

Alluminio nel tessuto cerebrale nell'autismo

Matthew Molda, Dorcas Umarb, Andrew Kingc, Christopher Exleya,*

a The Birchall Centre, Lennard-Jones Laboratories, Keele University, Staffordshire, ST5 5BG, United Kingdom

b Life Sciences, Keele University, Staffordshire, ST5 5BG, United Kingdom

c Department of Clinical Neuropathology, Kings College Hospital, London, SE5 9RS, United Kingdom

* Corresponding author.

<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.11.012>

Received 26 October 2017; Received in revised form 21 November 2017; Accepted 23 November 2017

* Corresponding author.

Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 46 (2018) 76–82

0946-672X/ © 2017 The Authors. Published by Elsevier GmbH. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Estratto

Il disturbo dello spettro autistico è un disordine dello sviluppo neurologico di eziologia sconosciuta. Si pensa che siano coinvolti sia la suscettibilità genetica sia i fattori ambientali tra cui le tossine ambientali. L'esposizione umana alla tossina ambientale dell'alluminio è stata collegata, seppur provvisoriamente, al disturbo dello spettro autistico. Qui abbiamo usato la spettrometria di assorbimento atomico a forno di grafite riscaldato trasversalmente per misurare, per la prima volta, il contenuto di alluminio del tessuto cerebrale da donatori con diagnosi di autismo. Abbiamo anche usato un fluoruro alluminio-selettivo per identificare l'alluminio nel tessuto cerebrale mediante microscopia a fluorescenza. Il contenuto di alluminio del tessuto cerebrale nell'autismo era costantemente alto. Il contenuto di alluminio medio (deviazione standard) in tutti i 5 individui per ciascun lobo era 3,82 (5,42), 2,30 (2,00), 2,79 (4,05) e 3,82 (5,17) µg/g di peso secco rispettivamente per i lobi occipitale, frontale, temporale e parietale. Questi sono alcuni dei valori più alti di alluminio nel tessuto cerebrale umano finora registrati e bisogna chiedersi perché, per esempio, il contenuto di alluminio del lobo occipitale di un bambino di 15 anni sarebbe di 8,74 (11,59) µg/g di peso secco? La microscopia a fluorescenza selettiva per l'alluminio è stata utilizzata per identificare l'alluminio nel tessuto cerebrale di 10 donatori. Mentre l'alluminio era associato nelle immagini con i neuroni sembrava essere presente intracellularmente in cellule simili a microglia e altre cellule infiammatorie non-neuronali nelle meningi, vascolarizzazione, materia grigia e bianca: La preminenza dell'alluminio intracellulare associata a cellule non-neuronali è stata un'osservazione eccezionale nel tessuto cerebrale autistico e può offrire indizi sia sull'origine dell'alluminio nel cervello sia su un ruolo putativo nel disturbo dello spettro autistico.

1. Introduzione

Il disturbo dello spettro autistico (ASD) è un gruppo di patologie del neurosviluppo di causa sconosciuta. È altamente probabile che sia i fattori genetici [1] sia quelli ambientali [2] siano associati all'insorgenza e al progresso dell'ASD, mentre i meccanismi alla base della sua eziologia dovrebbero essere multifattoriali [3-6]. L'esposizione umana all'alluminio è stata implicata nell'ASD e le conclusioni sono equivoche [7-10]. Finora la maggior parte degli studi ha utilizzato i capelli come indicatore dell'esposizione umana all'alluminio, mentre l'alluminio nel sangue e nelle urine è stato anche utilizzato in misura molto più limitata. I vaccini pediatrici che includono un adiuvante di alluminio sono una misura indiretta dell'esposizione del lattante all'alluminio e il loro crescente utilizzo è stato direttamente correlato alla crescente diffusione di ASD [11]. Modelli animali di ASD continuano a sostenere una connessione con l'alluminio e in particolare con gli adiuvanti di alluminio utilizzati nelle vaccinazioni umane [12]. Fino ad ora non ci sono precedenti segnalazioni di alluminio nel tessuto cerebrale da donatori morti con una diagnosi di ASD. Abbiamo misurato l'alluminio nel tessuto cerebrale nell'autismo e identificato la posizione dell'alluminio in questi tessuti.

2. Materiali e metodi

2.1 Misurazione dell'alluminio nei tessuti cerebrali

L'approvazione etica è stata ottenuta insieme ai tessuti della Oxford Brain Bank (Banca del Cervello di Oxford) (15/SC/0639). Campioni di corteccia di circa 1g di peso congelato da lobi temporali, frontali, parietali e occipitali e dall'ippocampo (solo 0,3g) sono stati ottenuti da 5 individui con ASD con diagnosi confermata con questionario ADI-R (Autism Diagnostic Interview-Revised), 4 maschi e 1 femmina, di età dai 15 ai 50 anni (Tabella 1). Il contenuto di alluminio di questi tessuti è stato misurato con un metodo stabilito e pienamente convalidato [13] che qui viene descritto solo brevemente. I tessuti scongelati sono stati tagliati usando una lama di acciaio inossidabile per dare campioni individuali di circa 0,3g (3 repliche di campione per ogni lobo eccetto per l'ippocampo in cui il tessuto è stato usato come fornito) peso umido ed essiccati a un peso costante a 37° C. I tessuti essiccati e pesati sono stati digeriti (mineralizzati?) in un forno a microonde (MARS Xpress CEM Microwave Technology Ltd.) in una miscela di 1ml 5.8 M HNO₃ [Grado Analitico di Fisher (Fisher Analytical Grade)] e 1ml 30% p / v H₂O₂ (BDH Aristar). I digest (campioni) erano chiari senza residui grassi e, al raffreddamento, sono stati portati fino a 5 ml di volume usando acqua ultrapura (cond. <0,067 µS / cm). L'alluminio totale è stato misurato in ciascun campione mediante spettrometria di assorbimento atomico a forno di grafite riscaldato trasversalmente (TH GFAAS) utilizzando standard a matrice abbinata e un programma analitico consolidato insieme a dati di garanzia di qualità precedentemente convalidati [13].

Tabella 1

Contenuto di alluminio di tessuto cerebrale dei lobi occipitale (O), frontale (F), temporale (T) e parietale (P) e ippocampo (H) di 5 donatori con una diagnosi di disturbo dello spettro autistico.

ID Donatore	Genere	Età	Lobo	Repliche	[Al] µg/g	
A1	F	44	O	1	0,49	
				2	4,26	
				3	0,33	
					Media (SD)	1,69 (2,22)
			F	1	0,98	
				2	1,10	
				3	0,95	
					Media (SD)	1,01 (0,08)
			T	1	1,13	
				2	1,16	
				3	1,12	
					Media (SD)	1,14 (0,02)
			P	1	0,54	
				2	1,18	
				3	NA	
		Media (SD)	0,86 (0,45)			
		Tutto	Media (SD)	1,20 (1,06)		
A2	M	50	O	1	3,73	
				2	7,87	
				3	3,49	
					Media (SD)	5,03 (2,46)
			F	1	0,86	
				2	0,88	
				3	1,65	
					Media (SD)	1,13 (0,45)
			T	1	1,31	
				2	1,02	
				3	2,73	
					Media (SD)	1,69 (0,92)
			P	1	18,57	
				2	0,01	
				3	0,64	
		Media (SD)	6,41 (10,54)			
		Ipo.	1	1,42		
		Tutto	Media (SD)	3,40 (5,00)		

A3	M	22	O	1	0,64
				2	2,01
				3	0,66
				Media (SD)	1,10 (0,79)
			F	1	1,72
				2	4,14
				3	2,73
				Media (SD)	2,86 (1,22)
			T	1	1,62
				2	4,25
				3	2,57
				Media (SD)	2,81 (1,33)
			P	1	0,13
				2	3,12
3	5,18				
Media (SD)	2,82 (1,81)				
Tutto	Media (SD)	2,40 (1,58)			
A4	M	15	O	1	2,44
				2	1,66
				3	22,11
				Media (SD)	8,74 (11,59)
			F	1	1,11
				2	3,23
				3	1,66
				Media (SD)	2,00 (1,10)
			T	1	1,10
				2	1,83
				3	1,54
				Media (SD)	1,49 (0,37)
			P	1	1,38
				2	6,71
3	NA				
Media (SD)	4,05 (3,77)				
Ipo	1	0,02			
Tutto	Media (SD)	3,73 (6,02)			
A5	M	33	O	1	3,13
				2	2,78
				3	1,71
				Media (SD)	2,54 (0,74)
			F	1	2,97
				2	8,27
				3	NA
				Media (SD)	5,62 (3,75)
			T	1	1,71
				2	1,64
				3	17,10
				Media (SD)	6,82 (8,91)
			P	1	5,53
				2	2,89
3	NA				
Media (SD)	4,21 (1,87)				
Tutto	Media (SD)	4,77 (4,79)			

2.2 Microscopia a fluorescenza

Tutti i prodotti chimici provenivano da Sigma Aldrich (Regno Unito), salvo diversa indicazione. Laddove il tessuto frontale, parietale, occipitale, temporale e ippocampale disponibile da 10 donatori (3 femmine e 7 maschi) con una diagnosi di ASD è stato fornito dall'Oxford Brain Bank come tre sezioni in serie di tessuto cerebrale racchiuso in paraffina da 5 μm di spessore per lobo per ogni donatore (Tabella S1). Le sezioni di tessuto montate su vetrini sono state collocate in un supporto per vetrini e decerate e reidratate tramite

trasferimento attraverso 250 mL dei seguenti reagenti: 3 minuti in Histo-Clear (National Diagnostics, US), 1 minuto in Histo-Clear fresco, 2 min in etanolo 100% v/v (grado HPLC), e 1 minuto in etanolo a 95, 70, 50 e 30% v / v seguito da reidratazione in acqua ultrapura (cond. <0,067 μ S / cm) per 35 s. I vetrini sono stati agitati ogni 20 s in ciascun solvente e trasferiti su carta velina tra i trasferimenti per ridurre al minimo il trasferimento di solvente. Le sezioni di tessuto cerebrale reidratate sono state accuratamente tracciate con una penna PAP per la colorazione, al fine di formare una barriera idrofobica attorno alla periferia delle sezioni di tessuto. Tra la colorazione, le sezioni di tessuto sono state mantenute idratate con acqua ultrapura e conservate in camere di umidità, per evitare che le sezioni si seccino. La colorazione è stata scaglionata per consentire tempi di incubazione precisi delle sezioni di tessuto cerebrale. Abbiamo sviluppato e ottimizzato il fluoro lumogallio come una macchia selettiva per l'alluminio nelle cellule [14] e nei tessuti umani [15]. Il lumogallio (4-cloro-3-(2,4-deidrossifenilazo)-2-idrossibenzene-1-acido solfonico, TCI Europe N.V. Belgio) è stato preparato a circa 1 mM tramite diluizione in un PIPES da 50 mM (acido 1,4-Piperazinadietansolfonico) tampone, regolato a pH 7,4 con NaOH. La colorazione con lumogallio è stata eseguita mediante l'aggiunta di 200 μ L della soluzione colorante a sezioni di tessuto cerebrale reidratate che sono state successivamente incubate a temperatura ambiente lontano dalla luce per 45 minuti. Le sezioni per l'analisi dell'autofluorescenza sono state incubate per 45 minuti in 200 μ L di solo tampone PIPES 50 mM, pH 7,4. Dopo la colorazione, vetrini contenenti sezioni di tessuto sono stati lavati sei volte con aliquote di 200 μ L di tampone PIPES 50 mM, pH 7,4, prima di risciacquare per 30 s in acqua ultrapura. Le sezioni seriali numerate 1 e 2 per ciascun lobo sono state incubate in un tampone PIPES da 50 mM, pH 7,4 o colorate con 1 mM di lumogallio nello stesso tampone, rispettivamente, per assicurare la coerenza tra i tessuti del donatore. Tutte le sezioni di tessuto sono state successivamente montate sotto il coprioggetto di vetro usando il mezzo di montaggio acquoso, Fluoromount™. I vetrini sono stati conservati orizzontalmente per 24 ore a 4° C al riparo dalla luce, prima dell'analisi tramite microscopia a fluorescenza.

Le sezioni di tessuto cerebrale umano colorate e montate sono state analizzate mediante l'uso di un microscopio a fluorescenza Olympus BX50, dotato di un illuminatore verticale e dell'accessorio per fluorescenza a luce riflessa BX-FLA (fonte di mercurio). Le microfotografie sono state ottenute con ingrandimento X 400 mediante l'uso di un obiettivo X 40 Plan-Fluorite (Olympus, Regno Unito). Le microfotografie dell'alluminio reattivo al lumogallio e relative autofluorescenze sono state ottenute mediante l'uso di un cubo filtrante di fluorescenza U-MNIB3 (eccitazione: 470-495 nm, specchio dicromatico: 505 nm, emissione a passo lungo: 510 nm, Olympus, Regno Unito). L'esposizione e i valori di trasmissione sono stati fissati attraverso le rispettive condizioni di trattamento della colorazione e le immagini sono state ottenute utilizzando la suite software CellD (Olympus, Soft Imaging Solutions, SiS, GmbH). Le regioni reattive al lumogallio identificate attraverso lo screening sequenziale delle sezioni di tessuto cerebrale umano colorato sono state ulteriormente riprese su sezioni seriali di autofluorescenza, per valutare il contributo del fluoroforo. La successiva fusione dei canali a fluorescenza e a campo chiaro è stata ottenuta utilizzando Photoshop (Adobe Systems Inc. US). Nel determinare la colorazione intracellulare il tipo di cellule colorate è stato stimato in base alla loro dimensione e forma nel contesto dell'area cerebrale campionata e del loro ambiente cellulare circostante.

3. Risultati

3.1 Contenuto di alluminio dei tessuti cerebrali

Il contenuto di alluminio di tutti i tessuti variava da 0,01 (il limite della quantificazione) a 22,11 μ g / g di peso secco. (Tabella 1). Il contenuto di alluminio per l'intero cervello (n = 4 o 5 a seconda della disponibilità di tessuto di ippocampo) variava da 1,20 (1,06) μ g / g di peso secco per la femmina donatrice di 44 anni (A1) a 4,77 (4,79) μ g / g di peso secco per un donatore maschio di anni 33 (A5). Precedenti misurazioni dell'alluminio del cervello, tra cui il nostro studio di 60 cervelli [13], ci hanno permesso di definire categorie vaghe di contenuto di alluminio cerebrale a partire da $\leq 1,00$ μ g / g di peso secco come patologicamente benigno (al contrario di "normale"). Circa il 40% dei tessuti (24/59) aveva un contenuto di alluminio considerato come patologico ($\geq 2,00$ μ g / g peso secco), mentre circa il 67% di questi tessuti aveva un contenuto di alluminio

considerato patologicamente significativo ($\geq 3,00 \mu\text{g} / \text{g}$ secco). Il cervello di tutti e 5 i soggetti aveva almeno un tessuto con un contenuto patologicamente significativo di alluminio. Il cervello di 4 individui aveva almeno un tessuto con un contenuto di alluminio $\geq 5,00 \mu\text{g} / \text{g}$ di peso secco mentre 3 di questi avevano almeno un tessuto con un contenuto di alluminio $\geq 10,00 \mu\text{g} / \text{g}$ di peso secco (Tabella 1). Il contenuto medio di alluminio (SD) in tutti i 5 individui per ciascun lobo era 3,82 (5,42), 2,30 (2,00), 2,79 (4,05) e 3,82 (5,17) $\mu\text{g} / \text{g}$ di peso secco rispettivamente per i lobi occipitale, frontale, temporale e parietale. Non ci sono state differenze statisticamente significative nel contenuto di alluminio tra nessuno dei 4 lobi.

3.2 Fluorescenza di alluminio nei tessuti cerebrali

Abbiamo esaminato sezioni cerebrali seriali di 10 individui (3 femmine e 7 maschi) che sono morti con una diagnosi di ASD e hanno registrato la presenza di alluminio in questi tessuti (Tabella S1). L'eccitazione del complesso di alluminio e lumogallio emette una caratteristica fluorescenza arancione che appare sempre più giallo brillante a intensità di fluorescenza più elevate. L'alluminio, identificato come deposito reattivo al lumogallio, è stato registrato in almeno un tessuto in tutti e 10 gli individui. L'autofluorescenza delle sezioni seriali immediatamente adiacenti ha confermato che la fluorescenza del lumogallio è indicativo dell'alluminio.

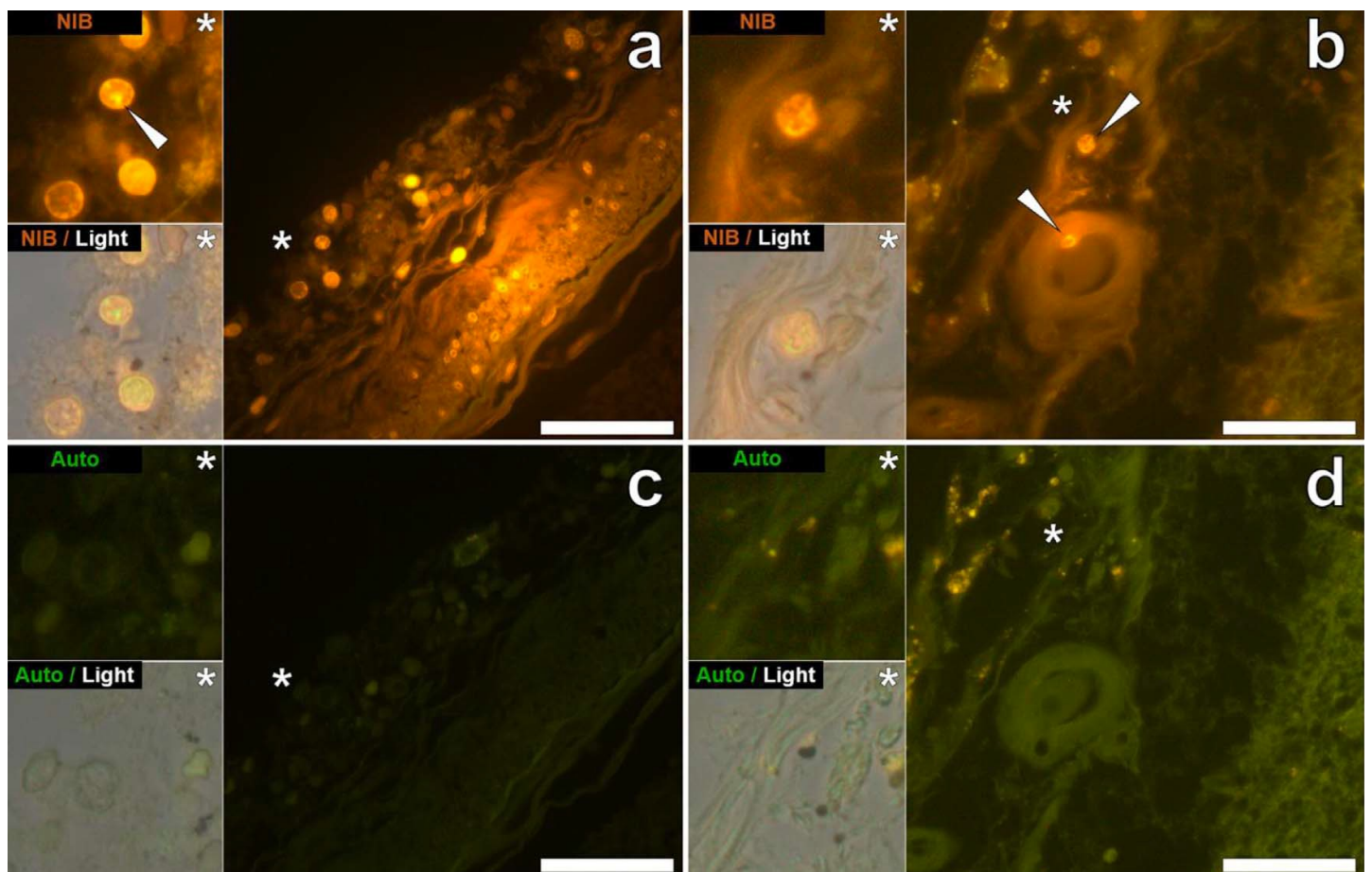


Fig. 1. Cellule infiammatorie mononucleate (probabilmente linfociti) nelle membrane leptomeningei nell'ippocampo e nel lobo frontale di un donatore maschio di 50 anni (A2), con diagnosi di autismo. L'alluminio intracellulare reattivo al lumogallio è stato notato mediante emissione di fluorescenza arancione puntata (freccie bianche) nell'ippocampo (a) e nel lobo frontale (b). Un'emissione di autofluorescenza verde è stata rilevata nella sezione seriale adiacente non colorata (5 μm) (c & d). I pannelli superiore e inferiore raffigurano inserti ingranditi contrassegnati da asterischi, del canale di fluorescenza e la sovrapposizione di campi luminosi. Ingrandimento x 400, barre di scala: 50 μm . (Per l'interpretazione dei riferimenti al colore nella legenda di questa figura, il lettore si riferisca alla versione web di questo articolo.)

I depositi di alluminio erano significativamente più prevalenti nei maschi (129 su 7 individui) rispetto alle femmine (21 su 3 individui). L'alluminio è stato trovato sia nella materia bianca (62 depositi) che grigia (88 depositi). Nelle femmine la maggior parte dei depositi di alluminio è stata identificata come extracellulare

(15/21) mentre nei maschi si è verificato il contrario con 80 su 129 depositi intracellulari. Ci sono state fornite solo 3 sezioni seriali di ciascun tessuto e quindi non siamo stati in grado di fare alcuna colorazione per la morfologia generale, il che significava che non era sempre possibile determinare quale sottotipo di cellule stava mostrando fluorescenza di alluminio. Globuli bianchi mononucleari carichi di alluminio, probabilmente linfociti, sono stati identificati nelle meningi e verosimilmente nel processo di ingresso nel tessuto cerebrale dal sistema linfatico (Fig.). L'alluminio potrebbe essere chiaramente visto all'interno delle cellule sia come depositi puntati distinti che come fluorescenza gialla brillante. L'alluminio era situato in cellule infiammatorie associate alla vascolarizzazione (Figura 2). In un caso, quello che sembra un linfocita o monocita carico di alluminio è stato notato all'interno di un lume dei vasi sanguigni circondato da globuli rossi, mentre un altro probabile linfocita che mostra una fluorescenza gialla intensa è stato notato nella tunica avventizia (Figura 2b). Cellule gliali comprendenti cellule simili a microglia che mostravano fluorescenza di alluminio positiva erano spesso osservate nel tessuto cerebrale in prossimità di depositi extracellulari colorati con alluminio (Figure 3e 4). Depositi distinti di alluminio di circa 1µm di diametro erano chiaramente visibili nei corpi sia delle cellule gliali rotonde che ameboidi (ad esempio Fig. 3b). Alluminio intracellulare è stato identificato in probabili neuroni e cellule simili alla glia e spesso nelle vicinanze o co-localizzati con lipofuscina (Figura 5). La microscopia in fluorescenza con alluminio-selettivo è riuscita a identificare l'alluminio in posizioni extracellulari e intracellulari nei neuroni e nelle cellule non-neuronali e in tutti i tessuti cerebrali studiati (Figure 1-5). Il metodo identifica solo l'alluminio come evidenziato da ampie aree di tessuto cerebrale senza alcuna caratteristica fluorescenza positiva all'alluminio (figura S1).

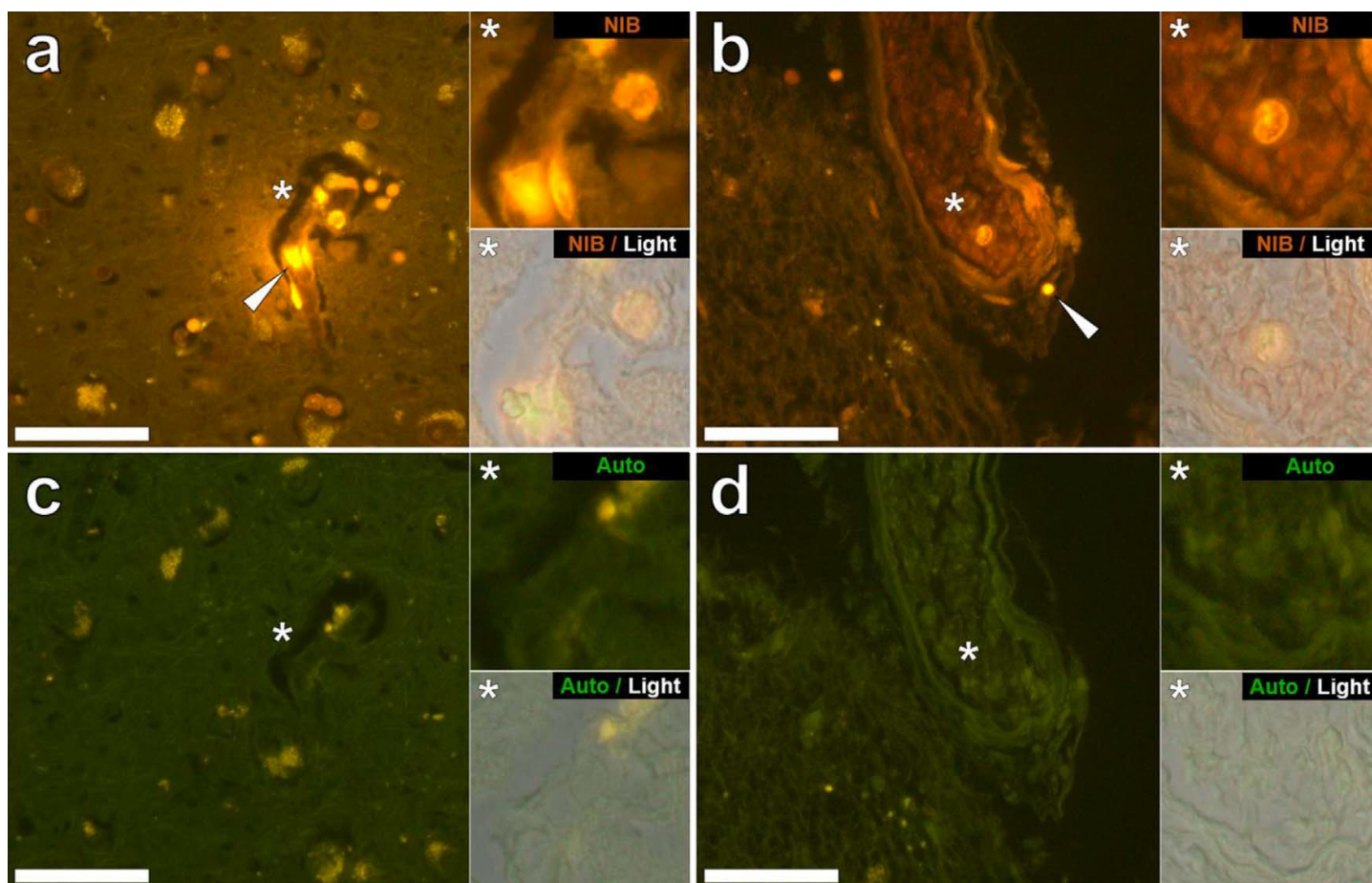


Fig.2 Alluminio intracellulare reattivo al lumogallio nella vascolatura dell'ippocampo di un donatore maschio di 50 anni (A2), con diagnosi di autismo. Sono evidenziate cellule infiammatorie cariche di alluminio osservate nell'ippocampo nella parete del vaso sanguigno (freccia bianca) (a) e raffiguranti fluorescenza arancione puntata nel lume (b). È stata anche rilevata una cellula infiammatoria nella tunica avventizia del vaso (freccia bianca) (b). L'alluminio reattivo al lumogallio è stato identificato tramite un'emissione di fluorescenza arancione (a & b) rispetto a un'emissione di autofluorescenza verde (c & d) della sezione seriale adiacente non colorata (5 µm). I pannelli superiore e inferiore raffigurano inserti ingranditi contrassegnati da asterischi, del canale di fluorescenza e della sovrapposizione di campi luminosi. Ingrandimento x 400, barre di scala: 50 µm. (Per l'interpretazione dei riferimenti al colore nella legenda di questa figura, il lettore si riferisca alla versione web di questo articolo.)

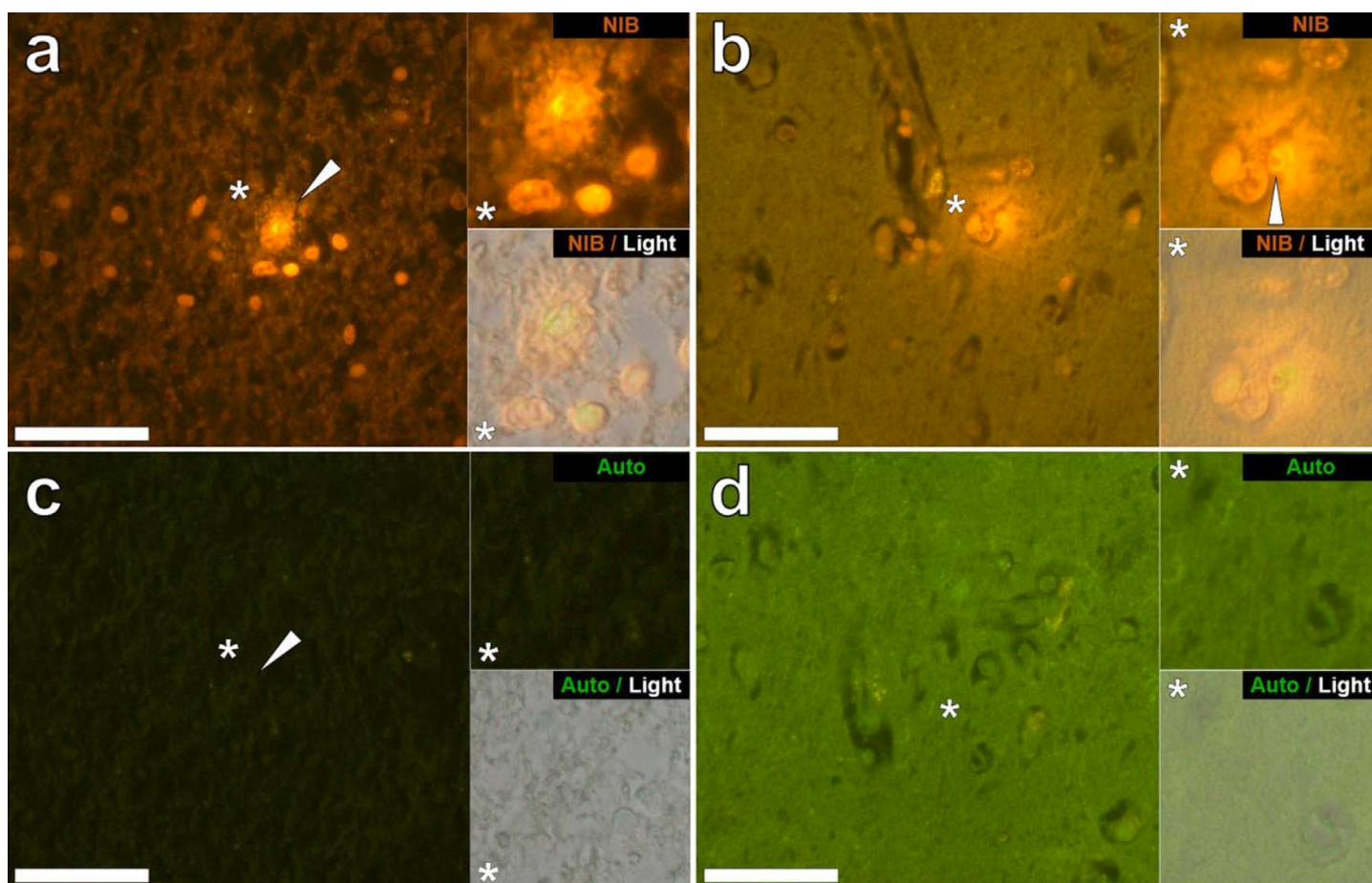


Fig. 3 Alluminio intracellulare in cellule morfologicamente compatibili con glia e neuroni nell'ippocampo di un donatore maschio di 15 anni (A4), con diagnosi di autismo. Alluminio cellulare reattivo al lumogallio è evidenziato all'interno di cellule gliali nell'ippocampo (a) e mentre produce una fluorescenza arancione puntata in glia che circonda una probabile cellula neuronale all'interno del lobo parietale (b) (freccie bianche). L'alluminio reattivo al lumogallio è stato identificato tramite un'emissione di fluorescenza arancione (a & b) rispetto a un'emissione di autofluorescenza verde (c & d) della successiva sezione seriale non colorata (5 μm) (freccia bianca / asterisco). I pannelli superiore e inferiore raffigurano inserti ingranditi contrassegnati da asterischi, del canale di fluorescenza e della sovrapposizione di campi luminosi. Ingrandimento x 400, barre di scala: 50 μm . (Per l'interpretazione dei riferimenti al colore nella legenda di questa figura, il lettore si riferisca alla versione web di questo articolo.)

4. Discussione

Il contenuto di alluminio dei tessuti cerebrali dei donatori con una diagnosi di ASD era estremamente alto (Tabella 1). Mentre c'era una significativa variabilità inter-tissutale, inter-lobo e inter-soggetto, il contenuto medio di alluminio per ogni lobo in tutti e 5 gli individui tendeva verso l'estremità più alta di tutte le precedenti (storiche) misurazioni del contenuto di alluminio del cervello, compresi i disturbi iatrogeni come la encefalopatia dialitica [13, 15, 16-19]. Tutti e 4 i donatori di sesso maschile presentavano concentrazioni di alluminio del cervello significativamente più elevate rispetto alla singola donatrice femminile. Abbiamo registrato alcuni dei più alti valori per il contenuto di alluminio nel cervello mai misurati in tessuti sani o malati, in questi donatori maschi con ASD compreso i valori di 17.10, 18.57 e 22.11 $\mu\text{g} / \text{g}$ di peso secco. (Tabella 1). Ciò che discrimina questi dati da altre analisi di alluminio del cervello in altre malattie è l'età dei donatori con ASD. Perché, per esempio, un ragazzo di 15 anni ha un contenuto di alluminio così alto nei suoi tessuti cerebrali? Non ci sono dati comparabili nella letteratura scientifica, i più vicini sono dati altrettanto alti per un maschio di 42 anni con malattia di Alzheimer familiare (FAD) [19].

La microscopia a fluorescenza alluminio-selettiva ha fornito indicazioni sulla posizione dell'alluminio in questi tessuti cerebrali ASD (Figure 1-5). L'alluminio è stato trovato sia nella sostanza bianca che grigia e in entrambe le posizioni extra- e intracellulari. Questi ultimi erano particolarmente preminenti in questi tessuti ASD. Le cellule che apparivano morfologicamente non neuronali e fortemente cariche di alluminio sono state identificate in associazione con le meningi (Fig. 1), con la vascolarizzazione (Figura 2) e all'interno della

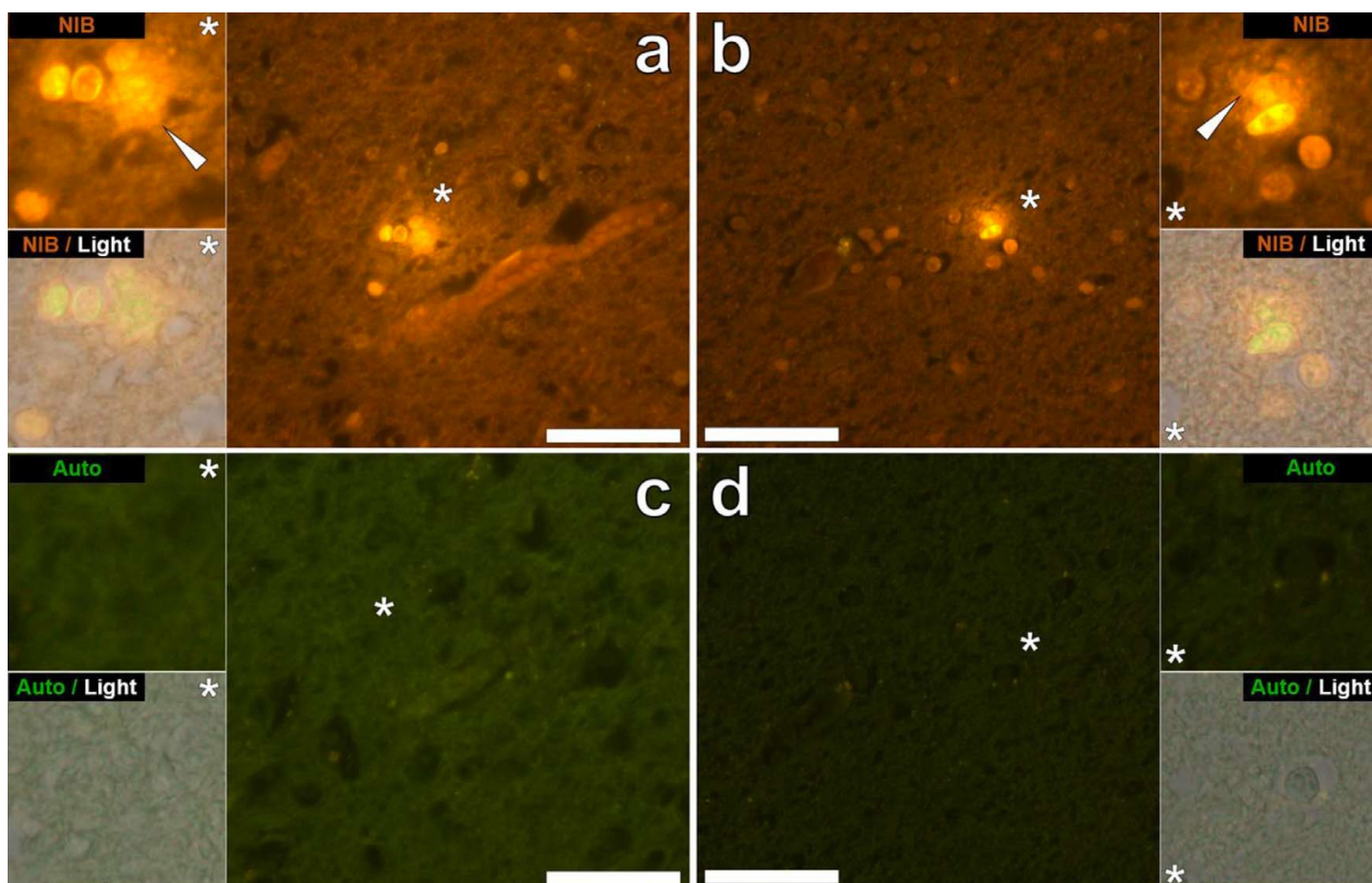


Fig. 4 Alluminio intracellulare a cellule morfologicamente compatibili con microglia all'interno dei lobi parietali e temporali di donatori maschi di 29 anni (A8) e di 15 anni (A4), con diagnosi di autismo. Alluminio extracellulare reattivo al lumogallio (freccie bianche) mentre producono un'emissione di fluorescenza arancione è stato osservato intorno alle probabili cellule microgliali nei lobi parietale (a) e temporale (b) dei donatori A8 e A4 rispettivamente. Sezioni seriali adiacenti non colorate (5 μm), hanno prodotto una debole emissione di autofluorescenza verde dell'identica area fotografata della materia bianca (c) e grigia (d) dei rispettivi lobi. I pannelli superiore e inferiore raffigurano inserti ingranditi contrassegnati da asterischi, del canale di fluorescenza e della sovrapposizione di campi luminosi. Ingrandimento x 400, barre di scala: 50 μm . (Per l'interpretazione dei riferimenti al colore nella legenda di questa figura, il lettore si riferisca alla versione web di questo articolo.)

materia grigia e bianca (Figure 3-5). Alcune di queste cellule sembravano gliali (probabilmente astrocitarie) mentre altre avevano nuclei allungati che avevano l'aspetto della microglia [5]. Questi ultimi erano a volte osservati nell'ambiente della deposizione di alluminio extracellulare. Ciò implica che l'alluminio abbia in qualche modo attraversato la barriera emato-encefalica e che sia stata prelevata da una cellula nativa, cioè la cellula microgliale. È interessante notare che la presenza di occasionali cellule infiammatorie cariche di alluminio nel sistema vascolare e nelle leptomeningi apre la possibilità di una modalità separata di ingresso dell'alluminio nel cervello, cioè intracellulare. Tuttavia, per consentire a questo secondo scenario di essere significativo, ci si aspetterebbe che un qualche tipo di danno intracerebrale si verificasse per consentire l'uscita dei linfociti e dei monociti dal sistema vascolare [20]. L'identificazione qui di cellule non neuronali comprendenti cellule infiammatorie, cellule gliali e microglia cariche di alluminio è un'osservazione eccezionale per l'ASD. Ad esempio, la maggior parte dei depositi di alluminio identificati nel tessuto cerebrale nella FAD erano extracellulari e quasi sempre associati alla sostanza grigia [19]. L'alluminio è citotossico [21] e la sua associazione con cellule infiammatorie nel sistema vascolare, le meningi e il sistema nervoso centrale è improbabile che sia benigno. Le microglia caricate pesantemente con alluminio mentre potenzialmente rimangono vitali, almeno per qualche tempo, saranno inevitabilmente compromesse e si ritiene che le microglia disfunzionali siano coinvolte nell'eziologia dell'ASD [22], ad esempio nella distruzione della potatura sinaptica [23]. Inoltre, il suggerimento dai dati qui riportati che l'ingresso di alluminio nel cervello attraverso cellule immunitarie che circolano nel sangue e nella linfa è accelerato nell'ASD potrebbe iniziare a spiegare la precedente domanda sul perché c'era così tanto alluminio nel cervello di un ragazzo quindicenne con ASD.

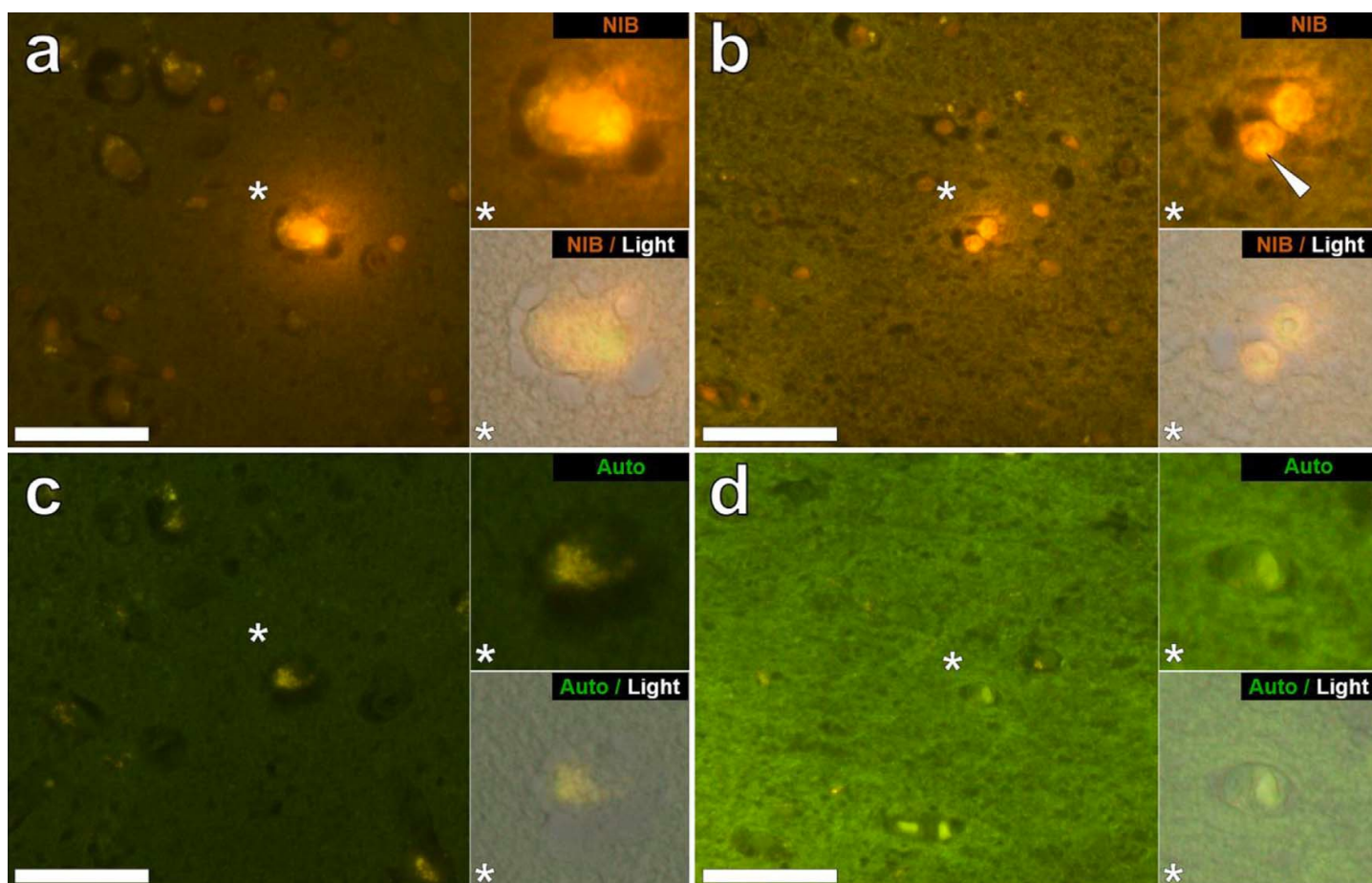


Fig. 5 Alluminio reattivo al lumogallio in probabili cellule neuronali e gliali nel lobo temporale e nell'ippocampo di un donatore maschio di 14 anni (A10), con diagnosi di autismo. Alluminio intraneuronale nel lobo temporale (a) è stato identificato tramite un'emissione di fluorescenza arancione, co-depositata con lipofuscina come rivelato da una fluorescenza gialla nella sezione seriale (5) di autofluorescenza non colorata (5 μm) (c). La fluorescenza arancione intracellulare puntata (freccia bianca) è stata osservata nella glia nell'ippocampo (b) mentre produce un'emissione di autofluorescenza verde sulla sezione non colorata (d). I pannelli superiore e inferiore raffigurano inserti ingranditi contrassegnati da asterischi, del canale di fluorescenza e della sovrapposizione di campi luminosi. Ingrandimento x 400, barre di scala: 50 μm . (Per l'interpretazione dei riferimenti al colore nella legenda di questa figura, il lettore si riferisca alla versione web di questo articolo.)

Una limitazione del nostro studio è il numero limitato di casi che erano disponibili per lo studio e la disponibilità limitata di tessuti. Riguardo a quest'ultimo, avere accesso a solo 1g di tessuto congelato e solo sezioni seriali di tessuto fisso per lobo sarebbe normalmente percepito come una limitazione significativa. Certamente, se non avessimo identificato depositi significativi di alluminio in un campione così piccolo (il cervello medio pesa tra 1500 e 2000 g) di tessuto cerebrale, una tale scoperta sarebbe equivoca. Tuttavia, il fatto che abbiamo trovato alluminio in ogni campione di tessuto cerebrale, congelato o fisso, suggerisce molto fortemente che le persone con una diagnosi di ASD hanno livelli straordinariamente elevati di alluminio nel loro tessuto cerebrale e che questo alluminio è preminentemente associato a cellule non neuronali comprendenti microglia e altri monociti infiammatori.

5. Conclusioni

Abbiamo fatto le prime misurazioni di alluminio nel tessuto cerebrale nell' ASD e abbiamo dimostrato che il contenuto di alluminio del cervello è straordinariamente alto. Abbiamo identificato alluminio nel tessuto cerebrale sia extracellulare che intracellulare con quest'ultimo che coinvolge sia i neuroni che le cellule non neuronali. La presenza di alluminio nelle cellule infiammatorie nelle meningi, nella vascolarizzazione, nella materia grigia e bianca è un'osservazione eccezionale e potrebbe implicare l'alluminio nell'eziologia dell' ASD.

Conflitto di interessi

Gli autori dichiarano di non avere alcun conflitto di interessi.

Ringraziamenti

La ricerca è finanziata da un sussidio del Children's Medical Safety Research Institute (CMSRI) (Istituto di Ricerca della Sicurezza Medica sui Bambini), una fondazione di ricerca senza fini di lucro con sede a Washington, negli Stati Uniti.

Appendice A. Dati supplementari

I dati supplementari associati a questo articolo possono essere trovati, nella versione online, all'indirizzo <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.11.012>.

Riferimenti

- [1] A. Krishnan, R. Zhang, V. Yao, C.L. Theesfeld, A.K. Wong, et al., Genome-wide prediction and functional characterisation of the genetic basis of autism spectrum disorder, *Nat. Neurosci.* 19 (2016) 1454–1462.
- [2] L.A. Sealey, B.W. Hughes, A.N. Sriskanda, J.R. Guest, A.D. Gibson, et al., Environmental factors in the development of autism spectrum disorders, *Environ. Int.* 88 (2016) 288–298.
- [3] R. Koyama, Y. Ikegaya, Microglia in the pathogenesis of autism spectrum disorders, *Neurosci. Res.* 100 (2015) 1–5.
- [4] Q. Li, J.-M. Zhou, The microbiota-gut-brain axis and its potential therapeutic role in autism spectrum disorder, *Neuroscience* 324 (2016) 131–139.
- [5] C. Kaur, G. Rathnasamy, E.-A. Ling, Biology of microglia in the developing brain, *J. Neuropathol Exp. Neurol.* 76 (2017) 736–753.
- [6] M. Varghese, N. Keshav, S. Jacot-Descombes, T. Warda, B. Wicinski, et al., Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models, *Acta Neuropathol.* 134 (2017) 537–566.
- [7] H. Yasuda, Y. Yasuda, T. Tsutsui, Estimation of autistic children by metallomics analysis, *Sci. Rep.* 3 (2013) 1199.
- [8] F.E.B. Mohamed, E.A. Zaky, A.B. El-Sayed, R.M. Elhossieny, S.S. Zahra, et al., Assessment of hair aluminium, lead and mercury in a sample of autistic Egyptian children: environmental risk factors of heavy metals in autism, *Behav. Neurol.* (2015) 545674 (Art).
- [9] M.H. Rahbar, M. Samms-Vaughn, M.R. Pitcher, J. Bressler, M. Hessabi, et al., Role of metabolic genes in blood aluminium concentrations of Jamaican children with and without autism spectrum disorder, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13 (2016) 1095.
- [10] A.V. Skalny, N.V. Simashkova, T.P. Klyushnik, A.R. Grabeklis, I.V. Radysh, et al., Analysis of hair trace elements in children with autism spectrum disorders and communication disorders, *Trace Elem. Med. Biol.* 177 (2017) 215–223.
- [11] L. Tomljenovic, C.A. Shaw, Do aluminium vaccine adjuvants contribute to the rising prevalence of autism? *J. Inorg. Biochem.* 105 (2011) 1489–1499.
- [12] C.A. Shaw, Y. Li, L. Tomljenovic, Administration of aluminium to neonatal mice in vaccine-relevant amounts is associated with adverse long term neurological outcomes, *J. Inorg. Biochem.* 128 (2013) 237–244.
- [13] E. House, M. Esiri, G. Forster, P. Ince, C. Exley, Aluminium, iron and copper in human brain tissues donated to the medical research council's cognitive function and ageing study, *Metallomics* 4 (2012) 56–65.
- [14] M. Mold, H. Eriksson, P. Siesjö, A. Darabi, E. Shardlow, C. Exley, Unequivocal identification of intracellular aluminium adjuvant in a monocytic THP-1 cell line, *Sci. Rep.* 4 (2014) 6287.
- [15] A. Mirza, A. King, C. Troakes, C. Exley, The identification of aluminium in human brain tissue using lumogallion and fluorescence microscopy, *J. Alzh. Dis.* 54 (2016) 1333–1338.
- [16] C. Exley, M. Esiri, Severe cerebral congophilic angiopathy coincident with increased brain aluminium in a resident of Camelford, Cornwall UK, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 77 (2006) 877–879.
- [17] C. Exley, E.R. House, Aluminium in the human brain, *Monatsh. Chem.* 142 (2011) 357–363.
- [18] C. Exley, T. Vickers, Elevated brain aluminium and early onset Alzheimer's disease in an individual occupationally exposed to aluminium: a case report, *J. Med. Case Rep.* 8 (2014) 41.
- [19] A. Mirza, A. King, C. Troakes, C. Exley, Aluminium in brain tissue in familial Alzheimer's disease, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 40 (2017) 30–36.
- [20] R. Shechter, O. Miller, G. Yovel, N. Rosenzweig, A. London, et al., Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus, *Immunity* (38) 2013 555–569.
- [21] C. Exley, The toxicity of aluminium in humans, *Morphologie* 100 (2016) 51–55.
- [22] M.W. Salter, B. Stevens, Microglia emerge as central players in brain disease, *Nat. Med.* 23 (2017) 1018–1027.
- [23] U. Neniskyte, C.T. Gross, Errant gardeners: glial-cell-dependent synaptic pruning and neurodevelopmental disorders, *Nat. Rev. Neurosci.* 18 (2017) 658–670.