

LE INIEZIONI DI IDROSSIDO DI ALLUMINIO PORTANO A DEFICIT MOTORI E DEGENERAZIONE DEI MOTONEURONI

Christopher A. Shaw e Michael S. Petrik

ABSTRACT

La Sindrome della Guerra del Golfo è un disturbo multi-sistemico che ha colpito molti veterani degli eserciti occidentali nella guerra del Golfo del 1990-1991. Un certo numero delle persone colpite può mostrare deficit neurologici incluse varie disfunzioni cognitive e malattie dei motoneuroni, quest'ultima espressione è praticamente indistinguibile dalla classica sclerosi laterale amiotrofica (SLA), tranne che per l'età di esordio.

Questo "cluster" SLA rappresenta il secondo cluster SLA descritto in letteratura fino ad oggi. Possibili cause della Sindrome della Guerra del Golfo includono svariati adiuvanti del vaccino contro l'antrace e altri.

Il colpevole più probabile sembra essere l'idrossido di alluminio. In una serie iniziale di esperimenti, abbiamo esaminato la potenziale tossicità dell'idrossido di alluminio in topi CD-1 maschi di razza, iniettati per via sottocutanea in due dosi equivalenti a quelle umane. Dopo il sacrificio, i campioni del midollo spinale e della corteccia motoria sono stati esaminati mediante immunoistochimica. I topi trattati con alluminio hanno mostrato un aumento significativo dell'apoptosi dei motoneuroni e aumenti degli astrociti reattivi e della proliferazione microgliale all'interno del midollo spinale e della corteccia. La colorazione di Morin ha rilevato la presenza di alluminio nel citoplasma dei motoneuroni con alcuni neuroni che risultano positivi anche per la presenza di proteina tau iperfosforilata, un segno patologico di varie malattie neurologiche, tra cui il morbo di Alzheimer e la demenza frontotemporale. Una seconda serie di esperimenti è stata condotta su topi iniettati con sei dosi di idrossido di alluminio. Le analisi comportamentali in questi topi hanno rivelato una riduzione significativa di alcune funzioni motorie e una ridotta capacità di memoria spaziale. La neurotossicità dimostrata dell'idrossido di alluminio e la sua ubiquità relativa come adiuvante suggeriscono che un maggiore controllo da parte della comunità scientifica è giustificato.

INTRODUZIONE

Vari studi hanno stabilito una correlazione tra il servizio nella Guerra del Golfo (1990-1991) e un disturbo multisistemico comunemente definito sindrome del Golfo (*o Sindrome della Guerra del Golfo*). Inclusi nella Sindrome del Golfo (GWS) ci sono vari disturbi neurologici, tra cui un evidente gruppo di casi di sclerosi laterale amiotrofica [1-4]. Haley [3] ha descritto i classici sintomi della SLA come debolezza muscolare e deperimento, disturbi della parola e deglutizione, difficoltà di respirazione e fascicolazione nei veterani della Guerra del Golfo, anni dopo aver sviluppato per la prima volta altri sintomi di GWS. Diciassette dei 20 militari con diagnosi di Sindrome del Golfo e di SLA definita avevano meno di 45 anni, il più giovane di questi aveva 20 anni. Tutti i 20 pazienti presentavano segni di degenerazione del motoneurone superiore (regione motoria motrice o bulbare) e inferiore (midollo spinale). Nessuno di questi pazienti aveva una storia familiare di SLA o di altri disturbi neurodegenerativi. Horner et al. [2] hanno condotto uno studio clinico a livello nazionale per identificare i livelli di incidenza di SLA per il decennio successivo all'agosto del 1990 tra membri attivi del servizio militare. Centosette casi

confermati di SLA sono stati identificati su circa 2,5 milioni di militari idonei. Se standardizzata per la popolazione generale degli Stati Uniti del 1990, l'incidenza annuale media della SLA tra popolazione militare non dispiegata era di 1,4 per 100 000 persone all'anno rispetto all'incidenza generale della popolazione generalmente accettata di 1,5 casi di SLA ogni 100 000. Il tasso di incidenza di SLA tra la popolazione militare impiegata era di 3,6 per 100.000 persone / anno. Weisskopf et al. [4] hanno notato un aumento generale della SLA nelle popolazioni militari statunitensi risalenti a un certo numero di decenni indipendentemente dal conflitto.

SLA-GWS è uno dei soli due cluster di malattia SLA attualmente accettato come soddisfacente la definizione di un cluster. L'altra è la variante guamaniana della SLA descritta per la prima volta dopo la seconda guerra mondiale, denominata complesso di demenza con sclerosi laterale parkinsonista amiotropica (SLA-PDC). Questo spettro di disturbi, una volta presente con livelli di incidenza centinaia di volte superiori a quelli degli Stati Uniti continentali [5] (vedi Kurland, 1988, per revisione), veniva espresso in due modi. Il primo era come una forma quasi classica di SLA; il secondo era una forma di parkinsonismo associata a una demenza simile alla malattia di Alzheimer (PDC). Circa il 10% delle vittime ha sviluppato entrambi i disturbi, con il fenotipo SLA che in genere appare per primo. Gli studi su potenziali eziologie si sono incentrati sui fattori ambientali dando la massima attenzione alla fine al consumo di semi contenenti tossine della varietà locale di palma cicada [6] e all'alta concentrazione di alluminio nel suolo nel Guam meridionale [7]. Per quanto riguarda il vaccino AVA GWS-SLA, l'attenzione è stata recentemente rivolta al vaccino antrace adsorbito (AVA) e vari ingredienti del vaccino, in particolare gli adiuvanti noti e sospetti, l'idrossido di alluminio e lo squalene [8]. Un adiuvante è una sostanza aggiunta durante la produzione di vaccino progettata per aumentare in modo non specifico la risposta immunitaria a un antigene [9]. I composti di alluminio sono stati identificati per la prima volta come adiuvanti oltre 90 anni fa. Attualmente l'alluminio, in varie forme (idrossido di alluminio, fosfato di alluminio e solfato di alluminio), è l'adiuvante più comunemente autorizzato il cui uso è generalmente considerato sicuro sia dall'industria farmaceutica sia dalle varie agenzie governative [10]. Diversi studi non hanno riscontrato effetti avversi o a lungo termine sulla salute a causa di adiuvanti di alluminio [11-13] e la Food and Drug Administration (FDA) ha continuato la sua approvazione di lunga data per l'uso dell'alluminio in questo modo. Nonostante la lunga storia di uso diffuso, le interazioni fisico-chimiche tra i composti di alluminio e gli antigeni sono relativamente poco conosciute e i loro meccanismi di base rimangono relativamente non studiati [14]. Sembra inoltre che non siano stati condotti rigorosi studi sugli animali sulla potenziale tossicità dell'adiuvante alluminio. L'assenza di tali studi è peculiare data la ben nota osservazione che l'alluminio in generale può essere neurotossico in una serie di condizioni [15,16] e in particolare gli adiuvanti sono stati implicati in malattie neurologiche [17-19]. La tabella 1 mostra i risultati di precedenti studi che hanno trattato gli animali con idrossido di alluminio, elencando gli impatti risultanti sul sistema nervoso. Nel contesto dell'uso di alluminio nei vaccini, i valori di LD50 per l'idrossido di alluminio non sono stati finora pubblicati (J.T. Baker Schede di Sicurezza dei Materiali).

Tabella 1

Riassunto dei sintomi della SLA umana e GWS rispetto ai sintomi osservati nei topi e nei ratti trattati con alluminio. Questa tabella delinea anche le somiglianze tra la SLA umana e la Sindrome del Golfo.

ANIMALE	ETA'	DOSE	TIPO INIEZIONE	RISULTATI	RIFERIMENTO
Topi NIH femmine	4 settimane	315-335 µg / kg	i.p.	Livelli significativamente elevati di Al nel cervello	Redhead et al., 1991
Ratti lunghi Evan maschi e femmine	2 mesi	100 o 300 mg / kg / giorno	Orale	Capacità di apprendimento o significativamente ridotta e livelli elevati di Al nel cervello	Bilkei-Gorzo, 1993
Topi albini svizzeri maschi	Non indicati	~ 20 µg / kg / giorno	Orale	Livelli di Al nel cervello, rene e fegato significativamente elevati.	Sahin et al., 1994
Pzh: topi SFIS	Non indicato	1,0 mg ogni 2 settimane o 0,1 mg 5 giorni / settimana	i.p.	Livelli significativamente elevati di Al nel fegato e tibia (osso), ma non nel cervello.	Fiejka et al., 1996

In letteratura è stato anche osservato il potenziale di iniezioni di alluminio d'indurre la miofasciite macrofagica [20-22].

Una precedente pubblicazione ha esaminato la potenziale neurotossicità di diversi adiuvanti dei vaccini noti o sospetti [8]. Nel presente studio, ci concentreremo esclusivamente sull'impatto delle iniezioni di idrossido di alluminio sui comportamenti motori e cognitivi e sull'espressione di diverse forme di neuropatologia in un modello di topo in vivo.

2. Procedure sperimentali

2.1. Animali sperimentali

Nel nostro studio iniziale [8], sono stati utilizzati topi maschi adulti CD-1 (3 mesi) giovani (circa 35 g all'inizio dell'esperimento). Gli animali più giovani sono stati deliberatamente scelti per imitare l'età tipica del servizio durante la Guerra del Golfo [3]. Sono stati utilizzati quattro gruppi di iniezione sottocutanea (due iniezioni distanziate di 2 settimane): soluzione salina di controllo / tampone fosfato (PBS) (n = 10); idrossido di alluminio (n = 11); squalene (n = 10); e idrossido di alluminio e squalene (n = 10). L'attuale studio riferirà solo sui gruppi trattati con alluminio e gruppi di controllo di questa serie sperimentale. Una seconda serie di esperimenti è stata condotta su maschi CD-1 di 9 mesi che hanno ricevuto sei iniezioni di idrossido di alluminio per un periodo di 2 settimane. Questi topi, insieme ai controlli e ad altri gruppi di

trattamento (da riportare altrove), sono stati sottoposti a un regime di test comportamentale più rigoroso che verrà descritto di seguito. Sono in corso analisi istologiche dei midolli spinali e del cervello di questi topi.

Tutti gli animali in entrambi gli esperimenti sono stati singolarmente ingabbiati presso la struttura per la cura degli animali del Centro di ricerca Jack Bell a Vancouver, in Canada. Durante l'esperimento sono stati mantenuti una temperatura ambiente di 22 ° C e un ciclo di luce di 12/12 ore. Tutti i topi sono stati nutriti con il purè Purina® e hanno avuto accesso ad alimentazione e acqua ad libitum.

I topi di entrambi gli studi sono stati sacrificati con un sovradosaggio di alotano e perfusi transcardialmente con paraformaldeide al 4% (PFA). I tessuti del SNC venivano raccolti per l'esame istologico. I cervelli fissati e il midollo spinale di tutti i topi sono stati trasferiti in una soluzione di saccarosio / PBS al 30% durante la notte e poi congelati e conservati a -80 ° C fino al sezionamento. Tutti i blocchi di tessuto cerebrale / cordonale sono stati caricati nel composto Tissue-Tek con temperatura ottimale (O.C.T) (Sakura, Zoeterwoude, Paesi Bassi) e quindi sezionati mediante criostato in sezioni coronali di 30 µm. I midolli spinali erano sezionati a 25 µm nel piano trasversale. Le sezioni sono state sottoposte a crioprotezione in soluzione di glicole etilenico al 30% glicerolo-dibasico e sodio fosfato monobasico e mantenute congelate a -20 ° C fino al momento dell'uso.

2.2. Gli adiuvanti

Alhydrogel®, una sospensione di gel di alluminio ($\text{Al}(\text{OH})_3$), è stato usato come fonte di idrossido di alluminio. L'Alhydrogel è prodotto da Superfos Biosector a / s (Danimarca) ed è stato acquistato da SIGMA Canada.

2.2.1. Dosi

Per calcolare dosaggi umani approssimativi di idrossido di alluminio per i nostri esperimenti, abbiamo utilizzato le seguenti informazioni: Il vaccino AVA per uso umano è prodotto da Bioport Corporation, di Lansing, Michigan. Secondo le schede tecniche del Michigan Biologic Products Institute (MBPI, Lansing, Michigan, USA, il predecessore di Bioport), una singola dose di vaccino AVA contiene 2,4 mg di idrossido di alluminio (equivalente a 0,83 mg di alluminio). In base a un peso corporeo medio ipotizzato di 70-80 kg, la quantità per kg di peso corporeo sarebbe di circa 30-34 µg / kg. Soldati o civili che hanno ricevuto il vaccino avrebbero ricevuto tra 30-34 µg / kg (1 iniezione) e fino a ca. 200 µg / kg se sono state ricevute sei iniezioni.

Le iniezioni adiuvanti nei topi trattati sono state calibrate sulla base del peso medio degli animali per entrambi gli esperimenti. I topi CD-1 maschi di 3 mesi pesano ca. 35 g; a 9 mesi, il peso è di ca. 50 g. Nell'esperimento 1, abbiamo eseguito due iniezioni di una sospensione di idrossido di alluminio di (50 µg / kg) in un volume totale di 200 µL di PBS sterile (0,9%) a distanza di 2 settimane l'una dall'altra. I topi in questo esperimento avrebbero quindi ricevuto 100 µg / kg contro un probabile 68 µg / kg nell'uomo. Nell'esperimento 2, i topi hanno ricevuto sei iniezioni per un totale di 300 µg / kg di idrossido di alluminio per 2 settimane. I controlli in entrambi gli studi sono stati iniettati con 200 µL di PBS. Il sito di iniezione per la somministrazione umana è tipicamente sottocutaneo

sul muscolo deltoide. Per le iniezioni nei topi abbiamo usato un'iniezione sottocutanea nella pelle flaccida dietro al collo (la "collottola") per minimizzare il disagio e per facilitare l'iniezione.

2.3. Test comportamentali

Nel primo studio, i topi sono stati sottoposti a intervalli regolari a specifici test comportamentali della funzione motoria e cognitiva, tra cui sospensione della rete metallica (2 x / settimana), campo aperto (1 x / settimana) e labirinto d'acqua (1 x / settimana) oltre 6 mesi dopo il periodo di iniezione (vedere [22]). L'ordine in cui gli animali sono stati testati è stato randomizzato per ogni prova. Nel secondo studio, abbiamo condotto un esame comportamentale più dettagliato basato sul sistema automatizzato EthoVision (Noldus Information Technology, Seattle, WA) che utilizza una videocamera e un software di monitoraggio (Noldus EthoVision® 3.1). I movimenti individuali dei topi sono stati tracciati per 5 minuti in un campo aperto a intervalli settimanali. Il software consentiva misurazioni quantitative di una varietà di funzioni motorie, tra cui distanza percorsa, percentuale di tempo in movimento, velocità e una varietà di altre. Questi ultimi esperimenti continuarono per 28 settimane dopo le ultime iniezioni.

2.4. Misure istologiche (esperimento 1)

2.4.1. NeuN e caspasi-3 attiva

Come citato in Petrik et al. [8], sono stati utilizzati cinque topi da ciascun gruppo di trattamento. In ciascuna sono state esaminate sezioni multiple del cervello (n = 3) e del midollo spinale (n = 8) a diversi livelli. I livelli di intensità fluorescente di NeuN e caspasi-3 attivati sono stati utilizzati per identificare rispettivamente i neuroni e le cellule che muoiono per apoptosi. Le regioni di interesse sono state definite utilizzando i riferimenti di atlanti stereotassici del cervello del topo e del midollo spinale [23,24]. Tutte le sezioni sono state contate in modo imparziale con un obiettivo 40 x.

2.4.2. Colina acetiltransferasi (ChAT) e proteina acida fibrillare gliale (GFAP)

Come citato in Petrik et al. [8], l'anticorpo ChAT è stato utilizzato per identificare i motoneuroni colinergici nel cervello e nel midollo spinale [25,26]. GFAP è stato usato per marcare gli astrociti reattivi [27,28].

2.4.3. Iba-1 Un anticorpo policlonale di coniglio contro la molecola

dell'adattatore di legame al calcio ionizzato (Iba-1) (Wako, Richmond, VA, USA) è stato usato per colorare la microglia attivata [29]. Per l'immunolabeling fluorescente Iba-1, la colorazione ha seguito lo stesso protocollo utilizzato per la marcatura del GFAP ad eccezione della seguente modifica: le sezioni sono state incubate con anticorpi primari di coniglio -Iba-1 (in PBST con 1% NGS + 1% BSA; 1: 1000 diluizione) durante la notte a 4 ° C. Le sezioni sono state quindi incubate in anticorpo secondario di coniglio AlexaFluor 546™ per 2 ore a temperatura ambiente (Sonde molecolari, Eugene, OR, 1: 200).

2.4.4. Morin (3,5,7,2', 4'-pentaidrossiflavone, BDH) Morin (M4008-2G, Sigma) è un fluorocromo che forma un complesso fluorescente con l'alluminio fluorescente verde (con una lunghezza d'onda di eccitazione di 420 nm) [15,30] quando lo fa. Il saggio di fluorescenza alluminio-Morin è stato utilizzato per la

visualizzazione e il rilevamento dell'alluminio nel midollo spinale lombare e di altri tessuti del SNC nei presenti esperimenti. La colorazione di Morin è stata utilizzata come soluzione allo 0,2% in alcool etilico all'85% contenente acido acetico allo 0,5%. Tutte le sezioni caricate sono state dapprima lavate con PBS due volte per 5 minuti. Le sezioni sono state pretrattate per 10 minuti in una soluzione acquosa all'1% di acido cloridrico, risciacquate in acqua bidistillata (ddH₂O) due volte per 5 minuti e immerse nel colorante di Morin allo 0,2% per 10 minuti. Le sezioni sono state quindi lavate in ddH₂O due volte per 5 minuti, disidratate nel 70%, 90% e al 100% di alcol etilico (EtOH) ed pulite con il 100% di xilene. Tutte le sezioni sono state quindi caricate utilizzando il mezzo di montaggio Vectashield (Vector Laboratories), sigillate con smalto trasparente e lasciate asciugare all'aria.

2.4.5. Colorazione per proteina tau iper-fosforilata. La marcatura della proteina iper-fosforilata tau (anti-umana PHF-Tau, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) è stata determinata utilizzando il metodo diaminobenzidina (DAB) non fluorescente. I vetrini contenenti sezioni caricate del midollo spinale lombare sono stati prima risciacquati due volte PBS (2 × 5 min) prima di eseguire lo smascheramento dell'antigene. L'attività perossidasi endogena è stata estinta usando perossido di idrogeno allo 0,3% in metanolo per 20 minuti. Le sezioni sono state risciacquate due volte in PBS (2 × 5 min) prima di bloccarle a temperatura ambiente per 1 ora in M.O.M. reagente bloccante (Kit M.O.M. - perossidasi, cat # PK 2200, Vector Laboratories, Inc., Burlingame CA) seguito da un rapido risciacquo in PBS e un'incubazione di 5 minuti in M.O.M. soluzione diluente. L'anticorpo primario PHF-Tau è stato diluito 100 × in M.O.M. soluzione diluente e l'incubazione è stata condotta a temperatura ambiente per 1 ora. Dopo la fase di incubazione dell'anticorpo primario, i vetrini sono stati risciacquati due volte in PBS e quindi incubati nel M.O.M. Reagente IgG anti-topo biotinilato per 10 min. Le sezioni sono state risciacquate in PBS prima dell'incubazione con l'anticorpo secondario (kit Vectastain ABC Elite, cat # PK-6101) per 1 ora a temperatura ambiente, seguita dall'incubazione nei reagenti ABC di Vectorstain ABC per altri 30 minuti. I vetrini sono stati risciacquati nuovamente in 1 × PBS. Lo sviluppo del colore è stato ottenuto utilizzando la soluzione DAB Vector ImmPACT™ (cat # SK-4105). Quando il colore desiderato è stato raggiunto, i vetrini sono stati sciacquati in ddH₂O per 5 minuti e controcolorati con lo 0,1% in metilgreen per 5 minuti. Dopo la contro-colorazione, i vetrini sono stati risciacquati brevemente in ddH₂O, due lavaggi con etanolo al 95% e due lavaggi con etanolo al 100%. Le diapositive sono state lasciate asciugare prima di essere caricate su Permount® (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ).

2.5. Microscopia

Le sezioni del cervello e del midollo spinale trattate con anticorpi fluorescenti o DAB sono state osservate con un microscopio Zeiss Axiovert 200 M (Carl Zeiss Canada Limited, Toronto, ON, Canada) con ingrandimento 40 × e 100 × (sotto olio). DAPI (fluorescenza blu) è stato visualizzato con un filtro di assorbimento / emissione da 359/461 nm. Alexa Fluor 546™ (rosso) e IgG di coniglio DuoLuX™ (rosso) sono stati visualizzati con il filtro 556 557/572 573 nm. FITC è stato visualizzato con un filtro 490 494/520 a 525 nm. Le sezioni del midollo spinale cerebrale e lombare per l'istologia sono state scelte casualmente per ciascun gruppo. Quando si contava usando l'ingrandimento 40 × sono state catturate

due immagini per sezione del midollo spinale: ventrale sinistra, ventrale destra. Le immagini 40 × erano 350 × 275 μm e le immagini 100 × erano 50 × 115 μm. Le immagini sono state acquisite utilizzando il software AxioVision 4.3.

2.6. Criteri per la determinazione e la quantificazione delle cellule marcate

Per la quantificazione, sono state contate solo le cellule che erano a fuoco e completamente all'interno del campo visivo. Per eliminare la probabilità che la stessa cellula venisse contata due volte, le fette per ogni esperimento istologico sono state prelevate da un solo pozzetto della piastra di raccolta per garantire che le sezioni fossero distanti almeno 250 μm. Le regioni di interesse per il conteggio delle cellule sono state definite utilizzando segni di confine e punti di riferimento dagli atlanti stereotassici del midollo spinale e del cervello [39,40]. Nel midollo spinale, solo le cellule che erano anteriori al canale centrale e l'apice profondo dove le materie grigie e bianche si incontrano erano considerate parte delle corna ventrale; al contrario, solo le cellule che erano posteriori al canale centrale e l'apice profondo posteriore erano considerate parte delle corna dorsali. Questi criteri sono stati applicati indipendentemente dai segmenti spinali esaminati. Nel cervello, sono state contate solo le cellule trovate all'interno delle corrispondenti strutture cerebrali. Tutte le sezioni sono state contate in modo imparziale (una chiave di codice è stata assegnata agli animali per scopi di monitoraggio, ma non ha rivelato l'identità del trattamento che era stato prescritto all'animale).

2.7 Statistica

I valori per ciascun topo sulle singole attività e nei conteggi delle cellule sono stati utilizzati per calcolare la media \pm S.E.M. per ogni gruppo e condizione. I punteggi comportamentali e il conteggio delle cellule sono stati normalizzati al valore medio dei controlli. I mezzi sono stati confrontati usando ANOVA a una o due vie (Statistica, Statsoft Inc., Tulsa, OK, GraphPad Prism, San Diego, CA).

3. Risultati

A differenza di Petrik et al. [8] studio che mostrava una perdita di motoneuroni positivi alla ChAT nel cavo lombare di topi trattati con idrossido di alluminio, non c'era alcuna differenza significativa nella marcatura di ChAT o nella conta dei motoneuroni nei segmenti del midollo spinale cervicale o toracico (Fig. 1A e B). Tuttavia, il gruppo iniettato di alluminio ha mostrato un aumento molto significativo nell'espressione degli astrociti positivi al GFAP (70%) rispetto al gruppo di controllo (elencato come 100% per tutti i grafici; Fig. 1C) nel segmento cervicale del midollo spinale. Questi risultati GFAP rispecchiavano i risultati precedentemente riportati nel cavo lombare.

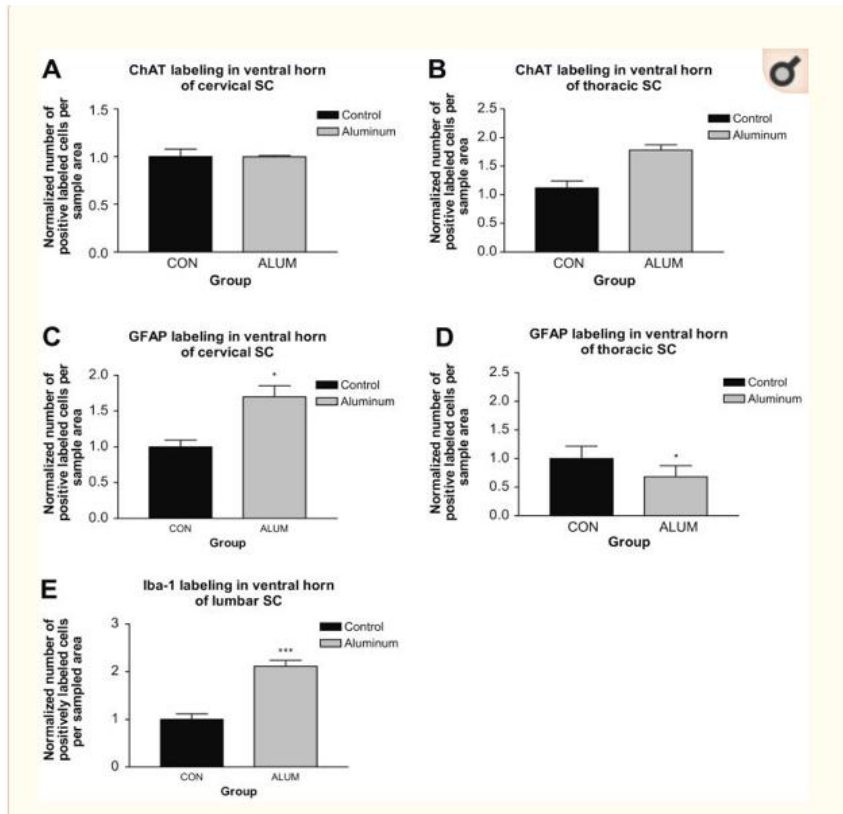


Fig. 1

Impatto dell'idrossido di alluminio su diversi livelli di midollo spinale (SC). (A e B) marcatura di ChAT in corde cervicali e toraciche, rispettivamente. (C e D) Conta cellulare normalizzata per la marcatura GFAP di astrociti reattivi nel midollo spinale cervicale e toracico, rispettivamente. Nel cordone cervicale, i gruppi trattati con idrossido di alluminio hanno mostrato livelli più elevati di marcatura di GFAP con il gruppo solo di alluminio raggiungendo significatività statistica. (E) La marcatura fluorescente Iba-1 nel corno ventrale del cavo lombare del topo ha mostrato che topi iniettati con alluminio avevano aumentato significativamente il numero di microglia attivata. I dati sono medi \pm S.E.M. *** $p < 0,001$, ANOVA a una via.

La marcatura Iba-1 ha dimostrato un aumento significativo dei livelli di microglia attivata nel midollo spinale lombare degli animali iniettati con alluminio (111%) rispetto ai controlli (Fig. 1E). Altri livelli di midollo non sono stati testati per la microglia nel presente studio.

Solo i topi iniettati con idrossido di alluminio hanno mostrato un aumento significativo della marcatura di Morin delle cellule nel midollo spinale lombare rispetto agli altri gruppi (Figura 2A-E). Allo stesso modo, solo i topi iniettati con alluminio hanno mostrato la presenza di una proteina tau anomala nei motoneuroni nel midollo lombare (Fig. 3). Altre regioni del midollo non sono state testate negli studi attuali per la proteina Morin o tau.

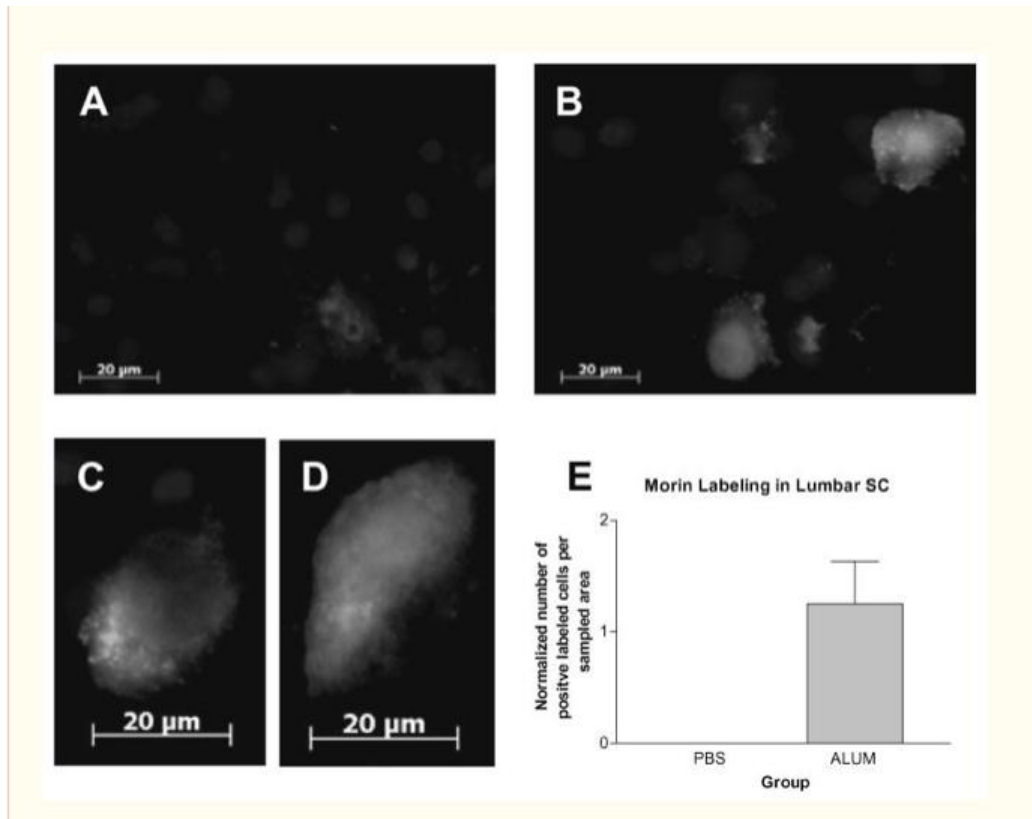
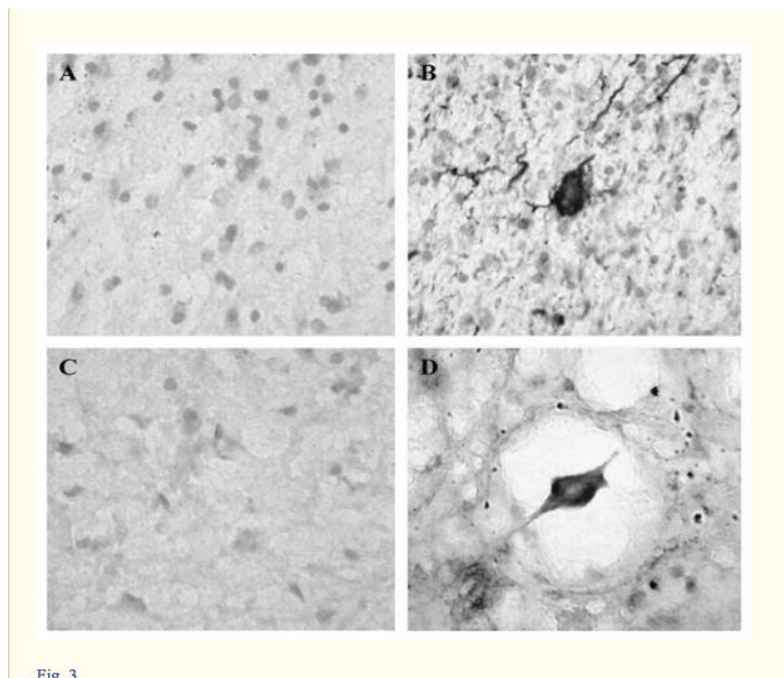


Fig. 2

Marcatura fluorescente di Morin nel corno ventrale del midollo spinale lombare del topo. Le sezioni dei topi di controllo (A) non hanno mostrato alcuna marcatura fluorescente di Morin. Barra della scala = 20 μm . (B) Neuroni motori Morin-positivi in topi trattati con idrossido di alluminio. (C e D) Maggiore potenza dei motoneuroni nei topi iniettati di alluminio che mostrano alti livelli di marcatura di Morin citoplasmatica. Barra della scala = 20 μm . (E) Conta delle cellule per le cellule Morin positive nei diversi gruppi di trattamento (n = 4 topi



/ gruppo, quattro sezioni ciascuno). I dati sono media \pm S.E.M. L'analisi ANOVA a una via ha rivelato un livello di significatività di * $p < 0,05$.

Fig. 3

immunocolorazione della proteina iper-fosforilata tau nel corno ventrale del midollo spinale lombare del topo rispetto al morbo di Alzheimer. (A) Una sezione della corteccia entorinale umana da un paziente di controllo. (B) Sezione di corteccia entorinale umana da un paziente con malattia di Alzheimer (sezioni gentilmente fornite per gentile concessione del Dr. P. McGeer). (C) campione del midollo spinale lombare da un topo iniettato con soluzione salina. (D) Sezione equivalente da un topo iniettato di idrossido di alluminio. Tutte le immagini sono ingrandite a 100 \times .

Le iniezioni multiple di idrossido di alluminio dell'esperimento 2 hanno mostrato profondi effetti sul comportamento motorio e altri comportamenti come mostrato nelle Figg. 4 e 5,5. Più iniezioni di alluminio hanno prodotto esiti comportamentali significativi, tra cui cambiamenti nel comportamento di locomozione, (Fig. 4) e deficit di memoria indotti nei compiti di labirinto acquatico (Fig. 5). Altre misure comportamentali, tra cui la forza e la resistenza muscolare misurate dalla sospensione del filo e la coordinazione motoria e il bilanciamento, misurati dal rotarod, non sono stati significativamente influenzati.

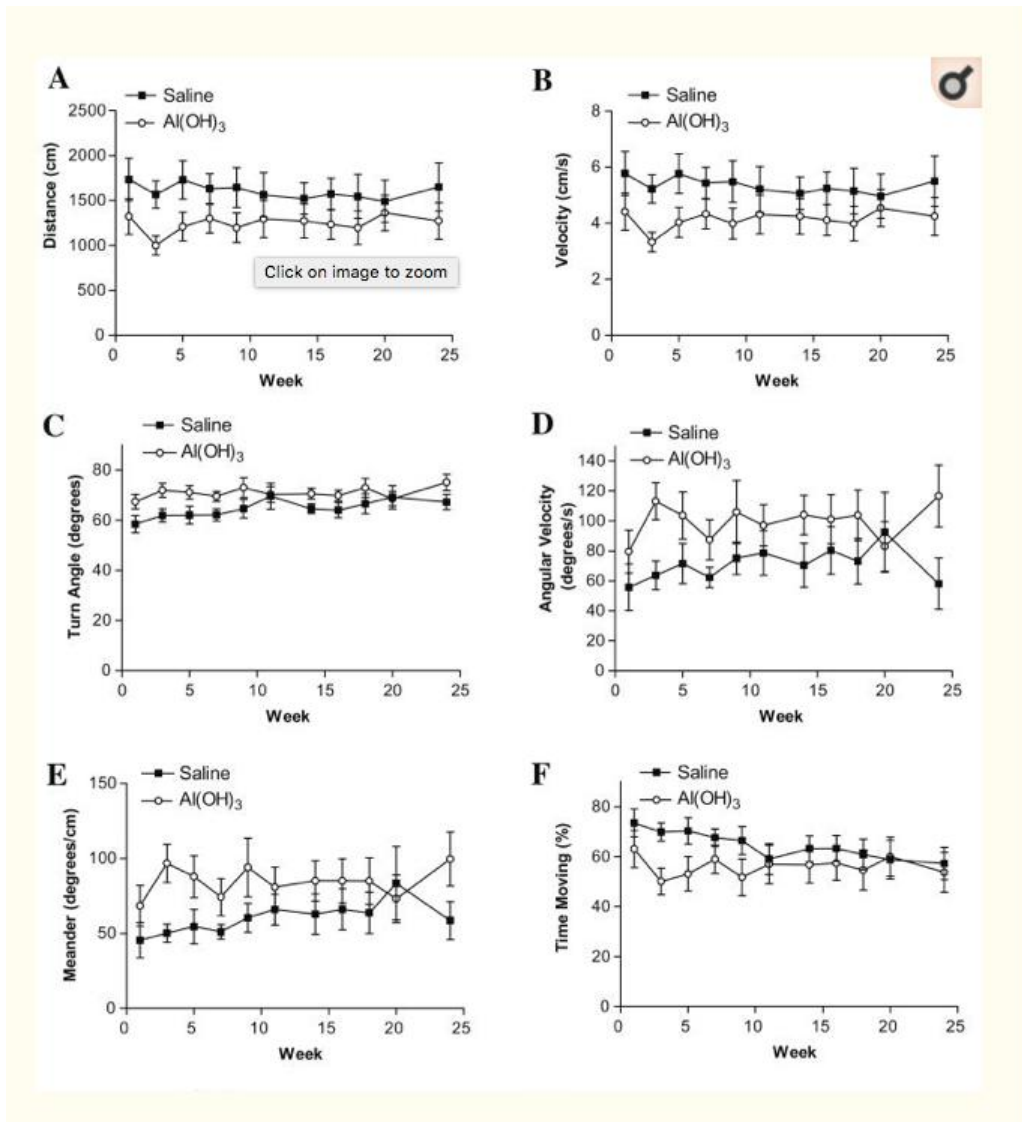


Fig. 4

Analisi del movimento in campo aperto come valutazione dell'attività spontanea e dell'ansia nei topi di controllo rispetto ai topi iniettati sei volte con idrossido di alluminio. Topi iniettati di idrossido di alluminio hanno mostrato i seguenti cambiamenti comportamentali: (A) distanze più corte spostate (** $p < 0,0001$). (B) Movimento più lento (** $p < 0,0001$). (C) Angolo di virata medio maggiore (** $p < 0,0001$). (D) Tornitura più rapida (** $p < 0,0001$). (E) Maggiore meandro (** $p < 0,0001$). (F) Piccola percentuale di tempo nel movimento complessivo (** $p = 0,0030$). (G) Meno voci nel centro del campo aperto (** $p < 0,001$). Ingresso ritardato al centro (** $p < 0,0001$). (Tutte le misure, ANOVA a due vie).

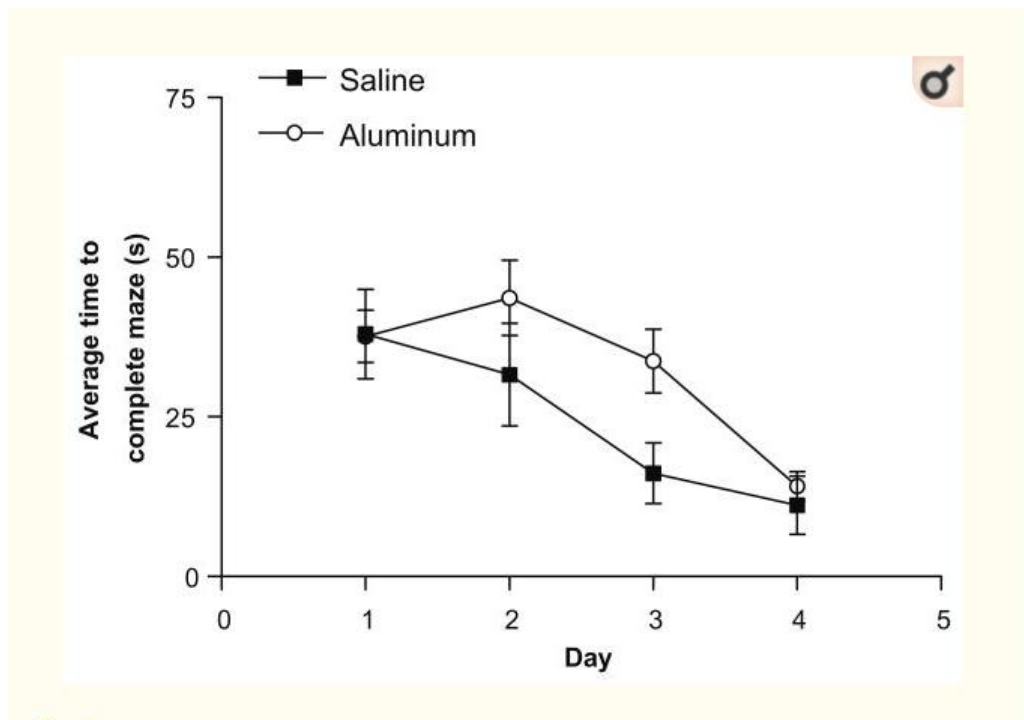


Fig. 5

Test del labirinto dell'acqua come valutazione dell'apprendimento e della memoria. I topi iniettati 6 × con idrossido di alluminio in media hanno impiegato molto più tempo per completare il labirinto rispetto ai topi con iniezione di soluzione salina (ANOVA a due vie. * P = 0,0389).

4 DISCUSSIONE

I risultati attuali estendono i risultati preliminari riportati da Petrik et al. [8] mostrando che l'attivazione della microglia è parte della patologia sottostante nel midollo lombare. Questi dati si sommano a quelli precedentemente riportati, cioè la perdita di motoneuroni e di altri neuroni e l'attivazione di astrociti reattivi. Considerata insieme ai dati attuali, l'attivazione complessiva di una risposta infiammatoria gliale nel midollo lombare suggerisce che questo processo è uno stadio iniziale chiave degli eventi patologici che portano alla morte dei motoneuroni. Questa interpretazione è supportata dall'assenza di perdita dei motoneuroni e dell'attivazione degli astrociti negli altri livelli del midollo spinale osservati nel presente studio. Nella SLA e nei modelli animali della malattia, l'attivazione gliale seguita dalla morte del motoneurone sembra spesso procedere in modo sequenziale lungo la neuroxite ventrale con i primi segni di patologia che appaiono per primi nel midollo lombare [31]. Detto questo, sembra possibile che un esame dei punti temporali successivi mostrerebbe anche risposte patologiche nel midollo toracico e cervicale. In alternativa, l'alluminio mostrato per essere presente nei motoneuroni del midollo lombare potrebbe non aver raggiunto questi altri segmenti del midollo spinale. Gli studi attualmente in corso determineranno se i motoneuroni in questi altri segmenti si colorano positivamente per l'alluminio.

La colorazione positiva di Morin nel midollo lombare dimostra chiaramente che l'alluminio post-iniezione trova accesso a questa parte del sistema nervoso. Una possibilità è che lo faccia per trasporto retrogrado dai muscoli ai motoneuroni in particolari segmenti. Ciò sembra improbabile dato che il nostro

paradigma di iniezione sottocutanea non dovrebbe avere come bersaglio alcun segmento particolare del midollo spinale. Un'altra possibilità è che l'alluminio possa entrare nel sistema nervoso centrale in modo sistemico se entra nel sistema circolatorio. Gli esperimenti in corso sono progettati per distinguere tra queste possibilità. La presenza di proteina tau iper-fosforilata, uno dei segni distintivi della malattia di Alzheimer e della SLA-PDC di Guam, nei motoneuroni nel midollo spinale lombare indica chiaramente che si stanno verificando ulteriori processi patologici associati all'alluminio.

I risultati comportamentali nel secondo esperimento riportato qui rafforzano gli esiti patologici osservati nei primi studi. Mentre le misurazioni istologiche di questi studi sono ancora in sospeso, l'entità dei deficit comportamentali suggerisce fortemente che osserveremo patologie neuronali diffuse. La maggiore estensione dei risultati comportamentali in questo esperimento può essere correlata al paradigma sperimentale che ha triplicato il numero di iniezioni di idrossido di alluminio.

Nel complesso, i risultati riportati qui rispecchiano il lavoro precedente che ha chiaramente dimostrato che l'alluminio, sia nella forma orale che in quella iniettata, può essere neurotossico [15,16,32,33]. Potenziali meccanismi d'azione tossici per l'alluminio possono includere l'aumento dell'infiammazione (cioè microgliosi) e l'interferenza con le proiezioni colinergiche [34], l'utilizzo ridotto del glucosio [33], le reazioni difettose di fosforilazione / defosforilazione [35], tasso alterato di diffusione transmembrana e cambiamenti selettivi nei sistemi di trasporto saturabili nella barriera emato-encefalica (BBB [36], e danno ossidativo sui processi cellulari mediante l'inibizione del ciclo redox del glutatione [37].

Considerato quanto sopra, non sorprende che l'alluminio sia stato ampiamente proposto come fattore nelle malattie neurodegenerative ed è stato trovato in associazione con i neuroni degenerati in specifiche regioni del SNC [38-41]. Negli studi su animali, l'alluminio è stato collegato all'accumulo di proteina tau e proteina beta-amiloide e osservato indurre apoptosi neuronale in vivo e in vitro [30]. Gli animali iniettati di alluminio mostrano una grave degenerazione anterograda dei terminali colinergici nella corteccia e nell'ippocampo [42]. L'alluminio nella sua forma adiuvante può accedere al SNC [42-44], tuttavia la somministrazione orale di gel di idrossido di alluminio non sembra essere neurotossica nell'uomo [45], sebbene il cloruro di alluminio lo sia, nei ratti [46]. La via di esposizione e forse la forma dell'alluminio possono essere fattori importanti che determinano il potenziale di tossicità.

Noi ipotizziamo che gli effetti neurotossici osservati dell'idrossido di alluminio nel presente studio derivano da percorsi sia 'diretti' che 'indiretti', alcuni dei quali sono citati sopra. La tossicità diretta si riferisce alla presenza fisica (o alla prossimità) dell'alluminio e al suo potenziale di iniziare i percorsi di morte cellulare. L'accumulo di alluminio nel citoplasma attraverso meccanismi di diffusione cellulare potrebbe causare alterazioni nella glutammina sintetasi e nella glutammina sintetasi e alterare facilmente la disponibilità del glutammato neurotrasmettitore [47]. L'azione dell'alluminio per indurre un accumulo anormale di proteine tau potrebbe anche aumentare i grovigli neurofibrillari e compromettere i meccanismi di trasporto cellulare [48]. Al di fuori della cellula, l'alluminio potrebbe influenzare i neuroni alterando le sinapsi. Ad esempio, è

stato dimostrato che l'alluminio riduce lo spessore della densità post-sinaptica, aumenta la larghezza della fessura sinaptica e aumenta il numero di sinapsi piatte [49]. L'alluminio potrebbe anche bloccare i canali del calcio attivati dalla tensione [50], aumentare l'attività dell'acetilcolinesterasi [51], o interferire con la trasmissione sinaptica semplicemente accumulandosi nella fessura sinaptica [52]. L'alluminio può anche indurre l'apoptosi negli astrociti [53]. Poiché gli astrociti sono essenziali per il mantenimento della salute neuronale, qualsiasi perdita di funzione degli astrociti potrebbe rivelarsi tossica per i neuroni. La tossicità indiretta dell'alluminio potrebbe verificarsi in vari modi, anche attivando varie citochine [54], rilasciando il glutammato in una cascata eccitotossica o modificando varie vie enzimatiche [55].

Oltre alle suddette azioni specifiche sulle cellule neurali, l'alluminio potrebbe agire indirettamente stimolando risposte immunitarie anormali e generalizzate. Questo è, in effetti, ciò che in primo luogo gli adiuvanti sono chiamati a fare nei vaccini. LA neurotossicità adiuvante potrebbe quindi essere il risultato di una risposta immunitaria squilibrata. Rook e Zumla [56] hanno ipotizzato che vaccinazioni multiple, stress e il metodo di vaccinazione potrebbero portare a un cambiamento nella risposta immunitaria [56,57]. L'idrossido di alluminio ha in precedenza dimostrato di stimolare una risposta di citochine Th2 [9,58].

Mentre i risultati attuali e il nostro studio precedente hanno dimostrato esiti comportamentali e neuropatologici significativi con idrossido di alluminio e alcuni esiti aggiuntivi significativi dovuti a una combinazione di adiuvanti, è importante riconoscere che questi sono stati raggiunti in condizioni minime. La Tabella 1 riassume gli aspetti dei sintomi di SLA e GWS umani confrontati con i risultati osservati nei topi iniettati con alluminio. Esiste la probabilità che si verifichi un effetto sinergico tra adiuvanti e altre variabili come stress, vaccinazioni multiple ed esposizione ad altre tossine. Uno studio recente che ha esaminato alcuni di questi fattori in combinazione ha mostrato che stress, vaccinazione e piridostigmina bromuro (un inibitore dell'enzima anticolinesterasi del carbammato (AChE)) possono agire sinergicamente su chinasi multiple attivate dallo stress nel cervello per indurre disturbi neurologici in GWS [59]. Inoltre, un background genetico nel contesto dell'esposizione dell'alluminio può giocare un ruolo cruciale e potrebbe essere un'area importante per la ricerca futura.

La dimostrazione di esiti neuropatologici e deficit comportamentali in topi iniettati di idrossido di alluminio può fornire alcune informazioni sulle cause non solo di GWS-SLA, ma può aprire vie di indagine su altre malattie neurologiche.

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato sostenuto da sovvenzioni dalla Scottish Rite Charitable Foundation of Canada e dal Natural Research and Engineering Research Council del Canada (alla CAS). Ringraziamo il dott. Meryl Nass (Mount Desert Island Hospital, Maine, USA) e il tenente colonnello John A. Richardson (USAFR, ret.) Per i loro preziosi contributi e contributi consultivi a questo progetto e manoscritto.

Abbreviazioni

chE Anticholinesterasi

SLA-PDC Sclerosi laterale amiotrofica-complesso parkinsonismo demenza
AVA Vaccino antrace adsorbito
BSA Albumina sierica bovina
GFAP proteina gliale fibrillare acida
ChAT Colina O-acetiltransferasi
GWS Sindrome della Guerra del Golfo
NGS siero normale di capra
OTT Temperatura di taglio ottimale
PBST Tampone fosfato salino - Tween 20
PFA Paraformaldeide

Le note

Approvazione etica animali: i protocolli che regolano l'uso degli animali sono stati approvati dai comitati di revisione dell'Università della British Columbia e sono conformi alle linee guida pubblicate dal Consiglio canadese per la cura degli animali e sono conformi alle linee guida internazionali inclusa la Guida NIH per la cura e uso di animali da laboratorio, nonché della direttiva del Consiglio CEE.

Conflitto di interessi: nessuno degli autori ha ricevuto sovvenzioni o finanziamenti da Bioport, Chirone, Corixa, né da altre società farmaceutiche nominate in questo articolo.

Bibliografia

1. Charatan F. *BMJ*. 2002;324:65. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
2. Horner RD, Kamins KG, Feussner JR, Grambow SC, Hoff-Lindquist J, Harati Y, Mitsumoto H, Pascuzzi R, Spencer PS, Tim R, Howard D, Smith TC, Ryan MA, Coffman CJ, Kasarskis EJ. *Neurology*. 2003;61:742-749. [[PubMed](#)]
3. Haley RW. *Neurology*. 2003;61:750-756. [[PubMed](#)]
4. Weisskopf MG, O'Reilly EJ, McCullough ML, Calle EE, Thun MJ, Cudkowicz M, Ascherio A. *Neurology*. 2005;64:32-37. [[PubMed](#)]
5. Kurland LT. *Trends Neurosci*. 1988;11:51-54. [[PubMed](#)]
6. Whiting MG. *Econ Bot*. 1963;17:271-302.
7. Garruto RM, Shankar SK, Yanagihara R, Salazar AM, Amyx HL, Gajdusek DC. *Acta Neuropathol Berl*. 1989;78:210-219. [[PubMed](#)]
8. Petrik MS, Wong MC, Tabata RC, Garry RF, Shaw CA. *Neuromol Med*. 2007;9:83-100. [[PubMed](#)]
9. Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, Mohrs M, Brombacher F, Alexander J. *J Immunol*. 1999;163:6448-6454. [[PubMed](#)]
10. Lindblad EB. *Vaccine*. 2004;22:3658-3668. [[PubMed](#)]
11. Baylor NW, Egan W, Richman P. *Vaccine*. 2002;20(Suppl 3):S18-S23. [[PubMed](#)]
12. Kanra G, Viviani S, Yurdakok K, Ozmert E, Anemona A, Yalcin S, Demiralp O, Bilgili N, Kara A, Cengiz AB, Mutlu B, Baldini A, Marchetti E, Podda A. *Pediatr*

- Int. 2003;45:314–318. [[PubMed](#)]
13. Jefferson T, Rudin M, Di Pietrantonj C. *Lancet Infect Dis.* 2004;4:84–90. [[PubMed](#)]
 14. Lindblad EB. *Immunol Cell Biol.* 2004;82:497–505. [[PubMed](#)]
 15. Crapper DR, Krishnan SS, Dalton AJ. *Science.* 1973;180:511–513. [[PubMed](#)]
 16. Kawahara M, Kato M, Kuroda Y. *Brain Res Bull.* 2001;55:211–217. [[PubMed](#)]
 17. Garruto RM, Yanagihara R, Gajdusek DC. *Neurology.* 1985;35:193–198. [[PubMed](#)]
 18. Wagner-Recio M, Toews AD, Morell P. *J Neurochem.* 1991;57:1891–1901. [[PubMed](#)]
 19. Bilkei-Gorzo A. *Food Chem Toxicol.* 1993;31:357–361. [[PubMed](#)]
 20. Verdier F, Burnett R, Michelet-Habchi C, Moretto P, Fievet-Groyne F, Sauzet E. *Vaccine.* 2005;23:1359–1367. [[PubMed](#)]
 21. Kalil RK, Monteiro A, Jr, Lima MI, Silveira EB, Foltran FS, Martins CE, Rizzo IM. *Ultrastruct Pathol.* 2007;31:45–50. [[PubMed](#)]
 22. Exley C, Swarbrick L, Gherardi RK, Authier FJ. *Med Hypotheses.* 2009;72:135–139. [[PubMed](#)]
 23. Sidman RL, Angevine JB, Jr, Pierce ET. *Atlas of the Mouse Brain and Spinal Cord.* Harvard University Press; Massachusetts: 1971.
 24. Paxinos G, Franklin KBJ. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.* second. Academic Press; San Diego: 2001.
 25. Wetts R, Vaughn JE. *Exp Neurol.* 1996;141:248–255. [[PubMed](#)]
 26. Maatkamp A, Vlug A, Haasdijk E, Troost D, French PJ, Jaarsma D. *Eur J Neurosci.* 2004;20:14–28. [[PubMed](#)]
 27. Lee VM, Page CD, Wu HL, Schlaepfer WW. *J Neurochem.* 1984;42:25–32. [[PubMed](#)]
 28. Tohyama T, Lee VM, Rorke LB, Trojanowski JQ. *J Comp Neurol.* 1991;310:285–299. [[PubMed](#)]
 29. Imai Y, Ibata I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;224:855–862. [[PubMed](#)]
 30. De Boni U, Scott JW, Crapper DR. *Histochemistry.* 1974;40:31–37. [[PubMed](#)]
 31. Tabata RC, Wilson JMB, Ly P, Zwiegers P, Kwok D, Van Kampen JM, Cashman N, Shaw CA. *Neuromol Med.* 2008;10:24–39. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
 32. Banks WA, Kastin AJ. *Neurosci Biobehav Rev.* 1989;13:47–53. [[PubMed](#)]
 33. Joshi JG. *Biofactors.* 1990;2:163–169. [[PubMed](#)]
 34. Platt B, Fiddler G, Riedel G, Henderson Z. *Brain Res Bull.* 2001;55:257–267. [[PubMed](#)]
 35. Cordeiro JM, Silva VS, Oliveira CR, Goncalves PP. *J Inorg Biochem.* 2003;97:132–142. [[PubMed](#)]
 36. Kaya M, Kalayci R, Arican N, Kucuk M, Elmas I. *Biol Trace Elem Res.* 2003;92:221–230. [[PubMed](#)]

37. Murakami NJ. *J Neurol*. 1999;256(Suppl 2):II16-II18. [[PubMed](#)]
38. Perl DP, Gajdusek DC, Garruto RM, Yanagihara RT, Gibbs CJ. *Science*. 1982;217:1053-1055. [[PubMed](#)]
39. Perl DP, Penderbury WW. *Can J Neurol Sci*. 1986;13:441-445. [[PubMed](#)]
40. Rao JK, Katsetos CD, Herman MM, Savory J. *Clin Lab Med*. 1998;18:687-698. [[PubMed](#)]
41. Savory J, Garruto RM. *Nutrition*. 1998;14:313-314. [[PubMed](#)]
42. Wen GY, Wisniewski HM. *Acta Neuropathol (Berl)* 1985;68:175-184. [[PubMed](#)]
43. Redhead K, Quinlan GJ, Das RG, Gutteridge JM. *Pharmacol Toxicol*. 1992;70:278-280. [[PubMed](#)]
44. Sahin G, Varol I, Temizer A, Benli K, Demirdamar R, Duru S. *Biol Trace Elem Res*. 1994;41:129-135. [[PubMed](#)]
45. Rosati G, De Bastiani P, Gilli P, Paolino E. *J Neurol*. 1980;223:251-257. [[PubMed](#)]
46. Walton JR. *Neurosci Lett*. 2007;412:29-33. [[PubMed](#)]
47. Zielke HR, Jackson MJ, Tildon JT, Max SR. *Mol Chem Neuropathol*. 1993;19:219-233. [[PubMed](#)]
48. Bizzi A, Crane RC, Autilio-Gambetti L, Gambetti P. *J Neurosci*. 1984;4:722-731. [[PubMed](#)]
49. Jing Y, Wang Z, Song Y. *Synapse*. 2004;15:292-298. [[PubMed](#)]
50. Busselberg D, Platt B, Haas HL, Carpenter DO. *Brain Res*. 1993;622:163-168. [[PubMed](#)]
51. Zatta P, Ibn-Lkhayat-Idrissi M, Zambenedetti P, Kilyen M, Kiss T. *Brain Res Bull*. 2002;59:41-45. [[PubMed](#)]
52. Banin E, Meiri H. *Brain Res*. 1987;423:359-363. [[PubMed](#)]
53. Aremu DA, Meshitsuka S. *Brain Res*. 2005;1031:284-296. [[PubMed](#)]
54. Johnson VJ, Sharma RP. *Neurotoxicity*. 2003;24:261-268. [[PubMed](#)]
55. Nayak P, Chatterjee AK. *Food Chem Toxicol*. 2001;39:1285-1289. [[PubMed](#)]
56. Rook GA, Zumla A. *Lancet*. 1997;349:1831-1833. [[PubMed](#)]
57. Rook GA, Zumla A. *Hosp Med*. 1998;59:10-11. [[PubMed](#)]
58. Valensi JP, Carlson JR, Van Nest GA. *J Immunol*. 1994;153:4029-4039. [[PubMed](#)]
59. Wang D, Perides G, Liu YF. *J Neurochem*. 2005;93:1010-1020. [[PubMed](#)]