

Anno CLXXII

2009

GIORNALE
DELLA
ACCADEMIA DI MEDICINA
DI TORINO

Comitato di Redazione

Giorgio Agati	Carlo de Sanctis
Alberto Angeli	Mario Umberto Dianzani
Paolo Arese	Guido Filogamo
Alessandro Bargoni	Gian Franco Pagano
Teresa Cammarota	Alessandro Pileri
Renato Cirillo	Giuseppe Poli
Alessandro Comandone	Nicola Riccardino
Edmondo Comino	Gian Luca Sannazzari

Direttore Responsabile

Giovanni Carlo Isaia

ACCADEMIA DI MEDICINA DI TORINO

Ufficio di Presidenza

<i>Presidente:</i>	Alberto Angeli
<i>Vice Presidente:</i>	Alessandro Comandone
<i>Segretario:</i>	Paolo Arese
<i>Amministratore:</i>	Giovanni Carlo Isaia
<i>Bibliotecario:</i>	Alessandro Bargoni
<i>Consiglieri:</i>	Teresa Cammarota Carlo de Sanctis
<i>Consigliere delegato per i rapporti con l'Università:</i>	Giuseppe Poli
<i>Past President:</i>	Nicola Riccardino

*Questo volume è pubblicato grazie
al generoso contributo di Alessio e Angelo Lucca,
in memoria e onore di Marisa Rocchi Lucca,
che con serenità e dolcezza ha testimoniato
come la sofferenza possa aggiungere valore
alla dignità umana.*

SOMMARIO

PARTE I

**Elenco dei Presidenti della Società Medico-Chirurgica
e dell'Accademia di Medicina di Torino** 9

Elenco dei Soci 11

PARTE II

Sedute dell'Accademia di Medicina, anno 2009 27

PARTE III

Contributi

Nicola Riccardino

Relazione del Presidente alla seduta inaugurale dell'Accademia Anno 2009/2010	33
--	-----------

Carlo de Sanctis, Raffaele Guariniello

Sviluppo mammario precoce e inquinanti alimentari	39
--	-----------

Giuseppe Licata, Gaspare Parrinello, Daniele Torres

Nuove frontiere per una vecchia malattia: lo scompenso di cuore	53
--	-----------

*Nicoletta Aimonino Ricauda, Renata Marinello, Maurizio Rocco,
Gianluca Isaia, Vittoria Tibaldi, Giovanni Carlo Isaia*

L'ospedale in casa: l'esperienza torinese	64
--	-----------

Maria Consuelo Valentini, Giovanna Carrara, Carola Jünemann

La RM Funzionale nell'imaging dei tumori cerebrali	76
---	-----------

Francesco Porpiglia, Cristian Fiori, Roberto M. Scarpa

L'endoscopia: substantia immanens dell'urologia	87
--	-----------

<i>Irma Dianzani, Anna Aspesi, Ugo Ramenghi</i>	
Ribosomi e malattie	107

<i>Antonio Bertolotto, Francesca Gilli, Simona Malucchi</i>	
Farmacogenomica della sclerosi multipla	119

<i>Umberto Ricardi, Andrea Riccardo Filippi, Riccardo Ragona</i>	
La Radioterapia Guidata dalle Immagini: IGRT	134

<i>Sante Bajardi, Luigi Resegotti</i>	
Promozione della salute. Nuova sfida per la medicina	142

<i>Roberto Civitelli, Nicola Napoli</i>	
Nuove strategie terapeutiche per le malattie del metabolismo osseo	149

<i>Luigi Santoro, Alessandra Farnetti, Annamaria Ronco, Roberto Mattio</i>	
I carcinomi cutanei	163

<i>Davide Spadaro, Angelo Garibaldi</i>	
Nanotecnologie e il settore agroalimentare	179

<i>Roberto Fantozzi, Chiara Dianzani</i>	
Le nanotecnologie per la salute dei vegetali e dell'uomo	194

Francesco Panero, Paolo Cavallo Perin, Graziella Bruno

Premio “Italo Arneodo”

Tesi di Laurea premiata in collaborazione con l’Accademia
di Medicina di Torino

**Epidemiologia del diabete mellito tipo 2:
lo studio di Torino203**

Maria Teresa Ricci

Premio “Italo Arneodo”

Tesi di Laurea premiata in collaborazione con l’Accademia
di Medicina di Torino

**Ruolo del gene APC nella predisposizione
al tumore della mammella220**

Marco Ravazzoli, Patrizia D’Amelio, Giovanni Carlo Isaia

Premio “Giampiero Gaidano”

Tesi di Laurea premiata dalla Fondazione Piera, Pietro e Giovanni Ferrero
in collaborazione con l’Accademia di Medicina di Torino

**Effetti biologici dell’alendronato sui linfociti T gamma-delta
nell’osteoporosi postmenopausale233**

PARTE IV

Tesi di Laurea vincitrice del Premio Fondazione Ferrero Onlus in memoria del Prof. Giampiero Gaidano Anno Accademico 2008/2009	249
Tesi di Laurea vincitrici del Premio in Memoria del Dott. Italo Arneodo Anno Accademico 2008/2009	251
Sito web dell'Accademia di Medicina di Torino	253
Norme redazionali per la pubblicazione sul "Giornale dell'Accademia di Medicina di Torino"	255
Indice degli Autori	257

*PRESIDENTI DELLA SOCIETÀ
MEDICO-CHIRURGICA DI TORINO*

1842-1844 Bernardino Bertini

1845-1846 Alessandro Riberi

*PRESIDENTI DELL'ACCADEMIA
DI MEDICINA DI TORINO*

1846	Alessandro Riberi	1883-1885	Carlo Reymond
1846-1849	Giovanni Giacomo Bonino	1885-1887	Domenico Tibone
1849-1851	Secondo Giovanni Berruti	1887-1889	Giacomo Gibello
1851-1853	Luigi Battalia	1889-1891	Maurizio Reviglio
1853-1855	Filippo Demichelis	1891-1892	Gaetano Arena
1855-1857	Paolo Andrea Carmagnola	1892-1893	Giulio Bizzozzero
1857-1859	Lorenzo Girola	1893-1895	Angelo Mosso
1859-1860	Giovacchino Fiorito	1895-1897	Cesare Lombroso
1860-1863	Carlo Demaria	1897-1899	Gerolamo Mo
1863-1864	Benedetto Trompeo	1899-1901	Edoardo Perroncito
1864-1866	Giovanni Demarchi	1901-1903	Camillo Bozzolo
1866-1869	Francesco Telesforo Pasero	1903-1905	Icilio Guareschi
1869-1871	Giovanni Stefano Bonacossa	1905-1907	Luigi Pagliani
1871-1873	Gaetano Pertusio	1907-1909	Daniele Bajardi
1873-1875	Vincenzo Peyrani	1909-1911	Pietro Giacosa
1875-1877	Lorenzo Bruno	1911-1913	Bonaventura Graziadei
1877-1879	Luigi Olivetti	1913-1919	Valentino Oliva
1879-1881	Alberto Gamba	1919-1921	Antonio Carle
1881-1883	Michele Lessona	1921-1923	Ferdinando Battistini

1923-1926	Giuseppe Vicarelli	1962-1967	Achille Mario Dogliotti
1926-1928	Camillo Negro	1967-1969	Pier Carlo Borsotti
1928-1930	Ignazio Dionisio	1969-1971	Giulio Cesare Dogliotti
1930-1932	Stefano Balp	1971-1976	Giorgio Cavallo
1932-1934	Ferruccio Vanzetti	1976-1979	Alfredo Lucca
1934-1938	Vitige Tirelli	1979-1986	Guido Filogamo
1938-1940	Luigi Bobbio	1986-1990	Rino Colombo
1940-1942	Ottorino Uffreduzzi	1990-1994	Angelo Carbonara
1942-1949	Carlo Gamna	1994-1998	Adriano Vitelli
1949-1950	Luigi Ferrio	1998-2002	Mario Umberto Dianzani
1952-1956	Pio Bastai	2002-2004	Renato Cirillo
1956	Stefano Perrier	2004-2008	Giuseppe Poli
1956-1957	Giacomo Mottura	2008-2010	Nicola Riccardino
1957-1962	Carlo Chiaudano		

ACCADEMIA DI MEDICINA DI TORINO

Via Po, 18 - 10123 Torino

Telefono 011.817.92.98 - Fax 011.817.92.98

www.accademiadimedicina.unito.it

ELENCO SOCI (AL 15 OTTOBRE 2010)

Soci Ordinari (in ordine di anzianità di nomina)

Francesco Morino

Professore di Chirurgia Generale

Università di Torino

(31 Maggio 1968)

Alberto Angeli

Professore di Medicina Interna

Università di Torino

(3 Luglio 1979)

Davide Schiffer

Professore di Neurologia

Università di Torino

(14 Giugno 1974)

Gian Paolo Busca

Professore di Clinica Otorinolaringoiatrica

Università di Torino

(3 Luglio 1979)

Alberto Sartoris

Professore di Clinica Otorinolaringoiatrica

Università di Torino

(30 Giugno 1977)

Onofrio Campobasso

Primario Emerito di Anatomia Patologica

Ospedale Maria Vittoria di Torino

(3 Luglio 1979)

Giovanni Bussolati

Professore di Anatomia e Istologia Patologica

Università di Torino

(14 Dicembre 1977)

Giorgio Emanuelli

Professore di Medicina Interna

Università di Torino

(3 Luglio 1979)

Giuseppe Piccoli

Professore di Nefrologia

Università di Torino

(14 Dicembre 1977)

Paolo Gallinaro

Professore di Clinica Ortopedica

Università di Torino

(3 Luglio 1979)

Luigi Ravizza

Professore di Clinica Psichiatrica

Università di Torino

(14 Dicembre 1977)

Giuseppe Heer

Primario Emerito di Oculistica

Ospedale Maria Vittoria di Torino

(3 Luglio 1979)

Gian Franco Pagano

Professore di Medicina Interna
Università di Torino
 (3 Luglio 1979)

Paolo Comoglio

Professore di Istologia
Università di Torino
 (26 Gennaio 1990)

Luigi Sena

Professore di Patologia Clinica
Università di Torino
 (3 Luglio 1979)

Guido Forni

Professore di Immunologia
Università di Torino
 (26 Gennaio 1990)

Remo Modica

Professore di Chirurgia Maxillo-Facciale
Università di Torino
 (13 Febbraio 1981)

Giovanni Losano

Professore di Fisiologia Umana
Università di Torino
 (26 Gennaio 1990)

Giacomo Giacobini

Professore di Anatomia Umana Normale
Università di Torino
 (20 Maggio 1983)

Marco Massobrio

Professore di Clinica Ostetrica e Ginecologica
Università di Torino
 (30 Novembre 1990)

Giorgio Palestro

Professore di Anatomia e Istologia Patologica
Università di Torino
 (20 Maggio 1983)

Antonio Solini

Primario Emerito di Ortopedia
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino
 (30 Novembre 1990)

Benedetto Terracini

Professore di Epidemiologia dei Tumori Umani
Università di Torino
 (20 Maggio 1983)

Francesco Di Carlo

Professore di Farmacologia
Università di Torino
 (20 Dicembre 1991)

Mario Rizzetto

Professore di Gastroenterologia
Università di Torino
 (26 Maggio 1989)

Federico Grignolo

Professore di Clinica Oculistica
Università di Torino
 (20 Dicembre 1991)

Franco Balzola

Primario Emerito di Dietetica e Nutrizione
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino
 (26 Gennaio 1990)

Alberto Piazza

Professore di Genetica Umana
Università di Torino
 (18 Dicembre 1992)

Alessandro Calciati

Primario Emerito di Oncologia Medica
Ospedale S. Giovanni, Antica Sede di Torino
 (26 Gennaio 1990)

Mario Pippione

Professore di Clinica Dermatologica
Università di Torino
 (18 Dicembre 1992)

Giuseppe Segoloni

*Professore di Nefrologia
Università di Torino
(18 Dicembre 1992)*

Italo Faraldi

*Primario Emerito di Oculistica
Ospedale Oftalmico di Torino
(17 Dicembre 1993)*

Pier Giorgio Montarolo

*Professore di Fisiologia Umana
Università di Torino
(17 Dicembre 1993)*

Giulio Preti

*Professore di Clinica Odontostomatologica
Università di Torino
(17 Dicembre 1993)*

Antonio Robecchi

*Professore di Chirurgia Generale
Università di Torino
(17 Dicembre 1993)*

Emanuele Albano

*Professore di Patologia Generale
Università del Piemonte Orientale
(16 Dicembre 1994)*

Mario Boccadoro

*Professore di Ematologia
Università di Torino
(16 Dicembre 1994)*

Pietro Bracco

*Professore di Clinica Odontostomatologica
Università di Torino
(16 Dicembre 1994)*

Paolo Cavallo Perin

*Professore di Medicina Interna
Università di Torino
(16 Dicembre 1994)*

Mario Maritano

*Primario Emerito di Anestesia e Rianimazione
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino
(16 Dicembre 1994)*

Antonio Mussa

*Professore di Chirurgia Generale
Università di Torino
(16 Dicembre 1994)*

Giovanni Muto

*Primario di Urologia
A.O. San Giovanni Bosco di Torino
(16 Dicembre 1994)*

Magda Passatore

*Professore di Fisiologia Umana
Università di Torino
(16 Dicembre 1994)*

Alessandro Negro Ponzi

*Professore di Microbiologia
Università di Torino
(15 Dicembre 1995)*

Giovanni Baduini

*Cardiologo Interventista
Torino
(13 Dicembre 1996)*

Cesare Bumma

*Primario Emerito di Oncologia
Ospedale S. Giovanni, Antica Sede di Torino
(13 Dicembre 1996)*

Giovanni Carlo Isaia

*Professore di Medicina Interna
Università di Torino
(13 Dicembre 1996)*

Alessandro Tizzani

*Professore di Urologia
Università di Torino
(13 Dicembre 1996)*

Ilario Viano

*Professore di Farmacologia
Università del Piemonte Orientale
(13 Dicembre 1996)*

Mario Campogrande

*Primario Emerito di Ostetricia e Ginecologia
A.O. Sant'Anna di Torino
(12 Dicembre 1997)*

Dario Fontana

*Professore di Urologia
Università di Torino
(12 Dicembre 1997)*

Piero Sismondi

*Professore di Clinica Ostetrica e Ginecologica
Università di Torino
(12 Dicembre 1997)*

Mario Nano

*Professore di Chirurgia Generale
Università di Torino
(11 Dicembre 1998)*

Luigi Santoro

*Primario Emerito di Dermochirurgia
Oncologica
Ospedale Gradenigo di Torino
(11 Dicembre 1998)*

Paolo Arese

*Professore di Biochimica
Università di Torino
(10 Dicembre 1999)*

Mario Eandi

*Professore di Farmacologia
Università di Torino
(10 Dicembre 1999)*

Gianruggero Fronda

*Primario di Chirurgia Generale
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino
(10 Dicembre 1999)*

Federico Ponzio

*Primario Emerito di Chirurgia Vascolare
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino
(10 Dicembre 1999)*

Paolo Rossi

*Professore di Clinica Ortopedica
Università di Torino
(10 Dicembre 1999)*

Maria Grazia Bernengo

*Professore di Dermatologia
Università di Torino
(15 Dicembre 2000)*

Dario Cantino

*Professore di Anatomia Umana Normale
Università di Torino
(15 Dicembre 2000)*

Lorenzo Capussotti

*Primario di Chirurgia Generale
A.O. Mauriziano di Torino
(15 Dicembre 2000)*

Angelo Pera

*Primario Emerito di Gastroenterologia
A.O. Mauriziano di Torino
(15 Dicembre 2000)*

Gabriele Fontana

*Primario Emerito di Urologia
Ospedale SS. Annunziata di Savigliano
(14 Dicembre 2001)*

Giovanni Gandini

*Professore di Radiologia
Università di Torino
(14 Dicembre 2001)*

Elsa Margaria

*Primario Emerito di Anestesia e Rianimazione
A.O. Sant'Anna di Torino
(14 Dicembre 2001)*

Lorenzo Silengo

*Professore di Biologia Molecolare
Università di Torino
(14 Dicembre 2001)*

Amalia Bosia

*Professore di Biochimica
Università di Torino
(13 Dicembre 2002)*

Sergio Coverlizza

*Primario di Anatomia Patologica
A.O. San Giovanni Bosco di Torino
(13 Dicembre 2002)*

Vittorio Modena

*Primario Emerito di Reumatologia
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino
(13 Dicembre 2002)*

Giuseppe Saglio

*Professore di Medicina Interna
Università di Torino
(13 Dicembre 2002)*

Federico Bussolino

*Professore di Biochimica
Università di Torino
(12 Dicembre 2003)*

Carlo de Sanctis

*Primario Emerito di Endocrinologia Pediatrica
A.O. Regina Margherita - S. Anna di Torino
(12 Dicembre 2003)*

Roberto Fantozzi

*Professore di Farmacologia
Università di Torino
(12 Dicembre 2003)*

Cesare Fava

*Professore di Radiologia
Università di Torino
(12 Dicembre 2003)*

Marcello Nobili

*Primario Emerito di Neurologia
Ospedale Martini di Torino
(12 Dicembre 2003)*

Roberto Rigardetto

*Professore di Neuropsichiatria Infantile
Università di Torino
(12 Dicembre 2003)*

Mauro Salizzoni

*Professore di Chirurgia Generale
Università di Torino
(12 Dicembre 2003)*

Filippo Bogetto

*Professore di Psichiatria
Università di Torino
(17 Dicembre 2004)*

Piero Borasio

*Professore di Chirurgia Toracica
Università di Torino
(17 Dicembre 2004)*

Umberto Dianzani

*Professore di Immunologia
Università del Piemonte Orientale
(17 Dicembre 2004)*

Pietro Greco Lucchina

*Primario Emerito di Cardiologia
A.O.U. San Luigi Gonzaga di Orbassano
(17 Dicembre 2004)*

Marco Vito Ranieri

*Professore di Anestesia e Rianimazione
Università di Torino
(17 Dicembre 2004)*

Maurizio Stella

*Primario Centro Grandi Ustionati
A.O. CTO - CRF - Maria Adelaide di Torino
(17 Dicembre 2004)*

Teresa Cammarota

*Primario di Radiologia
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino
(16 Dicembre 2005)*

Ezio Ghigo

*Professore di Endocrinologia
Università di Torino
(16 Dicembre 2005)*

Luigi Dogliotti

*Professore di Oncologia
Università di Torino
(15 Dicembre 2006)*

Franco Merletti

*Professore di Statistica Medica
Università di Torino
(15 Dicembre 2006)*

Mario Morino

*Professore di Chirurgia Generale
Università di Torino
(15 Dicembre 2006)*

Roberto Mutani

*Professore di Neurologia
Università di Torino
(15 Dicembre 2006)*

Patrizia Presbitero

*Primario di Cardiologia Interventistica
Istituto Clinico Humanitas di Rozzano (MI)
(15 Dicembre 2006)*

Mauro Rinaldi

*Professore di Chirurgia Cardiaca
Università di Torino
(15 Dicembre 2006)*

Alessandro Comandone

*Primario di Oncologia
Ospedale Gradenigo di Torino
(14 Dicembre 2007)*

Felicino Debernardi

*Primario di Anestesia, Rianimazione
e Terapia Antalgica
I.R.C.C. di Candiolo
(14 Dicembre 2007)*

Irma Dianzani

*Professore di Patologia Generale
Università del Piemonte Orientale
(14 Dicembre 2007)*

Alessandro Maria Gaetini

*Professore di Chirurgia Generale
Università di Torino
(14 Dicembre 2007)*

Guido Monga

*Professore di Anatomia Patologica
Università del Piemonte Orientale
(14 Dicembre 2007)*

Umberto Ricardi

*Professore di Diagnostica per Immagini
e Radioterapia
Università di Torino
(14 Dicembre 2007)*

Dario Roccatello

*Professore di Patologia Clinica
Università di Torino
(14 Dicembre 2007)*

Mariella Trovati

*Professore di Medicina Interna
Università di Torino
(14 Dicembre 2007)*

Maria Consuelo Valentini

*Primario di Neuroradiologia
A.O. CTO - CRF - Maria Adelaide di Torino
(14 Dicembre 2007)*

Antonio Bertolotto

*Responsabile Centro Regionale Sclerosi
Multipla
A.O.U. San Luigi Gonzaga di Orbassano
(12 Dicembre 2008)*

Giovanni Camussi

*Professore di Nefrologia
Università di Torino
(12 Dicembre 2008)*

Stefano Carossa

*Professore di Malattie Odontostomatologiche
Università di Torino
(12 Dicembre 2008)*

Claudio Fabris

*Professore di Pediatria
Università di Torino
(12 Dicembre 2008)*

Giovanni Succo

*Primario di Otorinolaringoiatria
Ospedale Martini di Torino
(12 Dicembre 2008)*

Alessandro Bargoni

*Professore di Storia della Medicina
Università di Torino
(18 Dicembre 2009)*

Giuseppe Boccuzzi

*Professore di Endocrinologia
Università di Torino
(18 Dicembre 2009)*

Rossana Cavallo

*Professore di Microbiologia
Università di Torino
(18 Dicembre 2009)*

Luca Cordero di Montezemolo

*Professore di Pediatria
Università di Torino
(18 Dicembre 2009)*

Martino Marangella

*Primario di Nefrologia e Dialisi
A.O. Mauriziano di Torino
(18 Dicembre 2009)*

Ferdinando Rossi

*Professore di Fisiologia Umana
Università di Torino
(18 Dicembre 2009)*

Giorgio Vittorio Scagliotti

*Professore di Pneumologia
Università di Torino
(18 Dicembre 2009)*

Francesco Scaroina

*Primario Emerito di Medicina Generale
A.O. San Giovanni Bosco di Torino
(18 Dicembre 2009)*

Umberto Vitolo

*Primario di Ematologia
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino
(18 Dicembre 2009)*

Soci Onorari Nazionali

Bruno Zanolio

Professore di Storia della Medicina

Università di Pavia

(13 Febbraio 1981)

Rita Levi Montalcini

CNR, Roma

(11 Dicembre 1981)

Ludovico Giulio

Professore di Fisiologia

Università di Torino

(9 Dicembre 1988)

Ernesto Quagliariello

Professore di Biochimica e Biologia Molecolare

Università di Bari

(20 Dicembre 1991)

Elio Guido Rondanelli

Professore di Clinica delle Malattie Infettive

Università di Pavia

(18 Dicembre 1992)

Francesco De Matteis

Professore di Tossicologia

Università di Torino

(17 Dicembre 1993)

Lucio Di Guglielmo

Professore di Radiologia

Università di Pavia

(16 Dicembre 1994)

Ludovico Dalla Palma

Professore di Radiologia

Università di Trieste

(12 Dicembre 1997)

Gian Gastone Neri Serneri

Professore di Clinica Medica

Università di Firenze

(11 Dicembre 1998)

Umberto Marinari

Professore di Patologia Generale

Università di Genova

(15 Dicembre 2000)

Beniamino Tesaro

Professore di Chirurgia Generale

Università di Napoli Federico II

(15 Dicembre 2000)

Rinaldo Bertolino

Professore di Diritto Canonico

Università di Torino

(13 Dicembre 2002)

Adelfio Elio Cardinale

Professore di Radiologia

Università di Palermo

(13 Dicembre 2002)

Mario Umberto Dianzani

Professore di Patologia Generale

Università di Torino

(12 Dicembre 2003)

Lorenzo Moretta

Professore di Immunologia

Università di Genova

(14 Dicembre 2007)

Aldo Fasolo

Professore di Biologia dello Sviluppo

Università di Torino

(12 Dicembre 2008)

Ezio Giacobini

Professore di Neuroscienze

Università di Ginevra e Springfield (Illinois)

(12 Dicembre 2008)

Soci Onorari Esteri

Renato Dulbecco

La Jolla, California

(11 Dicembre 1981)

Ronald J. Linden

Londra

(20 Dicembre 1991)

Gian Franco Bottazzo

Londra

(10 Febbraio 1984)

Robert C. Gallo

Bethesda, Washington

(17 Dicembre 1993)

Ralph John M.C.H. Nicholls

Londra

(18 Marzo 1988)

Alberto Boveris

Buenos Aires

(12 Dicembre 1997)

Liberato J.A. Di Dio

Toledo, Ohio

(9 Dicembre 1988)

Salvador Moncada

Londra

(11 Dicembre 1998)

Hans Konrad Müller Hermelink

Würzburg

(26 Maggio 1989)

Luc Montagnier

Parigi

(16 Dicembre 2005)

Anatoly V. Pokrovsky

Mosca

(26 Maggio 1989)

Josè Viña

Valencia

(14 Dicembre 2007)

Soci Corrispondenti Nazionali

Giuseppe Maria Pontieri
Professore di Patologia Generale
Università La Sapienza di Roma
 (14 Giugno 1974)

Oskar Schindler
Professore di Audiologia e Foniatria
Università di Torino
 (16 Dicembre 1994)

Carlo Grassi
Professore di Malattie Respiratorie
Università di Pavia
 (20 Maggio 1983)

Luigi Spandrio
Professore di Biochimica Clinica
Università di Brescia
 (16 Dicembre 1994)

Ferruccio Mandler
Primario Emerito di Laboratorio
Fondazione Monzino di Milano
 (30 Novembre 1990)

Andrea Ballabio
Professore di Genetica Medica
Università Federico II di Napoli
 (15 Dicembre 1995)

Marco Galloni
Professore di Anatomia Veterinaria
Università di Torino
 (18 Dicembre 1992)

Marcello Garavoglia
Professore di Chirurgia Generale
Università del Piemonte Orientale
 (15 Dicembre 1995)

Fulvia Vignotto
Anestesista
 (18 Dicembre 1992)

Guido Gasparri
Professore di Chirurgia Generale
Università di Torino
 (15 Dicembre 1995)

Giovanni Ceriotti
Professore di Chimica Clinica
Università di Padova
 (16 Dicembre 1994)

Giorgio Maria Innocenti
Professore di Neuroscienze
Karolinska Institutet di Stoccolma
 (15 Dicembre 1995)

Roberto Frairia
Professore di Medicina Interna
Università di Torino
 (16 Dicembre 1994)

Ottavio Davini
Direttore Sanitario
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino
 (10 Dicembre 1999)

Donatella Gattullo
Professore di Fisiologia
Università di Torino
 (16 Dicembre 1994)

Oscar Bertetto
Primario di Oncologia
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino
 (13 Dicembre 2002)

Alberto Biglino

*Professore di Malattie Infettive
Università di Torino
(15 Dicembre 2006)*

Paolo Pera

*Professore di Protesi Dentaria
Università di Genova
(14 Dicembre 2007)*

Giancarlo Cortese

*Primario di Radiodiagnostica
Ospedale degli Infermi di Biella
(15 Dicembre 2006)*

Anna Sapino

*Professore di Anatomia e Istologia Patologica
Università di Torino
(12 Dicembre 2008)*

Soci Corrispondenti Esteri

Jean Lenegre

*Parigi
(25 Marzo 1960)*

Soldano Ferrone

*New York
(20 Maggio 1983)*

Jean Pierre Changeux

*Parigi
(14 Giugno 1974)*

Neville A. Marsh

*Londra
(30 Novembre 1990)*

René Couteaux

*Parigi
(14 Giugno 1974)*

Nicolass Westerhof

*Amsterdam
(18 Dicembre 1992)*

Danilo Baggiolini

*Basilea
(20 Maggio 1983)*

Soci Emeriti

Bruno Boles Carenini
Professore di Clinica Oculistica
Università di Torino
 (23 Maggio 2006)

Napoleone Massaioli
Professore di Chirurgia Generale
Università di Torino
 (23 Maggio 2007)

Guido Filogamo
Professore di Anatomia Umana
Università di Torino
 (23 Maggio 2006)

Mario Portigliatti Barbos
Professore di Medicina Legale
Università di Torino
 (23 Maggio 2007)

Giuliano Maggi
Professore di Chirurgia Toracica
Università di Torino
 (23 Maggio 2006)

Salvatore Rocca Rossetti
Professore di Urologia
Università di Torino
 (23 Maggio 2007)

Gian Michele Molinatti
Professore di Medicina Interna
Università di Torino
 (23 Maggio 2006)

Gian Luca Sannazzari
Professore di Radiologia
Università di Torino
 (23 Maggio 2007)

Angelo Emilio Paletto
Professore di Chirurgia Generale
Università di Torino
 (23 Maggio 2006)

Giorgio Verme
Primario Emerito di Gastroenterologia
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino
 (23 Maggio 2007)

Simone Teich-Alasia
Primario Emerito di Chirurgia Plastica
A.O. CTO - CRF - Maria Adelaide di Torino
 (23 Maggio 2006)

Renato Cirillo
Primario Emerito di Radiologia
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino
 (18 Giugno 2008)

Felice Gavosto
Professore di Medicina Interna
Università di Torino
 (30 Ottobre 2006)

Edmondo Comino
Primario Emerito di Radiologia
A.O. San Giovanni Bosco di Torino
 (18 Giugno 2008)

Paolo Calderini
Primario Emerito di Chirurgia Generale
Ospedale S. Giovanni, Antica Sede di Torino
 (23 Maggio 2007)

Enrico Madon
Professore di Clinica Pediatrica
Università di Torino
 (18 Giugno 2008)

Alessandro Pileri
Professore di Ematologia
Università di Torino
 (18 Giugno 2008)

Pier Luigi Baima Bollone
Professore di Medicina Legale
Università di Torino
 (23 Giugno 2009)

Giorgio Agati
Primario Emerito di Radiologia
A.O. CTO - CRF - Maria Adelaide di Torino
 (23 Gennaio 2009)

Giuseppe Poli
Professore di Patologia Generale
Università di Torino
 (22 Febbraio 2010)

Pier Giuseppe De Filippi
Primario Emerito di Medicina Nucleare
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino
 (23 Gennaio 2009)

Nicola Riccardino
Primario Emerito di Laboratorio,
Analisi Chimiche e Microbiologiche
A.O. Mauriziano di Torino
 (22 Febbraio 2010)

Eugenio Meda
Professore di Fisiologia
Università di Torino
 (23 Gennaio 2009)

Soci Benemeriti

Ing. Enzo Brusasco
 (16 Dicembre 2005)

Dott. Inigo Lopez de la Osa
Escribano
 (14 Dicembre 2009)

Ing. Walter Ceresa
 (16 Dicembre 2005)

Notaio Alberto Morano
 (22 Febbraio 2010)

Dott. Piero Sola
 (16 Dicembre 2005)

Sig. Alessio Giuseppe Lucca
 (4 Ottobre 2010)

Soci già Ordinari

Giovanni Aastaldi

*Primario Emerito
Ospedale Maggiore di Tortona*

Giorgio Cortesina

*Professore di Clinica Otorinolaringoiatrica
Università di Torino*

Massimo Crepet

*Professore di Clinica delle Malattie
del Lavoro
Università di Padova*

Mario Dellepiane

*Primario di Chirurgia Generale
Ospedale Koelliker di Torino*

Ferdinando Dianzani

*Professore di Microbiologia
Campus Biomedico di Roma*

Paolo Gioannini

*Professore di Clinica delle Malattie Infettive
Università di Torino*

Francesco Gorgerino

*Primario Emerito di Anestesia e Rianimazione
Ospedale Martini di Torino*

Raoul Hahn

*Primario Emerito di Otorinolaringoiatria
Ospedale di Rivoli*

Giorgio Mangiarotti

*Professore di Biologia e Zoologia Generale
Università di Torino*

Angela Moiraghi Ruggerini

*Professore di Igiene
Università di Torino*

Mario Morea

*Professore di Cardiocirurgia
Università di Torino*

Walter Neri

*Già Sovrintendente Sanitario
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino*

Augusta Palmo

*Primario Emerito di Dietetica e Nutrizione
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino*

Giovanni Pisani

*Primario Emerito di Radiologia
Ospedale Maggiore di Novara*

Ernesto Pozzi

*Professore di Clinica delle Malattie
dell'Apparato Respiratorio
Università di Pavia*

Luigi Resegotti

*Primario Emerito di Medicina
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino*

Giovanni Sesia

*Primario Emerito di Urologia
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino*

Maria Luisa Soranzo

*Primario Emerito di Malattie Infettive
Ospedale Amedeo di Savoia di Torino
(12 Dicembre 1997)*

Piergiorgio Strata

*Professore di Fisiologia Umana
Università di Torino*

Gianpaolo Trevi

*Professore di Malattie dell'Apparato
Cardiovascolare
Università di Torino*

Regis Triolo

*Primario Emerito di Medicina
Ospedale Martini di Torino*

Gian Carlo Ugazio

*Professore di Patologia Generale
Università di Torino*

Gian Carlo Vanini

*Professore di Igiene
Università Cattolica di Roma*

Pierino Zardini

*Professore di Malattie
dell'Apparato Cardiovascolare
Università di Verona*

Sedute dell'Accademia di Medicina – Anno 2009

9 Gennaio CONVEGNO ANNUALE DELL'ITALIAN MALARIA NETWORK
Relazione introduttiva

Malaria vaccine: hopes and reality

Relatore: Odile PUIJALON-MERCEREAU
Institut Pasteur, Paris

Presentato dal Socio: Paolo ARESE

23 Gennaio **Apoptosi, invecchiamento e cancro**
Relatore: Umberto Maria MARINARI

13 Febbraio **Contaminanti alimentari ad azione estrogenica
e pubertà precoce**

Relatore: Raffaele GUARINIELLO

Presentato dal Socio: Carlo DE SANCTIS

27 Febbraio **Nuove frontiere per una vecchia malattia:
lo scompenso di cuore**

Relatore: Giuseppe LICATA

Presentato dal Socio: Alberto ANGELI

- 13 Marzo* **L'Ospedale in casa: l'esperienza torinese**
Relatori: Nicoletta AIMONINO RICAUDA
e Renata MARINELLO
Presentate dal Socio: Giancarlo ISAILA
- 27 Marzo* **L'imaging funzionale nei tumori cerebrali**
Relatore: Maria Consuelo VALENTINI
- 17 Aprile* **L'endoscopia "substantia immanens" dell'urologia**
Relatori: Francesco PORPIGLIA
e Roberto Maria SCARPA
Presentati dal Socio: Salvatore ROCCA ROSSETTI
- 28 Aprile* **Ribosomi e malattie**
Relatore: Irma DIANZANI
- 8 Maggio* **Farmacogenomica della sclerosi multipla**
Relatore: Antonio BERTOLOTTO
- 22 Maggio* CONVEGNO PER IL CENTENARIO DELLA MORTE
DI CESARE LOMBROSO
in collaborazione con
Università degli Studi di Torino e Regione Piemonte
- Lombroso a Torino (1876-1909): un secolo dopo**
Presidente: Nicola RICCARDINO

- 5 Giugno* **Terapia genica: nuove prospettive**
Relatore: Luigi NALDINI
Presentato dal Socio: Paolo COMOGLIO
- 23 Giugno* **La verità sulle cellule staminali**
Relatore: Giuseppe REMUZZI
Presentato dal Socio: Dario ROCCATELLO
- 2 Ottobre* **La radioterapia guidata delle immagini – IGRT**
Relatore: Umberto RICARDI
- 23 Ottobre* **Promozione della salute,
la nuova sfida della medicina**
*Relatori: Luigi RESEGOTTI
e Sante BAJARDI*
- 10 Novembre* **Seduta inaugurale dell'Anno Accademico 2009/2010**
Relazione del Presidente: Nicola RICCARDINO
- Il “rinascimento” della ricerca clinica
cardiovascolare**
Relatore: Attilio MASERI
Presentato dal Socio: Gianpaolo TREVI

17 Novembre **Nuove strategie terapeutiche per le malattie del metabolismo osseo**

Relatore: Roberto CIVITELLI

Presentato dal Socio: Giovanni Carlo ISAILA

27 Novembre **Gli epiteliomi cutanei**

Relatore: Luigi SANTORO

4 Dicembre SEDUTA IN COLLABORAZIONE CON
L'ACCADEMIA DELLE SCIENZE
E L'ACCADEMIA DI AGRICOLTURA DI TORINO

Le nanotecnologie per la salute dei vegetali e dell'uomo

*Relatori: Angelo GARIBALDI, Lorenzo SILENGO
e Roberto FANTOZZI*

Sedute Private

27 Febbraio **Approvazione rendiconto consuntivo 2008
e bilancio di previsione 2009**

18 Dicembre **Elezione del Presidente e del Vice Presidente
dell'Accademia di Medicina di Torino**
Elezione di nuovi Soci

Sedute Straordinarie

13 Maggio

**Presentazione delle Tesi di Laurea premiate
con il premio di Laurea “Italo Arneodo”**

Francesco PANERO e Maria Teresa RICCI

Presentati dai Relatori:

Paolo CAVALLO PERIN e Barbara PASINI

**Presentazione della Tesi di Laurea premiata
con il contributo della
Fondazione Piera, Pietro e Giovanni Ferrero,
premio di Laurea “Giampiero Gaidano”**

Marco RAVAZZOLI

Presentato dal Relatore:

Giovanni Carlo ISAIA

**RELAZIONE DEL PRESIDENTE
ALLA SEDUTA INAUGURALE DELL'ACCADEMIA
ANNO 2009-2010**

*A*utorità, Signore e Signori, cari Soci e cari amici,
 rivolgo a tutti i presenti un caloroso saluto di benvenuto alla cerimonia inaugurale del nuovo anno accademico dell'Accademia di Medicina di Torino. Grazie per essere qui numerosi a testimoniare con la vostra presenza l'interesse per questa antica istituzione, prezioso patrimonio culturale della nostra città.

Un ringraziamento particolare al Magnifico Rettore, Professor Ezio Pelizetti impossibilitato a partecipare e rappresentato dal Professor Giorgio Palestro, Preside della Facoltà di Medicina per i diversi interventi a favore dell'Accademia che proseguendo quelli dei suoi predecessori: Rinaldo Bertolino e Mario Umberto Dianzani, nostri Soci Onorari che con la loro autorevole presenza conferiscono alla riunione di oggi un significato particolare, interventi che hanno consentito di procedere nelle attività in programma. Analoghi sentiti ringraziamenti alla Regione Piemonte, alla Fondazione CRT, alla Compagnia di San Paolo, alla Fondazione Ferrero, alla Fondazione per l'Osteoporosi, alla famiglia Arneodo, al Rotary, alla Comunità Montana Alta Valle di Susa, a coloro che hanno destinato a noi il 5 per mille, ai professionisti amici, senza i contributi di questi benemeriti avremmo dovuto rinunciare alle nostre iniziative a causa della drastica sospensione del finanziamento del Ministero per i Beni e le Attività Culturali.

La cerimonia odierna, che dal 1964 si ripete senza interruzioni, ha un sapore e una tradizione antica ma nello stesso è moderna e attuale in quanto propone ogni anno tematiche nuove e programmi che riguardano le ricerche più recenti. In questa sede e in questa occasione mi pare opportuno richiamare l'articolo numero uno del nostro Statuto che recita:

L'Accademia di Medicina di Torino propone lo studio e la promozione delle scienze mediche e affini, organizza e patrocinia conferenze, convegni, seminari,

congressi e corsi di aggiornamento, istituisce premi e borse di studio, pubblica una rivista.

Viviamo un'epoca, come per altro nel 500 ha lasciato scritto Shakespeare, nella quale

**“FA PIÙ RUMORE UNA QUERCIA CHE CADE
CHE UNA FORESTA CHE CRESCE”**

nei suoi 164 anni di vita l'Accademia ha certamente contribuito a far crescere la cultura medica, e non solo torinese, senza strombazzature, in sordina, con pochi mezzi ma con impegno costante.

Un saluto particolare e un abbraccio al Professor Guido Filogamo, già presidente, Socio Emerito, che testimonia con la sua presenza faticosa e difficile il profondo legame con l'Accademia!

Proseguendo nella tradizione instaurata dai prestigiosi presidenti con i quali ho avuto l'onore di collaborare: i compianti Professori Rino Colombo, Angelo Carbonara, Adriano Vitelli e fortunatamente ancora con noi: i Professori Mario Umberto Dianzani, Renato Cirillo, Giuseppe Poli, veri maestri dai quali ho molto imparato, riferirò sulle attività svolte nell'ultimo anno.

Alla seduta inaugurale del 14 dicembre 2008 con la relazione del Professor Ezio Giacobini sul morbo di Alzheimer hanno fatto seguito 17 riunioni con relazione, una seduta straordinaria dedicata alla presentazione in aula da parte dei vincitori delle tesi premiate; due sedute private una per le elezioni dei nuovi soci, l'altra per l'approvazione dei bilanci consuntivo e preventivo.

La seduta straordinaria ha avuto luogo il 13 maggio 2008: il Dottor Francesco Panero ha illustrato la sua tesi relatore il Professor Paolo Cavallo Perin, la Dottoressa Maria Teresa Ricci la sua tesi relatrice la Professoressa Barbara Pasini premiate entrambe con il lascito del Dottor Italo Arneodo.

Il Dottor Marco Ravazzoli ha presentato la sua tesi relatore il Professor Gian Carlo Isaia con il fondo della Fondazione Ferrero in memoria del Professor GianPiero Gaidano.

Le sedute private hanno avuto luogo il 12 dicembre 2008 dedicata alle elezioni e il 27 febbraio 2009 per l'approvazione dei bilanci.

La nostra sede ha inoltre ospitato alcuni incontri.
il 18 dicembre 2008 il corso del Professor Oscar Bertetto sui tumori del colon-retto.
Il 9 gennaio 2009 l'Italian malaria network del Professor Paolo Arese.
Il 31 Marzo 2009 la presentazione del libro di Davide Schiffer "Io sono la mia memoria".
Il 10 ottobre 2009 IV corso di formazione della Società Italiana della Banca degli Occhi.

Con il supporto di alcune diapositive ricorderò i titoli delle sedute e i nomi dei relatori. Dopo la seduta inaugurale del 14 novembre 2008 del Professor Ezio Giacobini sul morbo di Alzheimer le riunioni ordinarie sono proseguite con il seguente calendario:

- 21 novembre 2008: Dall'imaging anatomico all'imaging molecolare di Romeo Canini presentato da Edmondo Comino.*
- 2 dicembre 2008: L'interventistica cardiologica nel trattamento dello stroke ischemico di Patrizia Presbitero.*
- 9 gennaio 2009: Malaria vaccine: hopes and reality di Odile Puijalon Mercerau presentata da Paolo Arese. Convegno annuale dell'Italian Malaria Network*
- 23 gennaio 2009: Apoptosi, invecchiamento e cancro di Umberto Maria Marinari*
- 13 febbraio 2009: Contaminanti alimentari ad azione estrogenica e pubertà precoce di Raffaele Guariniello presentato da Carlo De Sanctis*
- 27 febbraio 2009: Nuove frontiere per una vecchia malattia: lo scompenso di cuore di Giuseppe Licata presentato da Alberto Angeli.*
- 13 marzo 2009: L'ospedale in casa: l'esperienza torinese di Nicoletta Aimonino Ricauda e Renata Marinello presentate da Gian Carlo Isaia*
- 27 marzo 2009: L'imaging funzionale nei tumori cerebrali di Maria Consuelo Valentini*
- 17 aprile 2009: L'endoscopia "substantia immanens" dell'urologia di Francesco Porpiglia e Roberto Maria Scarpa presentati da Salvatore Rocca Rossetti.*

- 28 aprile 2009: *Ribosomi e malattie di Irma Dianzani.*
- 8 maggio 2009: *Farmacogenomica della sclerosi multipla di Antonio Bertolotto.*
- 22 maggio 2009: *Lombroso a Torino: un secolo dopo (1876-1909) convegno con la Regione Piemonte di un giorno intero. Coordinatore Pier Luigi Baima Bollone.*
Relatori in ordine: Nicola Riccardino, Mario Umberto Dianzani, Paolo Albarello, Giuseppe Armocida, Giuseppe Poli, Alessandro Bargoni, Giacomo Giacobini, Pier Luigi Baima Bollone, Alberto Angeli, Pier Maria Furlan, Roberto Mutani, Filippo Bogetto, Sergio Vinciguerra.
- 3 giugno 2009 : *Terapia genica: nuove prospettive di Luigi Naldini presentato da Paolo Comoglio.*
- 23 giugno 2009: *La verità sulle cellule staminali di Giuseppe Remuzzi presentato da Dario Roccatello.*
- 2 ottobre 2009: *La radioterapia guidata dalle immagini di Umberto Ricardi.*
- 23 ottobre 2009: *Promozione della salute, la nuova sfida della medicina di Luigi Resegotti e Sante Baiardi.*
- 10 novembre 2009: *Il rinascimento della ricerca clinica cardiovascolare di Attilio Maseri presentato da Gianpaolo Trevi. Seduta inaugurale anno accademico 2009-2010*
- Le prossime sedute saranno:*
- 17 novembre 2009: *Nuove strategie terapeutiche per le malattie del metabolismo osseo di Roberto Civitelli presentato da Gian Carlo Isaia*
- 27 novembre 2009: *Gli epitelomi cutanei di Luigi Santoro*
- 4 dicembre 2009: *Le nanotecnologie per la salute dei vegetali e dell'uomo, in collaborazione con le Accademie di Agricoltura e delle Scienze: di Angelo Garibaldi, Lorenzo Silengo, Roberto Fantozzi*
- 18 dicembre 2009: *Seduta privata per le elezioni del Presidente, del Vice Presidente e dei nuovi Soci.*

Anche quest'anno, grazie a benefattori, è stato possibile premiare quattro giovani colleghi per le loro tesi di laurea, tra le numerose pervenute, tutte valide e meritorie.

Sono risultate vincitrici dei premi:

la tesi della Dottoressa Isabel Resta relatore il Professor Mario Boccardo;

la tesi della Dottoressa Antonia Rotolo relatore Professor Giuseppe Saggio premiate, entrambe, con il lascito testamentario del Dottor Italo Arneodo;

la tesi del Dottor Gilberto Calzolari relatore il Professor Alberto Angeli premiata con il fondo della Fondazione Ferrero in memoria del Professor Gianpiero Gaidano;

la tesi della Dottoressa Elena Suman relatore Professor Gian Carlo Isaia premiata con il fondo della Fondazione per L'Osteoporosi Piemonte.

Una seduta straordinaria sarà dedicata come tradizione alla presentazione, in questa aula, delle tesi da parte dei premiati.

Al termine della mia relazione pregherò il Preside della facoltà, la Dottoressa Arneodo, la vedova del Professor Gaidano e il Professor Isaia di consegnare i relativi premi.

È fresco di stampa e in distribuzione il volume 171 del nostro Giornale, è in corso di stampa il volume 172 che raccoglie le comunicazioni dell'ultimo anno.

Da questo breve riassunto risulta come le relazioni tenute da colleghi illustri provenienti anche dall'estero, abbiano riguardato svariate branche della medicina su temi di grande interesse e di attualità. Sono state seguite da un buon pubblico, costituito non solo da soci e colleghi ed hanno dato luogo come consuetudine a domande e discussioni. È con grande piacere che comunico che con voto unanime del Consiglio di Presidenza, sono stati nominati.

Soci Emeriti:

i Professori Giorgio Agati, Pier Luigi Baima Bollone, Pier Giuseppe De Filippi, Eugenio Meda.

Sono risultati eletti nelle elezioni del 18 Dicembre 2008

Soci Onorari:

Professor Aldo Fasolo e Professor Ezio Giacobini;

Soci Ordinari:

Dr. Antonio Bertolotto, Prof. Giovanni Camussi, Prof. Stefano Carossa, Prof. Claudio Fabris, e Dr. Giovanni Succo.

Socio Corrispondente: Prof.ssa Anna Sapino.

Congratulazioni e rallegramenti per i meritati traguardi e complimenti e auguri ai nuovi Soci che portano nuove e fresche energie alla nostra istituzione.

Dopo tante notizie positive una nota triste, sono deceduti i soci: Valerio Gay, Franco Mollo e Roberto Pattono cari soci e amici: li ricordiamo con affetto e rimpianto, rinnoviamo ai famigliari i sensi del nostro cordoglio; come tradizione saranno commemorati in questa aula.

Prima di terminare la relazione sul secondo anno della mia presidenza e procedere alla consegna dei premi e dei diplomi, e pregare il Professor Paolo Trevi di presentare il prestigioso conferenziere Professor Attilio Maseri, mi corre l'obbligo non formale ma sincero di ringraziare tutti coloro che mi hanno consigliato, aiutato, sorretto nel compimento del mio mandato: i membri del Consiglio di Presidenza: Giuseppe Poli, Alberto Angeli, Gian Carlo Isaia, Paolo Arese, Alessandro Bargoni, Teresa Cammarota, Carlo De Sanctis, senza il loro contributo essenziale e determinante non sarebbe stato possibile realizzare il corposo programma. Li ho lasciati per ultimi proprio per sottolinearne l'importanza. Di ciascuno dovrei elencare l'operato e i meriti, hanno lavorato con grande impegno in modo collegiale: li abbraccio con riconoscenza, affetto e profonda amicizia, e con loro la nostra storica, inossidabile segretaria, la signora Alda Riva affiancata dalla gentile signora Lidia Morea. E un grazie sentito a tutti i relatori, alcuni venuti da lontano, ai soci, agli amici che hanno partecipato ai nostri programmi facendo sì che anche in questo anno l'Accademia di Medicina di Torino rispettasse lo statuto che ho ricordato contribuendo, consentitemi di citare ancora Shakespeare: A FAR CRESCERE SENZA TANTO RUMORE LA FORESTA delle conoscenze mediche! Con questa consapevolezza dichiaro ufficialmente aperto l'anno accademico 2009-2010, 164 dalla fondazione di Re Carlo Alberto.

Nicola Riccardino

SVILUPPO MAMMARIO PRECOCE E INQUINANTI ALIMENTARI

Carlo de Sanctis¹, Raffaele Guariniello²

¹ Endocrinologia Pediatrica
Ospedale Infantile Regina Margherita - Torino

² Procura della Repubblica - Torino

Key words: *Endocrine disrupters / Disregolatori endocrini*
 Precocious thelarche / Telarca precoce
 Gynecomastia / Ginecomastia

Abstract:

In microepidemic events of mammary enlargement in girls (defined as “precocious telarche”) or in boys (defined as “gynecomasty”), the international scientific literature gave great relief to the endocrine disruptors with oestrogenic or simil-oestrogenic action present in the food as pathogenetic mechanism. They are natural or synthetic hormones used in the cattle farms (known as auxinics), or vegetable compounds (known as phytoestrogens), or chemical compounds (known as xenoestrogens) used in the industry and in agriculture, that accumulate in the countries and contaminates the cultures and waters. After an alarm of food contamination considered responsible of the frequent appearance of precocious telarche and gynecomasty in children from the Province of Torino during the spring 2003, we wanted to verify the incidence of these manifestations and to collect probative elements for food contamination in the children’s population observed at the Pediatric Endocrinology Unit of the Regina Margherita Children’s Hospital. In the 2001-2006 period, precocious thelarche was observed in 331 girls, gynecomasty in 16 boys. The results of the study did not allow to indicate a specific origin for the premature telarche, whereas the observation of gynecomastia in 2 pairs of male twins allowed to support the food contamination hypothesis. With the suspicion that an offence hypothesis could rise from these series, these observations (and overall the ones of the 2003) have been sent to the Republic Prosecutor, even if the troubles in the recognition of the cause-effect relation are well known. A first profile of criminal liability can be the personal without malice aforethought offence, foreseen from the Art. 540 of the Penal Code, that punishes anyone causes a lesion from which comes a disease. Another crime’s hypothesis is the one foreseen from the Art.440 of the Penal Code, that punishes anyone alters substances addressed to the feeding before their distribution for the public consumption, making them dangerous for the public health.

Riassunto:

In presenza di microepidemie di ingrandimento mammario in bambine (definito “telarca precoce”) o in bambini (definito “ginecomastia”), la letteratura scientifica internazionale ha dato, come causa patogenetica di queste manifestazioni, grande rilievo ai endocrine disruptors ad azione estrogenica o simil-estrogenica assunti con gli alimenti. Sono ormoni naturali e di sintesi utilizzati nell’allevamento di bestiame, conosciuti come auxinici, o composti di origine vegetali, noti come fitoestrogeni, o composti chimici, conosciuti come xenoestrogeni che, impiegati nell’industria e in agricoltura, si accumulano nei terreni e contaminano colture ed acque.

A seguito di un allarme, nella primavera del 2003, di inquinamento alimentare, ritenuto responsabile della frequente comparsa di telarca precoce e di ginecomastia nei bambini della provincia di Torino, si è voluto verificare la frequenza dei casi con queste manifestazioni osservati presso l’Endocrinologia pediatrica dell’Ospedale Infantile Regina Margherita e raccogliere elementi probativi di contaminazione alimentare.

I casi di telarca precoce, osservati dal 2001 al 2006, sono stati 331, quelli di ginecomastia 16. I risultati dello studio non sono stati di particolare significato sull’origine del telarca, mentre l’osservazione della ginecomastia in 2 coppie di gemelli della stessa famiglia rendeva molto probabile l’esposizione ad inquinanti alimentari.

Con il sospetto che potessero emergere ipotesi di reato, la documentazione dei casi, soprattutto quelli giunti nell’anno 2003, è stata inviata alla Procura della Repubblica, pur conoscendo le difficoltà sul riconoscimento del rapporto causa – effetto.

Un primo profilo di responsabilità penale può essere il reato di lesione personale colposa, previsto dall’Art. 540 del codice penale, il quale punisce chiunque cagiona ad altri una lesione da cui derivi una malattia. Un’altra ipotesi di reato è quella prevista dall’Art. 440 del codice penale, il quale punisce chiunque adultera sostanze destinate all’alimentazione prima che siano distribuite per il consumo rendendole pericolose per la salute pubblica.

Nella letteratura scientifica internazionale vi sono numerose segnalazioni di ingrandimento mammario in bambine (definito “telarca”) o in bambini (definito “ginecomastia”) riferito a composti estrogenici o simil estrogenici (noti come “disregolatori endocrini” o con il termine anglossassone “endocrine disrupter”) presenti negli alimenti^(1,6,13,15). Tali segnalazioni hanno ingenerato un timore diffuso nel consumatore ed hanno contribuito ad accrescere l’attenzione sui rischi espositivi alimentari.

IL TELARCA PRECOCE E LA GINECOMASTIA

Il telarca precoce è una manifestazione caratterizzata dallo sviluppo di una o entrambe le mammelle in bambine prima dell’8° anno di vita, le cui caratteristiche cliniche sono riportate nella Figura 1. È un evento che può presentarsi in forma isolata, o associata ad altri segni di sviluppo puberale. Nella maggior parte dei casi si tratta della forma isolata ed è generalmente benigna per le forme ad esordio nei primi 2 anni, mentre quando insorge negli anni successivi può evolvere, nel 7-15% dei casi, in pubertà precoce.

Le cause patogenetiche più accreditate in letteratura sono rappresentate da un aumento di estrogeni endogeni conseguenti ad una iperattività ipotalamo-ipofisi ovarica (causa endogena) o dall’assunzione di estrogeni o composti estrogeno - simili con gli alimenti (causa esogena)^(7,12).

Si definisce ginecomastia l’ingrandimento mammario nel maschio con caratteristiche cliniche non dissimili da quelle riportate a proposito del telarca. Questa condizione è generalmente fisiologica quando è presente nel periodo neonatale, in adolescenza e nell’età senile. In età infantile si manifesta raramente e l’eziopatogenesi è multifattoriale. Sono state riportate cause endogene (aumentata produzione di estrogeni o aumentata conversione di

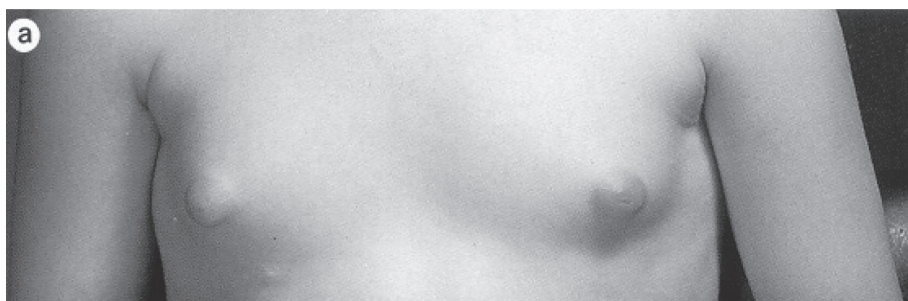


Figura 1. Bambina di 3 anni con telarca precoce caratterizzato da ingrandimento mammario bilaterale con disco subareolare di 2-3 cm., capezzoli sporgenti, areole allargate ed iperpigmentate.

estrogeni dagli androgeni a seguito, soprattutto, di patologie tumorali) e cause esogene rappresentate dall'assunzione di droghe, di composti estrogenici o simil-estrogenici⁽¹²⁾.

In bambine e bambini con telarca precoce o ginecomastia è comunque sempre indispensabile un'adeguata e approfondita indagine sull'impiego di terapie farmacologiche, sull'assunzione accidentale di farmaci, sull'utilizzo di prodotti dermatologici e tricologici contenenti estrogeni o sostanze con azione estrogeno - simili e sulle abitudini alimentari. Il rischio espositivo alimentare merita particolare rilievo soprattutto in momenti ad alta criticità, cioè in circostanze di aumentata concentrazione di pazienti con telarca precoce o ginecomastia in specifiche aree territoriali.

I DISREGOLATORI ENDOCRINI AD AZIONE ESTROGENICA

La comunità scientifica internazionale ha prestato attenzione agli “endocrine disrupters”, sostanze inquinanti che posseggono attività ormonale. Sono composti naturali o di sintesi che, interagendo con la secrezione, l'azione o il catabolismo degli ormoni endogeni, alterano l'omeostasi endocrina dell'organismo con la comparsa di vari quadri clinici patologici^(1,4,15). I dati scientifici, oggi disponibili, hanno confermato che la potenzialità del danno varia con la suscettibilità del bersaglio, a sua volta dipendente dal sesso e dall'età del soggetto. In questa ottica, la gravidanza, l'allattamento, l'età evolutiva sono considerati i momenti di maggiore vulnerabilità. È pertanto assolutamente necessario un'attenta strategia di controllo generale e specifico degli alimenti destinati alla gestante, alla nutrice e all'infanzia.

I disregolatori endocrini meglio studiati sono quelli ad azione estrogenica o simil - estrogenica conosciuti comunemente come “auxinici, fitoestrogeni e xeno – estrogeni” (Tabella I).

Gli auxinici sono composti ormonali naturali (17α e 17β estradiolo, estrone) e di sintesi (dietilstilbestrolo) impiegati negli allevamenti con funzione anabolizzante e riscontrabili nel latte di mucca e nella carne bovina e di pollo⁽⁴⁾.

I fitoestrogeni, di cui fanno parte gli isoflavoni, i lignani e lo zeranolo , sono estrogeni di origine vegetale, prodotti naturalmente dalle piante⁽¹⁶⁾. Anche se presenti in alte dosi nell'alimentazione quotidiana (oli vegetali, soia, legumi, mais, frutta) non sono generalmente causa di fenomeni di accumulo in quanto vengono metabolizzati dagli organismi viventi.

Gli xeno-estrogeni sono composti chimici (difenili-polibrominati: PBB, ftalati, diclorodifeniltricloroetano: DDT, diclorodifeniltricloroetilene: DDE)

AUXINICI (composti ormonali naturali e di sintesi impiegati negli alimenti)	17 α E 17 β ESTRADIOLO ESTRONE DIETILSTILBESTROLO
FITOESTROGENI (composti naturali presenti nei vegetali e cereali)	ISOFLAVONI-LIGNANI: piselli, fagioli, lenticchie, rape, broccoli, zucca, frutta (uva, fragole, lampone, ribes, mirtilli), soia, grano, oli vegetali ZERANOLO: micotossina prodotta da un microfungo presente nel mais
XENO-ESTROGENI (composti chimici impiegati nell'industria e nell'artigianato)	BIFENILI POLIBROMINATI (PBB): rivestimenti di scatole, di mobili, e di contenitori, fogli per involucri, colle, adesivi, detersivi, disinfettanti, additivi FTALATI: sostanze ammorbidenti la plastica contenute in fogli per confezioni, negli oggetti di casa e per l'infanzia (tettarelle, giocattoli) DDT: (diclorodifeniltricloroetano): pesticida p-pl DDE (diclorodifenildicloroetilene): pesticida

Tabella I. Disregolatori endocrini alimentari ad azione estrogenica o simil – estrogenica.

impiegati nell'industria in rivestimenti di scatole e di mobili, nelle colle, adesivi, additivi, negli oggetti di casa e per l'infanzia e in agricoltura come pesticidi⁽⁴⁾. Contrariamente ai fitoestrogeni naturali sono poco metabolizzati dai sistemi biologici e quindi persistono nell'ambiente. Essendo liposolubili hanno tempo di dimezzamento di decenni, si accumulano nei terreni, contaminano colture, acque, e giungono all'uomo e provocano effetti endocrini anche se posseggono una potenza generalmente 100-300 volte inferiore a quella degli ormoni endogeni⁽¹³⁾.

Nella valutazione degli effetti nocivi, oltre al fenomeno di accumulo per il quale queste sostanze possono raggiungere concentrazioni biologicamente attive, va tenuto presente che lo stesso campione biologico può essere contaminato da più componenti simili con conseguente potenziamento dell'attività biologica totale. Nel sud della Spagna, ad esempio, sono stati rilevati nel latte materno almeno 10 diversi tipi di pesticidi comunemente usati nell'attività agricola del territorio: alle concentrazioni rilevate ciascuna

di queste sostanze non produce alcun esito, mentre la loro combinazione produce, per effetto cumulativo, una significativa attività ormonale⁽¹³⁾.

Gli effetti a lungo termine, indotti dall'esposizione cronica di queste sostanze, sono stati presentati in alcuni studi, destando un grande interesse nell'opinione scientifica.

È stato documentato il loro effetto negativo sull'accrescimento del feto e sulla differenziazione sessuale condizionando nel neonato un basso peso alla nascita e quadri malformativi (ipospadia, criptorchidismo). Nel periodo prepuberale sono stati riportati effetti sulla comparsa di ginecomastia, di telarca precoce, di menarca precoce e di pubertà precoce.

Di grande rilevanza sociale sono anche le pubblicazioni che riportano l'osservazione di "microepidemie" di telarca e ginecomastia evidenziate negli ultimi decenni in diversi Paesi. Nel Bahrein fu riportata la presenza di telarca in 7 bambine e di ginecomastia in 1 bambino che assumevano latte di mucca trattata con un prodotto estrogenico⁽¹⁰⁾. In un'ampia popolazione scolastica italiana fu segnalata la presenza di telarca precoce o di ginecomastia ricondotti a una probabile ingestione, alla mensa scolastica, di carne bovina o di pollo trattata con prodotti auxinici⁽⁸⁾. In PortoRico è stata rilevata una microepidemia di telarca precoce che comportò una complessa ed articolata interpretazione multifattoriale: venne sostenuta l'assunzione di estrogeni attraverso carni e latte a produzione locale⁽¹⁴⁾; l'assunzione di alimenti confezionati in materiali plastici trattati con ftalati⁽⁵⁾; l'assunzione di derivati del mais e del latte di soia ad alto contenuto di fitoestrogeni⁽⁹⁾. L'esposizione protratta ai fitoestrogeni è stata anche descritta, come causa responsabile del telarca precoce, in bambine di un territorio di Gerusalemme⁽³⁾. Xeno-estrogeni sono stati ritenuti responsabili di 2 microepidemie, rispettivamente in aree geografiche del Michigan e del Belgio: Il 1° studio riporta ragazze con menarca precoce nate da madri con livelli elevati di PBB⁽²⁾; il 2° riporta una prevalenza di sviluppo puberale precoce in bambine, adottate ed immigrate da Paesi in via di sviluppo, presentanti nel siero livelli di DDE significativamente superiori rispetto alla bambine autoctone.

OSSERVAZIONE CLINICA

Nella primavera del 2003 alcuni quotidiani riportavano in molte bambine e bambini uno sviluppo precoce del seno riferibile all'assunzione di alimenti, soprattutto di carni. A seguito di questo allarme e del rischio di inquinamento alimentare si è ritenuto opportuno verificare la frequenza di casi di telarca precoce e di ginecomastia, osservati presso l'Endocrinologia Pediatrica

dell'Ospedale Regina Margherita di Torino, e raccogliere gli elementi probativi di contaminazione alimentare.

L'indagine, iniziata nell'anno 2003, è stata protratta per 4 anni, sino al 2006, ed è stata completata con l'analisi retrospettiva dei casi di telarca precoce giunti all'osservazione negli anni 2001 e 2002.

È stata disposta la scheda raccolta dati anamnestici, clinici, ormonali (Tabella II) nella quale in bambine tra 6 mesi e 7 anni con telarca precoce e in bambini tra 6 mesi e 10 anni con ginecomastia venivano riportate le caratteristiche dello sviluppo mammario, la valutazione auxologica (altezza, peso, velocità di crescita, età ossea) ed il quadro clinico generale.

In tutti si è indagato sulla presenza delle manifestazioni nel nucleo familiare, nella scuola, nell'area urbana di appartenenza e sul tipo di carni e vegetali assunti con l'alimentazione e sulle ditte e negozi fornitori di questi prodotti.

La valutazione ormonale ha comportato il dosaggio plasmatico delle gonadotropine, in situazione basale e dopo stimolo farmacologico con 100 mcg di LH-RH, del 17 β estradiolo, del testosterone e l'esame del profilo steroidurico urinario delle 24 ore. Queste indagini sono state eseguite in tutti i casi di ginecomastia, mentre sono state valutate le gonadotropine e il 17 β estradiolo solo in alcune bambine con telarca precoce, soprattutto quelle giunte all'osservazione nell'anno 2003.

Reclutamento	• bambine di 1-7 anni con telarca precoce • bambini di 1-8 anni con ginecomastia
Esame clinico	
Indagine anamnestica sulla presenza di telarca precoce	• nucleo familiare • scuola e mensa scolastica frequentata • area urbana di appartenenza
Indagine sull'impiego di omogeneizzati, liofilizzati e alimenti animali e vegetali	• ditte e negozi fornitori • tipo e marca • inizio e durata dell'assunzione
Valutazione ormonale	• 17 beta estradiolo, testosterone • FSH, LH basale e dopo LH RH • profilo steroidurico

Tabella II. Scheda raccolta dati anamnestici, clinici, ormonali.

Le bambine prese in considerazione in questa osservazione avevano un telarca precoce isolato mono o bilaterale senza altri segni di pubertà. Lo sviluppo mammario si presentava con scarsa pigmentazione dell'areola. La crescita staturale, la velocità di crescita e l'età ossea erano adeguati all'età cronologica.

I casi di telarca precoce, osservati dal 2001 al 2006, sono stati 331, provenienti soprattutto dalla Provincia di Torino (casi 285: 86%) e in scarso numero da altre Province del Piemonte (casi 41: 13%) e da altre Regioni (casi 5: 1%). Le bambine erano per la maggior parte della 1° infanzia: 296 casi (89%) di età tra 6 mesi-3 anni; 35 casi (11%) tra 3-7 anni.

Nell'anno 2003 sono giunti all'osservazione un numero maggiore di casi di telarca precoce (Figura 2): sono state esaminate 110 bambine molto di più di quelle osservate negli anni precedenti e successivi, durante i quali i casi valutati erano mediamente 44 per anno.

L'incremento nell'anno 2003, rispetto al 2002, è stato del 161% (Figura 2).

I risultati dello studio ormonale non sono stati di particolare significato sull'origine delle manifestazioni cliniche. I valori delle gonadotropine FSH ed LH, in situazione basale e quelli di LH, valutati anche dopo test farmacologico, sono risultati sovrapponibili ai soggetti prepuberi. In alcuni casi il 17β estradiolo e i valori di picco di FSH dopo stimolo con LH-RH erano elevati, come spesso viene riportato in letteratura nei casi di telarca prematuro.

È importante segnalare che in nessun caso sono emersi valori di LH superiori a quelli dell'FSH (reperto che caratterizza i pazienti con pubertà precoce

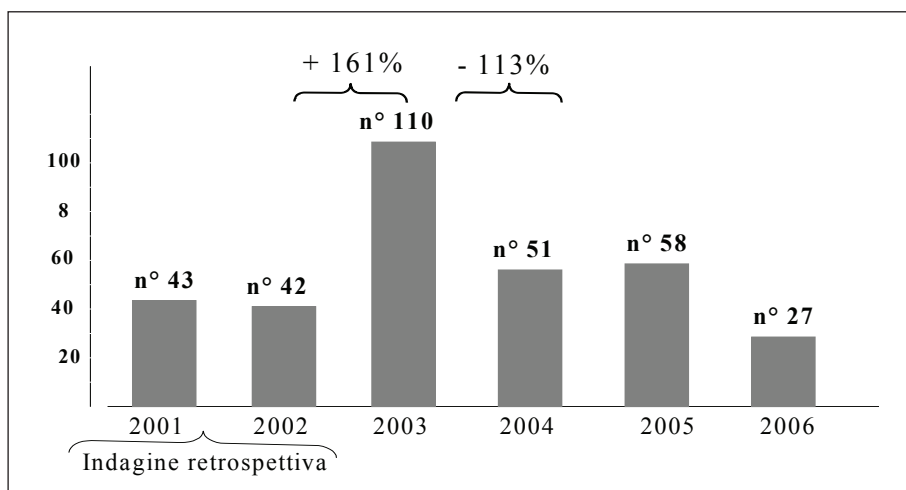


Figura 2. Casi (n 331) di telarca precoce isolato osservati dal 1/01/2001 al 31/12/2006.

centrale) e valori soppressi di entrambe le gonadotropine (reperto riportato in soggetti in corso di assunzione cronica di sostanze estrogeniche).

Dai dati raccolti nessuna delle bambine frequentava la stessa scuola e solo alcune utilizzavano abitualmente la mensa scolastica. Gli omogeneizzati e i liofilizzati assunti erano di diverse marche ed erano stati acquistati in diversi centri di rifornimento. Gli alimenti di origine animale e vegetale consumati non provenivano dagli stessi rivenditori. Nell'indagine svolta non sono, quindi, emersi elementi probativi di contaminazione ambientale responsabili della manifestazione clinica.

I bambini giunti all'osservazione negli anni 2003-2006 per ginecomastia sono stati 16, di numero inferiore alle bambine con telarca, confermandosi la rarità di questa manifestazione in età prepubere.

Tra questi casi è importante riportare la presenza di ginecomastia in 2 coppie di gemelli della stessa famiglia, rispettivamente di 7.7 anni e di 10.7 anni. Tutti presentavano un ingrandimento mammario bilaterale con disco subareolare di 2-3 cm, capezzoli sporgenti, areole allargate e iperpigmentate. I dati ormonali mostravano livelli soppressi di gonadotropine (FSH-LH) in situazione basale e dopo stimolo, mentre i valori di 17β estradiolo, di testosterone e quelli del profilo steroidurico erano sovrapponibili a quelli dei soggetti prepuberi, consentendo l'esclusione di altre patologie endocrine.

CASI	FSH (UI/l)		LH (UI/l)		T (ng/ml)	17 β E (pg/ml)	profilo steroidurico
	basale	dopo LHRH	basale	dopo LHRH			
GM	0.04	0.4	0.01	0.3	0.09	6	N
GN	0.05	0.6	0.03	0.5	0.1	14	N
GL	0.05	0.9	0.01	0.8	0.1	8	N
GJ	0.05	0.9	0.02	1.1	0.1	6	N
Legenda: N = valori normali							

Tabella III. Dati ormonali di 2 coppie di gemelli di sesso maschile della stessa famiglia, rispettivamente di 10.7 e 7.7, giunti all'osservazione per ginecomastia.

La contemporanea comparsa della ginecomastia nei 4 fratelli, i dati ormonali, la rapida regressione della sintomatologia, avvenuta in tutti i casi 6-8 mesi dopo l'esordio, rendono molto probabile che il quadro clinico possa essere condizionato dall'esposizione ad inquinanti alimentari, dalla presenza di un farmaco ad azione estrogenica o di altra sostanza estrogeno-simile che, per via inalatoria o percutanea o per ingestione, possono produrre l'effetto.

Con questo sospetto la documentazione dei casi di ginecomastia unitamente a quella dei casi di telarca precoce, giunti soprattutto nell'anno 2003, è stata inviata alla Procura della Repubblica per valutare l'opportunità di un controllo degli alimenti destinati all'infanzia onde evitare che prodotti non biologicamente sicuri possano giungere all'uomo.

Ancora oggi gli ormoni anabolizzanti, nonostante siano stati banditi dal mondo occidentale, vengono utilizzati in modo fraudolento nell'allevamento del bestiame. Ancora oggi i pesticidi e i bifenili, usati in agricoltura e nella linea produttiva industriale e accumulati per decenni nei terreni, possono contaminare le acque e le colture.

Tra i maggiori problemi da affrontare su questo argomento rimane quello della difficile identificazione tossicologica e del rapporto causa-effetto.

Le maggiori difficoltà sono legate non solo al numero elevato di composti estrogenici e simil estrogenici (a tutt'oggi sono state identificate circa 7000 molecole) presenti negli alimenti ed in grado di stimolare i meccanismi biologici che sono alla base del telarca e della ginecomastia, ma anche al fatto che l'effetto endocrino avviene a concentrazioni minime, addirittura 1000 volte inferiori alle dosi tossiche, ed in relazione alla durata dell'assunzione. È complesso il riconoscimento di queste sostanze anche nell'uomo: evidenziare la loro presenza in circolo, il loro legame con le proteine plasmatiche, con il recettore mammario.

RESPONSABILITÀ PENALI

Tra i numerosi casi segnalati di telarca precoce e ginecomastia, in un gruppo di 109 bambini (101 femmine e 8 maschi; 97 di età inferiore a 12 mesi) che avevano presentato la sintomatologia soprattutto nel corso dell'anno 2003, sono state eseguite alcune valutazioni. L'analisi è stata condotta predisponendo dei questionari e prendendo le informazioni presso i familiari di questi bambini. Su 109 casi, in 19 la diagnosi fu precedente lo svezzamento, invece in 90 fu contemporanea o successiva. Da notare che la sintomatologia si è manifestata, nell'81% dei casi, dopo l'introduzione nell'alimentazione di cibi diversi dal latte materno o artificiale.

Si è cercato di capire dove fossero stati acquistati i liofilizzati e gli omogeneizzati, soprattutto in 48 casi in cui la sintomatologia era comparsa dopo l'introduzione di carne fresca. Il tipo di carne era indifferentemente quella bianca e quella rossa. Gli esercizi commerciali interessati erano soprattutto macellerie.

Di fronte a questa casistica il Pubblico Ministero si chiede: ci sono o non ci sono responsabilità penali? Un primo profilo di responsabilità penale può essere un reato perseguibile a querela della persona offesa, e, cioè, il reato di lesione personale colposa, previsto dall' art. 590 del codice penale, il quale punisce chiunque cagiona ad altri una lesione da cui derivi una malattia. A questo proposito è stata fatta una valutazione, anche di carattere medico-legale, e di questa valutazione due punti possono essere interessanti.

Il primo è che l'assunzione di estrogeni con gli alimenti, come causa di manifestazione clinica, trae origine da molte segnalazioni che arrivano da diverse fonti: l'elevato numero di vitelli che alla macellazione presentano segni di trattamento con estrogeni o con sostanze estrogeno-simili; l'impiego in agricoltura di prodotti, tipo insetticidi e pesticidi, con una documentata azione estrogenica; la presenza in molti vegetali di fitoestrogeni, che per la loro struttura simile agli estrogeni naturali o di sintesi, hanno un'affinità con i recettori dei tessuti estrogeno-sensibili. È possibile, pertanto, che la presenza di ormoni, anche in piccolissime quantità, in prodotti alimentari della prima infanzia condizioni lo sviluppo mammario.

La seconda considerazione è che il telarca si può classificare come un'alterazione dello stato preesistente che possiede quei caratteri di evolutività verso la guarigione, con o senza postumi, insiti nel concetto di malattia penalmente rilevante.

Due punti per noi importanti: l'art. 590 del codice penale punisce chiunque cagiona ad altri una lesione da cui derivi una malattia. Però, il reato di lesione personale colposa, in tanto risulta provato, in quanto, come dice la Corte di Cassazione, si accerti con un elevato grado di probabilità logica che quella malattia sia associabile ad una specifica condotta colposa: ad esempio, ad una specifica condotta colposa di un ben identificato allevatore che abbia trattato un vitello con estrogeni la cui carne abbia determinato quella specifica malattia in quello specifico bambino. È un'impresa che solo a dirlo, appare molto ardua.

Il Pubblico Ministero cosa altro può fare di concreto? È apparso più realistico in questi casi cercare di fare prevenzione, sviluppare investigazioni a carattere preventivo, volte a verificare l'effettiva osservanza delle norme che proteggono la sicurezza alimentare. Di qui l'esigenza di campionamenti di

carne, di liofilizzati, di omogeneizzati; l'esigenza di accertamenti, sopralluoghi, addirittura perquisizioni, anche intercettazioni ambientali.

A questo proposito, il Ministero della Sanità e le Regioni stanno raccogliendo da qualche anno dati degni di menzione in uno studio sugli allevamenti dei bovini che comporta prelievi di organi bersaglio di bovini macellati presso i macelli in particolare di quattro Regioni: Piemonte, Emilia Romagna, Lombardia, Veneto. I risultati di questo studio sono significativi: perché gli allevamenti, in cui sono state rilevate lesioni gravi a carico degli organi bersaglio, sono pari in Piemonte al 37,3% degli allevamenti, in Lombardia al 33,3%, in Emilia Romagna al 14%, nel Veneto al 1,1%. Il commento dell'Istituto Superiore della Sanità è stato che l'uso illegale di farmaci negli allevamenti bovini, finalizzato soprattutto ad ottenere un miglioramento quantitativo delle rese in carni, è molto preoccupante.

Allora quali ipotesi di reato si possono eventualmente contestare e cercare di accertare? Una prima ipotesi di reato è quella prevista dall'art. 440 del codice penale, il quale punisce molto severamente con la reclusione sino a 10 anni chiunque adultera sostanze destinate all'alimentazione prima che siano distribuite per il consumo rendendole pericolose per la salute pubblica. C'è un altro reato, previsto dall'art. 444 del codice penale, che punisce chiunque detiene e pone in commercio sostanze destinate all'alimentazione, sostanze non adulterate ma pericolose alla salute pubblica.

Si è sviluppata una ricchissima giurisprudenza soprattutto legata agli allevamenti piemontesi. Paradigmatico è un caso affrontato dalla Corte di Cassazione in una sentenza depositata il 16/01/2009. Qui la Corte d'Appello di Torino aveva confermato la condanna di un allevatore per il reato previsto dall'art. 440 del codice penale per aver trattato dei bovini prima della distribuzione delle carni degli animali per l'alimentazione umana, con prodotti farmaceutici tali da renderne pericoloso il consumo per la salute pubblica. Condanna alla pena della reclusione per anni 2. Era stato accertato che agli animali, clinicamente sani al momento dell'importazione, erano state somministrate da parte dell'allevatore con ripetute inoculazioni, farmaci a base di sulfamidici e desametasone e poi i bovini erano stati inviati alla macellazione clandestina in assenza della necessaria certificazione ed in orario in cui non era presente il veterinario.

È difficile riuscire a contestare un caso di lesione personale a una singola persona, però è possibile sviluppare indagini volte a verificare la situazione di allevatori che utilizzano farmaci non per curare le malattie.

Un ultimo aspetto da sottolineare riguarda i medici e la collaborazione tra medici e l'autorità giudiziaria. Abbiamo visto che, nei casi di telarca o

ginecomastia, possono emergere ipotesi di reato. Allora bisogna ricordare che, in base a 2 articoli, il 365 del codice penale e il 334 del codice di procedura penale, chiunque abbia prestato nell'esercizio della propria professione sanitaria la propria assistenza o opera in casi che possono presentare i caratteri di un delitto perseguibile d'ufficio (come il delitto di cui all'art. 440 o 444 c.p.), ha l'obbligo di fare referto all'Autorità giudiziaria, ovvero ad altra Autorità che a sua volta ha l'obbligo di riferirne all'Autorità giudiziaria. Entra in gioco l'obbligo di referto all'Autorità giudiziaria, al Pubblico Ministero, obbligo sanzionato dall'art. 365 del codice penale. Perché sorga questo obbligo, alla luce dell'insegnamento della nostra giurisprudenza, occorre che sia certo il nesso causale tra il caso di telarca e la contaminazione alimentare? È un'interrogativo a cui dà una risposta l'art. 365 del codice penale il quale punisce chi omette o ritarda il referto. Dice la norma, testualmente, che sussiste l'obbligo di referto in casi che possono presentare i caratteri di un delitto perseguibile d'ufficio, non in casi che presentano i caratteri di un delitto perseguibile d'ufficio. A far scattare l'obbligo di referto non occorre la certezza e non occorre nemmeno la probabilità, ma basta la semplice possibilità che un caso, ad esempio, di telarca sia associabile alla contaminazione alimentare. Non tocca al medico, ma al magistrato, archiviare nei casi in cui non ci sia reato.

Quindi, noi abbiamo un fenomeno importante da prendere in considerazione, abbiamo delle possibilità di agire. Sarebbe altrettanto importante che nascesse una collaborazione tra Medici e Magistrati sul fronte del telarca e della ginecomastia.

BIBLIOGRAFIA

1. Alves C, Chagas Flores L, Cerqueira TS, Toralles MB: *Environmental exposure to endocrine disruptors with estrogenic activity and the association with pubertal disorders in children*. Cad. Saude Publica, Rio de Janeiro 2007; 23: 1005-1014.
2. Black HM, Marcus M, Tolbert PE, Rubin C, Henderson AK, Hertzberg VS, Zhang RH, Cameron L.: *Age at menarche and tanner stage in girls exposed in utero postnatally to polybrominated biphenyl*. Epidemiology 2000; 11: 641-647.
3. Boneh A, Landau H, Friendlander N: *Age and seasonal factors in the incidence of premature sexual development in girls in Jerusalem area*. Clin. Invest. Med. 1989; 12: 172-174.
4. Chiabotto P, Costante L, de Sanctis C: *Premature thelarche and environmental pollutants*. Minerva Med. 2006; 97: 277-285.
5. Colon I., Caro D., Bourdony C., Rosario O.: *Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development*. Environmental Health Perspective. 2000; 108: 895-900.
6. Den Hong E, Schoeters G: *Endocrine disrupters and human puberty*. International Journal of Andrology. 2006; 29: 264- 271.
7. de Sanctis C, Bisbocci D, Frajria R, Boccuzzi G, Lala R, Angeli A: *La risposta gonadotropinica all' LH-RH e la risposta prolattinica al TRH nel telarca prematuro*. Riv. Ital. Ped. 1977; 3: 185-193.
8. Fara GM, Del Corvo G, Bernuzzi S, Bigatello A, Di Pietro C, Scaglioni S, Chiumello G: *Epidemic of breast enlargement in an Italian school*. Lancet. 1979; 2: 295-297.
9. Freni-Titulaer LW, Cordero JF, Haddock L, Lebrón G, Martínez R, Mills JL.: *Premature telarche in Puerto Rico. A search for environmental factors*. Am. J. Dis. Child. 1986; 140: 1263-1267.
10. Kimball AM, Hamadeh R, Mahmood RA, Khalfan S, Muhsin A, Ghabrial F, Armenian HK.: *Gynecomastia among children in Bahrain*. Lancet .1981; 1: 671-672.
11. Krstevska-Konstantinova M, Charlier C, Craen M, Du Caju M, Heinrichs C, de Beaufort C, Plomteux G, Bourguignon JP: *Sexual precocity after immigration from developing countries to Belgium: evidence of previous exposure to organochlorine pesticides*. Human Reproduction 2001; 16: 1020-1026.
12. Lee PA, Houk CP: *Puberty and Its disorders*. In "Pediatric Endocrinology – fifth edition", 2007: 273-303, Inform Healthcare Ed, New York.
13. Massart F, Parrino R, Seppia P, Federico G, Saggese G: *How do environmental estrogen disruptors induce precocious puberty?* Minerva Pediatr. 2006; 58: 247-254.
14. Saenz de Rodriguez CA, Bongiovanni AM, Conde de Borrego L: *An epidemic of precocious development in Puerto Rican children*. J. Pediatr. 1985; 107: 393-396.
15. Schoeters G, Den Hond E, Dhooge W, Van Larebeke N, Leijls M: *Endocrine disruptors and abnormalities of pubertal development*. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 2008; 102: 168-175.
16. Stark A, Madar Z: *Phytoestrogens: A Review of Recent Findings*. JPEM 2002; 15: 561-572.

NUOVE FRONTIERE PER UNA VECCHIA MALATTIA: LO SCOMPENSO DI CUORE

Giuseppe Licata, Gaspare Parrinello, Daniele Torres

Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica

Unità dello Scompenso Cardiaco

Università degli Studi di Palermo

Key words: *Heart failure / Scompenso cardiaco*
 Fluid overload / Sovraccarico di volume
 Bioelectrical impedance analysis / Bioimpedenziometria
 Tailored therapy / Terapia personalizzata

Abstract:

Despite advances in diagnosis and pharmacotherapy, heart failure (HF), an old illness, remains a leading cause of hospitalization in patients older than 65 years in many world-wide hospitals. New horizons must be explored to reduce morbidity and mortality today. The clinical evaluation and diuretics represent the main approach to HF. Which are the new progresses in HF management? The accurate assessment of fluid overload by using bioelectrical impedance analysis, the plasmatic determination of BNP, the echocardiographic measurement by Tissue Doppler of the pulmonary capillary wedge pressure and left ventricular filling pressure represent the advances in diagnosis and monitoring. The new ways to treat acute HF are intravenous high-dose furosemide plus small volumes of hypertonic saline solution; in alternative the use of levosimendan, vasopressin antagonists, selective adenosine A2 receptor antagonists and in refractory HF the ultrafiltration. The therapeutic goal is the relief of HF signs/symptoms with achievement of dry weight and then the optimisation of therapy with diuretics, ace-inibhitors/sartans, beta-blockers (before contraindicated), a more limited use of digoxin (indicated in concomitant atrial fibrillation), fluid intake restriction. In advanced HF with ejection fraction <35% and/or left bundle branch block the resynchronisation therapy or in presence of ventricular arrhythmias the implantation of cardioverter-defibrillators is indicated. After discharge it's fundamental an early short term ambulatory follow-up to maintain clinical stabilization and tailor treatment, discover an early decompensation, responsibly the patients on therapy and encourage a mild-moderate exercise physical training (eg. fast walking).

Riassunto:

Lo scompenso cardiaco è una malattia antica, tuttora di grande attualità poiché ha raggiunto rilevanti dimensioni epidemiche divenendo la principale causa di ospedalizzazione sopra i 65 anni. Nonostante i progressi diagnostico-terapeutici raggiunti, altri passi avanti sono ancora necessari nella gestione del paziente scompensato al fine di ridurre gli elevati tassi di morbilità e mortalità. L'esame clinico e il trattamento diuretico fanno sempre da padroni nella gestione dello scompenso cardiaco. Ma quali sono le nuove frontiere? In campo diagnostico esse consistono nell'accurata valutazione del sovraccarico di liquidi con la bioimpedenziometria, nella determinazione del BNP plasmatico e della pressione capillare di incuneamento polmonare o della pressione di riempimento ventricolare sinistro valutate ecocardiograficamente tramite *Tissue Doppler*. Nell'approccio terapeutico allo scompenso cardiaco acuto consistono nell'utilizzo di piccoli volumi di soluzione salina ipertonica associati ad alte dosi di furosemide, e in alternativa l'utilizzo dei valptani, degli inibitori del recettore dell'adenosina, del levosimendan o dell'ultrafiltrazione nei casi refrattari al trattamento. Il goal terapeutico è il miglioramento e/o la risoluzione dei segni/sintomi attraverso il raggiungimento del peso secco. Ottenuto ciò si passerà ad ottimizzare la terapia che sarà basata su diuretici, ace-inibitori o sartani, talora beta-bloccanti (prima controindicati), un uso ridimensionato della digitale (riservato ai pazienti con fibrillazione atriale), la restrizione idrica ad 1 litro/die. Utili nelle forme avanzate con severa depressione della funzione sistolica (FE <35%) e/o blocco di branca sinistro la terapia di resincronizzazione elettrica e l'impianto di defibrillatori impiantabili. È fondamentale inoltre uno stretto follow-up ambulatoriale a breve termine dopo il ricovero al fine di ottenere una costante stabilizzazione clinica tramite la personalizzazione del trattamento, svelare una fase precoce di scompenso, responsabilizzare il paziente sulla terapia ed incoraggiare una attività fisica lieve-moderata (in passato controindicata) come la passeggiata a passo svelto.

INTRODUZIONE

Lo scompenso cardiaco (SC) è una malattia antica, conosciuta già da Ippocrate e descritta da Adriano nelle sue memorie. Da sempre considerata, anche dai medici storiografi più antichi, tra le malattie più invalidanti. Tuttavia, negli ultimi anni, nonostante i numerosi successi conseguiti nel campo della diagnosi e della terapia, lo SC ha assunto dimensioni epidemiche considerevoli divenendo la maggiore causa di ospedalizzazione dopo i 65 anni. La prevalenza nella popolazione generale è stimata tra lo 0,4 e il 2% circa⁽¹⁾. In Italia circa 3 milioni di soggetti sono affetti da SC (sia in forma asintomatica che conclamata) di cui i due terzi sono anziani. Questa condizione clinica tende rapidamente ad aumentare con l'età e ciò rende ragione, in parte, della frequenza crescente di quella che è stata definita da *Michael Rich* la "sindrome cardiogeriatrica" del XXI secolo⁽¹⁰⁾. Nello studio italiano TEMISTOCLE l'età media dei ricoverati con SC nelle divisioni di Medicina Interna e di Cardiologia è stata rispettivamente di 77 ± 10 e 70 ± 12 anni. Lo stesso studio ha dimostrato che il 5% muore durante la degenza, il 15% entro 6 mesi dalla dimissione, il 45% ritorna in ospedale entro 6 mesi dalla dimissione⁽²⁾. In circa la metà dei pazienti in cui è posta diagnosi di SC, l'exitus si verifica entro 4-5 anni, mentre in metà di quelli affetti da SC grave il decesso avviene entro 1 anno. Recenti studi hanno documentato che la diagnosi basata esclusivamente sui criteri clinici è spesso inadeguata, particolarmente nel sesso femminile, negli anziani e nei soggetti obesi o con BPCO. Pertanto, l'approccio diagnostico-terapeutico al paziente con SC deve privilegiare l'azione preventiva e la diagnosi precoce. Inoltre, l'aumentata prevalenza dello SC e il coinvolgimento della popolazione anziana, devono concentrare l'interesse del medico verso le forme avanzate, tra esse la sindrome cardiorenale, caratterizzate da una scadente qualità di vita, dall'alto rischio di ospedalizzazione, dalla scarsa risposta alla terapia medica, dalla necessità di un trattamento più aggressivo e da un tasso molto elevato di mortalità.

Nelle ultime decadi diversi cambiamenti hanno innovato il trattamento dello SC, in particolare l'uso dei beta-bloccanti (prima controindicati) e degli ace-inibitori, la prescrizione di una moderata attività fisica (prima controindicata), il ridimensionamento del ruolo della digitale, l'utilizzo quasi routinario nella pratica clinica del BNP e dell'ecocardiografia, l'avvento di nuove tecniche e strategie terapeutiche, alcune delle quali ancora in fase sperimentale, finalizzate a trattare lo SC nei suoi aspetti fisiopatologici più complessi ed intricati.

APPROCCIO CLINICO ALLO SC

Una diagnosi corretta è il presupposto per il trattamento appropriato dei sintomi e una minore degenza ospedaliera, per rallentare la progressione della malattia e ridurre la morbidità e mortalità. Nella valutazione clinica del paziente con SC gli obiettivi da perseguire sono:

1. *identificare la natura e la gravità della cardiopatia*
2. *valutare la natura e l'entità della limitazione funzionale del paziente*
3. *valutare la presenza e l'entità della ritenzione idrica.*

Pertanto, una storia clinica esaustiva ed un attento esame obiettivo sono gli steps fondamentali dell'approccio clinico e di una precoce valutazione della natura e gravità dello SC. Tuttavia, le metodiche di imaging sono essenziali per l'identificazione precisa della causa di scompenso e per guidare l'appropriato trattamento. Pertanto, posta l'ipotesi diagnostica di SC sulla scorta del quadro clinico, occorre, in prima battuta, individuare gli eventuali fattori scatenanti (se identificabili) e valutare l'entità clinica dello scompenso emodinamico e idrico e quindi stabilizzare clinicamente il paziente. In seconda battuta si procederà agli approfondimenti diagnostici, all'ottimizzazione del trattamento medico ed ad eventuali interventi terapeutici cruenti. Ampiamente utilizzata è la classificazione della *New York Heart Association* (NYHA) che permette di valutare anche il possibile miglioramento (riduzione della classe) ottenuto dal trattamento farmacologico. Essa è stata recentemente integrata dalla classificazione dell'*American College of Cardiology ed American Heart Association*, che sottolinea in particolare l'evoluitività e la progressione dello SC, definendo la necessità di strategie di trattamento fondate sulla prevenzione. Essa riconosce quattro stadi:

- A: pazienti ad alto rischio di sviluppare SC in assenza di anormalità strutturali del cuore;
- B: pazienti con anormalità strutturali del cuore ma che non hanno mai avuto sintomi di SC;
- C: pazienti con anormalità strutturali del cuore ed attuali o precedenti sintomi di SC;
- D: pazienti refrattari al trattamento medico standard.

Tuttavia, di fronte all'ammalato è clinicamente necessario e metodologicamente doveroso per il medico internista o per il cardiologo, sia ricercare un approccio clinico immediato ma, al tempo stesso, efficace e pratico per attuare il miglior trattamento possibile. Per tale motivo è utile

conoscere anche la *Classificazione di Forrester* che definisce 4 profili clinico-emodinamici in base alla presenza o meno delle due manifestazioni cliniche cardine: la congestione e l'ipoperfusione⁽⁵⁾. L'approccio meramente clinico va integrato dagli esami ematochimici che valutano la presenza di disionie, di insufficienza renale ed epatica, la presenza di anemia e delle alterazioni dell'equilibrio acido-base e degli scambi gassosi (emogasanalisi). Inoltre, va ricercata in tutti i pazienti (specialmente anziani, diabetici o con comorbidità) mediante la stima del GFR un'insufficienza renale inapparente ovvero una ridotta funzione renale con creatininemia normale che può essere una causa precipitante dello SC e della resistenza al trattamento medico. Oggi, inoltre, disponiamo di una indagine laboratoristica semplice che ha rivoluzionato l'approccio clinico allo SC. Il dosaggio del peptide natriuretico di tipo B (*BNP*) si sta ormai diffondendo nella pratica clinica come valido mezzo diagnostico per la disfunzione ventricolare sinistra e per la stratificazione prognostica del rischio intra- ed extra-ospedaliero, oltre che per guidare il trattamento dello SC durante la degenza ospedaliera. Non secondarie, inoltre, risultano le indagini strumentali. Le linee guida della Società Europea di Cardiologia ribadiscono l'indispensabile ruolo diagnostico dell'*ECG* e della *radiografia del torace*. Tuttavia, il gold standard per l'inquadramento diagnostico del paziente con sospetto SC è oggi l'*ecocardiografia doppler* in quanto tecnica non invasiva, ripetibile ed altamente informativa riguardo all'anatomia e alla funzione sistolica e diastolica. Un nuovo parametro valutato con l'ecocardiografia, utile nella gestione del paziente scompensato è la stima della pressione capillare polmonare di incuneamento (*PCWP*). Purtroppo, il gold standard di stima è un metodo cruento (cateterismo destro) e quindi non agevole. Molto recentemente il nostro gruppo ha invece validato in una coorte di 66 pazienti ospedalizzati per SC il valore della *PCWP* misurato ecocardiograficamente (non-invasivamente), mediante il doppler tissutale (*Tissue Doppler*). Utilizzando formule matematiche empiriche, è possibile stimare la pressione di incuneamento come rapporto di E/Ea . Nel nostro studio la *PCWP* così ottenuta si è rivelata un ottimo parametro per il monitoraggio del trattamento diuretico durante la degenza ospedaliera e durante il follow-up ambulatoriale. Recentemente, inoltre, è stata proposta un'altra nuova metodica strumentale semplice, rapida, a basso costo, accurata ed eseguibile al letto del paziente, già validata dal nostro gruppo, in grado di valutare il grado di congestione sistemica e segmentale (toracica): la bioimpedenziometria (*Bioelectrical Impedance analysis - BIA*). Nella cascata fisiopatologica di un episodio acuto di SC il *fluid overload* svolge un ruolo fondamentale come fattore precipitante dello SC subclinico

in SC manifesto⁽⁸⁾. Pertanto, diventa importante valutare non-invasivamente ed oggettivamente l'assetto idrico del paziente scompensato al fine di:

- evidenziare una condizione di iperidratazione pre-clinica (cioè prima della comparsa dell'edema o della dispnea),
- stabilire l'entità della ritenzione idrica,
- guidare la terapia diuretica e monitorare il raggiungimento del peso secco ottimale.

TERAPIA

Oggi gli obiettivi terapeutici dello SC sono:

- Ridurre i sintomi minimizzando la congestione (polmonare e/o periferica)
- Contrastare l'attivazione neuroendocrina
- Migliorare la funzione e la perfusione renale
- Contrastare l'ipertensione polmonare
- Prevenire e trattare tempestivamente gli eventi precipitanti lo scompenso
- Prevenire e trattare tempestivamente le complicanze
- Prevenire la progressione della malattia e ridurre la mortalità

Il trattamento farmacologico dello SC ha subito nel corso del tempo un radicale mutamento, al passo con l'evolversi delle conoscenze e dei modelli concettuali concernenti questa complessa ed eterogenea sindrome clinica. In passato, essa è stata essenzialmente interpretata sulla base di paradigmi fisiopatologici che assegnavano alle alterazioni emodinamiche (aumento delle pressioni di riempimento cardiache, deficit di contrattilità miocardica, incremento delle resistenze vascolari periferiche) un ruolo di primaria importanza nel determinarne l'espressività e l'evoluitività clinica. Ciò ha portato a ritenere che la terapia medica ottimale fosse quella che si dimostrava in grado di contrastare direttamente tali alterazioni: l'evidenza dell'efficacia di un farmaco era data dalla capacità di indurre un rapido miglioramento dei parametri emodinamici, associato anche ad un beneficio sui sintomi. Nei fatti, tale approccio ha dapprima legittimato l'impiego della digitale e dei diuretici, per lungo tempo gli unici agenti farmacologici disponibili per il trattamento dello SC, ed in seguito fornito il razionale su cui si sono fondate le aspettative nei confronti degli inotropi positivi non digitali e dei composti dotati di proprietà vasodilatatrici. In atto gli obiettivi del trattamento sono:

- 1) ridurre il precarico (diuretici dell'ansa, nitrati, antialdosteronici, levosimendan) e la congestione sistemica (diuretici dell'ansa +/- tiazidici)

- 2) il post-carico (ace-inibitori, idralazina, sartanici, nitrati)
- 3) l'ipertono simpatico e il RAAS (ace-inibitori, sartanici, antialdosteronici)
- 4) migliorare l'inotropismo (digitale, dopamina, dobutamina, levosimendan)

La classificazione di *Forrester* è molto utile in questi pazienti per guidare la strategia terapeutica in quanto indica di privilegiare i diuretici e i vasodilatatori in caso di congestione, gli inotropi in caso di ipoperfusione o entrambi (diuretici e inotropi) nei pazienti *cold and wet*. Il caposaldo della terapia sono i diuretici come in passato e i più utilizzati sono: furosemide o torasemide in infusione ev ad un dosaggio personalizzato in relazione allo stato di congestione, alla ritenzione idrica eventualmente valutata con la BIA, ai valori pressori e al grado di insufficienza renale. Tra i vasodilatatori la più usata, oltre agli ace-inibitori/sartani, è la nitroglicerina, per os o per via transdermica (riservando la via endovenosa ai pazienti che si presentano con pressione arteriosa normale e in grave forma congestizia o in edema polmonare acuto), perchè riduce l'after-load e la PCWP, migliora il pre-load e la circolazione coronarica alleviando la dispnea. Gli inotropi in infusione continua ev vanno riservati ai casi di marcata ipoperfusione e/o per migliorare, a dosaggio renale, la funzione del rene (come nella sindrome cardiorenale): quelli più usati sono la dopamina e la dobutamina; la digitale largamente usata nel passato come *first treatment* insieme al diuretico, può essere usata in alternativa come inotropo per alleviare la sintomatologia se essa persiste con ACE inibitori e diuretici, ma viene più frequentemente riservata in corsia al controllo della FC nelle tachiaritmie sopraventricolari usando cautela nell'insufficienza renale ed in alternativa all'amiodarone. Inoltre in molti pazienti, soprattutto nei più anziani, in quelli immobilizzati o a letto con fibrillazione atriale, al fine di prevenire complicanze trombo-emboliche, è utile iniziare il trattamento con antiaggreganti o con dicumarolici. In tutti i pazienti va inoltre monitorizzata la diuresi oraria e giornaliera per eseguire un accurato bilancio idrico. Tra le nuove frontiere terapeutiche dello SC già da qualche anno viene riconosciuto un ruolo rilevante alla soluzione salina ipertonica (SSI) che associata alle alte dosi di furosemide endovena, risulta efficace, oltre che a basso costo, in tutte le forme di SC refrattario al trattamento convenzionale e nella sindrome cardiorenale (SCR)⁽⁶⁾. Essa rappresenta il trattamento ideale di tutte le forme di insufficienza cardiaca in fase di scompenso associate al sovraccarico di liquidi (edema e stasi polmonare) in quanto è in grado di favorire l'aumento del flusso plasmatico renale con conseguente aumento della diuresi e della natriuresi (particolarmente utile nei pazienti con SC refrattario o con sindrome cardiorenale). La SSI aumenta la pressione osmotica ed espande il volume plasmatico, aumenta il flusso renale,

la concentrazione intratubulare di sodio, la pressione idrostatica peritubulare e l'escrezione urinaria del sodio, oltre a ridurre la resistenza idraulica capillare e la pressione oncotica plasmatica e peritubulare con conseguente aumento della diuresi e della natriuresi. La SSI rispetto al trattamento tradizionale con furosemide, come si evince dai nostri studi^(4,9), è in grado non soltanto di ridurre la PCWP, ma anche di preservare e migliorare significativamente la funzione renale, stimata come GFR secondo le formule *Cockcroft-Gault* e *Mord. Cockcroft-Gault e Modification of Diet in Renal Disease (MDRD)*, nei pazienti con SCR. Questo innovativo trattamento rappresenta peraltro anche secondo M.H. Drazner e L.W. Stevenson^(3,12), un approccio controintuitivo ma efficace e riteniamo che i trials internazionali attualmente in corso ne confermeranno i benefici. Le nuove frontiere terapeutiche in alternativa al trattamento diuretico convenzionale comprendono: la *nesiritide* (i cui effetti clinici non sono tuttora certi in quanto può peggiorare la funzione renale), il *levosimendan*, gli *antagonisti del recettore di arginina-vasopressina* (Valptani) e gli *antagonisti del recettore della adenosina A₁*, l'uso di questi agenti non è ancora esteso e i risultati sperimentali non sono tuttora univoci. Un'altro potenziale trattamento nei pazienti con SC avanzato in stato anasarcatco refrattario ai diuretici, specialmente se severamente iponatremiemici, o nei pazienti con SCR è *la terapia sostitutiva renale* (ultrafiltrazione o dialisi) ch   efficace e migliora drasticamente, anche se temporaneamente, la responsivit   renale e l'emodinamica cardiaca, rimuove velocemente l'accumulo di fluidi e riduce la degenza ospedaliera, ma    invasiva, costosa ed    solitamente usata come palliativo negli stadi terminali della sindrome e non costituisce una soluzione a lungo termine. Gli svantaggi dell'utilizzo di questa tecnica sono i costi elevati e la necessit   di un personale dedicato e con esperienza.

Una volta stabilizzato il paziente    opportuno ottimizzare la terapia con Ace-inibitori (enalapril, ramipril, lisinopril, quinapril, perindopril), o, in caso di intolleranza, con antagonisti dell'angiotensina (losartan, valsartan e candesartan), che    sempre indicata in tutti gli stadi in quanto allevia i sintomi, ritarda la progressione dello SC (grazie alla loro azione sul precarico, sulla modulazione neuro-ormonale e sul remodelling ventricolare sinistro), riduce l'ospedalizzazione e la mortalit  , migliora la capacit   funzionale e la qualit   di vita. In assenza di controindicazioni specifiche, ai pazienti con disfunzione sistolica (FE $\leq 40\%$), superata la fase di instabilit   clinica (NHYA II-III), va prescritta una terapia con beta-bloccanti (carvedilolo, bisoprololo, metoprololo, nebivololo) con incrementi gradualmente, sicuramente utile per la neuromodulazione simpatica, per il trattamento della tachicardia sinusale (frequente anche a riposo), per il significativo miglioramento della FE e

del rilasciamento ventricolare sinistro e della FE (carvedilolo), oltre che la riduzione delle riammissioni ospedaliere e l'incremento della sopravvivenza. I calcio-antagonisti non diidropiridinici sono utili nello SC diastolico: amlodipina migliora la funzionalità diastolica (riduzione del tempo di decelerazione; aumento del rapporto E/A), diltiazem ha effetti sull'asincronia del rilasciamento ventricolare, importante marker di disfunzione diastolica sia negli ipertesi ipertrofici sia nei soggetti ischemici, e sulla frequenza cardiaca. I nitrati, invece, possono migliorare la tolleranza allo sforzo e la capacità funzionale e sono indicati come terapia aggiuntiva soprattutto in pazienti con cardiopatia ischemica o ipertensione. Il ruolo della digitale è oggi ridimensionato ed è riservato ai soggetti con disfunzione sistolica e fibrillazione atriale (con frequenza cardiaca > 80 bpm) o in quelli in ritmo sinusale se persistentemente sintomatici nonostante l'ottimizzazione del trattamento con gli altri farmaci indicati. Tale farmaco riduce le riammissioni ospedaliere per SC ma non la mortalità. Sconsigliabile appare l'impiego della digitale nello SC diastolico. Gli antialdosteronici a basse dosi, se non controindicati (iperkaliemia, creatinina ≥ 2.5 mg/dl), vanno invece considerati nei pazienti persistentemente sintomatici (in particolare coloro con FE $\leq 35\%$) dopo aver ottimizzato il trattamento con Ace-inibitori/Sartani e beta-bloccanti o al fine di incrementare il sinergismo con gli altri diuretici. Fondamentale inoltre intraprendere una terapia antiaggregante nel paziente con malattia aterosclerotica o anticoagulante nei pazienti con SC avanzato e con fibrillazione atriale. A tutti i pazienti con SC va consigliata l'abolizione del fumo, la restrizione dell'apporto idrico, il mantenimento del peso corporeo ideale e un'attività fisica appropriata. Mentre la ridotta assunzione di sodio se utile nello stadio A e B, non lo è più nelle fasi avanzate dello SC in quanto, come hanno dimostrato le ricerche del nostro gruppo, la dieta normosodica rispetto a quella iposodica riduce l'attivazione neuro-ormonale (attività reninica, aldosterone, BNP) e citochinica diminuendo le riospedalizzazioni. Inoltre è auspicabile prima della dimissione responsabilizzare il paziente sulle norme dietetico-comportamentali in particolare sulla restrizione idrica (1 litro/die negli scompensi avanzati) e dopo la dimissione attuare sempre un programma specifico di training fisico individualizzato (ad es. il *fast walking*), riservando il riposo in condizioni di instabilità clinica. La terapia di resincronizzazione cardiaca è indicata invece in quei pazienti con ridotta frazione di eiezione ($\leq 35\%$) e dissincronia ventricolare (attualmente definita dalla durata del QRS >120 ms), che permangono sintomatici (NYHAIII-IV) nonostante l'ottimizzazione della terapia medica. Utile in questi casi anche l'uso del defibrillatore impiantabile al fine di prevenire la morte improvvisa.

APPROCCIO AMBULATORIALE

Il follow-up ambulatoriale precoce è oggi il metodo di approccio più corretto al paziente dimesso dall'ospedale con diagnosi SC in quanto consente di ottimizzare il trattamento intrapreso in ospedale personalizzando la terapia alle variabili cliniche e riducendo così significativamente la morbidità e la mortalità. Infatti, le frequenti esperienze riportate in letteratura stanno dimostrando come l'assistenza continua costituisca oggi la vera arma di difesa, sia terapeutica che preventiva, contro lo SC. I pazienti con un recente episodio di SC acuto, così come quelli in stadio avanzato o con SCR vanno sottoposti ad uno stretto follow-up a breve- e medio-termine al fine di raggiungere la stabilizzazione clinica duratura mediante l'opportuna modulazione dei farmaci, guidata sia dalla valutazione clinica che, ove possibile, strumentale. Il monitoraggio ambulatoriale consente di individuare le fasi precoci di scompenso ovvero del sovraccarico di volume, cioè prima ancora che sia sintomatico, grazie alla BIA e all'ecocardiografia⁽¹¹⁾. Pertanto, è fondamentale mantenere un *continuum* nella gestione clinica del paziente con SC, dalla fase ospedaliera a quella territoriale. I punti centrali del monitoraggio sono quindi: la continuità assistenziale, la flessibilità della dose del diuretico, l'educazione del paziente all'aderenza alla terapia e allo stile di vita, e un approccio di gestione ambulatoriale integrato finalizzato ad ottenere un trattamento personalizzato e un minor grado di congestione sistemica e polmonare. Obiettivo centrale è responsabilizzare il paziente (che deve co-gestire insieme al medico il trattamento) e il *care-giver* (cioè colui che è dedito alla cura e al sostegno del malato) ai quali vanno richieste molte capacità e molta pazienza: l'assunzione di una politerapia gravosa, una ferrea costanza, l'attuazione di cambiamenti dello stile di vita che spesso equivalgono a rinunce, lo sviluppo di capacità di autocontrollo (capacità di riconoscere il livello di insorgenza dei sintomi), mantenere un attento bilancio idrico controllando giornalmente il peso corporeo e i liquidi introdotti, la capacità di autogestire la terapia e di decidere sulle dosi di alcuni farmaci (ad es. i diuretici), capacità di decidere quando sia il caso di accedere rapidamente al controllo clinico ambulatoriale e quando sia meglio avvisare il medico telefonicamente e chiedergli consiglio. Una necessità non infrequente, è quella, inoltre, di integrare il trattamento medico con quello psicologico e/o psichiatrico poiché la depressione è uno dei rischi maggiori cui va incontro il paziente con SC e rappresenta un fattore prognostico negativo.

Va incoraggiata infine sotto controllo medico un'attività fisica tollerata (ad esempio il fastwalking) sconsigliando sforzi inusuali e pasti abbondanti, abolendo il fumo e il caffè e riducendo drasticamente l'alcool⁽⁷⁾.

BIBLIOGRAFIA

1. Bellotti P, Badano LP, Acquarone N, Griffo R, Lo Pinto G, Maggioni AP, Mattiauda C, Menardo G, Mombelloni P: *OSCUR Investigators. Specialty-related differences in the epidemiology, clinical profile, management and outcome of patients hospitalized for heart failure; the OSCUR study. Outcome dello Scompenso Cardiaco in relazione all'Utilizzo delle Risorse.* Eur. Heart J. 2001; 22, 596-604.
2. Di Lenarda A, Scherillo M, Maggioni AP, Acquarone N, Ambrosio GB, Annicchiarico M, Bellis P, Bellotti P, De Maria R, Lavecchia R, Lucci D, Mathieu G, Opasich C., Porcu M, Tavazzi L, Cafiero M: *TEMISTOCLE Investigators. Current presentation and management of heart failure in cardiology and internal medicine hospital units: a tale of two worlds - the TEMISTOCLE study.* Am. Heart J. 2003; 146, E12.
3. Drazner MH, Palmer BF: *Hypertonic saline: a novel therapy for advanced heart failure?* Am. Heart J. 2003; 145, 377-379.
4. Licata G, Di Pasquale P, Parrinello G, Cardinale A, Scandurra A, Follone G, Argano C, Tuttolomondo A, Paterna S: *Effects of high-dose furosemide and small-volume hypertonic saline solution infusion in comparison with a high dose of furosemide as bolus in refractory congestive heart failure: long-term effects.* Am. Heart J. 2003; 145, 459-466.
5. Nohria A, Tsang SW, Fang JC, Lewis EF, Jarho JA, Mudgegh, Stevenson LW: *Clinical assessment identifies hemodynamic profiles that predict outcomes in patients admitted with heart failure.* J. Am. Coll. Cardiol. 2003; 41, 797-1804.
6. Parrinello G, Paterna S, Di Pasquale P, Torres D, Fatta A, Mezzero M, Scaglione R, Licata G: *The usefulness of Bioelectrical Impedance Analysis in differentiating dyspnea from decompensated heart failure.* J. Card. Fail. 2008; 14, 676-686.
7. Parrinello G, Torres D, Licata G: *L'approccio al paziente con Scompenso Cardiaco.* Intern. Emerg. Med. 2008; 3, S226-S235.
8. Parrinello G, Torres D, Paterna S, Di Pasquale P, Licata G: *The pathophysiology of acute heart failure: The Key role of fluid accumulation.* Am. Heart J. 2008; 156, e19.
9. Paterna S, Di Pasquale P, Parrinello G, Fornaciari E, Di Gaudio F, Fasullo S, Giammanco M, Sarullo FM, Licata G: *Changes in BNP levels and bioelectrical impedance measurements after treatment with high dose furosemide and hypertonic saline solution versus high dose of furosemide alone, in refractory congestive heart failure. Double blind study.* J. Am. Coll. Cardiol. 2005; 45: 1997-2003.
10. Rich MW: *Heart failure in the 21st century: a cardiogeriatric syndrome.* J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 2001; 56, M88-M96.
11. Torres D, Parrinello G, Licata G: *Bioelectrical Impedance Analysis For Prediction Of Hospital Admission Due To Cardiac Decompensation In Ambulatory Heart Failure: A Follow-Up Study.* Eur. J. Intern. Med. 2008; 19, S33-S34.
12. Stevenson LW, Nohria A, Mielniczuk L: *Torrent or torment from the tubules? Challenge of the cardiorenal connections.* J. Am. Coll. Cardiol. 2005; 45, 2004-2007.

L'OSPEDALE IN CASA: L'ESPERIENZA TORINESE

*Nicoletta Aimonino Ricauda, Renata Marinello, Maurizio Rocco,
Gianluca Isaia, Vittoria Tibaldi, Giovanni Carlo Isaia*

¹ S.S.C.V.D. Ospedalizzazione a Domicilio - A.O.U. San Giovanni Battista di Torino

² SC Geriatria e Malattie metaboliche dell'osso - A.O.U. San Giovanni Battista di Torino

Key words: *Hospital at home / Ospedalizzazione a domicilio*
 Elderly patients / Pazienti anziani
 Home healthcare / Tecnologie sanitarie
 technologies domiciliari

Abstract:

Substitutive hospital-at-home care, defined as “a service that provides active treatment by health care professionals, in the patient's home, of a condition that otherwise would require acute hospital in-patient care”, may be a feasible, safe and efficacious alternative to traditional hospital care.

Hospital-at-home management of selected frail patients with acute illnesses may be associated with delayed additional hospital admissions, better quality of life and reduction of depressive symptoms without adverse effects on mortality.

Riassunto:

L'Ospedalizzazione a Domicilio, un servizio in grado di offrire al domicilio trattamenti sanitari che altrimenti richiederebbero un ricovero in un reparto per acuti, può essere fattibile, sicura e può rappresentare una efficace alternativa al trattamento ospedaliero tradizionale. Il trattamento ospedaliero domiciliare di pazienti fragili selezionati affetti da una patologia acuta può essere associato a una riduzione delle riospedalizzazioni, a un miglioramento della qualità di vita e dei sintomi depressivi senza esporre il paziente ad un rischio di mortalità maggiore rispetto a un trattamento tradizionale.

INTRODUZIONE

Vi è attualmente un notevole interesse verso i setting di cura alternativi al ricovero ospedaliero, in relazione all'aumentata richiesta di posti letto negli ospedali, all'innalzamento dell'età media ed alla necessità di contenere i costi. La letteratura scientifica e le esperienze operative nell'ambito delle cure domiciliari hanno evidenziato la particolare utilità ed efficacia di questo tipo di intervento sanitario, in particolare in area geriatrica e oncologica, riconoscendogli inoltre la funzione di rendere più flessibile la struttura ospedaliera e favorire l'integrazione ospedale-territorio.

L'Ospedalizzazione a Domicilio viene definita come la “modalità attraverso cui le strutture ospedaliere, in considerazione di specifiche valutazioni, seguono con il proprio personale, direttamente a domicilio, pazienti che necessitano di prestazioni con particolare complessità, tali da richiedere un processo assistenziale di livello ospedaliero”⁽¹⁸⁾.

L'Ospedalizzazione a Domicilio (OAD) di Torino è un servizio attivo dal 1985 presso l'Azienda Ospedaliero-Universitaria S. Giovanni Battista. Il team è multidisciplinare e comprende 4 medici geriatri, 1 coordinatore infermieristico, 13 infermieri, 1 counsellor, 1 assistente sociale, 3 fisioterapisti. Il servizio funziona tutti i giorni, compresi i festivi, dalle ore 8 alle ore 20. È stato stipulato un protocollo di intesa con il Servizio di Emergenza Regionale “118” per la gestione delle emergenze notturne. In casi di particolare complessità clinica un medico del servizio è reperibile anche nelle ore notturne. Si seguono in media 25 pazienti al giorno. Oltre all'attività di routine con visite domiciliari programmate viene garantita la possibilità, da parte del team di cura (medico+infermiere), di rispondere tempestivamente (20'-30') alle chiamate in emergenza e di effettuare accertamenti diagnostici complessi (Tabella 1). Da circa 1 anno è possibile posizionare accessi venosi tipo Midline o PICC mediante l'ausilio di un ecografo portatile. Inoltre, è attivo un servizio di sportello informativo e di counselling per i familiari. L'attivazione del servizio può avvenire su diretta richiesta del medico di Medicina Generale in alternativa all'invio del paziente in Pronto Soccorso (15% dei casi), su richiesta dei medici dei reparti di degenza del nostro ospedale (dimissioni precoci ma protette, 25%) o direttamente dal Pronto Soccorso (PS) della nostra Azienda (60%) dal quale, i pazienti eligibili, espletati gli accertamenti diagnostici necessari, vengono trasferiti a domicilio nell'arco di poche ore (in media 7-8 ore). Le più comuni cause di ricovero in OAD sono: scompenso cardiaco acuto con necessità di terapie infusionali, cerebrovasculopatie, gravi insufficienze respiratorie (è garantita una tempestiva fornitura di ossigeno a domicilio), infezioni con necessità di multiple somministrazioni giornaliere

TRATTAMENTI NON FARMACOLOGICI
• Visite mediche ed infermieristiche • Fisioterapia e terapia occupazionale • Counselling • Consulenze specialistiche
PROCEDURE E TRATTAMENTI
• Prelievi ematici venosi ed arteriosi • Misurazione SatO₂ • Elettrocardiogrammi • Spirometrie • O₂ terapia ed altre terapie respiratorie • Gestione terapia farmacologica orale (inclusa TAO) ed infusionale (inclusi antibiotici e farmaci citostatici) • Trasfusioni di emoderivati (emazie, piastrine, albumina) • Trattamento chirurgico di ulcere da decubito • Ecografie internistiche • Ecocardiografie • Ecodoppler venosi ed arteriosi • Esecuzione di paracentesi, salassi • Posizionamento di SNG e strumenti tipo Holter (cardiaco, pressorio) • Posizionamento di cateteri venosi periferici (<i>Midline, PICC</i>) • Radiografie e telemonitoraggio
L'ospedale detiene la responsabilità legale e finanziaria della cura dei pazienti ricoverati in regime di OAD. I pazienti sono considerati a tutti gli effetti come pazienti ricoverati in un reparto di degenza ospedaliero e, pertanto, i farmaci e le tecnologie usate a domicilio sono forniti dall'ospedale.

Tabella 1. Prestazioni del servizio OAD.

di antibiotico endovena, malattie neurologiche in fase avanzata (SLA, sclerosi multipla,...), gravi scompensi metabolici, patologie oncologiche e patologie ematologiche ad elevato fabbisogno trasfusionale. Criteri di ammissione all'OAD sono: consenso informato del paziente e del familiare, domicilio nell'area geografica di appartenenza del Servizio di OAD, adeguato supporto familiare, caratteristiche cliniche tali da richiedere il ricovero ospedaliero ma non un monitoraggio invasivo od intensivo. Dall'anno 1985 ad oggi sono stati seguiti oltre 11000 pazienti. Preso a campione l'anno 2009, i pazienti seguiti in OAD sono stati 452 (età media circa 80 anni); la durata media del ricovero è stata di 17 giorni. Da un'analisi dei costi diretti effettuata dalla nostra Azienda è stata calcolata una spesa per paziente, per giorno di degenza in OAD, di circa 160 Euro che include il costo del personale medico, infermieristico, riabilitativo, amministrativo ed i costi per farmaci, materiale sanitario e non, servizi non sanitari, ammortamenti, parco autovetture, trasporti in ambulanza.

L'OSPEDALIZZAZIONE A DOMICILIO DI TORINO: LA RICERCA

Una recente meta-analisi che ha valutato i risultati di 10 studi clinici internazionali, due dei quali realizzati presso il nostro servizio, e pubblicata sul *Canadian Medical Association Journal* ha dimostrato che per pazienti selezionati il ricovero in regime di ospedalizzazione domiciliare comporta risultati simili a quelli ottenibili in un reparto ospedaliero per quanto riguarda mortalità, numero di riospedalizzazioni e costi, a fronte di un più alto livello di soddisfazione e di una migliore qualità di vita⁽¹⁷⁾.

Abbiamo recentemente condotto un trial clinico randomizzato con follow up a sei mesi su pazienti anziani affetti da BPCO riacutizzata afferiti al PS della nostra Azienda, per valutare la fattibilità e l'utilità del ricovero in regime di OAD rispetto al ricovero tradizionale in reparti ospedalieri. Si tratta di pazienti molto anziani, pluripatologici, non autosufficienti nello svolgimento delle attività quotidiane. Dai risultati non sono emerse differenze statisticamente significative per quanto riguarda la mortalità e lo stato funzionale nei due diversi setting di cura, tuttavia si è osservato un minor sviluppo di complicanze infettive nei pazienti curati a casa⁽¹⁾.

Analogamente, in collaborazione con la Divisione Universitaria di Cardiologia del nostro ospedale abbiamo condotto e concluso uno studio sul trattamento a domicilio di pazienti anziani affetti da scompenso cardiaco cronico in fase di riacutizzazione giunti al PS del nostro ospedale.

Lo scompenso cardiaco rappresenta la principale causa di ospedalizzazione nell'anziano. Nonostante il progressivo declino della mortalità per

coronaropatia e cardiopatia ipertensiva, si è registrato infatti un incremento dell'incidenza e della prevalenza dell'insufficienza cardiaca, principalmente imputabile al progressivo aumento dell'età media della popolazione ed alla crescente diffusione delle patologie cardiovascolari. Oltre il 50% dei pazienti affetti da insufficienza cardiaca ha una età superiore ai 75 anni; per tale motivo lo scompenso cardiaco, definito da Michael Rich "sindrome cardiogeriatrica", rappresenta un problema di sanità pubblica destinato ad aumentare nei prossimi anni⁽¹⁴⁾.

Numerosi studi confermano che un programma globale di pianificazione ed assistenza post-dimissione, che associ al trattamento tradizionale l'istruzione dei pazienti e dei loro caregivers, la consulenza cardiologica, dietologica e sociale e un adeguato controllo del decorso, riduce le riospedalizzazioni e i costi globali di gestione dei pazienti affetti da scompenso cardiaco^(4,15,20); del resto, le più frequenti cause di riospedalizzazione di anziani scompensati sono risultati la non aderenza alle prescrizioni farmacologiche e dietetiche, il mancato controllo dell'ipertensione, l'inadeguatezza della programmazione della dimissione, del supporto sociale e del follow-up e il mancato ricorso all'intervento medico in caso di aggravamento. Per ottimizzare la gestione del paziente affetto da scompenso cardiaco acuto è fondamentale la creazione di una rete integrata di servizi tra l'ospedale e il territorio in grado di garantire un'adeguata continuità assistenziale. Negli ultimi 15-20 anni, molti studi hanno evidenziato come servizi di ospedalizzazione domiciliare rivolti a pazienti anziani e fragili afferiti in Pronto Soccorso per patologie in fase acuta, possano favorire la riduzione della degenza ospedaliera, dei tassi di ospedalizzazione ed istituzionalizzazione, il miglioramento dello stato funzionale e della qualità di vita oltre che il contenimento dei costi^(1,2,3,5,10,12,19,21).

Nel nostro studio, pubblicato su *Archives of Internal Medicine*⁽²¹⁾, abbiamo confrontato il trattamento in regime di ospedalizzazione a domicilio di pazienti anziani affetti da scompenso cardiaco in fase acuta con il trattamento in reparto di degenza ospedaliera. Dallo studio è emerso che l'intero campione era composto da pazienti molto anziani (età media 81 anni), comorbidi, funzionalmente e cognitivamente compromessi. L'ipertensione arteriosa, la malattia coronarica e le valvulopatie erano le principali cause di scompenso cardiaco in entrambi i gruppi. I fattori precipitanti di maggiore riscontro sono stati infezioni polmonari, fibrillazione atriale, crisi ipertensive e scarsa compliance farmacologica. Circa il 35% dei pazienti erano in classe NYHA IV, il 40% presentava una frazione di eiezione < 40%, senza differenze nei due gruppi. In entrambi i gruppi i pazienti sono stati trattati secondo protocolli di cura validati a livello internazionale: nel 2% dei casi sono stati somministrati

inotropi per via endovenosa. Non si sono osservate differenze di mortalità, risultata pari al 15% al follow-up a sei mesi. Solo nei pazienti ospedalizzati a domicilio si sono osservati un miglioramento del tono dell'umore e della qualità della vita, e tempi di riammissione in ospedale significativamente più lunghi.

Uno studio prospettico osservazionale condotto su pazienti a medio-alto rischio di delirium secondo i criteri della Inouye⁽⁶⁾ ha dimostrato che la “cura a casa” riduce il rischio di sviluppare uno stato confusionale⁽⁷⁾. Anche in altri studi da noi condotti su pazienti affetti da ictus cerebrale ischemico in fase acuta o demenza avanzata, l'ospedalizzazione a domicilio, a parità di mortalità rispetto alla degenza ospedaliera, è risultata essere protettiva nei confronti dello sviluppo di complicanze quali il delirium ed associata ad minor tasso di reingressi in ospedale e di istituzionalizzazione e ad un livello di qualità di vita più elevato per i pazienti^(2,3,22,23).

Lo sviluppo tecnologico ha permesso negli ultimi anni di poter trasferire al domicilio molte pratiche tipicamente ospedaliere, mediante strumentazioni più leggere e maneggevoli o in grado di offrire vantaggi clinici sia ai pazienti sia agli operatori sanitari. Sono attualmente in fase sperimentale due progetti che valutano l'efficacia della *Telemedicina* (Tele-monitoraggio e Tele-radiologia domiciliare), anche nell'ottica di future applicazioni nell'ambito della medicina territoriale.

Con il termine Telemedicina si intende *“integrazione, monitoraggio e gestione dei pazienti, nonché educazione dei pazienti e del personale, usando sistemi che consentano un pronto accesso alla consulenza di esperti ed alle informazioni del paziente, indipendentemente da dove il paziente o le informazioni risiedano”* (definizione concordata a livello CEE, 1990). Sebbene la telemedicina sia già stata applicata alla cura e alla sorveglianza dello scompenso cardiaco, del diabete e della BPCO con buoni risultati sia in termini di riduzione delle riospedalizzazioni sia in termini di riduzione dei costi e miglioramento della qualità di vita del paziente anziano dimesso o con un recente ricovero ospedaliero^(8,11,13,24), tuttavia mancano trial clinici randomizzati su campioni ampi di pazienti.

È attualmente in corso uno studio clinico randomizzato di tele-monitoraggio, in collaborazione con Telecom Italia e l'Istituto Superiore Mario Boella del Politecnico di Torino, che si propone di valutare la fattibilità e l'utilità di un sistema in grado di permettere ai pazienti di misurare alcuni parametri fisiologici (il peso corporeo, la pressione arteriosa, la frequenza cardiaca, la saturazione dell'ossigeno ematico, la spirometria e l'elettrocardiogramma) (Figura 1) direttamente nella propria abitazione, attraverso l'uso di semplici

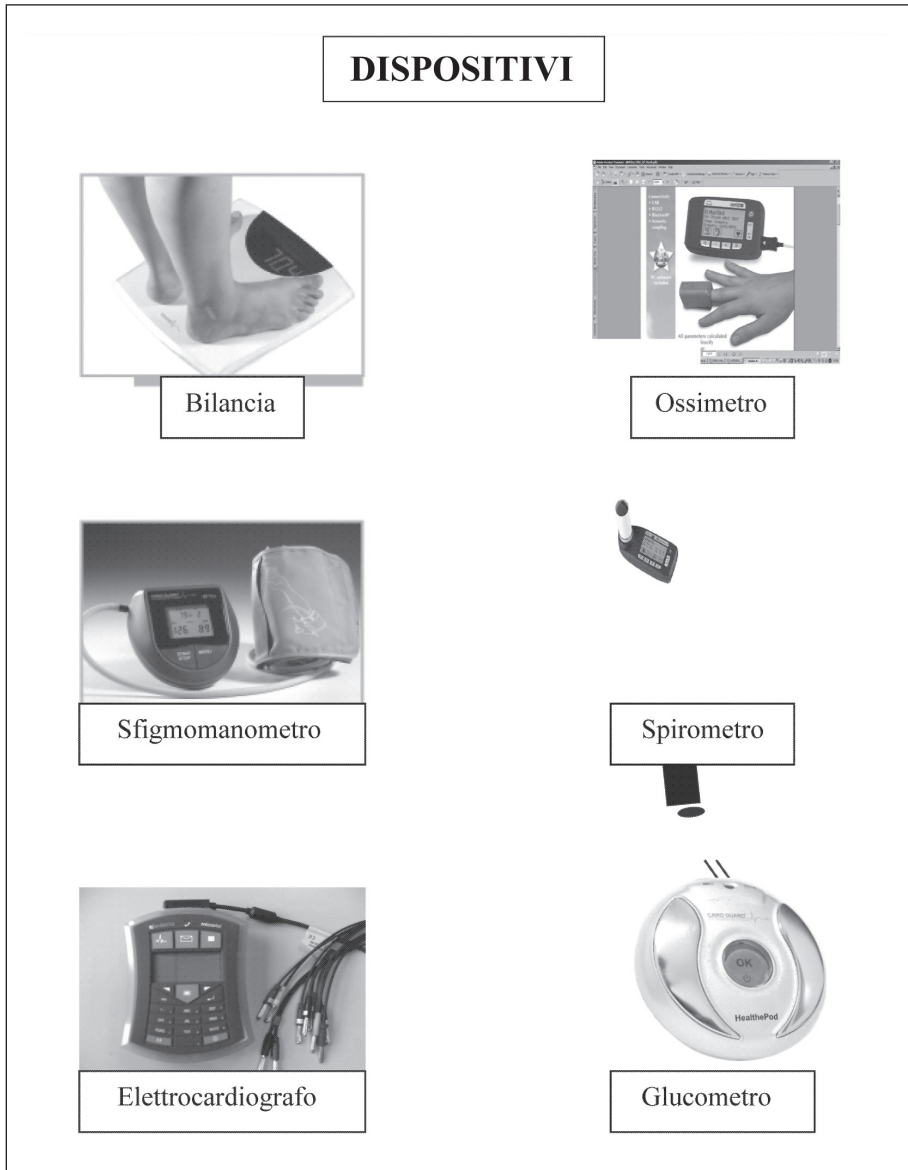


Figura 1. Dispositivi di tele monitoraggio in dotazione.

dispositivi che inviano automaticamente le misure ad un server consultabile da una piattaforma ospedaliera. I medici della struttura sanitaria possono così valutare le misure ricevute, essere allertati tempestivamente da notifiche

automatiche se le misure superano delle soglie limite, e in caso di necessità saranno in grado di interagire con il paziente stesso, modificando il protocollo di cura o la terapia farmacologica (Figura 2). I risultati preliminari dimostrano come tale metodica sia gradita ai pazienti e contribuisca a ridurre lo stress dei caregiver.

È in corso, inoltre, uno studio clinico randomizzato che valuta fattibilità ed efficacia di un servizio sperimentale di tele-radiologia domiciliare.

Trasferire la diagnostica radiologica al domicilio dei pazienti è sicuramente impegnativo, ma esperienze preliminari confermano che è fattibile, sicuro e non inficia la qualità delle immagini^(9,16).

Lo studio, condotto in collaborazione con i servizi di radiologia del nostro ospedale, consiste nel confrontare l'esecuzione di esami radiologici a domicilio con l'effettuazione dei medesimi accertamenti in ambito ospedaliero, in termini di costi, efficacia e qualità del servizio. Un veicolo attrezzato posto nei pressi del domicilio del paziente ("stazione radiologica mobile") (Figura 3) riceve le immagini radiologiche ottenute da un tubo radiogeno portatile situato al letto dell'ammalato ed è in grado di inviarle al *Picture Archive and Communication System (PACS)* aziendale tramite internet e la tecnologia UMTS, in modo tale che il medico radiologo possa visualizzarle e refertarle in tempo reale. Anche in questo caso, i dati preliminari dimostrano come tale sperimentazione sia fattibile e apprezzata dai pazienti, con una tendenza ad un contenimento dei costi ed a una migliore qualità di vita, a fronte di una qualità clinico-diagnostica dei radiogrammi eseguiti a domicilio assolutamente comparabile a quella degli esami effettuati in ospedale.

CONCLUSIONI

La valutazione multi-dimensionale, il lavoro in équipe multidisciplinare, il coinvolgimento del sistema familiare ed il modello di assistenza continuativa applicati nell'ambito delle cure domiciliari possono ridurre i tassi di ospedalizzazione ed istituzionalizzazione, migliorare la qualità di vita del paziente e contenere la spesa sanitaria.

Nel mese di marzo 2010 la Regione Piemonte ha prodotto una delibera (D.G.R. n. 85-13580 del 16 marzo 2010) specifica per l'organizzazione e la remunerazione delle attività di assistenza specialistica di ospedalizzazione domiciliare a carattere ospedaliero. Tale atto deliberativo rappresenta uno strumento fondamentale per lo sviluppo e la diffusione di questo modello di cura.

È infatti crescente il numero di persone malate che hanno bisogno di trattamenti che solo l'ospedale può fornire e che dovrebbero trascorrere in

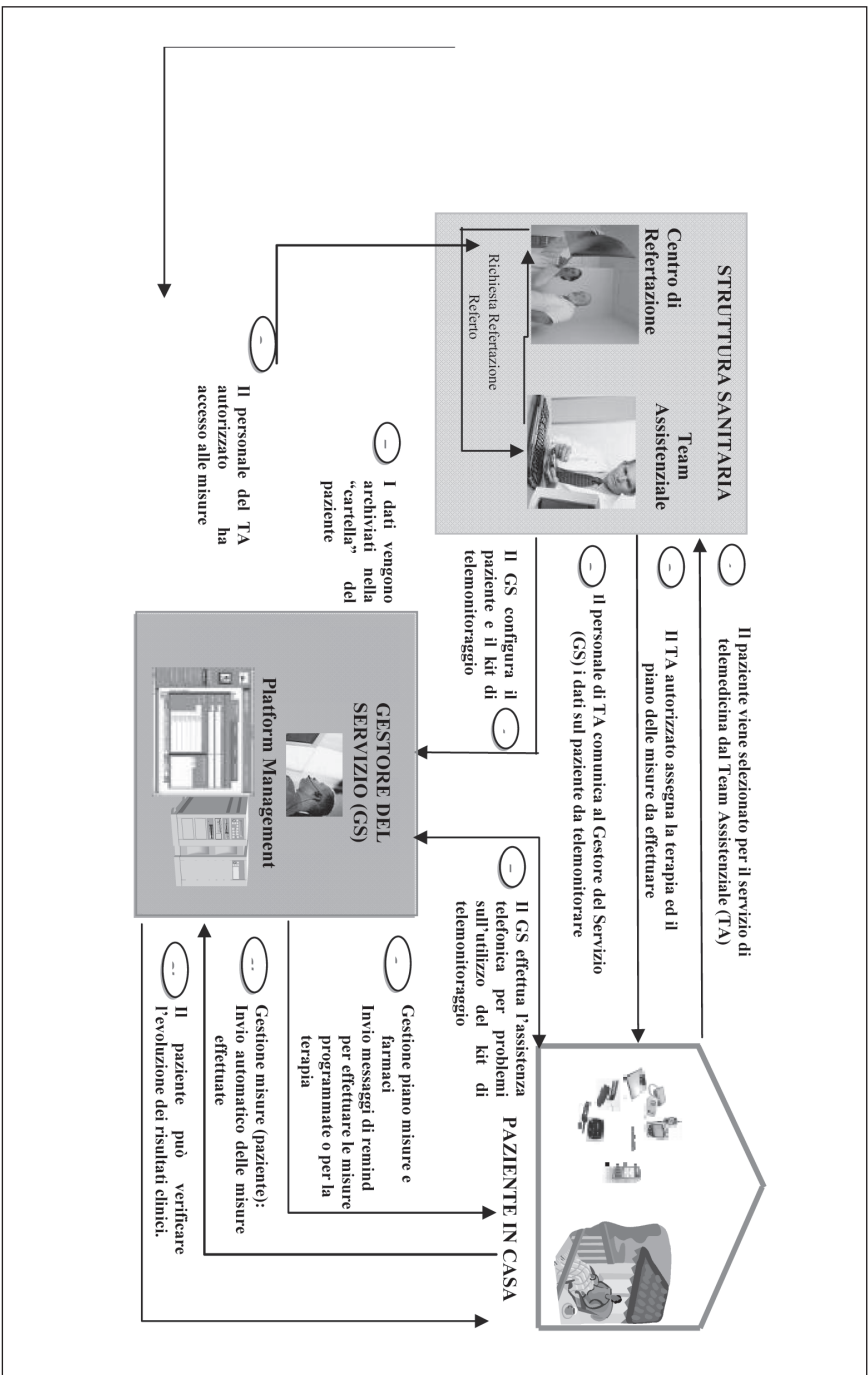


Figura 2. Diagramma di funzionalità del progetto MyDoctor@Home.

ospedale periodi molto lunghi della loro vita (con ricadute spesso negative in termini di qualità di vita, aumentato rischio iatrogeno, perdita di autonomia), e che invece possono trarre beneficio dal ricevere l'”ospedale a casa”.



Figura 3. La Tele Radiologia domiciliare: stazione radiologica mobile.

BIBLIOGRAFIA

1. Aimonino Ricauda N, Tibaldi V, Leff B, Scarafiotti C, Marinello R, Zanolchi M, Molaschi M: *Substitutive "hospital at home" versus inpatient care for elderly patients with exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: a prospective randomized controlled trial*. J. Am. Geriatr. Soc. 2008; 56: 493-500.
2. Aimonino Ricauda N, Tibaldi V, Pignata M, Marinello R, Bo M, Isaia G, Scarafiotti C, Molaschi M: *Acute ischemic stroke in elderly patients treated in hospital at home: a cost minimization analysis*. J. Am. Geriatr. Soc. 2005; 53: 1442-1443.
3. Aimonino Ricauda N, Bo M, Molaschi M, Massaia M, Salerno D, Amati D, Tibaldi V, Fabris F: *Home hospitalization service for acute uncomplicated first ischemic stroke in elderly patients: a randomized trial*. J. Am. Geriatr. Soc. 2004; 52: 278-283.
4. Blue L, Lang E, McMurray JJV, Davie AP, McDonagh TA, Murdoch DR, Petrie MC, Connolly E; Norrie J, Round CE, Ford I, Morrison CE: *Randomised controlled trial of specialist nurse intervention in heart failure*. BMJ. 2001; 323: 715-718.
5. Caplan GA, Ward JA, Brennan NJ, Coconis J, Board N, Brown A: *Hospital in the home: a randomised controlled trial*. Med. J. Aust. 1999; 170: 156-160.
6. Inouye SK, Viscoli CM, Horwitz RI et al: *A predictive model for delirium in hospitalized elderly medical patients based on admission characteristics*. Ann. Intern. Med. 1993; 119: 474-481.
7. Isaia G, Astengo M, Tibaldi V, Zanolchi M, Bardelli B, Obialero R, Tizzani A, Bo M, Moiraghi C, Molaschi M, Aimonino Ricauda N: *Delirium in elderly home-treated patients: a prospective study with 6-month follow-up*. AGE. 2009; 31 (2): 109-117.
8. Jaana M., Paré G: *Home telemonitoring of patients with diabetes: a systematic assessment of observed effects*. Journal of Evaluation in Clinical Practice ISSN. 1256-1294.
9. Laerum F, Amdal T, Kirkevold M, Engeland K, Castberg Hellund J, Oswald S, Borthne K, Sager EM, Randers J: *Moving equipment, not patients: mobile, net-based digital radiography to nursing home patients*. ICS. 2005; 1281: 922-925.
10. Leff B, Burton L, Mader SL, Naughton B, Burl J, Inouye SK, Greenough WB, Guido S, Langston C, Frick KD, Steinwachs D, Burton JR: *Hospital at home: feasibility and outcomes of a program to provide hospital-level care at home for acutely ill older patients*. Ann. Intern. Med. 2005; 143: 798-808.
11. Maric B, Kaan A, Ignaszewski A, Lear SA: *A systematic review of telemonitoring technologies in heart failure*. Eur. J. Heart Fail. 2009; 11 (5): 506-517.
12. Montalto M: *Hospital in the Home: Principles and Practice*. Melbourne. ArtWords Publishing 2002, Melbourne.
13. Paré G, Jaana M, Sicotte C: *Systematic Review of Home Telemonitoring for Chronic Diseases*. The Evidence Base Journal of the American Medical Informatics Association. 2007; 14 (3).
14. Rich MW: *Heart failure in the 21st century: a cardiogeriatric syndrome*. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 2001; 56: M88-M96.
15. Rich MW, Beckham V, Wittenberg C, Leven CL, Freedland KE, Carney RM: *A multidisciplinary intervention to prevent the readmission of elderly patients with congestive heart failure*. N. Engl. J. Med. 1995; 333: 1190-1195.

16. Sawyer RH, Patel U, Horrocks W: *Domiciliary radiography: an important service?* Clinical Radiology 1995; 50: 51-55.
17. Shepperd S, Doll H, Angus MR, Clarke MJ, Iliffe S, Kalra L, Aimonino Ricauda N, Tibaldi V, Wilson AD: *Avoiding hospital admission through provision of hospital care at home: a systematic review and meta-analysis of individual patient data.* CMAJ. 2009; 180 (2): 175-182.
18. Shepperd S, Iliffe S: *Hospital at home versus in-patient hospital care.* Cochrane Database Syst. Rev. 2001; CD000356.
19. Stessman J, Ginsberg G, Hammerman-Rozenberg R, Friedman R, Ronen D, Israeli A, Cohen A: *Decreased hospital utilization by older adults attributable to a home hospitalisation program.* J. Am. Geriatr. Soc. 1996; 44: 591-598.
20. Thompson DR, Roebuck A, Stewart S: *Effects of a nurse-led, clinic and home-based intervention on recurrent hospital use in chronic heart failure.* Eur. J. Heart Fail. 2005; 7: 377-384.
21. Tibaldi V, Isaia G, Scarafioti C, Gariglio F, Zanolchi M, Bo M, Bergerone S, Aimonino Ricauda N: *Hospital at home for elderly patients with acute decompensation of chronic heart failure: a prospective randomized controlled trial.* Arch. Intern. Med. 2009; 169 (17): 1569-1575.
22. Tibaldi V, Aimonino Ricauda N, Costamagna C, Obialero R, Ruatta C, Stasi MF, Molaschi M: *Clinical outcomes in elderly demented patients and caregiver's stress: a 2-year follow-up study.* Arch. Gerontol. Geriatr. 2007; Suppl. 1: 401-406.
23. Tibaldi V, Aimonino N, Ponzetto M, Stasi MF, Amati D, Raspo S, Roglia D, Molaschi M, Fabris F: *A randomized controlled trial of a home hospital interventions for frail elderly demented patients: behavioral disturbances and caregiver's stress.* Arch. Gerontol. Geriatr. 2004; Suppl. 9: 431-436.
24. Wakefield BJ, Holman JE, Ray A, Scherubel M, Burns TL, Kienzle MG, Rosenthal GE: *Outcomes of a home telehealth intervention for patients with heart failure.* J. Telemed. Telecare. 2009; 15 (1): 46-50.

LA RM FUNZIONALE NELL'IMAGING DEI TUMORI CEREBRALI

Maria Consuelo Valentini¹, Giovanna Carrara¹, Carola Jünemann²

¹ S.C. Neuroradiologia, Az. Ospedaliera CTO - M. Adelaide - Torino

² S.C. Neurochirurgia, Az. Ospedaliera CTO - M. Adelaide - Torino

Key words: *MRI / Risonanza Magnetica*
 Advanced Techniques / Tecniche Avanzate
 Brain Tumors / Tumori Cerebrali

Abstract:

Neuroradiology of brain tumors relies mainly on conventional MRI but there are still some diagnostic problems. Very useful for tumor grading and in the differential diagnosis between “necrotic” lesions (like metastasis, glioblastoma and abscess) and between tumor recurrence and post radiotherapy necrosis, are the advanced techniques. Diffusion, Perfusion and Spectroscopy imaging techniques give informations concerning cellular density, angiogenesis and tumoral metabolism becoming an invaluable support for the final diagnosis. Tractography (DTI) and cortical activation technique (fMRI) show the main eloquent areas and white matter tracts providing to the neurosurgeon anatomical details useful for the correct surgical approach.

Riassunto:

Non sempre le immagini morfologiche fornite dalla RM convenzionale sono sufficienti a formulare una ipotesi diagnostica. Un aiuto ci viene fornito dalle tecniche avanzate di RM non convenzionale che ci permettono di differenziare fra loro lesioni cistico-necrotiche (ascesso, metastasi o glioblastoma), definire il grading di astrocitomi infiltranti o distinguere una radionecrosi da una recidiva tumorale. Le tecniche di Diffusione, Perfusion e Spettroscopia forniscono informazioni sulla cellularità, angiogenesi e metabolismo tumorale rendendosi indispensabile supporto per la diagnosi, ma solo se vengono esaminate ed interpretate unitamente all'imaging convenzionale e ai dati clinico-anamnestici. Con la trattografia (DTI) e le tecniche di attivazione corticale (fMRI), si possono evidenziare le principali aree eloquenti e visualizzare il decorso dei fasci di sostanza bianca fornendo al neurochirurgo utili informazioni per un corretto approccio chirurgico.

L'avvento della TC negli anni '70 modificò radicalmente le tecniche radiologiche permettendo di visualizzare in modo diretto i vari organi e le loro patologie ma, a non molta distanza di tempo, negli anni '80, la Risonanza Magnetica assunse il ruolo chiave nella diagnostica encefalo-midollare. La RM è infatti considerata la tecnica di elezione per lo studio delle malattie del sistema nervoso e tra queste della patologia oncologica. L'elevato potere di risoluzione spaziale e di segnale e la sua multiplanarietà, permettono di rilevare e localizzare lesioni anche molto piccole: le alterazioni morfologiche di una neoformazione cerebrale rispetto al tessuto sano si accompagnano infatti a modificazioni del contenuto di acqua intra e/o extracellulare e quindi a differenze di segnale che facilitano, anche in assenza di impregnazioni contrastografiche, il rilevamento di una patologia (Figure 1 e 2).

Per formulare un'ipotesi di natura del tumore è necessario tener conto di un insieme di dati che vanno dall'età del paziente e sintomatologia clinica alle caratteristiche di sede, (intra o extraassiale, sopra o sottotentoriale, corticale o sottocorticale), ai suoi rapporti con le strutture vicine, ai suoi margini (ben delineato o infiltrante), all'effetto massa, alle caratteristiche di segnale e di impregnazione e al tipo di vascolarizzazione.

La Risonanza magnetica convenzionale o morfologica consente quindi di identificare le lesioni, di stabilirne la sede e restringere il novero delle ipotesi di natura, ma possiede delle limitazioni diagnostiche quali distinguere una patologia infiammatoria da una neoplasia e, nell'ambito di quest'ultime, di differenziare, ad esempio, un glioblastoma da una metastasi o da un linfoma. Nelle lesioni della serie gliale la RM morfologica possiede inoltre una scarsa sensibilità nel definirne il tipo e il grado di malignità e dopo un trattamento radioterapico non è in grado di identificare una recidiva rispetto ad una radionecrosi.

L'introduzione in Risonanza Magnetica delle cosiddette "tecniche avanzate" o "non convenzionali" o "funzionali" ha permesso di aggiungere ai dati morfologici anche aspetti metabolici e di microstruttura che aiutano a superare alcune di queste difficoltà ed aprono nuove prospettive nello studio dei tumori, con ripercussioni notevoli sia sul piano diagnostico sia terapeutico, neurochirurgico.

La sequenza RM pesata in "Diffusione", basata sul movimento browniano delle molecole di H_2O nei tessuti nervosi, fornisce importanti informazioni per una diagnosi differenziale tra neoplasia e formazione infiammatoria e per distinguere una bassa da un'alta cellularità tumorale. Con la Tecnica di **Diffusione** ad esempio è possibile differenziare meglio lesioni solide da lesioni a contenuto liquido, ascessi a contenuto liquido viscoso (pus) da

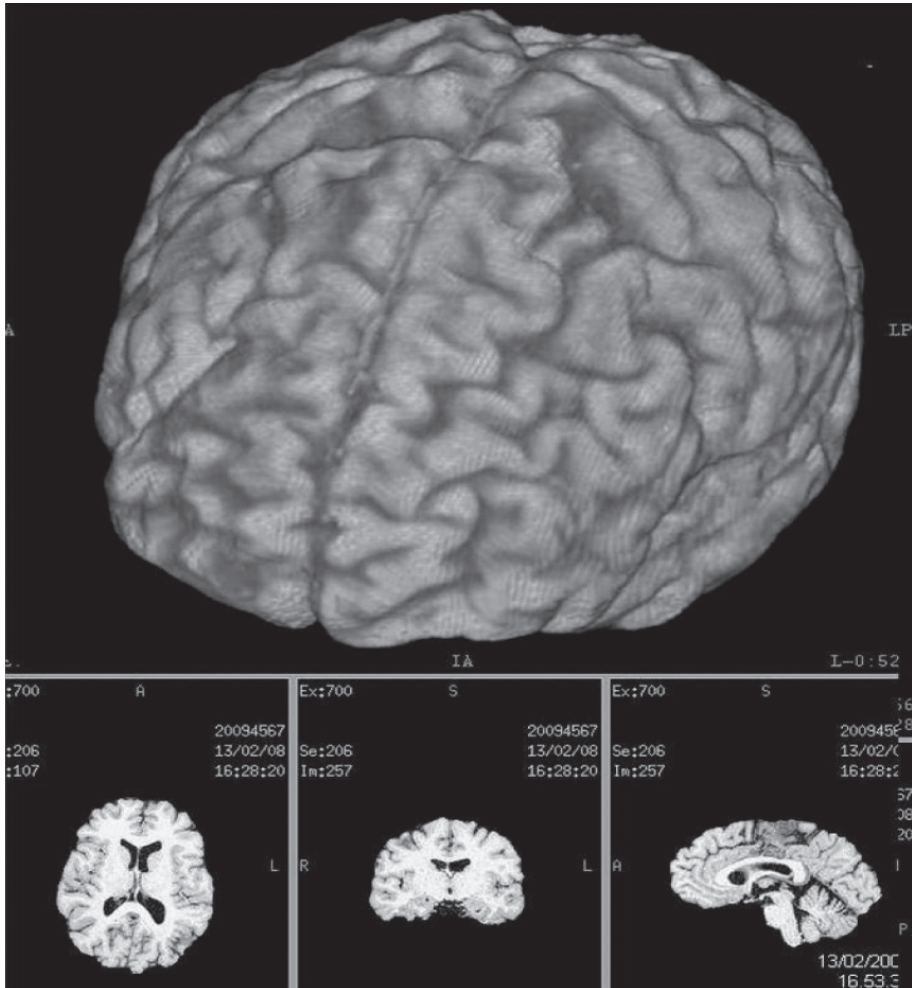


Figura 1. Studio 3D ad alta risoluzione spaziale con riformattazioni nei 3 piani dello spazio.

lesioni a contenuto liquido non viscoso come quello delle cisti intratumorali (Figura 3)^(9,11,17,18,19).

La somministrazione e.v del mezzo di contrasto paramagnetico è sempre indispensabile per definire le caratteristiche morfologiche di una lesione espansiva. L'impregnazione dipende dalla presenza o meno della barriera ematoencefalica, dalla sua integrità e dal grado di vascolarizzazione della neoplasia. L'impregnazione risulta pertanto molto intensa nei meningiomi, dove l'apporto ematico viene per lo più fornito da rami della carotide esterna,

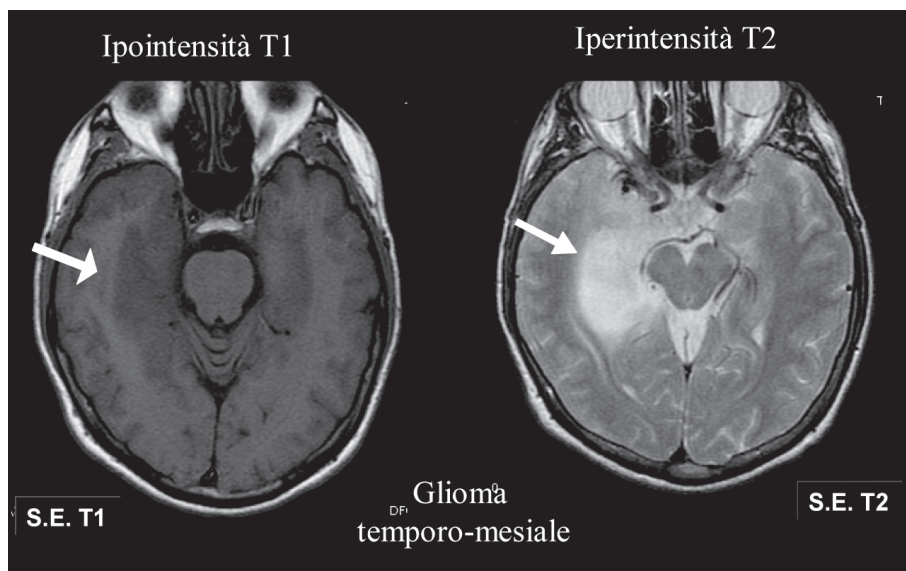


Figura 2. La RM rileva le differenze di segnale tra la neoformazione ed i tessuti cerebrali adiacenti in base alla modificazione del contenuto di acqua intra e/o extracellulare.

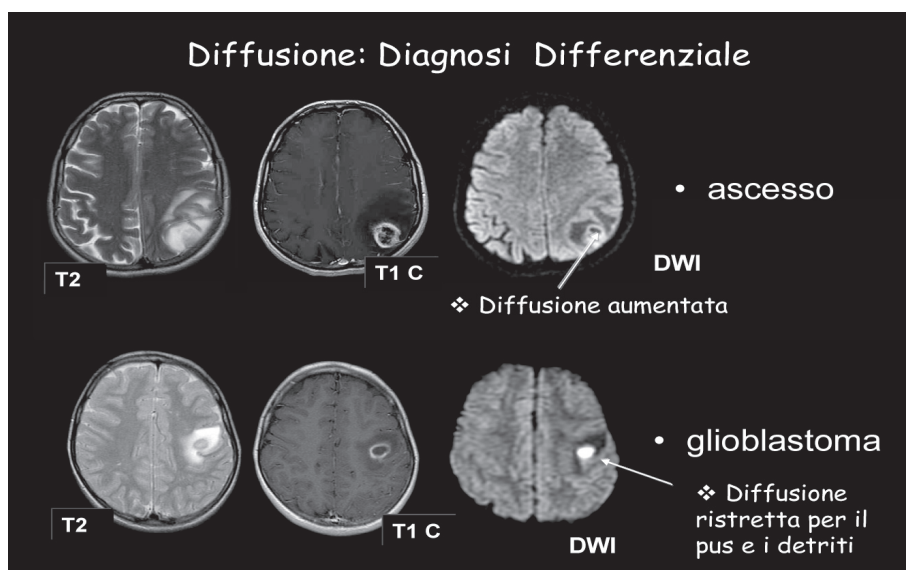


Figura 3. Nell'ascesso la diffusione è ristretta per presenza di pus e detriti, nel tumore la diffusione è aumentata per presenza di necrosi.

privi di barriera, o in numerosi tumori intrassiali, dove la membrana basale è alterata, soprattutto in quelli gliali di grado elevato quali il GBM. Vi sono però alcuni tumori di basso grado quali ad esempio gli astrocitomi pilocitici che hanno la caratteristica di avere giunzioni della membrana basale più ampie e che presentano una intensa impregnazione.

Generalmente si identifica come astrocitoma anaplastico o come GBL una lesione infiltrante con segnale disomogeneo per presenza di aree di necrosi, di emorragia, edema e impregnazione di mdc, mentre si considera di basso grado una lesione infiltrante in modo omogeneo il tessuto cerebrale con minimo o assente edema e con assenza di impregnazione di mezzo di contrasto. Questo purtroppo non sempre corrisponde ai dati neuropatologici e dalla letteratura si evince che il 40% circa degli astrocitomi privi di impregnazione contrastografica sono gliomi anaplastici⁽⁷⁾.

Se il grado di impregnazione non sempre fornisce elementi di correlazione con il grado istologico della neoformazione, preziose informazioni possono essere invece aggiunte dagli studi RM di **Perfusione**^(11,13,17,19).

La perfusione grazie a sequenze dinamiche T2* che rilevano la variazione del segnale indotta dal passaggio del MDC al variare del tempo e al calcolo delle curve suscettibilità-tempo e concentrazione-tempo, permette di valutare il flusso microscopico capillare nell'ambito del tessuto cerebrale normale e patologico. Con questa tecnica si può quindi valutare la vascolarizzazione di una neoplasia cerebrale e poiché la neo-angiogenesi accompagna la proliferazione neoplastica, la perfusione nell'ambito oncologico è in grado di fornire parametri di grading tumorale o nell'ambito di una stessa neoplasia, di individuare quelle aree a maggior attività angiogenetica. Inoltre la Perfusione si è rivelata molto importante per differenziare la radionecrosi da una recidiva neoplastica. (Figure 4 e 6).

Un'altra metodica RM che orienta nell'identificazione del tipo di tumore e aiuta a caratterizzare le neoplasie cerebrali è la **Spettroscopia**^(2,6,10,11,12). Questa metodica fornisce informazioni sulla composizione biochimica dei tessuti cerebrali registrando i segnali provenienti dai metaboliti presenti nelle cellule nervose. Poiché le "unità" attraverso cui vengono espresse le variazioni del segnale di Risonanza Magnetica sono unità arbitrarie, dipendenti da una serie di fattori relativi sia al paziente (regioni anatomiche, età), sia all'apparecchiatura (shimming, etc.) è necessario confrontare i dati con i valori di normalità acquisiti su campioni di popolazione normale. Le analisi quantitative vengono calcolate relativamente ad un metabolita di riferimento interno che è la Creatina. La Creatina (Cr) che nelle cellule ha il ruolo di mantenere costanti i livelli di ATP, ha infatti una presenza relativamente costante nell'encefalo normale.

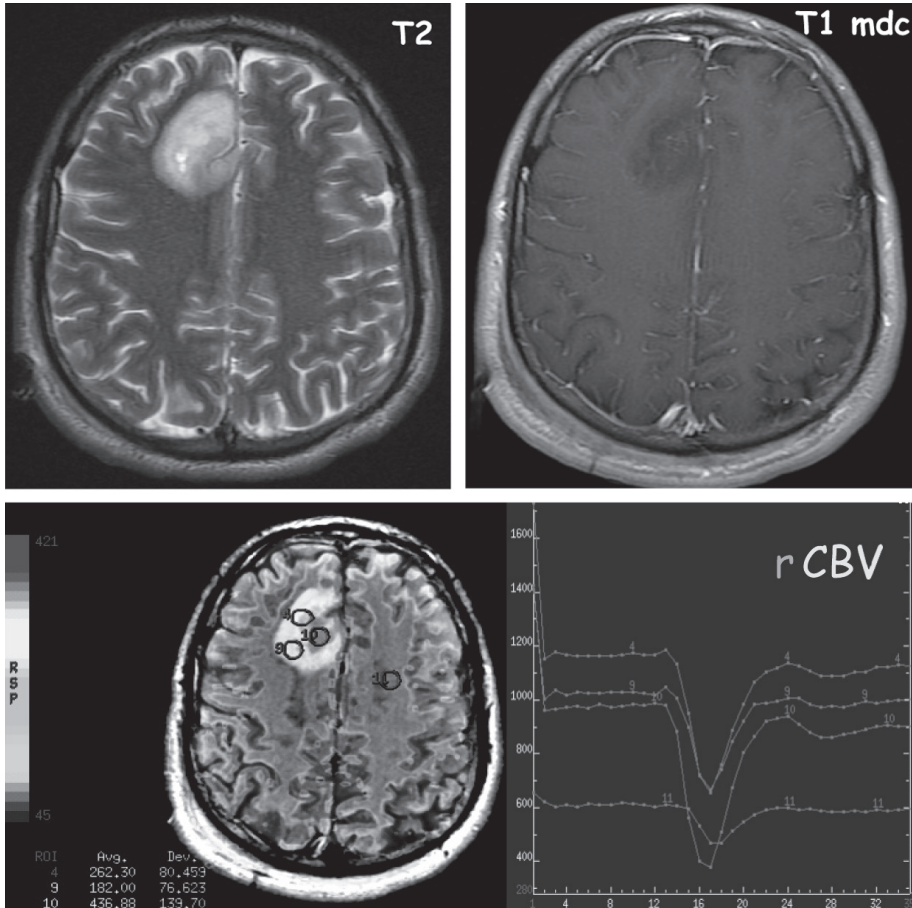


Figura 4. Astrocitoma anaplastico frontale parasagittale destro. La tecnica di perfusione dimostra un incremento del rCBV anche in lesioni prive di impregnazione contrastografica.

L'NAcetilAspartato (Naa) è un ottimo indicatore neuronale essendo presente solo nei neuroni funzionanti; la Colina (Cho) con la fosfocolina e la glicerofosfocolina rappresenta un prodotto intermedio del metabolismo lipidico e correla con un aumentato turnover cellulare, con l'aumento della densità cellulare e con le alterazioni delle membrane cellulari. La sua presenza aumenta ad esempio in tumori con cellule a rapida crescita. Il Mioinositolo, è un metabolita coinvolto nella neuroreazione ormonale ed è un probabile precursore di acido glucuronico; viene considerato un marker specifico delle cellule gliali. I Glx sono costituiti da glutammato e glutammina. Il glutammato

è un neuro-trasmittitore eccitatorio che gioca un ruolo nel metabolismo mitocondriale, ma anche nella neuro-trasmissione, come precursore del GABA, come componente del ciclo di Krebs nella regolazione dei livelli di ammoniemia e nella sintesi degli acidi grassi.

L'Alanina (Al) è un metabolita particolarmente espresso nei meningiomi.

Il lattato è un prodotto della glicolisi anaerobia. I lipidi costituiti da acidi grassi e trigliceridi, sono precursori o prodotti di degradazione dei lipidi stessi, non rilevabili nel tessuto cerebrale normale e compaiono nelle zone necrotiche.

Nei tumori astrocitari di basso grado i valori del Naa sono tendenzialmente normali con un modesto incremento del rapporto Cho/Cr. Nei gliomi di grado elevato all'aumento del rapporto Cho/Cr si associa la marcata riduzione del rapporto NAA/Cr e la comparsa di lattato e di lipidi (Figure 5 e 6)^(16,19).

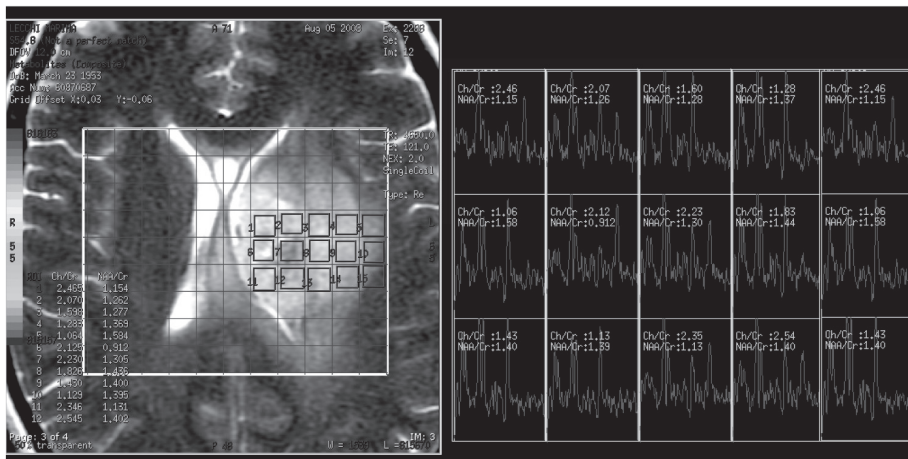


Figura 5. La tecnica di spettroscopia 3D valuta la lesione e i tessuti circostanti permettendo di distinguere, nell'ambito dell'alterazione del segnale, l'infiltrazione tumorale dall'edema.

La definizione dei rapporti anatomici di un tumore con i tessuti circostanti è particolarmente importante per l'approccio chirurgico onde evitare o limitare i danni iatrogeni. È necessario precisare con accuratezza il rapporto della lesione rispetto a particolari strutture quali la scissura silviana (area del Broca e Wernicke), la scissura centrale (area motoria e sensitiva), l'area visiva primaria ecc. A tale proposito un ruolo chiave può essere svolto dallo studio **RM Funzionale**^(1,5,8). Questa tecnica di "attivazione corticale" basata

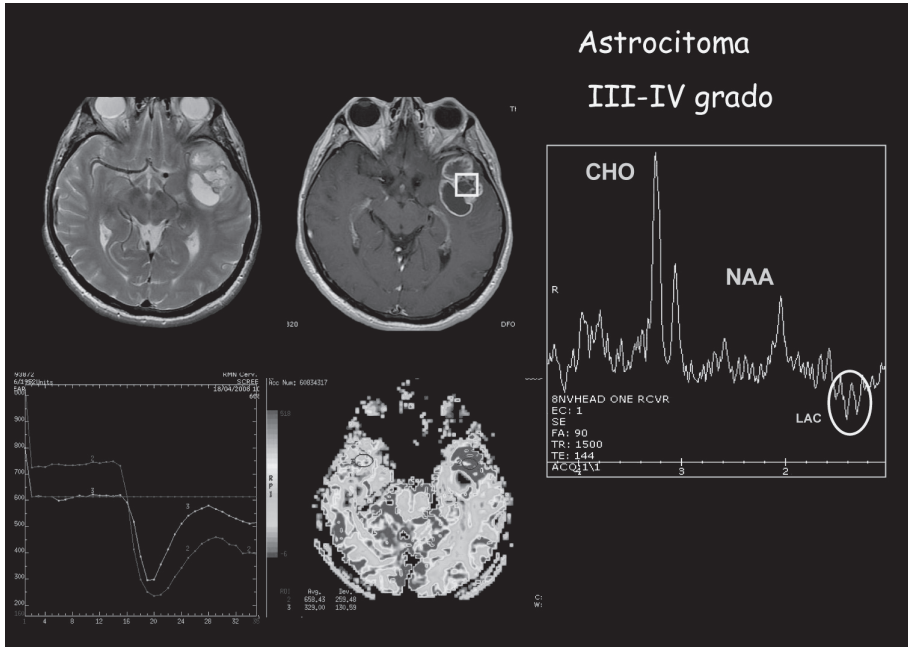


Figura 6. Astrocitoma anaplastico. La neoplasia presenta in spettroscopia un aumento del rapporto Cho/ Cr, la riduzione del rapporto NAA/Cr e la presenza di lattato, mentre lo studio in Perfusion dimostra un aumento del rCBV in accordo con un elevata malignità.

sull'effetto BOLD (Blood Oxygenation Level Dependent contrast), rileva, grazie alle proprietà paramagnetiche della deossiemoglobina, le variazioni di segnale legate ad un aumento del flusso ematico che arriva in corteccia durante un'attività neuronale. È così possibile evidenziare le aree corticali che si attivano con l'esecuzione di uno specifico compito (stimolazione motoria, visiva, acustica, cognitiva...) e stabilirne i rapporti con il tumore (Figura 7).

La **Trattografia** (DTI), tecnica basata sulla diffusione anisotropica delle molecole di idrogeno, visualizza ricostruendoli tridimensionalmente e con colori differenti a seconda della direzione, i grossi fasci di sostanza bianca (Figura 8)^(3,4,14,15).

Sia la RM funzionale sia la Trattografia hanno importanti implicazioni sul versante terapeutico ed in particolare per la pianificazione e la guida del trattamento chirurgico: le mappe funzionali che vengono ottenute con queste tecniche, fuse con le immagini RM morfologiche, vengono infatti inviate al Neuronavigatore in sala operatoria dove consentono al neurochirurgo un approccio più sicuro per la rimozione della neoplasia, evitando il più possibile

di danneggiare le aree critiche dell'encefalo, come ad esempio l'area motoria, quella del linguaggio, l'area visiva e quella acustica.

È necessario sottolineare che l'insieme di tutte queste tecniche "avanzate" convenzionali non consentono isolatamente di esprimere giudizi diagnostici ma permettono di migliorare l'accuratezza della diagnosi e del trattamento solo se integrate dai dati morfologici di RM convenzionale ed interpretate sulla base di dati clinico-anamnestici.

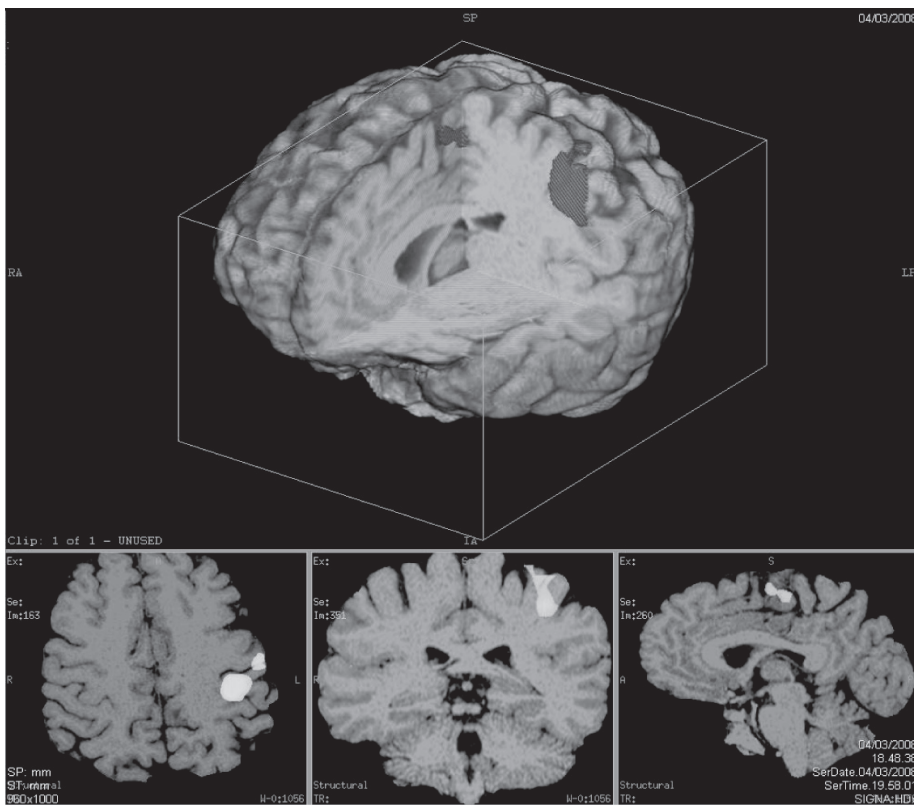


Figura 7. fMRI. Attivazione corticale dell'area motoria durante esecuzione di finger tapping mano destra.

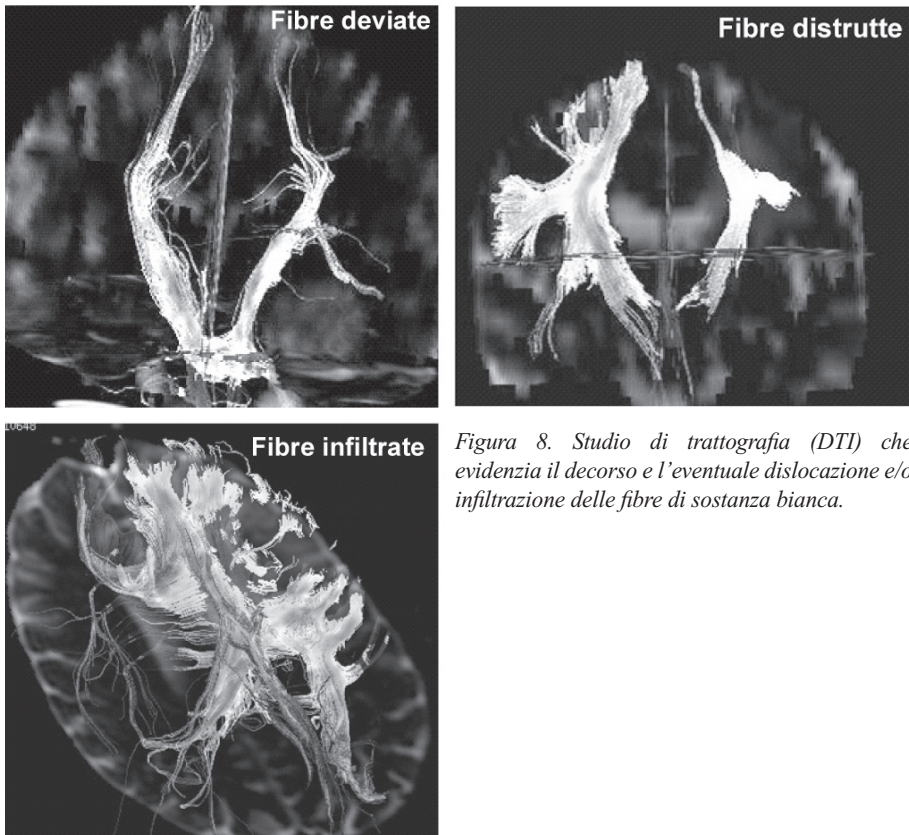


Figura 8. Studio di trattografia (DTI) che evidenzia il decorso e l'eventuale dislocazione e/o infiltrazione delle fibre di sostanza bianca.

BIBLIOGRAFIA

1. Bookheimer S: *Functional MRI of language: new approaches to understanding the cortical organization of semantic processing*. Annu. Rev. Neurosci. 2002; 25, 151-188.
2. Castillo M, Smith JK, Kwok L: *Correlation of myo-inositol levels and grading of cerebral astrocytomas*. AJNR Am. J. Neuroradiol. 2000; 9,1645-1649.
3. Catani M: *From hodology to function*. Brain. 2007; 130,602-605.
4. Catani M, Thiebaut de Schotten M: *A diffusion tensor imaging tractography atlas for virtual in vivo dissections*. Cortex. 2008; 44, 1105-1132.

5. Faro SH, Mohamed FB: *Functional MRI: Basic Principles and Clinical Applications*. Faro SH, Mohamed FB, eds. Springer. New York. 2006.
6. Fountas KN, Kapsalaki EZ, Vogel RL, Fezoulidis I, Robinson JS, Gotsis ED: *Non invasive histologic grading of solid astrocytomas using proton magnetic resonance spectroscopy*. Stereotact. Funct. Neurosurg. 2004; 82, 90-97.
7. Ginsberg LE, Fuller GN, Hashmi M, Leeds NE, Schomer DF: *The significance of lack of MR contrast enhancement of supratentorial brain tumors in adults: histopathological evaluation of a series*. Surg. Neurol. 1998; 49, 436-40.
8. Gore JC: *Principles and practice of functional MRI of the human brain*. J. Clin. Investigation. 2003; 112, 4-9.
9. Hein PA, Eskey CJ, Dunn JF, Hug EB: *Diffusion-weighted imaging in the follow-up of treated high-grade gliomas: tumor recurrence versus radiation injury*. AJNR Am. J. Neuroradiol. 2004; 25, 201-209.
10. Jansen JF, Backes WH, Nicolay K, Kooi ME: *1H MR spectroscopy of the brain: absolute quantification of metabolites*. Radiology. 2006; 240, 318-332.
11. Jenkinson MD, Du Plessis DG, Walker C, Smith TS: *Advanced MRI in the management of adult gliomas*. Br. J. Neurosurg. 2007; 21, 550-561.
12. Kuznetsov YE, Caramanos Z, Antel SB, Preul MC, Leblanc R, Villemure JG, Pokrupa R, Olivier A, Sadikot A, Arnold DL: *Proton magnetic resonance spectroscopic imaging can predict length of survival in patients with supratentorial gliomas*. Neurosurgery. 2003; 53, 565-574.
13. Lupo JM, Cha S, Chang SM, Nelson SJ: *Dynamic susceptibility-weighted perfusion imaging of high-grade gliomas: characterization of spatial heterogeneity*. AJNR Am. J. Neuroradiol. 2005; 26, 1446-1454.
14. Melhem ER, Mori S, Mukundan G, Kraut MA, Pomper MG, van Zijl PC: *Diffusion tensor MR imaging of the brain and white matter tractography*. AJR Am. J. Roentgenol. 2002; 178, 3-16.
15. Nguyen TH, Yoshida M, Stievenart JL, Iba-Zizen MT, Bellinger L, Abanou A, Kitahara K, Cabanis EA: *MR tractography with diffusion tensor imaging in clinical routine*. Neuroradiology. 2005; 47, 334-343.
16. Poptani H, Gupta RK, Roy R, Pandey R, Jain VK, Chhabra DK: *Characterization of intracranial mass lesions with in vivo proton MR spectroscopy*. AJNR Am. J. Neuroradiol. 1995; 16, 1593-1603.
17. Sadeghi N, D'Haene N, Decaestecker C, Levivier M, Metens T, Maris C, Wikler D, Baleriaux D, Salmon I, Goldman S: *Apparent diffusion coefficient and cerebral blood volume in brain gliomas: relation to tumor cell density and tumor microvessel density based on stereotactic biopsies*. AJNR Am. J. Neuroradiol. 2008; 29, 476-482.
18. Stadnik TW, Chaskis C, Michotte A, Shabana WM, van Rompaey K, Luypaert R, Budinsky L, Jellus V, Osteaux M: *Diffusion-weighted MR imaging of intracerebral masses: comparison with conventional MR imaging and histologic findings*. AJNR Am. J. Neuroradiol. 2001; 22, 969-976.
19. Young GS: *Advanced MRI of adult brain tumors*. Neurol. Clin. 2007; 25, 947-973.

L'ENDOSCOPIA: SUBSTANTIA IMMANENS DELL'UROLOGIA

Francesco Porpiglia, Cristian Fiori, Roberto M. Scarpa

S.C.D.U. Urologia
Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche
Facoltà di Medicina e Chirurgia "San Luigi Gonzaga"
Università degli Studi di Torino
A.O.U. San Luigi Gonzaga Orbassano (Torino)

Key words: *Laparoscopy / Laparoscopia*
 Endoscopy / Endoscopia
 Urology / Urologia

Abstract:

Endoscopy and laparoscopy, with the benefits of decreased blood loss, less postoperative pain, earlier resumption of oral feeding and shorter hospital stays, has become the procedures of choice for most urological interventions. Moreover, in the last few years, various techniques and devices have been proposed with the aim of further reducing the invasiveness of endoscopic and surgical procedures, widely known as mini laparoscopy, NOTES (Natural Orifice Transluminal Endoscopic Surgery), LESS (Laparo-Endoscopic Single-Site Surgery) and "Single-Port" devices. The aim of this study is to present a review of outcomes reported in the literature on new endoscopic and laparoscopic techniques in the urologic field with special emphasis on feasibility, safety and effectiveness of the techniques.

Riassunto:

L'endoscopia e la laparoscopia, grazie agli indubbi benefici che comportano ai pazienti sottoposti ad intervento chirurgico, quali ridotte perdite ematiche, ridotto dolore post operatorio, rapida degenza post operatoria e ripresa delle normali attività, hanno rivoluzionato la pratica clinica ed hanno limitato in modo significativo l'uso della chirurgia tradizionale in urologia.

Il continuo sviluppo della strumentazione e delle tecniche operatorie e, negli ultimi anni, l'introduzione delle tecniche robotiche, hanno permesso lo sviluppo procedure ancora meno invasive rispetto alle procedure endoscopiche e laparoscopiche convenzionali, basti pensare alla mini laparoscopia, alla

LESS (Laparo-Endoscopic Single-Site Surgery) ed alla NOTES (Natural Orifice Transluminal Endoscopic Surgery).

Lo scopo di questo studio è rivedere i risultati delle tecniche endo-laparoscopiche in urologia e presentare le novità in questo ambito.

INTRODUZIONE

Il trattamento delle patologie urologiche è cambiato radicalmente negli ultimi anni e si è passati dal paradigma “grande taglio, grande chirurgo” all’introduzione del concetto di mini invasività, che rappresenta la “strada maestra” per molti urologi. Un atto chirurgico è mini-invasivo quando si ottiene il massimo risultato terapeutico con il minimo trauma per il paziente e la massima espressione di mini-invasività è rappresentata dall’endoscopia. Quando questa utilizza le vie naturali per indagare e trattare le diverse patologie, è definita *endoscopia “intraluminale”*. Basti pensare alla cistoscopia, che permette di indagare le basse vie urinarie, o l’uretero-renoscopia che consente di esplorare sistematicamente l’alta via escretrice. Negli anni, si è compreso che anche la superficie esterna degli organi può essere indagata con l’endoscopia esplorando le cavità e gli spazi in cui tali organi sono contenuti. Nasce così il concetto di *endoscopia extraluminale o “laparoscopia”* (dal greco: esplorare l’addome) che ha dapprima sola valenza diagnostica e successivamente acquista anche una valenza operativa.

Scopo di questo lavoro è riportare le novità in tema di endoscopia e laparoscopia in ambito urologico.

ENDOSCOPIA

Poche specialità chirurgiche hanno conosciuto uno sviluppo tecnologico pari a quello registrato negli ultimi 20 anni in endoscopia urologica.

La disponibilità di cistoscopi flessibili delle dimensioni di 17-18 Ch ha consentito l’esecuzione di cistoscopie diagnostiche e di follow up in regime ambulatoriale, senza necessità di anestesia e con un notevole miglioramento per quanto riguarda il confort dei pazienti^(31,32).

Per quanto riguarda il trattamento dell’adenoma di prostata, che riveste un’importanza fondamentale visto l’elevato numero di interventi/anno, un enorme passo avanti è stato possibile grazie all’introduzione della tecnologia bipolare^(17,18,21,44,47). Grazie a questo sistema infatti la corrente necessaria alla resezione della prostata viene trasmessa fra due anse poste in cima al resettore, rendendo così superflua la placca di “messa a terra” per il paziente, consentendo resezioni (TUR_P) in sicurezza anche nei pazienti portatori di pace maker. Il vantaggio principale è però costituito dalla possibilità di utilizzare, in corso di resezione, la soluzione fisiologica in luogo della soluzione di glicina, minimizzando in tal modo la più temibile complicanza della TUR_P ovvero la TUR – syndrome⁽⁴⁶⁾. Grazie al sistema bipolare è quindi possibile l’esecuzione in sicurezza anche di resezione di adenomi

particolarmente voluminosi, un tempo ad esclusivo appannaggio della chirurgia open^(4,26).

Anche la diagnosi e la terapia delle patologie dell'alta via escretrice (uretere, pelvi e via escretrice intrarenale) sono state rivoluzionate dall'introduzione degli strumenti di nuova generazione. L'ureteroscopia, nata da una felice intuizione di Perez Castro all'inizio degli anni '80, è oggi eseguita routinariamente con strumenti da 6Ch e abbiamo a disposizione strumenti del calibro di 4Ch che permettono di esplorare agevolmente l'intero uretere e di trattare le patologie a suo carico (litiasi, neoformazioni etc)^(2,43,51). L'introduzione, più recente, di strumenti flessibili, (8Ch il calibro medio) ha completato il ventaglio di opzioni per l'urologo. Attraverso l'ureteroscopia flessibile è infatti possibile risalire lungo l'uretere, esplorare la pelvi ed addentrarsi nel sistema caliceale intrarenale, procedura inimmaginabile fino a pochi anni fa. Contestualmente è anche possibile trattare le patologie dell'alta via escretrice (anche in questo caso calcoli o neoformazioni), grazie a idonea strumentazione e alla disponibilità di fonti di energia laser^(7,19,48).

Anche le tecniche per il trattamento della litiasi renale per via percutanea (c.d. nefrolitotomia percutanea o PNL o PCNL) sono state notevolmente migliorate. Fin dalla sua prima descrizione, negli anni 50⁽¹⁵⁾, l'approccio percutaneo al rene è stato eseguito con il paziente in posizione prona, ma ciò comporta una serie di aspetti negativi quali: necessità di variare il decubito del paziente in corso di intervento, rischio di lesione nervosa da stiramento del plesso brachiale, difficoltà respiratorie e di ritorno venoso, difficile accesso alle vie aeree in caso di complicanze anestesilogiche. La proposta di Valdivia⁽⁶¹⁾ per un approccio supino, e le successive modifiche della posizione del paziente in corso di procedura percutanea (Figura 1) hanno consentito l'esecuzione della ECIRS (Endoscopic Combined Intrarenal Surgery) che permette l'approccio combinato percutaneo e retrogrado (ureteroscopico) migliorando la sicurezza e l'efficacia della procedura sia in caso di litiasi renale sia in caso di altre patologie dell'alta via escretrice, come stenosi dell'uretere o neoplasie uroteliali^(20,49).

Menzione a parte merita l'enorme miglioramento delle fonti di energia, in particolare le fonti laser. Oggi mediante laser, principalmente a Holmium, è possibile il trattamento dei calcoli urinari, indipendentemente dalla composizione, ovvero anche dei calcoli più compatti e ribelli al trattamento con altre fonti di energia, il trattamento di neoplasie dell'urotelio, così come il trattamento delle stenosi uretrali ed ureterali. Recente è inoltre la possibilità di eseguire l'enucleazione di voluminosi adenomi prostatici con energia laser, in luogo della procedura open (cd HoLEP)^(27,30).

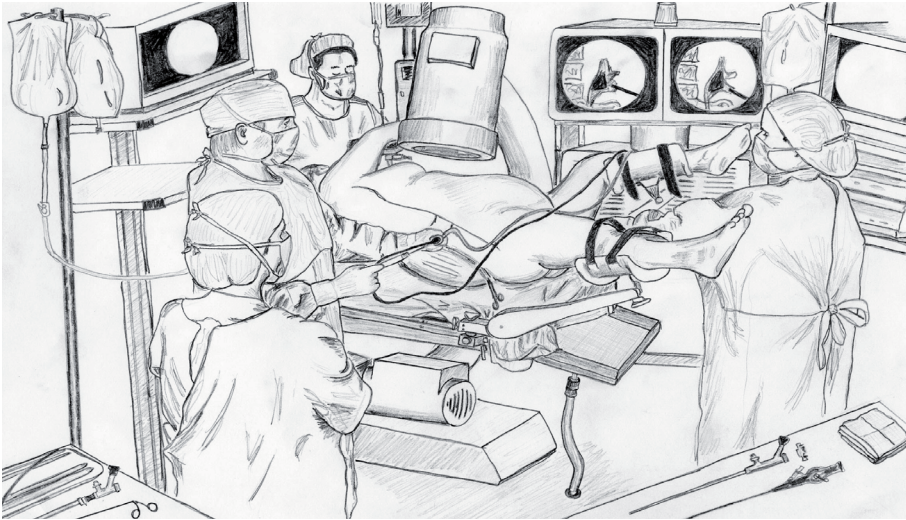


Figura 1. Posizione del paziente per ECIRS. Si noti la possibilità contestuale di accesso retrogrado (attraverso l'uretra con chirurgo ai piedi del paziente) e percutaneo (attraverso il calice inferiore con chirurgo al fianco del paziente) alla via escrettrice intrarenale.

LAPAROSCOPIA

Secondo alcuni osservatori, la laparoscopia rappresenta la seconda rivoluzione francese, poiché sono stati i chirurghi transalpini alla fine degli anni '80, a introdurla nella pratica clinica ed è in urologia che la laparoscopia ha la sua massima espressione.

Brevemente, l'intervento chirurgico laparoscopico prevede l'anestesia generale. Nell'addome del paziente viene insufflata anidride carbonica (CO_2), in modo che la parete addominale si distenda e si crei una "camera di lavoro" adeguata. Attraverso mini – incisioni della parete addominale (5-12mm) in cui vengono collocate le cannule dette porte laparoscopiche, il chirurgo inserisce la telecamera ed i vari strumenti laparoscopici. La telecamera permette di visualizzare l'interno dell'addome: l'immagine viene riportata in un monitor, dove appare ingrandita fino a 20 volte. Laddove risulti necessario asportare una parte di organo, viene effettuata un'incisione adeguata sulla parete addominale, nel punto più appropriato per l'estrazione del pezzo operatorio.

I suoi vantaggi della tecnica laparoscopica rispetto alla chirurgia tradizionale sono riassunti nella Tabella I.

Virtualmente, la quasi totalità degli interventi urologici condotti per via chirurgica open può essere condotta con tecnica laparoscopica (Tabella II)

VANTAGGI DELLA LAPAROSCOPIA	
Per il Chirurgo	Migliore visione dei dettagli anatomici e dei piani di dissezione Maggiore precisione chirurgica
Per il Paziente	Ridotto dolore post operatorio Rapida mobilizzazione ed alimentazione Ridotta ospedalizzazione Rapido recupero delle normali attività Migliore risultato estetico

Tabella I. Sintesi dei vantaggi della tecnica laparoscopica rispetto alle tradizionali tecniche open.

Rene	Nefrectomia semplice Nefrectomia radicale Nefrectomia parziale
Surrene	Surrectomia Surrenectomia parziale
Vescica	Cistectomia radicale Cistoplastica Diverticulectomia
Prostata	Prostatectomia radicale Adenomectomia
Via escrettrice	Pieloplastica Pielolitomia Reimpianto ureterale Nefroureterectomia

Tabella II. Principali interventi in ambito urologico eseguiti con tecnica laparoscopica.

e in alcuni casi la laparoscopia ha rimpiazzato il tradizionale approccio “incisionale” mentre in altri il suo ruolo è ancora controverso.

Surrenectomia

Gli autori concordano sul fatto che la surrenectomia laparoscopica (o retroperitoneoscopica, ovvero eseguita con gli stessi criteri della laparoscopia tradizionale – insufflazione di CO² e uso delle porte laparoscopiche – ma eseguita espandendo lo spazio retroperitoneale, senza violare il peritoneo) sia il gold standard per il trattamento delle lesioni surrenali che benigne, indipendentemente dal tipo di lesione e dalle dimensioni^(33,54). Assai più controverso è il ruolo della laparoscopia nel trattamento del carcinoma cortico surrenalico (ACC). In un precedente lavoro, sulla base di una analisi retrospettiva della nostra casistica, avevamo concluso che la laparoscopia è una tecnica fattibile e sicura nel trattamento delle lesioni maligne (primitive e secondarie) del surrene⁽³⁶⁾. Più recentemente abbiamo pubblicato un lavoro retrospettivo dimostrando la sovrapponibilità dei risultati oncologici fra chirurgia open e laparoscopica⁽³⁴⁾.

Nefrectomia

Anche in questo caso gli Autori concordano sul fatto che la nefrectomia semplice (ovvero eseguita per cause non oncologiche) laparoscopica è l'intervento di scelta rispetto all'intervento open⁽⁵⁶⁾. Più articolato è il giudizio relativo alla nefrectomia radicale anche se diverse pubblicazioni hanno confermato che l'intervento laparoscopico può essere condotto in modo da riprodurre fedelmente l'approccio open, compresa la legatura precoce dell'arteria renale^(39,25). La maggior parte dei lavori disponibili in letteratura conferma che i due approcci hanno eguale efficacia oncologica, ma la laparoscopia è caratterizzata da minore morbidità e rapido recupero delle normali attività⁽⁶⁾. La chirurgia open conserva un ruolo fondamentale in caso di lesioni estremamente voluminose (in genere >12-15cm) per cui l'handling laparoscopico è complesso; in caso di infiltrazione dei tessuti adiacenti, meglio controllabile in chirurgia open rispetto alla laparoscopia, e in caso di trombosi vascolare.

Nefrectomia parziale (NP)

Fino all'inizio degli anni '90 la nefrectomia parziale (open) era riservata solo a tumori piccoli (<4 cm) ed in pazienti monorene in cui la nefrectomia

avrebbe significato trattamento dialitico “quoad vitam”. Successivamente diversi studi hanno evidenziato che la percentuale di sopravvivenza nei pazienti sottoposti a NP per lesioni neoplastiche <4 cm era del tutto sovrapponibile a quella dei pazienti sottoposti a nefrectomia radicale per lesioni analoghe e ciò ha dato un grande impulso alla chirurgia conservativa del rene⁽⁸⁾. Successivamente alcuni Autori hanno dimostrato l’efficacia di tale approccio anche per lesioni tra 4 e 7 cm⁽⁵⁹⁾, tant’è che la NP è diventata il gold standard per questo tipo di lesioni. L’ingresso della laparoscopia ha contribuito a rinnovare l’interesse per la chirurgia conservativa del rene. Le principali critiche rivolte alla nefrectomia parziale laparoscopica sono due: la maggiore percentuale di complicanze ed il più elevato tempo di ischemia calda (WIT) (ovvero il tempo necessario alla resezione del tumore ed alla sutura del parenchima, eseguiti ad arteria renale temporaneamente clampata) rispetto alla chirurgia open. Tuttavia, con il miglioramento delle tecniche chirurgiche e il completamento della curva di apprendimento dei chirurghi in Centri di riferimento, le percentuali di complicanze sono crollate e si sono attestate a livelli paragonabili a quelli della chirurgia open, ovvero intorno al 10-15%⁽⁴¹⁾. Allo stesso modo, alcuni Autori hanno sottolineato come, impiegando tecniche innovative come l’“early unclamping”, sia possibile ridurre il WIT fino a valori sovrapponibili alla chirurgia open, ovvero intorno ai 12-15’⁽⁴²⁾. In questo ambito alcuni Autori hanno focalizzato l’attenzione circa la soglia di WIT oltre il quale si osserva un danno renale irreversibile, identificando livelli soglia variabili fra 20 e 30’^(37,3).

Ulteriori contributi sono stati forniti nella validazione della NP laparoscopica per lesioni voluminose (fra 4 e 7 cm), ed alcuni autori hanno concluso che questo approccio, pur se tecnicamente complesso, è sicuro ed efficace anche nel caso di lesioni voluminose^(35,52).

Cistectomia radicale

Fra tutti i principali interventi urologici, la cistectomia radicale laparoscopica è quello che ha meno entusiasmato i laparoscopisti. Il principale motivo è che anche in questo caso in genere la tecnica è mista ovvero la fase demolitiva è laparoscopica ma la fase ricostruttiva (uretero-ilecutaneo stomia o neovescica orto topica) è chirurgica open. Ciò implica un accesso laparotomico che vanifica buona parte dei vantaggi della laparoscopia⁽⁶⁰⁾. Dal canto nostro in un lavoro pubblicato nel 2007 in cui abbiamo confrontato la tecnica open e la tecnica combinata, abbiamo dimostrato che l’unico vantaggio della tecnica combinata è rappresentato dalle minori perdite ematiche⁽³⁸⁾. Per questi e per

altri motivi la cistectomia radicale laparoscopica è a tutt'oggi considerata una tecnica "sperimentale" e ancora in corso di validazione da parte della comunità scientifica.

Prostatectomia radicale

La prostatectomia laparoscopica ha avuto ampio sviluppo a partire dalla sua introduzione, in particolare dopo la standardizzazione della tecnica grazie ai chirurghi francesi negli anni '90⁽¹⁶⁾. Inoltre, accanto alla tradizionale tecnica transperitoneale si è affiancata anche la tecnica extraperitoneale che ha abbattuto la percentuale di complicanze intestinali della procedura e ha snellito i tempi della procedura stessa⁽⁴⁰⁾. In breve, sebbene diverse metanalisi non abbiano evidenziato un chiaro miglioramento dei parametri oncologici e funzionali (percentuali di potenza sessuale e continenza ad un anno dall'intervento) nei pazienti trattati mediante laparoscopia⁽¹¹⁾, è indubitabile che questa tecnica è caratterizzata da minore invasività, minore morbidità, minori perdite ematiche con relativo abbattimento delle percentuali di trasfusione perioperatorie e più rapida ripresa delle abituali attività dei pazienti.

Oggi, a livello mondiale, buona parte delle prostatectomie laparoscopiche è eseguita mediante l'assistenza del sistema robotico (cfr. capitolo dedicato).

Pieloplastica

La laparoscopia trova applicazione elettiva negli interventi ricostruttivi. Ne è tipico esempio la pieloplastica. Attraverso 3-4 piccole incisioni è possibile duplicare perfettamente la tecnica chirurgica open proposta da Anderson Hynes senza ricorrere alla tradizionale lombotomia con risultati funzionali eccellenti (dal 92 al 96% a seconda delle casistiche) del tutto sovrapponibili a quelli della chirurgia tradizionale⁽⁵⁷⁾ e significativamente superiori a quelli ottenuti mediante metodiche endoscopiche pure (incisione laser, Acucise) o percutanee (pielotomia anterograda a freddo).

Complicanze

Spesso si "accusa" la laparoscopia di essere gravata da una percentuale di complicanze elevata, non giustificata da un ragionevole bilancio costi/benefici. In realtà queste percentuali, in centri di riferimento, sono per lo meno paragonabili a quelle della chirurgia open. Per quanto riguarda il nostro centro,

abbiamo recentemente rivisto le nostre complicanze su oltre 1000 procedure e abbiamo presentato questa esperienza in occasione del Congresso della Società Americana di Urologia (AUA) nel 2008, riportando una percentuale complessiva (qualsiasi grado) di complicanze che si attesta intorno al 17% (Tabella III).

PROCEDURES	cases	# of comp.	comp. rate
Radical Prostatectomy	330	115	35,2%
Partial Nephrectomy	106	24	23,6%
Radical Cystectomy	34	8	23,5%
Nephroureterectomy	29	5	17,2%
Pyeloplasty	71	9	12,6%
Simple Prostatectomy (Millin)	52	5	9,6%
Bladder Diverticulectomy	31	3	9,6%
Adrenalectomy	201	12	5,9%
Radical Nephrectomy	143	8	5,6%
Others	136	6	4,4%
Overall complication rate: 17,2% (195/1133) G1-3 complications: 150 G3-5 complications: 45			

Tabella III. Studio presentato al Congresso della Società Americana di Urologia (AUA) relativo alle complicanze su 1133 interventi dal 2001 al 2007 presso la SCDU Urologia dell'AOU San Luigi Gonzaga-Orbassano. Si tratta per la maggior parte complicanze grado I e II di Clavien, ovvero risolte senza necessità di re-intervento. [comp=complication].

“OLTRE” LA LAPAROSCOPIA

Mini laparoscopia

La disponibilità di strumenti laparoscopici di piccolo calibro (fino a due mm) e lo sviluppo di laparoscopi delle medesime dimensioni ha reso possibile l'introduzione di tecniche dette mini laparoscopiche (mL), ovvero eseguite con strumenti dal diametro massimo di 3 mm o “needlescopiche”, con strumenti fino a 2mm. Inizialmente questo tipo di procedura era riservata a scopi diagnostici, successivamente l'ulteriore sviluppo della strumentazione ha permesso l'esecuzione di procedure operative. La mL è a tutti gli effetti una laparoscopia e non richiede, a differenza della LESS (vedere capitolo dedicato) né strumenti articolati né tecniche dedicate. In sintesi la mL rappresenta l'evoluzione verso la chirurgia virtualmente “scarless” della laparoscopia tradizionale: gli interventi sono condotti attraverso mini incisioni di 4-5 mm e in questo sta la forza della procedura, in quanto il trauma sulla parete addominale e le complicanze della ferita sono minime^(12,22,55) Le incisioni cutanee non richiedono suture poichè è sufficiente l'applicazione di cerotti tipo Steryl strips® e la cicatrice è praticamente invisibile. Il nostro gruppo ha condotto una indagine comparativa (dati non pubblicati) fra i pazienti sottoposti a mL e laparoscopia tradizionale dimostrando che il risultato estetico della mL è apprezzato in modo significativamente maggiore dai pazienti (Figura 2, Tabella IV). Molti sono gli



Figura 2. Esiti di pieloplastica mini laparoscopica sinistra in giovane paziente di sesso femminile. Si noti come le cicatrici cutanee siano appena percepibili.

SCAR ASSESSMENT QUESTIONNAIRE

Overall score (min: 34; max: 136)

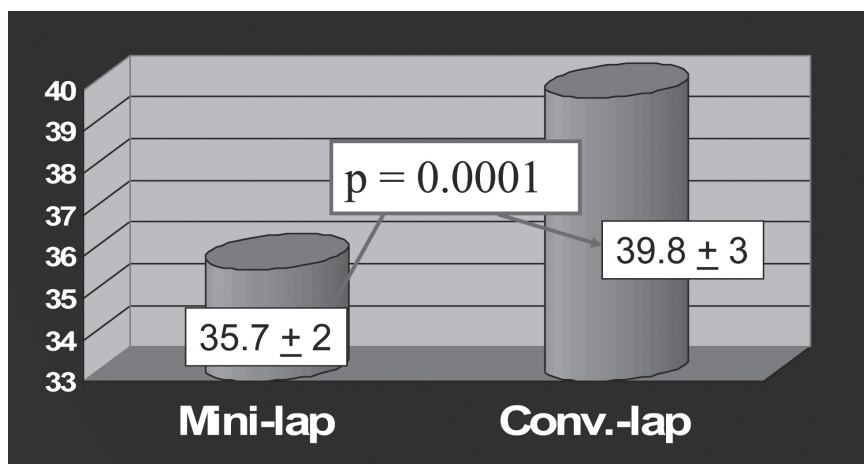


Tabella IV. Risultati dello “Scar assessment questionnaire” (<http://links.lww.com/A1041>) somministrato a due gruppi di pazienti sottoposti ad intervento laparoscopico: gruppo “mini lap”: (23 pazienti) sottoposti ad intervento con tecnica minilaparoscopica, gruppo “conventional lap”: (23 pazienti) trattati mediante laparoscopia standard. I pazienti sono stati “appaiaati” per tipo di intervento, età e sesso. La differenza in termini di score è risultata statisticamente significativa in favore dei pazienti del gruppo “mini lap” (cicatrice meglio “accettata” in tale gruppo).

interventi eseguiti con questa tecnica fra i principali ricordiamo la nefrectomia, l’orchidopessi, la pieloplastica il reimpianto ureterale^(9,13,53,55), ma l’intervento che meglio si presta alla mL è la surrenectomia⁽¹⁴⁾. Ovviamente l’intervento va riservato a pazienti non obesi e con anamnesi negativa per interventi chirurgici addominali, mentre l’equipe operatoria deve avere una adeguata esperienza laparoscopica⁽⁵⁵⁾.

LESS

La LESS (Laparo-Endoscopic Single-site Surgery) rappresenta l’“esasperazione” del concetto di mini invasività. L’accesso viene eseguito posizionando una sola porta (“single port”), dal diametro di 2.5 cm circa in grado di accogliere al suo interno l’ottica ed altri due strumenti operatori (Figura 3). Questa porta è introdotta a livello dell’ombelico e l’intero intervento è condotto mediante mini strumenti introdotti attraverso questa porta⁽²⁴⁾. Mediante LESS sono stati eseguiti diversi interventi come surrenectomia,



Figura 3. Uno dei dispositivi single port per chirurgia LESS disponibile in commercio. Si notino gli accessi per gli strumenti e la valvola per l'insufflazione.

nefrectomia, e recentemente, prostatectomia^(10,24). In linea generale il vantaggio è che il paziente presenta una sola mini incisione in luogo delle tre o quattro necessarie con la tecnica laparoscopica tradizionale. Lo svantaggio principale è determinato dalla cosiddetta “perdita di triangolazione” e dalla conseguente necessità di usare strumenti dedicati, articolati (ovvero con estremità flessibile) e laparoscopi flessibili⁽²⁴⁾. Ciò provoca inevitabilmente una lunga curva di apprendimento e soprattutto una dilatazione dei tempi operatori che limitano i vantaggi per il paziente⁽²⁹⁾. Per questi motivi il rapporto costo-beneficio della tecnica non è ancora chiaro e questa tecnica è ancora in fase di validazione.

NOTES

Una delle più recenti ed interessanti innovazioni nel campo della mini invasività è rappresentato dalla NOTES (Natural Orifice Transluminal Endoscopic Surgery) una modalità chirurgica che sfrutta gli organi cavi (vagina, tratto gastrointestinale) per accedere alla cavità peritoneale, evitando incisioni cutanee^(5,58). Il primo report di questa tecnica è stato pubblicato nel 2004 su modello animale, la prima appendicectomia transgastrica nell'uomo è stata riportata nel 2006 negli USA, successivamente nell'ambito del progetto “Anubi”, è stata riportata la prima colecistectomia interamente trans-vaginale⁽⁵⁸⁾. Questa tecnica consente ulteriori vantaggi rispetto alle altre tecniche mini invasive come assenza di incisioni cutanee, eccellenti risultati

estetici, ridotto dolore post operatorio e rapido recupero delle normali attività. Tuttavia la NOTES pura non è fattibile quando vi è la necessità di dissezione di organi voluminosi (ad esempio il rene) e di legare i grossi vasi (si pensi al penducolo renale). È nato così un approccio “ibrido” ovvero l'utilizzo di un orifizio naturale (in urologia, la vagina) come porta di accesso alla cavità peritoneale e come tramite per l'estrazione del pezzo operatorio contestuale al posizionamento di due o tre porte laparoscopiche ausiliare.⁽⁵⁰⁾ Questo approccio permette di superare le limitazioni tipiche della NOTES pura e di mantenere i vantaggi della mini invasività della procedura, pagando un piccolo “prezzo” determinato dall'uso delle porte addominali. Recentemente Alcaratz ha riportato una serie di 14 casi di nefrectomie radicali NOTES ibride con l'impiego di due porte addominali, concludendo che questa tecnica è riproducibile sicura ed efficace nel trattamento delle donne con neoplasia renale⁽¹⁾. Il nostro gruppo, compiendo un ulteriore passo verso la chirurgia scarless, ha proposto la nefrectomia mini laparoscopica NOTES assistita, ovvero l'intervento che prevede il posizionamento di tre porte da 3mm a livello della parete addominale ed una porta da 12 mm a livello vaginale. L'estrazione del pezzo operatorio avviene attraverso il fornice vaginale posteriore che viene successivamente suturato. Il risultato estetico, (mostrato in Figura 4) è eccellente.



Figura 4. Esiti di nefrectomia mini laparoscopica NOTES assistita sinistra in paziente di sesso femminile. Si noti come le cicatrici chirurgiche siano appena percepibili.

Chirurgia robotica

A partire dal 1998, anno della sua commercializzazione, il sistema robotico da Vinci® (Intuitive Surgical Inc, USA) è entrato prepotentemente nel panorama della chirurgia mini-invasiva. Questo sistema è principalmente costituito dai seguenti componenti:

- console chirurgo che integra un sistema di visione stereo 3D e i due manipolatori detti “master” ad uso del chirurgo;
- carrello chirurgico provvisto del braccio porta-ottica e di tre bracci (due nelle versioni precedenti) porta-strumenti fissati su una colonna che eseguono i comandi del chirurgo;
- strumentazione Endowrist® che comprende una gamma completa di strumenti a supporto del chirurgo e delle procedure disponibili.
- sistema di visualizzazione (InSite®Vision), con endoscopi 3D ad alta risoluzione e processori di immagine che forniscono una reale immagine tridimensionale del campo operatorio. La figura 5 mostra il sistema robotico allestito presso la nostra Divisione.



Figura 5. Sistema robotico Da Vinci ® allestito presso le camere operatorie della AOU San Luigi. Il primo operatore (a sinistra) non è sterile e lavora alla console del sistema. Il primo aiuto lavora al fianco del paziente. Si notino il monitor ed i bracci robotici.

Il sistema consente di articolare in modo continuo tutti i movimenti della mano dell'operatore e mette a disposizione del chirurgo una visione tridimensionale grazie all'utilizzo di un video-endoscopio a due canali ottici e doppia telecamera a 3CCD.

La posizione della consolle che il chirurgo utilizza per operare è al di fuori del campo sterile, il chirurgo appoggia gli avambracci sulla consolle, inserisce la testa in un apposito vano, appoggiando la fronte e direzionando lo sguardo nei due oculari posti al centro del vano stesso. Infila quindi le dita delle mani in appositi strumenti il cui modulo di controllo trasforma il segnale da meccanico in elettrico e lo trasmette tramite appositi attuatori ai bracci meccanici.

In urologia il robot *Da Vinci* viene attualmente impiegato per eseguire numerosi interventi tra cui la pieloplastica, la nefrectomia da donatore, la surrenectomia, la cistectomia radicale, il reimpianto ureterale, la sacrocolpopessi e, più recentemente, la nefrectomia parziale. È indubbio tuttavia che l'intervento robotico "principe" sia la prostatectomia radicale (RALP) soprattutto quando vi è l'indicazione a risparmiare i nervi deputati al mantenimento dell'erezione. Nel corso degli anni, infatti, gli interventi eseguiti mediante tecnica robot-assistita sono diventati sempre più numerosi: negli USA ad esempio, nel 2009 sono state eseguite 86.000 prostatectomie e 75.000 (87%) di queste sono state eseguite con metodica robotica. L'incremento dell'utilizzo del robot per la prostatectomia radicale robotica è giustificato dal fatto che i pazienti, secondo alcuni studi di Letteratura, presentano un mantenimento della potenza sessuale pari a 90% (in caso di procedura nerve-sparing) ed un recupero precoce della continenza urinaria in circa 80% dei casi dopo l'intervento, senza compromissione dei risultati oncologici e con significativa riduzione della morbidità (sanguinamento, stenosi anastomosi vescico-uretrale etc).

Nonostante questo entusiasmo, occorre ricordare che non si hanno ancora risultati oncologici a lungo termine per questa tecnica, che l'intervento richiede una curva di apprendimento non trascurabile e, soprattutto, che questa tecnologia è estremamente onerosa in termini economici^(11,28).

CONCLUSIONI

Grazie all'introduzione di strumenti, fonti energetiche e tecniche sempre più volte al garantire il massimo risultato con la minima invasività, l'urologia è stata completamente rivoluzionata negli ultimi anni ed oggi la quasi totalità dei pazienti urologici può essere curata in modo mini invasivo.

L'endoscopia e la laparoscopia rappresentano non soltanto il presente della chirurgia urologica ma soprattutto, grazie ai continui miglioramenti tecnologici e grazie agli sforzi degli urologi che si dedicano allo sviluppo delle tecniche, rappresentano ***il futuro*** di questa disciplina.

BIBLIOGRAFIA

1. Alcaraz A, Peri L, Molina A, Goicoechea I, García E, Izquierdo L, Ribal MJ: *Feasibility of transvaginal NOTES-assisted laparoscopic nephrectomy*. Eur. Urol. 2010; 57: 233-237.
2. Bader MJ, Sroka R, Gratzke C, Seitz M, Weidlich P, Staehler M, Becker A, Stief CG, Reich O: *Laser therapy for upper urinary tract transitional cell carcinoma: indications and management*. Eur. Urol. 2009; 56: 65-71.
3. Becker F, Van Poppel H, Hakenberg OW, Stief C, Gill I, Guazzoni G, Montorsi F, Russo P, Stöckle M: *Assessing the impact of ischaemia time during partial nephrectomy*. Eur Urol. 2009; 56: 625-634.
4. Bhansali M, Patankar S, Dobhada S, Khaladkar S: *Management of large (>60 g) prostate gland: PlasmaKinetic Superpulse (bipolar) versus conventional (monopolar) transurethral resection of the prostate*. J. Endourol. 2009; 23: 141-145.
5. Box G, Averch T, Cadeddu J: *Nomenclature of natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES) and laparoendoscopic single-site surgery (LESS) procedures in urology*. J. Endourol. 2008; 22: 2575-2581.
6. Breda A, Finelli A, Janetschek G, Porpiglia F, Montorsi F: *Complications of laparoscopic surgery for renal masses: prevention, management, and comparison with the open experience*. Eur. Urol. 2009; 55: 836-850.
7. Buscarini M, Conlin M: *Update on flexible ureteroscopy*. Urol. Int. 2008; 80: 1-7.
8. Butler BP, Novick AC, Miller DP, Campbell SA, Licht MR: *Management of small unilateral renal cell carcinomas: radical versus nephron-sparing surgery*. Urology. 1995; 45: 34-40.
9. Chueh SC, Liao CH, Wang SM, Hsieh MH, Lai MK, Chen J: *Clipless needlescopic bilateral varix ligation*. J Androl. 2005; 26: 93-97.
10. Desai MM, Berger AK, Brandina R, Aron M, Irwin BH, Canes D, Desai MR, Rao PP, Sotelo R, Stein R, Gill IS: *Laparoendoscopic single-site surgery: initial hundred patients*. Urology. 2009; 74: 805-812.

11. Ficarra V, Novara G, Artibani W, Cestari A, Galfano A, Graefen M, Guazzoni G, Guillonneau B, Menon M, Montorsi F, Patel V, Rassweiler J, Van Poppel H: *Retropubic, laparoscopic, and robot-assisted radical prostatectomy: a systematic review and cumulative analysis of comparative studies*. Eur. Urol. 2009; 55: 1037-1063.
12. Gill IS: *Needlescopic urology: current status*. Urol. Clin. North. Am. 2001; 28: 71-83.
13. Gill IS, Ross JH, Sung GT, Kay R: *Needlescopic surgery for cryptorchidism: the initial series*. J Pediatr. Surg. 2000; 35: 1426-1430.
14. Gill IS, Soble JJ, Sung GT, Winfield HN, Bravo EL, Novick AC: *Needlescopic adrenalectomy-the initial series: comparison with conventional laparoscopic adrenalectomy*. Urology. 1998; 52: 180-6.
15. Goodwin WE, Casey WC, Woolf W: *Percutaneous trocar (needle) nephrostomy in hydronephrosis*. J. Am. Med. Assoc. 1955; 157: 891-894.
16. Guillonneau B, Cathelineau X, Barret E, Rozet F, Vallancien G: *Laparoscopic radical prostatectomy: technical and early oncological assessment of 40 operations*. Eur. Urol. 1999; 36: 14-20.
17. Ho HS, Cheng CW: *Bipolar transurethral resection of prostate: a new reference standard?* Curr. Opin. Urol. 2008; 18: 50-55.
18. Ho HS, Yip SK, Lim KB: *A prospective randomized study comparing monopolar and bipolar transurethral resection of prostate using transurethral resection in saline (TURIS) system*. Eur. Urol. 2007; 52: 517-522.
19. Holden T, Pedro RN, Hendlin K, Durfee W, Monga M: *Evidence-based instrumentation for flexible ureteroscopy: a review*. J. Endourol. 2008; 22: 1423-1426.
20. Ibarluzea G, Scoffone CM, Cracco CM, Poggio M, Porpiglia F, Terrone C, Astobieta A, Camargo I, Gamarra M, Tempia A, Valdivia Uria JG, Scarpa RM: *Supine Valdivia and modified lithotomy position for simultaneous antegrade and retrograde endourological access*. BJU Int. 2007; 100: 233-236.
21. Issa MM: *Technological advances in transurethral resection of the prostate: bipolar versus monopolar TURP*. J. Endourol. 2008; 22: 1587-1595.
22. Lee BR, Kavoussi LR, Goh PM: *Needlescopic surgery*. Urology. 1999; 53: 1071.
23. Liao JC, Breda A, Schulam PG: *Laparoscopic renal surgery for benign disease*. Curr. Urol. Rep. 2007; 8: 12-18.
24. Liatsikos E, Kallidonis P, Kyriazis I, Al-Aown A, Stolzenburg JU: *Urologic laparoendoscopic single-site surgery*. Nat. Rev. Urol. 2009; 6: 654-659.
25. Ljungberg B, Hanbury DC, Kuczyk MA, Merseburger AS, Mulders PF, Patard JJ, Sinescu IC: *Renal cell carcinoma guideline*. Eur. Urol. 2007; 51: 1502-1510.
26. Lourenco T, Shaw M, Fraser C, MacLennan G, N'Dow J, Pickard R: *The clinical effectiveness of transurethral incision of the prostate: a systematic review of randomised controlled trials*. World J. Urol. 2010; 28: 23-32.
27. Montorsi F, Naspro R, Salonia A, Suardi N, Briganti A, Zanoni M, Valenti S, Vavassori I, Rigatti P: *Holmium laser enucleation versus transurethral resection of the prostate: results from a 2-center prospective randomized trial in patients with obstructive benign prostatic hyperplasia*. J. Urol. 2008; 179: S87-890.

28. Murphy DG, Bjartell A, Ficarra V, Graefen M, Haese A, Montironi R, Montorsi F, Moul JW, Novara G, Sauter G, Sulser T, van der Poel H: *Downsides of Robot-assisted Laparoscopic Radical Prostatectomy: Limitations and Complications*. Eur. Urol. 2009; (Epub ahead of print).
29. Müller EM, Cavazzola LT, Machado Grossi JV, Mariano MB, Morales C, Brun M: *Training for laparoendoscopic single-site surgery (LESS)*. Int. J. Surg. 2010; 8: 64-68.
30. Naspro R, Suardi N, Salonia A, Scattoni V, Guazzoni G, Colombo R, Cestari A, Briganti A, Mazzoccoli B, Rigatti P, Montorsi F: *Holmium laser enucleation of the prostate versus open prostatectomy for prostates >70 g: 24-month follow-up*. Eur. Urol. 2006; 50: 563-568.
31. O'Sullivan DC, Chilton CP: *Flexible cystoscopy*. Br. J. Hosp. Med. 1994; 51: 340-345.
32. Pillai PL, Sooriakumaran P: *Flexible cystoscopy: a revolution in urological practice*. Br. J. Hosp. Med. 2009; 70: 583-585.
33. Porpiglia F, Destefanis P, Fiori C, Giraudo G, Garrone C, Scarpa RM, Fontana D, Morino M: *Does adrenal mass size really affect safety and effectiveness of laparoscopic adrenalectomy?* Urology. 2002; 60: 801-805.
34. Porpiglia F, Fiori C, Daffara F, Zaggia B, Bollito E, Volante M, Berruti A, Terzolo M: *Retrospective Evaluation of the Outcome of Open Versus Laparoscopic Adrenalectomy for Stage I and II Adrenocortical Cancer*. Eur. Urol. 2010; (Epub ahead of print).
35. Porpiglia F, Fiori C, Piechaud T, Gaston R, Guazzoni G, Pansadoro V, Bachmann A, Janetschek G: *Laparoscopic partial nephrectomy for large renal masses: results of a European survey*. World J Urol. 2010 Mar; (Epub ahead of print).
36. Porpiglia F, Fiori C, Tarabuzzi R, Giraudo G, Garrone C, Morino M, Fontana D, Scarpa RM: *Is laparoscopic adrenalectomy feasible for adrenocortical carcinoma or metastasis?* BJU Int. 2004; 94: 1026-1029.
37. Porpiglia F, Renard J, Billia M, Musso F, Volpe A, Burruni R, Terrone C, Colla L, Piccoli G, Podio V, Scarpa RM: *Is renal warm ischemia over 30 minutes during laparoscopic partial nephrectomy possible? One-year results of a prospective study*. Eur. Urol. 2007; 52: 1170-1178.
38. Porpiglia F, Renard J, Billia M, Scoffone C, Cracco C, Terrone C, Scarpa RM: *Open versus laparoscopy-assisted radical cystectomy: results of a prospective study*. J. Endourol. 2007; 21: 325-329.
39. Porpiglia F, Terrone C, Cracco C, Cossu M, Grande S, Musso F, Renard J, Scarpa RM: *Early ligation of renal artery during radical laparoscopic transperitoneal nephrectomy: description of standard technique and direct access*. J Endourol. 2005; 19: 623-626.
40. Porpiglia F, Terrone C, Tarabuzzi R, Billia M, Grande S, Musso F, Burruni R, Renard J, Scarpa RM: *Transperitoneal versus extraperitoneal laparoscopic radical prostatectomy: experience of a single center*. Urology. 2006; 68: 376-380.
41. Porpiglia F, Volpe A, Billia M, Renard J, Scarpa RM: *Assessment of risk factors for complications of laparoscopic partial nephrectomy*. Eur. Urol. 2008; 53: 590-596.
42. Porpiglia F, Volpe A, Billia M, Scarpa RM: *Laparoscopic versus open partial nephrectomy: analysis of the current literature*. Eur. Urol. 2008; 53: 732-742.
43. Preminger GM, Tiselius HG, Assimos DG, Alken P, Buck C, Gallucci M, Knoll T, Lingeman JE, Nakada SY, Pearle MS, Sarica K, Türk C, Wolf JS Jr: *2007 guideline for the management of ureteral calculi*. J. Urol. 2007; 178: 2418-2434.

44. Puppo P, Bertolotto F, Introini C, Germinale F, Timossi L, Naselli A: *Bipolar transurethral resection in saline (TURis): outcome and complication rates after the first 1000 cases*. J. Endourol. 2009; 23: 1145-1149.
45. Rassweiler J, Schulze M, Stock C: *Bipolar transurethral resection of the prostate: technical modifications and early clinical experience*. Minim. Invasive Ther. Allied Technol. 2007; 16: 11-21.
46. Rassweiler J, Teber D, Kuntz R, Hofmann R: *Complications of transurethral resection of the prostate (TURP): incidence, management, and prevention*. Eur. Urol. 2006; 50: 969-979.
47. Singh H, Desai MR, Shrivastav P: *Bipolar versus monopolar transurethral resection of prostate: randomized controlled study*. J. Endourol. 2005; 9: 333-338.
48. Smith RD, Patel A: *Impact of flexible ureterorenoscopy in current management of nephrolithiasis*. Curr. Opin. Urol. 2007; 17: 114-119.
49. Scoffone CM, Cracco CM, Cossu M, Grande S, Poggio M, Scarpa RM: *Endoscopic combined intrarenal surgery in Galdakao-modified supine Valdivia position: a new standard for percutaneous nephrolithotomy?* Eur. Urol. 2008; 54: 1393-1403.
50. Shih SP, Kantsevov SV, Kalloo AN: *Hybrid minimally invasive surgery – a bridge between laparoscopic and transluminal surgery*. Surg. Endosc. 2007; 21: 1450-1453.
51. Skolarikos AA, Papatsoris AG, Mitsogiannis IC, Chatzidarellis L, Liakouras C, Deliveliotis C: *Current status of ureteroscopic treatment for urolithiasis*. Int. J. Urol. 2009; 16: 713-717.
52. Simmons MN, Chung BI, Gill IS: *Perioperative efficacy of laparoscopic partial nephrectomy for tumors larger than 4 cm*. Eur. Urol. 2009; 55: 199-207.
53. Simmons MN, Gill IS, Fergany AF, Kaouk JH, Desai MM: *Technical modifications to laparoscopic Boari flap*. Urology. 2007; 69: 175-180.
54. Smith CD, Weber CJ, Amerson JR: *Laparoscopic adrenalectomy: new gold standard*. World J. Surg. 1999; 23: 389-396.
55. Soble JJ, Gill IS: *Needlescopic urology: incorporating 2-mm instruments in laparoscopic surgery*. Urology. 1998; 52: 187-194.
56. Sountoulides PG, Kaufmann OG, Kaplan AG, Louie MK, McDougall EM, Clayman RV: *Laparoscopic renal surgery*. Minerva Chir. 2009; 64: 373-394.
57. Stein RJ, Gill IS, Desai MM: *Comparison of surgical approaches to ureteropelvic junction obstruction: endopyeloplasty versus endopyelotomy versus laparoscopic pyeloplasty*. Curr. Urol. Rep. 2007; 8: 140-149.
58. Swain P: *Nephrectomy and natural orifice transluminal endoscopy (NOTES): transvaginal, transgastric, transrectal, and transvesical approaches*. J. Endourol. 2008; 22: 811-818.
59. Thompson RH, Siddiqui S, Lohse CM, Leibovich BC, Russo P, Blute ML: *Partial versus radical nephrectomy for 4 to 7 cm renal cortical tumors*. J. Urol. 2009; 182: 2601-2606.
60. Ukimura O, Moizadeh A, Gill IS: *Laparoscopic radical cystectomy and urinary diversion*. Curr. Urol. Rep. 2005; 6: 118-121.
61. Valdivia Uría JG, Lachares Santamaría E, Villarroja Rodríguez S, Taberner Llop J, Abril Baquero G, Aranda Lassa JM: *Percutaneous nephrolithectomy: simplified technic (preliminary report)*. Arch. Esp. Urol. 1987; 40: 177-180.

RIBOSOMI E MALATTIE

Irma Dianzani¹, Anna Aspesi¹, Ugo Ramenghi²

¹ Dipartimento di Scienze Mediche - Università degli Studi del Piemonte Orientale

² Dipartimento di Scienze Pediatriche - Università degli Studi di Torino

Key words: *Ribosomes / Ribosomi*
 Bone marrow failure syndromes / Aplasie midollari ereditarie
 Diamond-Blackfan Anemia / Anemia di Diamond-Blackfan

Abstract:

Ribosomopathies are diseases due to defects in ribosome biogenesis. Diamond-Blackfan Anemia (DBA) is the first disease ever described in Vertebrates due to a defect in a ribosomal protein (RP). Patients with DBA carry mutations in one of nine different RPs, that are part of either the large or the small ribosomal subunit. The disease is characterised by defective erythropoiesis. About 30% of patients show several types of malformation. Inheritance is autosomal dominant, but many patients show *de novo* mutations. Fifty-per-cent of patients respond to steroid therapy, the others are subjected to transfusions with iron chelation. Hemopoietic stem cell transplantation is an option for patients with a compatible donor. The specificity of the clinical phenotype has not been clarified yet. It is hypothesized that the defect in the expression of an RP causes a reduction in the number of ribosomes and in protein synthesis efficiency. Tissues with a high turn-over may be particularly sensitive to this defect. The defective ribosome biogenesis may induce apoptosis of erythroid progenitors, at least in part through activation of p53-dependent pathways. The absence of an appropriate animal model has impaired both the definition of the pathogenetic mechanisms and the development of alternative treatment.

Riassunto:

Le ribosomopatie sono dovute a difetti della biogenesi dei ribosomi. La prima patologia ascrivita a difetto dei ribosomi nei Vertebrati è l'Anemia di Diamond-Blackfan (DBA). La DBA è dovuta a mutazioni inattivanti nei geni che codificano per proteine ribosomiali (RP) ed è caratterizzata da aplasia eritroide e malformazioni nel 30% dei casi. Sono implicati almeno nove geni, che codificano per RP sia della subunità grande del ribosoma sia di quella piccola, e la trasmissione ereditaria è autosomica dominante, anche se molti pazienti presentano mutazioni *de novo*. Circa metà dei casi risponde alla

terapia steroidea, gli altri sono trattati con trasfusioni croniche e chelazione del ferro. Il trapianto di cellule staminali è risolutivo nei pazienti con donatore compatibile. La specificità delle manifestazioni cliniche è un problema non ancora chiarito. Si ipotizza che il difetto nell'espressione di una RP possa ridurre il numero dei ribosomi e l'efficienza della sintesi proteica. I tessuti caratterizzati da alta proliferazione, come il compartimento eritroide, sarebbero più sensibili. Si ritiene che il difetto di sintesi dei ribosomi, determinato dalla carenza di una RP, inneschi l'apoptosi dei progenitori eritroidi, in parte tramite l'attivazione di p53. Lo studio del meccanismo patogenetico è reso difficile dalla mancanza di un modello animale appropriato.

INTRODUZIONE

Sono state definite ribosomopatie alcune rare malattie ereditarie dovute a ridotta produzione dei ribosomi, gli organelli della cellula che hanno il compito di tradurre le informazioni presenti nel codice genetico e sintetizzare le proteine^(12,23). Curiosamente, nonostante la biogenesi dei ribosomi sia un processo essenziale per ogni tipo cellulare, queste malattie sono caratterizzate da difetto in specifiche funzioni dell'organismo (Tabella 1: malattie ribosomali). La maggior parte è caratterizzata da aplasia midollare, trilineare o selettiva, e da malformazioni.

Il nostro gruppo di ricerca si è proposto di studiare i meccanismi patogenetici alla base di una di queste malattie, l'Anemia di Diamond-Blackfan (DBA). La DBA (MIM 105650) rappresenta il prototipo delle ribosomopatie, in quanto è stata la prima malattia umana in cui è stato identificato un difetto ribosomiale^(16,14).

Sebbene rara, la DBA è stata sempre considerata una malattia interessante per gli ematologi in quanto rappresenta una forma di difetto isolato della produzione dei globuli rossi, i cui progenitori muoiono per apoptosi a livello del midollo osseo. I pazienti devono essere sottoposti a terapia trasfusionale cronica con chelazione del ferro⁽³²⁾. Presentano anche bassa statura e malformazioni a carico del cuore, della facies, del distretto urogenitale⁽³²⁾. È riportato, inoltre, un incremento del rischio di sviluppare leucemie e tumori solidi. Nel 1999 la notizia che la DBA fosse dovuta al difetto di una proteina strutturale della piccola subunità del ribosoma, RPS19, destò molto stupore negli addetti ai lavori, in quanto fino ad allora si era ipotizzato un ruolo patogenetico di fattori di crescita eritroidi o proteine coinvolte nelle loro vie di segnalazione^(14,11). Il fatto che il meccanismo patogenetico fosse proprio dovuto ad un difetto di componenti del ribosoma venne confermato negli anni successivi, quando si dimostrò la presenza di mutazioni inattivanti nei geni di altre RP in pazienti con DBA. Attualmente sono state identificate mutazioni in almeno nove geni che codificano per componenti del ribosoma (*RPS19*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL35A*, *RPS24*, *RPS17*, *RPS7*, *RPS10*, *RPS26*, Tabella 1)^(19,7,17,21,29,13,5). Il nostro gruppo ha creato un database che raccoglie informazioni su tutte le mutazioni riscontrate nei pazienti con DBA^(4,3). Questi geni descrivono circa il 50% dei casi di DBA. Il gene più frequentemente mutato è RPS19 (25% dei casi). Almeno la metà dei pazienti non ha una chiara causa molecolare. È possibile che una parte dei pazienti che all'analisi di sequenza sembrano non avere mutazioni siano, in realtà, portatori di delezioni dell'intero gene, come riscontrato per RPS19⁽²⁸⁾. Sono in atto studi volti a ricercare eventuali delezioni degli altri geni noti. Altri si propongono di sequenziare i geni di tutte

Malattia	Gene	Clinica	Ereditarietà	Coinvolgimento del ribosoma	Funzione alterata
DBA	<i>RPS19, RPS24, RPS26, RPS10, RPL5, RPL11, RPL35A, RPS17, RPS7</i>	Aplasia midollare eritroide, malformazioni	Autosomica dominante	Piccola o grande subunità	Biogenesi del ribosoma
SBDS	<i>SBDS</i>	Neutropenia, malformazioni, insufficienza pancreatica	Autosomica recessiva	Grande subunità	Maturazione grande subunità
DC	<i>DKC1</i>	Discheratosi, aplasia midollare trilineare	Legata a X	Grande e piccola subunità	Pseudo-Uridilazione rRNA, funzione telomerasica, splicing
CHH	<i>RMRP</i>	Aplasia midollare eritroide, bassa statura, malformazioni scheletriche	Autosomica recessiva	Grande subunità	Degradazione pre mRNA, processamento del pre rRNA
TCS	<i>TCOF1</i>	Malformazioni craniofacciali	Autosomica dominante	Grande e piccola subunità	Trascrizione pol-I, metilazione rRNA

Tabella 1. Ribosomopatie ereditarie.

le RP e di tutte le proteine coinvolte nella biogenesi del ribosoma alla ricerca di nuovi geni responsabili.

In ogni caso, la DBA viene ereditata con meccanismo autosomico dominante, ma la maggior parte dei casi è dovuta a mutazione *de novo*.

La diagnosi di DBA non è semplice, in quanto viene ottenuta per esclusione di altre malattie e sindromi simili. Non esiste un test biochimico specifico e per molti anni l'elevazione dell'attività della adenosina deaminasi eritrocitaria è stato il principale parametro utilizzato per indirizzare la diagnosi⁽³²⁾. L'identificazione di una parte dei geni responsabili ha permesso la diagnosi molecolare, che è divenuta molto importante per la conferma diagnostica⁽³²⁾.

La DBA è usualmente classificata tra le aplasie midollari ereditarie. Tra queste quelle che condividono con la DBA l'eritroblastopenia sono la Anemia di Fanconi, la sindrome di Shwachman-Diamond (SD), l'ipoplasia cartilagine-capillizio (cartilage-hair hypoplasia syndrome-CHH) e la discheratori congenita (DC). È interessante osservare che la patogenesi sia della SD sia della CHH e almeno in parte quella della DC è stata ricondotta a un difetto della biogenesi ribosomale. Ciò fa ipotizzare un meccanismo patogenetico simile⁽²³⁾.

L'interesse per il ruolo dei ribosomi nell'eritropoiesi è stato rilanciato dalla scoperta che il difetto eritropoietico presentato da una mielodisplasia dell'adulto, la sindrome 5q-, è dovuta alla delezione del gene che codifica la proteina ribosomiale RPS14⁽¹⁵⁾. Questa osservazione fa supporre che alla base di questa sindrome acquisita sia in atto un meccanismo patogenetico simile a quello che causa la DBA.

Nonostante siano passati undici anni dalla pubblicazione del primo gene DBA, il legame tra il difetto di una proteina ribosomale e la produzione dei globuli rossi è ancora per molti versi oscuro.

Anche se la presenza di mutazioni inattivanti nei geni di nove RP avalla fortemente l'ipotesi che la patogenesi della DBA sia dovuta a un difetto della funzione e del numero dei ribosomi, il nesso tra l'aploinsufficienza di una RP e l'alterata eritropoiesi non è stato ancora completamente chiarito. Sia in modelli cellulari sia in cellule dei pazienti è stato documentato che il difetto di una proteina ribosomale determina la sintesi di un ridotto numero di ribosomi, un difetto di sintesi proteica ed un aumento della morte cellulare. Un difetto nella maturazione dell'rRNA ribosomale (rRNA) è stato identificato sia in cellule CD34+ di pazienti DBA sia in cellule eritroidi in cui RPS19 è stato silenziato⁽¹⁸⁾.

Alterazioni simili nelle vie di maturazione degli rRNA sono state individuate in cellule con difetto delle altre RP associate alla DBA: RPS24, RPS17, RPL35A, RPL5 e RPL11^(6,30,26)

Il precursore che si accumula, e di conseguenza il sito di blocco della via di processamento, è diverso a seconda della RP deficitaria⁽²⁶⁾, ma l'effetto è in ogni caso quello di una riduzione della subunità di cui la RP fa parte e del numero dei polisomi attivi.

Queste osservazioni hanno indotto a ipotizzare che il meccanismo patogenetico alla base della DBA sia rappresentato da una riduzione della sintesi proteica cui consegue una ridotta capacità proliferativa, particolarmente evidente nei tessuti con un elevato *turn-over*, come i progenitori eritroidi e i tessuti embrionali. In accordo con questa ipotesi, una ridotta sintesi proteica è stata osservata nei linfociti ottenuti da pazienti DBA⁽⁸⁾.

Questo modello, tuttavia, non spiega la selettività del difetto proliferativo. Per spiegare tale aspetto è stato proposto che esista un'espressione tessuto-specifica di alcune RP⁽¹⁶⁾.

Un altro modello propone, invece, che alcune RP abbiano una seconda funzione non strettamente ribosomale. Il difetto di questa funzione provocherebbe la DBA. Nell'ipotesi che RPS19 potesse regolare la funzione di fattori eritroidi tramite interazione proteina-proteina abbiamo identificato l'interattoma di RPS19. Abbiamo osservato che RPS19 interagisce con 159 proteine differenti, ma nessuna di queste è direttamente coinvolta nell'eritropoiesi. L'identificazione dell'interattoma di RPS19 ha escluso un'interazione con proteine con ruolo noto nell'eritropoiesi. Il ruolo di RPS19, e probabilmente quello delle altre RP deficitarie, è quindi molto probabilmente mediato dalla funzione ribosomale⁽²⁷⁾.

L'ipotesi più accreditata al momento è quella che un difetto della biogenesi dei ribosomi possa condurre all'attivazione di un particolare meccanismo di stress cellulare, lo stress ribosomale (anche detto stress nucleolare), cui segue l'attivazione di meccanismi di blocco proliferativo e di induzione dell'apoptosi⁽¹²⁾. Alcune di tali vie sarebbero mediate da p53, anche se sono stati proposti anche altri meccanismi⁽²²⁾.

Uno dei motivi che ha reso difficile lo studio della patogenesi della DBA è stato l'assenza di modelli affidabili della malattia in vertebrati. Il primo tentativo di produrre un modello murino non è stato di grande utilità. L'omozigosi per il difetto di RPS19 risultò, infatti, letale allo stadio embrionale, mentre il topo *knock-out* eterozigote non mostrava segni di malattia⁽²⁴⁾.

Un grande passo avanti in questa direzione è stata la produzione di modelli di zebrafish con difetto di RP. Sono stati ottenuti due modelli di zebrafish con insufficienza di RPS19 provocata iniettando analoghi di oligonucleotide antisense (morpholino) in embrioni allo stadio di una cellula^(31,9). Si è osservato che il difetto di RPS19 provoca riduzione del numero dei globuli rossi e

deformità della regione della testa e della coda⁽³¹⁾. Il fenotipo può essere evitato iniettando l'mRNA di *rps19* WT, ma non iniettando trascritti con le stesse mutazioni dei pazienti DBA. Gli autori dello studio hanno prodotto anche difetti di altre 20 RP. Tre RP mostrano, quando difettive, un fenotipo simile a quello di RPS19. Tra questi anche il difetto di *rpl35a*, un'altra RP causa di DBA. Gli autori hanno anche cercato di spiegare i meccanismi alla base del fenotipo⁽⁹⁾. Hanno osservato che la riduzione di *rps19* negli embrioni in cui erano stati iniettati i morpholino induceva modificazioni della trascrizione dei geni membri della famiglia di p53. Particolarmente evidente era l'aumento del trascritto deltaNp63 nei progenitori eritroidi purificati dagli embrioni. Simili alterazioni dell'espressione dei membri di p53 sono stati osservati in zebrafish con mutazioni in *rps8*, *rps11* and *rps18*. Di conseguenza, gli autori propongono che lo stress ribosomale causato dal difetto di *rps19* nello zebrafish determini un'aumentata espressione dei membri della famiglia di p53 con conseguente sbilanciamento dei componenti del network. Questo meccanismo, a sua volta, sarebbe alla base delle alterazioni dello sviluppo e della differenziazione. In accordo con il loro modello gli autori hanno dimostrato che il fenotipo causato dal difetto di *rps19* può essere prevenuto utilizzando un inibitore di p53. Ciò suggerisce la possibilità, seppure molto discutibile, che l'inibizione di alcune funzioni di p53 possa migliorare il quadro della malattia umana.

Negli ultimi anni ci sono stati altri tentativi di produrre un modello murino di DBA. Un topo transgenico portatore di una mutazione missense R32L in *Rps19*, ottenuto per mutagenesi chimica casuale, presenta alcuni aspetti simili ai pazienti DBA⁽²⁵⁾. Questo topo allo stato di omozigosi ha un fenotipo paragonabile a quello del topo *knock-out* per RPS19: entrambi i difetti sono letali a livello embrionale quando omozigoti. Ciò che distingue i due modelli è che il topo eterozigote per la mutazione *missense* ha un numero di globuli rossi lievemente ridotto, aumentata apoptosi dei progenitori eritroidi, riduzione del peso corporeo e macchie scure sulla pelle degli arti e della coda. È interessante notare che i pazienti con DBA presentano ridotto peso alla nascita, bassa statura, anemia e talvolta discromie cutanee. Tuttavia, il topo transgenico non presenta malformazioni, mentre le discromie cutanee sono presenti solo saltuariamente nei pazienti DBA. McGowan *et al.* hanno proposto un modello per spiegare la discromia⁽²⁵⁾. Hanno osservato che gli epitelociti di topi con difetto di *rps6* mostrano un'aumentata espressione di alcuni geni bersaglio di p53, in particolare *Mdm2* e *Kitl*. L'ipotesi patogenetica proposta dagli autori prevede che la stabilizzazione di p53 sia dovuta a un'aumentata disponibilità di RP in grado di sequestrare MDM2. Il livello di queste RP aumenterebbe poiché non più utilizzate per la produzione delle subunità ribosomali, in

rapporto al difetto di biogenesi del ribosoma. È infatti noto che alcune RP (ad es. RPL5 e RPL11) sono in grado di interagire con MDM2 e prevenire quindi l'ubiquitinizzazione di p53 dipendente da MDM2.

È inoltre documentato che *Kitl*, un altro bersaglio di p53, regola la funzione dei melanociti e la loro migrazione dalla cresta neurale. L'aumentato numero e l'aumentata attività dei melanociti nell'epidermide dei topi con pelle scura potrebbe essere dovuta ad un effetto mediato da p53, in quanto il topo *Trp53*^{-/-} *Rps19* *R32L*^{-/+} mostra reversione del fenotipo e assenza delle macchie scure.

Gli autori ritengono che l'aumento di *Kitl* non possa, però, essere responsabile della ridotta eritropoiesi, perché i topi con difetto di *Kitl* (detti anche topi Steel) sono anemici. Tra l'altro, la loro anemia non è curata dal trapianto di midollo, a differenza da quanto accade nei pazienti DBA.

È interessante osservare che i progenitori eritroidi dei pazienti DBA mostrano una drammatica risposta *in vitro* dopo esposizione a KITL, EPO e IL-3⁽²⁾. Il difetto eterozigote del gene *KIT*, inoltre, nell'uomo è causa di piebaldismo (MIM 172800), una situazione caratterizzata da discromie cutanee, ma non da anemia.

È stato recentemente prodotto un nuovo topo transgenico portatore della mutazione missense più frequente nei pazienti con difetto di *RPS19*, *R62W*⁽¹⁰⁾. L'espressione costitutiva di questa variante risulta letale già allo stadio embrionale, mentre il topo con espressione condizionale presenta ritardo di crescita, lieve anemia con riduzione dei progenitori eritroidi e difetto della maturazione eritroide terminale. L'analisi del trascrittoma degli eritroblasti ottenuti da questi topi mostra notevoli differenze da quello dei topi WT. In particolare, si osserva disregolazione di geni coinvolti negli stessi processi metabolici alterati nei profili trascrizionali ottenuti da cellule CD34⁺ ottenute da tre pazienti con DBA⁽²⁰⁾. I processi metabolici coinvolti includono quelli etichettati come "modificazioni post-trascrizionali", "sintesi proteica", "danno cellulare" (incluse le vie che coinvolgono p53), "proliferazione cellulare", e "metabolismo del ferro".

Questo modello suggerisce che almeno la mutazione *missense* *R62W* abbia un effetto dominante negativo a livello cellulare. Tale effetto si verifica tutte le volte che un polipeptide mutante interferisce con la funzione della proteina selvaggia⁽¹⁰⁾

Il nostro gruppo ha osservato che disregolazione di geni situati negli stessi processi sono presenti anche a livello del trascrittoma di fibroblasti ottenuti da pazienti con DBA⁽¹⁾. Pertanto, anche cellule non emopoietiche presentano alterata espressione di geni coinvolti nella sintesi proteica e nella sintesi degli aminoacidi.

Tutti questi dati avallano l'ipotesi patogenetica che vede all'origine della DBA un'alterazione della funzione dei ribosomi e della sintesi proteica.

In conclusione, negli ultimi anni sono stati fatti molti passi avanti nella comprensione del difetto alla base della DBA. I successi maggiori sono rappresentati dall'identificazione dei geni responsabili di 50% dei casi. Ciò ha determinato anche una maggiore accuratezza diagnostica della malattia. Anche le prospettive terapeutiche sono molto migliorate soprattutto per quanto riguarda il trapianto di cellule staminali emopoietiche. Le nuove tecniche molecolari consentono infatti di valutare meglio la compatibilità dei donatori non consanguinei. Per brevità rimandiamo al documento di consenso internazionale generato dagli ematologi che seguono i pazienti DBA⁽³²⁾.

In conclusione, i meccanismi patogenetici alla base della DBA sono stati studiati utilizzando strategie eleganti e sistematiche, che includono la produzione di modelli animali e cellulari. Queste strategie hanno evidenziato nuovi aspetti della DBA e proposto diverse ipotesi esplicative, nessuna delle quali mutualmente esclusiva. Tuttavia nessuna ipotesi patogenetica finora proposta riesce a spiegare in modo convincente il complesso fenotipo presentato dai pazienti con DBA.

BIBLIOGRAFIA

1. Avondo F, Roncaglia P, Crescenzo N, Krmac H, Garelli E, Armiraglio M, Castagnoli C, Campagnoli MF, Ramenghi U, Gustincich S, Santoro C, Dianzani I: *Fibroblasts from patients with Diamond-Blackfan anaemia show abnormal expression of genes involved in protein synthesis, amino acid metabolism and cancer*. BMC Genomics. 2009; 10, 442.
2. Bagnara GP, Zauli G, Vitale L, Rosito P, Vecchi V, Paolucci G, Avanzi GC, Ramenghi U, Timeus F, Gabutti V: *In vitro growth and regulation of bone marrow enriched CD34+ hematopoietic progenitors in Diamond-Blackfan anemia*. Blood. 1991; 78, 2203-2210.
3. Boria I, Garelli E, Gazda HT, Aspesi A, Quarello P, Pavesi E, Ferrante D, Meerpohl JJ, Kartal M, Da Costa L, Proust A, Leblanc T, Simansour M, Dahl N, Fröjmark AS, Pospisilova D, Cmejla R, Beggs AH, Sheen MR, Landowski M, Buros C, Clinton C, Dobson L, Vlachos A, Atsidaftos E, Lipton JM, Ellis SR, Ramenghi U, Dianzani I: *The Ribosomal Basis Of Diamond-Blackfan Anemia: Mutation And Database Update*. Hum. Mutat. (in press).

4. Boria I, Quarello P, Avondo F, Garelli E, Aspesi A, Carando A, Dianzani I, Ramenghi U: *A new database for ribosomal protein genes which are mutated in Diamond-Blackfan anemia*. Hum. Mutat. 2008; 29, E263-70.
5. Campagnoli MF, Ramenghi U, Armiraglio M, Quarello P, Garelli E, Carando A, Avondo F, Pavesi E, Fribourg S, Gleizes PE, Loreni F, Dianzani I: *RPS19 mutations in patients with Diamond-Blackfan anemia*. Hum. Mutat. 2008; 29, 911-920.
6. Choesmel V, Fribourg S, Aguisa-Toure AH, Pinaud N, Legrand P, Gazda HT, Gleizes PE: *Mutation of ribosomal protein RPS24 in Diamond-Blackfan anemia results in a ribosome biogenesis disorder*. Hum. Mol. Genet. 2008; 17, 1253-1263.
7. Cmejla R, Cmejlova J, Handrkova H, Petrak J, Pospisilova D: *Ribosomal protein S17 gene (RPS17) is mutated in Diamond-Blackfan anemia*. Hum. Mutat. 2007; 28, 1178-1182.
8. Cmejlova J, Dolezalova L, Pospisilova D, Petrtlyova K, Petrak J, Cmejla R: *Translational efficiency in patients with Diamond-Blackfan anemia*. Haematologica. 2006; 91, 1456-1464.
9. Danilova N, Sakamoto KM, Lin S: *Ribosomal protein S19 deficiency in zebrafish leads to developmental abnormalities and defective erythropoiesis through activation of p53 protein family*. Blood. 2008; 112, 5228-5237.
10. Devlin EE, Da Costa L, Mohandas N, Elliott G, Bodine DM: *A transgenic mouse model demonstrates a dominant negative effect of a point mutation in the RPS19 gene associated with Diamond-Blackfan anemia*. Blood, 2010 [Epub ahead of print].
11. Dianzani I, Garelli E, Dompè C, Crescenzo N, Locatelli F, Schilirò G, Castaman G, Bagnara GP, Olivieri NF, Gabutti V, Ramenghi U: *Mutations in the erythropoietin receptor gene are not a common cause of Diamond-Blackfan anemia*. Blood. 1996; 87, 2568-2572.
12. Dianzani I, Loreni F: *Diamond-Blackfan anemia: a ribosomal puzzle*. Haematologica 2008; 93, 1601-1604.
13. Doherty L, Sheen MR, Vlachos A, Choesmel V, O'Donohue MF, Clinton C, Schneider HE, Sieff CA, Newburger PE, Ball SE, Niewiadomska E, Matysiak M, Glader B, Arceci RJ, Farrar JE, Atsidaftos E, Lipton JM, Gleizes PE, Gazda HT: *Ribosomal protein genes RPS10 and RPS26 are commonly mutated in Diamond-Blackfan anemia*. Am. J. Hum. Genet. 2010; 86, 222-228.
14. Draptchinskaia N, Gustavsson P, Andersson B, Pettersson M, Willig TN, Dianzani I, Punnett HH, Shafer FE, Cario H, Ramenghi U, Glomstein A, Pfeiffer RA, Goringe A, Olivieri NF, Smibert E, Tchernia G, Elinder G, Dahl N: *The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia*. Nat. Genet. 1999; 21, 169-75.
15. Ebert BL, Pretz J, Bosco J, Chang CY, Tamayo P, Galili N, Raza A, Root DE, Attar E, Ellis SR, Golub TR: *Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen*. Nature. 2008; 451, 335-339.
16. Ellis SR, Massey AT: *Diamond Blackfan anemia: A paradigm for a ribosome-based disease*. Med. Hypotheses. 2006; 66, 643-648.
17. Farrar JE, Nater M, Caywood E, McDevitt MA, Kowalski J, Takemoto CM, Talbot CC Jr, Meltzer P, Esposito D, Beggs Schneider HE, Grabowska A, Ball SE, Niewiadomska E, Sieff CA, Vlachos Atsidaftos E, Ellis SR, Lipton JM, Gazda HT, Arceci RJ: *Abnormalities of the large ribosomal subunit protein, Rpl35a, in Diamond-Blackfan anemia*. Blood. 2008; 112, 1582-1592.

18. Flygare J, Aspesi A, Bailey JC, Miyake K, Caffrey JM, Karlsson S, Ellis SR: *Human RPS19, the gene mutated in Diamond-Blackfan anemia, encodes a ribosomal protein required for the maturation of 40S ribosomal subunits*. Blood. 2007; 109, 980-986.
19. Gazda HT, Grabowska A, Merida-Long LB, Latawiec E, Schneider HE, Lipton JM, Vlachos A, Atsidaftos E, Ball SE, Orfali KA, Niewiadomska E, Da Costa L, Tchernia G, Niemeyer C, Meerpohl JJ, Stahl J, Schratt G, Glader B, Backer K, Wong C, Nathan DG, Beggs AH, Sieff CA: *Ribosomal protein S24 gene is mutated in Diamond-Blackfan anemia*. Am. J. Hum. Genet. 2006; 79, 1110-1118.
20. Gazda HT, Kho AT, Sanoudou D, Zaucha JM, Kohane IS, Sieff CA, Beggs AH: *Defective ribosomal protein gene expression alters transcription, translation, apoptosis, and oncogenic pathways in Diamond-Blackfan anemia*. Stem Cells. 2006; 24, 2034-2044.
21. Gazda HT, Sheen MR, Vlachos A, Choesmel V, O'Donohue MF, Schneider H, Darras N, Hasman C, Sieff CA, Newburger PE, Ball SE, Niewiadomska E, Matysiak M, Zaucha JM, Glader B, Niemeyer C, Meerpohl JJ, Atsidaftos E, Lipton JM, Gleizes PE, Beggs AH: *Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients*. Am. J. Hum. Genet. 2008; 83, 769-780.
22. Iadevaia V, Caldarola S, Biondini L, Gismondi A, Karlsson S, Dianzani I, Loreni F: *PIM1 kinase is destabilized by ribosomal stress causing inhibition of cell cycle progression*. Oncogene, 2010 [Epub ahead of print].
23. Liu JM, Ellis SR: *Ribosomes and marrow failure: coincidental association or molecular paradigm?* Blood. 2006; 107, 4583-4588.
24. Matsson H, Davey EJ, Frojmark AS, Miyake K, Utsugisawa T, Flygare J, Zahou E, Byman I, Landin B, Ronquist G, Karlsson S, Dahl N: *Erythropoiesis in the Rps19 disrupted mouse: analysis of erythropoietin response and biochemical markers for Diamond-Blackfan anemia*. Blood Cells Mol. Dis. 2006; 36, 259-264.
25. McGowan KA, Li JZ, Park CY, Beaudry V, Tabor HK, Sabnis AJ, Zhang W, Fuchs H, de Angelis MH, Myers RM, Attardi LD, Barsh GS: *Ribosomal mutations cause p53-mediated dark skin and pleiotropic effects*. Nat. Genet. 2008; 40, 963-970.
26. O'Donohue MF, Choesmel V, Faubladier M, Fichant G, Gleizes PE: *Functional dichotomy of ribosomal proteins during the synthesis of mammalian 40S ribosomal subunits*. J. Cell. Biol. 2010; 190, 853-866.
27. Orrù S, Aspesi A, Armiraglio M, Caterino M, Loreni F, Ruoppolo M, Santoro C, Dianzani I: *Analysis of the ribosomal protein S19 interactome*. Mol. Cell. Proteomics 2007; 6, 382-93.
28. Quarello P, Garelli E, Brusco A, Carando A, Pappi P, Barberis M, Coletti V, Campagnoli MF, Dianzani I, Ramenghi U: *Multiplex ligation-dependent probe amplification enhances molecular diagnosis of Diamond Blackfan anemia due to RPS19 deficiency*. Haematologica. 2008; 93, 1748-1750.
29. Quarello P, Garelli E, Carando A, Brusco A, Calabrese R, Dufour C, Longoni D, Misuraca A, Vinti L, Aspesi A, Biondini L, Loreni F, Dianzani I, Ramenghi U: *Diamond-Blackfan anemia: genotype-phenotype correlations in Italian patients with RPL5 and RPL11 mutations*. Haematologica. 2010; 95, 206-213.
30. Robledo S, Idol RA, Crimmins DL, Ladenson JH, Mason PJ, Bessler M: *The role of human ribosomal proteins in the maturation of rRNA and ribosome production*. RNA. 2008; 14, 1918-1929.

31. Uechi T, Nakajima Y, Chakraborty A, Torihara H, Higa S, Kenmochi N: *Deficiency of ribosomal protein S19 during early embryogenesis leads to reduction of erythrocytes in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia*. Hum. Mol. Genet. 2008; 17, 3204-3211.
32. Vlachos A, Ball S, Dahl N, Alter BP, Sheth S, Ramenghi U, Meerpohl J, Karlsson S, Liu JM, Leblanc T, Paley C, Kang EM, Leder EJ, Atsidaftos E, Shimamura A, Bessler M, Glader B, Lipton JM: *Diagnosing and treating Diamond Blackfan anaemia: results of an international clinical consensus conference*. Br. J. Haematol. 2008; 142, 859-876.

FARMACOGENOMICA DELLA SCLEROSI MULTIPLA

Antonio Bertolotto, Francesca Gilli, Simona Malucchi

SCDO Neurologia 2 - CRESM (Centro Riferimento Regionale Sclerosi Multipla)
AOU San Luigi, Orbassano (TO)

Key words: *Multiple Sclerosis / Sclerosi Multipla*
 Pharmacogenomic / Farmacogenomica
 Pregnancy / Gravidanza
 Interferon beta / Interferone beta
 Non responder / Non rispondenti

Abstract:

Multiple Sclerosis (MS) is an ideal disease for pharmacogenomic, as the utilization of genomic markers could identify, as soon as possible, responders and non-responders patients. In fact the available pharmacological treatments are several, they are expensive, only partially effective, and they must be used for decades. Pharmacogenomic of MS is at its preliminary steps and at present the only pharmacogenomic available markers is the quantification of mRNA MxA in PBMC after one year of IFNb treatment. However new and interesting markers are under evaluation and in the next future they could help neurologists to choose the better treatment options for each patient.

Riassunto:

La Sclerosi Multipla (SM) è il terreno ideale, ma molto difficile, per l'applicazione della farmacogenomica, cioè l'utilizzo di markers genici, per individuare il più precocemente possibile i pazienti rispondenti e non-rispondenti ai diversi trattamenti disponibili. I trattamenti per la SM sono infatti numerosi, sono dispendiosi, parzialmente efficaci nella globalità dei pazienti e devono essere protratti per anni. La farmacogenomica della SM è in una fase iniziale, al momento l'unico marker utilizzabile nella pratica clinica quotidiana è rappresentato dalla misurazione del mRNA MxA nei PBMC (peripheral blood mononuclear cells) dopo un anno di trattamento con IFNb. Tuttavia nuovi ed interessanti studi stanno indagando altri markers che, in un futuro non lontano, potranno aiutare il neurologo a scegliere il farmaco più indicato per ogni singolo paziente.

La Farmacogenomica studia le interazioni tra genetica e farmaci; in particolare la FDA (Food and Drug Administration) definisce la farmacogenomica come lo “studio delle variazioni delle caratteristiche di DNA e RNA legate alla risposta ai farmaci”, e la farmacogenetica lo “studio delle variazioni della sequenza del DNA in relazione alla risposta al farmaco”⁽¹⁰⁾.

LA SCLEROSI MULTIPLA (SM)

La SM è una patologia autoimmune infiammatoria-degenerativa del sistema nervoso centrale, ad andamento cronico, che colpisce preferenzialmente il giovane adulto; la sua prevalenza è in aumento; in Italia colpisce circa 1 soggetto ogni 1000 abitanti con un rapporto femmina/maschio di circa 3/1.

La frequenza della patologia e l'aumento della sua prevalenza, uniti al fatto che il bersaglio principale della malattia è rappresentato dal giovane adulto, fanno sì che la ricerca scientifica in questo campo sia particolarmente attiva. Negli ultimi quindici anni sono stati commercializzati numerosi farmaci attivi contro la SM; essi sono attualmente rappresentati da: interferone beta (IFN β), disponibile in cinque diverse preparazioni commerciali: IFN β -1a (Avonex, somministrato 1/settimana per via intramuscolare), IFN β -1a (Rebif 22mcg e Rebif 44mcg, somministrati 3/sett per via sottocutanea), IFN β -1b (Betaferon e Extavia somministrati a giorni alterni per via sottocutanea), glatiramer acetato, natalizumab, mitoxantrone, azatioprina, ciclofosfamide; inoltre nuovi farmaci quali cladribina e fingolimode stanno per entrare in commercio. L'efficacia di queste terapie è parziale e la risposta ai trattamenti è molto variabile; inoltre, la patologia è caratterizzata da un'estrema eterogeneità sia inter sia intra-individuale e non si conoscono al momento precisi indicatori di risposta ai farmaci; questi fattori fanno sì che l'identificazione dei pazienti che non rispondono ai trattamenti sia difficoltosa; gli studi di farmacogenomica potrebbero in futuro spiegare la variabilità di risposta ai diversi trattamenti, al fine di migliorare le scelte terapeutiche e di personalizzare la terapia sul singolo paziente.

L'INTERFERON BETA (IFN β)

L'IFN β ricombinante, proteina con attività antivirale e antiproliferativa, rappresenta ad oggi uno dei farmaci di prima linea nel trattamento della SM a riacutizzazioni e remissioni (SM-RR). È costituito da una successione di 5 alfa-eliche e di 4 segmenti di congiunzione o loops.

Il recettore per l'IFN β , denominato IFNAR, condivide come ligandi tutti gli IFN di tipo 1 ed è espresso in quasi tutte le cellule in quantità diversa; è una glicoproteina di superficie che appartiene alla superfamiglia dei recettori citochinici di classe 2, i quali presentano una struttura dimerica (omo o etero) con almeno 2 catene, di cui una (alfa) con proprietà leganti e l'altra (beta) con proprietà trasducenti; presentano inoltre dei domini caratteristici nel segmento extracellulare di 200 amminoacidi indicati come D200. L'IFNAR è quindi composto da due catene denominate IFNAR 1 ed IFNAR2; le due catene e le loro varianti sono state clonate.

L'IFNAR1 ha proprietà trasducenti e non leganti. L'IFNAR2 esiste in 3 isoforme denominate IFNAR-2a o solubile; IFNAR-2b o transmembrana corto ed IFNAR-2c, o transmembrana lungo; queste 3 isoforme sono generate da un unico gene denominato hu/IFNAR2 localizzato sul cromosoma 21. Le forme IFNAR-2b e IFNAR-2c attraversano la membrana cellulare, mentre la forma IFNAR-2a sintetizza la forma solubile del recettore.

Non è nota la funzione di IFNAR-2a: esso è un potente inibitore di tutti i tipi di IFN di classe 1 e potrebbe agire come modulatore dell'attività interferonica in vivo. Il riscontro di quantità significative di un mRNA di 4.5 kb che è tradotto nel recettore solubile da 40 kDa, suggerisce che esso possa derivare da uno splicing alternativo piuttosto che da una proteolisi di membrana.

Il sito di legame ad alta affinità per il recettore è a livello di due loop (A-B e D-E) e dell'alfa-elica D; è necessario il loro coinvolgimento simultaneo per produrre un effetto apprezzabile: i singoli frammenti isolati mancano di attività biologica, essendo l'epitopo attivante il recettore tridimensionale e non lineare. Siti di legame a bassa affinità sono individuabili a livello delle eliche A e C. Il legame tra l'IFN β ed il recettore determina una oligomerizzazione di subunità che pare incrementare l'affinità di legame.

Il segnale determinato dall'interazione della molecola interferonica con il recettore viene trasmesso dalla membrana alle strutture nucleari attraverso diversi percorsi tra loro sinergici:

- 1) il percorso JAK-STAT: in seguito all'interazione IFN-recettore, le due catene intracitosoliche recettoriali si aggregano e attivano due chinasi (Jak1 e TYK2) le quali fosforilano delle proteine del complesso STAT (signal transducers and activators of transcription): STAT1 e STAT2; esse, una volta attivate, migrano nel nucleo e si legano all'ISRE (interferon stimulus response element) sul promotore di geni responsivi all'IFN determinandone la trascrizione;
- 2) il percorso DAG-PKC: l'interazione IFN-recettore determina un aumento del diacilglicerolo; esso attiva a sua volta la PKC (una serina-treonina

chinasi), che fosforila il fattore inibente NFkB, determinando il distacco di NFkB che può quindi migrare nel nucleo: qui andrà a legarsi ai promotori contenenti il suo sito di legame, provocando la trascrizione dei geni associati (ISGF2 o IRF1);

- 3) il percorso delle MAP (mitogen activated protein)-Chinasi: la cascata attivatoria della PKC coinvolge anche il complesso delle MAP-chinasi, con attivazione sequenziale mediante fosforilazioni a cascata di MAPKKK, di MAPKK, di MAPK la quale a sua volta migra nel nucleo ove fosforilerà dei fattori di trascrizione rendendoli attivi per la trascrizione genica. Sembra che questa via non sia influente sull'attività anti-virale dell'IFN, mentre sia essenziale per la regolazione proliferativa.

In seguito all'interazione con il recettore, l'IFN provoca l'espressione diretta di numerosi geni, circa 400, definiti ISGs (Interferon Stimulated Genes); tra questi risulta di particolare interesse il gene MxA, che è stato ormai validato come marcatore della risposta biologica all'IFN. In base alla definizione della FDA un biomarker genomico è "una quantificabile entità di DNA o RNA che è un indicatore di un processo biologico fisiologico oppure patologico e/o di una risposta ad un farmaco o ad una procedura. Un biomarker genomico può essere ad esempio un misuratore dell'espressione di un gene oppure della funzione di un gene oppure della regolazione di un gene. Un marker genomico di RNA può essere la sequenza di RNA, il livello di espressione di RNA, il livello di microRNA"⁽¹⁰⁾. Affinché una sostanza sia utilizzabile come marker di risposta biologica all'IFN β è necessario che una lunga serie di condizioni sia rispettata, per giungere infine alla sua validazione; tutti questi passaggi sono stati superati dal mRNA MxA.

LA BIODISPONIBILITÀ DELL'IFN β

Affinché l'IFN β possa svolgere la sua azione terapeutica è necessario che attivi il proprio recettore sui linfomonociti ematici (PBMCs), e che quindi si manifestino tutti quegli eventi descritti precedentemente.

La presenza di attività biologica è una condizione necessaria affinché un farmaco abbia una efficacia clinica⁽¹⁶⁾. La branca della farmacologia che studia l'attività biologica è denominata farmacodinamica. L'attività biologica dell'IFN β è rappresentata dall'attivazione degli ISGs e dall'azione antivirale, anti-proliferativa ed immuno-modulante.

Il meccanismo d'azione dell'IFN β nella SM è stato collegato alla sua azione immuno-modulante; essa, dopo l'attivazione degli ISGs che avviene nel giro

di poche ore, è imputabile alla modificazione di molecole e di popolazioni cellulari che intervengono dopo giorni o settimane dall'inizio della terapia con IFN β . L'attività immunomodulante avviene tramite l'inibizione della proliferazione di T-linfociti, la regolazione del livello di citochine quali IL-10, TGF β , IFN γ , TNF α , IL-12, la riduzione della permeabilità della barriera emato-encefalica interferendo con l'adesione e la migrazione dei linfomonociti tramite incremento del VCAM sierico e riducendo il livello di metalloproteasi MMP9 linfomonocitaria⁽¹¹⁾ modificando le NK ed infine normalizzando l'espressione di alcuni geni ricalcando l'azione benefica della gravidanza.

Come detto precedentemente, il gene MxA, può essere considerato come indicatore dell'attività biologica dell'IFN β ; esso è infatti selettivamente indotto dall'IFN β ; ha dimostrato una significativa differenza di espressione fra i pazienti in trattamento e quelli non in trattamento sia alla prima somministrazione sia durante il trattamento⁽⁵⁾; in particolare l'incremento dopo l'IFN β è molto rilevante, da 10 a 20 volte il livello basale, con una sensibilità e specificità di oltre il 94%⁽¹³⁾, il che permette effettivamente di utilizzare questo marker nella valutazione di ogni singolo paziente. Inoltre i livelli di MxA mRNA sono fortemente correlati con la presenza di sostanze (sIFNAR, anticorpi leganti o BAbs e anticorpi neutralizzanti l'IFN o NAbs) che impediscono il legame dell'IFN con l'IFNAR^(5,9,18) e con fattori che intervengono nella funzione immunomodulante dell'IFN β ^(11,20).

Inoltre, il livello di MxA mRNA correla con l'efficacia clinica dell'IFN β : questo risultato è stato raggiunto recentemente con il dosaggio di MxA mRNA, BAbs e NAbs dopo un anno di trattamento con IFN β e con la loro correlazione con il tempo alla prima poussée⁽¹⁷⁾. I pazienti che non presentano un incremento della MxA hanno un tempo mediano al primo attacco di 7 mesi, mentre più del 50% dei pazienti con incremento della MxA non ha un attacco durante tutto il follow-up di 2 anni, con un HR di 2,87 (Figura 1).

Alcuni fattori possono ridurre la biodisponibilità dell'IFN: il turnover del recettore IFNAR, la presenza del recettore solubile (sIFNAR) e la comparsa di NAbs.

Per quanto riguarda il turnover recettoriale si è osservato che nei pazienti in trattamento cronico con IFN dopo circa 6 mesi di terapia si ha una riduzione rispetto ai valori basali del livello di IFNAR 2b e IFNAR2c mentre si ha un aumento della forma solubile; nei pazienti che sviluppano NAbs si ha invece un incremento delle catene IFNAR2b e 2c; i livelli di MxA mRNA durante il trattamento cronico sono più bassi rispetto al valore misurabile dopo la prima iniezione di IFN β ; queste modificazioni, che costituiscono un meccanismo

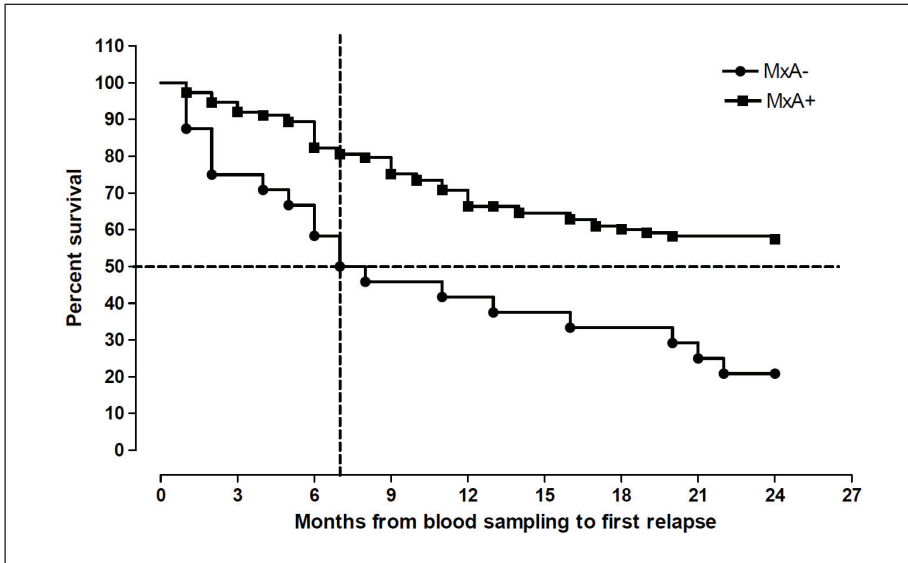


Figura 1. Valore predittivo di MxA mRNA, nei pazienti in trattamento con IFN β . La presenza di attività biologica (MxA +) dopo un anno di trattamento con IFN β predice un tempo al primo attacco molto più lungo che l'assenza di attività biologica (HR = 2,87). (Da Malucchi et al. *Neurology* 2008).

di tachifilassi, rappresentano un adattamento alla iperstimolazione cronica dell'IFN β ⁽¹⁵⁾.

La presenza di sIFNAR è stata dimostrata nel siero di pazienti trattati con IFN β ⁽¹⁴⁾; esso si lega all'IFN β modificandone la biodisponibilità; il 4% dei pazienti presenta il sIFNAR nel siero e l'80% di essi ha una attività biologica ridotta o abolita. La presenza di sIFNAR è un meccanismo fisiologico utilizzato per regolare l'attività dell'IFN β ; è stato identificato anche in altri sistemi citochinici ed utilizzato a fini terapeutici per bloccare l'azione di una citochina come il TNF α .

I NAbs sono una sottoclasse dei BAbs e si legano all'IFN in modo tale da impedirgli di interagire con il proprio recettore, IFNAR, bloccandone gli effetti biologici e terapeutici^(5,9,24).

I BAbs compaiono prima dei NAbs: infatti il picco di positività ai NAbs si riscontra intorno ai 12-15 mesi di trattamento e aumenta in prevalenza fino a 24 mesi, mentre i BAbs sono quantificabili sin dal primo trimestre di trattamento⁽²³⁾. Il rischio di sviluppare NAbs è diverso a seconda del tipo di IFN β somministrato ed esiste una generale concordanza di dati che dimostrano

una minore immunogenicità dell'Avonex rispetto al Rebif ed al Betaferon, con percentuali rispettivamente di 2-6%; 17-25% e 25-38%^(6,7,23).

Un numero rilevante di studi, tutti concordanti, ha dimostrato che la presenza nel siero di NAbS causa la perdita di attivazione degli ISGs, valutata come MxA proteina^(9,26) o come mRNA⁽⁴⁾ perché il legame degli anticorpi con l'IFN β ne impedisce il legame con il recettore IFNAR e di conseguenza non viene attivata la via intracellulare che dapprima porta alla espressione dei geni ISGs e poi a tutta la cascata dell'IFN β . Una quota dei pazienti che produce NAbS si negativizza, altri pazienti presentano ogni tanto un campione positivo, in genere a basso titolo. Questa dinamica dei NAbS comporta una suddivisione dei pazienti in base alla presenza degli anticorpi neutralizzanti in i) pazienti NAbS negativi (NAbS-), in cui non si sono mai rilevati anticorpi; ii) persistenti NAbS positivi (NAbS+), che abbiano almeno 2 prelievi positivi in 2 trimestri consecutivi; iii) isolati NAbS positivi (iNAbS+), con uno o più prelievi positivi non consecutivi nel tempo; iv) pazienti negativizzati, che presentano almeno due prelievi negativi in due trimestri consecutivi dopo un periodo di positività. Un siero viene definito NAbS+ quando presenta un titolo ≥ 20 TRU.

L'azione inibente dei NAbS sull'espressione di MxA è stata ampiamente dimostrata confrontando pazienti in trattamento con e senza anticorpi neutralizzanti^(4,5,9,18,19,26). Nei pazienti NAbS+ si osserva una espressione di MxA perfettamente sovrapponibile a quella dei pazienti non in trattamento, sia a livello proteico sia a livello di mRNA. Inoltre l'effetto dei NAbS sull'espressione genica di MxA è indipendente dal tipo di IFN somministrato e dal numero di iniezioni settimanali, in quanto l'attività biologica è abolita somministrando IFN β una volta o più volte la settimana⁽⁷⁾.

In alcuni pazienti NAbS- non si ha induzione di MxA, per cui altri meccanismi biologici interferiscono con l'attività biologica dell'IFN β : anticorpi leganti l'IFN β (BAbS) ad alto titolo⁽¹⁸⁾, il recettore solubile dell'IFN oltre che la scarsa compliance.

Inoltre è ipotizzabile come meccanismo di falsa mancanza di risposta biologica la saturazione recettoriale, che si è riscontrato quantificando il mRNA MxA per cinque giorni consecutivi in pazienti NAbS negativi in trattamento con Betaferon o Rebif. Si è osservato un incremento dopo ogni singola iniezione di IFN nell'82% delle iniezioni, mentre nel 18% delle somministrazioni il livello di mRNA MxA non aumenta rispetto al giorno precedente l'iniezione⁽⁷⁾. L'ipotesi formulata è che l'IFNAR sia stato legato dall'IFN β ed eliminato dalla membrana cellulare dei linfomonociti dalla iniezione che precede quella in studio di 48 – 72 ore, e quindi non più disponibile quando si esegue una seconda iniezione, che risulta perciò inefficace. Questa ipotesi è suffragata

dall'incremento del MxA nel 100% quando è utilizzato l'Avonex, le cui somministrazioni sono distanziate di 7 giorni⁽⁷⁾.

Esiste ormai un quasi generale consenso sull'effetto dei NAbS nella abolizione dell'efficacia dell'IFN β , valutata attraverso parametri sia clinici, sia radiologici.

I NAbS tendono a comparire dopo circa sei-dodici mesi dall'inizio del trattamento con IFN β ^(1,2,5,21). Dal momento che l'efficacia clinica del farmaco è modesta (circa 30% di riduzione della frequenza di attacchi) e l'impatto dei NAbS sulla clinica inizia ad evidenziarsi dopo 18-24 mesi di trattamento, solo gli studi condotti per un periodo di tempo sufficientemente lungo, superiore a due anni, hanno messo in luce il loro impatto negativo⁽²²⁾.

La comparsa dei NAbS, e la conseguente perdita di attività biologica dell'IFN β , precede la scomparsa dell'efficacia dell'IFN β sulla MRI, sugli attacchi clinici e sulla progressione della disabilità.

In un importante studio di Sorensen⁽²⁴⁾ è stato valutato l'effetto degli anticorpi sull'efficacia clinica dell'IFN su 541 soggetti, trattati con quattro diverse preparazioni commerciali di IFN per sei anni. Si è osservato che nel periodo di NAbS positività i pazienti presentavano un relapse rate significativamente più alto (0,64 - 0,70) rispetto a quello di NAbS negatività (0,43 - 0,46, $p < 0.03$). Suddividendo i pazienti in due gruppi in base alla presenza o assenza di NAbS a 12 mesi dall'inizio della terapia, è stato calcolato l'intervallo di tempo al primo attacco ed è emerso che questo tempo era significativamente più lungo ($p = 0,009$) nei NAbS- rispetto ai NAbS+; il tempo mediano al primo attacco era infatti 605 giorni nei pazienti NAbS- contro 361 giorni nei NAbS+; inoltre, la percentuale dei pazienti NAbS- liberi da ricadute era il 39% contro il 27% nel gruppo dei NAbS+ ($p = 0,0064$). Risultati sovrapponibili per i NAbS sono stati ottenuti dal nostro gruppo⁽¹⁷⁾ con la misurazione dopo un anno di trattamento dei NAbS, BABs e MxA: in questo studio fu validato per la prima volta il valore prognostico del MxA nell'individuazione precoce dei non responders clinici.

Esiste però anche una quota di pazienti che, pur presentando una normale attività biologica dell'IFN, non trae beneficio dalla terapia; è possibile dunque che determinate variazioni genetiche determinino una differente risposta alla terapia e che quindi esistano diverse categorie di non-rispondenti all'IFN β (Figura 2). Esistono numerosi studi di farmacogenomica volti a individuare eventuali geni la cui espressione possa predire nel singolo individuo la risposta al farmaco o volti a identificare una diversa espressione genica in corso di terapia.

Esistono degli studi di espressione genica misurata prima dell'inizio della terapia per stabilire se specifiche espressioni geniche predicono la risposta al

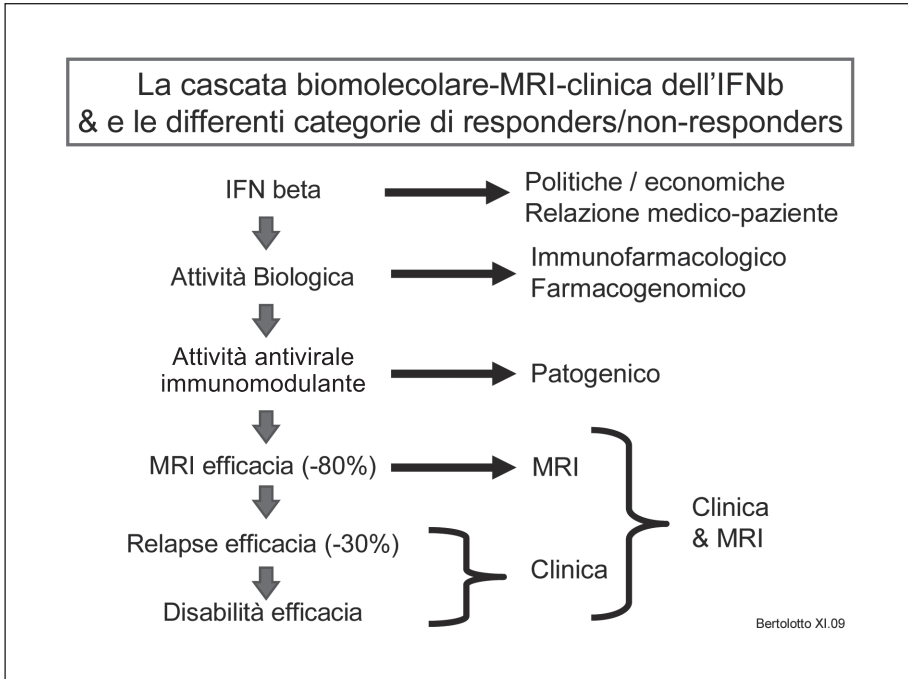


Figura 2. Categorie di non-respondenti all'IFN β in base al meccanismo d'azione del farmaco.

farmaco; ad esempio in uno studio del 2008⁽²⁵⁾ è stata evidenziata con cDNA microarray che i pazienti responsivi all'IFN avevano una ridotta espressione dell'interleuchina IL8 sia prima sia durante la terapia.

In un successivo studio del 2005⁽³⁾ l'analisi con RT-PCR dell'espressione di 70 geni ritenuti importanti prima e durante il trattamento con IFN ha dimostrato che 9 terne di 3 geni predicevano la risposta clinica nei due anni successivi con accuratezza.

Un recente lavoro di Comabella e collaboratori⁽⁸⁾ ha preso in considerazione due gruppi di pazienti distinguibili sulla base di caratteristiche cliniche in responders (senza attacchi né progressione di disabilità nei due anni dall'inizio della terapia) e non responders (con attacchi e progressione); in questi pazienti è stata studiata l'espressione genica nei PBMCs prima dell'inizio del farmaco e poi dopo 3 mesi. Gli autori trovano che prima del trattamento i non-responders si differenziano per 47 geni, in gran parte maggiormente espressi ed in particolare molti di essi sono ISGs; dopo 3 mesi di trattamento i responders dimostrano un aumento dell'espressione genica, in particolare dei ISGs, mentre questo fenomeno non avviene nei non-responders. L'interpretazione di

questi dati è che nei non-responders il sistema Interferone tipo I è già attivato prima del trattamento ed è refrattario ad una ulteriore stimolazione con l'IFN β somministrato come terapia. Da questi dati è stato calcolato la capacità di predire la futura condizione di responder ed utilizzando un gruppo di 8 geni (5 dei quali ISGs: IFIT 1, 2, 3; IFI44, OASL) si è ottenuta una correttezza del 78% nella predizione.

Per quanto riguarda lo studio dell'espressione genica durante la terapia, al momento l'unica procedura validata è la misurazione del mRNA MxA nei PBMCs, che permette di identificare i pazienti che non rispondono per la presenza di fattori che inibiscono l'attività biologica del farmaco.

GRAVIDANZA E SM

Una particolare applicazione della farmacogenomica nella sclerosi multipla è rappresentata dallo studio delle modificazioni geniche che si manifestano in corso di gravidanza. La gravidanza rappresenta un transitorio stato fisiologico di immuno-tolleranza; è noto che nella donna gravida affetta da sclerosi multipla si verifica una significativa riduzione del rischio di riacutizzazione di malattia⁽²⁷⁾, mentre, nel primo trimestre successivo al parto, si verifica un significativo aumento del rischio di attacchi; si ipotizza che la ridotta attività di malattia sia la conseguenza di una down-regolazione dell'immunità cellulomediata associata alla gravidanza, durante la quale si assiste ad uno shift verso un pattern citochinico di tipo Th2, ossia anti-infiammatorio. Molti sono i meccanismi coinvolti in tale shift, tra questi verosimilmente hanno un ruolo gli estrogeni.

Al momento non vi sono studi volti ad indagare a livello molecolare il fenomeno della gravidanza nella SM; da qui è nato l'interesse del nostro Centro nella ricerca di eventuali modificazioni geniche sottostanti al diverso andamento della patologia durante e dopo la gravidanza; pertanto è stato condotto uno studio con approccio genomico su donne affette da SM⁽³²⁾ e controlli sani (21 donne comparabili per età), seguite durante la loro gravidanza; le donne sono state sottoposte ad un prelievo ematico prima dell'inizio della gravidanza e poi ogni trimestre fino al primo trimestre dopo il parto e sui linfomonociti ematici è stata condotta un'analisi trascrizionale ad ampio spettro al fine di individuare geni associati alla SM che modificano il loro profilo di espressione durante la gravidanza.

L'analisi⁽¹²⁾ ha identificato la presenza di 347 geni che hanno un profilo di espressione significativamente alterato nelle donne non gravide affette da SM rispetto alle donne non gravide sane. L'analisi dei dati è proseguita con

la identificazione, fra i 347 geni, dei geni la cui espressione è “normalizzata” dalla gravidanza, considerando la gravidanza come “una terapia” per la SM. Questo approccio ha permesso di identificare in particolare otto geni che sono: SOCS2 (suppressor of cytokine signaling-2), TNFAIP3 (tumor necrosis factor alpha-induced protein-3), NR4A2 (nuclear receptor subfamily-4 member-2), CxCR4 (CXC chemokine receptor-4), ZFP36L1 (zinc-finger protein 36 C3H type-like-1), POLR2J (polymerase (RNA) II polypeptide J), FAM49B (family with sequence similarity-49 member-B) e STAG3L1 (stromal antigen-3 like-1). Per sette di questi geni (tutti tranne ZFP36L1) il dato è stato confermato mediante la quantificazione con tecnica RT-PCR (Figura 3). In particolare, prima della gravidanza 4 geni (TNFAIP3, NR4A2, SOCS2 e CxCR4) sono down-regolati nelle donne affette rispetto alle donne sane, mentre 3 geni (POLR2J, STAG3L1 e FAM49B) sono up-regolati nelle pazienti rispetto ai controlli sani. Tale deregolazione viene completamente persa durante la gravidanza, ossia, già a partire dal terzo trimestre, si osserva una “normalizzazione” dell’espressione genica dei sette geni, che quindi perdono completamente il loro ruolo discriminante tra pazienti e controlli; nel primo trimestre dopo il parto si assiste nuovamente ad un differente profilo di espressione.

Alcuni di questi geni (POLR2J, STAG3L1 e FAM49B) codificano per proteine le cui funzioni non sono note, mentre 4 geni (SOCS2, TNFAIP3, NR4A2 e CxCR4) svolgono una importante funzione di regolazione dell’infiammazione, in particolare sono in grado di diminuire l’entità dell’infiammazione. È importante sottolineare che tutti questi 4 geni sono sotto-espressi nella SM, suggerendo che nella malattia la capacità di frenare e bloccare l’infiammazione sia alterata, il che può portare ad una situazione di cronica infiammazione che favorirebbe la degenerazione neuronale ed assonale. Inoltre, la maggior parte di questi geni è regolata dagli estrogeni ed alcuni sono stati associati, oltre che alla SM, ad altre patologie autoimmuni. Un altro aspetto interessante emerso da questo studio è rappresentato dal fatto che il profilo di espressione genica è diverso nelle pazienti con riacutizzazione di malattia rispetto a quelle libere da attacchi; in quanto, nelle prime l’espressione genica era sovrapponibile a quella dei controlli in tempi più lunghi, precisamente al sesto o nono mese di gravidanza, mentre nel secondo gruppo già al terzo mese. In conclusione questo studio, per la prima volta, ha analizzato a livello trascrizionale la riduzione dell’attività di malattia correlata alla gravidanza, individuando una possibile strada per lo sviluppo anche di nuove strategie terapeutiche.

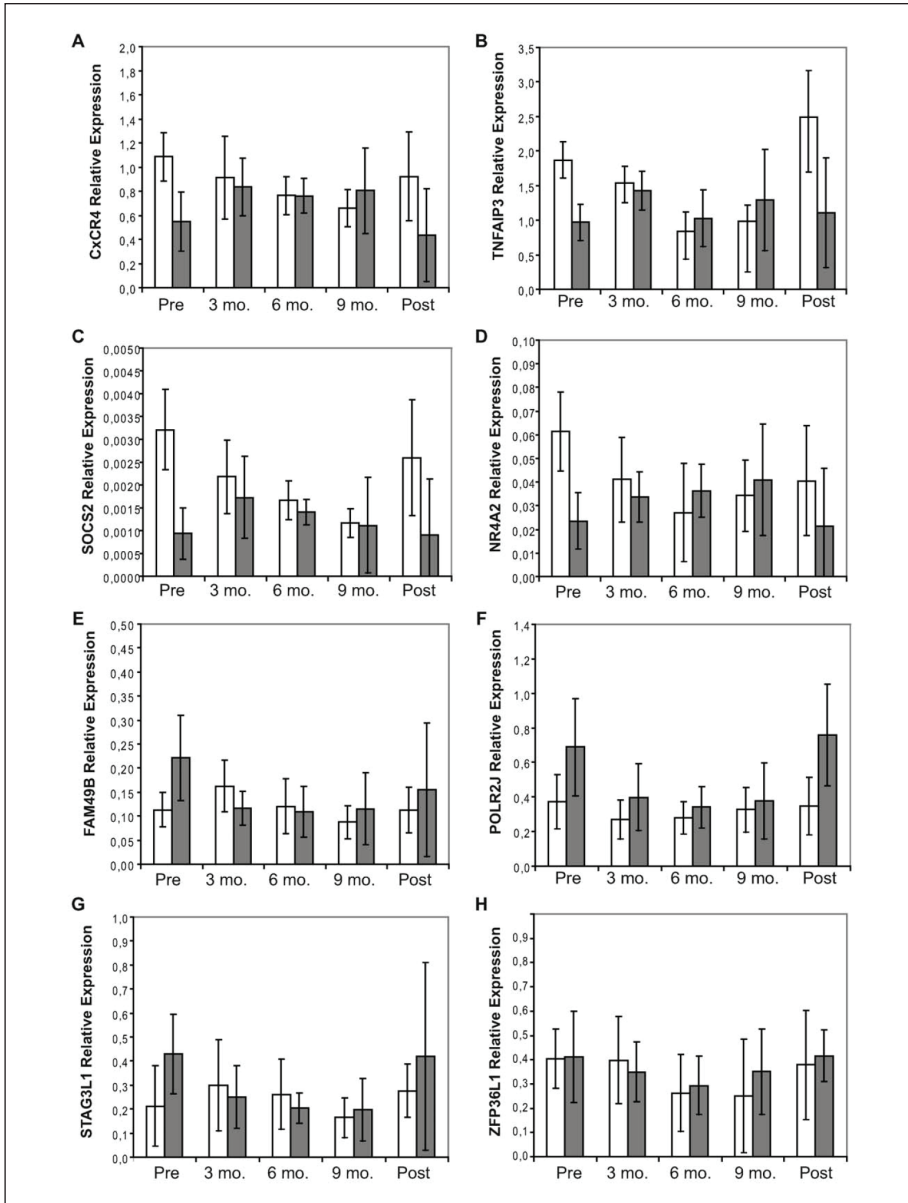


Figura 3. Profilo di espressione genica nelle pazienti e nei controlli sani. Confronto dei profili di espressione dei geni (A) CxCR4, (B) TNFAIP3, (C) SOCS2, (D) NR4A2, (E) FAM49B, (F) POLR2J, (G) STAG3L1 e (H) ZFP36L1 nei PBMCs ottenuti da controlli sani (colonne vuote) e pazienti affette da SM (colonne piene), seguite durante la gravidanza. I profili di espressione genica sono confermati con metodica RT-PCR per tutti i geni tranne che per ZFP36L1 (H). (Da Gilli et al. 2010).

CONCLUSIONI

La farmacogenomica della SM è in una fase iniziale, al momento l'unico marker utilizzabile nella pratica clinica quotidiana è rappresentato dalla misurazione del mRNA MxA nei PBMC dopo un anno di trattamento. Tuttavia nuovi ed interessanti studi stanno indagando altri markers che, in un futuro non lontano, potranno aiutare il neurologo a scegliere il farmaco più indicato per ogni singolo paziente.

BIBLIOGRAFIA

1. Antonelli G, Bagnato F, Pozzilli C, Simeoni E, Bastianelli S, Correnti M, De Pisa F, Fieschi C, Gasperini C, Salvetti M, Dianzani F: *Development of Neutralizing Antibodies in Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Treated with IFN-β1a*. J. Interferon Cytokine Res. 1998; 18: 345-350.
2. Antonelli G, Simeoni E, Bagnato F, Pozzilli C, Turriziani O, Tesoro R, Di Marco P, Gasperini C, Fieschi C, Dianzani F: *Further study on the specificity and incidence of neutralizing antibodies to interferon in relapsing remitting multiple sclerosis patients treated with IFN beta-1a or IFN beta-1b*. J. Neurol. Sci. 1999; 168: 131-136.
3. Baranzini SE, Mousavi P, Rio J, Caillier SJ, Stillman A, Villoslada P, Wyatt MM, Comabella M, Greller LD, Somogyi R, Montalban X, Oksenberg JR: *Transcription-based prediction of response to IFN-β using supervised computational methods*. PloS Biol. 2005; 3, e2.
4. Bertolotto A, Gilli F, Sala A, Audano L, Castello A, Magliola U, Melis F, Giordana MT: *Evaluation of bioavailability of three types of IFN beta in multiple sclerosis patients by a new quantitative-competitive-PCR method for MxA quantification*. J. Immunol. Methods. 2001; 256: 141-152.
5. Bertolotto A, Gilli F, Sala A, Capobianco M, Malucchi S, Milano E, Melis F, Marnetto F, Lindberg RLP, Bottero R, Di Sapio A, Giordana MT: *Persistent neutralizing antibodies abolish the interferon β bioavailability in MS patients*. Neurology 2003; 60: 634-639.
6. Bertolotto A, Malucchi S, Sala A, et al. *Differential effects of three interferon betas on neutralising antibodies in patients with multiple sclerosis: a follow up study in an independent laboratory*. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 2002; 73: 148-153.

7. Bertolotto A, Sala A, Malucchi S, Marnetto F, Caldano M, Di Sapio A, Capobianco M, Gilli F: *Biological activity of interferon betas in patients with multiple sclerosis is affected by treatment regimen and neutralising antibodies*. JNNP. 2004; 75: 1294-1299.
8. Comabella M, Lünemann JD, Río J, Sánchez A, López C, Julià E, Fernández M, Nonell L, Camiña-Tato M, Deisenhammer F, Caballero E, Tortola MT, Prinz M, Montalban X, Martin R: *A type I interferon signature in monocytes is associated with poor response to interferon- β in multiple sclerosis*. Brain. 2009; 132: 3353-3365.
9. Deisenhammer F, Reindel M, Harvey J, Gasse T, Dilitz E, Berger T: *Bioavailability of interferon beta 1b in MS patients with and without neutralizing antibodies*. Neurology. 1999; 52, 1239-1243.
10. FDA, Guidance for Industry, E15 Definitions for Genomic Biomarkers, Pharmacogenomics, Pharmacogenetics, Genomic Data and Sampling coding Categories, CDER, CBER, April 2008.
11. Gilli F, Bertolotto A, Sala A, Hoffmann F, Capobianco M, Malucchi S, Glass T, Kappos L, Lindberg RLP, Leppert D: *Neutralising antibodies against IFN- β in MS: antagonisation of IFN- β mediated suppression of MMPs*. Brain 2004; 127: 259-268.
12. Gilli F, Lindberg RLP, Valentino P, Marnetto F, Malucchi S, Sala A, Capobianco M, di Sapio A, Sperli F, Kappos L, Calogero RA, Bertolotto A: *Learning from Nature: Pregnancy Changes the Expression of Inflammation-Related Genes in Patients with Multiple Sclerosis*. PloS ONE 2010; 5: e8962.
13. Gilli F, Marnetto F, Caldano M, Sala A, Malucchi S, Di Sapio A, Capobianco M, Bertolotto A: *Biological responsiveness to first injection of interferon- β in patients with multiple sclerosis*. J Neuroimmunol. 2005; 158: 195-203.
14. Gilli F, Marnetto F, Caldano M, Valentino P, Granieri L, Di Sapio A, Capobianco M, Sala A, Malucchi S, Kappos L, Lindberg RL, Bertolotto A: *Anti-interferon- β neutralising activity is not entirely mediated by antibodies*. J Neuroimmunol. 2007; 192: 198-205.
15. Gilli F, Valentino P, Caldano M, Granieri L, Capobianco M, Malucchi S, Sala A, Marnetto F, Bertolotto, A: *Expression and regulation of IFN α/β receptor in IFN β -treated patients with multiple sclerosis*. Neurology; 2008; 71: 1940-1947.
16. Hardman JG, Limbird LE: *The pharmacological basis of therapeutics*. 9th edition, 633-5. McGraw Hill 1996. New York, NY, USA.
17. Malucchi S, Gilli F, Caldano M, Marnetto F, Valentino P, Granieri L, Sala A, Capobianco M, Bertolotto A. *Predictive markers for response to interferon therapy in patients with multiple sclerosis*. Neurology 2008; 70: 1119-1127.
18. Pachner AR, Bertolotto A, Deisenhammer F: *Measurement of MxA mRNA or protein as a biomarker of IFN β bioactivity. Detection of antibody-mediated decreased bioactivity (ADB)*. Neurology 2003; 61(Suppl 5): S24-S26.
19. Pachner A, Narayan K, Price N, Hurd M, Dail D: *MxA gene expression analysis as an interferon- β bioactivity measurement in patients with multiple sclerosis and the identification of antibody-mediated decreased bioactivity*. Mol Diagn. 2003; 7: 17-25.
20. Rudick RA, Simonian NA, Alam JA, Campion M, Scaramucci JO, Jones W, Coats ME, Goodkin DE, Weinstock-Guttman B, Herndon RM, Mass MK, Richert JR, Salazar AM, Munschauer FF 3rd, Cookfair DL, Simon JH, Jacobs LD: *Incidence and significance of neutralizing antibodies to interferon beta 1a in multiple sclerosis*. Neurology; 1998; 50: 1266-1272.

21. Scagnolari C, Bellomi F, Turriziani O, Bagnato F, Tomassini V, Lavalpe V, Ruggieri M, Bruschi F, Meucci G, Dicuonzo G, Antonelli G: *Neutralizing and binding antibodies to IFN-beta: relative frequency in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with different IFN-beta preparations.* J Interferon Cytokine Res. 2002; 22: 207-213.
22. Sørensen PS, Deisenhammer F, Duda P, Hohlfeld R, Myhr KM, Palace J, Polman C, Pozzilli C, Ross C; EFNS Task Force on Anti-IFN-beta Antibodies in Multiple Sclerosis: *Guidelines on use of anti-IFN-b antibody measurements in multiple sclerosis: report of an EFNS Task Force on IFN-b antibodies in multiple sclerosis.* Eur J Neurol. 2005b; 12: 817-827.
23. Sorensen PS, Koch-Henriksen N, Ross C, Clemmesen KM, Bendtzen K, Danish Multiple Sclerosis Study Group: *Appearance and disappearance of neutralizing antibodies during interferon-beta therapy.* Neurology 2005; 65: 33-39.
24. Sorensen PS, Ross C, Clemmensen KM, Bendtzen K, Frederiksen JL, Jensen K, Kristensen O, Petersen T, Rasmussen S, Ravnborg M, Stenager E, Koch-Henriksen N, Danish Multiple Sclerosis Study Group: *Clinical importance of neutralizing antibodies against interferon beta in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis.* Lancet 2003; 362: 1184-1191.
25. Sturzebecher S, Wandinger KP, Rosenwald A, Sathyamoorthy M, Tzou A, Mattar P, Frank JA, Staudt L, Martin R, McFarland HF: *Expression profiling identifies responder and non-responder phenotypes to interferon-beta in multiple sclerosis.* Brain 2003; 126: 1419-1429.
26. Vallittu AM, Halminen M, Peltoniemi J, Ilonen J, Julkunen I, Salmi A Erälinna JP and the Finnish Beta-Interferon Study Group: *Neutralizing antibodies reduce MxA protein induction in interferon beta-1-a-treated MS patients.* Neurology 2002; 58: 1786-1790.
27. Vukusik S, Hutchinson M, Hours M, Moreau T, Cortinovis-Tourniaire P, Adeleine P, Confavreux C, The Pregnancy In Multiple Sclerosis Group; Pregnancy In Multiple Sclerosis Group: *Pregnancy and multiple sclerosis (the PRIMS Study): clinical predictors of post-partum relapse.* Brain 2004; 127: 1353-1360.

LA RADIOTERAPIA GUIDATA DALLE IMMAGINI: IGRT

Umberto Ricardi, Andrea Riccardo Filippi, Riccardo Ragona

Radioterapia - Università degli Studi di Torino
Azienda Ospedaliero-Universitaria S. Giovanni Battista di Torino

Key words: *Image-Guided Radiotherapy / Radioterapia guidata
dalle immagini
3D Conformal Radiotherapy / Radioterapia conformazionale
Intensity-Modulated / Radioterapia ad
Radiation Therapy intensità modulata*

Abstract:

An inherent goal of all radiotherapy treatment is delivering radiation doses to the target volumes as planned. Because of setup errors, changes in tumour position, size and shape during and between fractions, residual uncertainties in the position of tumour and healthy tissues still persist. Thus, safe margins to the tumour volume including the healthy tissues are needed. Image-guided radiation therapy (IGRT), by means of precise and sophisticated tumour volume localization techniques, can lead to a reduction of healthy tissue volumes included in radiation fields (leading to a decrease in both acute and late toxicity) while maintaining the prescribed dose to the tumour or eventually enabling dose escalation to enhance tumour control. Different technical approaches have been used in recent years, and clinical data are now available showing that the advantage is not only theoretical (mainly in terms of reduced toxicity). Image-guided radiation therapy has a key-role in modern advanced radiation oncology and has a potential growing impact on future treatment protocols.

Riassunto:

Nella maggior parte dei trattamenti radioterapici, per riuscire a irradiare il bersaglio tumorale con dosi adeguate è necessario aggiungere dei margini di sicurezza. Tali margini sono necessari per compensare eventuali errori di posizionamento quotidiano del paziente e di spostamento del bersaglio o di modifica delle sue dimensioni, sia tra una seduta e l'altra sia durante la stessa seduta. Tali margini di sicurezza rendono purtroppo inevitabile irradiare anche una certa quota di tessuti non neoplastici adiacenti alla lesione tumorale. La radioterapia guidata dalle immagini ha lo scopo di ridurre questi margini

attraverso una precisa e sofisticata localizzazione quotidiana del bersaglio mediante diverse tecniche di immagine, consentendo un aumento delle dosi somministrate, con più elevate probabilità di controllo tumorale, e una riduzione della tossicità acuta e tardiva secondaria al trattamento. Sono ad oggi disponibili differenti soluzioni tecniche e soprattutto dati importanti relativi alle prime esperienze cliniche in questo campo, che dimostrano come il vantaggio teorico si traduca poi in reale impatto terapeutico in termini di riduzione di tossicità. La radioterapia guidata dalle immagini è quindi ad oggi una realtà, con la possibilità di ulteriori sviluppi applicativi supportati dalla sempre maggior implementazione di protocolli sperimentali.

INTRODUZIONE

La probabilità di controllo tumorale ($TCP = \textit{Tumor Control Probability}$) ottenibile con un trattamento radioterapico è proporzionale alla dose di radiazioni somministrata. Il fattore limitante l'intensificazione della dose ai fini di un maggior effetto anti-neoplastico è rappresentato dal danno iatrogeno nei confronti dei tessuti sani; infatti, il volume di tessuto sano irradiato rappresenta il parametro fondamentale nello sviluppo della tossicità radio-indotta. Così come è funzione della dose la probabilità di controllo del tumore, risulta infatti funzione della dose anche la probabilità di complicanze a carico dei tessuti sani ($NTCP = \textit{Normal Tissue Complication Probability}$). La separazione tra le due curve sigmoidi dose-risposta, per le quali l'effetto di *cell-killing* è espresso dal modello lineare-quadratico, rappresenta il cosiddetto Indice Terapeutico (IT).

Tradizionalmente, il volume irradiato comprende il volume tumorale macroscopico ($GTV = \textit{Gross Tumor Volume}$) e l'area a rischio di diffusione microscopica ($CTV = \textit{Clinical Target Volume}$): per assicurare una adeguata copertura dosimetrica, tale CTV viene espanso con l'aggiunta di un ulteriore margine per compensare gli errori di *set-up* giornaliero relativi al posizionamento del paziente ed ai movimenti d'organo respiratori e/o per processi fisiologici (ad esempio diverse condizioni di replezione del retto e della vescica per quanto riguarda la prostata), con l'ottenimento del cosiddetto Planning Target Volume (PTV), su cui viene prescritta la dose radioterapica.

L'evoluzione tecnica della radioterapia ha consentito notevoli progressi in termini di precisione balistica del trattamento stesso; infatti è oggi possibile, grazie al continuo sviluppo dei sistemi di calcolo della dose ed alla sempre maggior sofisticazione delle modalità di somministrazione del trattamento radiante (radioterapia con modulazione di intensità = IMRT), ottenere delle distribuzioni di dose ad elevata conformazione in termini di copertura del volume neoplastico e risparmio dei tessuti sani circostanti, con sempre maggior attenzione all'aspetto che forse costituisce l'obiettivo primario della radioterapia: la riduzione della tossicità ed il miglioramento del controllo di malattia.

Tuttavia, per ridurre ulteriormente il volume di tessuti sani intenzionalmente irradiato, è necessario ridurre il PTV stesso; se da un lato il progresso delle metodiche di *imaging*, morfologico e funzionale, contribuisce ad una più accurata definizione del CTV, diventa sempre più importante e necessario cercare di ridurre i margini di espansione dal CTV al PTV; tali margini sono il risultato del bilancio tra la necessità di colpire tutto il volume neoplastico ad ogni seduta di radioterapia e la necessità di ridurre comunque al minimo il volume di tessuto sano irradiato; più stretti saranno tali margini, più bassa

sarà la probabilità di complicanze a carico dei tessuti sani (ma tanto più alta sarà la probabilità di imprecisione del trattamento stesso, e quindi di una minor TCP). Se si eliminassero i problemi legati all'incertezza del *set-up* per il riposizionamento giornaliero del paziente e si ovviasse al problema dei movimenti d'organo inter- ed intra-frazione, non vi sarebbe alcuna necessità di aggiungere dei margini dal CTV al PTV, e quindi di includere intenzionalmente tessuti sani nel volume irradiato.

La recente integrazione dei processi di trattamento radioterapico con tecniche di acquisizione di immagini rende possibile la visualizzazione dell'anatomia del paziente immediatamente prima di somministrare ogni singola frazione di dose, ottenendo quindi in tempo reale una precisa localizzazione del volume bersaglio e dei suoi rapporti con gli organi critici. Questa modalità terapeutica, definita come "Radioterapia Guidata dalle Immagini" (*Image-guided Radiation Therapy*: IGRT)⁽¹⁾, ha quindi il potenziale di assicurare che, per ciascuna frazione erogata, la posizione del target sia esattamente la stessa di quanto previsto nel piano di trattamento, e che non ci si limiti, come accade attualmente anche in presenza di sofisticate tecniche radioterapiche (radioterapia conformazionale e radioterapia con modulazione di intensità), a considerare corretta la centratura di un paziente facendo riferimento solo a reperi anatomici ossei.

Come conseguenza di tutto ciò, i margini del PTV possono essere significativamente ridotti utilizzando programmi di IGRT, con conseguente importante riduzione del volume irradiato; ad esempio, immaginando per un volume neoplastico sferico di 5 cm di diametro una riduzione dei margini di espansione CTV-PTV da 20 mm a 5 mm, si potrà ottenere una riduzione del volume irradiato da 316 cm³ a 48 cm³.

L'IGRT sembra pertanto in grado di abbattere quegli ostacoli che hanno finora reso difficile l'impiego clinico di margini più stretti intorno al tumore e il ricorso a dosi più elevate, annullando quelle componenti di incertezza del trattamento radioterapico secondarie ad errori nel *set-up* del paziente e ai cosiddetti movimenti d'organo.

CONSIDERAZIONI CLINICHE

In una significativa percentuale di situazioni oncologiche, la dose biologica di radiazioni necessaria ad eradicare una malattia neoplastica non può essere somministrata, principalmente a causa dell'elevata probabilità di insorgenza di effetti tossici secondari al danno attinico ai tessuti sani; ad esempio, nel cancro della prostata, la dose al retto limita i programmi di intensificazione

della dose, mentre, nel caso dei tumori polmonari, dove i risultati terapeutici sono ancora ben lontani dall'essere considerati soddisfacenti, l'esofago ed il tessuto polmonare sano rappresentano gli organi critici dose-limitanti.

Il principale obiettivo della ricerca clinica in radioterapia oncologica è pertanto cercare di ottimizzare l'Indice Terapeutico, ovvero il rapporto TCP/NTCP, indipendentemente dalla associazione della radioterapia con altre modalità di cura.

L'utilizzo contemporaneo di tecniche ad alto gradiente di dose quali la radioterapia con modulazione di intensità, associato all'uso di margini più stretti per il PTV reso possibile dalla radioterapia guidata dalle immagini, consente in linea teorica una intensificazione della dose al target neoplastico con contemporanea riduzione dell'esposizione degli organi critici.

Come già ricordato in precedenza, l'IGRT assicura un significativo miglioramento della precisione del trattamento radioterapico attraverso una frequente visualizzazione diretta del target neoplastico e/o dei tessuti sani, appena prima di ogni singola seduta, con immediato eventuale intervento correttivo di ri-centratura del paziente.

In sintesi, l'IGRT può rispondere a diversi scopi⁽¹⁾:

- consentire una riduzione dei margini di espansione dal CTV al PTV (con conseguente e significativa riduzione del volume irradiato);
- consentire l'esatta conoscenza in tempo reale dell'anatomia della regione trattata durante la somministrazione dell'irradiazione, condizione indispensabile per garantire programmi di dosimetria in vivo e l'utilizzo sicuro di schemi di ipofrazionamento;
- permettere interventi adattativi nel corso del trattamento, in funzione della verifica giornaliera di eventuali modificazioni della lesione neoplastica quali conseguenza di risposta alla radioterapia.

Le prime esperienze cliniche di IGRT hanno riguardato protocolli di intensificazione della dose (*dose-escalation*) nel cancro della prostata^(2,3), con l'ottenimento di migliori tassi di controllo biochimico e contestuale prevenzione di un aumento delle complicanze a carico di retto e vescica. Analogamente, nei tumori della testa e del collo (rinofaringe ed orofaringe)⁽⁴⁾, il ricorso alla IGRT, giustificato dalla necessità di ridurre la dose alle ghiandole salivari maggiori, ha consentito di ridurre significativamente l'incidenza della xerostomia, con conseguente miglioramento della qualità di vita dei pazienti guariti. Esistono anche recenti dimostrazioni di una riduzione della tossicità acuta enterica ed urinaria ottenuta grazie al ricorso a metodiche di IGRT in protocolli di radioterapia preoperatoria nel cancro del retto, così come

di riduzione della tossicità acuta cutanea nell'irradiazione della mammella condotta con IMRT-IGRT.

Infine, proprio per la possibilità di somministrare la radioterapia in maniera così precisa, è attualmente in corso una rivisitazione dei concetti della radiobiologia e, con essa, degli schemi di frazionamento abitualmente utilizzati. Normalmente e da molti anni, i programmi di radioterapia curativa comportano la somministrazione di 30-40 sedute quotidiane di 1.8-2 Gy ciascuna (cosiddetto frazionamento convenzionale); l'uso di piccole dosi/frazione risparmia infatti i tessuti sani più delle cellule tumorali, mentre l'uso di dosi/frazione >2 Gy aumenta la probabilità di danno sui tessuti sani (NTCP); pertanto, da ormai più di 30 anni, sono stati virtualmente eliminati dall'uso clinico schemi di ipofrazionamento della dose, proprio per limitare la probabilità di complicanze a carico dei tessuti sani. Poiché l'IGRT consente un significativo risparmio fisico-dosimetrico dei tessuti sani, il concetto dell'ipofrazionamento diventa oggi totalmente rivisitabile; l'uso di dosi per frazione elevate consente una riduzione della durata globale del trattamento, grazie all'accelerazione dello stesso, che riduce il fenomeno del ripopolamento delle cellule neoplastiche (possibile causa di radio resistenza), portando ad un potenziale aumento della TCP. Esperienze iniziali di IGRT nel carcinoma della prostata hanno consentito di dimostrare un'equivalenza in termini di risultati e tossicità di tali schemi ipofrazionati (5 settimane di trattamento) rispetto a programmi di IGRT con frazionamento convenzionale (8 settimane).

L'esasperazione massima dell'ipofrazionamento è rappresentata dallo sviluppo recente di programmi di radioterapia stereotassica extracranica, che comportano la somministrazione di un limitatissimo numero di frazioni ad elevata dose (esempio: 45 Gy in 3 frazioni; 25 Gy in seduta singola); tali schemi, utilizzati in situazioni oncologiche in cui il bersaglio neoplastico sia di volume ragionevolmente limitato e di morfologia sferica, ottengono una vera e propria ablazione radio-indotta del tessuto tumorale, rappresentando una vera alternativa alla chirurgia nel caso di lesioni focali epatiche e di tumori polmonari o consentendo di esplorare nuove indicazioni radioterapiche.

IGRT: SOLUZIONI TECNICHE

Le prime vere esperienze di IGRT, intesa in senso stretto come la possibilità di verificare la corretta centratura della lesione neoplastica e non solo del paziente, sono recenti. Inizialmente, la prima soluzione è stata quella di rendere visibile una lesione neoplastica mediante il posizionamento al suo interno di reperi radio-opachi, visualizzabili nelle abituali immagini portalì;

il limite di tale approccio consiste ovviamente nell'invasività dell'approccio e nel fatto che solo poche lesioni tumorali possono subire il posizionamento di *markers* radiopachi. Analogamente, sono utilizzabili solo in specifiche situazioni anatomiche metodi di *imaging* ecotomografico per visualizzare il target neoplastico; tale approccio è stato usato sinora quasi esclusivamente nel cancro della prostata, dove effettivamente si è confermato utile come strumento di guida per la conduzione in sicurezza clinica di schemi di ipofrazionamento.

La vera IGRT si riferisce però oggi a soluzioni rappresentate da acceleratori lineari dedicati con diverse opzioni tecniche per la visualizzazione del *target* neoplastico disponibili nel bunker di trattamento, quali:

- tubi radiologici ortogonali (strutture surrogate quali *markers* radiopachi impiantati o reperi ossei sono richieste per acquisire informazioni sulla posizione anatomica del *target* neoplastico) (Figura 1).
- TC a “*slice*” singola con Megavoltaggio (Tomoterapia: l'acceleratore lineare montato nel *gantry* funziona contemporaneamente per la fase di *imaging*, mediante appositi detettori e con fascio di energia ridotta, e per la fase di trattamento attraverso apposito collimatore binario e traslazione del lettino TC) (Figura 2).
- TC volumetrica *Cone-Beam* con Kilovoltaggio (i moderni acceleratori lineari nascono oggi con una struttura aggiuntiva *on-board*, rappresentata da un tubo radiogeno e da un sistema di detettori, montata perpendicolarmente all'asse del fascio d'irradiazione) (Figura 3).

Ciascuna delle soluzioni presentate ha vantaggi e svantaggi⁽⁵⁾, in termini di costi dell'apparecchiatura, qualità dell'*imaging* diagnostico (risoluzione spaziale, visualizzazione dei tessuti molli, informazioni anatomiche sugli organi critici), rapidità di rilevazione delle immagini, supplemento di dose necessario all'acquisizione delle immagini diagnostiche.

CONCLUSIONI

Quale conseguenza di una tumultuosa innovazione tecnologica, è ad oggi possibile in radioterapia ottenere informazioni dettagliate circa la traslazione, la deformazione, la rotazione del bersaglio tumorale e degli organi a rischio mediante differenti soluzioni tecniche di *imaging* integrato. Sulla base di tali informazioni, ottenibili con cadenza giornaliera, è possibile correggere *on-line* o *off-line* la posizione del paziente, per esempio modificando la posizione del lettino di trattamento, o adattare di giorno in giorno il piano di cura

radioterapico. Tali modalità di correzione consentono una somministrazione della dose sempre più precisa e accurata, riducendo in modo importante la potenziale tossicità radio-indotta e consentendo di aumentare le dosi e conseguentemente la probabilità di controllo tumorale.

BIBLIOGRAFIA

1. Dawson LA, Jaffray DA: *Advances in Image-Guided Radiation Therapy*. J. Clin. Oncol. 2007; 25: 938-944.
2. Mackie TR, Kapatoes J, Ruchala K: *Image guidance for precise conformal radiotherapy*. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2003; 56: 89-105.
3. Ramos Poli E, Parker W, Patrocinio H, Souhami L, Shenouda G, Lucente Campos L, Poggorsak EB: *An assessment of PTV margin definitions for patients undergoing conformal 3D external beam radiation therapy for prostate cancer based on an analysis of 10,327 pretreatment daily ultrasound localizations*. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2007; 65: 1430-1437.
4. Rasch C, Steenbakkers R, Van Herk M: *Target definition in Prostate, Head, and Neck*. Semin. Radiat. Oncol. 2005; 15: 136-145.
5. Van Herk M: *Different Styles of Image-Guided Radiotherapy*. Semin. Radiat. Oncol. 2007; 17: 258-267.

PROMOZIONE DELLA SALUTE NUOVA SFIDA PER LA MEDICINA

Sante Bajardi, Luigi Resegotti

Confederazione Italiana per la Promozione della Salute CIPES Piemonte

Key words: *Disease prevention / Prevenzione*
 Health promotion / Promozione salute
 Empowerment / Valorizzazione
 Chart of Ottawa / Carta di Ottawa
 Chart of Tallinn / Carta di Tallin
 Cost benefit balance / Bilancio costo-benefici

Abstract:

In recent years, under the pressure of WHO attention moved formerly from the diagnosis and therapy of diseases to their prevention and lastly to the promotion of the wellbeing not only physical but also mental, social and spiritual of everybody. Prevention activities are addressed to general population and consist mainly in contrasting the negative determinants of health. The main actors are politicians. Health promotion is concerned more with the wellbeing of individuals and the main actors are physicians. The specificity of health promotion requires to outrun evidence based medicine as most criteria from homogeneity of the population, to the clear definition of evaluation parameters and the standard deviation cannot be met. In 1986 the Chart of Ottawa singled out "empowerment" as the main tool for health promotion and in 2009 the Chart of Tallinn recognized quality of life as the target of any action. Duties and rights for health are inseparable. The responsibility of every member of the society in building the health for all, the cost / benefit balance as the criterion for every choice, the informed consent for giving a central role to the patient are the basement stones of health promotion. An Academy of Medicine must be distinguished from an Academy of Science as it puts the man at the centre.

Riassunto:

Negli ultimi anni, sotto la spinta dell'OMS, l'attenzione è andata spostandosi dapprima dalla diagnosi e terapia delle malattie alla loro prevenzione e ora alla promozione del benessere non solo fisico, ma anche mentale, sociale e spirituale della persona.

Nella prevenzione le attività sono rivolte alla popolazione, le azioni sono prevalentemente di contrasto ai determinanti negativi e i protagonisti sono i politici, nella promozione della salute le attività sono rivolte alla persona e i protagonisti devono essere i medici. La specificità della promozione richiede il superamento della medicina basata sulle prove, in quanto non sono soddisfatti i criteri di omogeneità della popolazione in esame, della perfetta definizione dei criteri di valutazione e dei limiti statistici delle oscillazioni dei risultati. Nel 1986 la Carta di Ottawa ha individuato nella valorizzazione della persona lo strumento per la promozione della salute e nel 2009 la Carta di Tallinn ha riconosciuto come traguardo la qualità della vita. Diritti o doveri per la salute sono inscindibili. La responsabilizzazione di ogni membro della società per costruire il benessere di tutti, il bilancio costo/benefici come criterio per ogni scelta e il consenso informato per restituire la centralità al paziente sono le pietre fondamentali della promozione della salute e una Accademia di Medicina deve distinguersi da una Accademia delle Scienze perché mette la centro l'uomo, non la scienza.

È di oggi la notizia che l'Università di Firenze ha avviato un modello innovativo di formazione per gli studenti del Corso di laurea in Medicina e Chirurgia che prevede la frequenza presso le corsie dell'Ospedale di Careggi degli studenti sin dal primo anno di corso quando essi sono ancora digiuni di nozioni mediche in modo di stimolare la loro attenzione per il malato, come persona, prima ancora che come caso clinico, realizzando quanto sia importante nel curriculum formativo di un futuro medico la capacità di vedere in chi ci si trova dinnanzi non solo il portatore di una malattia da curare, ma un individuo che è un valore per se stesso e per gli altri e il cui benessere deve essere ricercato se si vuole veramente promuovere la salute e non semplicemente curare la malattia.

La promozione della salute nasce dalla Dichiarazione di Alma Ata che afferma che la salute non è assenza di malattia, ma benessere completo fisico, psichico e sociale della persona e si radica nella Carta di Ottawa che individua nella sua valorizzazione, nell'empowerment lo strumento per la costruzione della salute attraverso tre azioni: to enable, to mediate, to advocate.

La decisione della Università di Firenze rappresenta qualcosa di veramente rivoluzionario. Finalmente si è compreso che occorre uscire dall'autocompiacimento del sapere medico, della visione orientata alla malattia per cui quel che contano sono i successi scientifici nella conoscenza e nella terapia delle malattie, non il guadagno di salute di quelli che vengono chiamati i pazienti, quando non addirittura i clienti e gli utenti, dimenticandosi che sono individui, persone, cittadini come ben ha detto Erio Ziglio, direttore dell'Ufficio dell'OMS di Venezia per gli investimenti e lo sviluppo per la salute.

Talmente è lontana la corretta visione di cosa è la salute e di quanto debbano fare i medici e le strutture sanitarie per promuoverla che l'Organizzazione Mondiale della Salute ha sentito il bisogno di creare una rete degli Ospedali che promuovono la Salute quasi ad affermare che normalmente la salute non rientra negli interessi degli Ospedali. Dopo 12 anni di attività la rete, che da Europea che era, nel frattempo si è ampliata da un lato coinvolgendo anche Paesi di altri Continenti quali ad esempio il Canada, Taiwan, l'Arabia Saudita e dall'altro includendo anche i Servizi sanitari oltre agli Ospedali, ha ottenuto il riconoscimento di Organizzazione Internazionale Indipendente e si è dotata di una propria costituzione, sottoscritta nel maggio 2008 a Berlino. Chi vi parla rappresenta presso tale Organizzazione gli ospedali e i servizi sanitari piemontesi e coordina il gruppo di lavoro internazionale sulla sicurezza negli Ospedali.

Occorre innanzi tutto dissipare un equivoco che domina l'ambito della promozione della salute. Da un lato si ritiene che vi sia una certa contrapposizione

fra medicina clinica e promozione della salute, la prima dominio dei medici e degli operatori sanitari, la seconda dei politici e di un gran numero di varie professionalità. Dall'altro lato si ritiene che la prevenzione faccia parte della promozione della salute poiché l'una e l'altra operano a monte della comparsa della malattia, mirando ad evitarne la comparsa.

In effetti molte persone che si dicono impegnate nella promozione della salute, operano nel campo della prevenzione. Prevenzione non nel senso classico di evitare la comparsa di malattie, ad esempio con le norme igieniche o con le vaccinazioni, ma in un senso molto più ampio per evitare il danno alla persona prodotto da incidenti sul lavoro o stradali o domestici (lesioni, traumi, ustioni, folgorazioni), dalla polluzione ambientale, dall'uso di sostanze (farmaci, alcool, droghe) da una alimentazione scorretta (eccesso di grassi animali, sale, ecc).

Prevenzione è un concetto negativo, significa operare contro qualcosa che potrebbe determinare un danno, significa assumere un atteggiamento di difesa nei confronti dei determinanti della perdita di salute siano essi esterni (ambiente) o interni (stili di vita).

Promozione è un concetto positivo, significa operare a favore di tutto ciò che dà valore alla vita, all'individuo, alla persona, al cittadino, i tre termini che definiscono l'essere umano, sotto il profilo fisico, psichico e sociale

Credo sia importante aver chiara la differenza fra prevenzione e promozione della salute, la prima essenzialmente operativa, politica, la seconda essenzialmente culturale, medica, come è stato importante qualche anno fa chiarire la differenza fra promozione della salute, sia pure nella ambigua comprensione del suo significato ed educazione sanitaria come attività informativa e formativa.

Comprendere appieno la differenza fra prevenzione e promozione della salute permette di superare contrapposizioni che non hanno ragione di esistere fra diritti e doveri per la salute come fra figure mediche e politiche come attori della salute.

Nell'ambito della prevenzione del danno è innegabile che le azioni sanitarie abbiano un ruolo determinante limitato al 12% delle azioni opportune ed efficaci. Di fronte a tale dato è ben comprensibile che tutti gli Stati membri dell'Unione Europea abbiano sentito il bisogno di produrre il documento del 18 dicembre 2007 "La Salute in tutte le Politiche" per richiamare l'attenzione di tutti coloro che hanno un ruolo nella società civile a svolgere i propri compiti in modo tale da tutelare la salute dei cittadini. La distinzione fra diritti e doveri per la salute concerne più aspetti strategici, i primi puntando maggiormente all'ambiente, i secondi all'individuo, una distinzione che gli

svedesi hanno superato sottolineando che per ogni diritto vi è il dovere di qualcuno di soddisfarlo, come per ogni dovere c'è il diritto della società di goderne i frutti.

Nell'ambito delle promozione della salute la centralità dell'azione è l'incontro fra persone, col riconoscimento reciproco del valore dell'altro, il sostegno dello sviluppo positivo della salute mirato a rendere possibile una buona vita. Il protagonista è l'uomo, non l'istituzione. L'attenzione è rivolta in primo luogo agli aspetti psichici e sociali della salute. Il ruolo centrale è ancora quello del medico, dell'infermiere, dell'assistente sociale, di quelle persone alle quali si sa di potersi rivolgere per esporre i propri bisogni, le proprie preoccupazioni, per condividere tutto ciò che ci impedisce di avere una visione positiva della vita. Parlando di medico non si fa riferimento all'erogatore di servizi, al funzionario della sanità, al tecnico capace di correggere la lesione o il malfunzionamento di un organo. Neppure allo scienziato che sa tutto delle malattie e nulla dell'uomo. Non c'è spazio nella promozione della salute per le statistiche, le banche dati, le politiche per la salute. È ovvio che all'operatore sanitario, in particolare al medico, si richiede una buona preparazione scientifica, una conoscenza delle malattie, una adeguata capacità diagnostica. Le statistiche, le banche dati sono strumenti essenziali nelle sue mani per fare le scelte giuste. Una corretta visione politica e sociale fa del pari parte del suo strumentario per essere utile a chi a lui si rivolge e anche per impostare il suo modo di operare nella società. Ma il buon medico non cura categorie ma individui, dice tu e non voi. La singola persona è per lui più importante di una intera classe, l'egon della polis.

Se quindi è ben giustificato sottolineare il ruolo della politica per la salute sotto l'aspetto delle prevenzione, non vi è dubbio che nella promozione della salute, attività umana e culturale, non politica il ruolo centrale è ancora quello del medico clinico.

In questa sede, mi pare giusto far notare come l'epidemiologo, attento alla salute delle popolazioni, sia un protagonista nella politica per la salute, come il clinico, al servizio della persona, sia il protagonista della promozione della salute.

Un passo importante che dobbiamo fare è quello di riconoscere la centralità della promozione della salute che deve rientrare a pieno titolo negli interessi della nostra Accademia. Da tempo abbiamo dato spazio agli epidemiologi cui sono state affidate importanti relazioni in vari campi, primo fra tutti quello dei tumori, nulla è ancora stato fatto per la promozione della salute.

Il motivo di tale scelta risiede nel fatto che l'epidemiologo fornisce dati statistici scientificamente validati e noi siamo abituati a ragionare in termini

di medicina basata sulle prove. Va detto che mentre nel campo della medicina sperimentale il criterio delle prove è sicuramente ben radicato, in campo clinico spesso non sono soddisfatti i tre criteri che della medicina delle prove dovrebbero essere alla base, che le condizioni a cui si fa riferimento siano fra di loro sufficientemente omogenee da costituire un valido universo di riferimento, che i criteri di valutazione delle condizioni siano ben definiti e costanti e che siano chiaramente individuati i limiti di oscillazione dei valori di riferimento che definiscono l'universo all'interno del quale si possono fare affermazioni sicure. Si presume troppo spesso che individui diversi, con differenti storie personali e cliniche siano trattabili come popolazione omogenea solo perché hanno la stessa malattia, nello stesso stadio e ricevono lo stesso trattamento.

Ciò è vero in tutti i campi della medicina clinica per cui la cosiddetta medicina basata sulle prove è spesso un inganno. Ma lo molto di più nella promozione della salute e Costa ha potuto affermare autorevolmente che non esistono prove nella promozione della salute. Il fatto stesso che l'OMS abbia affermato la responsabilità multisettoriale per la salute dimostra quanto sia inadeguato invocare nelle scienze umane come è la medicina clinica, i criteri delle discipline sperimentali. Come fa autorevolmente osservare Potvin anche queste sono nate dalla forza di convincimenti teorici di persone che hanno avuto capacità di credere e di sperare contro ogni apparenza. In assenza di questi il sole continuerebbe a ruotare intorno alla terra che forse sarebbe ancora piatta.

Credere nella promozione della salute comporta riconoscere la necessità che il mondo accademico e gli ospedali inseriscano tale disciplina nel curriculum formativo dei giovani, come ha fatto la scuola medica fiorentina, e individuino le figure cui affidare tale insegnamento.

Nell'ultima Conferenza Internazionale della rete HPH a Berlino si è svolta una panel discussion sul problema dell'invecchiamento del personale, problema apparentemente poco sentito in Italia dove solo il 31% delle persone della fascia fra 56 e 65 anni lavorano contro il 70% della Svezia. Negli ospedali le persone fra 56 ed 65 anni sono un quarto di tutti i medici, il 17% degli infermieri e il 5% delle infermiere. Ritardare il pensionamento vorrebbe dire offrire meno possibilità di lavoro ai giovani, ma allontanare i medici ultrasessantacinquenni dagli ospedali vuol dire un inaccettabile spreco di risorse e un danno per la Sanità Pubblica in quanto a 66 anni molti medici sono in ottime condizioni fisiche e psichiche e ricchi di esperienza che mettono a disposizione delle cliniche private in cui molti continuano a lavorare e che approfittano di capacità per le quali nulla hanno fatto per costruirle. Affidare a tali medici la promozione della salute, affiancandoli

ai titolari del ruolo di curanti col compito di counselling verso i pazienti, di fornire spiegazioni a malati e ai loro famigliari non solo sulla malattia, ma anche sugli stili di vita e i comportamenti sociali perché questi si sentano maggiormente responsabili della propria salute e perché i giovani imparino che il loro obiettivo non deve essere solo, e neppure soprattutto, la cura della malattia, ma il guadagno di salute di ogni individuo e la qualità di vita di ogni membro delle società costituirebbe una valorizzazione dei medici anziani e una ricchezza per la Sanità pubblica. Ciò potrebbe essere facilmente realizzato a costo zero dilazionando l'erogazione della pensione ai medici che vanno a operare in strutture private o che esercitino l'attività libero-professionale, al momento in cui tale attività dovesse cessare, e incrementando di un 10% il trattamento pensionistico di chi continua ad operare nella struttura pubblica sia pure con orario ridotto. La rete irlandese ha già dichiarato di voler attuare tale politica.

Chi ha fatto della cura dei malati il proprio motivo di vita seguendo i migliori criteri di scientificità, ma non dimenticando i bisogni delle persone non può che restare allibito di fronte al silenzio di tutti i protocolli di cura nei riguardi dei "non responders" anche ai programmi di salvataggio. Fare promozione della salute vuol dire farsi carico di ogni persona perché ogni persona è un valore.

La differenza fra una Accademia delle Scienze e una Accademia di Medicina dovrebbe essere che la prima si occupa solo delle malattie, la seconda dei malati e di chi a loro è vicino. Per un vero medico non basta saper curare, deve saper amare.

NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE PER LE MALATTIE DEL METABOLISMO OSSEO

Roberto Civitelli¹, Nicola Napoli^{1,2}

¹ Division of Bone and Mineral Disease, Department of Internal Medicine
Washington University School of Medicine - St. Louis, MO, USA

² Università Campus Biomedico - Rome, Italy

Key words: *Osteoporosis / Osteoporosi*
 Denosumab / Osteopatie addensanti
 Wnt signaling / Segnale Wnt

Abstract:

Recent advances in cellular and molecular biology of the skeletal system have identified new therapeutic targets for osteoporosis and other metabolic bone disorders. The discovery of the RANK/RANKL system as a critical regulator of osteoclast differentiation and function has led to the development of a neutralizing, fully human antibody, denosumab, as a new anti-resorptive agent for the prevention of osteoporotic fractures. Stimulators of bone formation that can be used as therapeutic agents (osteo-anabolic agents) are still quite limited. However, advances in knowledge on the mechanisms that regulate osteoblast formation, proliferation and function have disclosed new potential targets for therapeutic intervention. The most studied and most promising is the Wnt signaling system. Human and mouse genetics studies have linked some osteosclerotic syndromes presenting with endosteal hyperostosis to single point mutations of the LRP5 gene, a key component of the Wnt signaling system. Thus, interference with LRP5 could be used to achieve an anabolic effect. Currently, the most promising strategy is to inhibit sclerostin, an LRP5 antagonist secreted by osteocytes. Loss-of-function mutations of the sclerostin gene (SOST) cause sclerosteosis and van Buchem disease, both characterized by hyperostosis. More recent studies have shown that the osteo-anabolic action of LRP5 is, at least in part, mediated by an endocrine loop via serotonin secretion by entero-chromaffin cells of the duodenum upon LRP5 activation in the gut, in turn leading to osteoblast proliferation. If these data hold true, then serotonin would be a therapeutic target for bone anabolism. In the future, it may be possible to target skeletal/stromal stem cells to favor their differentiation into osteoblasts as opposed to adipocytes, thus stimulating the regenerative properties of the bone marrow. Thus, the fast progress of bone biology and bio-pharmaceutical technologies holds promise for improved outcomes in the therapy of low bone mass diseases.

Riassunto:

Recenti acquisizioni nel campo della biologia cellulare e molecolare dell'osso hanno permesso di identificare nuovi target terapeutici per il trattamento delle malattie demineralizzanti, in particolare l'osteoporosi. La scoperta del sistema RANK-RANKL come regolatore essenziale della differenziazione osteoclastica ha permesso lo sviluppo di un anticorpo umano, denosumab, come potente e specifico agente anti-riassorbitivo, recentemente introdotto nell'uso clinico per la prevenzione di fratture da osteoporosi. Il campo dei farmaci osteo-anabolizzanti è molto più limitato, ma nuove strategie farmacoterapeutiche stanno emergendo con il progresso delle conoscenze sui meccanismi che regolano la differenziazione e la proliferazione degli osteoblasti. Gli sforzi maggiori, e con alta probabilità di successo, sono quelli volti ad interferire con il sistema di segnalazione Wnt. Studi di genetica molecolare hanno permesso di collegare alcune malattie osteoaddensanti ad una mutazione puntiforme del gene lipoprotein receptor related protein-5 (LRP5), parte integrante del sistema Wnt. Utilizzando anticorpi monoclonali che neutralizzano inibitori del recettore LRP5 è possibile ottenere un effetto osteo-anabolico. La strategia più promettente è quella di inibire la sclerostina, un antagonista di LRP5 prodotto specificamente dagli osteociti, la cui mutazione causa sindromi osteosclerotiche come la sclerostosi e la malattia di Van Buchem. Acquisizioni molto recenti hanno dimostrato che l'effetto osteo-anabolico di LRP5 è, almeno in parte, mediato da un circuito neuro-endocrino che regola la produzione di serotonina da parte delle cellule cromaffine del duodeno, risultando in uno stimolo proliferativo sugli osteoblasti. Questi dati indicano dunque nella serotonina un potenziale target terapeutico osteo-anabolico, anche se dati clinici non esistono ancora. In futuro è ipotizzabile poter intervenire sulle cellule staminali scheletriche, favorendone la differenziazione in osteoprogenitori, stimolando in tal modo le potenzialità rigenerative del midollo osseo. L'orizzonte terapeutico delle malattie demineralizzanti sembra quindi piuttosto incoraggiante, considerando il progresso della biologia del tessuto scheletrico e la messa a punto di nuove tecnologie bio-farmacologiche.

INTRODUZIONE

L'osteoporosi è una malattia ad elevata diffusione con elevati costi sociali, responsabile di significativa morbidità che determina notevole compromissione della qualità di vita. Questa condizione è responsabile di 1.5 milioni di fratture ogni anno, che comprendono un numero superiore a 700.000 fratture vertebrali, 300.000 fratture di femore, e 250.000 fratture di polso. È stato calcolato che solo negli Stati Uniti nel 2002 i costi diretti annuali per le fratture osteoporotiche si sono avvicinati a \$18 miliardi, mentre la proiezione dei costi diretti entro il 2040, si avvicinerà a \$50 miliardi. L'osteoporosi ha un impatto molto negativo sulla qualità di vita, soprattutto per le conseguenze delle fratture vertebrali e d'anca. In Italia si stima che 4 milioni di donne siano affette da osteoporosi e, a causa del generale invecchiamento della popolazione, morbidità, disabilità e mortalità da osteoporosi sono in aumento.

L'armamentario terapeutico corrente per il trattamento e la prevenzione dell'osteoporosi offre diverse classi di farmaci inibitori del riassorbimento osseo, i quali hanno dimostrato un'efficacia terapeutica significativa nel prevenire la perdita ossea post-menopausale e senile, e soprattutto nel ridurre l'incidenza di fratture vertebrali e dell'anca. Tra i farmaci anti-riassorbitivi, quelli più studiati ed utilizzati sono i bisfosfonati, la cui efficacia terapeutica è ormai ben stabilita. L'efficacia dei bisfosfonati nelle terapie a lungo termine è però ancora non del tutto chiara. Dal momento che questi composti si accumulano nel tessuto osseo, esiste la possibilità teorica che a lungo andare l'accumulo del bisfosfonato possa avere effetti negativi sulle proprietà biomeccaniche della matrice minerale e sulla capacità di rimodellamento in casi di frattura. Inoltre, i farmaci anti-riassorbitivi possono prevenire il progredire dell'osteoporosi, ma non sono in grado di rigenerare nuovo tessuto osseo, né di rinforzare le strutture trabecolari o corticali esistenti. Tali effetti sarebbero molto utili per ridurre significativamente il rischio di frattura in casi di demineralizzazione severa. Ad oggi esiste un solo farmaco "anabolico" per l'osso, cioè capace di stimolare la neoformazione ossea, il PTH 1-34 (teriparatide) il quale, somministrato giornalmente per via sottocutanea è in grado di attivare rapidamente la neoformazione ossea e produrre incrementi significativi della massa ossea, migliorando le caratteristiche biomeccaniche dell'osso e riducendo l'incidenza di fratture. Anche questo prodotto ha però alcune limitazioni, ed in particolare il fatto che possa essere somministrato solo per in massimo di 18-24 mesi, nonché anche la necessità di somministrarlo per via sottocutanea giornaliera, ed il costo. Da questo quadro risulta evidente come sia quindi necessario continuare la ricerca sulla biologia del tessuto scheletrico per identificare nuovi bersagli terapeutici allo scopo di ottimizzare

strategie terapeutiche per combattere le conseguenze dell'osteoporosi nel lungo termine.

INIBIZIONE DEL SISTEMA RANK (RECEPTOR ACTIVATOR OF NUCLEAR FACTOR- κ B)/RANKL

Il sistema RANK-RANKL, identificato nella metà degli anni novanta come essenziale per la regolazione della differenziazione, funzione e sopravvivenza degli osteoclasti^(15,26), è diventato un ovvio target terapeutico fin dall'inizio, in quanto rappresenta un sistema non solo necessario ma anche specifico per l'osteoclastogenesi. Il RANKL è una citochina della superfamiglia dei recettori del TNF α , viene prodotto dagli osteoblasti in seguito a stimolazione da ormoni come ad esempio paratormone, o metaboliti attivi della vitamina D, o citochine. Anche i fibroblasti della membrana sinoviale ed alcune classi di linfociti T attivati producono RANKL, anche se la funzione di questa molecola in tali cellule non è ancora del tutto chiarita. Il RANKL si lega al suo recettore, RANK, sito sui precursori degli osteoclasti, inducendone la differenziazione e la fusione in cellule giganti multinucleate ed alla fine stimolando l'attività osteolitica degli osteoclasti maturi, sostenendone anche la sopravvivenza. Dato che il RANKL non è secreto nel fluido extracellulare ma rimane inserito nella membrane cellulare degli osteoblasti, una vicinanza fisica tra osteoblasti e precursori degli osteoclasti è necessaria per l'attivazione di questi ultimi. Del sistema RANK/RANKL fa parte anche la osteoprotegerina (OPG), un recettore che viene secreto anch'esso dagli osteoblasti, e che blocca l'interazione tra RANKL e RANK, inibendo così l'osteoclastogenesi ed inattivando gli osteoclasti maturi. La produzione di RANKL e OPG deve essere finemente regolata sia in quantità che nei tempi per guidare le varie fasi del rimodellamento osseo, permettendo così l'attivazione e successivamente l'inattivazione della fase di riassorbimento passando poi alla fase di neoformazione ossea.

Nell'osteoporosi postmenopausale i cambiamenti che avvengono a livello ormonale portano ad un aumento del RANKL nei confronti dell'OPG, facendo pendere l'ago della bilancia verso un eccessivo riassorbimento, con conseguente aumentata fragilità ossea. Modelli preclinici hanno dimostrato che l'inibizione del RANKL porta ad un significativo miglioramento nella densità ossea corticale e trabecolare. Purtroppo la OPG non si è rivelata una molecola adatta allo sviluppo farmacologico perché ha una emivita ematica molto ridotta. Dopo vari tentativi, è stato sviluppato con successo un anticorpo monoclonale totalmente umano che inibisce il RANKL in modo potente e specifico, il denosumab. Somministrato per via sottocutanea, il denosumab

aumenta la densità minerale ossea a livello vertebrale e dell'anca in donne post-menopausali, un effetto che si registra già dopo 6 mesi dopo la prima dose, e che rimane in atto fintanto che il farmaco viene somministrato⁽²⁰⁾. Denosumab diminuisce drasticamente i marker di riassorbimento osseo, confermando la sua potente azione anti-osteoclastica. Uno studio di fase III, condotto in un largo numero di donne in postmenopausa con osteoporosi ha dimostrato anche l'efficacia del farmaco (60 mg ogni 6 mesi per 3 anni) nella riduzione delle fratture del rachide (68% dopo 3 anni, con una significativa riduzione già dopo 1 anno) e dell'anca (40% a 3 anni), nonché delle fratture non vertebrali (20% a 3 anni)⁽³⁾. Altri studi clinici hanno dimostrato che il denosumab aumenta significativamente la massa ossea in pazienti post-menopausali già trattate con alendronato, riducendone ulteriormente il rimodellamento osseo⁽¹²⁾. Nel 2010 il denosumab è stato approvato dalla Food and Drug Administration degli Stati Uniti come farmaco per prevenire le fratture in donne post-menopausali con osteoporosi, coronando quindi un ciclo che si era aperto solo 15 anni prima con una scoperta di biologia molecolare. Naturalmente restano da valutare l'efficacia a lungo termine e i possibili effetti collaterali conseguenti all'inibizione del RANKL sia nel tessuto scheletrico (soppressione drammatica e continuativa del rimodellamento osseo), sia nel sistema immunitario (aumentata severità delle infezioni cutanee e gastro-intestinali)⁽³⁾.

SISTEMA DI SEGNALE WNT/LRP5 (LIPOPROTEIN RECEPTOR RELATED PROTEIN-5)

Nel campo dei farmaci anabolici, cioè stimolatori della neoformazione ossea, gli sforzi maggiori, e con alta probabilità di successo, sono focalizzati sul sistema di segnalazione Wnt. È questo un sistema di trasduzione del segnale di importanza fondamentale dello sviluppo embrionale dello scheletro, dove tale sistema dirige e modula lo sviluppo dorso-ventrale dell'embrione. Il sistema Wnt è piuttosto complesso, ed esistono molti attivatori ed inibitori extracellulari, che possono funzionare sia come fattori paracrini o autocrini. Fondamentale per il meccanismo di segnalazione Wnt è l'attivazione dei corecettori frizzled e LRP5 o LRP6. Questo rappresenta la cosiddetta via canonica di attivazione Wnt che poi procede all'interno della cellula con l'attivazione della β -catenina, un fattore di trascrizione, sottraendola alla fosforilazione e degradazione nel proteosoma. La β -catenina attivata trasloca nel nucleo, dove si associa con specifici fattori nucleari che regolano la trascrizione genica⁽²¹⁾.

Il sistema Wnt non è certamente specifico per lo scheletro, essendo infatti implicato nello sviluppo di altri organi e tessuti, come ad esempio l'intestino,

Sindromi Osteoaddensanti Collegabili a Mutazioni del Sistema Wnt
Iperostosi o Osteosclerosi Endostale tipo Worth
Osteosclerosi Autosomica Dominante, detta anche Osteopetrosi Tipo 1
Sclerosteosi e Malattia di van Buchem
Sindrome di Alta Massa Ossea

Tabella 1.

il polmone e la cute. Questo meccanismo è quindi noto da tempo, in particolare nella biologia dello sviluppo. Solo negli ultimi 6-7 anni se ne è scoperto il ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi scheletrica, grazie a studi di genetica molecolare che hanno permesso di collegare alcune malattie osteoaddensanti ad una mutazione puntiforme del gene LRP5, che codifica il recettore chiave per l'attivazione del sistema Wnt. Esistono diverse forme o sindromi caratterizzate da un aumento della massa ossea, o osteosclerosi; alcune (Tabella 1) si presentano con segni e sintomi comuni, ed in particolare iperostosi corticale interna, cioè ispessimento della corticale delle ossa lunghe a livello endostale senza malformazioni o anomalie morfologiche, ispessimento in certi casi anche della teca cranica, della mandibola e delle mascelle, ed un rischio di frattura molto basso. Tra il 2002 ed il 2003 due gruppi di ricercatori scoprirono, lavorando indipendentemente, la stessa mutazione del gene LRP5 (una mutazione puntiforme, G171V) in soggetti con massa ossea molto alta appartenenti a famiglie in cui tale fenotipo è molto frequente^(18,1). Questa mutazione rende il recettore LRP5 meno sensibile ad alcuni inibitori, quindi rappresenta una mutazione attivante il sistema Wnt. Successivamente altre mutazioni del gene LRP5 sono emerse in altri pazienti con alta massa ossea, in alcuni casi precedentemente identificati, forse incorrettamente, come iperostosi endostale o anche osteopetrosi familiare, o altre forme osteoaddensanti⁽²⁹⁾. Alla luce delle conoscenze emerse dagli studi di genetica molecolare molte se non tutte queste sindromi osteosclerotiche che si presentano senza altre malformazioni scheletriche probabilmente rappresentano varianti dello stesso complesso sindromico causato da mutazioni attivanti di LRP5.

I meccanismi per cui l'attivazione del sistema Wnt condiziona lo svilupparsi di una iperostosi non sono ancora del tutto chiari. Certamente la β -catenina svolge un ruolo fisiologico essenziale nel processo di differenziazione osteoblastica, agendo nelle fasi iniziali di tale processo, stimolando la proliferazione dei

progenitori e permettendo la maturazione degli osteoblasti⁽²⁵⁾. Negli osteoblasti differenziati la β -catenina sembra invece inibire la differenziazione degli osteoclasti attraverso la stimolazione di osteoprotegerina⁽⁷⁾. Inoltre, la delezione del gene che codifica la β -catenina in cellule scheletriche embrionali in topi transgenici risulta in malformazioni scheletriche severe, incompatibili con la vita^(10,11). Esistono quindi discrepanze significative tra le conseguenze delle mutazioni genetiche di LRP5 o di β -catenina. Quindi un'attivazione della via canonica del sistema Wnt, che presuppone obbligatoriamente l'attività di trascrizione genetica della β -catenina, non può spiegare come le mutazioni inattivanti di LRP5 possano condurre ad un'aumentata massa ossea.

In effetti è stata dimostrata l'esistenza di un meccanismo alternativo, non canonico, di attivazione Wnt con effetti stimolanti l'osteogenesi durante lo sviluppo embrionale⁽²⁸⁾. Più importanti dal punto di vista della regolazione del rimodellamento osseo nell'adulto sono studi di genetica molecolare sulla base dei quali è stato proposto un meccanismo endocrino per l'azione osteoanabolica di LRP5. In questa ipotesi non sarebbe il recettore presente nelle cellule dell'osso a favorire la neoformazione ossea, ma quello presente nelle cellule enterocromaffini del duodeno, che conseguentemente all'attivazione di LRP5 produrrebbero serotonina, che a sua volta entrata in circolo si legherebbe a specifici recettori serotoninergici presenti negli osteoblasti favorendone la funzione secretoria e di mineralizzazione⁽³²⁾. Queste osservazioni sulla carta molto convincenti rimangono però ancora da confermare in altri modelli murini, anche se studi epidemiologici sembrano essere compatibili con l'ipotesi serotoninergica: studi clinici sugli inibitori dell'uptake di serotonina, farmaci usati molto frequentemente nel trattamento della depressione, hanno evidenziato un aumento del rischio di frattura in soggetti trattati con tale farmaci relativamente a coloro che avevano ricevuto un placebo⁽²³⁾. Inoltre, i livelli ematici di serotonina sono risultati bassi in pazienti con mutazioni attivanti di LRP5, mentre sono aumentati in soggetti con sindrome osteoporosi-pseudoglioma, dovuta a mutazioni inattivanti di LRP5⁽³²⁾. Questi dati indicano dunque nella serotonina un potenziale target terapeutico osteo-anabolico, anche se, come già accennato, i dati devono essere confermati soprattutto in studi clinici controllati.

SISTEMA WNT/LRP5 E ANABOLISMO OSSEO

La via di segnale Wnt rappresenta oggi probabilmente il più importante oggetto di studio per lo sviluppo di nuove terapie orientate a incrementare la massa ossea. Le caratteristiche di questo sistema di trasduzione del segnale

e la possibilità di modulare la massa ossea per il tramite di un recettore ben specifico, LRP5, rende questo sistema altamente suscettibile a manipolazioni farmacologiche. Le direzioni più promettenti sono rappresentate dall'inibizione degli antagonisti di Wnt, ed in particolare Dkk1, sclerostina e Sfrp1. Anticorpi monoclonali con attività neutralizzante selettiva sono stati prodotti ed alcuni sono attualmente in fase II o III della sperimentazione clinica. Al momento attuale la strategia più promettente è quella di inibire la sclerostina, un antagonista di LRP5 prodotto specificamente dagli osteociti. Essa è il prodotto del gene SOST, che è mutato in soggetti affetti da sclerostosi e da malattia di van Buchem, altre due malattie caratterizzate da ispessimento della corticale delle ossa lunghe e della faccia⁽³⁰⁾. È interessante notare che soggetti in cui un solo allele di SOST, il gene che codifica la sclerostina, è inattivato hanno una massa ossea elevata, ma senza l'iperostosi del cranio e delle ossa della faccia tipiche della malattia di van Buchem, e senza le esostosi dell'orofaringe e del palato, talvolta presenti in pazienti con mutazioni attivanti LRP5⁽⁶⁾. Tali osservazioni rafforzano il razionale per utilizzare la sclerostina come target terapeutico. Infatti, deformità della base del cranio e sindromi da compressione dei nervi cranici sono stati descritti in pazienti portatori di mutazioni attivanti LRP5^(24,31). Questi casi ampliano quindi lo spettro clinico delle sindromi osteosclerotiche riconducibili a mutazioni di LRP5, ed è possibile che fattori ambientali o altre componenti genetiche possano interferire con tali mutazioni risultando in caratteristiche fenotipiche variabili.

Studi preclinici dimostrano la validità delle strategie volte a neutralizzare gli inibitori di Wnt/LRP5 come nuova terapia anabolica. È stato dimostrato che la somministrazione di un anticorpo monoclonale anti-sclerostina (Scl-AbII) in topi ovariectomizzati è in grado di aumentare significativamente la massa ossea non solo rispetto ai controlli trattati con placebo, ma anche rispetto ai valori basali entro solo 5 settimane, comportando anche un aumento significativo del numero di osteoblasti e riduzione degli osteoclasti rispetto ai controlli ovariectomizzati⁽¹⁶⁾. Inoltre, si assisteva ad un aumento della attività osteoblastica con aumentata produzione di matrice e di mineralizzazione, risultando in marcato aumento della densità ossea e della resistenza alle fratture sia a livello vertebrale che femorale⁽¹⁷⁾. Risultati simili sono stati ottenuti anche in un modello murino di osteoporosi senile⁽¹⁷⁾ ed anche in primati, in cui Scl-AbII è capace di indurre un aumento di massa ossea, con ispessimento della trabecolare e corticale con soli 2 mesi di trattamento⁽²²⁾. Il vantaggio fondamentale dell'inibizione della sclerostina rispetto ad altri fattori inibitori di LRP5 rimane il fatto che la sclerostina è prodotta selettivamente dagli osteociti, il che ovviamente riduce le possibilità di effetti collaterali in altri organi.

Gli anticorpi anti-Dkk1 sono stati utilizzati in vari studi, tra cui il più rilevante è probabilmente quello su un modello murino di artrite reumatoide, in cui è stato dimostrato il miglioramento delle lesioni erosive periarticolari, un'aumentata proliferazione degli osteoblasti, e della neoformazione ossea e la soppressione dell'osteoclastogenesi⁽⁴⁾. Non solo, ma in modelli murini di mieloma multiplo la somministrazione di un anticorpo anti-Dkk1 promuove la neoformazione ossea a livello sia del femore colpito dalle lesioni mielomatose sia del femore sano⁽⁹⁾. D'altro canto la somministrazione di anticorpi anti-Dkk1 facilita l'insorgenza di osteofiti e un quadro generalizzato di osteoartrosi⁽⁴⁾. Quindi il profilo terapeutico di questi anticorpi che interferiscono con il sistema Wnt/LRP5 deve essere ancora studiato approfonditamente. Appare anche necessaria un'attenta valutazione degli effetti a lungo termine prima di un loro utilizzo clinico come agenti anabolizzanti. In particolare, sebbene gli anticorpi specifici anti-Dkk1 promuovano la neoformazione ossea, il fatto che in molte neoplasie si osservi un'attivazione della via di segnale Wnt ha creato qualche timore sul loro uso su larga scala. Un'altra strategia è inibire la glicogeno sintetasi chinasi-3 β (GSK3 β), la cui funzione nell'ambito del sistema Wnt è di fosforilare la β -catenina promuovendone la degradazione. Studi in ratti ovariectomizzati hanno dimostrato che un inibitore di GSK3 aumenta il numero, lo spessore e la connettività delle trabecole, nonché la massa ossea e migliora le caratteristiche biomeccaniche dell'osso⁽¹⁴⁾. Inoltre,

Target Biologico	Molecola in via di Sviluppo	Meccanismo d'Azione
Sclerostina	Anticorpo monoclonale neutralizzante	Aumenta legame di Wnt con LRP5
Dkk-1	Anticorpo monoclonale neutralizzante	Aumenta legame di Wnt con LRP5
sFRP-1	Inibitori sintetici	Aumentano disponibilità di Wnt per LRP5
GSK-3	Inibitori sintetici	Diminuiscono degradazione di β -catenina
Proteasoma	Inibitori sintetici	Diminuiscono degradazione di β -catenina

Tabella II. Targeting del Sistema Wnt per un'Azione Anabolica.

un anticorpo monoclonale è stato sperimentato in modelli murini e ne è stata dimostrata una efficace azione nell'aumentare la massa ossea in varie condizioni sperimentali di osteoporosi. Tale anticorpo è inoltre in grado di aumentare la sensibilità degli osteoblasti e degli osteociti al carico meccanico e migliorare la guarigione delle fratture⁽²⁷⁾. In ogni caso, strategie atte a inibire il sistema Wnt rimangono le più promettenti per lo sviluppo di nuovi farmaci anabolici (Tabella 2).

ORIZZONTI FUTURI

In futuro è ipotizzabile poter intervenire sulle cellule staminali scheletriche, favorendone la differenziazione in osteoprogenitori anziché in adipociti, e stimolando in tal modo le potenzialità rigenerative del midollo osseo. Lo sviluppo di questa strategia terapeutica è ancora ad uno stadio piuttosto precoce. L'identificazione e l'isolamento delle cellule staminali scheletriche restano infatti ancora da definirsi, un compito reso difficile dalla mancanza di marcatori specifici per queste cellule. D'altra parte cellule multipotenti, con possibilità di differenziarsi in osteoblasti sono state identificate non solo nel midollo osseo, ma anche in tessuti periferici, come ad esempio il tessuto adiposo. Nel nostro laboratorio stiamo studiando il ruolo delle caderine, molecole di adesione intercellulare nella differenziazione e funzione degli osteoblasti. Da studi in vitro ed in vivo, abbiamo stabilito che negli osteoblasti sono presenti due caderine, la N-cadherin e la cadherin-11. Entrambe contribuiscono al mantenimento dell'adesione tra osteoblasti, ma hanno anche funzioni specifiche. Ad esempio, la N-cadherin è presente in cellule mesenchimali indifferenziate, e la sua abbondanza diminuisce con la differenziazione osteoblastica⁽¹⁹⁾. L'abbondanza della cadherin-11 invece aumenta con la differenziazione osteogenica, e l'espressione di questa molecola in tessuti ectopici favorisce la differenziazione verso l'osteogenesi⁽¹³⁾. Da studi di genetica molecolare nel topo abbiamo recentemente dimostrato che l'inattivazione del gene che codifica N-cadherin, *Chd2*, selettivamente negli osteoblasti causa una osteopenia e un difetto di crescita dello scheletro, difetti che sono molto più accentuati quando sia la N-cadherin che la cadherin-11 sono entrambe inattivate⁽⁵⁾. Un'osservazione importante risultante da questi studi è la riduzione del numero dei precursori degli osteoblasti e delle cellule stromali non differenziate, fatto che suggerisce un ruolo della N-cadherin nel mantenimento delle cellule staminali stromali nella loro nicchia, in modo analogo alle nicchie delle cellule staminali ematopoietiche^(2,33). L'ipotesi di lavoro corrente vede la N-cadherin mantenere il contatto tra cellule della

nicchia (osteoblasti) e cellule staminali, le quali in tal modo restano protette da stimoli che ne possono indurre la differenziazione. La perdita dell'adesione tra cellule staminali e della nicchia in assenza di N-cadherin porta alla perdita delle prime. D'altro canto in condizioni normali, quando è necessario che cellule staminali diano origine a nuovi precursori degli osteoblasti, alcune cellule devono essere rilasciate dalla nicchia, e questo richiede la perdita dell'adesione alle cellule della nicchia. Pertanto l'abbondanza della N-cadherin deve diminuire per generare nuovi osteoblasti; ed infatti la persistenza della N-cadherin previene la differenziazione osteoblastica⁽⁸⁾. È quindi ipotizzabile che agendo sull'adesione intercellulare via N-cadherin si possa modulare l'uscita di cellule staminali stromali dalle nicchie midollari e quindi la produzione di precursori degli osteoblasti.

L'orizzonte terapeutico delle malattie demineralizzanti sembra quindi piuttosto incoraggiante, e reso possibile dal progresso della conoscenza di biologia del tessuto scheletrico e dalla messa a punto di nuove tecnologie bio-farmacologiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D., Insogna K, Lifton RP: *High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5*. N. Eng. J. Med. 2002; 346, 1513-1521.
2. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT: *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche*. Nature. 2003; 425,841-846.
3. Cummings SR, San Martin J, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, Delmas P, Zoog HB, Austin M, Wang A, Kutilek S, Adami S, Zanchetta J, Libanati C, Siddhanti S, Christiansen C; FREEDOM Trial: *Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis*. N. Engl. J. Med. 2009; 361,756-765.

4. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, Korb A, Smolen J, Hoffmann M, Scheinecker C, van der Heide D, Landewe R, Lacey D, Richards WG, Schett G: *Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling*. Nat. Med. 2007; 13, 156-163.
5. Di Benedetto A, Watkins M, Grimston S, Salazar V, Donsante C, Mbalaviele G, Radice GL, Civitelli R: *N-cadherin and cadherin 11 modulate postnatal bone growth and osteoblast differentiation by distinct mechanisms*. J. Cell. Sci. [e-pub ahead of print], 2010.
6. Gardner JC, van Bezooijen RL, Mervis B, Hamdy NA, Lowik CW, Hamersma H, Beighton P, Papapoulos SE: *Bone mineral density in sclerosteosis; affected individuals and gene carriers*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2005; 90, 6392-6395.
7. Glass DA, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, Taketo MM, Long F, McMahon AP, Lang RA, Karsenty G: *Canonical wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation*. Dev. Cell. 2005; 8, 751-764.
8. Hay E, Laplantine E, Geoffroy V, Frain M, Kohler T, Muller R, Marie PJ: *N-cadherin interacts with axin and LRP5 to negatively regulate Wnt/beta-catenin signaling, osteoblast function, and bone formation*. Mol. Cell. Biol. 2009; 29, 953-964.
9. Heath DJ, Chantry AD, Buckle CH, Coulton L, Shaughnessy JD, Evans HR, Snowden JA, Stover DR, Vanderkerken K, Croucher PJ: *Inhibiting Dickkopf-1 (Dkk1) removes suppression of bone formation and prevents the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma*. J. Bone Miner. Res. 2009; 24, 425-436.
10. Hill TP, Spater D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C: *Canonical Wnt/ β -catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes*. Dev. Cell. 2005; 8, 727-738.
11. Holmen SL, Zylstra CR, Mukherjee A, Sigler RE, Faugere MC, Bouxsein ML, Deng L, Clemens TL, Williams BO: *Essential role of β -catenin in postnatal bone acquisition*. J. Biol. Chem. 2005; 280, 21162-21168.
12. Kendler DL, Roux C, Benhamou CL, Brown JP, Lillestol M, Siddhanti S, Man HS, San Martin J, Bone HG: *Effects of denosumab on bone mineral density and bone turnover in postmenopausal women transitioning from alendronate therapy*. J. Bone Miner. Res. 2010; 25, 72-81.
13. Kii I, Amizuka N, Shimomura J, Saga Y, Kudo A: *Cell-cell interaction mediated by cadherin-11 directly regulates the differentiation of mesenchymal cells into the cells of the osteo-lineage and the chondro-lineage*. J. Bone Miner. Res. 2004; 19, 1840-1849.
14. Kulkarni NH, Onyia JE, Zeng Q, Tian X, Liu M, Halladay DL, Frolik CA, Engler T, Wei T, Kriaciuinas A, Martin TJ, Sato M, Bryant HU, Ma YL: *Orally bioavailable GSK-3 α /beta dual inhibitor increases markers of cellular differentiation in vitro and bone mass in vivo*. J. Bone Miner. Res. 2006; 21, 910-920.
15. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S: *Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation*. Cell. 1998; 93, 165-176.
16. Li X, Ominsky MS, Warmington KS, Morony S, Gong J, Cao J, Gao Y, Shalhoub V, Tipton B, Haldankar R, Chen Q, Winters A, Boone T, Geng Z, Niu QT, Ke HZ, Kostenuik PJ, Simonet WS, Lacey DL, Paszty C: *Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis*. J. Bone Miner. Res. 2009; 24, 578-588.

17. Li X, Warmington KS, Niu QT, Asuncion FJ, Barrero M, Grisanti M, Dwyer D, Stouch B, Thway TM, Stolina M, Ominsky MS, Kostenuik PJ, Simonet WS, Paszty C, Ke HZ: *Inhibition of sclerostin by monoclonal antibody increases bone formation, bone mass and bone strength in aged male rats*. J. Bone Miner. Res. 2010.
18. Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, Dupuis J, Osborne M, Folz C, Manning SP, Swain PM, Zhao SC, Eustace B, Lappe MM, Spitzer L, Zweier S, Braunschweiger K, Benchekroun Y, Hu X, Adair R, Chee L, FitzGerald MG, Tulig C, Caruso A, Tzellas N, Bawa A, Franklin B, McGuire S, Nogues X, Gong G, Allen KM, Anisowicz A, Morales AJ, Lomedico PT, Recker SM, Van Eerdewegh P, Recker RR, Johnson ML: *A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait*. Am. J. Hum. Genet., 2002; 70,11-19.
19. Mbalaviele G, Shin CS, Civitelli R: *Cell-cell adhesion and signaling through cadherins: connecting bone cells in their microenvironment*. J. Bone Miner. Res., 2006; 21, 1821-1827.
20. Miller PD, Bolognese MA, Lewiecki EM, McClung MR, Ding B, Austin M, Liu Y, San Martin J: *Effect of denosumab on bone density and turnover in postmenopausal women with low bone mass after long-term continued, discontinued, and restarting of therapy: a randomized blinded phase 2 clinical trial*. Bone. 2008; 43, 222-229.
21. Nusse R: *Wnt signaling in disease and in development*. Cell Res. 2005; 15, 28-32.
22. Ominsky MS, Vlasseros F, Jolette J, Smith SY, Stouch B, Doellgast G, Gong J, Gao Y, Cao J, Graham K, Tipton B, Cai J, Deshpande R, Zhou L, Hale MD, Lightwood DJ, Henry AJ, Popplewell AG, Moore AR, Robinson MK, Lacey DL, Simonet WS, Paszty C: *Two doses of sclerostin antibody in cynomolgus monkeys increases bone formation, bone mineral density, and bone strength*. J. Bone Miner. Res. 2010; 25, 948-959.
23. Richards JB, Papaioannou A, Adachi JD, Joseph L, Whitson HE, Prior JC, Goltzman D: *Effect of selective serotonin reuptake inhibitors on the risk of fracture*. Arch. Intern. Med. 2007; 167, 188-194.
24. Rickels MR, Zhang X, Mumm S, Whyte MP: *Oropharyngeal skeletal disease accompanying high bone mass and novel LRP5 mutation*. J. Bone Miner. Res. 2005; 20, 878-885.
25. Rodda SJ, McMahon AP: *Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors*. Development. 2006; 133, 3231-3244.
26. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ: *Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density*. Cell. 1997; 89, 309-319.
27. Spencer GJ, Utting JC, Etheridge SL, Arnett TR, Genever PG: *Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NFkappaB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro*. J. Cell. Sci. 2006; 119, 1283-1296.
28. Tu X, Joeng KS, Nakayama KI, Nakayama K, Rajagopal J, Carroll TJ, McMahon AP, Long F: *Noncanonical Wnt signaling through G protein-linked PKCdelta activation promotes bone formation*. Dev Cell. 2007; 12,113-127.

29. Van Wesenbeeck L, Cleiren E, Gram J, Beals RK, Bénichou O, Scopelliti D, Key L, Renton T, Bartels C, Gong Y, Warman ML, De Vernejoul MC, Bollerslev J, Van Hul W: *Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density*. Am. J. Hum. Genet. 2003; 72, 763-771.
30. Whyte MP: *Sclerosing bone dysplasias*. In *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. CJ Rosen, editor. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research. 2008; 412-423.
31. Whyte MP, Reinus WH, Mumm S: *High-bone-mass disease and LRP5*. N. Engl. J. Med. 2004; 350, 2096-2099; author reply 2004; 2096-2099.
32. Yadav VK, Ryu JH, Suda N, Tanaka KF, Gingrich JA, Schütz G, Glorieux FH, Chiang CY, Zajac JD, Insogna KL, Mann JJ, Hen R, Ducy P, Karsenty G: *Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum*. Cell. 2008; 135, 825-837.
33. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L: *Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size*. Nature. 2003; 425, 836-841.

I CARCINOMI CUTANEI

Luigi Santoro, Alessandra Farnetti, Annamaria Ronco, Roberto Mattio

Servizio di Dermochirurgia Oncologica
Presidio Ospedaliero Gradenigo - Torino

Key words: *Skin Cancer / Carcinomi Cutanei*
 Basal cell carcinoma / Epiteliomi basocellulari
 Squamous cell carcinoma / Epiteliomi spinocellulari

Abstract:

Skin cancer is one of the most frequent kinds of tumour, representing around 20% of all cancer types. They are classified in different sub-groups according to their origin: the most common ones derive from epithelium (carcinoma) and melanocytic lesions (melanoma). Malignant tumours represent approximately 90% of skin neoplasms: they comprise both the basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. They both generate from skin cells and they have different epidemiological and carcinogenesis aspects in common, although are different in their evolution. Carcinoma is more commonly seen in adults over the age of 50 and reaches a peak between the age of 70 and 80. The progressive rise of tumours can be linked to different trigger factors, which comprise the increase of the elderly population, environmental, physical, chemical and viral carcinogens. A close relation exists between skin carcinoma and sunlight exposure: they actually grow mainly in areas exposed to sunlight, particularly on the face, on subjects with fair skins, or due to professional and/or geographical reasons, are exposed to intense and prolonged exposure to the sun. These neoplasms arise de novo on healthy skin or other times, especially in the squamous cell form, can be localized in sunlight damaged skin or in precancerous defined lesions. The most common is the actinoid keratosis. These lesions are initially difficult to diagnose: they can present themselves as an erythematous lesion, an erosion of small dimensions, which tend to go unrepaired. Over the months neoplasms acquire different clinical characteristics. The elective therapy is surgery associated with a 90-95% percentage of recovery. A histological examination is a fundamental part of evaluation on the success of the operation. Radiotherapy is an effective method and is indicated for the treatment of neoplasm in high-risk patients and for lesions that are not easily approachable through surgery due to their location (ears, eyelids). Alternative treatments such as cryotherapy, laser therapy, photodynamic therapy need to be used in selected cases.

Riassunto:

Le neoplasie cutanee primitive sono in assoluto i tumori più frequenti rappresentando il 20% circa.

In base alla loro origine vengono classificati in diversi sottogruppi: i più frequenti sono quelli a derivazione epiteliale (carcinomi) e di derivazione melanocitaria (melanomi). I carcinomi rappresentano circa il 90% delle neoplasie cutanee: comprendono la forma basocellulare e la forma spinocellulare. Entrambi originano dalle cellule dell'epidermide ed hanno in comune molti aspetti epidemiologici e di carcinogenesi, ma anche differenze significative soprattutto per quanto riguarda l'evoluzione. L'età di comparsa è generalmente dopo i 50 anni con picco fra i 70-80 anni. Il progressivo aumento di queste neoplasie è legato a diversi fattori favorenti che comprendono l'aumento della popolazione anziana, dei carcinogeni ambientali, fisici e chimici, e virali. Esiste una stretta correlazione fra carcinomi cutanei e irradiazione solare: infatti insorgono prevalentemente in regioni foto esposte, soprattutto al viso, in soggetti con pelle chiara che per ragioni professionali e/o geografiche sono sottoposte ad una intensa e prolungata esposizione solare. Queste neoplasie possono insorgere ex novo su cute sana o altre volte, specialmente la forma spinocellulare, può localizzarsi su una cute fotodanneggiata o su lesioni definite precancerose. La più frequente è la cheratosi attinica. La lesione iniziale è difficilmente diagnosticabile: si può presentare come una lesione eritematosa, un'erosione di piccole dimensioni senza tendenza alla riparazione. Nel corso dei mesi la neoplasia acquista le diverse caratteristiche cliniche. La terapia elettiva è quella chirurgica associata ad un'alta percentuale di guarigione (90-95%). L'esame istologico è indispensabile per verificare la radicalità dell'intervento. La radioterapia è un metodo efficace ed è indicata per il trattamento di neoplasie in soggetti in cattive condizioni generali e per lesioni di non facile approccio chirurgico in rapporto alla loro sede (orecchio, palpebra). Trattamenti alternativi alla chirurgia quali la crioterapia, laserterapia, fotodinamica devono essere utilizzati in casi selezionati.

Le neoplasie cutanee rappresentano il 20% circa di tutti i tumori maligni. L'incidenza dei carcinomi fra le neoplasie cutanee è circa del 90% ed è sotto stimata in quanto spesso non vengono individuati o talora sono asportati senza esame istologico, e aumenta di circa il 10% ogni anno nel mondo⁽¹⁵⁾.

In Europa il tasso standardizzato di incidenza è di circa 70/80 casi per 100.000 abitanti; allo stato attuale un americano su cinque ed un australiano su due manifestano nella loro vita un carcinoma cutaneo^(20,44).

I carcinomi cutanei vengono classificati in carcinomi in situ ed in carcinomi invasivi.

I carcinomi in situ comprendono il morbo di Bowen, il morbo di Paget e l'eritroplasia di Queyrat.

MORBO DI BOWEN

È raro prima dei 30 anni, compare dopo i 60 anni con un picco ai 70 anni. È più frequente nelle donne e predomina nelle aree fotoesposte (viso e tronco). Si presenta come una chiazza simil eczematosa, ben delimitata, eritematosa ricoperta da piccole squame. La comparsa di infiltrazione, vegetazioni ed ulcerazioni è espressione di evoluzione verso il carcinoma spinocellulare. Il trattamento di scelta è l'exeresi chirurgica con controllo istologico. Sulle mucose genitali il morbo di Bowen si presenta come una chiazza rossa, vellutata a limiti netti ed evoluzione cronica e viene definita come Eritroplasia di Queyrat⁽³⁴⁾.

MORBO DI PAGET

È una neoplasia caratterizzata dalla proliferazione intradermica di cellule epiteliali grandi, tondeggianti con citoplasma PAS positivo e con voluminoso nucleo vescicoloso. Si distingue un Paget mammario ed un Paget extramammario. Il Paget mammario predilige le donne fra i 60/70 anni ed è eccezionale nell'uomo, frequentemente precede o accompagna il carcinoma mammario. Si presenta come una chiazza eczematosa del capezzolo e dell'areola ricoperta da piccole squame. Il Paget extramammario si localizza alla vulva, agli organi genitali maschili, in sede perineale, ascellare, inguinale. Si presenta come una chiazza eritemato-essudante. Per quanto riguarda l'eziopatogenesi la forma mammaria sarebbe un carcinoma epidermotropo dei dotti galattofori, mentre la forma extramammaria deriverebbe dalle cellule secretorie delle ghiandole sudoripare.

La terapia elettiva ove possibile è l'exeresi chirurgica; quando questa non è praticabile la radioterapia rappresenta la miglior scelta terapeutica⁽³⁴⁾.

CARCINOMI INVASIVI

Esistono due varietà clinico-istologiche: il carcinoma basocellulare ed il carcinoma spinocellulare.

Pur avendo un'origine comune dalle cellule epidermiche, un'eziopatogenesi analoga, presentano un comportamento evolutivo diverso.

Il carcinoma basocellulare è quattro volte più frequente dello spinocellulare; è un tumore a malignità locale con la caratteristica di lento accrescimento espansivo con tendenza ad infiltrare i tessuti circostanti e con incidenza di metastasi estremamente limitata 0,1%. La malignità sostanzialmente rara fa sì che questo tumore causi la morte molto raramente; nondimeno una diagnosi tardiva può costringere a trattamenti a volte mutilanti. Nei paesi europei l'incidenza standardizzata si aggira sui 70/100.000 casi all'anno. Presenta maggiore frequenza nei soggetti a fototipo chiaro con capacità di abbronzatura scarsa; insorge essenzialmente a livello delle zone fotoesposte e specialmente sul viso (80%). Non ci sono predominanze in base al sesso. L'età di comparsa è mediamente attorno ai 50 anni e l'incidenza aumenta con l'età. L'istogenesi è controversa: probabilmente le cellule tumorali originano da elementi immaturi totipotenti di origine epidermica o annessiale^(8,16,34,36).

Il carcinoma spinocellulare rappresenta il 20% dei carcinomi cutanei. È un tumore maligno, infiltrante ad evoluzione progressiva fonte di metastasi per via ematica e linfatica. In Europa il tasso standardizzato di incidenza è 10-20/100.000 all'anno nell'uomo e 5-10/100.000 nella donna. Negli USA e in Australia è di 150-250/100.000. L'incidenza nell'uomo è pari a 2-3 volte nella donna ed aumenta con l'età. Il rischio di un carcinoma spinocellulare è legato principalmente a due fattori: l'esposizione solare cumulativa ed il fototipo. I soggetti a rischio sono gli individui di razza bianca con capelli biondi o rossi, carnagione chiara, che si abbronzano con difficoltà. Il 50-60% colpisce la testa ed il collo, i restanti casi prediligono le mani, regione superiore del tronco e le gambe. Nelle donne la localizzazione più frequente è nella parte inferiore delle gambe, nell'uomo le sedi preferite sono le zone fotoesposte (padiglione auricolare, labbro inferiore, dorso delle mani).

Se la maggior parte dei carcinomi spinocellulari ha una prognosi eccellente, devono essere tutti considerati potenzialmente aggressivi^(5,36,39).

Sono stati individuati alcuni fattori prognostici:

- Dimensioni: tumori di diametro superiore ai 2 cm presentano rischio di recidiva, rischio di metastasi superiore rispetto a quelli di diametro inferiore;

- Profondità di invasione: rischio di recidiva e metastasi aumentato in caso di superamento del derma reticolare;
- Sede: padiglione auricolare, labbro inferiore, regione anogenitale presentano rischio maggiore di recidiva e metastasi;
- Eziopatogenesi: i carcinomi insorti su cicatrice da ustione, radiodermi, ulcera cronica presentano alti rischi di metastatizzazione a differenza di quelli insorti in cheratosi attinica;
- Immunodepressione: nell'immunodepresso i carcinomi spinocellulari sono più aggressivi con aumentato rischio di metastasi.

Istologicamente è una proliferazione irregolare ed anarchica di cellule malpighiane con livelli variabili di differenziamento corneo^(9,40).

EZIOPATOGENESI

Molteplici sono i fattori responsabili dell'insorgenza dei carcinomi cutanei.

Fattori fisici

Raggi solari:

indiscutibili dati epidemiologici indicano una stretta correlazione fra carcinomi cutanei e irradiazione solare: insorgono in regioni fotoesposte, nei soggetti di pelle chiara che per ragioni professionali e/o geografiche sono sottoposti ad intensa e/o prolungata esposizione solare. L'energia solare emette radiazioni elettromagnetiche di tipo ionizzante (raggi X, raggi gamma) e di tipo non ionizzante (ultravioletti UVA, UVB, UVC, infrarossi e visibile). L'ozono svolge funzioni di filtro delle radiazioni solari per cui l'energia solare che raggiunge il suolo è composto dall'infrarosso 50%, dal visibile 40%, e dall'ultravioletto 10% (UVA 8%, UVB 2%). La quantità degli UV varia nel corso della giornata, nei diversi mesi dell'anno in rapporto alla latitudine, all'altitudine ed in diverse condizioni meteorologiche. È stata sottolineata la possibile correlazione fra incremento delle neoplasie cutanee e la riduzione dello strato di ozono atmosferico per la presenza di fattori inquinanti fisici e/o chimici. Gli UVA hanno un'azione più subdola perché pur essendo meno energetici hanno una presenza maggiore rispetto agli UVB. Gli UVA sono presenti dal sorgere del sole al tramonto, gli UVB hanno un massimo tra le 10 e le 14. Gli UVA hanno una forte potere di penetrazione e raggiungono il derma mentre gli UVB hanno scarso potere di penetrazione ed agiscono sugli strati

superficiali dell'epidermide. Il ruolo degli UV nello sviluppo dei carcinomi cutanei è duplice: in primo luogo inducono mutazioni al livello del DNA cellulare, l'inadeguata riparazione di queste alterazioni genetiche può portare alla formazione del tumore. In secondo luogo gli UV agiscono sul sistema immunitario (cellule di Langherans) inducendo una immunodepressione relativa che ostacola l'eliminazione dei cloni tumorali^(1,2,45).

Radiazioni ionizzanti:

è di frequente osservazione la comparsa di carcinomi cutanei radio indotti di tipo professionale (radiologi, tecnici di radiologia, operatori nucleari) o secondari a radioterapia. Le radiazioni ionizzanti esercitano un'azione carcinogenetica provocando alterazioni della sintesi del DNA e della replicazione cellulare. Fra le sorgenti artificiali di UV ricordiamo le lampade e lettini solari, lampade germicide, lampade fluorescenti e alogene, saldatrici ad arco elettrico. Per quanto riguarda le lampade solari le statistiche indicano che aumentano il rischio per il carcinoma basocellulare di 2.5 volte e di 1.5 per i carcinoma spinocellulare soprattutto se l'esposizione inizia prima dei 20 anni⁽⁴⁵⁾.

Fattori chimici:

negli anni passati era facile l'osservazione di epiteliomi in persone che usavano composti arsenicali per uso farmacologico, industriale ed agricolo; esposizione ad idrocarburi policiclici aromatici (catrame, bitume, pece, olii minerali). Sir Percivall Pott fu il primo a descrivere un esempio di carcinogenesi chimica professionale avendo osservato l'alta incidenza di carcinomi della cute dello scroto e del pene negli spazzacamini attribuendolo alla fuliggine⁽¹⁶⁾.

Fattori immunologici:

aumento della frequenza dei carcinomi cutanei negli immunodepressi sia nella immunodepressione congenita che in quella acquisita (AIDS, trapianti d'organo, terapie immunosoppressive). Le neoplasie insorte in questi pazienti presentano alcune particolarità di comportamento (comparsa in fasi precoci della malattia, comportamento più aggressivo, tendenza alle lesioni multiple)^(4,6,17,37).

Fattori virali:

è chiaro il ruolo dei papillomavirus nella carcinogenesi delle neoplasie anogenitali⁽³⁸⁾.

Fattori genetici:

numerosi genodermatosi predispongono allo sviluppo dei carcinomi cutanei. Le più frequenti sono lo xeroderma pigmentoso, l'epidermodisplasia verruciforme e l'albinismo oculocutaneo^(21,35).

ASPETTI CLINICI DEI CARCINOMA BASOCELLULARE

Generalmente il basocellulare insorge ex novo su cute sana.

La lesione iniziale è spesso difficilmente diagnosticabile: si presenta come una chiazza eritematosa, una piccola papula ipercherotica, un piccolo nodulo ricoperto da minute teleangectasie o come una minima erosione ricoperta da crosta ematica con scarsa tendenza alla riparazione. Nel corso di mesi o di anni l'epitelioma acquista le caratteristiche clinico-morfologiche^(8,34).

- Epitelioma superficiale: inizia come una chiazza eritematosa finemente desquamante ben delimitata da un sottile bordino perliniforme translucido (perle cornee). Il tumore si estende molto lentamente in periferia ed a seconda dell'aspetto clinico ricorda altre patologie: possiamo avere la forma pagetoide, la forma bowenoide, la forma eritematosa.
- Epitelioma piano-cicatrizziale: inizia come una lesione eritematosa, desquamante con crosticine periferiche che ricoprono piccole aree disepitelizzate ad evoluzione cicatrizziale atrofica. Il tumore acquista l'aspetto di un'area cicatrizziale superficiale delimitata da un orletto perlaceo.
- Epitelioma sclerodermiforme: si presenta come una placca di colore avorio lievemente depressa, poco mobile sui piani sottostanti delimitata a volte dall'orletto traslucido.
- Epitelioma nodulare: si localizza soprattutto al viso, si presenta come un nodulo di varie dimensioni, a superficie liscia translucido solcato da teleangectasie, di consistenza duro-elastica. La forma pigmentata si distingue per la presenza di melanina e la diagnosi differenziale deve essere fatta con il melanoma.
- Epitelioma ulcerato: insorge come una piccola ulcera (ulcus rodens). I margini sono tagliati a picco sormontati a volte da un orletto perlaceo duro.. Queste forme si localizzano specialmente al volto ed al capo, hanno tendenza ad estendersi in periferia ed in profondità interessando i tessuti molli sottostanti, la cartilagine e l'osso.

ASPETTI CLINICI DEL CARCINOMA SPINOCELLULARE

Il carcinoma spinocellulare può insorgere ex novo su cute normale o su una lesione preesistente.

- Forma ulcero-vegetante è la più frequente. Si presenta come una lesione rilevata, infiltrante, incassata nel derma. La superficie è vegetante ulcerata con fondo irregolare sanguinolento.
- Forma vegetante si presenta come un nodo rosa.-rosso infiltrato ricoperto da piccole squamocroste adese tenacemente alla superficie che può successivamente ulcerarsi⁽⁵⁾.
- Forma superficiale è la più rara e può essere confusa con una carcinoma basocellulare. Si presenta come una chiazza rosso scura ricoperta da squamocroste.
- Carcinoma verrucoso è una variante anatomo patologica caratterizzata da bassa malignità, elevato grado di differenziazione e scarsa tendenza alla metastatizzazione. Appare come una grossa verruca esofitica a cavolfiore e si localizza soprattutto a livello orale, genitale, perianale e agli arti inferiori^(10,11,12,29).

STADIAZIONE TNM

Si applica per i carcinomi basocellulari e spinocellulari esclusi la palpebra, la vulva ed il pene. Vi deve essere la conferma istologica del tumore.

- T tumore primitivo;
- TX Il tumore primitivo non può essere definito;
- T0 Non segni di tumore primitivo;
- Tis Carcinoma *in situ*;
- T1 Tumore di 2 cm o meno nella sua dimensione massima;
- T2 Tumore superiore a 2 cm ma non più di 5 cm nella sua dimensione massima;
- T3 Tumore superiore a 5 cm nella sua dimensione massima;
- T4 Tumore che invade le strutture extradermiche profonde (p.e., cartilagini, muscoli scheletrici ed osso).

Nel caso di tumori multipli verrà classificato il tumore con la più alta categoria T ed il numero degli altri tumori sarà indicato tra parentesi. Es. T2(5).

- N linfonodi regionali sono correlati alla sede del tumore primitivo;
- NX I linfonodi regionali non possono essere definiti;
- N0 non metastasi nei linfonodi regionali;
- N1 metastasi linfonodi regionali;
- M metastasi a distanza;
- Mx la presenza di metastasi a distanza non può essere accertata;
- M0 non metastasi a distanza;
- M1 metastasi a distanza.

PRECANCEROSI

I carcinomi cutanei possono insorgere ex novo soprattutto i basocellulari o su lesioni preesistenti soprattutto gli spinocellulari.

Le precancerosi rappresentano un gruppo di lesioni di natura ed espressione clinico-istologiche varie evolventi con diversa incidenza verso forme tumorali. Sono di grande interesse teorico-pratico in quanto se riconosciute permettono di effettuare un'eccellente prevenzione. Si distinguono precancerosi obbligate e precancerosi facoltative. Le precancerosi obbligate sono già espressione di un disordine proliferativo epiteliale e stromale e comprendono: la cheratosi attinica, la cheilite attinica, la leucoplachia, il corno cutaneo ed alcune genodermatosi fra ele quali lo xeroterma pigmentoso e la epidermodisplasia di Levandowsky - Lutz.

Le precancerosi facoltative sono rappresentate da dermatosi di tipo infiammatorio e/o degenerativo e comprendono le cicatrici da ustione, radiodermiti croniche, ulcere croniche, papulosi bowenoide anogenitale, lichen scleroatrofico, lupus volgare.

La cheratosi attinica è la più frequente forma di precancerosi: insorge su zone fotoesposte di soggetti adulti specie di carnagione chiara cronicamente esposti all'insulto attinico. L'incidenza aumenta con l'età, con predominanza maschile. Si presentano come piccole lesioni bruno gialle, piane o rilevate, ben delimitate misuranti circa 1 cm molto adese e difficilmente staccabili dai piani profondi. Caratteristica è la sensazione di ruvidità al tatto. La trasformazione maligna si manifesta con la comparsa di un alone eritematoso, con l'infiltrazione della base, con la presenza di erosioni, ulcerazioni, vegetazioni della superficie. La durata del periodo di latenza è lunga e può essere influenzata da fattori endogeni ed esogeni.

Il trattamento terapeutico può essere invasivo (chirurgia, crioterapia, laserterapia, diatermocoagulazione) o non invasivo (terapia fotodinamica, trattamenti con farmaci topici quali imiquimod, diclofenac sodium).

Cheilite attinica: colpisce pressoché unicamente il labbro inferiore, clinicamente è analoga alla cheratosi solare. Segno fondamentale è la perdita del limite netto che nel labbro separa la parte rosea semimucosa dalla porzione cutanea. La semimucosa si presenta secca, rugosa, ipoelastica con tendenza alla fissurazione e alla erosione.

Leucoplachia: è una leucocheratosi che si sviluppa soprattutto a livello della mucosa orale e genitale. Si presenta come una macchia bianca, grigio-bianca difficilmente staccabile, con superficie lievemente rugosa, a volte verrucosa. A livello orale può essere correlata ad irritazione chimica (sigaretta, pipa, masticare tabacco) o meccanica (monconi dentari, protesi); a livello genitale è correlata ad infezione da HPV 11 e 16.

Corno cutaneo è una cheratosi caratterizzata da una esuberante ipercheratosi che forma un corno vero e proprio. Si presenta come una escrescenza piramidale di colore giallo-bruno con base infiltrativa. Si localizza soprattutto al viso (fronte e orecchie) ed al dorso delle mani dove è frequente la trasformazione verso il carcinoma.

Xeroderma pigmentoso – Epidermodisplasia verruciforme: genodermatosi, malattie e trasmissione genetica nelle quali i processi di riparazione dei danni cellulari prodotti dai raggi UV risultano defecitari. Sono caratterizzate nello xeroderma dalla comparsa precoce di cheratosi attiniche soprattutto nelle parti scoperte che rapidamente si moltiplicano, e nella epidermodisplasia verruciforme di lesioni simili a verruche, papule. In queste malattie si osservano precocemente la comparsa di carcinomi basocellulari e spinocellulari e anche melanomi⁽²⁸⁾.

Nell'ambito delle precancerosi facoltative ricordiamo:

- **Radiodermiti:** lesioni conseguenti a trattamenti con radiazioni ionizzanti. La trasformazione maligna è circa il 25% ed il periodo di latenza è lungo, variabile tra i 20 e 30 anni.
- **Cicatrici da ustione:** sono soggette a trasformazione maligna soprattutto quelle conseguenti ad idrocarburi ad alte temperature, ed è maggiore quando l'ustione cicatrizza lentamente e tende ripetutamente ad ulcerarsi. La latenza è dell'ordine di diversi anni.
- **Papillomatosi e condilomatosi (Papulosi bowenoidi):** provocata da HPV con comparsa a livello anogenitale di lesioni papulose, piane color carne che progressivamente si trasformano in placche di aspetto verrucoide, isolate o confluenti.

TERAPIA

La terapia dei carcinomi cutanei si basa sui criteri generali adottati per l'asportazione di ogni tumore maligno: eliminazione radicale della neoplasia con il rispetto estetico e funzionale, con il minimo disagio per il paziente e possibilmente con il massimo contenimento dei costi.

La scelta del trattamento elettivo si basa sulla valutazione dei parametri legati alla neoplasia e all'individuo.

I parametri legati alla neoplasia sono: varietà clinica della lesione, sede anatomica, dimensione e numero delle lesioni, rischio di recidive, risultato estetico-funzionale.

I parametri legati al paziente sono: condizioni generali, coesistenza di patologie gravi, presenza di pace-maker, terapia antiaggregante, allergie nei confronti di anestetici locali.

Le terapie che vengono adottate sono:

- Terapia chirurgica
- Radioterapia
- Crioterapia
- Curettage ed elettrocoagulazione
- Laserterapia
- Chemioterapia locale
- Terapia fotodinamica.

La terapia chirurgica rappresenta la terapia ottimale e con essa si ottiene una guarigione fino al 95%. Il margine di exeresi varia dai 3 ai 5 mm con asportazione a livello medio del sottocutaneo. Nei casi di dimensioni maggiori o recidivi o in alcune varietà clinico-istologiche si raccomanda un'escissione da 1 a 2 cm dai bordi che deve essere estesa a tutto il sottocutaneo^(3,33).

La terapia chirurgica comprende l'exeresi con sutura diretta, l'exeresi con riparazione mediante lembi di vicinanza, l'exeresi con riparazione con innesto libero.

Norma fondamentale è che la ricostruzione plastica venga effettuata quando si è certi della rimozione completa della neoplasia.

I vantaggi della chirurgia sono: controllo istologico della radicalità dell'intervento, rapidità di esecuzione, buon risultato estetico-funzionale, rapporto costo beneficio ottimale.

Gli svantaggi sono: difficoltà in alcune sedi (naso, palpebra, orecchie), ospedalizzazione per interventi con neoplasie estese ed infiltranti con ricorso all'anestesia generale, alto costo nei casi complessi, rischio operatorio elevato in pazienti definiti a rischio^(41,42).

Curettage ed elettro coagulazione

L'asportazione della lesione è facilitata dalla friabilità del tessuto neoplastico rispetto a quello sano e deve essere seguita dalla diatermo coagulazione del fondo e dei margini. È indicata per il trattamento di lesioni superficiali non recidivanti. I vantaggi sono la facilità di esecuzione ed il basso costo. Gli svantaggi sono: l'impossibilità di controllo istologico, la scarsa radicalità, rischio maggiore di recidive, retrazione cicatriziale successiva alla guarigione per seconda intenzione^(18,31).

Crioterapia

È indicata nel trattamento dei carcinomi superficiali ed in sedi a basso rischio di recidive (tronco e arti). Utilizza azoto liquido (-196°C) o protossido di azoto (-89°C) o anidride carbonica allo stato solido (-79°C). Non è eseguibile in pazienti affetti da crioglobulinemia, malattia di Raynaud, orticaria da freddo, malattie bollose. I vantaggi e gli svantaggi sono gli stessi evidenziati con il curettage^(13,18,31).

Laserterapia

Viene utilizzato il laser CO₂. Ha le stesse indicazioni e gli stessi limiti degli altri trattamenti fisici senza apportare alcun vantaggio⁽¹⁴⁾.

La terapia non invasiva comprende:

- Chemioterapia topica: viene utilizzato abitualmente il 5FU in concentrazione al 5% in crema. È utilizzato in forme molto superficiali in pazienti anziani. È alto il rischio di recidive con successiva tendenza all'approfondimento della neoplasia^(23,24).
- Chemioterapia topica con immunomodulanti: viene utilizzato l'IMIQUIMOD soprattutto nelle cheratosi attiniche e nei carcinomi basocellulari superficiali^(22,32).
- Terapia topica con diclofenac antinfiammatorio non steroideo⁽¹⁹⁾.
- Terapia topica con Tazorotene: è un retinoide utilizzato nel trattamento della psoriasi⁽²⁶⁾.
- Terapia fotodinamica: consiste nell'applicazione di una sostanza fotosensibilizzante che attivata da una sorgente luminosa penetra selettivamente nelle cellule neoplastiche determinandone la morte^(7,25,30).

Questi trattamenti alternativi generalmente vengono utilizzati nelle cheratosi attiniche e dei carcinomi basocellulari superficiali e solamente nei casi in cui

la chirurgia è inattuabile in quanto non consentono un immediato riscontro dell'efficacia e della radicalità della terapia mediante esame istologico.

RADIOTERAPIA

I carcinomi baso e spinocellulare cutanei sono molto sensibili alla radioterapia. Le odierne apparecchiature permettono un controllo oggettivo delle dose somministrata al focolaio ed ai tessuti circostanti sani sia in superficie che in profondità. Il risparmio degli organi critici è sempre garantito con l'uso di schermature adeguate.

Le indicazioni elettive alla radioterapia sono le neoplasie del naso, delle palpebre, del labbro, della commissura labiale, dell'orecchio cioè quelle sedi nella quali la chirurgia può non garantire buoni risultati estetico-funzionali. I risultati a distanza sono complessivamente ottimi sovrapponibili a quelli ottenuti con la chirurgia. La metodica comporta un trauma psichico ridotto, è indolore, viene eseguita ambulatorialmente (comporta però una maggiore durata in termini di tempo 3-4 settimane), non influisce sulle condizioni generali, permette il proseguimento delle terapie in atto.

Spesso la scelta terapeutica diversa dalla radioterapia non è legata da scelte ideologiche bensì da altri fattori, quali una inadeguata informazione sulle possibilità della radioterapia in campo dermatologico, difficoltà di praticare la radioterapia in centri di radioterapia generale quasi sempre oberati al trattamento di neoplasie di altri organi e dotazione tecnica carente ed insufficiente in alcuni centri^(27,42,43).

BIBLIOGRAFIA

1. Alam M, Caldwell JB, Eliezri YD: *Human papillomavirus-associated digital squamous cell carcinoma: literature review and report of 21 new cases*. J. Am. Acad. Dermatol. Mar. 2003; 48: 385-393.
2. Arbiser JL, Fan CY, Su X, Van Emburgh BO, Cerimele F, Miller MS, Harvell J, Marinkowich MP: *Involvement of p53 and p16 tumor suppressor genes in recessive dystrophic epidermolysis bullosa-associated squamous cell carcinoma*. J. Invest. Dermatol. 2004; 123: 788-790.
3. Avril MF, Auperin A, Margulis A, Gerbaulet A, Duvillard P, Benhan E, Guillaume JC, Chalon R, Petit JY, Sancho-Garnier H, Prade M, Bouzy J, Chassagne D: *Basal cell carcinoma of the face: surgery or radiotherapy? Results of a randomized study*. Br. J. Cancer. 1997; 76: 100-106.
4. Bandieramonte G, Lepera P, Moglia D, Bono A, De-Vecchi C, Milani F: *Laser microsurgery for superficial T1-T2 basal cell carcinoma of the eyelid margins*. Ophthalmology 1997; 104: 1179-1184.
5. Bargman H, Hochman J: *Topical treatment of Bowen's disease with 5-Fluorouracil*. J. Cutan. Med. Surg. 2003; 7: 101-105.
6. Berg D, Otley CC: *Skin cancer in organ transplant recipients: Epidemiology, pathogenesis, and management*. J. Am. Acad. Dermatol. 2002; 47: 1-17.
7. Bernstein SC, Lim KK, Brodland DG, Heidelberg KA: *The many faces of squamous cell carcinoma*. Dermatol. Surg. Mar. 1996; 22: 243-254.
8. Buettner PG, Raasch BA: *Incidence rates of skin cancer in Townsville, Australia*. Int. J. Cancer. Nov. 23 1998; 78: 587-593.
9. Butler GJ, Neale R, Green AC, Pandeya N, Whitemann DC: *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of actinic keratoses and squamous cell cancers of the skin*. J. Am. Acad. Dermatol. 2005; 53: 966-972.
10. Chen K, Craig JC, Shumack S: *Oral retinoids for the prevention of skin cancers in solid organ transplant recipients: a systematic review of randomized controlled trials*. Br. J. Dermatol. 2005; 152: 518-523.
11. Clayman GL, Lee JJ, Holsinger FC, Zhou X, Duvic M, Ul-Naggar AK: *Mortality risk from squamous cell skin cancer*. J. Clin. Oncol. Feb. 1 2005; 23: 759-765.
12. Cooper JS: *Radiotherapy in the treatment of skin cancers*. In "Cancer of the Skin", 1991; 553-68, WB Saunders, Philadelphia.
13. Corona R, Dogliotti E, D'Errico M, Sera F, Ivarone I, Baliva G, Chinni LM, Gobello T, Mazzanti C, Puddu P, Pasquini P: *Risk factors for basal cell carcinoma in a Mediterranean population*. Arch. Dermatol. 2002; 137: 1162-1168.
14. Diepgen TL, Mahler VM: *The epidemiology of skin cancer*. Br. J. Dermatol. 2002; 146: 1-6.
15. Dlugosz A, Merlino G, Yuspa S: *Progress in cutaneous cancer research*. J. Invest. Dermatol. Symposium Proceedings. 2002; 7: 17-26.
16. Drake L, Ceilley RI, Cornelison RL, Dobes WA, Dorner W, Goltz RW, Lewis CW: *Guidelines of care for basal cell carcinoma. The American Academy of Dermatology Committee on Guidelines of Care*. J. Am. Acad. Dermatol. 1992; 26: 117-120.

17. Euvrard S, Kanitakis J, Claudy A: *Skin cancers after organ transplantation*. N. Engl. J. Med. 2003; 348: 1681-1691.
18. Garland SM: *Imiquimod*. Curr. Opin. Infect. Dis. 2003; 16: 85-89.
19. Geisse J, Caro I, Lindholm J, Goliz L, Stampone P, Owens M: *Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle controlled studies*. J. Am. Acad. Dermatol. 2004; 50: 722-733.
20. Giglia-Mari G, Sarasin A: *TP53 mutations in human skin cancers*. Hum. Mutat. 2003; 21: 217-228.
21. Goette DK: *Topical chemotherapy with 5-fluorouracil. A review*. J. Am. Acad. Dermatol. 1981; 4: 633-636.
22. Gray DT, Suman VJ, Su WP, Clay RP, Harmsen WS, Roenigk RK: *Trends in the population-based incidence of squamous cell carcinoma of the skin first diagnosed between 1984 and 1992*. Arch. Dermatol. Jun 1997; 133: 735-740.
23. Hauben DJ, Zirkin H, Mahler D, Sacks M: *The biologic behavior of basal cell carcinoma: analysis of recurrence in excised basal cell carcinoma: Part II*. Plast. Reconstr. Surg. 1982; 69: 110-116.
24. Hussein MR: *Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms*. J. Cutan. Pathol. Mar. 2005; 32: 191-205.
25. Johnson TM, Rowe DE, Nelson BR, Swanson NA: *Squamous cell carcinoma of the skin (excluding lip and oral mucosa)*. J. Am. Acad. Dermatol. Mar 1992; 26: 467-484.
26. Johnson TM, Tromovitch TA, Swanson NA: *Combined curettage and excision: a treatment method for primary basal cell carcinoma*. J. Am. Acad. Dermatol. 1991; 24: 613-617.
27. Kuflik EG, Gage AA: *The five-year cure rate achieved by cryosurgery for skin cancer*. J. Am. Acad. Dermatol. 1991; 24: 1002-1004.
28. Miller DL, Weinstock MA: *Nonmelanoma skin cancer in the United States: incidence*. J. Am. Acad. Dermatol. May 1994; 30: 774-778.
29. Morton CA, Brown SB, Collins S, Ibbotson S, Jenkinson H, Kurwa H: *Guidelines for topical photodynamic therapy: report of a workshop of the British Photodermatology Group*. Br. J. Dermatol. 2002; 146: 552-567.
30. Morton CA, MacKie RM, Whitehurst C, Moore JV, McColl JH: *Photodynamic therapy for basal cell carcinoma: effect of tumor thickness and duration of photosensitizer application on response*. Arch. Dermatol. 1998; 134: 248-249.
31. Nguyen P, Vin-Christian K, Ming ME, Berger T: *Aggressive squamous cell carcinomas in persons infected with the human immunodeficiency virus*. Arch. Dermatol. 2002; 138: 758-763.
32. Nordin P, Larko O, Stenquist B: *Five-year results of curettage-cryosurgery of selected large primary basal cell carcinomas on the nose: an alternative treatment in a geographical area underserved by Mohs surgery*. Br. J. Dermatol. 1997; 136: 180-183.
33. Phan TA, Halliday GM, Barnetso RS, Damian DL: *Spectral and dose dependence of ultraviolet radiation-induced immunosuppression*. Front Biosci. Jan 1 2006; 11: 394-411.

34. Poon TS, Barnetson RS, Halliday GM: *Sunlight-induced immunosuppression in humans is initially because of UVB, then UVA, followed by interactive effects.* J. Invest. Dermatol. Oct. 2005; 125: 840-846.
35. Rowe DE, Carroll RJ, Day CL Jr: *Prognostic factors for local recurrence, metastasis, and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear, and lip. Implications for treatment modality selection.* J. Am. Acad. Dermatol. 1992; 26: 976-990.
36. Salasche SJ, Cheney ML, Varvares MA: *Recognition and management of the high-risk cutaneous squamous cell carcinoma.* Curr. Prob. Dermatol. 1993; 5: 141-192.
37. Schmults CD. *High-risk cutaneous squamous cell carcinoma: identification and management.* Adv Dermatol. 2005; 21: 133-152.
38. Spiller WF & Spiller RF. *Treatment of basal cell carcinomas by a combination of curettage and cryosurgery.* J. Dermatol. Surg. Oncol. 1997; 3: 443-447.
39. Stockfleth E, Nindl I, Sterry W, Ulrich C, Schmook T, Meyer T: *Human papillomaviruses in transplant-associated skin cancers.* Dermatol. Surg. 2004; 30: 604-609.
40. Takata M, Saida T: *Early cancers of the skin: clinical, histopathological, and molecular characteristics.* Int. J. Clin. Oncol. 2005; 10: 391-397.
41. Telfer NR, Colver GB, Bowers PW: *Guidelines for the management of basal cell carcinoma.* Br. J. Dermatol. 1999; 141, 415-423.
42. Veness MJ, Morgan GJ, Palme CE, GebSKI V: *Surgery and adjuvant radiotherapy in patients with cutaneous head and neck squamous cell carcinoma metastatic to lymph nodes: combined treatment should be considered best practice.* Laryngoscope. 2005; 115: 870-875.
43. Veness MJ: *Treatment recommendations in patients diagnosed with high-risk cutaneous squamous cell carcinoma.* Australas Radiol. 2005; 49: 365-376.
44. Wilson BD, Mang TS, Stoll H, Jones C, Cooper M, Dougherty TJ: *Photodynamic therapy for the treatment of basal cell carcinoma.* Arch. Dermatol. 1992; 128: 1597-1601.
45. Wolf DJ & Zitelli JA: *Surgical margins for basal cell carcinoma.* Arch. Dermatol. 1987; 123: 340-344.

NANOTECNOLOGIE E IL SETTORE AGROALIMENTARE

Davide Spadaro, Angelo Garibaldi

Agroinnova – Centro di Competenza per l’Innovazione in Campo Agro-ambientale
Università degli Studi di Torino - Grugliasco (TO)

Key words: *Precision farming / Agricoltura di precisione*
 Biosensors / Biosensori
 Plant disease diagnostics / Diagnostica fitopatologica
 Nanomaterials / Nanomateriali

Abstract:

Nanotechnologies (NT) deals with matter control on a scale lower than one micrometer and with the design and realization of devices at such scale. The fundamental areas of NT with potential for the agrifood sector include nanomaterials, biosensors, microfluidics and lab-on-a-chips, nanoparticle tagging, and new systems for molecule delivery. NT can help in the identification of pathogens and contaminants through biosensors. Precision farming, through computers, satellite positioning systems and remote sensing systems, can permit to measure different parameters, including the soil conditions, the environmental changes, the diseases and the plant health. Nanomaterials could be exploited to deliver more efficiently and safely pesticides and fertilizers. The tendency to commercialize first, and to answer to the problems raised by the consumers later, created big obstacles for the biotech development. Starting from the experience matured in the field of green biotechnology, the NT sector should identify the technologies that could reach easily the market and explore the potential risks and benefits of each NT.

Riassunto:

Le nanotecnologie (NT) si occupano del controllo della materia su scala dimensionale inferiore al micrometro e della progettazione e realizzazione di dispositivi in tale scala. Le aree fondamentali delle NT che hanno potenziale nel settore agroalimentare comprendono i nanomateriali, la biosensoristica, la microfluidica e i lab-on-a-chip, il nanoparticle tagging e nuovi sistemi per la distribuzione delle molecole. Le NT includono l’identificazione di patogeni e contaminanti mediante biosensori. L’agricoltura di precisione, facendo uso di computer, sistemi di posizionamento satellitari e sistemi di remote sensing può permettere di misurare diversi parametri, tra cui le condizioni

del suolo, i cambiamenti ambientali, le malattie e la salute delle piante. I nanomateriali offrono opportunità per somministrare in modo più efficiente e sicuro agrofarmaci e fertilizzanti. La tendenza a commercializzare prima e a rispondere alle questioni sollevate dai consumatori in seguito ha costituito un grosso ostacolo per lo sviluppo biotecnologico. Partendo dall'esperienza maturata nel campo delle biotecnologie verdi, il settore delle NT dovrebbe identificare le tecnologie che possono in breve tempo raggiungere il mercato e esplorare i potenziali rischi e benefici di ogni NT.

1. INTRODUZIONE

Le nanotecnologie (NT) si occupano del controllo della materia su scala dimensionale inferiore al micrometro (in genere tra 1 e 100 nanometri) e della progettazione e realizzazione di dispositivi in tale scala⁽¹⁷⁾. La nanotecnologia opera in un ambito d'investigazione multidisciplinare, coinvolgendo molteplici indirizzi di ricerca, tra cui biologia molecolare, chimica, scienza dei materiali, fisica, ingegneria meccanica, ingegneria chimica ed elettronica. Il grande sviluppo delle NT è stato reso possibile dalla diffusione di nuove tecnologie che permettono di vedere e manipolare i singoli atomi delle molecole, tra cui il microscopio a effetto tunnel (STM⁽³⁾).

Le NT possono essere viste sia come un'estensione delle scienze esistenti sulla scala nanometrica, che come un loro "riarrangiamento". Ci sono due principali approcci per la sintesi dei nanomateriali e la fabbricazione di nanostrutture: il metodo *top-down* e il *bottom-up*. L'approccio *top-down* si realizza principalmente con l'utilizzo di processi fisici sui materiali, come la macinatura o triturazione. Al contrario, l'approccio *bottom-up* si riferisce alla sintesi di un materiale "dal basso", ovvero partendo dagli atomi, passando per le molecole e arrivando a sintetizzare dei composti. Le NT che sfruttano il metodo *bottom-up* si ispirano ai concetti biologici di autoassemblaggio e autorganizzazione.

2. TECNICHE NANOTECNOLOGICHE

Le aree fondamentali delle NT che hanno potenziale nel settore agroalimentare comprendono l'impiego di nanomateriali, la biosensoristica, la microfluidica, l'individuazione di punti quantici, il nanoparticle tagging e i sistemi di delivery intelligenti.

2.1 I nanomateriali

Un nanomateriale, secondo la definizione dell'EFSA è "*qualsiasi forma di materiale composto da parti funzionali distinte, molte delle quali hanno una o più dimensioni uguali o inferiori a un ordine di grandezza di 100 nm*". Si parla di nanomateriale quando questo risulta costituito da strutture nanometriche e in grado di indurre nuove proprietà chimiche e fisiche riferibili alle leggi della meccanica quantistica e normalmente assenti nel materiale stesso di dimensioni convenzionali, ovvero micro/macrometriche. Tra le nanostrutture più impiegate nel settore agroalimentare ritroviamo le nanoparticelle, le nanobacchette, i nanofoglietti, le nanofibre e i nanotubi.

I nanotubi di carbonio, ad esempio, sono entità fisiche distinte che hanno due dimensioni uguali o inferiori a un ordine di grandezza di 100 nm e una di misura maggiore⁽⁹⁾. Il loro diametro nanometrico li rende particolarmente adatti per prelevare il nucleo in una cellula ed inserirlo in un'altra. In altre parole, svolgendo la funzione di nano ago, permettono la clonazione di materiale biologico. Si sta studiando il loro uso anche come strumenti per rilasciare in maniera molto precisa dosi infinitesimali di farmaci o agrofarmaci.

2.2 Biosensoristica

Promettenti sviluppi potranno derivare dall'applicazione delle conoscenze sui "biosensori" che sfruttano reazioni biologiche per individuare l'organismo target. Questi dispositivi, già utilizzati in diagnostica clinica, accoppiano un elemento di riconoscimento biologico (ad es. sequenze specifiche di DNA) ad un trasduttore fisico che trasforma l'evento di bio-riconoscimento (ibridazione) in un segnale elettrico misurabile, quale la luce, la corrente o la frequenza. Esistono due tipi di biosensori, quelli il cui legame selettivo avviene con una molecola immobilizzata (anticorpo, oligonucleotide ecc.) ed in questo caso si parla di bioaffinità e quelli nei quali un enzima immobilizzato è utilizzato per il riconoscimento del substrato (strumenti bio-catalitici). L'abbinamento di biosensori con i DNA array consente l'analisi rapida di campioni complessi di DNA.

2.3 Microfluidica e Lab on a chip

La microfluidica, è caratterizzato dall'interdisciplinarietà e integra la fisica, l'ingegneria e la chimica per l'elaborazione di flussi di fluidi costretti in scala sub millimetrica in ambito tipo chimico-biologico, sfruttando anche le tecniche di microtecnologia e biotecnologia. I sistemi microelettro meccanici (MEMS, dall'inglese *Micro Electro Mechanical Systems*) stanno dando un grosso slancio alle scoperte in campo biologico. I dispositivi *Lab-on-a-chip* sono un sottogruppo dei dispositivi MEMS e spesso indicati anche come Micro Total Analysis Systems (μ TAS). Tuttavia, con il termine "*Lab-on-a-Chip*" si indica generalmente la misurazione di un singolo o di un multiplo processo di laboratorio con un semplice *chip*, mentre " μ TAS" si dedica all'integrazione di tutte le sequenze di processi di laboratorio per fare analisi chimiche. I *Lab-on-a-chip* sono dei dispositivi di microfluidica in grado di identificare la presenza di particolari geni o proteine a partire da piccole quantità di campioni biologici⁽⁵⁾. Svolgono le analisi in modo rapido, automatico ed anche

contemporaneamente per più campioni. Le loro dimensioni molto contenute li rende maneggiabili e trasportabili ovunque. Vengono prodotti con tecniche mutate dall'industria elettronica e per tale motivo beneficiano di bassi costi dovuti alla produzione di massa. L'aspetto innovativo dei lab-on-a-chip è dato dalla rapidità, efficienza e accuratezza dell'analisi diagnostica; il diametro molto piccolo dei microcanali, infatti, permette l'uso di una minore quantità di reagenti riducendo così il tempo necessario per la stabilizzazione delle temperature.

2.4 Individuazione di singole molecole

I punti quantici (dall'inglese *quantum dots*) sono nanostrutture formate da un'inclusione di un materiale semiconduttore, con una certa banda proibita (intervallo di energia interdetto agli atomi), e con dimensioni tipiche comparabili alla lunghezza d'onda di De Broglie, all'interno di un altro semiconduttore con banda proibita più grande. Un punto quantico, se opportunamente funzionalizzato, emette un singolo fotone in presenza di una molecola specifica. L'obiettivo finale è la costruzione di un dispositivo in grado di rilevare la presenza di una singola molecola all'interno della sostanza da analizzare, accoppiando elevata sensibilità a costi di realizzo relativamente bassi.

2.5 Nanoparticle Tagging

Le nanoparticelle sono di dimensioni talmente piccole da comportarsi come dei punti quantici, ovvero a seconda delle dimensioni e del materiale di cui sono costituite emettono luce di un ben determinato colore. Attaccando nanoparticelle di colori diversi a molecole di varia natura, è possibile determinare la presenza nello stesso campione di differenti specie biologiche. In maniera molto simile, si possono attaccare alle molecole da riconoscere nanobacchette che differiscono per strisce di metalli diversi posti sulla superficie esterna. Le nanobacchette sono entità fisiche distinte aventi due dimensioni uguali o inferiori a un ordine di grandezza di 100 nm e una dimensione di misura maggiore.

2.6 Nanocapsule, nanoparticelle e nanospugne

Nuovi sistemi per la distribuzione di molecole potranno rivoluzionare il futuro della difesa da patogeni, parassiti e infestanti. Le nanocapsule sono

strutture costituite da uno strato sottile esterno (un guscio) con un ampio spazio all'interno⁽⁶⁾. Il guscio protegge il composto chimico dai danni provocati da agenti esterni e aiuta a migliorare solubilità e penetrazione attraverso i tessuti. Inoltre, è possibile controllare l'apertura del guscio per il rilascio del principio attivo, ad esempio variando le condizioni di pH. L'incapsulazione e i metodi di rilascio controllato permetteranno di cambiare l'impiego dei farmaci in medicina veterinaria e degli agrofarmaci e dei fertilizzanti in agricoltura.

Le nanoparticelle hanno invece un nucleo o matrice solida, normalmente costituito di atomi metallici. A causa della loro taglia minuscola, le proprietà fisiche delle nanoparticelle sono significativamente diverse rispetto alle particelle di taglia maggiore dei materiali grezzi. Ciò comporta la comparsa di effetti quantici, tra cui il superparamagnetismo, il blocco di Coulomb, la risonanza plasmonica di superficie, potenzialmente utili. Le nanoparticelle presentano inoltre un aumento del rapporto tra area superficiale e volume, che porta alla comparsa di effetti di superficie correlati con l'elevato numero di atomi di superficie. Diversi materiali possono essere utilizzati per la fabbricazione di nanoparticelle, tra cui ossidi metallici, ossidi ceramici, silicati e materiali magnetici⁽¹⁵⁾.

Le nanospugne sono composti iper-reticolati di ciclodestrine, derivate naturali dell'amido, utilizzate in diversi ambiti/settori quali quello farmaceutico veterinario, della difesa delle piante ed ambientale. Le caratteristiche principali sono: la forma sferica, la non tossicità, le nanoporosità in grado di veicolare, includere e rilasciare in maniera controllata molecole di diversa tipologia.

3. APPLICAZIONI NANOTECNOLOGICHE

Le NT hanno il potenziale di rivoluzionare i sistemi agroalimentari. Verranno di seguito trattate alcune delle potenzialità delle NT e dei materiali per il settore dell'agricoltura e dell'alimentazione.

3.1 Agricoltura di precisione

L'agricoltura di precisione o agricoltura sito-specifica consiste "nell'applicazione di tecnologie, principi e strategie per una gestione spaziale e temporale della variabilità associata agli aspetti della produzione agricola"⁽¹⁶⁾, ossia nell'esecuzione di interventi colturali in relazione alle reali necessità dell'appezzamento ed alla loro variabilità spaziale e temporale.

I principi dell'agricoltura di precisione possono essere oggi applicati a tutte le operazioni agronomiche (lavorazioni del terreno; semina; concimazione; irrigazione; difesa della coltura), l'importante è tenere in considerazione che il presupposto per poter applicare le soluzioni presenti sul mercato è la gestione strategica della variabilità, e quindi la gestione delle informazioni che si possono ricavare dai dati raccolti in campo. Una gestione di questo tipo consente di perseguire dei vantaggi di ordine agronomico (mediante l'accrescimento della performance della coltura), economico (attraverso il miglior utilizzo degli input e la riduzione dei costi culturali) ed ambientale. Ma soprattutto permette di incrementare l'efficienza del sistema produttivo attraverso una razionalizzazione dei singoli interventi, la quale richiede inizialmente una revisione del sistema gestionale adottato in azienda.

L'agricoltura di precisione, facendo uso di computer, sistemi di posizionamento satellitari e sistemi di remote sensing può permettere di misurare diversi parametri, tra cui le condizioni del suolo, i cambiamenti ambientali, le malattie e la salute delle piante. Può essere utile analizzare i diversi livelli tecnologici nei quali si articola l'agricoltura di precisione, tenendo conto che si tratta di passaggi successivi, nel senso che ciascuno dei livelli superiori richiede l'acquisizione completa di quello precedente:

- 1) alla base della piramide troviamo la guida assistita: il conducente della macchina agricola utilizza un particolare navigatore satellitare per ottimizzare le passate in campo, evitando inutili sovrapposizioni;
- 2) il passo intermedio consiste nella verifica delle produzioni conseguite (con o senza l'analisi qualitativa del prodotto), effettuata con appositi sensori già durante la fase di raccolta, per creare una mappa del campo in cui si evidenziano le zone più o meno produttive, al fine di impostare la coltura che seguirà su dosi variabili dei vari mezzi tecnici, in funzione della scelta produttiva adottata;
- 3) al vertice troviamo l'impiego del telerilevamento, con il quale la mappa del campo viene tenuta aggiornata in relazione alle reali condizioni della coltura durante il suo ciclo biologico, allo scopo di intervenire tempestivamente senza dovere attendere l'annata successiva.

L'unione di BT e NT nei sensori creerà dispositivi a superiore sensibilità permettendo risposte più precoci ai cambiamenti ambientali. I biosensori permetteranno di raccogliere accurate informazioni attraverso il monitoraggio in tempo reale di condizioni del suolo (pH, composizione minerale), cambiamenti ambientali (umidità, temperatura), presenza di malattie, parassiti e infestanti, stato di salute e di sviluppo delle piante⁽²⁾. In futuro verranno

sviluppati sistemi di monitoraggio nanotecnologici innovativi in grado di rispondere a variazioni di parametri ambientali, per esempio, in grado di rilasciare nanofertilizzanti in risposta ad una carenza di azoto.

3.2 La diagnostica molecolare

In patologia vegetale le NT potranno avere un notevole impatto soprattutto nel settore della diagnostica e nello studio dell'interazione ospite-patogeno. Grazie alla disponibilità di nuovi materiali con proprietà fisiche e caratteristiche funzionali straordinarie e alla possibilità di realizzare sistemi in miniatura, abbinando biotecnologie e NT (“convergenza tecnologica”), è possibile implementare qualità e caratteristiche di processi e prodotti diagnostici esistenti o realizzare nuovi sistemi di analisi.

I metodi basati sulla caratterizzazione molecolare del patogeno sono più rapidi, specifici, sensibili e in generale più precisi dei metodi di diagnosi tradizionale per l'identificazione accurata di un agente patogeno. Nonostante questi vantaggi, le metodologie molecolari non sono ancora applicate su larga scala per la diagnosi di routine, a causa di motivazioni tecniche ed economiche. Per migliorare l'efficienza della diagnosi è auspicabile lo sviluppo di metodi “multiplex”, che permettono di individuare diversi patogeni contemporaneamente, e quantitativi, in modo da poter valutare anche il grado di suscettibilità dell'ospite, determinare il potenziale della malattia o la soglia economica del danno e quindi decidere opportune strategie di lotta⁽⁴⁾. La tecnica del DNA array permette di effettuare contemporaneamente reazioni specifiche di ibridazione tra gli acidi nucleici di un campione e le sonde molecolari fissate su un supporto⁽¹⁴⁾. In base alle dimensioni e alla distribuzione delle sonde, si distinguono i macroarray con una bassa densità di distribuzione, che hanno una membrana di nylon o nitrocellulosa come supporto, e i microarray con una elevata densità di distribuzione, nei quali il supporto è un vetrino o un wafer di silicio⁽¹¹⁾.

Le nanobiotecnologie, il cui obiettivo prioritario è lo studio di processi bio-molecolari a livello cellulare, cominciano ad essere utilizzate per studi funzionali nell'interazione pianta-patogeno ed in particolare per l'analisi dell'espressione genica. Queste applicazioni sono possibili grazie al progresso delle conoscenze relative alla sequenza del genoma di un numero sempre più elevato di funghi fitopatogeni. Applicazioni simili esistono per patogeni fungini economicamente importanti; un esempio è l'Affymetrix GeneChip microarray basato sull'intero genoma di *Fusarium graminearum*, agente causale della fusariosi della spiga del grano e dell'orzo, per lo studio dell'espressione genica

differenziale *in vitro ed in planta*⁽⁸⁾, che consente di individuare i geni attivati nel fungo durante il processo di infezione.

Un'altra interessante linea di sviluppo è la realizzazione di sistemi bio-informatici automatizzati per identificare gli agenti patogeni sulla base delle sequenze del DNA mediante un "codice a barre". Li e coautori⁽¹⁰⁾ hanno messo a punto un sistema di identificazione che utilizza nanostrutture di DNA, dette dendrimeri, molecole di DNA ramificate marcate con coloranti fluorescenti di colore rosso e verde, in proporzioni controllate, così da ottenere un codice a barre caratteristico per ciascun patogeno. I dendrimeri sono legati a sonde specifiche per i DNA bersaglio e i risultati dell'analisi vengono rilevati mediante citometria a flusso o elettroforesi su gel di agarosio. Questo metodo è multiplex ed ha una sensibilità dell'ordine dell'attomole; l'impiego della citometria a flusso lo rende anche molto rapido (1 min). Un altro vantaggio è la possibilità di automatizzare la lettura dei risultati dell'analisi. La realizzazione di un archivio informatico di codici a barre dei microrganismi patogeni potrebbe costituire un sistema universale di classificazione.

3.3 Nanoagrofarmaci e nanofertilizzanti

I nanomateriali offrono opportunità per somministrare in modo più efficiente e sicuro agrofarmaci e fertilizzanti. Alcuni dei primi nanoagrofarmaci in sviluppo sono nanoformulazioni di nano-farmaci già esistenti⁽⁷⁾. Le multinazionali agrochimiche stanno incapsulando i principi attivi in nanocapsule disegnate in modo da aprirsi in particolari condizioni, ad esempio in risposta alla radiazione solare, al calore, a campi magnetici, a ultrasuoni, all'umidità o alle condizioni alcaline dello stomaco degli insetti. Numerose aziende preparano formulazioni contenenti nanoparticelle nell'intervallo tra 100 e 250 nm in grado di dissolversi in acqua più efficientemente rispetto alle formulazioni tradizionali, mentre altre aziende impiegano nanoemulsioni acquose o oleose contenenti sospensioni uniformi di nanoparticelle di agrofarmaci di 200-400 nm.

3.4 Particle farming

Il particle farming rappresenta un'applicazione industriale utile per recuperare nanoparticelle di metalli crescendo piante in suoli ricchi di tali componenti. Le ricerche hanno mostrato, ad esempio, che la coltivazione di piante di erba medica in suoli ricchi in oro permette di assorbire nanoparticelle di questo metallo attraverso le radici e di accumularle nei tessuti della pianta.

Le nanoparticelle possono poi essere separate dai tessuti vegetali dopo la raccolta⁽¹²⁾.

3.5 Applicazioni nanotecnologiche lungo la filiera alimentare

Le NT, consentendo la manipolazione degli ingredienti alimentari a livello molecolare, non sostituiscono i prodotti naturali, ma vengono aggiunte per migliorarli nelle loro caratteristiche come durata, aspetto, colore, profumo che si possono ricondurre a due ambiti tipici delle tecnologie alimentari: produzione e conservazione⁽¹⁸⁾.

Al primo ambito sono riconducibili applicazioni come: sensori di processo, controllori microbiologici, progettazioni di componenti (aromi, antiossidanti, sostanze funzionali) e trasporto di sostanze per favorire determinati processi di trasformazione. Al secondo, invece, appartengono le applicazioni sia sulla superficie del cibo sia all'interno dell'imballaggio per impedirne l'ossidazione oppure la degenerazione in seguito alla luce e all'umidità⁽²⁰⁾.

Per realizzare sensori si impiegano molecole biologiche, zuccheri o proteine, in qualità di "target-recognition group". Si tratta di biosensori che possono servire come rilevatori di fattori patogeni, di contaminanti (tossine batteriche, micotossine, residui di agrofarmaci) o come strumenti atti a monitorare i prodotti in via di lavorazione o stagionatura. Nella filiera ortofrutticola sono stati messi a punto nanosensori per la tracciabilità lungo la catena del freddo, nanosensori che identificano la presenza di ossigeno, o nanosensori per identificare contaminanti e patogeni. Si sta attualmente lavorando allo sviluppo di involucri 'intelligenti' (contenenti nano-sensori e attivatori anti-microbici) in grado di rilevare il deterioramento degli alimenti e di rilasciare dei nano-anti-microbi per estendere la durata degli alimenti, permettendo ai supermercati di conservare il cibo per periodi più lunghi prima della vendita.

Viceversa nel realizzare vitamine, antimicrobici, antiossidanti, aromatizzanti e conservanti lo scopo è di migliorare il livello funzionale degli ingredienti, senza eccedere nella loro concentrazione⁽¹³⁾. Nanostrutture colloidali, nanoemulsioni e nanoparticelle biopolimeriche sono il meccanismo ideale per il rilascio controllato di ingredienti funzionali. Tali strutture potrebbero incrementare l'assorbimento e la digestione delle sostanze nutritive o intensificarne aspetto e sapore, migliorando la sensazione al palato. I cibi 'intelligenti' potrebbero percepire un'eventuale allergia di un individuo agli ingredienti di un alimento e bloccarne l'azione nociva.

Per il secondo tipo di ambito applicativo, la conservazione, la struttura più efficace è la nanolamina che poi si traduce in un film che può essere edule

o no. Nel primo caso, lo si può applicare direttamente su frutta, verdura, carne, cioccolato, prodotti da forno, patatine fritte ecc. e può agire sia come protezione sia come miglioramento dell'aspetto dei cibi. I nanolaminati sono fatti di polisaccaridi, proteine e lipidi con caratteristiche diverse, visto che polisaccaridi e proteine costituiscono una buona barriera contro ossigeno e anidride carbonica, ma sono meno efficaci contro l'umidità; viceversa i lipidi funzionano bene contro quest'ultima, anche se hanno una limitata resistenza meccanica.

4. RISCHI LEGATI ALL'IMPIEGO DI NANOTECNOLOGIE

Aggiungere nanomateriali lungo la filiera agroalimentare non è tuttavia del tutto privo di rischi. A causa delle loro dimensioni ridotte, i nanomateriali riescono a superare le barriere come l'epitelio dell'intestino, ed entrare nel flusso sanguigno, possono poi raggiungere altri organi e in essi depositarsi.

Un gruppo di lavoro dell'EFSA (Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare) ha recentemente rilasciato la bozza di un'opinione sulle NT presenti negli alimenti e nei mangimi. Gli approcci attuali alla valutazione del rischio possono essere applicati alle NT, ma i dati sulle versioni non-nano delle sostanze non possono essere trasferiti alle versioni nano, perché le dimensioni ridotte delle nanoparticelle permettono loro di muoversi nell'organismo in modo diverso dalle particelle più grandi, mentre la loro superficie maggiore ne aumenta la reattività. La valutazione del rischio dovrebbe essere eseguita considerando caso per caso.

Le ricerche condotte sulla tossicità dei nano materiali ingegnerizzati somministrati per via orale, ad oggi, sono relativamente scarse. La maggior parte di esse si riferisce all'assorbimento gastrointestinale di metalli o ossidi di metallo, spesso somministrate a dosi troppo elevate per essere utilizzate nella determinazione dell'esposizione al pericolo. Inoltre, i dati presenti in bibliografia si riferiscono a studi di tossicità acuta, mentre mancano dati in merito alla tossicità cronica, indotta da somministrazioni di piccole dosi per via orale, ripetute per lunghi periodi. Dai risultati attualmente disponibili, si può affermare che l'assorbimento per via orale di alcuni nanomateriali (nanoparticelle di biossido di titanio, di rame, di zinco) può indurre processi degenerativi o infiammatori principalmente su reni e fegato, visibili sia a livello macroscopico sia microscopico⁽¹⁾. Alcuni scienziati hanno suggerito che le nanoparticelle impiegate come additivi alimentari potrebbero essere uno dei fattori implicati nell'aumento dell'incidenza di malattie autoimmuni come il morbo di Crohn o la sindrome dell'intestino irritabile⁽¹⁹⁾. Infine,

studi relativi alla tossicità dei materiali nanostrutturati somministrati per via endovenosa e/o respiratoria hanno evidenziato effetti tossici anche in altri organi appartenenti al sistema nervoso, immunitario, polmonare e riproduttivo.

5. ASPETTI NORMATIVI SUI NANOMATERIALI

Oggi a livello europeo, solo il Reg. CE 1333/2008 prevede esplicitamente questa distinzione, stabilendo una rivalutazione degli additivi autorizzati, qualora siano utilizzate le NT per la loro produzione. Mentre in tutti gli altri casi, non è prevista una distinzione tra i prodotti realizzati con tecnologie convenzionali e prodotti sviluppati con le NT. Inoltre, le etichette dei prodotti alimentari ottenute con le NT non riportano alcun riferimento all'impiego delle stesse: la mancanza di questa informazione non costituisce infrazione della relativa normativa, dato che la stessa non prevede obbligo di dichiarazione di questi prodotti in etichetta.

Molti scienziati, esperti di *nanofoods*, hanno espresso la necessità di nuove normative, sottolineando l'esigenza di eseguire delle analisi volte ad assicurare la sicurezza dei prodotti, prima di autorizzare il loro inserimento nel mercato. Al contrario, nella sua comunicazione sugli aspetti normativi relativi alle NT, la Commissione Europea afferma che la legislazione attuale considera i potenziali rischi sulla salute, sulla sicurezza e sull'ambiente associati ai nanomateriali. Infatti, il Regolamento CE 178/2002 traccia i principi generali della sicurezza alimentare, stabilendo le procedure necessarie a garantire la sicurezza alimentare e le basi per garantire un adeguato livello di protezione della salute e degli interessi dei consumatori. In particolare l'art. 14, comma 1, stabilisce che gli alimenti a rischio non possono essere immessi sul mercato. Inoltre, l'art. 1, comma a, del Regolamento CE 852/2004 stabilisce che la responsabilità principale per la sicurezza degli alimenti e dell'operatore del settore alimentare. Tuttavia, la Commissione riconosce che è necessario implementare l'attuale legislazione al fine di garantire un adeguato livello di protezione e che, a tal fine, è essenziale ampliare le conoscenze in merito alla caratterizzazione dei nanomateriali, alla valutazione dell'esposizione e alla valutazione e gestione del rischio. In particolare, la Commissione ritiene necessario perfezionare le metodiche analitiche e la metodologia per la valutazione del rischio. Inoltre, la Commissione richiama il principio di precauzione, dichiarando che le misure di gestione dei nanomateriali, per ora, devono basarsi su tale principio, stabilito dall'art 7 del Reg. CE 178/2002.

6. CONSIDERAZIONI FINALI

L'esperienza ha mostrato che ogni rischio o beneficio associato con l'integrazione di nuove tecnologie nei processi agroalimentari viene fortemente amplificato dai potenziali effetti su uomini, animali, comunità rurali e l'ambiente. La percezione e l'accettazione pubblica delle NT nell'agroalimentare influenzeranno fortemente le modalità di ingresso di tali applicazioni nella società. Il successo o il fallimento nella commercializzazione delle prime NT nel settore agroalimentare potrà influenzare fortemente la futura commercializzazione di NT in tutti i settori industriali.

C'è un segmento crescente della popolazione che non vuole cibo ingegnerizzato, né biotecnologico né nanotecnologico. Tale segmento della popolazione è disposto a pagare un prezzo superiore per un prodotto biologico. Il valore del settore biologico – che la maggior parte della popolazione associa con il fatto di essere OGM-free – è cresciuto con percentuali vicine al 15% all'anno a partire dalla seconda metà degli anni Novanta.

Le grosse aziende agroalimentari non vogliono che tra dieci anni si ripeta la situazione in cui i consumatori siano attratti da prodotti nano-free. Ciononostante, le aziende sono riluttanti a manifestare che cosa stanno sviluppando nei loro laboratori di ricerca (in modo da evitare che i competitori possano rubare le idee o avere vantaggi competitivi). Il fatto di dichiarare le informazioni sui nuovi prodotti confidenziali blocca però l'azione governativa di controllo e la possibile discussione delle nuove tecnologie con il pubblico. I consumatori o coloro che potrebbero venire a contatto con i materiali e le sostanze create mediante NT hanno il diritto di sapere a che cosa sono esposti e se esistano dei rischi quando inalano o ingeriscono tali materiali. Ci possono essere conseguenze inattese? È necessario prevedere gli effetti collaterali prima che questi prodotti siano introdotti commercialmente e diffusi nella popolazione. Quando i materiali sono ristretti alle dimensioni nanometriche anche le loro proprietà cambiano, per cui non possono essere semplicemente considerati versioni in miniatura dei materiali originali.

È necessaria, pertanto, nuova ricerca di base e applicata. Se tale ricerca non verrà svolta i consumatori e l'ambiente potranno avere dei danni di due tipi:

- 1) venendo esposti a prodotti potenzialmente dannosi; o
- 2) se paure infondate dovessero rallentare il processo di approvazione o condurre ad una sovra-regolamentazione, venendo privati di innovazioni realmente benefiche. Il bisogno di identificare completamente ogni possibile rischio correlato alle NT non è necessario per alimentare paure

irrazionali o allarmistiche, ma per anticipare punti di pressione che, se ignorati, impediranno al settore industriale di raggiungere il massimo potenziale di sviluppo.

BIBLIOGRAFIA

1. Ashwood P, Thompson R, Powell J: *Fine particles that adsorb lipopolysaccharide via bridging calcium cations may mimic bacterial pathogenicity towards cells*. Exp. Biol. Med. 2007; 232: 107-117.
2. Bath J, Turberfield A: *DNA nanomachines*. Nat. Nanotechnol. 2007; 2: 275-284.
3. Binnig G, Rohrer H, Gerber Ch, Weibel E: *Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy*. Phys. Rev. Lett. 1982; 49: 57-61.
4. Cacciola SO: *Recenti acquisizioni e tecniche di biologia molecolare per la diagnosi dei patogeni fungini delle piante*. Inf.tore Fitopatol. 2007; 57: 23-28.
5. Chovan T, Guttman A: *Microfabricated devices in biotechnology and biochemical processing*. Trends Biotechnol. 2002; 20: 116-122.
6. Couvreur P, Barratt G, Fattal E, Legrand P, Vauthier C: *Nanocapsule technology: a review*. Crit. Rev. Ther. Drug 2002; 19: 99-134.
7. Green J, Beestman G: *Recently patented and commercialized formulation and adjuvant technology*. Crop Prot. 2007; 26: 320-327.
8. Guldener U, Seong K-Y., Boddu J, Cho S, Trail F., Xu J-R, Adam G, Mewes H-W, Muehlbauer GJ, Kistler CH: *Development of a Fusarium graminearum Affymetrix GeneChip for profiling fungal gene expression in vitro and in planta*. Fungal Genet. Biol. 2006; 43: 316-325.
9. Harris PJF: *Carbon Nanotube Science. Synthesis, Properties and Applications*. Cambridge University Press, 2007, Cambridge.
10. Li Y, Hong Cu YT, Luo D: *Multiplexed detection of pathogen DNA with DNA-based fluorescence nanobarcodes*. Nat. Biotechnol. 2006; 43: 316-325.
11. Lievens B, Thomma BPHJ: *Quantification in multiplex format as a challenging goal for plant pathogen molecular diagnostic assays*. Pest Technol. 2007; 1: 17-26.

12. Mack C, Wilhelmi B, Duncan JR, Burgess JE: *Biosorption of precious metals*. Biotechnol. Adv. 2007; 25: 264-271.
13. Mozafari M, Flanagan J, Matia-Merino L, Awati A, Omri A, Suntres Z, Singh H: *Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods*. J. Sci. Food Agric. 2006; 86: 2038-2045.
14. Mumford R, Boonham N, Tomlinson J, Barker I: *Advances in molecular phytodiagnostics - new solutions for old problems*. Eur. J. Plant Pathol. 2006; 116: 1-19.
15. Panyam J, Labhasetwar V: *Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue*. Adv. Drug Deliver. Rev. 2003; 55: 329-347.
16. Pierce FJ, Nowak P: *Aspects of precision agriculture*. Adv. Agron. 2009; 67: 1-85.
17. Roco MC: *Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine*. Curr. Opin. Biotechnol. 2003; 14: 337-346.
18. Sanguansri P, Augustin M: *Nanoscale materials development – a food industry perspective*. Trends Food Sci. Technol. 2006; 17: 547-556.
19. Schneider J: *Can microparticles contribute to inflammatory bowel disease: Innocuous or inflammatory?* Exp. Biol. Med. 2007; 232: 1-2.
20. Sorrentino A, Gorrasi G, Vittoria V: *Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications*. Trends Food Sci. Technol. 2007; 18: 84-95.

LE NANOTECNOLOGIE PER LA SALUTE DEI VEGETALI E DELL'UOMO

Roberto Fantozzi, Chiara Dianzani

Dipartimento di Anatomia, Farmacologia e Medicina Legale
Università degli Studi di Torino

Key words: *Nanotechnology / Nanotecnologie*
 Solid lipid nanoparticles / Nanoparticelle solide lipidiche
 Nanodelivery / Nanodelivery
 Cholesteryl butyrate / Colesterilbutirrato

Abstract:

Nanotechnology is an emerging branch of science that deals with designing tools and devices of size of 1-100 nm with unique function, at the cellular, atomic and molecular levels. Recent studies on nanotechnologies have lead to the development of new systems of drug nanocarriers. In particular, in collaboration with Prof.ssa Cavalli (Department of Scienza e Tecnologia del Farmaco), we have investigated the effects of solid lipid nanoparticles of cholesterylbutirate and microspheres of 5-fluorouracil. The results demonstrated that the use of nanocarriers might be a novel clinical possibility to deliver drugs at lower dosages and with higher drug efficacy. Besides, systems of drug delivery can help to reduce multi-drug resistance, which represents an important obstacle to anticancer drug therapy.

Riassunto:

Le nanotecnologie sono un termine collettivo per indicare l'insieme dei metodi, delle tecniche e dei processi che consentono di osservare, misurare e manipolare la materia su scala atomica e molecolare. Gli studi attualmente in corso sull'uso delle nanotecnologie in ambito medico hanno portato alla formulazione di nuovi sistemi per la veicolazione di farmaci. In particolare nel nostro laboratorio, in collaborazione con il laboratorio della Prof.ssa Cavalli del Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco, sono stati studiati gli effetti della veicolazione di sostanze farmacologicamente attive (butirrato e 5-fluorouracile) mediante nanoparticelle solide lipidiche e microsfe di chitosano. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la veicolazione mediante nanosistemi permette l'uso di farmaci a concentrazioni più basse e più

intervallate nel tempo rispetto ai farmaci liberi. Inoltre l'utilizzo di sistemi di nano delivery può contribuire a ridurre la comparsa di forme di multi-resistenza, che possono rappresentare un importante ostacolo all'efficacia di terapie antitumorali.

Le nanotecnologie sono un termine collettivo per indicare l'insieme dei metodi, delle tecniche e dei processi che consentono di osservare, misurare e manipolare la materia su scala atomica e molecolare. Il mondo delle nanotecnologie è quello compreso tra 1 e 100 nanometri. A questa scala dimensionale le caratteristiche ed i comportamenti della materia possono cambiare drasticamente rispetto a quelle normalmente osservate e quindi mediante le nanotecnologie, che consentono appunto di manipolare la materia a tale scala, è possibile ottenere materiali, sistemi e architetture aventi proprietà e funzionalità grandemente migliorate o del tutto nuove. In particolare, nel settore della salute, lavorare a tali dimensioni comporta necessariamente il superamento della tradizionale distinzione tra biologia, chimica e fisica, facendo della nanomedicina una disciplina ad elevato grado di multidisciplinarietà. Gli studi attualmente in corso sull'uso delle nanotecnologie in ambito medico hanno portato, ad esempio, alla formulazione di nuovi sistemi per la veicolazione di farmaci. Infatti tramite opportune nanoparticelle (vettori) è possibile "traghetare" all'interno del corpo umano quelle molecole, ioni o agenti di contrasto ad oggi non utilizzate, perché altamente tossiche, idrofobiche o di sfavorevole farmacocinetica e che, per queste caratteristiche negative, vengono attualmente scartate dall'impiego in clinica. Le nanoparticelle possono essere "guidate" verso le cellule tumorali mediante due diverse tipologie di trasporto: il "delivery attivo" ed il "delivery passivo". Nel delivery attivo alle nanoparticelle "vettori" vengono opportunamente coniugati in superficie degli anticorpi diretti verso antigeni specifici delle cellule che si intende bersagliare. Il delivery passivo sfrutta invece l'effetto EPR (Enhanced Permeability and Retention). Contrariamente all'endotelio normale, quello tumorale presenta ampie "finestrature" le cui dimensioni superano i 100 nm. Nanoparticelle di queste dimensioni quindi sono in grado di extravasare nell'endotelio tumorale, mentre vengono trattenute in circolo dall'endotelio normale, in questo modo i farmaci trasportati nelle nanoparticelle si accumulano solo nella zona colpita dal tumore. Chiaramente, la circolazione prolungata di nanosistemi (come ad esempio i liposomi PEGilati) facilita l'accumulo EPR-mediato nelle regioni bersaglio, poiché fornisce maggiori opportunità di raggiungere ed interagire col sito d'azione.

L'opportunità quindi di operare un rilascio modificato del farmaco e di realizzare un direccionamento passivo e/o attivo sito-specifico, incrementando la frazione di farmaco che si accumula nell'area patologica, è in grado di migliorare l'efficacia terapeutica e diminuire le reazioni avverse e gli effetti collaterali.

In Italia ad oggi sono già disponibili diverse strategie farmaco-terapeutiche che sfruttano soluzioni nanotecnologiche. Ad esempio, formulazioni liposomiali, polimeri sintetici biocompatibili e biodegradabili con differenti possibilità di funzionalizzazione e compresse di nanocristalli di principio attivo che sfruttando l'elevato rapporto tra superficie e volume permettono migliore assorbimento e maggiore biodisponibilità.

Una recente soluzione strutturale nanotecnologica è rappresentata dai dendrimeri. I dendrimeri sono macromolecole simmetriche monodisperse costruite attorno ad una molecola più piccola oppure ad un nucleo polimerico. Possono essere sintetizzati in varie predeterminate forme e dimensioni e la loro attività biochimica può essere conferita tramite reazioni chimiche che modificano la superficie del materiale. La specificità del direccionamento è ottenuta mediante l'introduzione di linker specifici legati chimicamente alla superficie esterna dei dendrimeri. Ad esempio, come dimostra lo studio di Kukowska et al. (2005) il legame con acido folico ne facilita il direccionamento nelle cellule tumorali in cui può venire rilasciato l'antitumorale in esse contenuto. La stabilità e la protezione dai fagociti si ottiene addizionando ai dendrimeri catene di polietilenglicole.

I nanotubi di carbonio possono essere considerati, analogamente al fullere, come una delle forme allotropiche del carbonio. Esistono nanotubi a parete singola (SWCNT: Single-Wall Carbon NanoTube) costituiti da un singolo foglio grafittico avvolto su se stesso e nanotubi a parete multipla (MWCNT: Multi-Wall Carbon NanoTube) formati da più fogli avvolti coassialmente uno sull'altro. La veicolazione di farmaci adsorbiti sulla superficie dei nanotubi potrebbe permettere di migliorare la penetrazione del farmaco nella cellula mediante meccanismi di endocitosi. È stato ad esempio dimostrato sperimentalmente che l'adsorbimento sulla superficie di nanotubi a parete singola di siRNA (short interfering RNA) diminuisce la crescita tumorale nel modello murino di carcinoma polmonare di Lewis.

Le nanoparticelle costituite da metalli semiconduttori come cadmio selenio o zinco (definite quantum dot) hanno invece la proprietà di emettere fluorescenza in quasi tutti i colori e possono perciò essere utilizzati come sonde per evidenziare determinate reazioni nelle cellule. Esse possono essere legate a biomolecole per formare sonde lunghe e sensibili allo scopo di identificare composti specifici tramite il legame con quantum dots di colori differenti.

Condizione essenziale perché le aspettative riposte nella nanomedicina si realizzino veramente, è che gli eventuali rischi tossicologici associati ad essa siano valutati tempestivamente e ridotti al minimo. Ciò richiede, in particolare, la definizione di una terminologia chiara e condivisa, un approccio scrupoloso

alla gestione del rischio, una eventuale revisione delle legislazioni esistenti, cooperazione e coordinamento tra i vari organismi pubblici, industria e ricerca a livello nazionale ed internazionale. Tutto ciò va completato con una informazione ed un dialogo con il pubblico corretti ed affidabili, che rassicurino e prevengano l'insorgere di pregiudizi.

Da alcuni anni il nostro gruppo di ricerca si occupa di studiare gli effetti della veicolazione di farmaci attraverso nanoparticelle solide lipidiche (SLN). Ad esempio, è noto che i farmaci somministrati per via topica o sistemica per curare le malattie oculari funzionano benissimo se si tratta del segmento anteriore dell'occhio, ma i risultati sono limitati quando si vogliono trattare le malattie vitreo-retiniche, a causa della scarsa penetrazione dei farmaci nella parte posteriore dell'occhio; infatti, incontrano numerose barriere che possono influenzarne la farmacocinetica, per esempio il tessuto stromale della cornea e della sclera, l'epitelio corneale e l'endotelio. Formulazioni come microsfele biodegradabili, nanocapsule, emulsioni, liposomi o ancora SLN a rilascio controllato del farmaco potrebbero, perciò, offrire notevoli vantaggi rispetto ai normali farmaci correntemente in uso.

Sono state allo scopo prodotte dalla Prof.ssa Cavalli del Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco, Facoltà di Farmacia dell'Università di Torino, delle SLN di desametasone. La formulazione di SLN ha dimostrato di essere stabile, senza forme di aggregazione o di precipitazione, con un diametro di 220 nm. Le SLN di desametasone e il desametasone sono stati somministrati nel coniglio per via topica nel sacco congiuntivale inferiore e per via intravenosa. Per dimostrare la migliore efficacia della nanoformulazione rispetto ai farmaci normalmente utilizzati in terapia, è stato utilizzato come controllo il Luxazone® per via topica e il Decadron Phosphate® per via sistemica. Dopo 1-3 ore dalla somministrazione, sono state valutate le concentrazioni di ciascuna sostanza nell'umor acqueo, nel vitreo e nella retina. I risultati hanno dimostrato che le SLN si ritrovano a concentrazioni da 2 a 10 volte superiori a quelle del farmaco "free" ad entrambi i tempi valutati, riuscendo a penetrare anche nella retina, dove il Luxazone® invece non arriva. Per dimostrare, poi, che non solo le SLN riescono a penetrare più facilmente nella camera posteriore dell'occhio, ma anche che il farmaco viene rilasciato e risulta attivo, è stata valutata la capacità delle SLN di desametasone e del desametasone "free" di inibire l'espressione di cicloossigenasi-2 (COX-2) da parte di cellule endoteliali (HUVEC) stimulate con IL-1 β . Mentre il desametasone esplica l'effetto antiinfiammatorio tra le 8 e le 24 ore, le SLN risultano già pienamente efficaci già dopo 4 ore, dimostrando una cinetica di azione più veloce, anche se in misura quantitativamente simile.

Un'altra nanoformulazione da noi studiata è stata quella delle nanoparticelle di colesterilbutirrato (CB SLN); il butirrato è un acido grasso a corta catena, normalmente prodotto dalla flora batterica intestinale dopo l'assunzione di fibre. Gli acidi grassi a corta catena (SCFA), l'acido acetico, propionico, butirrico, valerico, vengono metabolizzati dalle cellule epiteliali del colon, dove agiscono come fonte primaria di energia e giocano un ruolo fondamentale nel mantenere le funzioni fisiologiche. L'acido butirrico è il più importante degli SCFA ed è stato considerato come un potenziale agente terapeutico in alcuni disordini intestinali, come il morbo di Crohn o la colite ulcerativa, per le sue proprietà antiinfiammatorie e nel cancro del colon-retto per le sue proprietà antitumorali. Il butirrato, inoltre, gioca un ruolo cruciale nel mantenere l'integrità della mucosa intestinale, perché regola il bilanciamento tra la proliferazione delle cellule epiteliali, la differenziazione cellulare e l'apoptosi. È un membro endogeno della famiglia degli inibitori della deacetilazione degli istoni HDAC1. L'acetilazione-deacetilazione dinamica degli istoni è uno dei vari meccanismi che regolano l'espressione genica a livello post-translazionale. Un'alterata espressione degli HDAC, come un disequilibrio nel bilanciamento acetiltransferasi-HDAC è coinvolto nello sviluppo e nella progressione del cancro, perciò gli inibitori degli HDAC sono considerati potenziali agenti antitumorali. I carcinomi del colon mostrano un'elevata espressione di HDAC1, e numerosi studi mostrano una correlazione tra le specifiche isoforme degli HDAC1 e lo sviluppo di tumori dell'intestino. Più il tumore è in fase avanzata, sia localmente che con presenza di metastasi, maggiore è l'espressione nucleare degli HDAC (soprattutto il sottotipo 3, 73%, il 2, 58% e l'1, 36%) e minore il tempo di sopravvivenza del paziente.

Il butirrato causa una inibizione non competitiva e reversibile della classe 1 degli HDAC (sottotipi 1,2,3 e 8) e un po' meno di quelli della classe 2A (sottotipi 4,5,7 e 9). L'azione del butirrato pro-differenziante e antiproliferativa è dose e tempo-dipendente, ma si hanno effetti significativi solo quando la sostanza è rilasciata per più di 24 ore ad alte concentrazioni (0.1-1 mM). Per questo motivo, a dispetto dei risultati incoraggianti ottenuti in vitro, gli studi in vivo sia su modelli animali che nei trials clinici sull'uomo non sono andati avanti, a causa soprattutto delle peculiarità farmacocinetiche di questa sostanza. La clearance plasmatica infatti è molto rapida; somministrato per via endovenosa il T1/2 è di soli 6 minuti. Sono stati fatti dei trials clinici somministrando sali di arginina butirrico (per evitare l'eccesso di sodio che si potrebbe verificare somministrando eccessive quantità di butirrato di sodio, comunemente utilizzato negli studi in vitro) dato in maniera continua o con dosi multiple giornaliere per infusione endovenosa, ma le concentrazioni

ematiche raggiunte sono sempre state notevolmente inferiori a quelle che si erano dimostrate utili in vitro. Inoltre elevate concentrazioni di butirrato possono determinare nell'uomo effetti collaterali come anemia, mal di testa, nausea, diarrea e crampi addominali, condizionando fortemente la compliance del paziente.

Per ovviare a queste caratteristiche farmacocinetiche negative del butirrato sono stati prodotti e studiati dei derivati stabili o pro-drug del butirrato, alcuni dei quali sono in fase 1 o 2 di trials clinici. Questi profarmaci passano facilmente le barriere cellulari, compresa la barriera ematoencefalica, hanno una minore tossicità sistemica, una migliore biodisponibilità dopo assunzione per os e mostrano attività sinergica se usati in combinazione con alcuni chemioterapici o radiazioni ionizzanti.

Già nel 2006 (Dianzani et al., Br J Pharmacol) avevamo dimostrato che una formulazione di CB SLN prodotta dal laboratorio diretto dalla Prof.ssa Cavalli induce un effetto antinfiammatorio maggiore rispetto a quello prodotto dal sodio butirrato (NaBut). Infatti, è in grado di inibire in modo dose-dipendente (nel range di concentrazione 10^{-8} - 10^{-5} M) l'adesione dei granulociti neutrofili all'endotelio, la produzione di anione superossido e il rilascio di mieloperossidasi, agendo a concentrazioni di tre ordini di grandezza inferiori a quelle utilizzate dal NaBut (es, per quanto riguarda la liberazione di anione superossido, IC_{50} : 2.8×10^{-6} M e 2.7×10^{-3} M, rispettivamente per CB SLN e NaBut).

Visto che, come già detto precedentemente, il butirrato risulta possedere anche effetti antitumorali, ci siamo chiesti se le migliori proprietà dimostrate dal CB SLN come antinfiammatorio potessero applicarsi anche all'effetto antitumorale. In effetti, facendo aderire delle cellule di cancro del colon, le HT29, all'endotelio precedentemente trattato con il CB SLN abbiamo dimostrato come questo inibisca l'adesione delle cellule tumorali in modo dose-dipendente (10^{-7} - 10^{-4} M, con effetto inibitorio massimo del 60-70%) e tempo-dipendente (l'effetto si esplica dopo 8 ore di trattamento e prosegue per almeno 48 ore). Il NaBut, invece, risulta attivo solo alla concentrazione maggiore e il colesterilpalmitato, usato come controllo del veicolo, risulta sempre inefficace. L'effetto del CB SLN non è limitato alla sola azione sulle cellule endoteliali, infatti il pretrattamento delle cellule tumorali e la susseguente incubazione con l'endotelio determina un effetto antiadesivo simile a quello ottenuto precedentemente. Addirittura, se entrambe le popolazioni cellulari vengono trattate separatamente con il CB SLN e poi incubate insieme si ottiene un effetto additivo, con una inibizione massima di circa il 70%, che si ottiene già alla concentrazione più bassa, 10^{-7} M. Le cellule tumorali liberano IL-1 β ,

che, aumentando l'espressione di integrine sulle cellule endoteliali, aumenta la quantità di cellule tumorali che vi aderiscono. L'effetto inibitorio del CB SLN si verifica anche se prestimoliamo con IL-1 β le cellule endoteliali. A questo punto ci siamo chiesti se l'effetto del CB SLN fosse limitato alle sole HT29 o si esplicasse anche su altre cellule di cancro del colon, o ancora su altri tipi di linee tumorali. In effetti il CB SLN ha dimostrato di funzionare anche su altre linee di cancro del colon, le CaCo-2 e le HCT116 (cellule più o meno differenziate, rispettivamente), e anche su cellule di cancro del seno (MCF-7) o della prostata (PC-3).

Altra sostanza utilizzata nel cancro del colon da più di 40 anni è il 5-Fluorouracile (5-FU); anche questo farmaco ha una emivita molto breve, che rende necessario l'utilizzo di alte dosi di farmaco i.v. per ottenere i livelli terapeutici ottimali. Risulta perciò evidente come l'introduzione di questo farmaco in nanoparticelle che ne prolunghino l'emivita potrebbe determinare notevoli vantaggi. Pertanto il 5-FU è stato introdotto in microsfele di chitosano (1400-1500 nm di diametro medio). Il chitosano è un polimero di natura polisaccaridica, biocompatibile, biodegradabile e non tossico. I test di rilascio del farmaco dalle microsfele è graduale nel tempo (0-130 minuti), così come l'azione citotossica nei confronti delle HT29: l'azione non solo è maggiore rispetto a quella del farmaco "free", ma più prolungata nel tempo, essendo ancora efficace dopo 48-72 ore, quando il 5-FU libero non risulta più funzionante. Questi dati possono far ipotizzare una minore frequenza di somministrazione del farmaco in vivo. Risultati migliori con la formulazione in microsfele sono stati ottenuti anche con il test antiadesivo: mentre il 5-FU inibisce l'adesione delle HT29 all'endotelio solo di circa il 30% (a concentrazioni 10^{-6} - 10^{-5} M) e solo per 24 ore, le microsfele di chitosano contenenti il 5-FU alle stesse concentrazioni inducono un effetto più elevato che si protrae nel tempo anche dopo 48 ore, esplicando un'inibizione massima del 70% (alla massima concentrazione utilizzata).

Questi dati dimostrano come l'introduzione di farmaci in nanoparticelle possa permettere l'uso di farmaci a concentrazioni più basse e più intervallate nel tempo rispetto ai farmaci liberi, ma non solo. Un grosso problema, infatti, che si verifica molto spesso nel corso delle terapie antitumorali è la comparsa di forme di multi-resistenza; anche in questa situazione le nanoformulazioni possono essere d'aiuto. Infatti, è stato dimostrato, per esempio, con le nanoparticelle di doxorubicina, il fatto che la sostanza viene liberata in prossimità della membrana plasmatica in concentrazioni così elevate da saturare completamente le pompe di efflusso, così da rendere inefficace uno dei principali meccanismi con cui viene indotta la resistenza ai farmaci.

Ugualmente, è stato dimostrato che utilizzando nanoparticelle formate da polialchilcianoacrilato si riesce a sfuggire alla multi-resistenza mediata dalla p-glicoproteina, perché queste rilasciano il farmaco libero lontano da dove sono ubicate le pompe di efflusso.

Interessante notare, ancora per quanto riguarda l'uso di CB SLN, che questo non necessita di trasportatori particolari per essere veicolato all'interno della cellula neoplastica, ma viene inglobato per fagocitosi e quindi liberato all'interno della cellula: questo permette non solo di ovviare, come detto prima, al problema delle pompe di efflusso, ma anche fa sì che il farmaco possa funzionare anche con quelle cellule tumorali normalmente resistenti al butirrato perché sprovviste dei trasportatori del butirrato stesso (SMCT1 e MCT1).

BIBLIOGRAFIA:

1. Bhabra G, Sood A, Fisher B, Cartwright L, Saunders M, Evans WH, Surprenant A, Lopez-Castejon G, Mann S, Davis SA, Hails LA, Ingham E, Verkade P, Lane J, Heesom K, Newson R, Case CP: *Nanoparticles can cause DNA damage across a cellular barrier*. Nat. Nanotechnol. 2009; 4: 876-83.
2. Dianzani C, Cavalli R, Zara GP, Gallicchio M, Lombardi G, Gasco MR, Panzanelli P, Fantozzi R: *Cholesteryl butyrate solid lipid nanoparticles inhibit adhesion of human neutrophils to endothelial cells*. Br. J. Pharmacol. 2006; 148: 648-56.
3. Junghanns JU, Müller RH: *Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications*. Int. J. Nanomedicine. 2008; 3: 295-309.
4. Kim KY: *Nanotechnology platforms and physiological challenges for cancer therapeutics*. Nanomedicine. 2007; 3: 103-10.
5. Sandhiya S, Dkhar SA, Surendiran A: *Emerging trends of nanomedicine an overview*. Fundam. Clin. Pharmacol. 2009; 23: 263-9.
6. Sanvicens N, Marco MP: *Multifunctional nanoparticles-properties and prospects for their use in human medicine*. Trends Biotechnol. 2008; 26: 425-33.
7. Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC: *Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments*. Clin. Pharmacol. Ther. 2008; 83: 761-9.

EPIDEMIOLOGIA DEL DIABETE MELLITO TIPO 2: LO STUDIO DI TORINO

Premio “Italo Arneodo”

Tesi di Laurea premiata in collaborazione con
l'Accademia di Medicina di Torino

Francesco Panero, Paolo Cavallo Perin, Graziella Bruno

Dipartimento di Medicina Interna
Università degli Studi di Torino

Key words: *Diabetes / Diabete*
 Epidemiology / Epidemiologia
 Costs / costi
 Prevalence / Prevalenza
 Prescription / Prescrizioni

Abstract:

Objective: We have identified a large population-based cohort to evaluate the prevalence of diagnosed type 2 diabetes, to analyze its distribution according to some variables of interest and to compare prescription drug costs in diabetic and non-diabetic people living in the city of Torino.

Research, Design and Methods: Diabetic people residents of Torino on July 31, 2003 were identified through multiple independent data sources. More than 80% of the whole diabetic population was gathered by linking three administrative database, originally planned to be used for purposes different from epidemiology research. Data about their income and educational level were obtained and matched for each person. All prescriptions registered in the 12-months period August 1, 2003 - July 31, 2004 were examined to compare prevalence of treatment and costs in diabetic (n. 33797) and non-diabetic people (n. 863 876). A log linear model was employed to estimate ratios of costs between diabetic and non diabetic people.

Results: Lower income and lower educational level are associated with a higher risk of suffering from diabetes, even when data are adjusted for age and gender. These socio-economic differences are even strongly apparent in females, whereas women belonging to both the lowest income and educational level category bear the heaviest burden of the disease. Age and sex standardized cost per patient-year was € 830.9 in diabetic and € 182.8 in non diabetic people (Rate Ratio = 2.8, 95% CI 2.7-2.9). The excess of expenditure was particularly high in diabetic people aged < 45 years (RR = 9.3), with

type 1 ($RR = 7.7$) and in insulin users ($RR = 4.8$). Diabetic people treated with diet only had similar cost of diabetic people treated with oral drugs. Diabetes was associated with an increased prevalence of treatment for most drugs categories, not just for drugs usually employed in the prevention and treatment of diabetes and its complications.

Conclusions: This population-based study shows that: 1) people with a low income and a low level of education has a higher risk of being affected by diabetes; 2) diabetic people have three-fold higher drugs costs than in non-diabetic people, independently on main confounders.

Riassunto:

Obiettivi: Abbiamo identificato un'ampia coorte di popolazione di persone affette da diabete mellit tipo 2 al fine di studiare la prevalenza della malattia, analizzarne la distribuzione di frequenza secondo alcune variabili di interesse ed effettuare un confronto tra il costo delle prescrizioni farmaceutiche nei diabetici e nei non diabetici torinesi.

Materiali e Metodi: I diabetici residenti a Torino al 31 luglio 2003 sono stati identificati attraverso l'uso di diversi database amministrativi originariamente pianificati per scopi differenti dalla ricerca epidemiologica. Abbiamo così raccolto i dati relativi ad oltre l'80% dei diabetici torinesi e di ciascuno di essi abbiamo recuperato le informazioni circa il reddito ed il grado di scolarizzazione. Tutte le prescrizioni di farmaci erogate tra il 1 agosto 2003 ed il 1 luglio 2004 sono state esaminate per confrontarne la prevalenza ed il costo tra diabetici e non diabetici.

Risultati: Un basso livello di reddito ed un basso grado di scolarizzazione sono risultati associati ad una elevata prevalenza di diabete, in particolare tra le donne.

Il costo delle prescrizioni farmaceutiche, standardizzato per età e sesso, è risultato pari a € 830.9 nei diabetici e a € 182.3 nei non diabetici (Rate Ratio = 2.8, 95% CI 2.7-2.9). L'eccesso di spesa è risultato particolarmente elevato nei soggetti più giovani ($RR = 9.3$), nei diabetici tipo 1 ($RR = 7.7$) e negli insulino-trattati ($RR = 4.8$). La spesa farmaceutica nei diabetici in sola terapia dietetica è risultato sovrapponibile a quello dei diabetici trattati con ipoglicemizzanti orali.

Conclusioni: Il nostro studio ha evidenziato che: 1) le persone con basso reddito e basso livello di scolarità sono esposte ad un maggior rischio di diabete mellito; 2) i soggetti diabetici costano al SSN in media 3 volte più dei non diabetici per l'acquisto di farmaci.

AUMENTO DI PREVALENZA O DI INCIDENZA

La prevalenza di una malattia cronica, quale è il diabete, è data dalla differenza tra il numero di nuovi casi (ovvero l'incidenza) – in un arco di tempo definito – ed il numero totale dei decessi imputabili ad essa (mortalità) in quel periodo. Quando l'incidenza eguaglia la mortalità di una popolazione demograficamente stabile (vale a dire non influenzata da fattori quali le migrazioni), la popolazione viene considerata in “equilibrio epidemiologico”. Date queste premesse, si evince che qualsivoglia variazione di incidenza o mortalità – o, comunque, del rapporto fra le due – determina una corrispondente variazione nella prevalenza della malattia in esame.

Un incremento della prevalenza del diabete è stato osservato nella maggior parte delle popolazioni nel mondo, ma la spiegazione è meno lampante di quanto si possa immaginare a causa della dinamicità della demografia, associata ad un continuo miglioramento dello stato di salute, all'aumento della vita media e alle migrazioni⁽¹⁰⁾. La prevalenza del diabete viene calcolata grazie a stime puntuali nell'ambito di un sistema dinamico le cui variabili principali sono date da:

- rapporto tra casi di diabete diagnosticato/non diagnosticato;
- cambiamenti demografici della popolazione;
- età di insorgenza del diabete;
- mortalità nella popolazione diabetica e nella popolazione generale;
- incidenza del diabete.

Al giorno d'oggi siamo ancora lontani dall'avere una conoscenza esaustiva della diffusione del diabete mellito e, in particolare, della forma non insulino-dipendente; forma diffusa, soprattutto, nella società di tipo occidentale dove costituisce la quasi totalità dei casi di diabete mellito (oltre il 90% nel mondo e, nel nostro Paese, oltre il 95%)⁽³²⁾. Lo studio di *King* valuta la prevalenza di diabete stratificata per età, sesso, etnia, grado di sviluppo del Paese, residenza in aree urbane o rurali (in quanto questo è riconosciuto come fattore di rischio per il diabete, nei Paesi in via di sviluppo). A fronte di una stabile crescita dell'intera popolazione nei Paesi sviluppati – +11% dal 1995 al 2025, pari a 1 miliardo di persone – e di un considerevole incremento dell'80% (1.5 miliardi) nei Paesi in via di sviluppo, la prevalenza del diabete crescerà nei primi del 27% (passando dal 6.0 al 7.6%) mentre nei secondi del 48% (dal 3.3 al 4.9%). Complessivamente la popolazione crescerà del 60% e la prevalenza di diabete del 35%, da 4.0 a 5.4% nel periodo definito⁽¹⁸⁾.

EPIDEMIOLOGIA DEL DIABETE MELLITO TIPO 2 IN ITALIA

La tendenza alla crescita nel numero di diabetici in Europa è stata stimata, perlopiù, da studi condotti nei Paesi scandinavi^(3,12,22,30) ed i dati relativi ai Paesi del bacino del Mediterraneo sono limitati⁽²⁴⁾.

Per quanto riguarda l'Italia, stime sulla prevalenza del diabete mellito noto erano state prodotte nell'ambito di un progetto multicentrico promosso dal Ministero della Sanità nel 1988, che aveva visto il coinvolgimento, fra le altre, delle popolazioni di Casale Monferrato, Cremona, Foligno e Verona⁽³²⁾. I valori riscontrati in tale occasione – ottenuti utilizzando fonti multiple e metodi della cattura-ricattura per stimare la completezza della rilevazione – prevedevano una prevalenza di diabete noto nella popolazione generale pari al 2.6-3.2%⁽⁴⁾.

Si stima che, attualmente, la prevalenza del diabete noto in Italia sia al 6-7%⁽⁴⁾; la sopravvivenza dei diabetici nel nostro Paese è circa il 30-40% inferiore rispetto a quella della popolazione generale, prevalentemente a causa dell'aumentato rischio cardiovascolare. Il diabete, inoltre, è la principale causa di ricorso alla terapia dialitica⁽²⁷⁾ e una delle più rilevanti di cecità⁽²⁶⁾. L'elevato impatto della patologia sulle risorse sanitarie fa sì che gli studi epidemiologici volti a monitorare l'andamento della malattia e degli indicatori della qualità della cura rivestano un grande interesse sia per i clinici sia per gli amministratori della sanità⁽¹⁵⁾.

Già dal 1989 la Regione Piemonte dispone del Registro Regionale Diabetici (RRD): la prevalenza di diabete mellito tipo 2 nella popolazione maschile al 30/04/2003, secondo i dati dell'RRD, era pari a 3.62% contro il 3.49% di quella femminile. Il diabete mellito tipo 2 costituiva oltre il 90% di detta popolazione.

È da segnalare come il numero dei soggetti registrati sia aumentato nel tempo, da 127.308 individui nel 1999 agli oltre 168.000 suddetti nel 2003, con un incremento percentuale del 33% in 4 anni; nel periodo 1995-1998 l'andamento si era mantenuto, invece, pressoché stabile. Su tale stima influisce verosimilmente l'effetto combinato dell'abbassamento del criterio soglia di definizione del diabete e del reale incremento nella prevalenza della malattia.

Nella provincia di Alessandria, il Casale Monferrato Study⁽⁶⁾ – iniziato nel 1988 con l'obiettivo di valutare la prevalenza di diabete noto nella popolazione residente nell'area di competenza della ASL 21 – identificò 1967 diabetici a partire dai registri dei centri di diabetologia, dei medici di base, delle SDO e delle prescrizioni di strisce per la glicemia e di siringhe. Nel 2000, il database è stato aggiornato tramite l'identificazione di tutti i componenti viventi della coorte originaria e le persone con nuova diagnosi di diabete. Il numero di casi prevalenti è aumentato da 2340 nel 1988 a 3488 nel 2000 nonostante la riduzione

della dimensione dello studio da 91.121 a 87.972 persone; in termini percentuali ciò si traduce in un incremento della prevalenza standardizzata per età o sesso dal 2.57% e 2.13% dell'88 al 3.76% e 3.07% nel 2000, nei due sessi.

In conclusione, lo studio ha evidenziato come la prevalenza di diabete mellito tipo 2 noto sia cresciuta del 44% rispetto alla rilevazione precedente del 1998: 3.1% nel 2000 contro il 2.1% nel '98.

OBIETTIVI DELLO STUDIO

Dal momento che la prevalenza di diabete sta crescendo in tutto il mondo, sistemi di sorveglianza - capaci di monitorare l'insorgenza di casi di malattia nel tempo e in aree geografiche definite - sono indispensabili per consentire una razionale pianificazione ed allocazione delle risorse destinate alla prevenzione primaria e secondaria di questa malattia⁽²⁶⁾. Per fronteggiare tale epidemia, è stata recentemente suggerita l'adozione di metodologie tradizionalmente appannaggio della prevenzione e del controllo delle malattie infettive, quali l'utilizzo di database ad uso amministrativo per il monitoraggio dei nuovi casi⁽²⁹⁾. I registri di soggetti diabetici normalmente redatti a scopi amministrativi (dimissioni ospedaliere, prescrizioni, centri di diabetologia, laboratoristici, assicurativi...) possono essere ottenuti in molte aree geografiche, consentendo di applicare il metodo della cattura-ricattura al fine di eseguire rilevamenti periodici a basso costo^(16,17,19).

Nell'ambito del Turin Longitudinal Study (TLS), è stato recentemente implementato un programma di sorveglianza nella città di Torino finalizzato alla valutazione delle variazioni della prevalenza della malattia nel tempo, della qualità e dei costi dell'assistenza sanitaria^(21,23,25).

In questo lavoro verranno descritte le variazioni della prevalenza dei diabetici per età, sesso, livello di scolarità e stato socio-economico, quali risultati della prima fase del programma.

MATERIALI E METODI

1. Disegno dello studio

Studio di popolazione basato su fonti di dati amministrativi.

2. Modalità di identificazione della coorte

La popolazione in oggetto è stata selezionata all'interno di quella del TLS, un database di popolazione dinamica, volto a monitorare le disuguaglianze

nella salute e a validare i risultati delle iniziative sanitarie e delle politiche di prevenzione. Il fulcro del TLS è costituito dal Registro di Popolazione di Torino (RPT) che può essere incrociato sia con le informazioni socio-demografiche sia con vari registri di carattere sanitario. La base dello studio includeva tutti i residenti nella città di Torino (897 743 abitanti nel 2003) con una diagnosi di diabete e viventi al 31 luglio 2003.

Tre fonti di dati sono state impiegate per identificare i casi di diabete.

La prima (S1) è costituita dal registro di tutti i soggetti che avevano ottenuto l'esenzione dal pagamento dei farmaci, delle siringhe e delle strisce per la misurazione della glicemia a seguito di una diagnosi di diabete mellito. Tutti gli individui diabetici possono ricevere, infatti, gratuitamente dal SSN i presidi medici necessari a patto che abbiano una certificazione di diabete fatta da un diabetologo afferente ad una struttura pubblica. Grazie a tale procedura, una larga proporzione di diabetici fa riferimento ad un centro di diabetologia e si rende disponibile ad essere registrata al momento della diagnosi^(7,13).

La seconda fonte (S2) è il registro di tutte le prescrizioni di farmaci anti-diabetici (codice ATC: A10A e A10B) compilate dall'1 gennaio al 31 dicembre

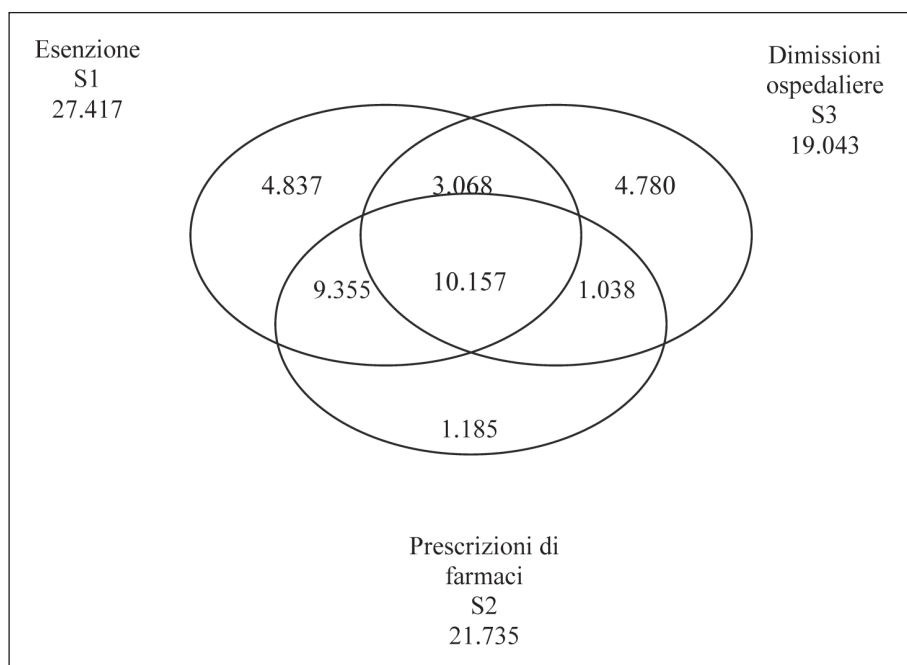


Figura 1. Distribuzione dei diabetici secondo la fonte di rilevamento in Torino, 2003.

2003 a residenti in Torino. Per ridurre la possibilità di includere falsi positivi, abbiamo considerato quali “affetti” solamente i soggetti che abbiano ricevuto almeno due prescrizioni specifiche.

La terza fonte (S3) è rappresentata dal registro dei residenti in Torino che siano stati dimessi da ospedali regionali o nazionali con una diagnosi primaria o secondaria di diabete (codice ICD-9-CM 250) nel periodo 1 gennaio 1995 – 31 dicembre 2002.

Il database finale, quindi, includeva 897 674 soggetti, 863 876 non diabetici e 33 797 diabetici, dei quali 1704 individui affetti da diabete tipo 1, 26 327 affetti da diabete tipo 2 e 5766 con diabete non identificato; nell’analisi finale, poi, questi ultimi sono stati considerati quali casi di diabete tipo 2, ottenendo così un numero definitivo di 32 093 diabetici tipo 2 (Figura 1).

3. Rilevamento dei dati

Le tre fonti sono state combinate, quindi, tramite una procedura di “linkage” che usava il codice fiscale quale chiave unica di identificazione; sono state incrociate, poi, con i dati dell’ RPT affinché venissero inclusi i soli soggetti vivi alla data 31 luglio 2003 e ne fosse determinato il grado di scolarità. Quest’ultimo è stato suddiviso in tre livelli: elevato (università o scuola media superiore), intermedio (scuola media inferiore) e basso (scuola elementare o nessun titolo).

I dati relativi alle fasce di reddito medio (CTMI) sono stati derivati, inoltre, quali stima del reddito procapite e calcolati grazie al confronto tra il registro di popolazione di Torino e il Registro delle Imposte del 1998 del Ministero delle Finanze. Le fasce di reddito (aventi un numero medio di 207 abitanti) sono state raggruppate secondo il percentile in quattro livelli: basso (al di sotto del 20esimo percentile), medio - basso (tra il 20esimo e il 49esimo percentile), medio - alto (tra il 50esimo e il 79esimo) e alto (80esimo percentile e oltre)^(8,20). Circa le prescrizioni, sono state esaminate tutte quelle registrate nei 12 mesi compresi tra l’1 agosto 2003 ed il 31 luglio 2004 nella popolazione di Torino.

4. Valutazione della completezza della rilevazione

Abbiamo applicato l’analisi secondo il metodo della cattura-ricattura usando modelli log-lineari per stimare il numero di casi mancanti e la completezza dell’accertamento^(5,21,23). Sono stati utilizzati modelli log-lineari che hanno incluso fattori per la dipendenza tra le fonti e l’eterogeneità tra le fonti stesse.

5. Costo delle prescrizioni farmaceutiche

Il costo di ciascun farmaco è stato calcolato quale prodotto tra il numero di unità prescritte ed il costo unitario per ogni confezione, utilizzando il prezzo effettivamente in vigore alla data della prescrizione. Le spese sostenute dai diabetici e dai non-diabetici sono state raffrontate, dopo standardizzazione per età e sesso. Il rapporto tra il costo nei diabetici e nei non diabetici è stato stimato con un modello log-lineare:

$$\log(\text{spesa per persona}) = b_0 + b_1(\text{presenza di diabete}) + b_2(\text{sesso}) + b_3(\text{classe di età}) + \text{err}$$

in cui
$$\exp b_1 = \frac{\text{spesa media nei diabetici}}{\text{spesa media nei non diabetici}}$$

I casi di diabete gestazionale (n = 623) sono stati esclusi dall'analisi dei costi.

6. Prevalenza

Le analisi sono state condotte sull'intero gruppo di dati e su ciascuno dei sotto-gruppi secondo la fascia di età, il livello di scolarità e CTMI. Il modello di selezione è basato sulla devianza. I valori puntuali ed i relativi intervalli di confidenza al 95% (IC 95%) per il numero di casi persi alla rilevazione è stato ottenuto secondo Chao et al.⁽⁸⁾ La prevalenza di diabetici è stata calcolata come rapporto tra il numero di casi identificati e la popolazione di Torino, aggiustato per la completezza stimata dell'accertamento. La prevalenza all'interno dei livelli di scolarità e delle fasce di reddito è stata direttamente standardizzata con un metodo diretto usando la distribuzione dell'età (<65, da 65 a 74, >74 anni) della popolazione di Torino e i rapporti di prevalenza usando il più alto tasso di scolarità e la più elevata fascia di reddito come riferimento. Gli intervalli di confidenza sono stati calcolati secondo metodi standard⁽²⁸⁾.

RISULTATI

Alla data del 31 luglio 2003, 34.420 persone con una precedente diagnosi di diabete erano state identificate tra i residenti nella città di Torino. Di questi, 27.417 erano stati identificati attraverso il registro delle esenzioni (S1, 79.6%), 21.735 da quello delle prescrizioni (S2, 63.1%) e 19.043 da quello delle schede di dimissione ospedaliera (S3, 56.4%).

Come mostrato in Figura 1, meno di un terzo della popolazione è stato identificato in tutte le fonti di dati, 4837 (14.1%) casi lo erano stati solamente a partire da S1, 4.780 da S3 e 1.185 da S2. Nel modello finale, che includeva

	Uomini		Donne	
	Prevalenza (%) (IC 95%)	Rapporto di prevalenza (IC 95%)	Prevalenza (%) (IC 95%)	Rapporto di prevalenza (IC 95%)
< 65 anni	2.65 (2.51 - 2.84)	1.00	2.16 (2.02 - 2.34)	1.00
da 65 a 74 anni	14.38 (13.88 - 15.03)	5.43 (5.26 - 5.60)	11.61 (10.70- 13.09)	5.38 (5.21 - 5.56)
>= 75 anni	15.08 (14.35 - 16.18)	5.69 (5.49 - 5.89)	12.23 (11.85 - 12.71)	5.67 (5.49 - 5.86)

Tabella I. Prevalenza di diabete per età e sesso in Torino; rapporto di prevalenza (riferimento, età <64 anni), 2003.

	Uomini		Donne	
	Prevalenza (%) (IC 95%)	Rapporto di prevalenza (IC 95%)	Prevalenza (%) (IC 95%)	Rapporto di prevalenza (IC 95%)
LIVELLO DI SCOLARITÀ				
Alto	4.15 (4.02 - 4.27)	1.00	2.38 (2.28 - 2.48)	1.00
Intermedio	5.08 (4.95 - 5.21)	1.22 (1.18 - 1.27)	3.55 (3.46 - 3.65)	1.50 (1.42 - 1.57)
Basso	6.38 (6.25 - 6.50)	1.54 (1.48 - 1.59)	5.76 (5.66 - 5.87)	2.42 (2.32 - 2.54)
REDDITO				
Alto	4.04 (3.91 - 4.18)	1.00	2.64 (2.54 - 2.74)	1.00
Medio-alto	5.49 (5.36 - 5.63)	1.36 (1.30 - 1.42)	3.94 (3.84 - 4.04)	1.50 (1.43 - 1.56)
Medio-basso	5.59 (5.46 - 5.73)	1.38 (1.33 - 1.44)	4.86 (4.75 - 4.97)	1.84 (1.76 - 1.93)
Basso	6.25 (6.07 - 6.43)	1.55 (1.48 - 1.62)	5.76 (5.61 - 5.92)	2.19 (2.09 - 2.29)

Tabella II. Prevalenza di diabete standardizzata per età e sesso, per livello di scolarità e reddito a Torino, 2003.

i dati derivanti dall'incrocio dei tre registri (S1 e S2, S2 e S3), abbiamo considerato 42.671 persone come base dello studio con una completezza stimata del rilevamento pari all'80.6%.

La prevalenza aggiustata per la completezza era pari a 4.79% (95% CI 4.54-5.15), 4.91 (4.69-5.22) negli uomini e 4.68% (4.41-5.08) nelle donne. Secondo quanto riportato nella Tabella I, la prevalenza del diabete aumenta con l'età, dal 2.65% al di sotto dei 65 anni al 15.08% oltre i 75 anni tra gli uomini e, rispettivamente, dal 2.16% al 12.23% tra le donne.

Livello di scolarità	Uomini			Donne		
	n.	Prevalenza (%) (IC 95%)	Rapporto di prevalenza (IC 95%)	n.	Prevalenza (%) (IC 95%)	Rapporto di prevalenza (IC 95%)
< 65 anni						
Alto	2627	2.27 (2.06 - 2.58)	1	1650	1.40	1
Intermedio	3449	2.54 (2.45 - 2.65)	1.12 (1.06 - 1.18)	2377	1.91	1.36 (1.28 - 1.45)
Basso	3167	3.25 (3.12 - 3.42)	1.43 (1.36 - 1.51)	3452	3.29 (3.17 - 3.45)	2.35 (2.22 - 2.49)
65 - 74 anni						
Alto	1248	10.67 (10.05 - 11.54)	1	472	5.39 (4.71 - 6.85)	1
Intermedio	1963	13.72 (13.24 - 14.34)	1.29 (1.20 - 1.38)	1507	9.19 (7.70 - 11.90)	1.71 (1.54 - 1.89)
Basso	3978	16.58 (16.13 - 17.14)	1.55 (1.46 - 1.66)	5311	14.11 (13.39 - 15.06)	2.62 (2.38 - 2.88)
> 74 anni						
Alto	752	10.45 (10.00 - 11.50)	1	416	6.14 (5.74 - 6.74)	1
Intermedio	1075	13.86 (13.46 - 14.39)	1.33 (1.21 - 1.46)	1222	9.16 (8.61 - 9.91)	1.49 (1.33 - 1.67)
Basso	2839	17.75 (16.75 - 19.15)	1.70 (1.57 - 1.84)	5507	14.37 (14.06 - 14.74)	2.3 (2.22 - 2.47)

Tabella III. Prevalenza di diabete per età, sesso e livello di scolarità a Torino, 2003.

	Diabetici		Non diabetici		Rapporto tra costi* (IC 95%)
	n (%)	Costo medio delle prescrizioni (€) per persona / anno*	n (%)	Costo medio delle prescrizioni (€) per persona / anno*	
Età (anni)					
< 45	1673 (5.0%)	569.3	450496 (52.1%)	55.0	9.3 (8.0-10.8)
45-64	10735 (31.8%)	751.5	232483 (26.9%)	205.0	3.5 (3.3-3.7)
> 64	21389 (63.3%)	872.5	180897 (20.9%)	466.2	1.9 (1.8-1.9)
Sesso					
Uomini	17153 (50.8%)	666.7	412493 (47.7%)	181.5	2.8 (2.7-3.0)
Donne	16644 (49.2%)	679.7	451383 (52.3)	162.7	2.7 (2.6-2.9)
Tipo di diabete					
Tipo 1	1704 (5.0%)	846.2			2.5 (2.4-2.6)
Tipo 2	32093 (95%)	542.2			
Trattamento					
Dieta	9691 (28.7%)	425.0			
Ipog. orali	17476 (51.7%)	479.3			
Insulina	6630 (19.6%)	891.8			
Totale	33797 (100%)	671.9	863876 (100%)	169.7	2.8 (2.7-2.9)

Tabella IV. Costo delle prescrizioni farmaceutiche nella popolazione diabetica (per trattamento e tipo di diabete) e non diabetica di Torino, per fascia di età e sesso.

* costo per persona standardizzato per età e sesso. ** stimato tramite modello log-lineare.

La prevalenza standardizzata per età era associata al livello socio-economico, essendo più alta tra le persone aventi basso grado di scolarità e di reddito. La Tabella II riporta la prevalenza di diabete stratificata per età e grado di scolarità (i risultati sono sovrapponibili per quanto riguarda il reddito, non inclusi in tabella).

In entrambi i sessi ed in tutte le fasce di età, la prevalenza di diabete è risultata più elevata nei soggetti con scolarità bassa (Tabella III). Le differenze socio-economiche, valutate per classe di età, erano molto più evidenti tra le donne.

La popolazione diabetica non riceve solamente un maggior numero di prescrizioni per farmaci cardiovascolari, ma anche per farmaci di altre categorie, inclusi gli antibiotici e gli analgesici. Questo risultato avvalorava l'ipotesi secondo la quale, rispetto alla popolazione non diabetica di pari età e sesso, i diabetici sono maggiormente suscettibili a altre malattie concorrenti, con un conseguente aggravamento dei costi sanitari.

Il costo più elevato è sostenuto dal sottogruppo dei diabetici di tipo 1, che presentano un eccesso di costo di 8 volte rispetto ai non diabetici di pari età e sesso; il diabete tipo 1 rappresenta, tuttavia, solo il 5% dell'intera coorte e, quindi, il peso maggiore sul costo è dato dal diabete tipo 2. L'eccesso di costo è più elevato, parimenti, nei soggetti di età < 45 anni ed inferiore nell'età > 64 anni, come prevedibile, visto il parallelo incremento nel consumo di farmaci anche nella popolazione non diabetica in questa fascia d'età (Tabella IV).

DISCUSSIONE

Gli strumenti per stimare la prevalenza di diabete in una popolazione e per monitorare le sue variazioni nel tempo e nello spazio sono indispensabili, sia a scopo descrittivo sia per finalità di pianificazione sanitaria^(29,19). I metodi basati su programmi di screening condotti su campioni casuali della popolazione generale potrebbero essere inadeguati a causa dei costi elevati e della enorme variabilità intra-individuale dei test da carico di glucosio⁽³⁵⁾.

Per fronteggiare l'epidemia di diabete la ricerca epidemiologica si deve focalizzare sull'incremento della sorveglianza, utilizzando metodiche e procedure routinariamente adottate per prevenire e controllare le malattie trasmissibili, così come avvalersi delle fonti di dati computerizzate. A New York, per esempio, è stato recentemente istituito un registro di tutte le emoglobine-glicate (HbA1c) contenente le informazioni individuali dei pazienti e dei medici che hanno prescritto il test⁽²⁹⁾.

Utilizzando i dati raccolti, siamo stati in grado di costituire una larga coorte di persone con diagnosi di diabete. Usando il metodo della cattura-ricattura,

inoltre, abbiamo potuto stimare la completezza della rilevazione e calcolare la prevalenza di diabete che risultava simile a quanto riportato in altre aree europee^(2,3), maggiore rispetto a quella riferita nel 1988 dal Casale Monferrato Study⁽⁵⁾ – l'ultimo studio che ha fornito stime circa la prevalenza della malattia in Italia. Questo primo risultato dimostra come sia fattibile un programma di sorveglianza a basso costo del diabete.

Quale ulteriore risultato, abbiamo studiato le differenze socio-economiche circa la prevalenza di malattia diabetica. A differenza di altri studi, che hanno utilizzato dati aggregati quali indicatori della classe sociale, il nostro studio ha il pregio di essere basato su dati individuali e di includere l'80% dei casi di malattia nella città di Torino. Abbiamo dimostrato che il diabete è più frequente tra le persone con un basso grado di scolarità e basso reddito; che le differenze sociali sono più forti tra le donne rispetto agli uomini; e che le disuguaglianze socio-economiche sono simili in tutte le fasce di età. Le prime due conclusioni concordano con la maggior parte degli studi internazionali e, in questo senso, suggeriscono che le differenze nello stile di vita e/o nella cura della propria salute legate al sesso (nelle diverse classi sociali) agiscono nella stessa misura anche in aree geografiche diverse^(1,3,9,11,31). La più alta prevalenza di diabete negli individui con bassa scolarità (o basso reddito) è verosimilmente attribuibile all'obesità e all'inattività fisica, entrambi fattori di rischio consistenti di diabete tipo 2; un ampio gradiente legato alla classe sociale, infatti, è stato dimostrato in Italia per entrambi^(33,34).

La maggior parte degli studi ha evidenziato, inoltre, un effetto decrescente dello stato socio-economico sulla prevalenza del diabete con l'avanzare dell'età, fatto che può essere principalmente ascritto alla minor sopravvivenza delle persone di basso livello socio-economico. Tale differenza di sopravvivenza per classe sociale non è presente, invece, nei diabetici torinesi, come dimostrato in uno studio di mortalità condotto su questa coorte; la spiegazione più plausibile, perciò, è che l'assistenza sanitaria garantita ai diabetici non venga influenzata da fattori socio-economici⁽¹⁴⁾.

Il più favorevole impatto della malattia a Torino piuttosto che negli altri Paesi, anche nelle classi sociali più disagiate, è indicativo del fatto che in Italia i diabetici ricevano un follow-up clinico regolare indipendente dalla loro posizione sociale: una situazione molto diversa da quella statunitense. Ciò è dovuto, in larga parte, all'ampia distribuzione dei centri di diabetologia sul territorio nazionale – impostazione che consente ai diabetologi di seguire periodicamente i propri pazienti nell'ambito del Sistema Sanitario Nazionale – e alla stretta cooperazione con i medici di base, due condizioni

che verosimilmente incrementano la sopravvivenza dei malati, garantendo un adeguato follow-up.

Questo ampio studio di popolazione dimostra, poi, come il trattamento del diabete abbia un grande impatto sui costi delle prescrizioni farmaceutiche, le quali determinano una spesa quasi 3 volte maggiore nei soggetti diabetici rispetto ai non-diabetici, indipendentemente da età e sesso. La popolazione diabetica non riceve solamente un maggior numero di prescrizioni per farmaci cardiovascolari, ma anche per farmaci di altre categorie, inclusi gli antibiotici e gli analgesici. Questo risultato avvalorava l'ipotesi secondo la quale, rispetto alla popolazione non diabetica di pari età e sesso, i diabetici sono maggiormente suscettibili a altre malattie concomitanti, con un conseguente aggravamento dei costi sanitari. Il costo più elevato è sostenuto dal sottogruppo dei diabetici di tipo 1, che presentano un eccesso di costo di 8 volte rispetto ai non diabetici di pari età e sesso; il diabete tipo 1 rappresenta, tuttavia, solo il 5% dell'intera coorte e, quindi, il peso maggiore sul costo è dato dal diabete tipo 2. L'eccesso di costo è più elevato, parimenti, nei soggetti di età < 45 anni ed inferiore nell'età > 64 anni, come prevedibile, visto il parallelo incremento nel consumo di farmaci anche nella popolazione non diabetica in questa fascia d'età.

Il nostro studio ha una serie di limiti. Innanzitutto la completezza del rilevamento a Torino è stata dell'80%, valore paragonabile ad altre analoghe rilevazioni⁽⁶⁾. I casi mancanti non erano mai stati ospedalizzati, non assumevano alcun farmaco anti-diabete e non avevano richiesto l'esenzione dal pagamento. Di conseguenza è ragionevole supporre si tratti di soggetti ad uno stadio di malattia meno grave e in semplice terapia dietetica.

Le fonti di dati utilizzate, infine, non includono informazioni su molti determinanti del diabete, quali l'attività fisica e il BMI, in ciò non consentendoci di calcolare valori di prevalenza stratificati per dette variabili né di controllare la presenza di confondenti o di alterazioni di altri fattori associati al sesso, all'età o allo stato socio-economico. Per superare questi limiti, campioni rappresentativi della popolazione dovrebbero essere estratti dalle fonti informatizzate per desumerne i dati clinici di interesse.

Il nostro studio, per concludere, evidenzia la fattibilità di un sistema di monitoraggio del diabete basato su database di tipo amministrativo e la conseguente possibilità di mantenere sotto controllo i dati epidemiologici in maniera semplice ed a costi assai contenuti. Incrociando, in aggiunta, i dati considerati con altri database amministrativi differenti da quelli usati per le stime di prevalenza (ad esempio i certificati di morte, le visite specialistiche) sarà possibile monitorare la qualità delle prestazioni sanitarie erogate ai pazienti.

Le evidenze prodotte nelle disuguaglianze sociali, altresì, costituiscono informazioni preziose per gli amministratori locali della Sanità ed evidenziano come la prevenzione, sia essa primaria o secondaria, dovrebbe essere diretta verso i gruppi più fragili della popolazione: in particolare le donne di classe sociale più bassa rappresentano il sottogruppo a più alto rischio di diabete.

BIBLIOGRAFIA

1. Agardh EE, Ahlbom A, Andersson T, Efendic S, Grill V, Hallqvist J, Ostenson CG: *Explanation of socioeconomic differences in excess risk of type 2 diabetes in Swedish men and women*. Diabetes Care. 2004; 27: 716-721.
2. Arteagoitia JM, Larrañaga MI, Rodriguez JL, Fernandez I, Pinies JA: *Incidence, prevalence and coronary heart disease risk level in known Type 2 diabetes; a sentinel practice network study in the Basque Country, Spain*. Diabetologia. 2003; 46: 899-909.
3. Berger B, Stenstrom G, Sundkvist G: *Incidence, prevalence, and mortality of diabetes in a large population. A report from the Skaraborg Diabetes Registry*. Diabetes Care. 1999; 22: 773-778.
4. Bruno G, Carta Q, Runzo C, Prina Cerai S, Pagano G: *Incidenza e prevalenza di diabete mellito di tipo 2*. Il diabete. 2004; Suppl 1: 23-27.
5. Bruno G, LaPorte RE, Merletti F, Biggeri A, McCarty D, Pagano G: *National diabetes programs. Application of capture-recapture to count diabetes?* Diabetes Care. 1994; 17: 548-556.
6. Bruno G, Merletti F, Bargerò G, Melis D, Masi I, Ianni A, Novelli G, Pagano G, Cavallo-Perin P: *Changes over time in the prevalence and quality of care of type 2 diabetes in Italy: The Casale Monferrato Surveys, 1988 and 2000*. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 2008; 18 (1): 39-45.
7. Bruno G, Merletti F, Boffetta P, Cavallo-Perin P, Bargerò G, Gallone G, Pagano G: *Impact of glycaemic control, hypertension and insulin treatment on general and cause-specific mortality: an Italian population-based cohort of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus*. Diabetologia. 1999; 42: 297-301.
8. Chao A, Tsay PK, Lin SH, Shau WY, Chao DY: *The application of capture-recapture methods to epidemiological data*. Stat. Med. 2001; 20: 3123-3157.
9. Choi BCK, Shi F: *Risk factors for diabetes mellitus by age and sex: results of the National Population Health Survey*. Diabetologia. 2001; 44: 1221-1231.

10. Colagiuri S, Borch-Johnsen K, Glumer C, Vistisen D: *There really is an epidemic of type 2 diabetes*. Diabetologia. 2005; 48: 1459-1463.
11. Dalstra JAA, Kunst AE, Borrell C, Breeze E, Cambois E, Costa G, Geurts JJ, Lahelma E, Van Oyen H, Rasmussen NK, Regidor E, Spadea T, Mackenbach JP: *Socioeconomic differences in the prevalence of common chronic diseases: an overview of eight European countries*. Int. J. Epidemiol. 2005; 34: 316-326.
12. Glumer C, Jorgensen T, Borch-Johnsen K: *Prevalences of diabetes and impaired glucose regulation in a Danish population: the Inter99 study*. Diabetes Care. 2003; 26: 2335-2340.
13. Gnani R, Karaghiosoff L, Dalmaso M, Bruno G: *The Piedmont Diabetes Register: opportunities and limits for epidemiological purposes*. Epidemiol. Prev. 2006; 30: 59-64.
14. Gnani R, Petrelli A, Demaria M, Spadea T, Carta Q, Costa G: *Mortality and educational level among diabetic and non-diabetic people in the Turin Longitudinal Study: a 9 year follow-up*. Int. J. Epidemiol. 2004; 33: 864-871.
15. Goldberg RB: *Lifestyle interventions to prevent type 2 diabetes*. Lancet 2006; 368: 1634-1636.
16. International Working Group for Disease Monitoring and Forecasting: *Capture-recapture and multiple-record systems estimation I: History and theoretical development*. Am. J. Epidemiol. 1995; 142: 1047-1058.
17. International Working Group for Disease Monitoring and Forecasting: *Capture-recapture and multiple-record systems estimation II: Applications in human diseases*. Am. J. Epidemiol. 1995; 142: 1059-1068.
18. King H, Aubert RE, Herman WH: *Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections*. Diabetes Care. 1998; 21: 1414-1431.
19. LaPorte RE, McCarty D, Bruno G, Tajima N, Baba S: *Capture-recapture methods to count diabetes in the 21st century*. Diabetes Care. 2006; 16: 528-534.
20. Marinacci C, Schifano P, Cesaroni G, Caranci N, Russo A, ISIH: *Income inequalities in hospitalization in Italy*. J. Epidemiol. Community Health. 2004; Suppl 1, 58: A5.
21. Marinacci C, Spadea T, Biggeri A, Demaria M, Caiazzo A, Costa G: *The role of individual and contextual socioeconomic circumstances on mortality: analysis of time variations in a city of north west Italy*. J. Epidemiol. Community Health. 2004; 58: 199-207.
22. Midthjell K, Kruger O, Holmen J, Tverdal A, Claudi T, Bjorndal A, Magnus P: *Rapid changes in the prevalence of obesity and known diabetes in an adult Norwegian population. The Nord-Trondelag Health Surveys: 1984-1986 and 1995-1997*. Diabetes Care. 1999; 22: 1813-1820.
23. Office of National Statistics: *Longitudinal study newsletter n. 24*. London: Office of National Statistics and Centre for Longitudinal Study. 2001.
24. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoo C, Stefanadis C: *The epidemiology of Type 2 diabetes mellitus in Greek adults: the ATTICA study*. Diabet. Med. 2005; 22: 1581-1588.
25. Petrelli A, Gnani R, Marinacci C, Costa G: *Socioeconomic inequalities in coronary heart disease in Italy: A multilevel population-based study*. Soc. Sci. Med. 2006; 63: 446-456.
26. Porta M: *Retinopatia diabetica*. Il diabete 2004; Suppl 1: 343-347.
27. Reboldi GP, Quintaliani G, Buetti A: *Nefropatia e ipertensione nel diabete di tipo 2*. Il diabete 2004; Suppl 1: 348-357.

28. Rothman KJ, Greenland S: *Modern Epidemiology*. 1998; 2nd ed Lippincott-Raven, Philadelphia.
29. Steinbrook R: *Facing the diabetes epidemic-mandatory reporting of glycosylated hemoglobin values in New York City*. N. Engl. J. Med. 2006; 354: 545-548.
30. Stene LC, Midthjell K, Jenum AK, Skeie S, Birkeland KI, Lund E, Joner G, Tell GS, Schirmer H: *Prevalence of diabetes mellitus in Norway*. Tidsskr Nor Laegeforen 2004; 124: 1511-1514.
31. Tang M, Chen Y, Krewski D: *Gender-related differences in the association between socioeconomic status and self-reported diabetes*. Int. J. Epidemiol. 2003; 32: 381-385.
32. Vaccaro O, Bonora E, Bruno G, Garancini MP, Muntoni S: *L'epidemiologia del diabete non-insulino-dipendente e della ridotta tolleranza al glucosio*. In "Il diabete in Italia". 1996; Editrice Kurtis, Milano.
33. Vannoni F, Burgio A, Quattrocioni L, Costa G, Faggiano F: *Differenze sociali e indicatori di salute soggettiva, morbosità cronica, disabilità e stili di vita nell'indagine ISTAT sulla salute 1994*. Epidemiol. Prev. 1999; 23: 215-229.
34. Vaz de Almeida MD, Graca P, Alfonso C, D'Amicis A, Lappalainen R, Damkjaer S: *Physical activity levels and body weight in a nationally representative sample in the European Union*. Public Health Nutrition 1999; 2: 87-95.
35. Wareham NJ, Forouhi NG: *Is there really an epidemic of diabetes?* Diabetologia 2005; 48: 1454-1455.

RUOLO DEL GENE APC NELLA PREDISPOSIZIONE AL TUMORE DELLA MAMMELLA

Premio “Italo Arneodo”

Tesi di Laurea premiata in collaborazione con
l'Accademia di Medicina di Torino

Maria Teresa Ricci

Dipartimento di Genetica, Biologia e Biochimica
Università degli Studi di Torino

Key words: *Breast cancer / Neoplasia della mammella*
 APC / APC
 Predisposition / Forma di predisposizione
 Variants of unknown significance / Varianti di significato ignoto

Abstract:

Background: Gaspar *et al.* describe a mouse carrying a truncating mutation at exons 15 of *Apc* (*Apc*^{1572T/+}) (Gaspar *et al.*, in preparation). The mouse is prone to develop mammary tumors in the absence of intestinal adenomas. Following this observation, in the present study, we evaluate the role of APC in human mammary tumor development. We perform a mutational screening in a region of 1000 nucleotides near human codon 1574, homologous of murine codon 1572.

Patients and methods: Mutational screening of APC is performed in 271 patients from 262 families affected by breast cancer. DHPLC analysis (Denaturing high performance liquid chromatography) followed by direct sequencing is used.

Results: A total of 3 different variants are identified: 2 silent variants (c.4902G>A p.Pro1634 e c.4326T>A p.Pro1442) and 1 in frame deletion of 6 nucleotides that causes two leucine loss [c.4850_4855del6 (TTCTAC) p.Leu1617_Leu1618]. These variants have not been reported previously in the literature.

Conclusion: Our study contributes to better understand the APC role in breast cancer oncogenesis. We identify 3 variants of unknown clinical significance not reported previously in the literature or in databases. Tissue and mRNA analysis are necessary to evaluate the pathogenicity of these variants.

Riassunto:

Introduzione: Gaspar *et al.* descrivono un topo transgenico portatore di una mutazione troncante in eterozigosi dell'esone 15 del gene *Apc* (*Apc*^{1572T/+}) che presenta una predisposizione autosomica dominante allo sviluppo di tumori mammari in assenza di polipi a livello del tratto gastro-enterico (Gaspar *et al.*, in preparation). In base alle caratteristiche fenotipiche del suddetto modello animale, il presente lavoro valuta l'eventuale ruolo del gene APC nella predisposizione allo sviluppo del tumore mammario umano, femminile e maschile. Sono state pertanto ricercate mutazioni germinali del gene APC in una regione di circa 1000 nucleotidi attorno al codone Ile1574 omologo del codone murino Ile1572.

Pazienti e metodi: L'analisi genetica è stata condotta mediante metodica DHPLC (Denaturing high performance liquid chromatography) seguita da sequenziamento diretto su un campione di 271 individui provenienti da 262 nuclei famigliari con tumori della mammella e/o dell'ovaio ovvero tumori giovanili e/o multipli e/o famigliari.

Risultati: Nei 271 soggetti analizzati sono state identificate 3 varianti genetiche del gene APC di incerto significato biologico. Si tratta di 2 varianti silenti (c.4902G>A p.Pro1634 e c.4326T>A p.Pro1442) e di una delezione *in frame* di 6 nucleotidi che determina la perdita di due residui di leucina [c.4850_4855del6 (TTCTAC) p.Leu1617_Leu1618]. Tali varianti non sono mai state descritte in precedenza in letteratura.

Conclusioni: I risultati del presente lavoro concorrono al dibattito su un eventuale ruolo del gene APC nello sviluppo del tumore della mammella. L'analisi genetica ha permesso di identificare tre varianti mai riportate in letteratura e nei databases che raccolgono i polimorfismi o le mutazioni deleterie associate a fenotipi patologici. Sono necessari ulteriori approfondimenti sul tessuto tumorale e l'analisi dell'RNA messaggero per valutare l'eventuale ruolo patogenetico delle suddette varianti.

INTRODUZIONE

Il carcinoma della mammella è il tumore più frequente del sesso femminile, pur incidendo diversamente in vari Paesi. In Italia, esso rappresenta il 10% di tutte le neoplasie; negli Stati Uniti, una donna su nove sviluppa un carcinoma mammario nel corso della propria vita.

Il carcinoma della mammella è una malattia multifattoriale alla cui insorgenza partecipano fattori di rischio sia di tipo costituzionale che di tipo ambientale.

Fin dall'inizio del secolo scorso, il cancro al seno è stato collegato alla presenza di una predisposizione familiare. Si parla di tumore familiare quando sono presenti all'interno della stessa famiglia altri casi di tumore alla mammella. Circa il 20% delle persone con tumore della mammella ha un precedente caso in famiglia. Studi epidemiologici hanno dimostrato che avere un parente stretto con questo tumore aumenta di 2-3 volte il rischio di malattia. Ciò può essere dovuto sia alla presenza di un gene di predisposizione sia alla condivisione di fattori ambientali che, indipendentemente dalla presenza di una componente genetica, può portare ad un maggior rischio di sviluppare la malattia in famiglia. Comunque, poiché il tumore della mammella è una malattia frequente dopo i 50 anni, la presenza di più casi diagnosticati in tale fascia d'età può essere dovuta, in alcune famiglie, unicamente al caso.

Un numero minore di casi di carcinoma della mammella (circa 5-10 su 100) è causato da un difetto genetico ad alta penetranza: in questo caso, il tumore si definisce *ereditario*. Negli anni '90, lo studio dei fattori di rischio di tipo genetico di questa neoplasia ha avuto un notevole sviluppo. Nel 1990, è stata identificata una prima forma di predisposizione ereditaria allo sviluppo del tumore della mammella: Malkin e collaboratori hanno dimostrato che mutazioni del gene TP53, responsabili della sindrome di Li-Fraumeni, aumentano anche il rischio di sviluppare una neoplasia mammaria⁽⁹⁾. Negli anni 1994-1995 sono stati scoperti i due geni principali di predisposizione allo sviluppo del tumore della mammella: BRCA1 e BRCA2^(10,21). Le mutazioni di BRCA1 e BRCA2 non sono frequenti ma conferiscono un rischio consistente di sviluppare tumori sia della mammella che dell'ovaio e predispongono, in misura minore, allo sviluppo di altri tumori quali neoplasie della prostata (BRCA1) e del pancreas (BRCA2)^(18,19,1). Accanto a questi geni, lo studio dei meccanismi molecolari di controllo del ciclo cellulare e di riparazione dei danni al DNA ha portato all'identificazione di una serie di geni che sono responsabili, se mutati, di un aumento di circa 2 volte del rischio di carcinoma mammario (ATM, CHEK2, NBS1, BRIP1, RAD50, PALB2). Un aumento del rischio per lo sviluppo della neoplasia mammaria, infine, è presente, anche nelle due rare sindromi di Cowden e di Peutz-Jeghers, dovute a mutazioni dei geni PTEN⁽¹²⁾ e LKB1⁽²⁾.

Nel 2007 è stato descritto un topo transgenico portatore di una mutazione in eterozigosi dell'Ile1572 a livello dell'esone 15 del gene APC che produce la proteina tronca APC1572T (Gaspar *et al.*, in preparation). I topi *Apc*^{+/-1572T} si ammalano di tumori della mammella. Sulla base di questo modello murino è stato ipotizzato che mutazioni specifiche del gene APC possano associarsi ad un aumentato rischio di sviluppare tumori mammari.

APC è un gene soppressore della crescita tumorale localizzato a livello del braccio lungo del cromosoma 5. Esso è costituito da 15 esoni: l'esone 15 rappresenta il 75% della regione codificante. Il gene APC codifica una proteina di 2843 aminoacidi coinvolta in numerosi processi, tra cui la regolazione del ciclo cellulare, l'apoptosi, l'adesione, l'assemblaggio dei microtubuli e la segregazione cromosomica alla mitosi⁽¹³⁾. Anche se l'assenza di ciascuna di queste funzioni, di per sé, può favorire lo sviluppo di un tumore, numerose evidenze sperimentali suggeriscono che il ruolo di gene soppressore della crescita tumorale dipenda soprattutto dalla capacità di APC di regolare i livelli intracellulari di β -catenina nel contesto della via di trasduzione del segnale pro-mitotico *wnt*. Quando la proteina APC manca o è mutata, la β -catenina non viene degradata, si accumula nel citoplasma, trasloca nel nucleo e attiva i geni di proliferazione cellulare anche in assenza del segnale *wnt*^(4,15). Mutazioni germinali del gene APC causano la poliposi adenomatosa familiare (FAP), una malattia autosomica dominante caratterizzata dallo sviluppo di centinaia o migliaia di polipi a livello del colon e del retto nella seconda o terza decade di vita. Il 95% delle mutazioni germinali del gene APC sono mutazioni *nonsense* o *frameshift* che causano la formazione di una proteina anomala che perde in modo consistente la capacità di regolare i livelli di β -catenina nella cellula. È stato ampiamente dimostrato che esiste una relazione tra la posizione della mutazione germinale e il fenotipo della malattia.

Sono stati generati numerosi modelli animali di topo portatori di mutazioni specifiche del gene APC per studiare la relazione tra la posizione della mutazione germinale e il fenotipo della malattia. Sorprendentemente, i topi *Apc*^{+/-1572T} non sviluppano adenomi a livello del tratto intestinale ma si ammalano di tumori della mammella che presentano caratteristiche sia luminali che mioepiteliali ed accumulo di β -catenina nel citoplasma (Gaspar *et al.*, in preparation). La proteina APC1572T conserva parte dei siti di legame con la β -catenina (le 3 ripetizioni di 15 aminoacidi e 3 delle 7 ripetizioni di 20 aminoacidi) e nessuno dei motivi SAMP fondamentali per il legame con le proteine conduttina/axine 1 e 2 (nessuna delle 3 ripetizioni): la capacità di *down-regulation* nei confronti della β -catenina sembra quindi compromessa.

Scopo del presente lavoro è la ricerca di mutazioni germinali del gene APC in una regione di circa 1000 nucleotidi attorno al codone Ile1574 omologo del codone murino Ile1572 in corrispondenza del quale la presenza di una mutazione germinale troncante determina una forma di predisposizione allo sviluppo di tumori della mammella. In base alle caratteristiche fenotipiche del modello murino APC1572T che non presenta adenomi dell'intestino tenue ma solo tumori della mammella, si può infatti ipotizzare che mutazioni specifiche del gene APC possano associarsi ad un aumentato rischio di sviluppare tumori mammari piuttosto che gastro-enterici. Poiché tali mutazioni potrebbero conferire nell'uomo un rischio di tumore mammario di entità modesta o consistente, è stata sottomessa ad analisi del gene APC una casistica di 262 nuclei famigliari eleggibili ad analisi dei geni BRCA1 e BRCA2. L'analisi è stata estesa anche a casi portatori di mutazioni dei geni BRCA perché varianti genetiche del gene APC potrebbero rappresentare fattori "modificatori" del fenotipo ovvero aumentare la penetranza delle mutazioni BRCA.

PAZIENTI E METODI

Sono stati inseriti nello studio 271 pazienti, giunti presso gli ambulatori di Genetica Oncologica delle Aziende Sanitarie Ospedaliere San Giovanni Battista di Torino (130 casi), IRCC di Candiolo - Ordine Mauriziano (133 casi) e San Luigi Gonzaga di Orbassano (8 casi) nel periodo 2000-2006 e risultati eleggibili per un'analisi genetica dei geni BRCA (262 pazienti casi indice e 9 secondi probandi sottoposti ad analisi dei BRCA dopo che l'analisi genetica è risultata negativa sul caso indice). I 262 nuclei famigliari analizzati sono stati selezionati in base ai seguenti criteri:

- a prescindere dalla storia famigliare:
 - donne affette da tumore della mammella diagnosticati prima dei 36 anni o tumori bilaterali o multifocali
 - donne affette da tumore della mammella e dell'ovaio
 - uomini affetti da tumore della mammella a qualsiasi età
- nuclei famigliari con:
 - almeno due parenti di primo grado affetti da tumore della mammella femminile prima dei 50 anni o tumore bilaterale, tumore ovarico, tumore della mammella maschile
 - almeno tre parenti di primo grado affette da tumore della mammella a qualsiasi età.

Tipologia di casi	Mut BRCA1	Mut BRCA2	Variazioni genetiche ad effetto biologico incerto BRCA1 o 2	BRCA1 BRCA2 wt	Totale
BrCa Femminile < 36 aa (fam. negativa)	1	0	0	17	18
BrCa Femminile ≥ 36 aa (fam. negativa)	1	0	0	8	9
BrCa Maschile (fam. negativa)	0	0	0	2	2
OvCa < 36 aa (fam. negativa)	1	0	0	0	1
BrCa +OvCa (fam. negativa)	2	0	0	3	5
Famiglie con solo BrCa Femminile (2-7 casi in fam.)	4	15	2	138	159
Famiglie con BrCa Femminile e Maschile (2-5 casi in fam.)	1	5	0	7	13
Famiglie con BrCa e OvCa (2-12 casi in fam.)	25	8	1	19	53
Famiglie con solo OvCa (2-3 casi in fam.)	1	0	0	1	2
Totale	36	28	3	195	262

Tabella I. Risultati dell'analisi genetica per la ricerca di mutazioni BRCA1 e BRCA2 nelle 262 famiglie analizzate.

Nei 262 probandi inseriti nello studio era stata effettuata in precedenza l'analisi genetica per la ricerca di mutazioni puntiformi e delezioni dei geni BRCA1 e BRCA2. La ricerca di mutazioni puntiformi è stata eseguita mediante analisi in PTT (*protein truncation test*) degli esoni 11 di BRCA1 e BRCA2 e l'analisi in DHPLC (*denaturing high performance liquid chromatography*) dei rimanenti esoni dell'intera regione codificante. La ricerca di delezioni è stata eseguita mediante metodica MLPA (*Multiplex Ligation-dependent probe amplification*). In 64 pazienti è stata dimostrata la presenza di mutazioni germinali deleterie dei geni BRCA (36 mutazioni del gene BRCA1 e 28 mutazioni del gene BRCA2), 3 pazienti sono risultati portatori di varianti genetiche di BRCA2 di incerto significato biologico mentre in 195 pazienti non è stata dimostrata alcuna mutazione (Tabella I).

Tutti i pazienti reclutati sono stati sottoposti ad un prelievo di 8 ml di sangue venoso periferico in EDTA. Il DNA genomico è stato estratto dai campioni in esame tramite il kit commerciale QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA) secondo la procedura indicata dal produttore.

La Polymerase chain reactions (PCRs) è stata eseguita seguendo un protocollo Touchdown il cui obiettivo è la riduzione dell'amplificazione non specifica. La regione dell'esone 15 del gene APC da amplificare è stata divisa in quattro frammenti (15A, 15B, 15C e 15D) e sono state progettate quattro coppie di primers altamente specifiche (Tabella II).

Regione	Primers (5' → 3')	Cicli di <i>touchdown</i>	N° cicli
15A Forward 15A Reverse	GAGTGAACCATGCAGTGGAA TTTCCTGAACTGGAGGCATT	63° → 56°	7 + 35
15B Forward 15B Reverse	GAGCCTCGATGAGCCATTTA CTTGCCACAGGTGGAGGTA	67° → 60°	7 + 35
15C Forward 15C Reverse	CCAAGAGAAAGAGGCAGAAAAA CCTTCTCCAGCAGCTAACTCA	67° → 60°	7 + 35
15D Forward 15D Reverse	TATGCCACGGGTGTATTGTG TGATTTTGTGGGTGCAGA	63° → 56°	7 + 35

Tabella II. Primers, temperature e numero di cicli di touchdown delle reazioni di PRC per l'amplificazione delle regioni 15A, 15B, 15C e 15D del gene APC.

Regione	RTm (I)	RTm + 2°C
15A	55° - 59°	60°
15B	56°	57°
15C	54° - 58°	60°
15D	58°	59°

Tabella III. Temperature utilizzate per l'analisi in DHPLC dei prodotti di amplificazione.

Le reazioni sono state eseguite in un termocicizzatore automatico TProfessional Thermocycler- Whatman (Biometria).

L'analisi in DHPLC è stata eseguita mediante la WAVE™ DHPLC DNA Fragment Analysis System (Transgenomic) secondo le condizioni indicate in Tabella III.

I campioni che, all'analisi in DHPLC, presentavano picchi aggiuntivi di eluizione o un profilo diverso rispetto al "wild type" sono stati sottoposti a sequenziamento diretto. Il sequenziamento, determinando l'esatta sequenza di nucleotidi di ogni campione analizzato, consente di verificare la variazione nucleotidica responsabile del profilo di eluizione anomalo ottenuto al DHPLC.

La sequenza *consensus* di ciascun amplificato, ottenuta dal confronto tra il filamento senso e quello antisenso, è stata confrontata con quella presente sul database Ensembl, che può essere trovato nel sito www.ensembl.org: Ensembl transcript ID: ENSG00000134982.

RISULTATI

Dei 271 pazienti sottoposti ad analisi del gene APC, 266 (98,2%) sono risultati normali all'analisi in DHPLC e 5 (1,8%) sono risultati portatori di varianti a livello dell'esone 15 del gene APC. Dei 266 casi normali, 125 sono risultati eterozigoti per 1 o più polimorfismi noti.

Le 3 varianti genetiche del gene APC di significato biologico ancora incerto identificate sono:

- c.4902G>A p.Pro1634: identificata in una paziente affetta da tumore della mammella con familiarità positiva e analisi genetica negativa per mutazioni BRCA;

- c.4326T>A p.Pro1442: identificata in due sorelle sane con familiarità positiva e analisi genetica negativa per mutazioni BRCA e in una paziente affetta da neoplasia mammaria, familiarità positiva e portatrice di una mutazione BRCA2;
- c.4850_4855del6 (TTCTAC) p.Leu1617_Leu1618 (delezione *in frame* di 6 nucleotidi che causa la perdita di due residui di leucina): individuata in una donna affetta da tumore della mammella con familiarità positiva e portatrice di una mutazione BRCA1.

Le due varianti silenti identificate e la delezione *in frame* di 2 aminoacidi sono mutazioni di incerto significato biologico. La loro assenza in letteratura e nei databases che raccolgono i polimorfismi o le mutazioni deleterie associate a fenotipi patologici non permette comunque né di confermare né di escludere un eventuale ruolo patogenetico.

È noto infatti che mutazioni silenti o missenso possono interferire con il corretto processamento del gene o creando siti anomali di splicing o eliminando sequenze esoniche di riconoscimento per gli enzimi coinvolti nello splicing (cosiddette sequenze ESE o *exonic splicing enhancers*). Le suddette varianti sono state quindi analizzate *in silico* utilizzando sei diversi software che analizzano la sequenza nucleotidica ed attribuiscono dei punteggi alle regioni che presentano omologie con i siti accettore e donatore di splicing più frequenti del genoma umano e di altri organismi. L'analisi eseguita con questi programmi informatici di predizione non ha dimostrato alcuna variazione significativa per le varianti c.4326T>A p.Pro1442 e c.4850_4855del6 (TTCTAC) p.Leu1617_Leu1618. Per quanto riguarda invece la variante c.4902G>A p.Pro1634, due modelli bio-informatici su sei hanno segnalato la possibile comparsa di un nuovo sito accettore di splicing nell'esone 15 del gene APC in corrispondenza della sostituzione nucleotidica. L'attivazione di un sito accettore criptico di splicing in corrispondenza della mutazione determinerebbe l'eliminazione dei primi 2945 nucleotidi dell'esone 15 del gene APC con comparsa di un segnale prematuro di stop al codone 655.

È stato inoltre analizzato l'allineamento delle sequenze ortologhe della proteina APC in 14 specie progressivamente divergenti. Le sequenze proteiche utilizzate sono state reperite nel database Ensembl e sono state selezionate in maniera da massimizzare la diversità limitando il numero di sequenze troppo vicine dal punto di vista filogenetico ed evitando al contempo di inserire sequenze troppo divergenti dalla proteina umana o di dimensioni eccessivamente ridotte. Gli allineamenti sono stati generati utilizzando l'applicativo T-Coffe. L'allineamento delle sequenze ortologhe della proteina

APC mostra come i due residui di Leucina in posizione 1617 e 1618 siano conservati in tutti i vertebrati analizzati ad eccezione del *Takifugu rubripes* (nel quale è presente un solo residuo di Leucina), mentre sono assenti negli organismi ad eccezione del *Tetraodon nigroviridis*. Questo dato suggerisce che la perdita dei due residui di Leucina possa avere un effetto sulla funzione della proteina ed è meritevole di ulteriori approfondimenti.

CONCLUSIONI

Nel presente lavoro è stato valutato l'eventuale ruolo di APC quale gene di predisposizione allo sviluppo del tumore mammario umano, femminile e maschile. L'osservazione che i topi *Apc*^{+1572T} sviluppano tumori mammari in assenza di polipi a livello gastro-enterico ha fatto ipotizzare che anche nell'essere umano specifiche mutazioni del gene APC potrebbero elettivamente predisporre allo sviluppo di neoplasie mammarie in assenza delle importanti manifestazioni gastro-intestinali tipiche della poliposi adenomatosa famigliare. È stata pertanto eseguita la ricerca di mutazioni germinali del gene APC in una regione di circa 1000 nucleotidi attorno al codone Ile1574 omologo del codone murino Ile1572. Tra i 262 nuclei famigliari analizzati per un totale di 271 soggetti, sono state identificate 3 varianti genetiche del gene APC di incerto significato biologico. Si tratta di 2 varianti silenti c.4902G>A p.Pro1634 e c.4326T>A p.Pro1442 e di una delezione *in frame* di 6 nucleotidi che determina la perdita di due residui di leucina (c.4850_4855del6 (TTCTAC) p.Leu1617_Leu1618). Dato che le pazienti portatrici di tali varianti non presentano alcuna storia clinica di manifestazioni gastro-enteriche di poliposi, nemmeno attenuata, non è possibile né confermare né escludere un ruolo patogenetico rispetto al rischio di tumore mammario. La variante silente c.4902G>A p.Pro1634 potrebbe essere responsabile della attivazione di un sito accettore criptico di *splicing* all'interno dell'esone 15 del gene APC determinando un codone prematuro di stop molto precoce. Inoltre, l'allineamento delle sequenze ortologhe di APC mostra come i due residui di Leucina in posizione 1617 e 1618, assenti nella variante c.4850_4855del6 p.Leu1617_Leu1618, siano altamente conservati in diverse specie animali: questo dato suggerisce che la perdita dei due residui di Leucina potrebbe avere un effetto sulla funzione della proteina.

Tali varianti meritano quindi approfondimenti che verranno eseguiti nel prossimo futuro quali l'analisi di segregazione, l'analisi immuno-istochimica dei corrispondenti tumori mammari al fine di verificare l'accumulo di β -catenina che rappresenta l'effetto pro-mitotico conseguente alla perdita di

funzione del gene APC, l'analisi dell'RNA messaggero del gene APC delle pazienti portatrici e eventualmente ricerca nei tessuti tumorali della mammella di un *second hit* somatico a carico del secondo allele del gene APC.

A tutt'oggi non è chiaro se il *pathway* di *wnt* possa avere un ruolo nello sviluppo della neoplasia mammaria e/o nella sua progressione e se questo riguardi particolari tipi istologici. I dati disponibili in letteratura si basano su casistiche limitate e prendono in considerazione singoli aspetti del problema. Una ridotta espressione della proteina APC sembra presente nel 35-41% dei tumori mammari^(6,14) che ben correla sia con un 39% dei tumori caratterizzati da accumulo citoplasmatico di β -catenina sia con una iper-metilazione del promotore del gene APC presente nel 47-52% dei casi⁽³⁾. Allo stesso modo, delezioni somatiche del gene APC sono state descritte in passato nel 25-38% dei campioni di tumore mammario sottoposti ad analisi di LOH^(11,20,8) mentre mutazioni somatiche puntiformi sono state descritte in percentuali estremamente variabili tra lo 0.4 e il 18% dei casi^(17,5,16).

In assenza di correlazioni reciproche tra questi eventi, è evidente come il ruolo effettivo del gene APC nella cancerogenesi mammaria resti indeterminato.

Johannsdottir e collaboratori hanno identificato delezioni somatiche della regione cromosomica 5q21-5q23, comprendente il gene APC nel 61% dei tumori mammari "informativi" (ovvero eterozigoti per i marcatori utilizzati) insorti in donne portatrici di mutazioni BRCA1, nel 21-35% dei tumori provenienti da portatrici BRCA2 e nell'8-16% dei tumori mammari sporadici⁽⁷⁾. Pertanto un ruolo del gene APC non può essere escluso a buon titolo nemmeno nelle donne portatrici di mutazioni dei due geni maggiori di suscettibilità.

BIBLIOGRAFIA

1. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg A, Pasini B, Radice P, Manoukian S, Eccles DM, Tang N, Olah E, Anton-Culver H, Warner E, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, Tulinius H, Thorlacius S, Eerola H, Nevanlinna H, Syrjäkoski K, Kallioniemi OP, Thompson D, Evans C, Peto J, Lalloo F, Evans DG, Easton DF: *Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 detected in case series unselected for family History: a combined analysis of 22 studies*. Am. J. Hum. Genet. 2003; 72: 1117-1130.
2. Boardman LA, Thibodeau SN, Schaid DJ, Lindor NM, McDonnell SK, Burgart LJ, Ahlquist DA, Podratz KC, Pittelkow M, Hartmann LC: *Increased risk for cancer in patients with the Peutz-Jeghers syndrome*. Ann. Intern. Med. 1998; 128: 896-899.
3. Dulaimi E, Hillinck J, Ibanez de Caceres I, Al-Saleem T, Cairns P: *Tumor suppressor gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients*. Clin. Cancer Res. 2004; 15: 6189-6193.
4. Fodde R, Clevers H: *APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer*. Nature Rev. Cancer. 2001; 1: 55-67.
5. Furuuchi K, Tada M, Yamada H, Kataoka A, Furuuchi N, Hamada J, Takahashi M, Todo S, Moriuchi T : *Somatic mutations of the APC gene in primary breast cancers*. Am. J. Pathol. 2000; 156: 1997-2005.
6. Ho KY, Kalle WH, Lo TH, Lam WY, Tang CM: *Reduced expression of APC and DCC gene protein in breast cancer*. Histopathology 1999; 35: 249-256.
7. Johannsdottir HK, Jonsson G, Johannesdottir G, Agnarsson BA, Eerola H, Arason A, Heikkilä P, Egilsson V, Olsson H, Johannsson OT, Nevanlinna H, Borg A, Barkardottir RB: *Chromosome 5 imbalance mapping in breast tumors from BRCA1 and BRCA2 mutation carriers and sporadic breast tumors*. Int. J. Cancer. 2006; 119: 1052-1060.
8. Kashiwaba M, Tamura G, Ishida M: *Aberrations of the APC gene in primary breast carcinoma*. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 1994; 120: 727-731.
9. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA: *Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms*. Science 1990; 250: 1233-1238.
10. Miki Y, Swensen J, Shattuk-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W: *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1*. Science 1994; 266: 66-71.
11. Medeiros AC, Nagai MA, Neto MM, Brentani RR: *Loss of heterozygosity affecting the APC and MCC genetic loci in patients with primary breast carcinomas*. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 1994; 3: 331-333.
12. Nelen MR, Padberg GW, Peeters EA, Lin AY, van den HB, Frants RR, Coulon V, Goldstein AM, van Reen MM, Easton DF, Eeles RA, Hodgson S, Mulvihill JJ, Murday VA, Tucker MA, Mariman EC, Starink TM, Ponder BA, Ropers HH, Kremer H, Longy M, Eng C: *Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22-23*. Nat. Genet. 1996; 13: 114-116.
13. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, Hedge P: *Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients*. Science 1991; 253: 665-669.

14. Ozaki S, Ikeda S, Ishizaki Y, Kurihara T, Tokumoto N, Iseki M, Arihiro K, Kataoka T, Okajima M, Asahara T: *Alterations and correlations of the components in the Wnt signaling pathway and its target genes in breast cancer*. *Oncol. Rep.* 2005; 14: 1437-1443.
15. Polakis P: *Wnt signaling and cancer*. *Genes Dev.* 2000; 14: 1837-1851.
16. Schlosshauer PW, Brown SA, Eisinger K, Yan Q, Guglielminetti ER, Parsons R, Ellenson LH, Kitajewski J: *APC truncation and increased beta-catenin levels in a human breast cancer cell line*. *Carcinogenesis* 2000; 2: 1453-1456.
17. Sorlie T, Bukholm I, Borresen-Dale AL: *Truncating somatic mutation in exon 15 of the APC gene is a rare event in human breast carcinomas*. *Hum. Mutat.* 1998; 12: 215-216.
18. The Breast Cancer Linkage Consortium: *Cancer risks in BRCA2 carriers*. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999; 91: 1310-1316.
19. Thompson D, Easton DF: *Cancer incidence in BRCA1 mutation carriers*. *J. Natl. Cancer Inst.* 2002; 94: 1358-1365.
20. Thompson AM, Morris RG, Wallace M, Wyllie AH, Steel CM, Carter DC: *Allele loss from 5q21 (APC/MCC) and 18q21 (DCC) and DCC mRNA expression in breast cancer*. *Br. J. Cancer* 1993; 68: 64-68.
21. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G: *Identification of breast cancer susceptibility gene BRCA2*. *Nature* 1995; 378: 789-792.

EFFETTI BIOLOGICI DELL'ALENDRONATO SUI LINFOCITI T GAMMA-DELTA NELL'OSTEOPOROSI POSTMENOPAUSALE

Premio "Giampiero Gaidano"

Tesi di Laurea premiata dalla Fondazione Piera, Pietro e Giovanni Ferrero
in collaborazione con l'Accademia di Medicina di Torino

Marco Ravazzoli, Patrizia D'Amelio, Giovanni Carlo Isaia

Dipartimento di Discipline Medico Chirurgiche - Sezione di Geriatria
AOU S. Giovanni Battista di Torino

Key words: *Osteoporosis / Osteoporosi*
Osteoclast / Osteoclasto
Alendronate / Alendronato

Abstract:

The protective role exerted by estrogens on bony tissue is currently believed to be connected to their ability in diminishing osteoclast formation, in increasing apoptotic phenomena and in reducing its reabsorbing activity. Estrogen deficiency seems to be involved in the regulation of the osteoclastogenesis process. The hypothesis according to which estrogens would act indirectly on osteoclasts via an immune system regulation (acting specifically on T-lymphocytes) has been increasingly bolstered by experimental data collected in the last few years. A side effect of aminobisphosphonates, the most commonly employed drugs in the treatment of postmenopausal osteoporosis and which include alendronate, is the induction of an acute phase response that clinically manifests itself as a "flu-like syndrome". It has been suggested that T $\gamma\delta$ lymphocytes, if stimulated by compounds resulting from the enzyme block induced by aminobisphosphonates, could be the cells responsible for releasing these cytokines. Moreover, aminobisphosphonates seem to be capable of acting on T lymphocytes increasing the peripheral T-cell number and, particularly, increasing T $\gamma\delta$ lymphocyte count. An effect of BSP on OC precursor cells at bone level was also demonstrated. This study was designed to assess the possible immunomodulatory effect of ALN on PBMC subpopulations and, specifically, on T $\gamma\delta$, as well as on immune system activation and on osteoclast precursors. ALN was given in vivo to a group of patients affected by postmenopausal osteoporosis. As shown by our data, ALN acts as immunomodulator, as it strongly reduces T $\gamma\delta$ lymphocyte number and increases T-cell number, even though not significantly. The number of other cells is not considerably affected. In order to assess more clearly

the selectivity of ALN effect on analyzed subpopulations we carried out a study on osteoclast precursors in peripheral blood, stressing thus that ALN is capable of reducing marrow output of osteoclast precursors.

Riassunto:

Attualmente si ritiene che il ruolo protettivo esercitato dagli estrogeni sul tessuto osseo sia legato alla loro capacità di ridurre la formazione degli osteoclasti, aumentarne i fenomeni apoptotici e diminuirne la attività riassorbitiva e che la carenza estrogenica sia coinvolta nella regolazione dei processi di osteoclasto genesi. Negli ultimi anni sempre più dati sperimentali hanno avvalorato l'ipotesi secondo la quale gli estrogeni agiscano indirettamente sugli osteoclasti attraverso una regolazione del sistema immunitario ed, in particolare, dei linfociti T.

Uno degli effetti collaterali degli aminobisfosfonati, i farmaci attualmente più utilizzati nel trattamento dell'osteoporosi postmenopausale tra cui vi è l'alendronato, è l'induzione di una risposta di fase acuta che clinicamente si manifesta nella "flu-like syndrome".

È stato suggerito che potrebbero essere i linfociti T $\gamma\delta$ le cellule che, stimulate dai composti derivati dal blocco enzimatico indotto dagli aminobisfosfonati, liberano tali citochine.

Inoltre è stato suggerito che gli aminobisfosfonati sono in grado di agire sui linfociti T aumentando il numero di cellule T in periferia e, in particolar modo, espandendo la popolazione dei linfociti T $\gamma\delta$. Inoltre è stato dimostrato un effetto dei BSP sui precursori degli OC a livello osseo.

Questo studio è stato disegnato per valutare il possibile effetto immunomodulatore dell'ALN somministrato in vivo ad un gruppo di pazienti affette da osteoporosi postmenopausale sulle sottopopolazioni di PBMC ed in particolare sui T $\gamma\delta$, sull'attivazione del sistema immune e sui precursori degli osteoclasti.

I nostri dati evidenziano che l'ALN agisce come immunomodulatore riducendo significativamente il numero di linfociti T $\gamma\delta$, ma aumentando, sebbene in misura non significativa il numero di cellule T, mentre non mostra un effetto significativo sul numero delle altre cellule.

Per chiarire ulteriormente la selettività dell'effetto del ALN sulle sottopopolazioni analizzate abbiamo condotto un'indagine sui precursori degli osteoclasti nel sangue periferico evidenziando come l'ALN sia in grado di ridurre l'output midollare di precursori degli osteoclasti.

L'osteoporosi è una patologia sistemica dello scheletro ad eziopatogenesi multifattoriale caratterizzata da una riduzione della densità minerale (BMD) e da un deterioramento microarchitetturale osseo con conseguente fragilità e suscettibilità alle fratture.

Numerosi fattori di rischio, modificabili e non (scarsa introduzione di calcio con la dieta, un basso body mass index (BMI), il fumo, la nulliparità, una scarsa attività fisica, una storia familiare di frattura e l'assunzione di alcool⁽⁸⁾, sono coinvolti nella perdita di massa ossea postmenopausale.

La causa prevalente dell'osteoporosi postmenopausale è la carenza estrogenica. Questa determina l'attivazione di nuove unità di rimodellamento osseo ed uno squilibrio tra neoformazione e riassorbimento osseo. Il rimodellamento osseo è attuato dall'unità multicellulare di base (BMU) formata da osteoblasti, osteociti, osteoclasti e matrice extracellulare.

L'inizio di questo processo è caratterizzato dal reclutamento di precursori osteoclastici che si fondono a formare osteoclasti attivi multinucleati. L'osteoblasto, in seguito, deposita matrice osteoide nell'area riassorbita dall'osteoclasto, questa viene successivamente mineralizzata per precipitazione di cristalli di idrossiapatite. Il deficit estrogenico aumenta il reclutamento degli osteoclasti e la loro attivazione causando un aumento del riassorbimento osseo soprattutto a livello dell'osso trabecolare⁽²⁵⁾.

Attualmente si ritiene che il ruolo protettivo esercitato dagli estrogeni sul tessuto osseo sia legato alla loro capacità di ridurre la formazione degli osteoclasti, aumentarne i fenomeni apoptotici e diminuirne la attività riassorbitiva⁽²⁵⁾ e che quindi la carenza estrogenica sia coinvolta nella regolazione dei processi di osteoclastogenesi, tuttavia rimangono ancora punti oscuri nell'esatto meccanismo d'azione di questi ormoni a livello osteoclastico. Appare molto interessante l'ipotesi secondo la quale gli estrogeni agiscano indirettamente sugli osteoclasti attraverso una regolazione del sistema immunitario ed, in particolare, dei linfociti T^(30,32,45,46).

Alcuni studi dimostrano come sia possibile identificare precursori degli osteoclasti nella frazione di cellule mononucleate circolanti nel sangue periferico (Peripheral Blood Mononuclear Cells PBMC)^(40,10) e come sia possibile ottenerne la differenziazione in osteoclasti maturi in vitro⁽¹⁰⁾ in particolare, è stato dimostrato come queste cellule derivino dalla frazione cellulare CD 14+, ovvero dalla popolazione monocitaria circolante^(40,10).

La differenziazione dei monociti precursori del midollo in osteoclasti maturi si ritiene sia sostenuta soprattutto da Macrophages Colony Stimulating Factor (M-CSF), che agisce principalmente aumentando le dimensioni del

pool di pre-osteoclasti presenti nel midollo osseo, e da Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) che rappresenta il principale fattore in grado di modulare il passaggio finale della cascata differenziativa che conduce alla formazione di osteoclasti maturi e funzionalmente attivi. Nel nostro lavoro abbiamo considerato le cellule che esprimono sulla superficie cellulare le molecole CD14 (marker monocitario), CD11b (integrina di superficie), VNR (recettore della vitronectina) come precursori degli osteoclasti, è stato infatti dimostrato che queste cellule sono in grado di dare origine ad osteoclasti mature ed attivi in coltura in misura maggiore rispetto ai monociti indifferenziati^(11,47,13).

Infine numerosi studi hanno attribuito alle interleuchine 1 (IL1), 6 (IL6) e TNF α il ruolo di citochine proosteoclastogenetiche tramite la modulazione dell'espressione di RANK, RANKL e OPG^(25,30).

La carenza estrogenica del periodo postmenopausale è responsabile della rapida perdita della densità ossea tramite la modulazione del sistema di citochine coinvolte nell'osteoclastogenesi (aumento dei livelli di IL1 e TNF α , RANKL e M-CSF, aumentando la sensibilità dei pre-osteoclasti a RANKL stesso e promuovendo, in sinergismo con RANKL, l'attivazione dei fattori trascrizionali pro-osteoclastogenici NF- κ B e c-JUN^(3,48).

Un recente studio del nostro gruppo di ricerca⁽⁹⁾ ha dimostrato come sia possibile ottenere osteoclasti in colture di PBMC in misura significativamente maggiore nelle pazienti osteoporotiche rispetto ai controlli sani in postmenopausa e come tale osteoclastogenesi spontanea dipenda dall'aumentata produzione in coltura di citochine proosteoclastogeniche come RANKL e TNF, maggiore nelle colture delle pazienti rispetto a quelle dei controlli.

Linfociti T $\gamma\delta$

I linfociti T $\gamma\delta$ circolanti costituiscono circa l'1-5% delle cellule T del sangue periferico; il 70% di questi linfociti esprime il medesimo TCR V γ 9-V δ 2 ed esprimono il CD3 ma né il CD4 né il CD8. Questo TCR rende queste cellule capaci di riconoscere famiglie di composti non peptidici non processati purché di basso peso molecolare (100-600 Da) e con un pattern conservato; questi composti includono metaboliti microbici come ad esempio pirofosfomonoesteri (come l'IPP, isopentenile pirofosfato) e alchilamine. Questi composti sono in grado di attivare i linfociti T $\gamma\delta$ e di indurne la proliferazione e la produzione di citochine tra cui l'IFN- γ e il TNF- α .

Terapia con aminobisfosfonati e “flu-like syndrome”

Uno degli effetti collaterali degli aminobisfosfonati, i farmaci attualmente più utilizzati nel trattamento dell'osteoporosi postmenopausale tra cui vi è l'alendronato, è l'induzione di una risposta di fase acuta che clinicamente si manifesta nella “flu-like syndrome”.

Il meccanismo alla base di queste manifestazioni pare essere associato con la liberazione di citochine in particolare TNF- α e IL-6.

È stato suggerito che potrebbero essere i linfociti T $\gamma\delta$ le cellule che, stimulate dai composti derivati dal blocco enzimatico indotto dagli aminobisfosfonati, liberano tali citochine⁽¹⁶⁾.

In particolare studi in vitro hanno dimostrato come gli aminobisfosfonati aggiunti a colture di PBMC siano in grado di attivare esclusivamente la sottopopolazione di linfociti T $\gamma\delta$ che esprimono la catena V γ 9 del TCR^(16,19,14).

Queste cellule V γ 9⁺ risultano la fonte sia del TNF α che dell'IL-6 prodotte in risposta all'aggiunta al medium di aminobisfosfonati⁽¹⁶⁾.

È possibile che i monociti/macrofagi siano attivati in un secondo tempo da queste stesse citochine.

Alcuni recenti reports^(34,19,14) hanno dimostrato che gli aminobisfosfonati sono in grado di attivare i linfociti T $\gamma\delta$ in vitro o direttamente in vivo⁽²²⁾.

Questi dati evidenziano come gli aminobisfosfonati siano in grado di stimolare la sintesi citochinica in vitro da parte dei linfociti T $\gamma\delta$ e, se somministrati per via endovenosa, di attivare i linfociti T $\gamma\delta$ in vivo e di incrementare la loro produzione citochinica inducendo una reazione di fase acuta che clinicamente si manifesta nella flu-like syndrome.

Visti i dati presenti in letteratura ci è sembrato interessante valutare se gli aminobisfosfonati, in particolare l'alendronato (ALN), sia in grado di incrementare il numero o attivare i linfociti T $\gamma\delta$ circolanti quando somministrato per os a dosaggi clinicamente rilevanti (70 mg alla settimana).

OBIETTIVI

- a) Valutare l'effetto dell'Alendronato (ALN) somministrato in vivo a pazienti sui linfociti T $\gamma\delta$ circolanti nel sangue periferico. In particolare è stato valutato se la singola somministrazione di 70 mg di ALN fosse in grado, nel corso di 3-6 mesi, di modificare il numero e/o l'attivazione di linfociti T $\gamma\delta$ nel sangue periferico di pazienti affette da osteoporosi postmenopausale. È stato inoltre valutato l'eventuale effetto dell'ALN sui linfociti B e sui monociti.

- b) Valutare l'eventuale effetto dell'ALN come molecola immunomodulante sul numero e attività di cellule fondamentali del sistema immunitario (linfociti T e B).
- c) Valutare l'effetto dell'ALN sui precursori degli osteoclasti circolanti nel sangue periferico.

Pazienti

Nello studio sono state incluse 17 pazienti affette da osteoporosi postmenopausale.

Le pazienti dovevano avere un T-score di densità minerale ossea (BMD) uguale o inferiore a -2.5 S.D, in accordo con i criteri dettati dalla OMS con o senza fratture. La BMD è stata misurata a livello lombare o del collo femorale con tecnica DXA (Double emission X-ray Absorptiometry).

Le pazienti dovevano essere in menopausa spontanea da almeno un anno, possedere un BMI compreso tra 20 e 26 e non aver assunto da almeno 1 anno farmaci in grado di alterare il metabolismo osseo calcio e vitamina D, ormoni tiroidei, corticosteroidi, estrogeni, bisfosfonati, paratormone, fluoruro, stronzio ranelato e raloxifene.

Le pazienti che rientravano in questi criteri sono state invitate al Centro per un primo incontro durante il quale, previo consenso scritto, si è proceduto, al fine di escludere la presenza di forme di osteoporosi secondaria, alla raccolta di un'anamnesi più dettagliata, ad un esame obiettivo ed ad un prelievo di sangue venoso per la valutazione di: emocromo con formula, QPE, calcemia, fosforemia, PTH, fosfatasi alcalina isoforma ossea (BAP) e 25 OH-vitD.

Se gli esami eseguiti risultavano nella norma, i soggetti venivano richiamati ad un secondo incontro e sottoposte ad un prelievo di sangue in litio eparina (LH) al fine di ottenere le PBMC.

In occasione di questa visita 13 pazienti hanno iniziato la terapia con colecalciferolo 400 UI/die + calcio carbonato 400 mg/die per tre mesi poi hanno assunto ALN 70 mg alla settimana + colecalciferolo 400 UI/die + calcio carbonato 400 mg/die per i successivi 3 mesi per evidenziare eventuali variazioni della popolazione gamma delta in corso di terapia con ALN; mentre 4 pazienti hanno assunto ALN 70 mg/sett per tre mesi e ALN 70 mg alla settimana + colecalciferolo 400 UI/die + calcio carbonato 400 mg/die per i successivi 3 mesi sia per evidenziare l'effetto del solo ALN sui linfociti T $\gamma\delta$ che per valutare l'effetto della terapia a lungo termine.

La terapia dai 3 ai 6 mesi per tutte le pazienti consisteva in: ALN 70 mg più colecalciferolo 2800 UI e 1000 mg di calcio carbonato al dì.

Separazione dei PBMC dal sangue periferico

I PBMC sono stati ottenuti da 40 ml di sangue intero prelevato in LH con metodo di centrifugazione in gradiente di densità attraverso l'utilizzo del Ficoll-Pacque⁽⁴⁰⁾.

I PBMC ottenuti da questa prima centrifugazione vengono raccolti e lavati in soluzione fisiologica. per l'analisi al FACS servono 8.000.000; le restanti cellule vengono congelate in siero (50.000.000/ml) addizionato al 10% di DMSO (dimetilsolfossido) e conservate in azoto liquido.

Linfociti T $\gamma\delta$

I linfociti T $\gamma\delta$ circolanti a livello periferico sono stati individuati con tecnica citofluorimetrica, su sangue intero, utilizzando un citofluorimetro FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA) eseguendo una citofluorimetria a tre colori con i seguenti anticorpi coniugati: biotin anti-human $\gamma\delta$ TCR, anticorpo monoclonale antiCD3 (CD3FITC fluorescina isotiocianato) o con i rispettivi isotipi.

L'anticorpo diretto contro il CD3 riconosce specificamente la catena epsilon del complesso antigene CD3/recettore per l'antigene del linfocita T (TCR).

Per identificare i linfociti T $\gamma\delta$ nell'ambito della popolazione cellulare CD3+ si utilizza il secondo anticorpo streptavidina RPE.

La doppia positività (CD3 e TCR $\gamma\delta$) permette di identificare i linfociti T $\gamma\delta$; mentre la sola positività al recettore CD3 consente di differenziare i linfociti T nell'ambito dei PBMC circolanti.

I dati sono stati espressi come percentuale della popolazione linfocitaria ed anche come intensità di fluorescenza. L'intensità di fluorescenza media (MIF), misurata come area sotto la curva, rappresenta il numero di CD espressi sulla superficie cellulare.

Analisi delle sottopopolazioni di PBMC

Poiché abbiamo osservato una significativa riduzione dei linfociti T $\gamma\delta$ dopo soli tre mesi di terapia con l'ALN, abbiamo voluto valutare l'eventuale effetto mielosoppressivo del farmaco ovvero l'eventuale capacità di ridurre quantitativamente tutte le cellule circolanti che nel loro complesso costituiscono i PBMC (linfociti T CD3+, linfociti B CD19+ e monociti CD14+).

Per fare questo abbiamo analizzato il comportamento dal punto di vista numerico di questi i vari tipi cellulari. Inoltre per valutare l'eventuale effetto immunomodulante dell'ALN⁽³⁵⁾ abbiamo analizzato l'espressione sulla superficie cellulare di RANK marker di attivazione cellulare su tutte

le sottopopolazioni di PBMC prima e dopo terapia utilizzando l'anticorpo RANK PE, mentre per discriminare, nell'ambito dei PBMC, i linfociti T, i linfociti B e i monociti abbiamo utilizzato rispettivamente i seguenti anticorpi: CD3 PerCP, CD19 FITC (fluorescina isotiocianato) e CD14 APC (alloflicocianina).

Analisi dei precursori degli osteoclasti

Per valutare se l'effetto osservato sui PBMC fosse specifico verso la popolazione che differenzia in osteoclasti in coltura (effetto antiosteoclastogenico) abbiamo valutato il numero di precursori di osteoclasti in circolo nel sangue periferico prima e dopo terapia.

I precursori osteoclastici circolanti a livello periferico sono stati individuati con tecnica citofluorimetrica eseguendo una citofluorimetria, su sangue intero, a tre colori con i seguenti anticorpi coniugati: VNR-FITC, CD14-PE (ficoeritrina), CD11b-APC ed i corrispondenti controlli isotipici. Il CD14 è un marker specifico che identifica i monociti, il CD11b identifica, oltre ai precursori degli osteoclasti, anche i granulociti e i precursori dei macrofagi, mentre il VNR corrisponde al recettore della vitronectina.

Come detto le cellule triple positive sono considerate precursori osteoclastici altamente differenziato⁽³⁹⁾. I dati sono stati espressi come percentuale ed anche come intensità di fluorescenza.

RISULTATI

Linfociti T $\gamma\delta$

Dopo 3 mesi di terapia con calcio e vitamina D non si verificano variazioni dei linfociti T $\gamma\delta$ e della MIF, mentre dopo 3 mesi dall'inizio della terapia con ALN il numero di linfociti T $\gamma\delta$ circolanti nel sangue periferico si riduce, ma si verifica un incremento dell'espressione del TCR sulla membrana delle cellule, al contrario non ci sono differenze nella percentuale di linfociti T e nell'espressione del TCR nelle pazienti.

Sottopopolazioni di PBMC

Alla luce di questo risultato abbiamo voluto valutare la possibilità che quanto osservato potesse derivare da un generico effetto mielosoppressivo dell'ALN.

Non abbiamo osservato alcuna variazione significativa nelle sottopopolazioni di PBMC dopo terapia con calcio+vitamina D e/o con ALN sia dopo 3 che

dopo 6 mesi, tuttavia il numero di linfociti T tende ad aumentare dopo 3 mesi di terapia con ALN come precedentemente riportato in letteratura sebbene in misura non statisticamente significativa.

La selettiva riduzione del numero di linfociti T $\gamma\delta$ a fronte di un mancato effetto su linfociti B e monociti e ad un aumento medio dei linfociti T totali potrebbe essere dovuto ad un effetto immunomodulante dell'ALN.

Effetto immunomodulante

Per indagare ulteriormente questa ipotesi sull'effetto immunomodulante dell'ALN, abbiamo analizzato l'espressione di RANK sulla superficie cellulare quale parametro di attivazione.

Analizzando il livello di espressione di RANK sui linfociti T, B e monociti al tempo zero e dopo tre mesi di terapia si nota un aumento della sua espressione statisticamente significativa solo per quanto riguarda i linfociti T. Tuttavia dopo ulteriori 3 mesi di terapia gli indici di attivazione linfo-monocitaria tendono a ritornare nei limiti di norma, in accordo con i dati che suggeriscono che la reazione proinfiammatoria dei BSP avvenga nelle prime fasi di terapia e poi scompaia^(29,33,12,1,17,4).

Precursori degli osteoclasti

Per valutare un effetto specifico dell'ALN sui precursori degli osteoclasti abbiamo analizzato il loro numero prima e dopo terapia con calcio+vitamina D e/o ALN.

Abbiamo osservato una riduzione dei precursori dopo 3 e poi 6 mesi di terapia con ALN, in particolare si raggiunge una riduzione del numero di cellule triple positive di circa il 53% dopo soli 6 mesi di terapia che raggiunge il 70% a sei mesi di terapia, sebbene la riduzione non raggiunga la significatività statistica, forse per la ridotta numerosità campionaria. A conferma di questa interpretazione non si osservava una riduzione dopo la sola terapia con calcio e vitamina D.

DISCUSSIONE

Gli aminobisfosfonati come l'alendroanto agiscono come analoghi di fosfolipidi isoprenoidi e inibiscono l'enzima farnesil pirofosfato sintasi, un enzima della via del mevalonato⁽³³⁾.

L'inibizione di questa via metabolica impedisce la sintesi di lipidi isoprenoidi essenziali per la farnesilazione e la geranilazione di piccole proteine implicate nella traduzione del segnale ad attività GTPasica. A seguito

del fenomeno apoptotico viene inibito il riassorbimento osseo mediato dagli osteoclasti⁽¹²⁾.

Il loro effetto sui precursori degli osteoclasti e sulla produzione citochinica rimane comunque incerto^(2,41); alcuni studi indicano che l'effetto pro-infiammatorio degli aminobisfosfonati incrementi la produzione di citochine pro-osteoclastogeniche come l'IL-6 e il TNF α ^(16,37).

Altri studi non hanno evidenziato alcun effetto sui precursori osteoclastici o, al limite, una semplice riduzione a lungo termine dei livelli di citochine^(28,31,36,15).

Inoltre è stato suggerito che gli aminobisfosfonati sono in grado di agire sui linfociti T aumentando il numero di cellule T in periferia e, in particolar modo, espandendo la popolazione dei linfociti T $\gamma\delta$. Tuttavia i dati sul possibile effetto immunomodulatore dei BSP sono piuttosto controversi.

Inoltre è stato dimostrato un effetto dei BSP sui precursori degli OC a livello osseo⁽⁶⁾.

È stato descritto che osteoclasti maturi e attivi possono differenziare da colture di PBMC⁽⁹⁾ e che la loro attività riassorbitiva è nettamente maggiore nelle pazienti affette da osteoporosi postmenopausale in confronto con controlli sani e che l'aumentata formazione osteoclastica è largamente dipendente dalla maggiore capacità dei PBMC estratti dal sangue dei pazienti di produrre citochine pro-osteoclastogeniche (in particolare TNF α e RANKL) in confronto con i controlli sani⁽³⁶⁾.

Questo studio è stato disegnato per valutare il possibile effetto immunomodulatore dell'ALN sulle sottopopolazioni di PBMC ed in particolare sui T $\gamma\delta$, sull'attivazione del sistema immune, valutata misurando l'espressione di RANK che è un marker di attivazione cellulare, e sui precursori degli osteoclasti.

Infatti non ci sono ancora spiegazioni inequivocabili sull'effetto dei BSP sui precursori degli osteoclasti circolanti nel sangue periferico e nemmeno sul loro eventuale effetto immunomodulante^(41,42). Gli effetti in vivo della terapia con bisfosfonati sulla formazione di osteoclasti in colture di PBMC e sulla produzione di citochine non sono ancora chiari^(15,18). Non esistono ancora spiegazioni esaustive sugli effetti dell'ALN sulla presenza di preosteoclasti circolanti e sulla produzione citochinica sebbene ci siano in letteratura dati sull'induzione dell'apoptosi degli osteoclasti in vitro ed in vivo da parte dei bisfosfonati e sugli effetti nei confronti dei precursori^(43,38).

La novità di questo studio consiste nella valutazione in vitro dell'effetto in vivo tramite metodiche relativamente semplici che potrebbero essere applicate nella pratica clinica per valutare la risposta al trattamento nonché la compliance allo stesso.

I nostri dati evidenziano che l'ALN agisce come immunomodulatore riducendo significativamente il numero di linfociti T $\gamma\delta$, ma aumentando, sebbene in misura non significativa il numero di cellule T, mentre non mostra un effetto significativo sul numero delle altre cellule. Per interpretare questo dato alla luce dei reports presenti in letteratura che suggeriscono un effetto stimolante degli amino BSP sulla popolazione T $\gamma\delta$ è importante considerare che gli studi presenti sono stati ottenuti o valutando l'effetto degli amino BSP più potenti come lo zoledronato o l'ibandronato oppure aggiungendo il BSP direttamente in vitro. Questo potrebbe portare a dei bias nella interpretazione dell'effettivo ruolo della terapia con BSP per via orale come comunemente adottata nell'osteoporosi postmenopausale. Inoltre i nostri dati sono confortati dall'analisi del comportamento dei T $\gamma\delta$ in condizioni basali e dopo tre mesi di terapia con calcio e vitamina D e cioè con una terapia che non influisce sulla produzione midollare di linfo-monociti.

Questo effetto dell'ALN sembra presente solo durante le prime fasi della terapia; infatti dopo ulteriori 3 mesi di terapia il livello dei $\gamma\delta$ ritorna al livello basale.

Altri dati ottenuti dallo studio suggerisco che l'effetto dell'ALN sia particolarmente selettivo nei confronti dei linfociti T, infatti non abbiamo osservato variazioni nelle altre sottopopolazioni di PBMC dopo terapia. D'altra parte i nostri dati, sebbene preliminari, sembrerebbero confermare la tesi di un effetto immunoregolatore dell'ALN, vista la variazione dell'attivazione sia dei linfociti T, che dei linfociti B e dei monociti dopo soli 3 mesi di terapia. Questo possibile effetto attivante sul sistema immunitario renderebbe ragione della variazione dei livelli di citochine proinfiammatorie suggerito in studi precedenti^(16,37,28,31,36,15,38), inoltre potrebbe spiegare l'effetto antifratturativo del farmaco che va al di là del recupero della massa ossea, nel senso di una miglior omeostasi delle cellule ossee.

È infatti stato suggerito durante gli ultimi anni che il sistema immunitario influisca pesantemente nella regolazione del metabolismo calcio-fosforico soprattutto dopo la menopausa. Numerosi studi sia su modello animale^(24,44,23), che sull'uomo^(5,20) hanno suggerito un ruolo importante della risposta T e B cellulare dopo esposizione all'antigene nel regolare il metabolismo osseo. Per confermare ulteriormente questo dato abbiamo in corso esperimenti di dosaggio citochinico sia a livello sierico che in coltura e di paragone tra ALN ed altri farmaci antirassorbitivi come il raloxifene per cui non è stato descritto un effetto immunomodulante.

Il possibile effetto immunomodulante dei BSP potrebbe spiegare la loro efficacia antitumorale in vari modelli sperimentali⁽²⁶⁾.

Per chiarire ulteriormente la selettività dell'effetto del ALN sulle sottopopolazioni analizzate abbiamo condotto un'indagine sui precursori degli osteoclasti nel sangue periferico.

Questa analisi ha confermato come anche l'ALN, come già suggerito per il risedronato⁽⁷⁾ sia in grado di ridurre l'output midollare di precursori degli osteoclasti.

Nel gruppo di pazienti che ha assunto per i primi tre mesi calcio e vitamina D richiamati a distanza di tre mesi, non abbiamo riscontrato differenze significative nel numero dei precursori circolanti; abbiamo così escluso la possibile variabilità spontanea di questi parametri.

In conclusione quindi questi dati preliminari suggeriscono che l'ALN avrebbe un effetto immunomodulante, riducendo il numero dei linfociti T $\gamma\delta$ e dei precursori degli osteoclasti circolanti nel sangue periferico nonché un effetto attivante sui linfociti T.

BIBLIOGRAFIA

1. Benford HL, McGowan NW, Helfrich MH, Nuttall ME, Rogers MJ: *Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts in vitro*. Bone. 2001; 28: 465-473.
2. Boonekamp PM, van der Wee-Pals LJ, van Wijk-van Lennep MM, Thesing CW, Bijvoet OL: *Two modes of action of bisphosphonates on osteoclastic resorption of mineralized matrix*. Bone Miner. 1986; 1: 27-39.
3. Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novack D, Woodring J, Pacifici R: *Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha*. J. Clin. Invest. 2000; 106: 1229-1237.
4. Colucci S, Minielli V, Zamboni G, Cirulli N, Mori G, Serra M, Patella V, Zamboni Zallone A, Grano M: *Alendronate reduces adhesion of human osteoclast-like cells to bone and bone protein-coated surfaces*. Calcif. Tissue Int. 1998; 63: 230-235.
5. Colucci S, Brunetti G, Cantatore FP, Oranger A, Mori G, Quarta L, Cirulli N, Mancini L, Corrado A, Grassi FR, Grano M: *Lymphocytes and synovial fluid fibroblasts support osteoclastogenesis through RANKL, TNFalpha, and IL-7 in an in vitro model derived from human psoriatic arthritis*. J. Pathol. 2007; 212: 47-55.
6. D'Amelio P, Grimaldi A, Bernabei P, Pescarmona GP, Isaia G: *Immune system and bone metabolism: does thymectomy influence postmenopausal bone loss in humans?* Bone. 2006; 39: 658-665.
7. D'Amelio P, Grimaldi A, Tamone C, Di Bella S, Pescarmona GP, Isaia GC: *Risedronate inhibits spontaneous osteoclastogenesis from peripheral blood mononuclear cells in post menopausal osteoporosis*. Abstract ASBMR 2005.
8. D'Amelio P, Tamone C, Pluviano F, Di Stefano M, Isaia GC: *Effects of lifestyle and risk factors on bone mineral density in a cohort of italian women: suggestion for a new decision rule*. Calcific. Tissue Int. 2005; 77: 72-78.
9. D'Amelio P, Grimaldi A, Pescarmona GP, Tamone C, Roato I, Isaia GC: *Spontaneous osteoclast formation from peripheral blood mononuclear cells in postmenopausal osteoporosis*. FASEB J. 2005; 19: 410-420.
10. Faust J, Lacey DL, Hunt P, Burgess TL, Scully S, Van G, Eli A, Qian Y, Shalhoub V: *Osteoclast markers accumulate on cells developing from human peripheral blood mononuclear precursors*. J. Cell Biochem. 1999; 72: 67-80.
11. Felix R, Cecchini MG, Fleish H: *Macrophage colony stimulating factor restores in vivo bone resorption in the op/op osteopetrotic mouse*. Endocrinology. 1990; 127: 2592-2604.
12. Fisher JE, Rogers MJ, Halasy JM, Luckman SP, Hughes DE, Masarachia PJ, Wesolowski G, Russell RG, Rodan GA, Reszka AA: *Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999; 96: 133-138.
13. Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ: *TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts*. J. Exp. Med. 1998; 188: 997-1001.
14. Green AE, Lissina A, Hutchinson SL, Hewitt RE, Temple B, James D, Boulter JM, Price DA, Sewell AK: *Recognition of nonpeptide antigen by human V gamma 9V delta 2 T cells requires contact with cells of human origin*. Clin Exp Immunol. 2004; 136: 472-482.

15. Gur A, Denli A, Cevik R, Nas K, Karakoc M, Sarac AJ: *The effects of alendronate and calcitonin on cytokines in postmenopausal osteoporosis: a 6-month randomized and controlled study.* Yonsei Med. J. 2003; 44: 99-109.
16. Hewitt RE, Lissina A, Green AE, Slay ES, Price DA, Sewell AK: *The bisphosphonate acute phase response: rapid and copious production of proinflammatory cytokines by peripheral blood gd T cells in response to aminobisphosphonates is inhibited by statins.* Clin. Exp. Immunol. 2005; 139: 101-111.
17. Hughes DE, Wright KR, Uy HL, Sasaki A, Yoneda T, Roodman GD, Mundy GR, Boyce BF: *Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo.* J. Bone Miner. Res. 1995; 10: 1478-1487.
18. Hughes DE, McDonald BR, Russel RGG, Gowen M: *Inhibition of osteoclast-like cell formation by bisphosphonates in long-term cultures of human bone marrow.* J. Clin. Invest. 1989; 83: 1930-1950.
19. Kato Y, Tanaka H, Yamashita S, Minato N: *Requirement of species-specific interactions for the activation of human gammadelta T cells by pamidronate.* J. Immunol. 2003; 170: 3608-3613.
20. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, Karimbux NY, Goncalves RB, Valverde P, Dibart S, Li YP, Miranda LA, Ernst CW, Izumi Y, Taubman MA: *B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease.* Am. J. Pathol. 2006; 169: 987-998.
21. Kimble RB, Bain S, Pacifici R: *The functional block of TNF but not of IL-6 prevents bone loss in ovariectomized mice.* J. Bone Miner. Res. 1997; 12: 935-941.
22. Kunzmann V, Bauer E, Wilhelm M: *Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate.* N. Engl. J. Med. 1999; 340: 737-780.
23. Li Y, Toraldo G, Li A, Yang X, Zhang H, Qian WP, Weitzmann MN: *B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo.* Blood. 2007; 109: 3839-3848.
24. Manabe N, Kawaguchi H, Chikuda H, Miyaura C, Inada M, Nagai R, Nabeshima Y, Nakamura K, Sinclair AM, Scheuermann RH, Kuro-o M: *Connection between B lymphocyte and osteoclast differentiation pathways.* J. Immunol. 2001; 167: 2625-2631.
25. Manolagas SC, Jilka RL: *Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis.* N. Engl. J. Med. 1995; 332: 305-311.
26. Mariani S, Muraro M, Pantaleoni F, Fiore F, Nuschak B, Peola S, Foglietta M, Palumbo A, Coscia M, Castella B, Bruno B, Bertieri R, Boano L, Boccadoro M, Massaia M: *Effector gammadelta T cells and tumor cells as immune targets of zoledronic acid in multiple myeloma.* Leukemia. 2005; 19: 664-670.
27. Massey HM, Flanagan AM: *Human osteoclasts derive from CD14-positive monocytes.* Br. J. Haem. 1999; 106: 167-170.
28. Mossetti G, Rendina D, De Filippo G, Viceconti R, Di Domenico G, Cioffi M, Postiglione L, Nunziata V: *Interleukin-6 and osteoprotegerin systems in Paget's disease of bone: relationship to risedronate treatment.* Bone. 2005; 36: 549-554.
29. Nguyen ND, Eisman JA, Nguyen TV: *Anti-hip fracture efficacy of bisphosphonates: a Bayesian analysis of clinical trials.* J. Bone Miner. Res. 2006; 21: 340-349.

30. Pacifici R: *Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis*. J. Bone Miner. Res. 1996; 11: 1043-1051.
31. Papadaki HA, Tsatsanis C, Christoforidou A, Malliaraki N, Psyllaki M, Pontikoglou C, Miliaki M, Margioris AN, Eliopoulos GD: *Alendronate reduces serum TNFalpha and IL-1beta, increases neutrophil counts, and improves bone mineral density and bone metabolism indices in patients with chronic idiopathic neutropenia (CIN)-associated osteopenia/osteoporosis*. J. Bone Miner. Metab. 2004; 22: 577-587.
32. Robbie-Ryan M, Pacifici R, Weitzmann MN: *IL-7 drives T cell-mediated bone loss following ovariectomy*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2006; 1068: 348-351.
33. Rogers MJ: *New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates*. Curr. Pharm. Des. 2003; 9: 2643-2658.
34. Romanello M, Bivi N, Pines A, Deganuto M, Quadrifoglio F, Moro L, Tell G: *Bisphosphonates activate nucleotide receptors signaling and induce the expression of Hsp90 in osteoblast-like cell lines*. Bone. 2006; 39: 739-753.
35. Romas E, Gillespie MT, and Martin TJ: *Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis*. Bone. 2002; 30: 340-346.
36. Santini D, Fratto ME, Vincenzi B, La Cesa A, Dianzani C, Tonini G: *Bisphosphonate effects in cancer and inflammatory diseases: in vitro and in vivo modulation of cytokine activities*. BioDrugs. 2004; 18: 269-278.
37. Sauty A, Pecherstorfer M, Zimmer-Roth I, Fioroni P, Juillerat L, Markert M, Ludwig H, Leuenberger P, Burckhardt P, Thiebaud D: *Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels after bisphosphonates treatment in vitro and in patients with malignancy*. Bone. 1996; 18: 133-139.
38. Schweitzer DH, Oostendorp-van de Ruit M, Van der Pluijm G, Lowik CW, Papapoulos SE: *Interleukin-6 and the acute phase response during treatment of patients with Paget's disease with the nitrogen-containing bisphosphonate dimethylaminohydroxypropylidene bisphosphonate*. J. Bone Miner. Res. 1995; 10: 956-962.
39. Shalhoub V, Elliott G, Chiu L, Manoukian R, Kelley M, Hawkins N, Davy E, Shimamoto G, Beck J, Kaufman SA, Van G, Scully S, Qi M, Grisanti M, Dunstan C, Boyle WJ, and Lacey DL: *Characterization of osteoclast precursors in human blood*. Br. J. Haematol. 2000; 111: 501-512.
40. Shih C, Bernard GW: *Peripheral blood mononuclear cells develop into multinucleated osteoclasts in tissue culture*. Anat. Rec. 1996; 245: 41-45.
41. Van Beek ER, Lowik CW, Papapoulos SE: *Bisphosphonates suppress bone resorption by a direct effect on early osteoclast precursors without affecting the osteoclastogenic capacity of osteogenic cells: the role of protein geranylgeranylation in the action of nitrogen-containing bisphosphonates on osteoclast precursors*. Bone. 2002; 30: 64-70.
42. Van Beek ER, Lowik CW, Papapoulos SE: *Effect of alendronate treatment on the osteoclastogenic potential of bone marrow cells in mice*. Bone. 1997; 20: 335-340.
43. Wang XM, Yu SF, Yang ZP: *Apoptosis of osteoclast-like cells induced by alendronate is related to Fas gene expression*. Chin. J. Dent. Res. 2000; 3: 26-32.
44. Weitzmann MN, Cenci S, Haug J, Brown C, DiPersio J, Pacifici R: *B lymphocytes inhibit human osteoclastogenesis by secretion of TGFbeta*. J Cell Biochem. 2000; 78: 318-324.

45. Weitzmann MN, Pacifici R: *Estrogen regulation of immune cell bone interactions*. Ann N Y Acad Sci. 2006; 1068: 256-74.
46. Weitzmann MN, Pacifici R: *Role of the immune system in postmenopausal bone loss*. Curr Osteoporos Rep. 2005; 3: 92-97.
47. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano , Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T: *Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL*. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95: 3597-3602.
48. Zhang YH, Heulsmann A, Tondravi MM, Mukherjee A, Abu-Amer Y: *Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways*. J Biol Chem. 2001; 276: 563-568.

*Tesi di Laurea vincitrice del
PREMIO FONDAZIONE FERRERO ONLUS
in memoria del Prof. Giampiero GAIDANO
Anno Accademico 2008/2009*

Candidato: Simone RIBERO

Relatore: Prof.ssa Maria Grazia BERNENGO

Titolo: **Parametri clinico-patologici del linfonodo sentinella
in pazienti affetti da melanoma cutaneo:
valore predittivo sul coinvolgimento dei linfonodi
non sentinella a decorso clinico**

Tesi di Laurea vincitrici del
PREMIO IN MEMORIA DEL DOTT. ITALO ARNEODO
Anno Accademico 2008/2009

Candidato: Cecilia BRACCO

Relatore: Prof. Paolo M. COMOGLIO

Titolo: **Inibizione farmacologica della tirosina-cinasi Src
nella tumorigenesi sostenuta dall'oncogene MET:
uno studio preclinico in *vitro* e in *vivo***

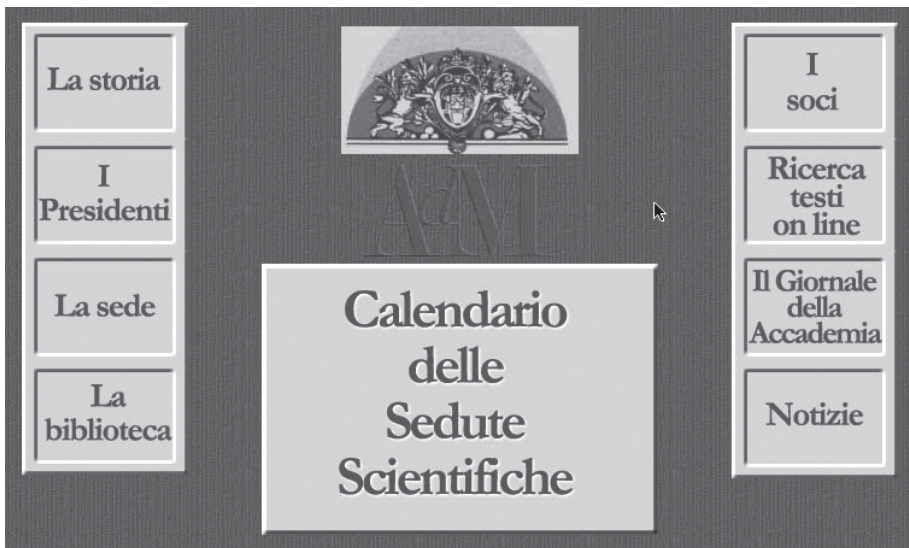
Candidato: Celeste CAGNAZZO

Relatore: Prof. Alberto REVELLI

Titolo: **Valutazione della qualità degli ovociti e degli embrioni
umani mediante microscopia a luce polarizzata**

SITO WEB
dell'Accademia di Medicina di Torino

www.accademiadimedicina.unito.it



*Norme redazionali per la pubblicazione sul
“Giornale dell’Accademia di Medicina di Torino”*

(in vigore dal 2008)

- a) Il Giornale dell’Accademia di Medicina di Torino pubblica lavori relativi ad argomenti trattati durante le sedute scientifiche, editoriali su invito e, a giudizio del Comitato di Redazione, anche articoli scientifici liberamente inviati da Soci e da non Soci. Se relativi ad argomento trattato durante una seduta scientifica, questi devono essere consegnati al Segretario Generale in occasione della medesima. I lavori, in italiano o in inglese, devono essere trasmessi al Segretario Generale su supporto elettronico in file Word, contenuti in una lunghezza massima di 25.000 battute (spazi inclusi) e corredati da un massimo di 10 tabelle o figure (in bianco e nero). Testi più estesi devono essere autorizzati dal Segretario Generale. Le figure e le tabelle, numerate progressivamente e separatamente con numeri arabi, devono essere richiamate nel testo. Le rispettive didascalie devono essere riportate separatamente su una pagina a parte ed al termine del lavoro.

- b) Nella prima pagina di ogni lavoro devono essere indicati i Nomi (per esteso) ed i Cognomi degli Autori, le relative affiliazioni, l’indirizzo postale e mail dell’Autore principale, 1-5 parole chiave in italiano ed in inglese, un riassunto in italiano ed in inglese, ciascuno di lunghezza non superiore a 2200 caratteri (spazi inclusi).

- c) Nella bibliografia le singole voci devono essere indicate in ordine alfabetico, numerate progressivamente e devono essere redatte secondo le seguenti modalità:
 - 1) Citazione di un articolo: Cognome e Iniziale del nome di tutti gli Autori, due punti, Titolo dell’articolo, punto, abbreviazione del Titolo della rivista, anno, punto e virgola, volume, due punti, prima ed ultima pagina.

Esempio:

Williard WC, Hajdu SI, Casper ES, Brennan MF: *Comparison of amputation with limb-sparing operations from Adult soft tissue sarcoma of the extremity*. Ann. Surg. 1992; 215: 269-275.

- 2) Citazione di un intero volume: Cognome e Iniziale del nome di tutti gli Autori, due punti, Titolo del volume, punto, Casa Editrice, anno, Luogo della stampa.

Esempio:

Bianchi P, Verdi S: *Le malattie del metabolismo Minerale. Guida pratica alla gestione operativa*. Ed. Centro Scientifico Editore, 2000, Torino.

- 3) Citazione di un capitolo di un libro: Cognome e Iniziale del nome di tutti gli Autori, due punti, Titolo del capitolo, punto, “Titolo del volume”, anno, due punti, pagina iniziale e finale, Casa Editrice, Luogo della stampa.

Esempio:

Bianchi P, Verdi S, Rossi GC: *Psychological and Psychopatological aspects of Anorexia in the elderly patients*. In “Sedentary life and Nutrition”, 1990: 81-88, Raven Press Ed, New York.

Nel testo i riferimenti bibliografici devono essere numerici e riportati in parentesi tonde: se più di uno, devono essere separati da una virgola.

- d) L'Autore deve specificare se desidera gli estratti ed in quale numero. Il relativo costo è a carico del richiedente.

INDICE DEGLI AUTORI

Aimonino Ricauda Nicoletta	64	Malucchi Simona	119
Aspesi Anna	107	Marinello Renata	64
Bajardi Sante	142	Mattio Roberto	163
Bertolotto Antonio	119	Napoli Nicola	149
Bruno Graziella	203	Panero Francesco	203
Carrara Giovanna	76	Parrinello Gaspare	53
Cavallo Perin Paolo	203	Porpiglia Francesco	87
Civitelli Roberto	149	Ragona Riccardo	134
D'Amelio Patrizia	233	Ramenghi Ugo	107
de Sanctis Carlo	39	Ravazzoli Marco	233
Dianzani Chiara	194	Resegotti Luigi	142
Dianzani Irma	107	Ricardi Umberto	134
Fantozzi Roberto	194	Riccardino Nicola	33
Farnetti Alessandra	163	Ricci Maria Teresa	220
Filippi Andrea Riccardo	134	Rocco Maurizio	64
Fiori Cristian	87	Ronco Annamaria	163
Garibaldi Angelo	179	Santoro Luigi	163
Gilli Francesca	119	Scarpa Roberto M.	87
Guariniello Raffaele	39	Spadaro Davide	179
Isaia Gianluca	64	Tibaldi Vittoria	64
Isaia Giovanni Carlo	64, 233	Torres Daniele	53
Jünemann Carola	76	Valentini Maria Consuelo	76
Licata Giuseppe	53		

FONDAZIONE  CRT

Autorizzazione del Tribunale di Torino n. 477
Finito di stampare nel mese di novembre 2010

Stampato da: Tipografia Bodrato s.n.c.
Via Vanchiglia 31 - 10124 Torino - Tel. 011.817.71.44