

FONDAZIONE  CRT

Anno CLXXIII

2010

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

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 2010 27

PARTE III

Contributi

Alberto Angeli

**Relazione del Presidente alla seduta inaugurale
dell'Accademia Anno 2010/2011** 33

<i>Francesco Di Carlo</i> Commemorazione del socio Enrico Genazzani	41
<i>Giovanni Carlo Isaia</i> Commemorazione del socio Valerio Gai	50
<i>Elsa Margaria</i> Commemorazione del socio Roberto Pattono	55
<i>Guido Monga</i> Commemorazione del socio Franco Mollo	59
<i>Rossana Cavallo</i> Nuovi scenari in virologia clinica: la gestione del paziente immunocompromesso	63
<i>Giovanni Camussi, Andrea Raghino, Stefania Bruno, Maria Chiara Deregibus</i> Cellule staminali e rigenerazione tissutale	76
<i>Mario Bo</i> L'anziano, la malattia e l'ospedale	90
<i>Sergio Bernasconi, Marilena Garrubba, Chiara Sartori</i> la prevenzione dell'obesità: l'unione fa la forza!	102

Benedetto Terracini

**Un secolo di amianto: da minerale magico a polvere micidiale.
Dedicato a Franco Mollo** 115

Ferdinando Rossi

**Esperienza, plasticità, riparazione del danno
e recupero della funzione nervosa** 126

*Cristhian Carlino, Andrea Corrias, Anna Mussano,
Isabella Morra, Luca Cordero di Montezemolo*

**Approccio integrato ai tumori astrocitari encefalici
in età pediatrica** 138

Riccardo Torta

Mente e corpo in oncologia 154

Oriana Pecchio

Cuore e vette: appunti di medicina di montagna 169

Enrico Donegani

Il paziente cardiopatico in alta quota 181

Edmondo Comino

Problemi etici per il medico, oggi 192

Roberto Civitelli, Konstantinos Ziambaras

Pathophysiology of Hypophosphatemic Syndromes 207

*Marco Fangazio, Silvia Rasi, Valeria Spina,
Alessio Bruscazzin, Stefania Cresta, Clara Deambrogi,
Sara Monti, Lorenzo De Paoli, Laura Pasqualucci,
Riccardo Dalla-Favera, Davide Rossi, Gianluca Gaidano*

**Richter syndrome: from molecular genetics
to therapeutic strategies** 216

*Federico Ragazzoni, Alberto Mormile, Maurilio Deandrea,
Francesca Garino, Maria Josefina Ramunni, Gabriella Magliona,
Filippo Molinari, Roberto Garberoglio, Paolo Limone*

**L'ecografia nella diagnostica e nella terapia della patologia
nodulare tiroidea: attualità e prospettive** 235

*Simone Ribero, Giuseppe Macripò,
Anna Sapino, Maria Grazia Bernengo*

Premio "Giampiero Gaidano"
Tesi di Laurea premiata
dalla Fondazione Piera, Pietro e Giovanni Ferrero
in collaborazione con l'Accademia di Medicina di Torino

**Parametri clinico patologici del linfonodo sentinella
nel melanoma cutaneo** 254

Cecilia Bracco

Premio "Italo Arneodo"
Tesi di Laurea premiata in collaborazione con l'Accademia
di Medicina di Torino

**Inibizione farmacologica della tirosina-cinasi SRC
nella tumorigenesi sostenuta dall'oncogene *MET*** 265

Celeste Cagnazzo

Premio “Italo Arneodo”

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

**Valutazione della qualità degli ovociti umani
nelle strategie di fecondazione assistita** 283

PARTE IV

Tesi di Laurea vincitrice del Premio
Fondazione Ferrero Onlus
in memoria del Prof. Giampiero Gaidano
Anno Accademico 2009/2010 311

Tesi di Laurea vincitrici del Premio
in Memoria del Dott. Italo Arneodo
Anno Accademico 2009/2010 313

Sito web dell’Accademia di Medicina di Torino 315

Norme redazionali per la pubblicazione sul
“Giornale dell’Accademia di Medicina di Torino” 317

Indice degli Autori 319

*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 Bizzozero
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	2010-2011	Alberto Angeli

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 2011)****Soci Ordinari** (in ordine di anzianità di nomina)**Francesco Morino***Professore di Chirurgia Generale**Università di Torino*

(31 Maggio 1968)

Giorgio Emanuelli*Professore di Medicina Interna**Università di Torino*

(3 Luglio 1979)

Alberto Sartoris*Professore di Clinica Otorinolaringoiatrica**Università di Torino*

(30 Giugno 1977)

Paolo Gallinaro*Professore di Clinica Ortopedica**Università di Torino*

(3 Luglio 1979)

Giovanni Bussolati*Professore di Anatomia e Istologia Patologica**Università di Torino*

(14 Dicembre 1977)

Gian Franco Pagano*Professore di Medicina Interna**Università di Torino*

(3 Luglio 1979)

Giuseppe Piccoli*Professore di Nefrologia**Università di Torino*

(14 Dicembre 1977)

Luigi Sena*Professore di Patologia Clinica**Università di Torino*

(3 Luglio 1979)

Alberto Angeli*Professore di Medicina Interna**Università di Torino*

(3 Luglio 1979)

Remo Modica*Professore di Chirurgia Maxillo-Facciale**Università di Torino*

(13 Febbraio 1981)

Onofrio Campobasso*Primario Emerito di Anatomia Patologica**Ospedale Maria Vittoria di Torino*

(3 Luglio 1979)

Giacomo Giacobini*Professore di Anatomia Umana Normale**Università di Torino*

(20 Maggio 1983)

Giorgio Palestro

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

Benedetto Terracini

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

Mario Rizzetto

Professore di Gastroenterologia
Università di Torino
 (26 Maggio 1989)

Alessandro Calciati

Primario Emerito di Oncologia Medica
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino
 (26 Gennaio 1990)

Paolo Comoglio

Professore di Istologia
Università di Torino
 (26 Gennaio 1990)

Giovanni Losano

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

Marco Massobrio

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

Francesco Di Carlo

Professore di Farmacologia
Università di Torino
 (20 Dicembre 1991)

Federico Grignolo

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

Alberto Piazza

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

Mario Pippione

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

Giuseppe Segoloni

Professore di Nefrologia
Università di Torino
 (18 Dicembre 1992)

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 - Novara
 (16 Dicembre 1994)

Mario Boccadoro

Professore di Ematologia
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
A.O.U. San Giovanni Battista 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 - Novara
(13 Dicembre 1996)*

Mario Campogrande

*Primario Emerito di Ostetricia e Ginecologia
A.O. OIRM - S. 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. Ordine Mauriziano di Torino
(15 Dicembre 2000)*

Angelo Pera

*Primario Emerito di Gastroenterologia
A.O. Ordine 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. OIRM - S. 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. OIRM - 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 - Novara
(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.U. 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 - Novara
(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 - Novara
(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.U. 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

*Professore di Clinica Otorinolaringoiatrica
Università 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. Ordine 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 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)*

Chiara Benedetto

*Professore di Ginecologia e Ostetricia
Università di Torino
(17 Dicembre 2010)*

Sebastiano Marra

*Primario di Cardiologia
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino
(17 Dicembre 2010)*

Massimo Porta

*Professore di Medicina Interna
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino
(17 Dicembre 2010)*

Claudio Rabbia

*Primario di Radiologia Vascolare
e Interventistica
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino
(17 Dicembre 2010)*

Corrado Tarella

*Professore di Ematologia
Università di Torino
(17 Dicembre 2010)*

Soci Onorari Nazionali

Bruno Zanobio

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)

José 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 - Novara
(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)*

Ottavio Davini

*Primario di Radiologia Diagnostica 2
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino
(10 Dicembre 1999)*

Roberto Frairia

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

Oscar Bertetto

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

Donatella Gattullo

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

Alberto Biglino

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

Giancarlo Cortese

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

Paolo Pera

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

Anna Sapino

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

Gianluca Gaidano

*Professore di Ematologia
Università del Piemonte Orientale - Novara
(17 Dicembre 2010)*

Paolo Piero Limone

*Primario di Endocrinologia, Diabetologia
e Malattie del Metabolismo
A.O. Ordine Mauriziano di Torino
(17 Dicembre 2010)*

Soci Corrispondenti Esteri**Jean Lenegre**

*Parigi
(25 Marzo 1960)*

Neville A. Marsh

*Londra
(30 Novembre 1990)*

Jean Pierre Changeux

*Parigi
(14 Giugno 1974)*

Nicolass Westerhof

*Amsterdam
(18 Dicembre 1992)*

René Couteaux

*Parigi
(14 Giugno 1974)*

Giorgio Maria Innocenti

*Stoccolma
(15 Dicembre 1995)*

Danilo Baggiolini

*Basilea
(20 Maggio 1983)*

Roberto Civitelli

*St. Louis
(17 Dicembre 2010)*

Soldano Ferrone

*New York
(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 Radioterapia
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.U. 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
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino
 (23 Maggio 2007)

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

Giorgio Agati

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

Pier Giuseppe De Filippi

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

Eugenio Meda

Professore di Fisiologia
Università di Torino
 (23 Gennaio 2009)

Pier Luigi Baima Bollone

Professore di Medicina Legale
Università di Torino
 (23 Giugno 2009)

Giuseppe Poli

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

Nicola Riccardino

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

Italo Faraldi

Primario Emerito di Oculistica
Ospedale Oftalmico di Torino
 (12 Settembre 2011)

Giuseppe Heer

Primario Emerito di Oculistica
Ospedale Maria Vittoria di Torino
 (12 Settembre 2011)

Davide Schiffer

Professore di Neurologia
Università di Torino
 (12 Settembre 2011)

Luigi Ravizza

Professore di Clinica Psichiatrica
Università di Torino
 (12 Settembre 2011)

Soci Benemeriti**Ing. Enzo Brusasco**

(16 Dicembre 2005)

Notaio Alberto Morano

(22 Febbraio 2010)

Ing. Walter Ceresa

(16 Dicembre 2005)

Sig. Alessio Giuseppe Lucca

(4 Ottobre 2010)

Dott. Piero Sola

(16 Dicembre 2005)

Dott. Ugo Riba

(11 Febbraio 2011)

Dott. Inigo Lopez de la Osa**Escribano**

(14 Dicembre 2009)

Ing. Tito Gavazzi

(12 Settembre 2011)

Soci già Ordinari

Giovanni Aastaldi

*Primario Emerito
Ospedale Maggiore di Tortona*

Franco Balzola

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

Pietro Bracco

*Professore di Clinica Odontostomatologica
Università di Torino*

Gian Paolo Busca

*Professore di Clinica Otorinolaringoiatrica
Università di Torino*

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*

Guido Forni

*Professore di Immunologia
Università di Torino*

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 Otorinolaringoiatrica
Ospedale di Rivoli*

Giorgio Mangiarotti

*Professore di Biologia Molecolare
Università di Torino*

Angela Moiraghi Ruggenini

*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 Ematologia
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino*

Giovanni Sesia

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

Antonio Solini

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

Maria Luisa Soranzo

*Primario Emerito di Malattie Infettive
Ospedale Amedeo di Savoia di Torino*

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 2010

15 Gennaio **Le laringectomie orizzontali “ad intensità modulata”**
Relatore: Giovanni Succo

29 Gennaio SEDUTA A RICORDO DEL PROF. ENRICO GENAZZANI

Il ricordo del Maestro

Relatore: Francesco Di Carlo

Lo studio della farmacocinetica nello sviluppo dei farmaci

Relatore: Mario Eandi

I neuropeptidi nella psicopatologia

Relatore: Paolo Portaleone

La chemioterapia antimicrobica oggi

Relatore: Ilario Viano

12 Febbraio **Nuovi scenari in virologia clinica**
Relatore: Rossana Cavallo

26 Febbraio SEDUTA IN COLLABORAZIONE CON
IL DIPARTIMENTO DI GENETICA, BIOLOGIA
E BIOCHIMICA DELL'UNIVERSITÀ DI TORINO
E L'ITALIAN MALARIA NETWORK

Italian Malaria Network.

Rapporto del terzo anno di attività

Relazione introduttiva: Paolo Arese

*Relatori: Marco Corsi, Pietro Alano, Bruno Arcà,
Zeno Bisoffi, Giuseppe Campiani,
Francesco Castelli, Andrea Crisanti,
Alessandra Della Torre, Fulvio Esposito,
Ernesto Fattorusso, Guido Favia,
Annette Habluetzel, David Modiano,
Elisabetta Pizzi, Marta Ponzi, Menico Rizzi,
Roberta Spaccapelo, Evelin Schwarzer,
Donatella Taramelli*

12 Marzo **Medicina molecolare dei tumori tiroidei**

Relatore: Sebastiano Filetti

Presentato dal Socio: Alberto Angeli

26 Marzo **Commemorazione del Socio
Valerio GAI**

di Giovanni Carlo Isaia

Cellule staminali e rigenerazione tissutale

Relatore: Giovanni Camussi

9 Aprile **L'anziano, le malattie e l'ospedale**

Relatore: Mario Bo

Presentato dal Socio: Giovanni Carlo Isaia

23 Aprile **L'obesità: ruolo del pediatra**
Relatore: Sergio Bernasconi
Presentato dal Socio: Carlo de Sanctis

7 Maggio **Commemorazione del Socio**
Roberto PATTONO
di Elsa Margaria

Cellule staminali tumorali e fenotipo nei gliomi maligni
Relatori: Davide Schiffer, Marta Mellai, Valentina Caldera

21 Maggio **Commemorazione del Socio**
Franco MOLLO
di Guido Monga

PRIMA SEDUTA DEDICATA ALL'AMIANTO
E PATOLOGIE PLEURO-POLMONARI

**Un secolo di amianto:
da minerale magico a polvere micidiale**

Relatore: Benedetto Terracini

**Meccanismi patogenetici delle patologie polmonari
da amianto**

Relatore: Dario Ghigo

11 Giugno SECONDA SEDUTA DEDICATA ALL'AMIANTO
E PATOLOGIE PLEURO-POLMONARI
Gestione clinica integrata del mesotelioma pleurico
Relatori: Piero Borasio, Giorgio Vittorio Scagliotti

- 30 Giugno* **SEDUTA IN COLLABORAZIONE CON
L'ACCADEMIA DELLE SCIENZE
E L'ACCADEMIA DI AGRICOLTURA DI TORINO**
- Farmacoresistenza: meccanismi molecolari,
impatto pratico, strategie di intervento**
- Relatori: Roberto Mazzanti, Giovanni Appendino,
Alberto Gasco*
-
- 8 Ottobre* **Esperienza, plasticità, riparazione del danno
e recupero della funzione nervosa**
- Relatore: Ferdinando Rossi*
-
- 22 Ottobre* **Approccio integrato ai tumori maligni encefalici
nell'età pediatrica**
- Relatori: Luca Cordero di Montezemolo, Christian Carlino
Isabella Morra, Andrea Corrias*
-
- 12 Novembre* **Seduta inaugurale Anno Accademico 2010-2011**
- Relazione del Presidente: Alberto ANGELI*
- Oncologia, evoluzione ed evoluzione dell'oncologia**
- Relatore: Lucio Luzzatto*
- Presentato dal Socio: Paolo Arese*
-
- 26 Novembre* **Mente e corpo nel paziente oncologico**
- Relatore: Riccardo Torta*
- Presentato dal Socio: Alberto Angeli*

3 Dicembre **Cuore e vette: appunti di medicina di montagna**
Relatori: Oriana Pecchio, Enrico Donegani
Presentati dal Socio: Alessandro Comandone

Sedute Private

12 Febbraio **Approvazione rendiconto consuntivo 2009
e bilancio di previsione 2010**

17 Dicembre **Elezione di nuovi Soci**

Convegni e Sedute Straordinarie

- 10 Maggio* **SIMULA: il video simulatore per la didattica chirurgica**
- 15 Maggio* **Rischio di frattura osteoporotica e soglia di intervento:
l'algoritmo diagnostico**
- 18 Maggio* **La sostenibilità delle cure nella Regione Piemonte**
- 24 Settembre* **Notte dei ricercatori 2010
– Incontro con la scienza e l'innovazione –**
- 19 Novembre* **Scienza e innovazione: l'OCT oltre l'AMD**
- 23 Novembre* **Presentazione della ristampa anastatica del volume
“La Paura” di Angelo Mosso**
- 24 Novembre* **Convegno celebrativo del centenario della morte
di Angelo Mosso: “Angelo Mosso fisiologo e scienziato
positivista (1846 – 1910)”**

**RELAZIONE DEL PRESIDENTE
ALLA SEDUTA INAUGURALE DELL'ACCADEMIA
ANNO 2010-2011**

*A*utorità, cari Soci, cari colleghi, signore e signori,
buon pomeriggio e benvenuti tutti nella storica aula della nostra Accademia. Con il Presidente Vicario e il Segretario Generale, qui accanto a me, a nome dell'intero Consiglio di Presidenza, desidero innanzitutto esprimere il ringraziamento più vivo per la Vostra partecipazione alla cerimonia di apertura del nuovo Anno Accademico della nostra istituzione.

L'Accademia di Medicina è la più giovane delle tre Accademie Sabaude tuttoggi attive nella nostra città: l'Accademia delle Scienze, l'Accademia di Agricoltura e, appunto, l'Accademia di Medicina. Siamo onorati di avere oggi con noi il Presidente dell'Accademia di Agricoltura Prof. Orazio Sappa che saluto con grande stima e amicizia. Il Presidente dell'Accademia delle Scienze, Prof. Pietro Rossi, impossibilitato a essere con noi perché, come Accademico dei Lincei, è oggi a Roma per la concomitante apertura dell'Anno Accademico di quella prestigiosa Accademia, ha scritto una lettera che ci onora per l'amicizia e la considerazione che ha voluto testimoniare.

Il nostro Atto Ufficiale di Fondazione risale al Febbraio 1846; stiamo quindi per compiere 165 anni. In questo lungo arco di tempo, l'Accademia di Medicina è sempre stata sicuro punto di riferimento scientifico e culturale non soltanto per la classe medica, ma anche per la società civile, coniugando tradizione e innovazione, informazione e formazione, dialogo e stimolo. Pochi giorni or sono, abbiamo sentito proprio il Prof. Pietro Rossi dire in una splendida prolusione accademica che la cultura non è una condizione statica ma processuale, nel senso che è in continua evoluzione dinamica, condizionata da molti fattori, auspicabilmente in progresso, ma possibilmente anche in regresso. Non è certo il semplice accumularsi di conoscenze, ma è l'inserimento delle conoscenze e dell'esperienza in una dimensione, meglio

dire in una scelta etica, che esita poi nei comportamenti pratici . E allora vale la spesa ricordare anche il recente volume di Steven Shapin, storico della scienza oggi ad Harvard, intitolato “The Scientific Life. A moral history of a modern late vocation”¹. Integrità, onestà e apertura mentale restano le caratteristiche qualificanti di chi sceglie il metodo scientifico, un insieme di rigore e umiltà, per migliorare se stesso, progressivamente, con fatica, incertezze e delusioni, ma anche con forza e serenità crescenti. Più che mai la società dei nostri tempi, afferma Shapin, ha bisogno, in ogni settore, di chi è insieme scienziato e gentiluomo, e – per quanto ci riguarda – potremmo dire medico e gentiluomo.

Ovviamente, questo vale anche per il sesso femminile. Ecco, a fronte di una deriva di superficialità, violenza e sciatteria morale che sembra inarrestabile nella società in cui viviamo, l’Accademia vuole riaffermare, con semplicità, sobrietà e dignità, il valore nobile delle scienze biomediche, vissuto dai protagonisti del loro progresso e trasmesso alle più giovani generazioni. È un impegno che viene di lontano, è il filo conduttore della nostra storia. L’Accademia non è certo una Società Scientifica, men che mai una pseudo-facoltà o un club di intellettuali démodé e auto referenziati, ma un’istituzione viva e attiva, attenta ai ricambi generazionali. Per questo, ferisce la disaffezione dei Soci, la scarsa presenza alle sedute pubbliche e il modesto impegno propositivo. Ho definito l’Accademia un catalizzatore culturale. In questo senso, la sua attività è articolata in sedute scientifiche pubbliche che onorano una tradizione consolidata e in iniziative di apertura all’esterno e di interfaccia con vari settori delle scienze umane.

Per quanto riguarda le prime, debbo ricordare che sono state 18 nell’ultimo Anno Accademico cui vanno aggiunte le due sedute private dedicate, la prima, all’approvazione del rendiconto consuntivo e del bilancio preventivo, e la seconda, all’elezione dei nuovi soci. È fresco di stampa il volume 172 degli Atti dell’Accademia, che raccoglie i testi delle relazioni svolte e riporta il calendario e il programma di tutte le sedute. È a disposizione dei Soci e degli interessati. Per brevità di esposizione, non riporterò qui l’elenco delle sedute svolte nell’anno 2010 e dei tanti relatori. Gli argomenti e il loro significato culturale, spesso innovativo, sempre stimolante, si possono ritrovare nelle pagine iniziali del presente Volume degli Atti dell’Accademia. A tutti i relatori va il più sentito ringraziamento per l’impegno dimostrato e per il livello qualitativo

¹ Steven Shapin: *The Scientific Life. A moral history of a late modern vocation*. The University of Chicago Press, Chicago and London 2009, pp 468.

davvero elevato dei loro contributi. Vorrei qui solo ricordare l'importante lettura magistrale con la quale il Prof. Attilio Maseri ha inaugurato il passato Anno Accademico (Il rinascimento della ricerca clinica cardiovascolare) e la tradizionale seduta che ogni anno organizziamo in collaborazione con l'Accademia delle Scienze e l'Accademia di Agricoltura, dedicata quest'anno alla Farmacoresistenza: meccanismi molecolari, impatto pratico, strategie d'intervento, e i tre relatori della serata: Prof. Roberto Mazzanti, di Firenze, per la nostra Accademia; Prof. Giovanni Appendino, per l'Accademia di Agricoltura; Prof. Alberto Gasco, per l'Accademia delle Scienze.

Per quanto riguarda le iniziative che ho prima definito di "apertura all'esterno", debbo dire che sono state numerose, qualificanti e gratificanti. Sarebbe tedioso, ancora, elencare tutti i Convegni e gli eventi che si sono succeduti in quest'aula nei mesi scorsi. Sono anch'essi evidenziati nelle pagine già menzionate, che sono in apertura dell'attuale Volume dei nostri Atti. Desidero però sottolineare il coinvolgimento dell'Accademia in due iniziative più recenti, rivolte ai giovani ricercatori e ai giovani studenti universitari. E questo coinvolgimento ci riporta alla funzione definita in precedenza di catalizzatore culturale. L'aula dell'Accademia è stata una delle sedi nel Settembre scorso della "Notte dei ricercatori" – Incontro con la scienza e l'innovazione – promosso dall'Associazione per lo sviluppo scientifico e tecnologico del Piemonte e dell'Università di Torino e finalizzato all'alta divulgazione scientifica. Da inizio Ottobre, e cioè dall'inizio dell'Anno Accademico Universitario, la nostra Aula è una sede ufficiale del Corso di Studi Superiori dell'Università di Torino, rivolto a un gruppo selezionato di studenti delle varie Facoltà universitarie e organizzato su grandi temi interdisciplinari lungo un intero Anno Accademico e quindi sino alla prossima primavera. Complessità e sostenibilità sono le emblematiche parole chiave di quest'Anno; al nostro neo-Socio Prof. Ferdinando Rossi, Presidente del Comitato Scientifico del Corso, il più vivo ringraziamento per questa presenza di giovani nella nostra sede.

E qui si raccorda il discorso sulla collaborazione, anzi, meglio, sull'interazione fra Accademia e Università di Torino. È un'interazione che nel tempo si è sempre più consolidata. Promossa con lungimiranza dal Rettore Dianzani, sviluppata con determinazione e tenacia dal Rettore Bertolino, ulteriormente voluta e interpretata dall'attuale Rettore Pelizzetti, ha visto il re-inserimento dell'Università nello stabile di Via Po 18 e la partecipazione dell'Amministrazione Universitaria alla complessa gestione degli spazi e dei servizi, fra i quali uno dei più rappresentativi è certamente

la Biblioteca della nostra Accademia. Nei prossimi mesi è prevista, in collaborazione con l'Università e con il contributo della Compagnia di San Paolo, la digitalizzazione dei testi antichi, prezioso patrimonio della nostra Accademia, che consentirà una importante valorizzazione, e non solo una maggiore fruibilità di questo patrimonio. Debbo quindi esprimere, a nome del Consiglio di Presidenza, il più vivo ringraziamento al Rettore e ai molti amici dell'Accademia che operano nell'Università, sia nello staff più direzionale, sia negli uffici amministrativi e tecnici. Ancillare alla politica di visibilità e sviluppo del patrimonio della Biblioteca, è la scelta di presentare in Accademia nuovi libri o ristampe di particolare interesse. Emblematica, ad es., è l'iniziativa che abbiamo preso in collaborazione con la fondazione intitolata ai genitori di Dario Cantino e Gisella Cantino Wataghin. In occasione delle celebrazioni per il Centenario della morte di Angelo Mosso, illustre poliedrico fisiologo e studioso del comportamento umano, Presidente della nostra Accademia a fine '800, verrà qui presentata, il 23 Novembre prossimo, la ristampa anastatica del suo interessantissimo volume "La Paura", la cui prima edizione risale al 1883. Siete tutti invitati a presenziare.

Nella seduta privata del Dicembre sono stati eletti nuovi Soci ordinari. È compito e privilegio del Presidente consegnare loro i diplomi tradizionali, ed è quindi giunto il momento di chiamarli individualmente perché ricevano il diploma, le congratulazioni e l'applauso di rito:

- Prof. Alessandro BARGONI
- Prof. Giuseppe BOCCUZZI
- Prof.ssa Rossana CAVALLO
- Prof. Luca CORDERO DI MONTEZEMOLO
- Dott. Mario MARANGELLA
- Prof. Ferdinando ROSSI
- Prof. Giorgio Vittorio SCAGLIOTTI
- Dott. Francesco SCAROINA
- Dott. Umberto VITOLO

Inoltre, sulla base del rinnovato Statuto dell'Accademia, che ora prevede la categoria dei Soci Emeriti, il Consiglio di Presidenza unanime ha nominato Soci Emeriti:

- Prof. Giuseppe POLI
- Prof. Nicola RICCARDINO

Sono stati altresì nominati Soci Benemeriti per il supporto dato all'Accademia:

- Notaio Alberto MORANO
- Signor Alessio Giuseppe LUCCA

Ora, con vivo cordoglio, a nome del Consiglio di Presidenza e dell'intera comunità accademica, desidero ricordare i nostri Soci, deceduti nel corso dell'ultimo Anno Accademico. Sono tre Soci già Ordinari: il Dott. Giampaolo AMBROGGIO, la Prof.ssa Nicoletta ANSALDI e il Prof. Bruno DEMICHELIS. È anche deceduto a Londra il Prof. Richard J. LINDEN, nostro Socio Onorario Estero. Alle famiglie rinnoviamo oggi, in occasione di questa Cerimonia, i sentimenti di partecipazione intensa e affettuosa al loro dolore, nel ricordo di colleghi e amici così apprezzati come scienziati e clinici. Ricordo anche che nei mesi passati sono stati commemorati in quest'aula illustri Soci deceduti nel precedente Anno Accademico: il Prof. Enrico GENAZZANI (commemorato dal Prof. Francesco Di Carlo); il Prof. Valerio GAI (commemorato dal Prof. Giovanni Carlo Isaia); il Prof. Roberto PATTONO (commemorato dalla Prof.ssa Elsa Margaria); il Prof. Franco MOLLO (commemorato dal Prof. Guido Monga).

Ed è giunto il momento di premiare le tesi di laurea che, com'è tradizione dell'Accademia, vengono selezionate dal Consiglio di Presidenza fra quante presentate a fronte dei bandi pubblicizzati in primavera e riguardanti neo-laureati dell'Anno Accademico 2008-2009. Due premi sono intitolati alla memoria del Dott. Italo Arneodo, e saranno consegnati dalla sorella, Dott.ssa Severina Arneodo che chiamo ora al mio fianco e che, a nome di tutti i Soci, ringrazio ancora per la disponibilità e la simpatia sempre dimostrate nei confronti della nostra Accademia. I premi di laurea vanno a due brillanti dottoresse ricercatrici:

- Dott.ssa Cecilia BRACCO, Relatore Prof. Paolo M. Comoglio, “Inibizione farmacologica della tirosina-cinasi Src nella tumorigenesi sostenuta dall'oncogene MET: uno studio preclinico in vitro e in vivo”.
- Dott.ssa Celeste CAGNAZZO, relatore Prof. Alberto Revelli, “Valutazione della qualità degli ovociti e degli embrioni umani mediante microscopia a luce polarizzata”.

Un premio di laurea è intitolato alla memoria del nostro Socio Prof. Giampiero GAIDANO, ed è supportato con generosità e sensibilità dalla

Fondazione Piera, Pietro e Giovanni Ferrero di Alba, qui rappresentata dal Segretario Generale Prof. Mario Strola, cui va il nostro più vivo ringraziamento. Sono onorato di chiamare al mio fianco la Sig.ra Elena Gaidano per la consegna del premio al Dott. Simone RIBERO, Relatore Prof.ssa Maria Grazia Bernengo, "Parametri clinico-patologici del linfonodo sentinella in pazienti affetti da melanoma cutaneo: valore predittivo sul coinvolgimento dei linfonodi non sentinella e decorso clinico".

Siamo in dirittura finale. Ai ringraziamenti personali, del Presidente, non formali, espressi con intensità di sentimenti. Dopo la cessazione dal servizio attivo di Professore Universitario, di Direttore di Struttura Complessa e di Dipartimento in una grande Azienda Ospedaliero-Universitaria, ho avuto la fortuna di arricchirmi di questa esperienza, coinvolgente e stimolante. Nel corso di questa relazione, ho via via ringraziato le istituzioni che hanno supportato, ma vorrei dire che hanno consentito sopravvivenza e vita dell'Accademia, e qualcuna ne ho dimenticata e ne faccio subito ammenda: la Regione Piemonte, e in particolare l'Assessorato ai Beni Culturali e la Divisione Biblioteche; la Fondazione Cassa di Risparmio di Torino, che supporta anche la nostra attività editoriale. E poi i mecenati privati, Soci benemeriti, che hanno cuore e sensibilità attenta e così apprezzata per i nostri progetti.

Ma lasciate che esprima gratitudine tutt'affatto particolare per gli amici componenti del Consiglio di Presidenza per il loro supporto, la loro collaborazione, costruttiva, critica, propositiva, in una parola bellissima, di tutti questi mesi. I past-president Pippo Poli e Nicola Riccardino sono stati preziosissimi, e così le nostre Segretarie, Lidia MOREA e Alda RIVA, che vivono l'Accademia come una loro cosa (o casa) preziosa: sempre disponibili, positive, anche in circostanze impreviste e in problemi non facili da gestire. E Gino Zanchi, mitico custode e prezioso testimone della migliore tradizione dell'Accademia, e il più giovane Domenico Spano, bibliotecario che è sempre disponibile per i visitatori reali o informatici dei nostri testi.

Un grazie, ancora, ai professionisti esterni, che anche quest'anno hanno fornito con generosità e professionalità indiscussa le loro consulenze in ambito notarile, contabile, legale.

Infine, un grazie con il cuore a mia moglie Annita, alle care amiche Wanda, Lalla, Luisa e Ginevra, che con i colori e le composizioni dei fiori ci hanno oggi ricordato come la cultura non sia triste e grigia, ma tragga vita anche dalla bellezza della natura e dall'espressione estetica.

Concludo rinnovando a Voi tutti il ringraziamento personale per la presenza odierna e per l'apprezzamento manifestato nei confronti della nostra istituzione e dichiaro ufficialmente aperto l'Anno Accademico 2010-2011, centosessantacinquesimo dalla fondazione dell'Accademia di Medicina, sancita dal Re Carlo Alberto.

Prof. Alberto Angeli

COMMEMORAZIONE DEL SOCIO ENRICO GENAZZANI

Il ricordo del Maestro

La seduta di questa sera è dedicata al ricordo del professor Enrico Genazzani, ed a me, l'allievo più vecchio a Torino, il compito di ricordare il Maestro scomparso, secondo una tradizione universitaria consolidata negli anni.

Il professor Enrico Genazzani era nato a Firenze il 19 luglio 1920 e nella sua città è mancato il 3 marzo 2009, qualche mese prima del suo 89esimo compleanno.





Il prof. Genazzani con il prof. Donatelli.

Molti episodi della sua lunga vita sono stati descritti da lui stesso nelle sue due opere autobiografiche intitolate rispettivamente “Sipari” e “Fuori scena”, dove ha ripercorso alcuni importanti avvenimenti, dall’esilio forzato, per sfuggire alle ignobili leggi razziali contro gli ebrei, prima in Francia, a Marsiglia, e poi in Svizzera, a Losanna, dove si è laureato in Medicina e Chirurgia, al ritorno a Firenze, dove ha incontrato l’uomo che gli ha cambiato la vita, il professor Leonardo Donatelli.

Da lui affascinato, il giovane Genazzani si dedicò alla Farmacologia e, quando nel 1950 il suo Maestro vinse la cattedra presso l’Università di Napoli, lo seguì con giovanile entusiasmo e dedizione.

Nella città partenopea l’Istituto di Farmacologia diretto da Donatelli rappresentò ben presto un centro di studi innovatore e stimolante, capace di attirare molti giovani medici desiderosi di dedicarsi alla ricerca. I piccoli gruppi che si formarono furono incoraggiati ed assecondati da Donatelli a sviluppare i temi di ricerca di loro maggiore interesse. Ben 10 dei suoi giovani e brillanti Assistenti diventarono nel tempo Professori Ordinari di Farmacologia, a testimonianza delle straordinarie doti del Maestro.

Molti anni dopo, anche Enrico Genazzani, diventato a sua volta Maestro, si comporterà allo stesso modo con i suoi numerosi allievi, dei quali sosterrà sempre le naturali inclinazioni scientifiche.

Nel 1956, a 36 anni, il dottor Genazzani conseguì la libera docenza in Farmacologia.

È a quel periodo (1958) che risale il mio primo incontro con il professor Genazzani, in quanto, ancora giovane studente del liceo, avevo frequentato l'Istituto di Farmacologia di Napoli, dove erano già presenti i miei due fratelli, Vincenzo (che, prossimo alla libera docenza, aveva bisogno di "manovalanza" a buon mercato per portare a termine alcuni esperimenti sugli anestetici locali) e Raffaele, fresco di laurea in Medicina e Chirurgia, con tesi in Farmacologia.

Nel 1962, partito mio fratello Vincenzo per gli USA, Raffaele entrò a far parte del gruppo del prof. Genazzani, allora Aiuto ed Incaricato di Farmacologia Veterinaria, la cui principale attività di ricerca era rivolta ad un argomento allora molto di moda, il legame farmaco-proteico, del quale egli era uno dei più noti studiosi in Italia. In quegli anni vennero alla luce, ad opera del gruppo del prof. Genazzani, numerosi studi sulle interferenze tra diversi farmaci, soprattutto antibiotici, nei riguardi del loro legame con le sieroproteine. Uno di questi studi, sulla competizione tra sulfamidici e tetracicline, rappresentò il nucleo della mia tesi di laurea in Medicina e Chirurgia. Nel 1965 anche mio fratello Raffaele raggiunse un traguardo importante della vita accademica: la libera docenza, grazie agli studi condotti sotto la guida del prof. Genazzani.

Facevano parte del gruppo Genazzani, tra gli altri, 2 studiosi che hanno avuto tanta importanza nella vita universitaria ed extra-universitaria per il professore: si tratta dei prof. Giuseppe Pagnini e Loris Jacopo Bononi. Il primo diventò, in seguito, Professore Ordinario di Farmacologia alla Facoltà di Medicina Veterinaria di Napoli, mentre il secondo, brillante oratore e scrittore, fu a lungo Professore Associato di Chemioterapia a Torino nella Facoltà di Medicina e Chirurgia.

Del "gruppo Genazzani" di Napoli facevano parte anche 2 giovani tecnici: Pino Paino ed Antonio Crispino. Pino Paino, molti anni dopo, laureatosi in Medicina Veterinaria, ha fatto una brillante carriera universitaria, che lo ha portato sino alla cattedra di Anatomia Veterinaria all'Università di Napoli.

A Torino il professor Genazzani giunse nel 1967 come cattedratico presso la Facoltà di Farmacia; era completamente solo. Antonio Crispino lo seguì perciò quasi subito a Torino, mentre io lo raggiunsi un anno dopo, grazie alla disponibilità di una borsa di studio della stessa Facoltà.

Enrico Genazzani era un uomo di grande carisma, pieno di fascino, colto, capace di stimolare gli allievi alla ricerca scientifica, toccando le corde giuste ed assecondandone gli interessi naturali e le curiosità scientifiche. Era difficile

resistergli, ed io non opposi troppa resistenza alla sua richiesta di seguirlo definitivamente a Torino. C'erano esattamente 20 anni di differenza d'età tra noi ed io avevo in lui la cieca fiducia e l'ammirazione sconfinata che si ha verso un giovane padre o un fratello maggiore, brillante e pieno di vitalità. Egli rappresentava per me l'esempio da seguire.

Direttore dell'Istituto era il professore Emilio Beccari, uomo dall'aspetto severo, dotato di grande personalità, farmacologo di indiscusso prestigio, tanto da essere stato eletto nel 1965 Presidente della Società Italiana di Farmacologia (lo fu sino al 1969).

Gli Assistenti del prof. Beccari erano 3 simpatiche e gentili dottoresse: Giuseppina Rolla in Alfieri, Andreina Baracchi in Post e Silvana Gamalero in Ricci. Il prof. Giorgio Segre, altro allievo di Beccari, si era trasferito a Siena, come Direttore dell'Istituto di Farmacologia di quella città, e il prof. Luigi Molinengo era a Modena, in attesa che fossero trascorsi i 3 anni di straordinariato per tornare a Torino dal suo Maestro. Allievo interno era Mario Eandi, un giovane saluzzese, "impallinato" di elettrofisiologia, ma soprattutto molto dotato per la matematica e, come Giorgio Segre, interessato all'applicazione delle sue regole alla cinetica dei farmaci.

Le ricerche del gruppo Genazzani, in quel periodo, continuarono sulla scia di quelle già svolte nel periodo napoletano sulle interazioni tra farmaci.

Nel 1970 il professore Genazzani passò a dirigere la II cattedra di Farmacologia della Facoltà di Medicina e Chirurgia. La Farmacologia della Facoltà di Farmacia, affidata al prof. Luigi Molinengo, che era tornato a Torino, si trasferì nell'edificio di fronte a quello che ospitava gli Istituti di Medicina, in Corso Raffaello 31. Nacque così un Istituto di Farmacologia e Farmacognosia nuovo anche nella collocazione nella città, oggi diretto da Roberto Fantozzi.

Il passaggio a Medicina del professor Genazzani gli permise di cementare ancor più i suoi rapporti con tutti i colleghi di Facoltà, dei quali seppe meritare grande stima e rispetto, anche per la gentilezza dei modi e le non comuni capacità diplomatiche. Tra questi colleghi spiccano Giorgio Cavallo e Mario Umberto Dianzani (entrambi, in successione, Rettori dell'Università di Torino) e Beppe Zina (insigne Professore di Dermatologia), ai quali lo hanno legato per tutta la vita sentimenti di grande amicizia. Non a caso i loro allievi sono sempre stati affettuosamente considerati da me come dei veri e propri "cugini".

L'Istituto di Farmacologia di Torino era sprovvisto delle apparecchiature adatte alle ricerche del gruppo Genazzani. Non fu facile riorganizzarlo su basi più adeguate. Fu determinante l'opera del professor Genazzani, il quale con molta fatica riuscì ad ottenere da varie fonti i mezzi necessari all'acquisto di

nuove apparecchiature e, con tanta capacità di persuasione, convinse il prof. Beccari, un po' restio a profonde innovazioni, ad accettarne l'installazione in Istituto. Nell'opera di riorganizzazione dell'Istituto il prof. Genazzani trovò, come già a Napoli, un valido e costante aiuto in mio fratello Raffaele, il quale si era trasferito a Torino nel 1970, dopo un anno trascorso a Strasburgo presso il Centro di Neurochimica del CNRS, diretto dal famoso professor Paul Mandel.

In tal modo vennero impiantate a Torino le più moderne tecniche di neurochimica di quell'epoca, che permisero di effettuare interessanti ricerche sperimentali sull'attività di farmaci del sistema nervoso sul metabolismo dell'RNA cerebrale. I primi risultati furono presentati già nel 1970 e nel 1971 ad importanti Congressi Internazionali.

A cavallo di quegli anni frequentarono l'Istituto numerosi giovani, molti dei quali avrebbero fatto una brillante carriera nell'industria o nell'attività privata, come Tino Cellerino, Paolo Prino, Marco Blisa, Sergio Mastroviti, Josè Franzone. Con tutti fu facile instaurare dei solidi rapporti di amicizia.

Nel 1974 il Professore Genazzani diventò il Direttore dell'Istituto di Farmacologia e Terapia Sperimentale. È di quel periodo un'intensa partecipazione ai congressi, come quello di Farmacologia di Helsinki, luglio 1975, al quale presero parte tra gli altri Paolo Portaleone e Eugenio Torre, oggi Professore Ordinario di Psichiatria a Novara.

Paolo Portaleone era entrato a far parte dell'Istituto nel 1973. Era un giovane entusiasta e desideroso di fare ricerca nel campo delle neuroscienze. Molto colto, come quasi sempre sono gli Ebrei, divoratore di libri d'ogni genere, pieno di idee originali e di progetti di ricerca all'avanguardia, brillante parlatore, affascinava facilmente ogni interlocutore, incluso il professore Genazzani ed una schiera di futuri docenti di Farmacologia, quali Carola Eva, Piera Ghi e Carlo Ferretti.

Da qualche anno era arrivato in Istituto, affiancando Antonio Crispino come tecnico, Beppe Conti, il quale, con grande forza di volontà e sacrificio, dapprima si laureò in Scienze Biologiche e, successivamente, conseguì la specializzazione in Patologia Generale. Beppe Conti ha partecipato attivamente per lunghi anni a tutte le più importanti ricerche effettuate dal gruppo Genazzani: le tecniche per il dosaggio dell'RNA cerebrale con mio fratello, le tecniche per la determinazione del legame degli ormoni steroidei con i recettori specifici con me, le metodologie di base non avevano segreti per lui. Intorno a lui sono cresciuti e si sono formati decine di giovani aspiranti farmacologi, dei quali è diventato il punto di riferimento non solo per il laboratorio, ma anche il confidente e l'amico, pronto sempre a "dare una

mano” spesso decisiva. Per il professor Genazzani e per tutti noi è stato un prezioso e fedele collaboratore. Per me anche un caro amico. Gli devo tanto per l’impegno profuso in laboratorio e per la totale dedizione all’Istituto di Farmacologia.

Nel 1975 mio fratello Raffaele risultò tra i vincitori del concorso nazionale per professore ordinario di Farmacologia. Fu uno dei più importanti riconoscimenti alla Scuola del professor Genazzani.

In quegli anni vide la luce il Dottorato di Ricerca in Farmacologia e Tossicologia: le elevate capacità diplomatiche ed organizzative del professor Genazzani, ma soprattutto il suo prestigio nell’ambito del mondo universitario, fecero confluire in esso docenti di 4 importanti Sedi universitarie (Torino, Pisa, Pavia, e Genova). Questo “consorzio” suggellò un solido patto di alleanza tra i docenti delle diverse Università destinato a durare nel tempo.

Nel 1976 arrivò in Istituto Ilario Viano, allievo di Ferdinando Dianzani, brillante professore di microbiologia, che si stava trasferendo all’Università di Roma. Ilario si occupava di antibiotici e chemioterapici e, pertanto, iniziò una proficua collaborazione con Loris Bononi. Diventò Assistente 2 anni dopo ed iniziò una notevole carriera universitaria che lo porterà a raggiungere vette prestigiose: prima, nel 1992, Preside della Facoltà di Medicina di Novara e poi, nel 1998, Rettore dell’Università del Piemonte Orientale.

Nel luglio 1978, pochi giorni dopo la nascita di Stefano, il 3° dei miei figli, si svolse a Torino un importante congresso internazionale intitolato “Pharmacological Modulation of Steroid Action” organizzato dal professor Genazzani e da me, che diede luogo anche ad una successiva pubblicazione della Raven Press. Questo congresso rappresentò un ulteriore grande successo internazionale del professor Genazzani e della sua Scuola, in particolare del mio gruppo di ricerca, che, a partire dal 1972, aveva iniziato ad occuparsi di recettori degli estrogeni e dei progestinici e dell’importanza della loro misurazione nei carcinomi della mammella ai fini di una scelta mirata del trattamento farmacologico da adottare in clinica. Le dottoresse Milla Reboani, Elena Gallo, Maura Giubertoni, Patrizia Marsanich, Paola Badino, e soprattutto Silvia Racca, sono state le principali componenti di questo gruppo di ricerca. Silvia Racca, mia allieva preziosa e prediletta, è stata sempre al mio fianco, sin dal momento in cui è entrata in Istituto per preparare la tesi di laurea. Silvia è oggi Professore Associato di Farmacologia e svolge la sua attività di ricerca e di didattica all’ospedale San Luigi Gonzaga di Orbassano, sede della seconda Facoltà di Medicina e Chirurgia dell’Università di Torino.

Il 1980 è stato un anno memorabile per me e per il professor Genazzani, perché sono risultato tra i vincitori del concorso nazionale per Professore

Ordinario di Farmacologia. Il Professore faceva parte della commissione giudicatrice. L'esito del concorso fu preceduto dalla consegna a me, a Verona, dell'Upjohn Award per la farmacologia, a riconoscimento dell'importanza dei nostri studi sui carcinomi della mammella svolti in collaborazione con gli amici e colleghi di Facoltà, professori Gigi Dogliotti ed Antonio Mussa. Ricordo ancora con affetto la profonda partecipazione emotiva all'evento da parte del professore Genazzani al momento della consegna del premio e, ancor più, della mia illustrazione dei risultati della ricerca, davanti ad una platea formata dai più importanti farmacologi italiani. Il successo dell'allievo era anche il successo del Maestro.

In quel periodo iniziava ad interessarsi ai tumori mammari anche mio fratello Raffaele, che da anni si occupava di studi sulla prolattina.

Con le ricerche sui recettori della prolattina iniziò la collaborazione di Raffaele con un giovane allievo che è rimasto al suo fianco per molti anni. Si tratta di Giampiero Muccioli, diventato, in seguito, ordinario di Farmacologia presso la Scuola Universitaria Interfacoltà di Scienze Motorie (più nota come SUISM).

Nel 1982 Raffaele ritornò a Napoli, lasciando in me un vuoto mai più colmato: con lui ho condiviso a lungo gioie e dolori della nostra famiglia (la morte della comune madre e quella di sua figlia, l'indimenticabile e dolce Giulia, ricercatore universitario presso l'Università di Napoli), così come successi ed insuccessi professionali. È stato per me un punto di riferimento fondamentale, nella vita e nella professione. È stato ed è un fratello eccezionale, un modello che ho cercato di imitare, anche se non sempre ne sono stato capace.

Nel 1990 arrivò a Torino, da Firenze, via Ferrara, Roberto Fantozzi.

Nel 1992 io venni eletto Preside di Medicina a Torino: impegno gravoso e difficile dopo un Preside mitico come il prof. Guido Filogamo. Ricordo ancora una volta la grande soddisfazione del professor Genazzani per il successo del suo allievo. Questa gioia fu ancora maggiore quando anche Ilario Viano, di lì a poco, diventò Preside a Novara. In quel periodo arrivò a Novara, da Firenze, Sandra Brunelleschi, come ricercatore. Nel 1994 il professore Genazzani andò in pensione.

Nel 1997-98 si svolse a Padova il concorso per 39 posti di professore associato. Il presidente della commissione, della quale facevo parte anch'io, fu un grande amico del professor Genazzani: Tito Berti, un vero Signore e grande farmacologo della Scuola padovana. Dei candidati torinesi i dottori Marco Orsetti, Sandra Brunelleschi e Carola Eva superarono l'ostacolo e diventarono professori associati. Qualche anno dopo Carola Eva e Sandra Brunelleschi, diventeranno professori di 1^a fascia, rispettivamente a Torino e a Novara.

Piero Canonico ed Armando Genazzani, figlio del professor Enrico, erano già da qualche anno a Novara nella Facoltà di Farmacia. Armando è attualmente Professore Associato.

Da quanto ho cercato di ricordare in questa sede, un po' affrettatamente ed in maniera superficiale ed incompleta, credo risulti evidente che il professor Genazzani, come il prof. Donatelli, è stato un vero Maestro della Farmacologia italiana, un Caposcuola. Numerosi sono i suoi allievi, diretti o indiretti, che hanno raggiunto l'apice della carriera universitaria: Raffaele Di Carlo, Giuseppe Pagnini, Francesco Di Carlo, Mario Eandi, Paolo Portaleone, Ilario Viano, Giampiero Muccioli e Carola Eva.

Desidero aggiungere, infine, che al Professor Genazzani, su proposta del Consiglio del 26 aprile 2001 della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Torino, che ha accolto la proposta del professor Giorgio Cavallo e mia (ero Preside all'epoca), fu conferito, nel dicembre dello stesso anno, il titolo di Professore Emerito di Farmacologia in riconoscimento dei suoi elevati meriti scientifici e didattici.



"Genazzani's day" 1 dicembre 2007.

Per concludere vorrei riportare il giudizio sull'uomo di uno dei suoi più fedeli amici (M.U. Dianzani, prefazione a "Sipari"): *"Enrico mi fu subito simpatico, appena lo conobbi, in parte perché era ebreo ed immaginavo che avesse molto sofferto per questo. Ma non solo per questo motivo. Mi piacque la sua intensa umanità, la sua semplicità, il distacco con cui valutava le cose, la riservatezza, che in lui giungeva quasi alla timidezza"*.

Per parte mia, desidero ricordare il Professore con la fotografia che segue, che lo ritrae sorridente, felice e commosso, accanto a me, in un'occasione particolarmente gradita, il "Genazzani's day", giornata di festa in suo onore, da me organizzata a dicembre del 2007 al San Luigi.

Al prof. Enrico Genazzani, a nome di tutti gli allievi, un grazie di cuore per tutto quello che abbiamo appreso da lui!

Francesco Di Carlo

COMMEMORAZIONE DEL SOCIO VALERIO GAI

Sig. Presidente, Cari Colleghi ed Amici, Gent.ma Sig.ra Gai,

Ho accettato volentieri di commemorare la figura di Valerio Gai, Socio ordinario di questa Accademia dal 2003, non soltanto come Collega dello stesso raggruppamento Scientifico Disciplinare, ma soprattutto perché a Lui mi legavano da tempo reciproci rapporti di stima e di amicizia.

Il prof Gai nacque a S. Damiano d'Asti il 14 gennaio 1939, si laureò in Medicina e Chirurgia nel 1964 presso la nostra Università con il massimo dei voti e con una tesi sulle reazioni vasomotorie periferiche. Consegui poi nel 1966 la specializzazione in Cardiologia, nel 1972 la libera docenza



in Patologia Speciale Medica e Metodologia Clinica e successivamente le idoneità a Primario di Medicina Generale e di Cardiologia.

Allievo della prestigiosa Scuola di Alessandro Beretta Anguissola, che fornì decine di Cattedratici e di Primari Ospedalieri, e non solo al Piemonte, frequentò dalla Laurea al 1970 come “Medico Interno con compiti didattici ed assistenziali” il mitico Istituto di Patologia Speciale Medica e Metodologia Clinica dell’Università di Torino e, anche se nel 1970 intraprese la carriera Ospedaliera presso l’Ospedale Valdese di Pomaretto, dapprima come Aiuto e poi, dal 1973 al 1989, come Primario di Medicina Generale, non abbandonò l’impostazione universitaria e l’attitudine ad insegnare. Dal 1989 al 1994 fu Primario di Medicina Generale presso l’Ospedale Edoardo Agnelli di Pinerolo e nel 1994 approdò alle Molinette come Direttore della Medicina d’Urgenza e del Pronto Soccorso e poi anche come Direttore del Dipartimento di Emergenza ed Accettazione. Non v’è dubbio che quest’ultimo passaggio ha costituito uno snodo fondamentale non solo per la sua vita professionale, ma soprattutto per l’Ospedale, nel quale portò una ventata di innovazione culturale e tecnologica, avendo intuito fra i primi in Italia la funzione nevralgica del sistema dell’emergenza non solo nell’ambito dell’Ospedale, ma anche sul territorio cittadino, e non solo; si dedicò infatti con passione alla formazione dei Medici e degli Infermieri, divenendo in ciò un punto di riferimento e promuovendo intensamente la diffusione dei corsi di BLS e di ACLS su tutto il territorio nazionale, con la formazione complessiva di centinaia di istruttori e di provider. Grazie a proficui contatti internazionali, ha inoltre organizzato, in collaborazione con la Harvard University, numerosi corsi di Airway Management per Medici d’urgenza in tutta Italia ed ha curato lo svolgimento di moltissimi corsi di Trauma Team nel DEA, di corsi sulla Ventilazione Meccanica non invasiva a pressione positiva in Emergenza-Urgenza, nonché di altri corsi sui temi della medicina d’urgenza e di pronto soccorso. Dal 1994 in poi è stato responsabile dell’organizzazione dei Corsi Regionali di Formazione per i Medici di guardia medica, ha formalizzato un contratto di formazione fra l’American Heart Association e la Società Italiana di Medicina d’Urgenza con sede principale per l’Italia a Torino ed è stato unico titolare della Italian Training Organization. Organizzò nella nostra Città numerosi convegni nazionali ed internazionali: di particolare rilievo sono stati il Congresso Nazionale di Medicina d’Urgenza, due edizioni delle Giornate Italo-Americane di Medicina d’urgenza, il Convegno Internazionale sulla Medicina dei Disastri, in collaborazione con l’American College of Emergency Physicians, ed il Congresso congiunto delle Società Italiana e Americana di Medicina d’Emergenza nel 2006. Come concreto riconoscimento

di questa intensa attività formativa, nel 2003 il Dipartimento di Emergenza ed Accettazione da lui diretto è divenuto referente per l'Unità di Crisi del Ministero della Sanità in caso di emergenze per le malattie infettive e, sempre nel 2003, il Prof Gai entrò a far parte del gruppo regionale per le emergenze infettive e punto di contatto per l'Unità di Crisi del Ministero della Salute.

La Sua attività didattica istituzionale si sviluppò fin dal 1995 come titolare del corso di insegnamento di Medicina d'Urgenza e Pronto Soccorso presso la Scuola di Specializzazione di Medicina Interna e, dal 2002, come Professore a Contratto di Medicina d'Urgenza nel Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia. La prematura scomparsa lo colse proprio nel momento in cui stava impostando la neoattivata Scuola di Specializzazione in Medicina di Emergenza-Urgenza.

Per quanto riguarda la Sua attività pubblicistica e scientifica, fu, fin dalla sua istituzione nel 1999 e sino alla fine della Sua vita, Direttore scientifico del Giornale Italiano di Medicina d'Urgenza e Pronto Soccorso. È stato membro del board e direttore responsabile della edizione italiana della rivista "Emergency Medicine Practice". È stato coordinatore e coautore di numerosi testi scientifici sui temi dell'Urgenza, tra cui ebbero ampia diffusione il "Medicina d'Urgenza Pratica e Progresso" edito nel 2001, e l'edizione italiana di "Neurologic Emergencies: a Symptom-Oriented Approach". Il prematuro decesso lo ha colto mentre era in corso di stesura il suo nuovo testo di Medicina d'Urgenza, che a breve, postumo, vedrà le stampe.

Come è del tutto evidente, l'obiettivo fondamentale del suo operare fu il miglioramento dei livelli di efficienza gestionale in Medicina d'Urgenza, obiettivo che raggiunse attraverso la formazione degli operatori e l'adeguamento tecnologico, che nel campo dell'emergenza è di importanza vitale, conferendo alla struttura da Lui diretta una connotazione di primo piano a livello nazionale. Reperì gran parte dei fondi per la costruzione di una nuova struttura di Medicina d'Urgenza ad avanzato livello tecnologico alle Molinette che purtroppo non ebbe il tempo di vedere e che tutti ci auguriamo venga presto attivata: sarebbe questo un concreto segno di omaggio alla Sua figura, e soprattutto un beneficio indiscutibile alla cittadinanza.

Il suo carattere non incline ai formalismi accademici, il suo atteggiamento pragmatico, il suo stile sobrio, l'apertura alle innovazioni, lo hanno caratterizzato come un tipico esponente della medicina ospedaliera subalpina. Con questa seppur lusinghiera connotazione sarebbe probabilmente stato ricordato se le circostanze connesse alla rapida evoluzione della Medicina dell'emergenza non avessero condizionato lo sviluppo della Sua carriera in ambito accademico, promuovendone la candidatura a Professore Ordinario e a

Direttore della Scuola di Specializzazione in Medicina d'Urgenza della nostra Università. Raggiunse il prestigioso traguardo della Cattedra universitaria nel 2007, mantenendo contestualmente la Direzione della struttura ospedaliera e del Dipartimento di Emergenza. Anche se gli mancò materialmente il tempo per dare vita ad una vera e propria Scuola universitaria dell'emergenza, non c'è dubbio che seppe formare con i suoi Collaboratori un gruppo di Professionisti di elevato livello e, dopo la Sua scomparsa, la Struttura di Medicina d'Urgenza e di Pronto Soccorso è tornata, in una corretta logica di integrazione propria di un'Azienda Ospedaliero-Universitaria, ad essere gestita da personale Medico ospedaliero che peraltro lui stesso aveva per anni diretto ed anche contribuito a formare.

Cari Colleghi, a conclusione di questo mio intervento non posso esimermi dal ricordo di una persona che lo ha accompagnato e sorretto in questo Suo percorso di vita professionale: quello di Lucetta Gastaldi con la quale, fin dagli anni dell'Università, stabilì un forte legame affettivo ed intellettuale, e che assistette con estrema dignità ed amore sconfinato nei lunghi anni della malattia e della sofferenza.

Come un uomo che ha caratterizzato la propria vita professionale con autorevolezza, generosità, lealtà, elevato livello etico e grande senso dell'amicizia vorrei ricordarlo a tutti voi, come forse a Lui sarebbe piaciuto, senza indulgere nella retorica, e rammentando i nostri scambi di opinione in Ospedale oppure nella casa dove entrambi abitavamo. Mi riferisco in particolare alla sua visione del Geriatra come figura inserita organicamente nel sistema dell'emergenza ed alla proficua collaborazione fra il Pronto Soccorso e l'Ospedalizzazione a domicilio, che favorì in ogni modo, e che ancora oggi è gestita dai Geriatri del nostro Dipartimento: anche in ciò mostrò una visione lungimirante e ben lontana dal concetto culturalmente superato secondo il quale alla Geriatria dovrebbe essere demandata esclusivamente la cura delle patologie croniche.

Sono sinceramente convinto che il lavoro assiduo, tenace e qualificato che Valerio affrontò nel corso di tutta la Sua vita resterà per tutti noi come un esempio di operatività clinica esemplare, di dedizione alle Istituzioni pubbliche, di attenzione particolare ai complessi problemi tecnologici, organizzativi e gestionali dell'Ospedale, ed in particolare alla formazione degli Operatori che curò in modo straordinario ben prima di assurgere alla Cattedra Universitaria; ebbe in tal modo a realizzare compiutamente quella sintesi operativa fra le funzioni istituzionali che devono caratterizzare la nostra attività di Professori Universitari: quella didattica, quella scientifica e quella assistenziale, cementate in Lui da un forte sentimento di attenzione

alle esigenze del malato e da una indiscutibile correttezza nei rapporti interpersonali.

A Lui devono gratitudine generazioni di Medici e di operatori sanitari, moltitudini di Pazienti e noi tutti, Colleghi ed Amici dell'Accademia di Medicina, dell'Università e dell'Ospedale penso possiamo, ricordando due versi di Umberto Saba,

*“.....ed è il pensiero
della morte che, in fine, ci aiuta a vivere”*

ringraziare Valerio, per averci, questa sera, aiutato a vivere.

Giancarlo Isaia

COMMEMORAZIONE DEL SOCIO ROBERTO PATTONO

È mancato il 30 Agosto 2009 il Prof. Roberto Pattono. Era nato a Torino il 18 ottobre 1934.

Dopo la maturità presso il Liceo Scientifico di Alessandria, conseguì la Laurea in Medicina e Chirurgia all'Università degli Studi di Torino a pieni voti nel 1961, e la Specialità in Anestesiologia nel 1963 (a quel tempo il corso era di 2 anni) a pieni voti assoluti. Nel frattempo divenne Allievo interno e in seguito Assistente volontario presso la clinica Chirurgica dell'Università di Torino. Nel 1964 divenne Assistente di ruolo “con



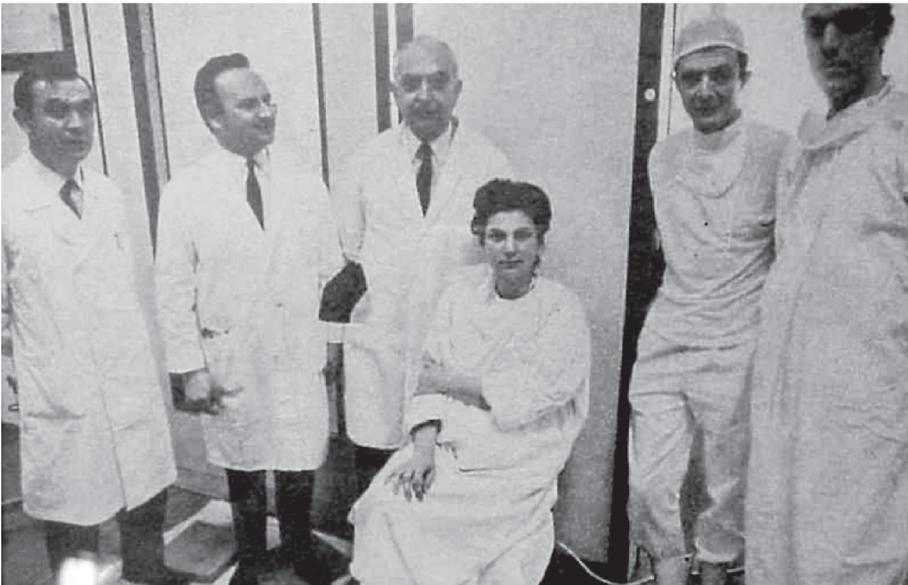
mansioni di anestesista". Nel 1965 conseguì a Roma la Libera Docenza in Anestesiologia e Rianimazione. Divenne Professore Aggregato di Anestesiologia e Rianimazione presso l'Università di Torino dal 1 Novembre 1971, nel 1973 Professore straordinario nella stessa disciplina, dal novembre 1976 Professore Ordinario.

Il prof. Pattono è stato autore di numerose pubblicazioni nei vari campi della disciplina, coautore del primo Trattato Italiano di Rianimazione e di una monografia sulla genesi e protezione dall'inquinamento da gas e vapori anestetici negli ambienti operatori.

La sua attività clinica si è svolta inizialmente presso il centro di Cardio Chirurgia, di Chirurgia toraco-polmonare, di Chirurgia generale nell'ambito di tutte le specialità afferenti alla disciplina, sempre con compiti direzionali. Ha svolto un periodo di perfezionamento presso il Karolinska Institut di Stoccolma.

Ha effettuato la valutazione di idoneità delle strutture di un Ospedale privato a Beirut, e la collaborazione per la costruzione e l'ottimizzazione del progetto iniziale per la costruzione di un Ospedale Universitario presso l'Università Austral nel distretto di Buenos Aires.

È stato il progettista della prima autoambulanza di rianimazione costruita in Italia.



Il celebre anestesista Ciocatto e i suoi collaboratori Elsa Margaria, Pattono e Martini.

Ha progettato e seguito la costruzione di apparecchi per circolazione extra corporea, di camere iperbariche mono e pluri posto e dell'arredo tecnico per i centri di rianimazione.

Per circa 15 anni ha diretto il Servizio di Anestesia e Rianimazione dell'Ospedale Maggiore San Giovanni Battista e della Città di Torino. In tale periodo ha istituito il reparto di Terapia Intensiva Rianimatoria.

Dal dicembre 1982 fino al 2000 ha diretto l'Istituto e la relativa Scuola di Specializzazione, mantenendo la docenza specifica presso altre Scuole di Specializzazione della Facoltà di Medicina e Chirurgia.

Ha preso parte a vari congressi Mondiali WFSA.

Ha organizzato molteplici convegni e riunioni scientifiche nazionali, è stato tre volte Vice Presidente della S.I.A.A.R.T.I. (Società Scientifica di Anestesiologia, Rianimazione e Terapia Intensiva).

Nel 1997 è stato organizzatore e Presidente del 51° congresso Nazionale della SIAARTI.

È andato fuori ruolo nel 2004, continuando ad interessarsi della evoluzione della disciplina anche con l'attuale Direttore dell'Istituto di Anestesiologia e Rianimazione dell'Università di Torino, prof. Vito Marco Ranieri.

L'Accademia di Medicina di Torino lo ha nominato Socio emerito dal 25 gennaio 2009.

Roberto Pattono possedeva, oltre ad un notevole intuito clinico, un dono raro e strettamente legato all'entusiasmo con il quale affrontava il suo, il nostro lavoro: una eccezionale capacità di progettare e fare funzionare macchinari, ventilatori, monitor e tutto ciò che di meccanico e tecnico è importante nell'assistenza al paziente in Sala Operatoria e in Rianimazione.

Lavorava indefessamente, non gli ho mai sentito un moto di stanchezza o di insofferenza, anche dopo ore e ore di Sala Operatoria.

Nel corso di tanti anni di lavoro ho personalmente apprezzato, oltre alla simpatia e al senso dell'umorismo che lo contraddistinguevano, la sua semplicità piemontese, nei confronti di tutti, non solo dei pazienti, ma anche dei colleghi, fino al più giovane degli specializzandi, l'assoluta correttezza, l'onestà adamantina, che gli hanno meritato l'affetto e la stima di quanti lo hanno conosciuto.

Trovava sempre il tempo per chiunque, anche l'ultimo arrivato tra gli allievi, per ascoltare, per spiegare, per aiutare senza farlo pesare, con la naturalezza del vero signore.

Apprezzava, oltre alla parte scientifica, anche l'aspetto conviviale delle riunioni accademiche. Gli piaceva la buona cucina, e amava spolverare

abbondantemente il cibo di peperoncino, che offriva anche a chi gli stava accanto, attingendo ad un astuccio apposito che portava sempre con sé.

Nella chiesa gremita, al suo funerale, oltre ai tanti amici, suoi, di Sarina e dei suoi due splendidi ragazzi, Roberta e Daniele, oltre ai colleghi di lavoro di tutta la vita, numerosi erano i chirurghi: e questo è il più significativo segnale di stima per un anestesista!

Lo ricordiamo riportando le sue parole, espresse sulla prefazione di un libro del'UNI3, che bene illustrano quella che era la sua filosofia di vita.

“Finalmente sono in pensione ed al mattino, dopo il caffè, apro un settimanale arrivato ieri e sulla copertina trovo un titolo piacevole: “Così pagavano le tangenti Telecom”. L'articolo ne spiega le modalità. Su un quotidiano trovo la descrizione quasi a fumetti di una sparatoria da parte di uno studente nella sua scuola con il risultato di morti e feriti”.

Questi sono solo esempi della misura di quale sia la nostra produzione maggiore: il degrado economico e sociale che obbliga per molte persone delle condizioni di vita più basse rispetto a quelle comunitarie.

Non ho mai letto per intero il Codice penale e civile, ma credo che non compaia mai la parola “degrado”. Credo che dovremmo definirlo “il signor Degrado” che, quasi sempre impunito, si occupa di tutto a spese nostre svolgendo attività in ogni campo della nostra quotidianità.

Se questo è un nostro primato, noi ne abbiamo creato, svezato e moltiplicato uno tutto nostro che si chiama “Università della Terza Età”. Dai pochi che eravamo agli inizi, ora siamo molte migliaia e diffusi non solo in Italia ma anche in molti altri paesi. Questa Accademia accoglie persone di ogni estrazione sociale portandoci le loro esperienze di vita vissuta, di culture diverse e portandoci anche proposte di miglioramento per la nostra attività. Tutto ciò ci è indispensabile per sconfiggere il nostro grande nemico: il “Signor Degrado”.

L'intenzione è quella di diffondere una CULTURA adeguata, l'AMICIZIA, la SOLIDARIETÀ, e principalmente l'UMANITÀ che, alla fine è il corollario della nostra attività.

Elsa Margaria

COMMEMORAZIONE DEL SOCIO FRANCO MOLLO

Ringrazio il Presidente della nostra Accademia di Medicina di avermi voluto affidare il compito grato, anche se doloroso, di ricordare Franco Mollo con cui ho condiviso molti anni di vita scientifica e accademica e che mi ha onorato della sua amicizia.

Franco Mollo, Professore Ordinario di Anatomia Patologica e Professore Emerito presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Torino, socio dell'Accademia di Medicina di Torino ci ha lasciati il 29 luglio 2009, dopo una lunga malattia affrontata con serenità e sopportata con stoicismo.

Laureatosi in Medicina e Chirurgia nel 1954 ha percorso tutta la carriera accademica nell'Ateneo torinese, come assistente del Prof. Mottura, come Professore Aggregato e infine come Professore Ordinario, lasciando il servizio nel 2002.

Franco Mollo è stato docente lucido e rigoroso per generazioni di medici e di specializzandi, sempre attento a sottolineare il significato e l'utilità clinica dello studio anatomopatologico accurato, soprattutto ai fini prognostici e per scopi terapeutici. Significativi in tal senso già i primi studi della fine degli anni '50 su casistiche di melanomi o tumori dell'osso che si inserivano nel filone emergente delle indagini di surgical pathology le quali avrebbero avuto grande sviluppo e rilevanza negli anni successivi.

Curioso di quanto la tecnologia metteva a disposizione della diagnostica e della ricerca, fin dai primi anni '60 s'interessò delle applicazioni della microscopia elettronica in Anatomia Patologica, condividendo esperienze stimolanti e ricche di speranze con i pochi colleghi italiani allora interessati alla patologia ultrastrutturale. Si fece carico della creazione e quindi della direzione del Centro di Microscopia Elettronica dell'Istituto di Anatomia Patologica dove si svolsero, fra le altre, ricerche sulla patologia ultrastrutturale dei linfomi, dei carcinomi polmonari, dei tumori del tessuto nervoso periferico, dell'epatite virale e delle malattie del muscolo striato.

Il suo interesse era anche rivolto ai nuovi campi della diagnostica e della ricerca anatomopatologica che si andavano aprendo in quegli anni. Fu tra i primi a cogliere le potenzialità di nuove tecniche di prelievo dei tessuti, in particolare dell'agobiopsia, una procedura vista negli anni '60 con sospetto da molti anatomopatologi, in quanto ritenuta poco attendibile per l'esiguità del materiale fornito e che invece si sarebbe dimostrata un potente mezzo, capace di rivoluzionare le nostre conoscenze sulle alterazioni degli organi nelle varie fasi della malattie. Si rese quindi disponibile a questa sfida, appassionandosi allo studio delle malattie non neoplastiche epatiche e renali. Particolarmente approfonditi e ricchi di risultati rilevanti furono gli studi sulle glomerulopatie, condotti anche con tecniche immunoistochimiche e ultrastrutturali, in cui seppe coinvolgere allievi e collaboratori. In questa, come in altre occasioni, è emersa la capacità di motivare i giovani, di suscitare interesse ed entusiasmo, formando un gruppo che avrebbe continuato il percorso quando i suoi interessi si orientarono altrove.

La capacità di cogliere il nuovo non era però disgiunta da quella di aver ben presente il significato e l'attualità della tradizione. Ne è testimonianza l'importanza attribuita alla pratica autoptica che ha insegnato, non solo e non tanto negli aspetti tecnici, ma soprattutto in quelli scientifici, collegati alla correlazione anatomoclinica e alla valutazione epidemiologica, a generazioni di specializzandi. Era radicato in Lui il concetto della preminenza dell'idea sul mezzo, che ribadiva sottolineando l'identica dignità delle sofisticate tecniche di biologia molecolare e del coltello del settore.

Questi molteplici interessi erano espressione di un'irrequietezza intellettuale e della propensione a scegliere nuovi obiettivi da affrontare con immutato acume e rigore. Gli interessi scientifici volsero, a partire dalla fine degli anni '70, verso la patologia ambientale polmonare, collegando idealmente la propria ricerca con quella della Scuola, e in particolare del suo maestro Prof. Mottura. I frutti di indagini più che ventennali sono documentate da oltre 50 pubblicazioni su riviste internazionali, prevalentemente relative alla patologia da asbesto (mesoteliomi, asbestosi minima), ma anche al carcinoma polmonare e alla bronchite cronica. Sono questi campi indagati a fondo, in cui la valutazione anatomopatologica si associa a indagini epidemiologiche e a correlazioni anatomocliniche, in cui le procedure spaziano dalla microscopia elettronica, alla immunoistochimica, alla semplice e tradizionale indagine autoptica.

In questo stesso atteggiamento intellettuale anticonvenzionale si collocano anche la sottolineatura e il richiamo alla non univocità del giudizio diagnostico, al comprendere l'esistenza della componente soggettiva della valutazione, soprattutto quando l'approccio diventa "fine" ed ultraspecialistico.

Lungi dall'essere un cultore del relativismo, seppe tuttavia infondere la consapevolezza di quanto oggi viene riportato sulla variabilità diagnostica inter e intra-osservatore e sul *bias* che spesso è correlato alla applicazione di tecniche sofisticate di laboratorio.

La competenza e l'impegno professionali non si sono esauriti con l'uscita dal mondo accademico, ma hanno continuato a trovare applicazione pratica offrendo il supporto tecnico alla magistratura torinese impegnata a contrastare l'inquinamento dell'ambiente e del mondo del lavoro. Emergeva anche in queste situazioni la capacità di un approccio razionale, di offrire dimostrazioni documentate e rigorose, valutazioni equilibrate, prive di spirito fazioso, qualità riconosciute anche da chi, nell'occasione, costituiva la parte avversa.

Se gli interessi nel campo della ricerca scientifica rappresentarono una rilevante parte della sua attività accademica e professionale, è fuor di dubbio che quello didattico fu un impegno prioritario e, in alcuni momenti, anche prevalente, da onorare con lo scrupolo nella preparazione delle lezioni e nella disponibilità al confronto. Franco Mollo amava insegnare, sempre disponibile e attento nei confronti dei suoi studenti e di chiunque avesse sete di apprendimento. Egli ha incarnato il vero senso dell'essere Professore Universitario. Ne è testimonianza l'unanime apprezzamento di centinaia di studenti che, diventati in seguito professionisti, continuavano e continuano a ricordarlo con stima. Sotto questo profilo, fu l'antitesi di quanti considerano gli studenti come fastidiosi soggetti che sottraggono tempo a più elevate attività di ricerca o a più remunerativi impegni professionali. La passione per la didattica e la pedagogia lo portarono ad essere negli anni '80 tra i promotori della nascita della Società Italiana di Pedagogia Medica e a partecipare con grande impegno ai lavori promossi dalla neonata Fondazione Smith Kline sul rinnovamento e sulla rimodulazione del corso di studi in Medicina e Chirurgia.

Un ulteriore lascito riguarda l'attenzione verso tutto ciò che, sul piano relazionale, gestionale ed organizzativo, è correlato ad un efficiente ed efficace svolgersi delle attività assistenziali. Franco Mollo ha insegnato, con l'esempio, ai suoi allievi che non si rimanda a domani una diagnosi che può essere formulata e firmata oggi, che non bisogna avere timore di chiedere un parere o una consulenza a un collega, che è molto utile avere un colloquio con i parenti di una persona sottoposta ad autopsia per sgomberare timori e false credenze e per spiegare le cause dell'evento. In sintesi, egli ha insegnato un metodo di lavoro organizzato, non estemporaneo, non individualistico, e uno stile di direzione pacato, ma fermo, basato sull'analisi dei problemi, sul coinvolgimento di tutto il personale, medico tecnico e amministrativo, sulla scelta finale delle decisioni.

La sua personalità non si esauriva nell'attività professionale, ma era aperta verso la cultura e la politica. Chi gli è stato vicino e ha convissuto gli anni della contestazione, può testimoniare la rielaborazione dei fermenti e delle istanze proprie del tempo che, assolutamente estranea allo spirito barricadiero e talora intellettualmente approssimativo, lo ha portato a considerare l'impegno politico come un dovere civile, vissuto anche con fatica e certamente senza vantaggi personali.

Ricca è l'eredità professionale, didattica e scientifica lasciata non solo ai più stretti collaboratori, ma anche a tanti allievi e colleghi, non solo anatomopatologi. È stato un esempio di costante impegno nella faticosa attività quotidiana, di capacità di confronto franco, talora anche duro, ma sempre equilibrato, di razionale approccio ai problemi intellettuali e pratici, di disponibilità a farsi carico di compiti magari poco gratificanti. È bello però, alla fine di queste righe ricordare come, fra le pieghe di una personalità seria e forse anche all'apparenza un po' austera, si celassero un'allegria di fondo che affiorava nei momenti più imprevedibili e una fine ironia (e autoironia) che facilitavano il rapporto interpersonale e aiutavano a superare differenze di età e di posizione accademica e professionale.

Per chi ha avuto il privilegio e la fortuna di affiancarlo per molti anni, accanto, e oltre, alla figura dell'accademico e del ricercatore è manifesta quella di un uomo che con rigorosa razionalità, serena capacità di giudizio ed equilibrato comportamento ha saputo misurarsi con le evenienze della vita, fino ad affrontare serenamente (e infondendo serenità anche a quanti lo circondavano) la malattia che ha portato a concludere la sua presenza fra noi.

Guido Monga

NUOVI SCENARI IN VIROLOGIA CLINICA: LA GESTIONE DEL PAZIENTE IMMUNOCOMPROMESSO

Rossana Cavallo

Professore Ordinario di Microbiologia e Microbiologia Clinica
Università degli Studi di Torino
Direttore della Struttura Complessa Virologia Universitaria
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino

Key words: *Virus / Virus*
 Transplant / Trapianto
 Herpesvirus / Herpesvirus
 Polyomavirus / Polyomavirus

Abstract:

Viruses have always played a relevant part in human history. New viruses, previously unrecognized as human pathogens, periodically appear on the world scenario, such as HIV, SARS-coronavirus and pandemic influenza virus H1N1 in 2009. In the meanwhile, the growing number of transplantations and the introduction of deeply immunosuppressive drugs have lead to an absolute increase of the clinical impact of both classic and emergent viruses. Host immune defenses are fundamental to contain viral replication, as confirmed by the severity of these infections in the immunocompromised host.

Primary objective in these patients is prevention and timely treatment of infections, that represent the more severe complication of long-term immunosuppressive therapies. In this context, the most relevant pathogens are represented by cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, polyomavirus BK and several other viruses that are acquiring growing importance. In these patients, progression toward disease is determined by several factors, related to host, transplanted organ, and the virus. These complex interactions are modulated by immunosuppression level and its impact on virus-specific cellular immune response.

The optimal clinical-diagnostic approach has to evaluate the level of viral replication for an early diagnosis and initiation of pre-emptive treatment in the presence of a defined viral load cut-off, as well as the virus-specific T-cell immune response. Protocols of immunological monitoring can be useful to identify patients with a reduced or delayed reconstitution of immune response, that are at higher risk of developing viral disease and in which a pre-emptive treatment can be initiated. In this review, advancements in virological diagnosis and state of the art at the beginning of the 21th century will be

described. The challenge in clinical virology is to understand the real impact of each virus and to interpretate the laboratory data in the context of each patient.

Riassunto:

I virus fanno parte della storia dell'uomo ed hanno giocato un ruolo importante in tutte le epoche. Sullo scenario mondiale periodicamente compaiono virus non riconosciuti in precedenza quali agenti patogeni umani, quali l'HIV, il virus della SARS e il ceppo influenzale pandemico H1N1 del 2009. Allo stesso tempo, l'aumento del numero dei trapianti e l'introduzione di potenti terapie immunosoppressive ha condotto a un incremento assoluto dell'impatto clinico di virus sia classici sia emergenti. Le difese immunitarie dell'organismo sono fondamentali per contenere la replicazione virale, come confermato dalla gravità di tali infezioni nell'ospite immunocompromesso.

L'obiettivo primario in questi pazienti è la prevenzione e il trattamento tempestivo delle infezioni, che rappresentano la complicanza più grave delle terapie immunosoppressive a lungo termine. In questo ambito, il patogeno più rilevante è il Citomegalovirus, ma anche il virus di Epstein-Barr, il polyomavirus BK e numerosi altri virus stanno acquisendo crescente importanza. La progressione verso la malattia in questi pazienti è determinata da diversi fattori relativi all'ospite, all'organo trapiantato e al virus. Queste complesse interazioni sono modulate dal livello di immunosoppressione e dall'impatto di questa sulla immunità cellulare virus-specifica.

L'approccio diagnostico-clinico ottimale deve valutare sia l'entità della replicazione virale per una diagnosi precoce che consenta un trattamento preventivo in presenza di determinati livelli di carica virale; sia la risposta immunitaria T-linfocitaria virus-specifica. Protocolli di monitoraggio immunologico possono essere utili per identificare pazienti con una ridotta o ritardata ricostituzione della risposta immunitaria che sono quindi maggiormente predisposti a sviluppare malattia e in cui può essere attuato un trattamento preventivo.

In questa review sarà descritta l'evoluzione della diagnosi virologica nel paziente immunocompromesso e lo stato dell'arte agli inizi del 21° secolo. La sfida in virologia clinica è comprendere il reale impatto di ciascun virus e interpretare il dato virologico nel contesto del singolo caso clinico.

INTRODUZIONE

La Virologia è una disciplina relativamente giovane; infatti, le prime osservazioni e ipotesi sull'esistenza dei virus risalgono agli esperimenti di fine '800 (1892-1898) di Dimitri Ivanovski e di Martinus Beijerinck sulla filtrabilità del virus del mosaico del tabacco.

Tuttavia, i virus fanno parte della storia dell'uomo e con esso sono co-evoluti. Esistono prove che dimostrano che fin dall'antichità l'uomo era affetto da infezioni virali. Già Omero nell'Iliade descriveva Ettore come "cane pazzo" ovvero rabico, cioè infettato dal virus della rabbia. Alcune leggi della Mesopotamia redatte prima del 1000 a.c. descrivevano le responsabilità dei possessori di cani affetti da rabbia; la loro esistenza indica che già a quei tempi era nota la trasmissibilità di tale patologia.

Un geroglifico egizio della 18ª dinastia (circa 1500 a.c.) rappresenta un sacerdote con paralisi flaccida a un arto inferiore, lesione tipica della poliomielite. La mummia del Faraone Ramsete V, vissuto circa 3000 anni or sono, presenta delle lesioni del tutto simili a quelle che residuano a una infezione vaiolosa. Anche la febbre gialla, malattia caratterizzata da epatite e febbre emorragica è causata da un Flavivirus che viene trasmesso all'uomo tramite la puntura di un insetto vettore ed è nota da secoli. Questa malattia che ha costituito il flagello del commercio africano, è stata probabilmente anche all'origine della leggenda della nave maledetta "Flying Dutchman", il cui equipaggio venne decimato dalla malattia⁽¹²⁾.

Il termine *virus* deriva dal greco e significa veleno. Questi agenti vennero inizialmente descritti da Edward Jenner nel 1798. Nel diciannovesimo secolo tutti gli agenti infettivi erano considerati virus finché Robert Koch non sviluppò le tecniche di coltura pura che consentirono l'individuazione e la crescita dei batteri.

A fine 1800 i batteri furono purificati e riconosciuti come agenti patogeni distinti dagli "agenti filtrabili". I primi virus umani descritti furono il picornavirus responsabile della foot and mouth disease (1898), il virus della febbre gialla (1900) e il retrovirus oncogeno del sarcoma di Rous (1906).

I virus hanno giocato un ruolo importante nella storia dell'uomo in tutte le epoche, condizionandone l'evoluzione etnica e sociale:

- negli ultimi 1000 anni: vaiolo e morbillo furono importati in Nord e Sud America dai primi esploratori e conquistatori europei. Queste patologie, verso cui i nativi americani non possedevano immunità acquisita, uccisero un'ampia percentuale della popolazione contribuendo alla decimazione di queste società;

- negli ultimi 100 anni: nel 1918-19 un ceppo influenzale uccise 20 milioni di persone; un decennio dopo la poliomielite divenne una delle più temibili infezioni in bambini e giovani adulti;
- nell'ultimo ventennio del XX secolo: un nuovo virus con letalità ~100%, HIV, si è rapidamente diffuso nel mondo.

Ciascun virus oggi presente sul pianeta rappresenta in realtà il risultato dei continui fenomeni evolutivi, che lo stesso virus ha subito nei secoli.

La Virologia è, quindi, testimonianza in tempo reale dell'evoluzione, con comparsa continua di nuovi mutanti che costituiscono la sfida a cui è chiamata l'attività di ricerca e di diagnostica clinica.

Sullo scenario mondiale periodicamente compaiono virus che non avevano in precedenza mai causato patologia nell'uomo, denominati pertanto *virus emergenti*. Basti pensare negli ultimi anni alla diffusione globale dell'HIV, ma anche a casi sporadici, a carattere epidemico o pandemico, di infezioni virali comparse nello scenario clinico: il virus della SARS o il virus dell'Influenza aviaria e il ceppo pandemico del virus dell'influenza A H1N1 nel 2009.

Accanto a questi, con l'aumento del numero dei trapianti e l'introduzione di potenti terapie immunosoppressive si è assistito a un incremento assoluto dell'impatto clinico di virus sia classici sia emergenti. In questo scenario, infatti, virus che possiamo definire *classici* o *antichi* come gli Herpesvirus e i Polyomavirus, che da sempre convivono e coesistono con l'uomo, sono emersi come responsabili di importanti patologie in grado di condizionare il decorso e la sopravvivenza del paziente trapiantato e immunocompromesso.

Analogamente, anche nell'ambito della diagnostica sono stati compiuti progressi enormi, tanto che attualmente il monitoraggio virologico e viro-immunologico e la terapia preventiva sono cardini fondamentali nella gestione clinica, così come le tecniche attuali consentono di evidenziare agenti virali il cui ruolo clinico deve ancora essere definito.

La comprensione dell'attività patogena dei virus deve essere valutata sulla base dello studio delle *interazioni virus-ospite*, che si presentano molto complesse, e della *pressione selettiva*, che è stata esercitata in numerose generazioni di ospiti e che ha condotto a complesse modificazioni dei ceppi virali esistenti.

L'uomo è continuamente esposto ai numerosi virus presenti nell'ambiente o soggetti a trasmissione interpersonale, pertanto dovrebbe andare incontro a continui fenomeni di contagio, e di conseguenza sviluppare malattia; tuttavia ciò accade solo di rado, o meglio solo di rado si assiste al manifestarsi della malattia conclamata. Verosimilmente, il contagio si attua sempre e in larga

misura, ma gli esiti patologici nella maggioranza dei casi non si manifestano. Questo può accadere perché le cellule dell'ospite spesso non sono suscettibili all'infezione o non permissive alla replicazione virale o, alternativamente, perché il sistema immunitario riesce a contenere la replicazione virale.

L'importanza delle difese immunitarie dell'organismo ospite è confermata dalla gravità delle infezioni virali nell'ospite immunocompromesso e dalla pressoché diretta proporzionalità del livello complessivo di immunocompromissione.

PRINCIPALI AGENTI VIRALI NEL PAZIENTE SOTTOPOSTO A TRAPIANTO

L'obiettivo primario nei pazienti sottoposti a trapianto d'organo è la prevenzione e il trattamento delle infezioni, che rappresentano la complicanza più grave delle terapie immunosoppressive a lungo termine.

Il patogeno virale più importante in questo contesto è il citomegalovirus (CMV). Questo virus appartiene alla famiglia delle *Herpesviridae* ed è diffuso ubiquitariamente nella popolazione generale. La caratteristica principale degli herpesvirus è la latenza; dopo l'infezione primaria, il virus non viene eliminato dall'organismo, ma rimane latente in diversi tipi di cellule e tessuti, e può andare incontro a ripetute riattivazioni nel corso della vita, sia nel soggetto immunocompetente (peraltro senza manifestazioni cliniche), sia nel paziente immunocompromesso. In quest'ultimo caso, la replicazione virale può diventare incontrollata conducendo all'insorgenza di segni/sintomi di malattia sistemica o d'organo. Mentre con il termine infezione da CMV si fa riferimento al riscontro laboratoristico del virus, la malattia da CMV viene definita sulla base dei seguenti riscontri: dimostrazione del virus in campioni clinici in presenza di sintomi quali febbre, dolore muscolare, leucopenia, trombocitopenia o interessamento d'organo (ad esempio: epatite, ulcere gastrointestinali, polmonite, retinite, interessamento del sistema nervoso centrale, nefrite, miocardite, cistite o pancreatite)⁽⁸⁾.

Dal momento che esistono farmaci antivirali specifici per il CMV, tanto più efficaci quanto più precoce è l'inizio della terapia (idealmente allo stato di infezione, prima dell'insorgenza di malattia), punto fondamentale del controllo dell'infezione è la diagnosi precoce che consente una gestione terapeutica ponderata. La diagnosi precoce di infezione da CMV può essere effettuata utilizzando sia tecniche classiche che tecniche molecolari.

L'isolamento virale classico, attuato mediante infezione di cellule suscettibili in coltura e rilevamento dell'effetto citopatico a distanza di numerosi giorni,

risulta poco utile ai fini della gestione clinica, in considerazione della lunghezza dei tempi. Più recentemente sono state sviluppate tecniche di *isolamento rapido*. Questo può essere effettuato a partire da differenti campioni clinici, in particolare da leucociti polimorfonucleati del sangue periferico (in questo caso il saggio prende il nome di *viremia*), ma anche da campioni biologici, quali ad esempio il lavaggio broncoalveolare nel caso si sospetti una polmonite da CMV. Il test si attua infettando fibroblasti di polmone embrionario umano (human embryonic lung fibroblasts, HELF) in coltura e successivamente dopo 24 ore eseguendo un saggio di immunofluorescenza indiretta utilizzando un anticorpo monoclonale che riconosce la proteina immediata-precoce del virus (IE p-72). L'entità della carica virale viene determinata sulla base del numero di fibroblasti positivi infettati con 200.000 leucociti. Un isolamento virale positivo dimostra la presenza di virioni infettanti maturi, questo test si negativizza all'inizio della terapia antivirale rappresentando quindi un utile e rapido mezzo per identificare l'efficacia del trattamento instaurato⁽¹¹⁾.

Il saggio dell'*antigenemia* consiste nella ricerca della fosfoproteina strutturale di matrice del CMV pp-65 nei granulociti polimorfonucleati circolanti mediante immunofluorescenza indiretta. Si tratta di una metodica semiquantitativa in quanto il risultato viene fornito come numero di cellule positive su 200.000 leucociti utilizzati per il test. Da notare che si utilizzano i granulociti polimorfonucleati in quanto, pur non essendo un sito di latenza del virus, durante l'infezione acuta sono il principale "carrier" virale. La pp-65, sintetizzata in notevole eccesso a livello delle cellule endoteliali, viene trasferita ai leucociti in seguito a fenomeni di adesione all'endotelio da parte dei leucociti circolanti⁽¹¹⁾.

Le *metodiche molecolari* prevedono la quantificazione dell'acido nucleico virale (DNA) mediante real-time PCR, cosiddetta CMV-DNAemia, che rispecchia direttamente la replicazione virale e può fornire "cut-off" di riferimento per discriminare le infezioni autolimitanti da quelle a rischio di sviluppo di malattia. È stato definito un "Consensus" nazionale e internazionale per la gestione dell'infezione da CMV con quantificazione su sangue intero che rappresenta un campione ottimale per l'elevata resa e l'elevata sensibilità⁽⁸⁾.

Il controllo dell'infezione/malattia da CMV nel post-trapianto viene attuato utilizzando la terapia antivirale specifica secondo tre modalità differenti: *profilassi*, *terapia "pre-emptive"* e *trattamento della malattia*. Nel caso della profilassi i farmaci antivirali sono somministrati prima della comparsa dell'infezione per prevenirla; nei soggetti sottoposti a trapianto è indicata nei casi in cui venga somministrato tra i farmaci immunosoppressori anche il siero anti-linfocitario o nei casi in cui il matching sierologico

donatore/ricevente (D/R) sia ad alto rischio (D+/R-), anche se in realtà tale profilassi non sia efficace nelle infezioni primarie. La terapia “Pre-emptive” o preventiva prevede l’inizio della somministrazione del farmaco antivirale al primo segno di infezione da CMV. Rispetto alla profilassi, la terapia “pre-emptive” presenta il vantaggio di sottoporre a trattamento un numero minore di pazienti con una minore probabilità di insorgenza di possibili resistenze (resistenza al farmaco antivirale, ganciclovir) e sono tutti concordi che sia meglio prevenire che non trattare una malattia conclamata. Il trattamento della malattia conclamata prevede l’inizio della terapia antivirale all’occorrenza della sintomatologia.

Il trattamento “pre-emptive” viene solitamente iniziato in presenza di livelli predeterminati di carica virale nei soggetti sottoposti a trapianto d’organo (cosiddetti cut-off per l’inizio della terapia “pre-emptive”). È quindi fondamentale basarsi sui dati quantitativi ottenuti mediante tecniche di diagnosi precoce caratterizzati da caratteristiche operative ottimali in termini di elevato valore predittivo positivo, quali l’antigenemia o la PCR quantitativa su sangue intero per l’infezione sistemica e la PCR su campioni clinici diversi in caso di malattia d’organo (ad es. lavaggio broncoalveolare per la localizzazione polmonare)⁽⁸⁾.

Accanto al monitoraggio virologico, negli ultimi anni ha acquisito crescente importanza il *monitoraggio viro-immunologico* (risposta immunitaria virus-specifica). La risposta cellulare T è il principale fattore responsabile del controllo dell’infezione da CMV. La severità dell’infezione/malattia e l’estensione della compromissione d’organo sono inversamente correlati allo sviluppo e alla ricostituzione di una efficiente risposta dei linfociti T sia helper (CD4+) sia citotossici (CD8+). Nell’immunocompromesso, la ricostituzione precoce della risposta cellulare previene o abbrevia la durata dell’infezione, evitando quindi lo sviluppo di malattia o recidive. Viceversa, una risposta cellulare tardiva o ridotta è la base patogenetica di episodi ricorrenti di infezione e malattia sintomatica (in assenza di trattamento antivirale). Per il controllo dell’infezione si devono sviluppare sia la risposta CD4+ sia quella CD8+. Il contemporaneo “follow-up” virologico e viro-immunologico dei pazienti sottoposti a trapianto può migliorare la gestione dell’infezione nei pazienti trapiantati evitando uno stretto monitoraggio/trattamento virologico in pazienti con una efficiente risposta T⁽⁸⁾.

In base al profilo temporale della ricostituzione della risposta cellulare, i pazienti possono essere suddivisi in “*early responders*”, con ricostituzione della risposta cellulare a 30 giorni dal trapianto, e “*late responders*”, con ricostituzione della risposta cellulare dopo >30 giorni dal trapianto e/o

risposta ridotta o persistentemente assente. Nei “late responders” sembra particolarmente critico il ritardo della risposta CD4+. I pazienti che sviluppano precocemente una risposta linfocitaria specifica verso il CMV (entro i 30 giorni) non sono a rischio di malattia e sono in grado di controllare l’infezione senza l’impiego di antivirali, in questo caso si può procrastinare il trattamento con un risparmio in termini economici e gestionali evitando anche il rischio di eventuali insorgenze di resistenze all’antivirale.

Un altro agente virale che ha acquisito nel corso degli anni crescente importanza, particolarmente nel trapianto renale, è il polyomavirus BK. Oltre al BK, tra i polyomavirus umani più conosciuti v’è anche il JC. Si tratta di un virus ubiquitari, con una sieroprevalenza del 70-80% negli adulti. L’infezione viene acquisita per via respiratoria, solitamente nell’infanzia e in forma asintomatica. Il virus diffonde quindi per via ematica, raggiungendo quindi gli organi bersaglio dove persiste indefinitamente in forma latente a livello del rene e delle vie urinarie, dei linfociti B, e nel cervello⁽¹⁾.

La riattivazione dell’infezione è asintomatica negli immunocompetenti e si evidenzia (esclusivamente se ricercata) mediante viruria, mentre nei soggetti immunodepressi può essere parimenti asintomatica o causare cistite emorragica nei trapiantati di midollo (solo BKV), stenosi ureterale o nefrite interstiziale nei trapiantati di rene (BKV e JCV); nei pazienti immunodepressi, tra cui, oltre ai trapiantati, anche soggetti HIV-positivi o pazienti in trattamento con farmaci biologici, JCV è responsabile di una patologia neurodegenerativa demielinizzante, la leucoencefalopatia multifocale progressiva (LMP) il cui meccanismo patogenetico consiste nella distruzione degli oligodendrociti infettati dal virus.

Per quanto riguarda la *nefropatia da Polyomavirus*, si tratta di un vero e proprio esempio di patologia inizialmente misconosciuta. BKV è stato isolato per la prima volta nel 1971 nelle urine di un paziente trapiantato di rene con stenosi ureterale. Nel 1978 Mackenzie et coll. descrissero una nefropatia nel trapianto di rene associata a presenza di “decoy cells” nelle urine (cellule uroepiteliali di sfaldamento), inclusioni virali nelle biopsie renali, difficile diagnosi differenziale rispetto al rigetto acuto e al ruolo dell’immunosoppressione⁽⁹⁾. Tuttavia, nonostante la lucida descrizione di quelle che sono le caratteristiche principali della nefropatia da polyomavirus (polyomavirus-associated nephropathy, PVAN), ancora il BK venne considerato come un virus orfano e solo nel 1995 Purighalla et coll. descrissero ufficialmente il primo caso di nefropatia associata a polyomavirus⁽¹⁰⁾. A questo report, nel giro dei pochi anni successivi, seguirono sempre più numerosi studi che evidenziavano il carattere emergente della patologia.

In base ai dati epidemiologici attuali, la prevalenza di PVAN varia dall'1% al 10%, con differenze dovute prevalentemente all'attuazione o meno di un intenso programma di monitoraggio virologico e screening della replicazione virale. La maggioranza dei casi di nefropatia viene registrata nel primo anno post-trapianto ed è associata alla perdita del rene trapiantato nel 30-100% dei casi, con ritorno in dialisi entro 6-60 mesi. Ad esempio, in un ampio studio pubblicato da Hariharan et coll. nel 2006 sono descritti 48 casi di PVAN su 1139 pazienti, con una prevalenza del 4.2% e perdita del rene trapiantato nel 39% dei casi⁽⁶⁾.

La PVAN si configura come una patologia associata a marcata e significativa diminuzione della sopravvivenza del rene trapiantato.

I determinanti coinvolti nella patogenesi della nefropatia sono differenti e strettamente interrelati: legati al paziente, all'organo e al virus stesso. Il fattore più importante, *condicio sine qua non*, è una intensa terapia immunosoppressiva, infatti solitamente l'insorgenza di PVAN si riscontra nei pazienti in terapia immunosoppressiva tripla con una combinazione di tacrolimus, micofenolato mofetil e steroidi e nei pazienti con ripetuti episodi di rigetto trattati con boli di steroidi; tra gli altri fattori legati al paziente sembrano giocare un ruolo anche il numero di mismatches HLA. Il fatto che la PVAN si manifesti preferenzialmente nel rene trapiantato, piuttosto che nei reni nativi di pazienti sottoposti a trapianto di altri organi (pur essendone stati descritti alcuni casi e pur essendo questi pazienti sottoposti anch'essi a immunosoppressione), evidenzia l'esistenza di fattori legati all'alterato microambiente renale per cui la sussistenza di un danno renale è un importante co-fattore nella patogenesi di un'infezione massiva. Un altro fattore legato all'organo trapiantato e che sembra giocare un ruolo in termini di rischio di PVAN è rappresentato dalla carica virale latente. Per quanto riguarda i determinanti legati al virus, è stato evidenziato che variazioni di epitopi immunologicamente rilevanti della proteina capsidica VP1 sono coinvolti nell'evasione immunitaria, analogamente a mutazioni della sequenza della regione genomica virale non-codificante di controllo, che comportano una maggiore fitness virale con elevato livello replicativo.

Lo screening della replicazione virale è fondamentale per la gestione dei pazienti a rischio di PVAN in quanto permette di intervenire precocemente con un miglioramento dell'outcome clinico. L'assenza di replicazione virale ha un alto valore predittivo negativo (praticamente pari al 100%), in quanto l'assenza di replicazione virale esclude virtualmente la PVAN. È inoltre importante per il monitoraggio della risposta al trattamento in caso di PVAN, che si attua soprattutto mediante un'attenta modulazione dell'immunosoppressione in quanto non sono disponibili farmaci antivirali efficaci.

La riattivazione dell'infezione da virus BK nei pazienti sottoposti a trapianto di rene si osserva nel 10-68% dei casi, con ampia variabilità a seconda delle casistiche; dal momento che la riattivazione asintomatica avviene sia nei soggetti normali che negli immunodepressi asintomatici, da un punto di vista clinico-diagnostico è importante discriminare tra bassi e alti livelli di carica virale che possono comportare l'evoluzione verso la nefropatia. Per identificare i pazienti a rischio di sviluppare una nefropatia il parametro più significativo è la valutazione della *BK viremia* (carica virale su plasma), che presenta un valore predittivo negativo del 100% ed un valore predittivo positivo del 60%. La viremia di BKV non solo fornisce una stima del danno citopatico renale ma è anche un indicatore dell'efficacia della riduzione dell'immunosoppressione che rappresenta il trattamento chiave⁽⁶⁾.

Come dimostrato per altre infezioni virali rilevanti nell'ambito dei trapianti, in particolare per il CMV, l'incapacità di montare una risposta immune protettiva potrebbe giocare un ruolo centrale nello sviluppo di infezione attiva da BKV e nella progressione a PVAN⁽²⁾. La risposta immune specifica verso BKV è valutabile mediante il saggio *ELISpot* che misura la produzione di IFN- γ da parte delle cellule mononucleate del sangue periferico (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) dopo stimolazione con peptidi virali specifici (solitamente si utilizza l'antigene Large T e la proteina capsidica VP1). Questa metodica in pratica permette una misurazione quantitativa dei linfociti BKV-specifici, definendo lo stato dell'immunità cellulo-mediata. La valutazione della risposta immunitaria cellulare potrebbe fornire informazioni utili per predire e monitorare il decorso clinico della PVAN, nonché il trattamento. I dati preliminari ottenuti dai pochi studi effettuati suggeriscono che la mancanza di una risposta cellulare protettiva potrebbe favorire la riattivazione dell'infezione da BKV e influenzare la progressione della malattia⁽³⁾.

Altre infezioni virali hanno acquisito crescente importanza, in particolare come patogeni delle vie aeree inferiori, e rappresentano una importante causa di morbilità e mortalità nei pazienti sottoposti a trapianto. Tra i soggetti trapiantati, un caso particolare è rappresentato dal *paziente sottoposto a trapianto di polmone* in quanto la terapia immunosoppressiva è particolarmente impegnativa e l'organo trapiantato stesso è esposto all'ambiente. Oltre agli effetti diretti, con malattia d'organo, sono anche descritti effetti indiretti, tra cui particolare rilevanza riveste l'insorgenza di rigetto acuto e cronico. Quest'ultimo, descritto clinicamente come sindrome da bronchiolite obliterante (BOS, sulla base di parametri funzionali spirometrici), rappresenta la principale causa che limita la sopravvivenza a lungo termine del paziente e insorge in un'elevata percentuale degli stessi nell'arco dei 5 anni post-

trapianto. Si ritiene che il danno provocato dall'infezione virale inneschi una cascata con attivazione di citochine pro infiammatorie che induce il rigetto acuto, che costituisce a sua volta un fattore di rischio di BOS. Pertanto, i virus nel trapianto di polmone devono essere considerati sia come agenti eziologici di polmonite interstiziale sia in correlazione con l'insorgenza di rigetto acuto e cronico.

Oltre al CMV un ruolo importante è stato riconosciuto al *virus di Epstein-Barr* (EBV), anche se non è ancora noto il ruolo patogenetico di questo virus a livello polmonare. Le vie aeree inferiori rappresentano il sito di latenza più significativo, ed è stata dimostrata la replicazione di EBV nelle cellule alveolari *in vivo*. In caso di disordini linfoproliferativi post-trapianto (PTLD) possono essere presenti masse o noduli a livello polmonare. Il DNA di EBV viene frequentemente riscontrato nel lavaggio broncoalveolare di pazienti sottoposti a trapianto di polmone, ma anche in pazienti non trapiantati, così come in soggetti sia immunocompetenti che immunocompromessi. In un lavoro pubblicato recentemente dal nostro gruppo è stata valutata la presenza di EBV DNA su campioni di lavaggio broncoalveolare (in totale 272 campioni) di pazienti trapiantati e non trapiantati (in totale 174). Complessivamente, la prevalenza di positività di EBV DNA è stata del 23.9% nei campioni e del 29.4% nei pazienti, con una prevalenza significativamente più alta nei pazienti trapiantati (40.7%). Inoltre, EBV DNA è risultato positivo in presenza di diagnosi di polmonite (28.6% dei casi); insufficienza respiratoria (24.5%); esacerbazione di broncopneumopatie cronico-obstruttive (30.8%); altre pneumopatie (21.1%). È stata inoltre evidenziata un'elevata frequenza di coinfezioni, in particolare EBV e herpesvirus 6 nel 49.2% dei campioni; EBV e herpesvirus 7 nel 58.5% ed EBV e CMV nel 18.5%⁽⁵⁾.

Anche gli herpesvirus 6 e 7 sono stati riconosciuti come patogeni di crescente rilevanza nei trapiantati d'organo (compreso il polmone) e proposti come possibile cofattore nell'insorgenza di malattia da CMV. Il ruolo patogeno di HHV-7 nell'uomo è poco noto; dopo l'infezione primaria, HHV-7 persiste in latenza nei linfociti T CD4⁺ e in vari organi e tessuti, tra cui il polmone, ed è stato associato a patologie cutanee, neurologiche, epatiti e complicanze post-trapianto (spesso in coinfezione con altri virus). HHV-6 e HHV-7 presentano una notevole omologia genomica e sono caratterizzati da linfotropismo. Nei pazienti critici immunocompetenti, il ruolo patogeno dei beta-herpesvirus è poco noto e tuttora limitato a case report: ad esempio, sono stati descritti due casi di ARDS (acute respiratory distress syndrome) in pazienti non immunocompromessi associati, rispettivamente, a HHV6-e HHV-7⁽⁴⁾.

CONCLUSIONI

In conclusione, la replicazione virale e la progressione verso la malattia nei pazienti immunocompromessi sottoposti a trapianto è determinata da diversi fattori relativi al paziente, all'organo trapiantato e al virus. Queste complesse interazioni sono modulate dal livello di immunosoppressione e dall'impatto della immunità cellulare virus-specifica.

Le strategie per affrontare questi problemi sono uno stretto monitoraggio e una diagnosi precoce di infezione, in quest'ottica per ottimizzare la gestione clinica dell'infezione virale nel trapianto l'approccio diagnostico-clinico prevede, da un lato la determinazione dell'entità della replicazione virale, dall'altro il monitoraggio viro-immunologico.

La natura dei virus soggetta a continue mutazioni e i notevoli progressi che si stanno compiendo in ambito diagnostico e terapeutico richiedono un notevole impegno nell'ambito della ricerca al fine di traslare all'attività clinica i risultati ottenuti dagli studi clinici.

RINGRAZIAMENTI

A tutti i componenti della SC Virologia U dell'AOU San Giovanni di Torino che con entusiasmo e professionalità si dedicano alla Virologia Clinica.

BIBLIOGRAFIA

1. Cavallo R, Bergallo M, Sidoti F, Astegiano S, Terlizzi ME, Costa C: *Polyomavirus-associated nephropathy: critical issues in virological monitoring*. New Microbiol. 2009; 32: 235-243.
2. Chen Y, Trofe J, Gordon J, Du Pasquier RA, Roy-Chaudhury P, Kuroda MJ, Woodle ES, Khalili K, Koralknik IJ: *Interplay of cellular and humoral immune responses against BK virus in kidney transplant recipients with polyomavirus nephropathy*. J. Virol. 2006; 80: 3495-3505.
3. Comoli P, Binggeli S, Ginevri F, Hirsch HH: *Polyomavirus-associated nephropathy: update on BK virus-specific immunity*. Transpl. Infect. Dis. 2006; 8: 86-94.
4. Costa C, Curtoni A, Bergallo M, Solidoro P, Lorusso M, Delsedime L, Sapino A, Cavallo R: *Quantitative detection of HHV-6 and HHV-7 in transbronchial biopsies from lung transplant recipients*. New Microbiol. In press, 2011.
5. Costa C, Elia M, Astegiano S, Sidoti F, Terlizzi ME, Solidoro P, Botto S, Libertucci D, Bergallo M, Cavallo R: *Quantitative detection of Epstein-Barr virus in bronchoalveolar lavage from transplant and nontransplant patients*. Transplantation 2008; 86: 1389-1394.
6. Hariharan S: *BK virus nephritis after renal transplantation*. Kidney Int. 2006; 69: 655-662.
7. Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg C, Ginevri F, Gordon J, Limaye AP, Mihatsch MJ, Nickeleit V, Ramos E, Randhawa P, Shapiro R, Steiger J, Suthanthiran M, Trofe J: *Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations*. Transplantation 2005; 79: 1277-1286.
8. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Åsberg A, Chou S, Snyderman DR, Allen U, Humar A: *International Consensus Guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation*. Transplantation 2010; 89: 779-795.
9. Mackenzie EF, Poulding JM, Harrison PR, Amer B: *Human polyoma virus (HPV) - a significant pathogen in renal transplantation*. Proc. Eur. Dial. Transplant. Assoc. 1978; 15: 352-360.
10. Purighalla R, Shapiro R, McCauley J, Randhawa P: *BK virus infection in a kidney allograft diagnosed by needle biopsy*. Am. J. Kidney Dis. 1995; 26: 671-673.
11. Terlizzi ME, Costa C, Astegiano S, Sidoti F, Vendrame R, Segoloni GP, Bergallo M, Cavallo R: *Monitoring of human cytomegalovirus infection by antigenemia and viremia in the first 100 days following renal transplantation and relation to antiviral strategies*. Minerva Med. 2008; 99: 231-239.
12. Zuckerman AJ, Banatvala JE, Schoub B, Griffiths PD, Mortimer P: *Principles and practice of clinical virology*, 6 ed. Ed. Wiley-Blackwell, 2009, Chichester.

CELLULE STAMINALI E RIGENERAZIONE TISSUTALE

*Giovanni Camussi, Andrea Ranzhino
Stefania Bruno, Maria Chiara Deregibus*

Dipartimento di Medicina Interna - Università degli Studi di Torino

Key words: *Regenerative medicine / Medicina rigenerativa
Stem cells / Cellule staminali
Microvesicles / Microvescicole*

Abstract:

In recent years great interest has been attributed to the use of stem cells in regenerative medicine to repair damaged tissues. Following several uncontrolled clinical studies, many clinical trials are currently under way to check safety and feasibility under different pathological conditions. Many data are now available on the safety of stem cells derived from bone marrow and in particular of mesenchymal stem cells from different sources. However, the data relative to their feasibility are frequently controversial. In addition, the mechanisms of action of these cells are only partially known and further investigation is required. Several experimental studies point to a prevalent paracrine action of adult stem cells able to stimulate tissue regeneration. In this context, the transfer of genetic information as mRNA and microRNA by microvesicles seems to play a critical role to promote tissue regeneration.

Riassunto:

Nell'ultimo decennio è stato dato un grande impulso alla ricerca di nuove strategie terapeutiche basate sull'uso di cellule staminali in medicina rigenerativa. Preceduti da studi clinici non controllati, sono attualmente in atto numerosi *trials* clinici per valutare sicurezza ed efficacia in diverse condizioni patologiche. Attualmente sono disponibili numerosi dati relativi alla sicurezza delle cellule staminali adulte di derivazione dal midollo osseo ed in particolare delle cellule staminali mesenchimali di diversa origine. I dati, tuttavia, sulla loro efficacia sono spesso contraddittori. Inoltre i meccanismi d'azione di queste cellule sono solo parzialmente conosciuti e richiedono un ulteriore approfondimento. Numerosi dati sperimentali indicano che l'effetto benefico delle terapie con staminali adulte è da ricondursi prevalentemente ad un effetto paracrina in grado di stimolare la rigenerazione tissutale da parte di

cellule residenti. In questo ambito il trasferimento di informazione genetica sotto forma di mRNA e microRNA mediato dalle microvescicole sembra avere un ruolo critico nel promuovere la rigenerazione tissutale.

INTRODUZIONE

L'uso delle cellule staminali nella rigenerazione di organi o tessuti ha ricevuto negli ultimi decenni crescente interesse e la medicina rigenerativa è alla ricerca di fonti di cellule progenitrici/staminali utilizzabili in modo sicuro ed efficiente per ristabilire la funzione di organi danneggiati quali cuore, fegato o rene.

Le cellule staminali sono cellule indifferenziate in grado di auto-rinnovarsi in modo illimitato e dotate di elevato potenziale multi-differenziativo cioè della capacità di dare origine a tipi diversi di cellule mature. In base alla loro origine le cellule staminali sono divise in due gruppi: le cellule staminali embrionali, presenti nella massa cellulare interna della blastocisti poco prima dell'impianto nella mucosa uterina in grado di differenziarsi in tutti i tessuti dell'organismo (totipotenti) e le cellule staminali adulte, che comprendono le cellule staminali fetali, quelle neonatali isolabili dal cordone ombelicale e quelle presenti nell'organismo adulto. A differenza delle cellule staminali embrionali, le cellule staminali presenti nell'organismo adulto sono cellule indifferenziate presenti in tessuti differenziati con capacità di auto rinnovamento più limitata e con minore potenziale differenziativo di solito limitato al tipo cellulare del tessuto da cui originano⁽¹¹⁾.

Le cellule staminali nell'adulto sono responsabili della crescita, dell'omeostasi e della riparazione tissutale nel corso della vita. In particolare, le cellule staminali sono importanti per il mantenimento dell'omeostasi in tessuti con elevato *turnover* cellulare quali il sistema emopoietico, l'intestino e la pelle; tuttavia, progenitori/cellule staminali sono presenti nella maggior parte dei tessuti/organi dei mammiferi, inclusi il sistema nervoso centrale, retina, muscolo scheletrico, fegato e rene. In tessuti con basso ricambio cellulare, quali rene, polmone, muscolo scheletrico e fegato, le cellule staminali residenti si possono attivare dopo un danno e possono partecipare alla riparazione di quel tessuto dando origine a cellule differenziate specifiche del tessuto in cui risiedono, rivestendo così un ruolo rilevante nella crescita degli organi dopo la nascita, nel *turnover* fisiologico e nella riparazione tissutale. Si suppone che le cellule staminali residenti si co-localizzino con cellule di supporto stromali in nicchie, specifiche regioni o microambienti specializzati in ciascun tessuto o organo. La fonte più comune di cellule staminali adulte è rappresentata dal midollo osseo dove si trovano due popolazioni principali di cellule staminali: le cellule staminali emopoietiche (HSC) localizzate nella nicchia endosteale, associate agli osteoblasti della superficie interna delle cavità dell'osso trabecolare, e nell'area perivascolare dei sinusoidi; le cellule staminali mesenchimali (MSC), localizzate nelle aree perivascolari

del midollo osseo sono in stretta associazione con le HSC. Le MSC sono cellule staminali adulte indifferenziate di origine mesodermica in grado di differenziarsi in cellule del tessuto connettivo, quali tessuto osseo, adiposo, cartilagineo e muscolare⁽²⁰⁾.

Nell'organismo dei mammiferi sono state individuate altre nicchie di cellule staminali, quali la nicchia staminale epiteliale, la nicchia staminale intestinale e la nicchia staminale del sistema nervoso⁽¹¹⁾.

Mentre le HSC sono ben caratterizzate e possono essere purificate sulla base dell'espressione di marcatori specifici, non sono ad oggi noti marcatori specifici per le cellule staminali residenti nei tessuti e la loro identificazione si avvale di *tests* funzionali *in vitro* su colture cellulari; pertanto la loro esatta localizzazione e funzione *in vivo* resta incerta. Diversi studi suggeriscono che le cellule staminali adulte residenti nei tessuti appartengano alla linea mesenchimale. I criteri minimi per definire le MSC umane stabiliti dal *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy* comprendono la positività per CD105, CD73 e CD90, la negatività per CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 o CD19 e HLA-DR ed il potenziale differenziativo in tessuto osseo, cartilagineo ed adiposo^(8,12).

È stata prospettata per le MSC una loro localizzazione perivascolare, correlandole con i periciti, spiegando così la presenza delle MSC in quasi tutti i tessuti vascolarizzati. La zona perivascolare potrebbe comportarsi come nicchia mesenchimale *in vivo* ed il microambiente potrebbe modulare il loro fenotipo con transizione verso progenitori o verso cellule differenziate⁽⁹⁾.

POTENZIALITÀ DELLE TERAPIE CON CELLULE STAMINALI IN MEDICINA RIGENERATIVA

Poiché è possibile uno sfruttamento commerciale non regolamentato del potenziale terapeutico delle cellule staminali, è necessaria una valutazione scientifica prudente dei benefici e dei potenziali rischi della terapia con cellule staminali⁽³⁰⁾.

Le linee guida per il trapianto clinico di cellule staminali da parte della *International Society for Stem Cell Research* sottolineano i requisiti scientifici, clinici, regolatori ed etici, nonché gli impatti sociali che devono essere presi in considerazione per un trasferimento responsabile della ricerca al trattamento dei pazienti. Queste linee guida prendono in considerazione anche la regolamentazione di una ricerca clinica applicata coinvolgente i prodotti di cellule staminali embrionali o cellule staminali pluripotenti indotte da cellule somatiche (iPS). Il rinnovato impegno negli Stati Uniti di una

politica di finanziamento della ricerca sulle cellule staminali ha fatto da volano determinando un'escalation degli studi pre-clinici e dei *trials* clinici in ambito internazionale. In particolare i nuovi *trials* clinici si stanno focalizzando su terapie cellulari allogeniche che rispetto alle terapie con cellule autologhe presentano problemi più complessi dal punto di vista biologico e clinico. Si prevede inoltre nel prossimo decennio lo sviluppo di strategie terapeutiche basate sull'uso, alternativamente alle staminali embrionali, di cellule iPS autologhe che non presentano i problemi etici e immunologici delle embrionali, ma che ancora oggi, come le embrionali, pongono problemi di bio-sicurezza. Attualmente sono invece disponibili numerosi dati relativi alla sicurezza delle cellule staminali adulte di derivazione dal midollo osseo ed in particolare delle cellule staminali mesenchimali di diversa origine. I dati, tuttavia, sulla loro efficacia sono spesso contraddittori. L'effetto immunosoppressivo ed anti-infiammatorio delle cellule staminali mesenchimali in patologie quali la “*graft versus host disease*”, il trapianto d'organo e la fibrosi polmonare sembrano abbastanza consolidati. L'effetto, invece, su malattie neurodegenerative, ictus e patologie cardiovascolari sembra più limitato o controverso. Inoltre i meccanismi d'azione di queste cellule sono solo parzialmente conosciuti e richiedono un ulteriore approfondimento. I maggiori sforzi ed avanzamenti delle terapie basate su cellule staminali sono oggi focalizzati sulla sclerosi multipla, la riparazione di malattie neurodegenerative, la degenerazione maculare, il diabete di tipo I, il “targeting” tumorale, le malattie autoimmuni e cardiovascolari. L'interesse dimostrato dalla ricerca accademica e dalle compagnie biotecnologiche e farmaceutiche fa prospettare nei prossimi anni una rapida evoluzione della medicina rigenerativa. Tuttavia, la convalida di questi approcci terapeutici richiede che i *trials* di fase II/III già attivi o che attendono di essere approvati vengano completati nei prossimi anni ed è possibile prevedere che il passaggio da *trials* clinici di ricerca ad un'applicazione clinica possa richiedere parecchi anni.

Attualmente non esiste una fonte universale di cellule staminali. Le cellule staminali embrionali, che hanno un potere differenziativo illimitato, sarebbero i candidati ideali per la generazione tissutale, ma i problemi biologici, immunologici, etici e legali associati al loro uso, nonché il rischio della formazione di teratomi o teratocarcinomi ne ostacola l'applicazione clinica⁽²¹⁾.

Anche le iPS promettono una applicazione clinica. Si tratta di cellule mature in cui si ottiene la riprogrammazione a cellule staminali mediante trattamento con alcuni fattori di trascrizione altamente espressi nelle cellule staminali embrionali⁽³⁵⁾. Essendo le iPS prodotte dalle cellule somatiche del paziente,

non esistono problemi etici e immunologici, ma anche per le iPS esiste un elevato rischio tumorigenico^(23,37).

Per tutti questi motivi le attuali terapie cellulari utilizzano i progenitori cellulari isolati dai tessuti adulti con capacità differenziative minori, quali le cellule staminali ematopoietiche (HSC), i progenitori endoteliali (EPC), le cellule staminali mesenchimali derivate da midollo osseo (BM-MSC), da cordone ombelicale (UC-MSC) e da tessuto adiposo (AT-MSC)⁽³⁰⁾.

La terapia clinica con MSC presenta l'inconveniente che tali cellule devono essere coltivate ed espanse per 3-5 settimane con la possibilità che il procedimento di coltura possa indurre cambiamenti fenotipici e funzionali delle MSC⁽³⁰⁾.

Diversamente dalle MSC derivate dal midollo osseo e dal cordone ombelicale, quelle derivate dal tessuto adiposo hanno un fenotipo immunologico diverso e una maggiore capacità proliferativa in un tempo minore, consentendo una più facile applicazione clinica. Tali cellule rappresentano inoltre una facile sorgente per generare MSC singeniche. Attualmente, tuttavia rimangono in gran parte da definire le differenze delle proprietà funzionali dei diversi tipi di cellule mesenchimali⁽³⁰⁾.

L'uso delle MSC derivate da midollo osseo in studi preclinici e clinici di fase I ha fornito risultati incoraggianti e numerosi *trials* sono in corso per diverse condizioni patologiche quali la graft versus host disease, l'osteogenesis imperfecta, l'infarto miocardico, il lupus eritematoso sistemico e il diabete^(17,22). Alcuni di questi *trials* clinici con MSC espanse *in vitro* sono stati attualmente completati⁽¹⁷⁾ (Tabella I).

In alcuni *trials* clinici sono state utilizzate MSC autologhe derivate dal midollo osseo (BM-MSC): BM-MSC differenziate in progenitori degli epatociti per la cirrosi epatica⁽¹⁸⁾; BM-MSC per la vasculogenesi in pazienti con ischemia miocardica severa⁽³⁴⁾; BM-MSC in pazienti diabetici con critical limb ischemia⁽¹⁹⁾. Altri hanno utilizzato BM-MSC umane adulte eterologhe per il trattamento del Morbo di Crohn da moderato a severo^(24,16); della graft versus host disease^(33,32,15); nel recupero funzionale dopo meniscectomia mediale parziale⁽¹⁾; BM-MSC eterologhe differenziate in epatociti sono state utilizzate per il trattamento dell'ipercolesterolemia famigliare⁽²⁾; BM-MSC autologhe ed eterologhe differenziate in osteoblasti sono state usate in *trials* clinici di rigenerazione del tessuto periodontale⁽⁵⁾. In altri *trials* sono state utilizzate cellule staminali derivate dal tessuto adiposo per valutare la loro efficacia e sicurezza nel trattamento di fistole perianali complesse non associate a Morbo di Crohn⁽¹⁴⁾ e cellule staminali derivate dal tessuto adiposo differenziate in adipociti in pazienti con cicatrice depressa⁽³¹⁾. Diversi *trials* clinici sono in

Sorgente cellulare	Fase	Condizione	Ref.
BM-MSC autologhe differenziate in progenitori degli epatociti	I/II	Cirrosi epatica	18
BM-MSC autologhe	I/II	Ischemia miocardica	34
BM-MSC autologhe	II	Piede diabetico	19
BM-MSC eterologhe	II	Morbo di Crohn moderato-severo	24
BM-MSC eterologhe	III	Morbo di Crohn moderato-severo	16
BM-MSC eterologhe	II	Graft versus Host Disease	32, 33
BM-MSC eterologhe	III	Graft versus Host Disease	15
BM-MSC eterologhe differenziate in epatociti	I	Ipercolesterolemia familiare	2
BM-MSC+BM-MSC differenziate in osteoblasti (autologhe ed eterologhe)	I/II	Periodontite dell'adulto	5
MSC autologhe derivate dal tessuto adiposo	III	Fistole perianali non associate a Morbo di Crohn	14
MSC autologhe derivate dal tessuto adiposo differenziate in adipociti	II/III	Cicatrice depressa	31
BM-MSC eterologhe	I/II	Recupero dopo meniscectomia parziale mediale	1

Tabella I. Trials clinici completati con MSC espanse in vitro (www.clinicaltrials.gov).

corso per valutare la sicurezza e l'efficacia della terapia con MSC in patologie renali e nel trapianto renale (Tabella II)⁽²⁹⁾.

Le terapie cellulari, qualunque siano le cellule impiegate, hanno ottenuto alcuni benefici quali un miglioramento funzionale dell'organo danneggiato,

pur mancando la dimostrazione della transdifferenziazione delle cellule utilizzate nelle cellule specifiche dell'organo. Il miglioramento funzionale potrebbe essere dovuto ad un effetto paracrino da parte delle cellule trapiantate mediante secrezione di fattori di crescita, citochine o chemochine che inibiscono l'apoptosi delle cellule residenti nei tessuti danneggiati e stimolano l'angiogenesi⁽²⁸⁾. Abbiamo dimostrato che l'effetto paracrino è in parte dovuto al trasferimento dell'informazione genica mediato dalle microvescicole liberate dalle cellule staminali^(10,3). Infatti, accanto a fattori solubili, le microvescicole (MV) sono state descritte come un nuovo meccanismo di comunicazione intercellulare⁽⁴⁾.

Trial	Fine primario	Studio
Trapianto di MSC in riceventi di trapianto renale da vivente	Sicurezza ed efficacia	Randomizzato, open label
MSC e rigetto subclinico	Sicurezza e fattibilità	Non randomizzato, open label
MSC associate a terapia di induzione con Basiliximab/RATG per indurre tolleranza al trapianto renale	Sicurezza ed efficacia	Randomizzato, open label
Effetto del trapianto di MSC nel trattamento di Chronic Allograft Nephropathy	Sicurezza ed efficacia	Randomizzato, open label
Trapianto di MSC per lupus eritematoso sistemico refrattario	Sicurezza ed efficacia	Trattamento non randomizzato, open label
Trattamento con MSC eterologhe per danno renale acuto conseguente a cardiocirurgia	Sicurezza ed efficacia	Trattamento non randomizzato, open label

Tabella II. Trials clinici attualmente registrati di terapia con MSC in patologie renali (www.clinicaltrials.gov).

RUOLO DELLE MICROVESCICOLE NELLA BIOLOGIA DELLA CELLULA STAMINALE

Il concetto di nicchia inteso come microambiente che assicura l'omeostasi delle cellule staminali è stato associato al modello gerarchico di biologia delle cellule staminali. Il modello gerarchico garantisce l'autorinnovamento delle cellule staminali e la generazione di cellule figlie che perdono progressivamente il loro potenziale proliferativo per acquisire le caratteristiche di cellule differenziate^(4,36). Quesenberry *et al.* più recentemente hanno proposto un modello continuo secondo cui le cellule staminali presentano un fenotipo labile che cambia reversibilmente durante il loro transito nel ciclo cellulare e l'esposizione a fattori ambientali che sono determinanti per l'acquisizione da parte della stessa cellula di fenotipi diversi nei differenti stati funzionali^(7,25). La nicchia staminale per Quesenberry e Aliotta presenterebbe aree di influenza in grado di adeguare continuamente il fenotipo delle cellule staminali in base alle specifiche necessità e il sistema rigenerativo dei mammiferi non avrebbe bisogno di tanti tipi differenti di cellule staminali in ogni organo, ma sarebbero sufficienti poche cellule indifferenziate con capacità di auto rinnovamento⁽²⁶⁾.

In caso di danno di tessuto/organo, le cellule staminali potrebbero cambiare il loro fenotipo e acquisire quello delle cellule differenziate danneggiate. Dall'altro lato, cellule differenziate sopravvissute al danno potrebbero riacquisire un fenotipo indifferenziato, proliferare ed in seguito ridifferenziarsi in cellule mature per ristabilire l'integrità funzionale del tessuto/organo danneggiato. In questo contesto la comunicazione intercellulare mediata dalle MV riveste un ruolo fondamentale.

Le MV comprendono:

- 1) gli esosomi, originati dal compartimento endosomale e liberati dalla cellula nello spazio extracellulare con un meccanismo di esocitosi dopo fusione di questi con la membrana cellulare. Si tratta di una popolazione abbastanza omogenea con dimensioni che vanno dai 30 ai 120 nm;
- 2) le *shedding vesicles*, generate per gemmazione di piccole protrusioni citoplasmatiche e distacco dalla superficie cellulare con un meccanismo dipendente dalla concentrazione intracellulare di ioni calcio che modifica la distribuzione asimmetrica dei fosfolipidi della membrana cellulare da parte di enzimi specifici quali flippase, floppase e scramblase.

Le *shedding vesicles*, rispetto agli esosomi, sono una popolazione più eterogenea con dimensioni che variano da 100nm a 1µm. Dal momento che la popolazione di vescicole presente *in vitro* ed *in vivo* è una popolazione mista

di esosomi e *shedding vesicles*, usiamo il termine MV che le comprende entrambe.

L'importanza delle MV nella comunicazione tra cellule deriva dalla osservazione che le MV liberate da una cellula possono interagire con altre cellule "target" mediante interazione recettore/ligando specifica seguita da internalizzazione e liberazione del loro contenuto nel citoplasma della cellula. Le MV influenzano il comportamento delle cellule "target" in diversi modi. Possono trasferire un segnale per interazione recettore/ligando, possono trasferire recettori, proteine e lipidi biologicamente attivi e materiale genetico. Il trasferimento di informazioni geniche ha particolare rilevanza nella biologia della cellula staminale. Infatti, le cellule staminali rappresentano una ricca sorgente di MV. Ratajczak *et al.* hanno dimostrato che le MV derivate dalle cellule staminali embrionali murine possono riprogrammare i progenitori emopoietici con aumentata espressione di *markers* pluripotenti e fosforilazione di MAPK e Akt⁽²⁷⁾. Poiché RNase inibiva l'effetto biologico mediato dalle MV, fu suggerito il coinvolgimento del mRNA. Noi abbiamo dimostrato che le MV derivate dalle EPC sono in grado di attivare un programma angiogenetico nelle cellule endoteliali mediante trasferimento orizzontale di mRNA⁽¹⁰⁾. Yuan *et al.* hanno dimostrato che le MV derivate da cellule staminali embrionali di topo contengono non solo mRNA, ma anche microRNA⁽³⁸⁾. Noi abbiamo caratterizzato i microRNA presenti nelle MV derivate da staminali umane adulte e abbiamo dimostrato che le MV possono trasferire *subsets* specifici di microRNA funzionali a cellule "target"⁽⁶⁾. Poiché i microRNA sono piccoli RNA, di 21-24 nucleotidi, non codificanti con funzione di regolatori dell'espressione genica che agiscono a valle della trascrizione del DNA in mRNA determinando il clivaggio del mRNA o reprimendo la sintesi proteica, le cellule staminali possono modificare l'espressione di geni in cellule vicine mediante il trasferimento di microRNA contenuti nelle MV.

LE MV LIBERATE DALLE CELLULE STAMINALI CONTRIBUISCONO ALLA RIGENERAZIONE TISSUTALE

Le MV trasferendo informazione genica sotto forma di mRNA e microRNA tra cellule staminali e cellule tissutali danneggiate, possono influenzare la rigenerazione tissutale. Lo scambio di materiale genetico è bi-direzionale. Le MV liberate dalle cellule del tessuto danneggiato possono riprogrammare il fenotipo delle cellule staminali derivate dal midollo osseo o residenti in quel tessuto facendo loro acquisire le caratteristiche specifiche di quel tessuto da cui sono liberate. Il gruppo di Quesenberry ha dimostrato che la co-cultura

di cellule di midollo osseo con cellule di tessuto polmonare irradiato induce l'espressione di geni e proteine specifici del tessuto polmonare da parte delle cellule del midollo osseo; i cambiamenti del fenotipo delle BM-SC dipendevano dalle MV liberate dalle cellule danneggiate che contenevano alte concentrazioni di mRNA specifici del polmone e li trasferivano alle cellule del midollo osseo⁽¹³⁾.

D'altra parte, le MV derivate dalle cellule staminali possono riprogrammare le cellule differenziate sopravvissute al danno inducendone una transitoria de-differenziazione con rientro di queste nel ciclo cellulare in modo da favorire la rigenerazione del tessuto danneggiato. Infatti, abbiamo dimostrato⁽³⁾ che le MV liberate da MSC umane possono essere internalizzate nelle cellule epiteliali tubulari renali ed il trasferimento di mRNA e microRNA in esse contenuto ne stimola *in vitro* la proliferazione e la resistenza all'apoptosi con acquisizione transitoria di un fenotipo mesenchimale. La somministrazione *in vivo* di MV derivate da MSC accelera la ripresa funzionale e la riparazione tissutale in modelli di danno renale acuto tossici ed ischemici. Poiché l'efficacia delle MV nell'indurre il recupero renale è paragonabile a quella della somministrazione delle MSC, si può prospettare che l'effetto delle MSC sia in gran parte dovuto alla liberazione di MV. L'inattivazione mediante RNase del contenuto di RNA delle MV ne abroga l'effetto, suggerendo che il meccanismo sia dipendente dal trasferimento di RNA specifici. Infatti le MV contengono un *subset* definito di mRNA e microRNA rappresentativi delle molteplici proprietà differenziative e funzionali delle MSC. Il trasferimento di questi prodotti genici delle MSC umane in cellule "target" murine è stato dimostrato sia *in vitro* che *in vivo* utilizzando mRNA *reporter*⁽³⁾.

CONCLUSIONI

In conclusione, la ricerca nel campo della medicina rigenerativa si è in questi ultimi anni focalizzata sulla possibilità di identificare popolazioni cellulari appropriate che rispondano a requisiti di facile accessibilità, bio-sicurezza ed efficacia. L'applicabilità clinica delle staminali embrionali e delle iPS, nonostante la loro potenziale efficacia, rimane ancora lontana per problemi di bio-sicurezza.

Le cellule staminali adulte hanno fornito evidenze di potenziali applicazioni, tuttavia rimangono aperti molti problemi a cominciare dalla valutazione della *potency* delle diverse preparazioni che rende difficilmente comparabili i diversi studi. Sebbene gli studi di fase I indichino una sostanziale fattibilità dell'uso e della bio-sicurezza di questi prodotti cellulari, permangono problemi di

potenziale maldifferenziazione. Inoltre gli effetti benefici riportati sono per lo più transitori e legati ad un effetto paracrino piuttosto che ad una diretta transdifferenziazione di queste cellule in cellule del tessuto danneggiato. Studi recenti hanno evidenziato la possibilità di sfruttare a fini rigenerativi bioprodotto delle cellule staminali, quali le MV che possono prospettare approcci terapeutici che mimano l'effetto paracrino delle cellule staminali senza la somministrazione delle cellule stesse.

BIBLIOGRAFIA

1. *A Phase I/II study of chondrogen delivered by intra-articular injection following meniscectomy*. Washington, DC: FDA, ClinicalTrials.gov, 2005. Available from: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00225095?term=NCT00225095&rank=1>.
2. *Bone marrow stem cells as a source of allogenic hepatocyte transplantation in homozygous familial hypercholesterolemia*. Washington, DC: FDA, ClinicalTrials.gov, 2007. Available from: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00515307?term=NCT00515307&rank=1>.
3. Bruno S, Grange C, Deregibus MC, Calogero RA, Saviozzi S, Collino F, Morando L, Busca A, Falda M, Bussolati B, Tetta C, Camussi G: *Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury*. J. Am. Soc. Nephrol. 2009; 20: 1053-1067.
4. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L: *Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication*. Kidney Int. 2010; 78: 838-848.
5. *Clinical trials of regeneration for periodontal tissue*. Washington, DC: FDA, ClinicalTrials.gov, 2005. Available from: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00221130?term=NCT00221130&rank=1>.
6. Collino F, Deregibus MC, Bruno S, Sterpone L, Aghemo G, Viltono L, Tetta C, Camussi G: *Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs*. PLoS One. 5, e11803, 2010.
7. Colvin GA, Lambert JF, Moore BE, Carlson JE, Dooner MS, Abedi M, Cerny, Quesenberry PJ: *Intrinsic hematopoietic stem cell/progenitor plasticity: Inversions*. J Cell Physiol. 2004; 199: 20-31.
8. Da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB: *In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells*. Stem Cells. 2008; 26: 2287-2299.

9. Da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB: *Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues*. J. Cell Sci. 2006; 119: (Pt 11), 2204-2213.
10. Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, Biancone L, Bruno S, Bussolati B, Camussi G: *Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA*. Blood 2007; 110: 2440-2448.
11. Deregibus MC, Tetta C, Camussi G: *The dynamic stem cell microenvironment is orchestrated by microvesicle-mediated transfer of genetic information*. Histol. Histopathol. 2010; 25: 397-404.
12. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E: *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy. 2006; 8: 315-317.
13. Dooner MS, Aliotta JM, Pimentel J, Dooner GJ, Abedi M, Colvin G, Liu Q, Weier HU, Johnson KW, Quesenberry PJ: *Conversion potential of marrow cells into lung cells fluctuates with cytokine-induced cell cycle*. Stem Cells Dev. 2008; 17: 207-219.
14. *Efficacy and safety of adipose stem cells to treat complex perianal fistulas not associated to Crohn's disease*. Washington, DC: FDA, ClinicalTrials.gov, 2007. Available from: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00475410?term=NCT00475410&rank=1>.
15. *Efficacy and safety of adult human mesenchymal stem cells to treat patients who have failed to respond to steroid treatment for acute graft versus host disease (GVHD)*. Washington, DC: FDA, ClinicalTrials.gov, 2006. Available from: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00366145?term=NCT00366145&rank=1>.
16. *Extended evaluation of Prochymal adult human stem cells for treatment-resistant moderate-to-severe Crohn's disease*. Washington, DC: FDA, ClinicalTrials.gov, 2007. Available from: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00543374?term=NCT00543374&rank=1>.
17. García-Gómez I, Elvira G, Zapata AG, Lamana ML, Ramírez M, Castro JG, Arranz MG, Vicente A, Bueren J, García-Olmo D: *Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications*. Expert Opin. Biol. Ther. 2010; 10: 1453-1468.
18. *Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a Phase I-II clinical trial*. Washington, DC: FDA, ClinicalTrials.gov, 2007. Available from: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00420134?term=NCT00420134&rank=1>.
19. *Induced wound healing by application of expanded bone marrow stem cells in diabetic patients with critical limb ischemia*. Washington, DC: FDA, ClinicalTrials.gov, 2010. Available from: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01065337?term=NCT01065337&rank=1>.
20. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM: *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow*. Nature. 2002; 418: 41-49.
21. Kaiser J, Vogel G: *Embryonic stem cells. Controversial ruling throws U.S. research into a tailspin*. Science. 2010; 329: 1132-1133.
22. Le Blanc K, Ringdén O: *Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience*. J. Intern. Med. 2007; 262: 509-525.

23. Park IH, Daley GQ: *Human iPS cell derivation/reprogramming*. Curr. Protoc. Stem Cell Biol. 2009. Chapter 4, Unit 4A.1.
24. *Prochymal™ Adult Human Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Moderate-to-severe Crohn's Disease*. Washington, DC: FDA, ClinicalTrials.gov, 2006. Available from: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00294112?term=NCT00294112&rank=1>.
25. Quesenberry P, Abedi M, Dooner M, Colvin G, Sanchez-Guijo FM, Aliotta J, Pimentel J, Dooner G, Greer D, Demers D, Keane P, Peterson A, Luo L, Foster B: *The marrow cell continuum: stochastic determinism*. Folia Histochem Cytobiol. 2005; 43: 187-190.
26. Quesenberry PJ, Aliotta JM: *The paradoxical dynamism of marrow stem cells: considerations of stem cells, niches, and microvesicles*. Stem Cell Rev. 2008; 4: 137-147.
27. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, Ratajczak MZ: *Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery*. Leukemia. 2006; 20: 847-856.
28. Ratajczak MZ: *The emerging role of microvesicles in cellular therapies for organ/tissue regeneration*. Nephrol. Dial. Transplant. 2011; 26: 1453-1456.
29. Reinders ME, Fibbe WE, Rabelink TJ: *Multipotent mesenchymal stromal cell therapy in renal disease and kidney transplantation*. Nephrol. Dial. Transplant. 2010; 25: 17-24.
30. Reinders ME, Rabelink TJ: *Adipose tissue-derived stem cells: can impure cell preparations give pure results?* Nephrol. Dial. Transplant. 2010; 25: 3805-3807.
31. *Safety and efficacy of autologous cultured adipocytes in patient with depressed scar*. Washington, DC: FDA, ClinicalTrials.gov, 2009. Available from: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00992147?term=NCT00992147&rank=1>.
32. *Safety and efficacy of Prochymal for the salvage of treatment-refractory acute GVHD patients*. Washington, DC: FDA, ClinicalTrials.gov, 2006. Available from: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00284986?term=NCT00284986&rank=1>.
33. *Safety and efficacy study of adult human mesenchymal stem cells to treat acute GVHD*. Washington, DC: FDA, ClinicalTrials.gov, 2005. Available from: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00136903?term=NCT00136903&rank=1>.
34. *Stem cell therapy for vasculogenesis in patients with severe myocardial ischemia*. Washington, DC: FDA, ClinicalTrials.gov, 2005. Available from: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00260338?term=NCT00260338&rank=1>.
35. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S: *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell. 2007; 131: 861-872.
36. Till JE, McCulloch EA, Siminovitch L: *A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1964; 51: 29-36.
37. Yamanaka S: *Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors*. Cell Prolif. 41 Suppl 2008; 1: 51-56.
38. Yuan A, Farber EL, Rapoport AL, Tejada D, Deniskin R, Akhmedov NB, Farber DB: *Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles*. PLoS One. 2009; 4: e4722.

L'ANZIANO, LA MALATTIA E L'OSPEDALE

Mario Bo

SCDU Geriatria e Malattie Metaboliche dell'Osso
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino

Key words: *Aging / Anziano*
 Hospital / Ospedale
 Chronic diseases / Malattie croniche

Abstract:

In Italy as in the majority of Western countries, the elderly constitute about 20% of the population and they represent a group that is in constant rapid growth, particularly in the older age range. Although health and functional conditions have been steadily improving over the last century in these older subjects, numerous, complex clinical problems combined with a high frequency of critical social factors lead to an increase use of public health services. In particular, access to the emergency department and hospitalization contribute notably to the consumption of health resources on the part of the elderly. Hospital admission is a critical event for many older patients, with the potential for either relevant clinical benefit and, at the same time, adverse events and complications, which may adversely affect functional independence, cognitive status, quality of life and residual survival, particularly in those patients who are most prone to the negative effects of stay-in hospital. Indeed, older patients may frequently experience some of the common hospital-related complications, including infections, acute confusional states, immobilization and bed rest, malnutrition, decrease in muscle mass and strength and functional decline, which overall may result in significant and persistent functional limitations and loss of independence. Therefore, the optimal comprehensive care of elderly patients who present conditions amenable to hospital admission should include an early and careful evaluation of benefits and risks from hospitalization, the identification of the best setting for acute medical care, and a qualified and age-specific acute care during hospital stay, aimed not only to the best diagnostic and therapeutic pathway but also to the preservation and improvement of functional and cognitive conditions in each patient.

Riassunto:

Gli anziani costituiscono una percentuale consistente delle popolazioni dei principali paesi occidentali. Sebbene le condizioni di salute e di autonomia in questa fascia di età siano in costante progresso, una discreta percentuale di soggetti anziani presenta rilevanti problematiche cliniche, che determinano un frequente ricorso alle cure ospedaliere.

Il ricovero in ospedale rappresenta un evento comunque cruciale per l'anziano, auspicabilmente in grado di determinare importanti benefici clinici ma, al contempo, potenzialmente foriero di eventi avversi in grado di impattare negativamente sulle condizioni funzionali e sulla sopravvivenza dei pazienti più suscettibili agli effetti negativi ed alle complicanze dell'ospedalizzazione.

Non solo gli individui anziani "fragili", ma anche e soprattutto quelli ancora integri da un punto di vista cognitivo e funzionale, sono esposti alle comuni complicanze dell'ospedalizzazione, quali sovrapposizioni infettive spontanee o postprocedurali, allettamento ed immobilizzazione, malnutrizione e declino funzionale, in grado di determinare significative e talora durature limitazioni funzionali residue.

La gestione ottimale del paziente anziano prevede quindi interventi medici volti innanzitutto alla valutazione complessiva dell'individuo e delle sue problematiche cliniche e sociali, ad una precoce ed attenta valutazione dei benefici e dei potenziali inconvenienti legati all'ospedalizzazione, all'identificazione dei settings di cura più idonei ed, infine, nel caso in cui il ricovero sia indicato ed indispensabile, ad una gestione specialistica medico-infermieristica durante la degenza non solo in ordine alle problematiche cliniche ma anche e soprattutto per quel che riguarda il mantenimento o il recupero dei livelli di autonomia.

Il successo delle cure ospedaliere nell'anziano infatti non può essere misurato esclusivamente in termini di prolungamento della sopravvivenza nella fase estrema della vita o di compressione o controllo di morbidità per lo più croniche e soggette a periodiche riacutizzazioni, ma anche e soprattutto in termini di mantenimento dei livelli di autonomia funzionale e di qualità della vita. La cura dell'anziano in ospedale quindi richiede in sostanza di perseguire nel modo migliore e nel più breve tempo possibile i migliori risultati clinici compatibili per ciascun paziente, parallelamente allo sforzo di ottimizzazione e mantenimento dei livelli di autonomia funzionale ed integrità cognitiva possibili per ciascun paziente.

Gli anziani entrano in ospedale più spesso degli altri, vi stanno più a lungo, hanno più spesso prognosi peggiori e più frequentemente ne vengono dimessi non al proprio domicilio.

Sebbene gli anziani costituiscano meno di un quarto della popolazione nella maggior parte dei paesi occidentali⁽¹⁵⁾, e molti di essi siano relativamente in buone condizioni di salute ed autonomia, essi rappresentano i maggiori fruitori di servizi sanitari ospedalieri^(4,5,13,16,17).

All'interno della fascia di età anziana, il più importante incremento percentuale riguarda i cosiddetti oldest-old, gli individui di 80 o più anni, i quali contribuiscono in modo significativo agli accessi ospedalieri. A seguito di questi cambiamenti epidemiologici, ed anche per il costante progresso nella cura di molte malattie, l'età media dei pazienti ricoverati in reparti internistici e chirurgici è drammaticamente aumentata, avvicinandosi in molti casi agli 80 anni.

Molto spesso, gli anziani vengono comunemente definiti soggetti "fragili". Sebbene tale affermazione possa avere un fondo di verità, essa porta alla banalizzazione di un concetto, quello di "fragilità" appunto, che ha una precisa dignità clinica. In ambito clinico geriatrico definiamo solitamente la fragilità come una sindrome biologica caratterizzata da ridotte riserve funzionali e resistenza agli eventi stressanti di diversa natura, derivante per lo più da plurimi declini fisiologici multi organo e/o dal concorso di condizioni ambientali e patologiche, e determinante una maggior vulnerabilità dell'individuo. Sebbene esistano plurimi criteri per definire il soggetto fragile, gli elementi che più facilmente ne consentono una rapida identificazione clinica sono la ridotta massa muscolare, la perdita di forza e resistenza, lentezza nella marcia, e bassi livelli globali di attività motoria⁽¹⁰⁾. In quanto tale, si stima che la fragilità interessi all'incirca meno del 10% degli individui anziani nella maggior parte dei paesi occidentali, mentre la prevalenza dei cosiddetti prefragili è estremamente più elevata, attorno al 40%. La condizione di fragilità non è sinonimo necessariamente di polipatologia, poiché essa può risultare anche da un invecchiamento sfavorevole in assenza di rilevanti comorbidità. Essa non è inoltre necessariamente sinonimo di disabilità, sebbene le due condizioni possano frequentemente coesistere. Ciò che appare invece assolutamente evidente all'occhio del clinico è come la fragilità rappresenti spesso nell'anziano un circolo vizioso critico predisponente a complicanze e ad un invecchiamento sfavorevole, secondo un modello largamente noto e diffuso in ambito geriatrico, teorizzato molti anni addietro da Fried et al⁽¹⁰⁾ (Figura 1).

L'ospedalizzazione rappresenta certamente un momento "critico" per l'anziano. Con l'invecchiamento infatti non aumenta solo l'incidenza delle

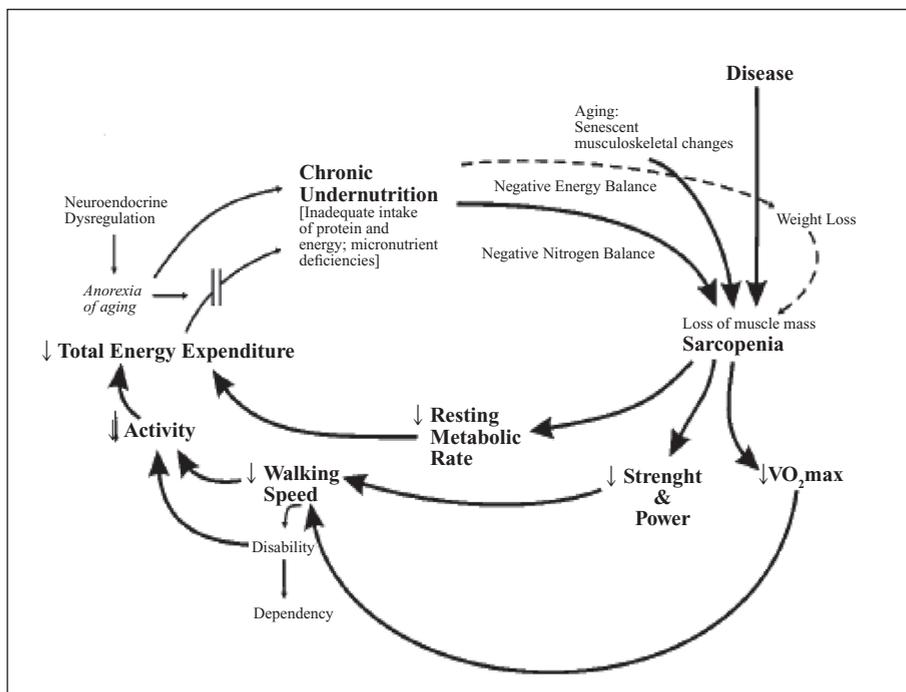


Figura 1.

principali malattie ma parimenti cresce la vulnerabilità alle complicanze “iatroge” legate al ricovero ed alle procedure effettuate durante la degenza. Sebbene nell’aspettativa comune siano i pazienti anziani più “fragili” quelli ritenuti a maggior rischio di eventi avversi legati al ricovero, i dati della letteratura medica degli anziani dimostrano altresì che sono invece gli anziani ancora “integri” dal punto di vista funzionale quelli esposti al maggior rischio di disabilità o declino funzionale legato all’ospedalizzazione.

L’ospedalizzazione e la conseguente ridotta attività possono infatti avere conseguenze drammatiche da un punto di vista funzionale. Gill et al⁽¹¹⁾ hanno valutato l’impatto su alcune funzioni basali del vivere quotidiano (capacità di lavarsi, vestirsi, muoversi dentro casa ed alzarsi da una sedia) su di un campione di 754 ultrasettantenni non disabili, distinguendoli in base alla presenza o meno di fragilità prima del ricovero. Nei 372 soggetti che hanno avuto almeno una ospedalizzazione il rischio di sviluppo di disabilità era di 61,8 (IC 95%: 49,0-78,0), e l’aumento di rischio era ugualmente significativo e drammatico sia per gli individui fragili che in quelli non fragili al momento del ricovero (Tabella I).

Intervening Event ²	Hazard Ratio (95% Confidence interval) ¹		
	Any Disability	Persistent Disability	Disability With Nursing Home Admission
Hospitalization³			
Physically frail at baseline	31,8 (22.5-45.0)	29.5 (20.2-43.1)	191 (102-357)
Not physically frail at baseline	122 (82.4-180)	76.5 (47.3-124)	312 (141-691)
Restricted activity only⁴			
Physically frail at baseline	41.3 (2.87-5.95)	2.76 (1.39-5.46)	4.52 (1.95-10.5)
Not physically frail at baseline	6.45 (4.06-10.3)	3.30 (2.15-5.07)	1.71 (0.35-8.29)

¹ Hazard ratios are adjusted for age, sex, race/ethnicity, living alone, years of education, chronic conditions, cognitive impairment, depressive symptoms, and prior intervening events.

² The exposure period was the month prior to the assessment of disability. The comparison group included participants without an acute hospital admission or restricted activity.

³ There was a statistical interaction with physical frailty for any disability ($P < .001$) and persistent disability ($P = .002$), but not for disability with nursing home admission ($P = .22$).

⁴ There were no statistical interactions with physical frailty for any of the 3 disability outcomes.

Tabella I. Associazione tra nuovi eventi incidenti (ospedalizzazione e limitata attività) e sviluppo di disabilità in relazione alla presenza di fragilità al basale.

Gli stessi Autori in un altro lavoro⁽¹²⁾ hanno valutato l'effetto di una permanenza a letto per motivi medici sulla residua autonomia funzionale in 680 ultrasessantenni non disabili al basale, dimostrando una significativa riduzione delle abilità fisiche e strumentali e nell'autonomia di movimento nel campione totale, che peraltro era maggiormente drammatica in coloro che non erano "fragili" prima del ricovero (Tabella II).

Nel loro complesso questi dati indicano chiaramente come i potenziali inconvenienti sull'autonomia funzionale derivanti dall'ospedalizzazione rischino di essere più drammatici per i soggetti anziani più integri al momento del ricovero.

Ehlenbach et al⁽⁹⁾ hanno recentemente valutato se vi fosse un maggior declino cognitivo ed un maggior rischio di demenza negli anziani ricoverati per malattie acute o critiche in strutture intensive. In un campione di 2929 individui ultrasessantacinquenni seguiti per circa 6 anni 1287 soggetti hanno

	Overall			Physically Frail					
				No			Yes		
Functional Outcome ¹	β	SE	<i>p</i> Value	β	SE	<i>p</i> Value	β	SE	<i>p</i> Value
Disability Measure									
IADL	0.082	0.017	<.001	0,71	0.037	<.001	0.038	0.016	.015
Mobility	0.027	0.009	.003	0.077	0.018	<.001	0.013	0.011	.249
Ability Measure									
Physical activity	-0.088	0.042	.035	-0.141	0.064	.029	-0.049	0.056	.383
Social activity	-0.026	0.007	<.001	-0.036	0.010	<.001	-0.018	0.009	.062

Notes: Results are adjusted for the baseline value of the respective functional outcome, age, sex, race/ethnicity, living situation, years of education, number of chronic conditions, physical frailty (for overall results only), cognitive impairment, depressive symptoms, and temperature (for physical activity only) as described in Methods.

¹ A positive β represents functional decline for the disability outcomes, while a negative β represents functional decline for the ability outcomes.

SE = standard error; IADL = instrumental activities of daily living.

Tabella II. Coefficienti di regressione per gli effetti dei mesi di permanenza a letto sugli outcomes funzionali (da Gill TM et al).

riportato almeno una ospedalizzazione. Sia il declino cognitivo (Tabella III) che il rischio di demenza (Tabella IV) erano significativamente maggiori nei pazienti che avevano avuto almeno una ospedalizzazione per malattia acuta o critica.

L'anziano ricoverato a seguito di un evento acuto, in particolare se tale da richiedere un provvedimento di ospedalizzazione, presenta quindi un maggior rischio di confusione acuta e delirium, di complicanze infettive spontanee o postprocedurali, di allettamento ed immobilizzazione, di malnutrizione e declino funzionale, eventi che nel loro insieme si traducono spesso in un circolo vizioso automantenentesi ed esitante in outcomes negativi, sia in termini di sopravvivenza che di qualità di vita ed autonomia residua (Figura 2).

L'approccio ai pazienti di questa età comporta quindi problematiche importanti e specifiche, che in qualche misura sfuggono al tradizionale approccio malattia-orientato della medicina tradizionale. In ragione delle specifiche caratteristiche di questa popolazione di pazienti (estrema eterogeneità clinica e funzionale, polipatologia, comorbilità, e politerapia)

	Difference in Score (95% CI) ^b			
	Following Noncritical Illness Hospitalization	<i>P</i> Value	Following Critical Illness Hospitalization	<i>P</i> Value
Follow-up CASI	-2.27 (-2.61 to -1.93)	< .001	-2.92 (-5.00 to -0.86)	.006
Adjusted difference ^c	-1.01 (-1.33 to -0.70)	< .001	-2.14 (-4.24 to -0.03)	.047
Follow-up CASI IRT	-0.28 (-0.32 to -0.24)	< .001	-0.27 (-0.45 to -0.09)	.003
Adjusted difference ^c	-0.12 (-0.16 to -0.08)	< .001	-0.19 (-0.38 to -0.01)	.04

Abbreviations: CASI = Cognitive Abilities Screening Instrument; CI = confidence interval;
IRT = item response theory

^a Linear regression with generalized estimating equations to account for repeated observations, specifying an exchange-able correlation matrix and robust variance estimates.

^b The reference category in each comparison was no hospitalization.

^c Adjusted for age at study visit, sex, baseline cognitive score, years of education, time since baseline visit, and the baseline comorbidities coronary heart disease and cerebrovascular disease.

Tabella III. Differenze nel punteggio cognitivo (CASI score) al follow-up in relazione all'evento ospedalizzazione (da Ehlenbach WJ et al).

	No Hospitalizations During Study (n = 1601)	One or More Noncritical Illness Hospitalizations (n = 1287)	<i>P</i> Value	One or More Critical Illness Hospitalizations (n = 41)	<i>P</i> Value
Cases of incident dementia, No.	146	228		5	
Risk of incident dementia, HR (95% CI)	1 [Reference]	1.5 (1.3 to 1.9)	< .001	1.7 (0.7 to 4.0)	.27
Adjusted risk of incident dementia, HR (95% CI) ^b	1 [Reference]	1.4 (1.1 to 1.7)	.001	2.3 (0.9 to 5.7)	.09

Abbreviations: CI = confidence interval; HR = hazard ratio.

^a Cox proportional hazards regression with age at study visit as the time axis and age at study entry as the beginning of the time period.

^b Adjusted for age at study entry, sex, baseline Cognitive Abilities Screening Instrument item response theory score, years of education, and baseline comorbidities of coronary heart disease and cerebrovascular disease, with presence of coronary heart disease at baseline included as a time-varying covariate.

Tabella IV. Rischio di incidenza di demenza al follow-up in relazione all'evento ospedalizzazione (da Ehlenbach WJ et al).

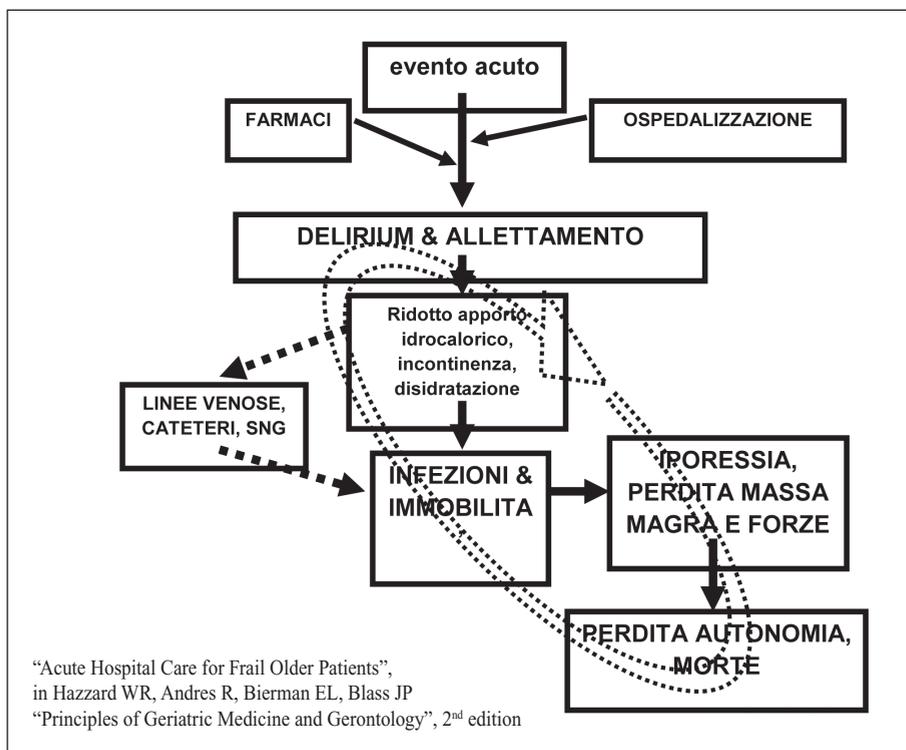


Figura 2.

soltanto una valutazione complessiva che non si fermi ai tradizionali parametri biomedici ma che includa gli aspetti psico-cognitivi, il livello di autonomia funzionale, e le condizioni sociali e familiari, consente una valutazione attendibile delle prospettive di sopravvivenza e di salute per ciascun individuo sulla base della quale definire priorità e fattibilità delle opzioni terapeutiche.

In questo ambito, abbiamo potuto dimostrare alcuni anni fa^(6,7) come l’inclusione di alcuni parametri facilmente rilevabili e specificatamente suggestivi di vulnerabilità dell’anziano (ridotta massa corporea, perdita di autonomia e deterioramento cognitivo) (Tabella V) possano notevolmente migliorare le capacità prognostiche nell’anziano con malattia acuta (Figura 3), permettendo quindi migliore stratificazione del rischio e scelta del trattamento.

La gestione dell’anziano in ospedale richiede pertanto competenze specifiche che prescindono dalle generiche raccomandazioni cliniche

Variable	Odds Ratio	95% Confidence Interval
Body mass index, kg/m ²	0.93	0.88-0.99
Activities of daily living (dependence)	2.84	1.71-4.74
Short Portable Mental Status Questionnaire (moderate to severe impairment)	3.98	2.41-6.58
Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score	1.07	1.03-1.12

Tabella V. Variabili indipendentemente predittive di mortalità intraospedaliera in ultrasessantenni ricoverati in Medicina d'Urgenza (da Bo M et al).

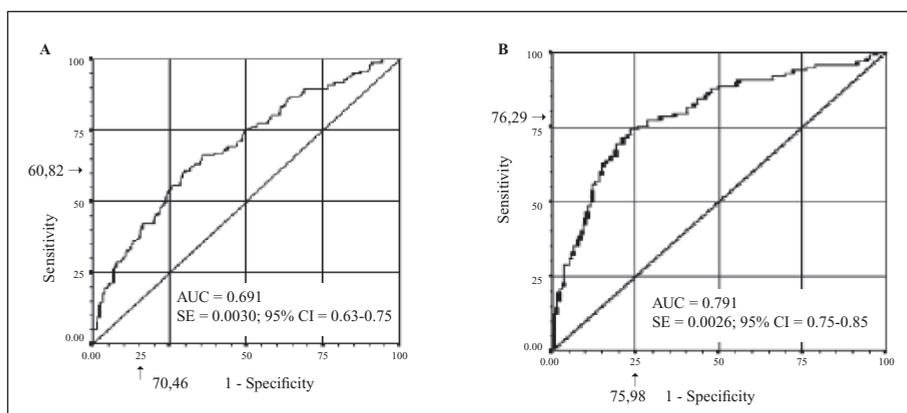


Figura 3. Miglioramento del modello prognostico (Curva ROC) con l'inclusione del Body Mass Index, del livello di autonomia valutato mediante ADL, e del deterioramento cognitivo mediante SPMSQ, oltre al punteggio APACHE (a destra) rispetto al modello prognostico convenzionale basato sul solo punteggio APACHE II.

dell'evidence based medicine (peraltro assai scarsa per pazienti di questa età), e che richiedono una strategia individualizzata finalizzata alla definizione di un ottimale bilancio rischio beneficio non solo in termini di sopravvivenza ma anche, e soprattutto, di preservazione del livello di autonomia funzionale. Strategie finalizzate in questo senso per gli individui anziani dovrebbero quindi includere *a priori* al domicilio una valutazione attenta dell'indicazione reale

e dei potenziali effetti negativi del ricovero stesso, nonché dell'ambito di cura ideale (reparto ospedaliero, ospedalizzazione domiciliare, day hospital) o, in ultima analisi, una valutazione specialistica geriatrica in Pronto Soccorso, volta a scongiurare ricoveri non necessari e frequentemente dannosi. Nei pazienti per i quali vi sia un'indicazione specifica al ricovero, questo dovrebbe avvenire nell'ottica di minimizzarne le potenziali criticità, a partire da strategie di ospitalità e di permanenza in Pronto Soccorso adatte a pazienti di questa età ed alle loro vulnerabilità. In questo senso risultati eccellenti sono stati ottenuti nel trattamento domiciliare di pazienti anziani con diverse patologie acute da parte del servizio di Ospedalizzazione a Domicilio^(1,2,3,18). La gestione domiciliare di pazienti anziani selezionati con patologie frequentemente causa di ospedalizzazione ha dimostrato di poter ottenere risultati clinici simili a quelli del ricovero tradizionale, per lo più con una tendenza a minori complicanze, in particolare per quel che riguarda delirium⁽¹⁴⁾, depressione e sovrapposizioni infettive, oltre a comportare percentuali assai ridotte di successive istituzionalizzazioni dei pazienti rispetto a quanto avviene tra i pazienti ricoverati in ospedale.

Laddove tuttavia il ricovero e l'ospedalizzazione siano indicate ed inevitabili, la gestione dei pazienti anziani in reparti di Geriatria, da parte di personale medico ed infermieristico specificamente addestrato alla conoscenza ed alla gestione delle problematiche specifiche di questa età (delirium, immobilizzazione, infezioni, gestione del dolore, bilancio idrico, ecc) permette di ottenere importanti benefici rispetto ai pazienti ricoverati nelle unità di Medicina Generale, non tanto in termini di sopravvivenza, quanto nel mantenimento e nell'ottimizzazione delle condizioni di autonomia funzionale, nella riduzione di complicanze infettive e delirium, e nella possibilità di mantenere più spesso al domicilio il paziente dopo la dimissione⁽⁸⁾.

In un'epoca caratterizzata da ridotte risorse economiche e crescenti richieste proprio per l'invecchiamento della popolazione, il mantenimento dell'autonomia funzionale e la non istituzionalizzazione dei pazienti rappresentano vantaggi non indifferenti anche per l'economia del sistema socio sanitario oltre che per i pazienti.

BIBLIOGRAFIA

1. Aimonino-Ricauda N, Bo M, Massaia M, Molaschi M, Amati D, Roglia D, 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.
2. Aimonino-Ricauda N, Tibaldi V, Marinello R, Bo M., Isaia G, Scarafioti 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, Tibaldi V, Leff B: *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.
4. Aminzadeh F, Dalziel WB: *Older adults in the emergency department: a systematic review of patterns of use, adverse outcomes and effectiveness of interventions*. Ann Emerg Med 2002; 39: 238-247.
5. Bentley J, Meyer J: *Repeat attendance by older people at accident and emergency departments*. Journ Adv Nurs 2004; 48 (2): 149-156.
6. Bo M, Massaia M, Raspo S, Bosco F, Cena P, Molaschi M, Fabris F: *Predictive factors of in-hospital mortality in elderly patients admitted to a medical intensive-care unit*. J. Am. Geriatr. Soc., 2003; 51: 529-533.
7. Bo M, Raspo S, Massaia M, Cena P, Bosco F, Antro C, Gai V, Fabris F: *A predictive model of in-hospital mortality in elderly patients admitted to medical intensive care units*. J. Am. Geriatr. Soc. 2003; 51: 1507-1508.
8. Bo M, Martini B, Ruatta C, Massaia M, Aimonino Ricauda N, Varetto P, Astengo M, Torta R: *Geriatric ward hospitalization reduced incidence of delirium among older medical inpatients*. Am. J. Ger. Psych. 2009; 17: 760-768.
9. Ehlenbach WJ, Hough CL, Crane PK, Haneuse SJPA, Carson SS, Curtis JR, Larson EB: *Association between acute care and critical illness hospitalization and cognitive function in older adults*. JAMA 2010; 303: 763-770.
10. Fried LP, Tangen CM, Walston J: *Frailty in older adults: evidence for a phenotype*. J Gerontol. Med. Sci. 2001; 56: M146-M156.
11. Gill TM, Allore HG, Holford TR, Guo Z: *Hospitalization, restricted activity, and the development of disability among older persons*. JAMA 2004; 292: 2115-2124.
12. Gill TM, Allore HG, Guo Z: *The deleterious effects of bed rest among community-living older persons*. J Gerontol Med Sci 2004; 59A: 755-761.
13. Grief L.C, *Patterns of ED use and perceptions of the elderly regarding their emergency care: a synthesis of recent research*. J Emerg Nurs 2003; 29: 122-126.
14. Isaia G, Astengo M, Tibaldi V, Zanocchi 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: 109-117.
15. Istituto nazionale di statistica (ISTAT): *Statistiche demografiche ISTAT*. [Http://demo.istat.it/pop2009/index.html](http://demo.istat.it/pop2009/index.html). Gennaio 2009.

16. McCusker J, Karp I, Cardin S, Durand P, Morin P: *Determinants of emergency department visits by older adults: a systematic review*. Acad. Emerg. Med. 2003; 10: 1362-1370.
17. Salvi F, Morichi V, Grilli A, Giorgi R, De Tommaso G, Dessi-Fulgheri P: *The elderly in the emergency department: a critical review of problems and solutions*. Intern. Emerg. Med. 2007; 2: 292-301.
18. Tibaldi V, Isaia G, Scarafioti C, Gariglio F, Zancocchi M, Bo M, Bergerone S, Aimonino Riccauda N: *Hospital at home for elderly patients with acute decompensation of chronic heart failure*. Arch. Intern. Med. 2009; 169: 1569-1575.

LA PREVENZIONE DELL'OBESITÀ: L'UNIONE FA LA FORZA!

Sergio Bernasconi, Marilena Garrubba, Chiara Sartori

Università degli Studi di Parma

Key words: *Obesity / Obesità*
Epidemiology / Epidemiologia
Prevention / Prevenzione

Abstract:

The prevalence of childhood obesity is rapidly increasing worldwide. This phenomenon has major public health consequences since it promotes the onset of major chronic diseases, such as cardiovascular disease, various types of cancer, diabetes, arterial hypertension. The WHO has established a series of monitoring and promoting dietary habits and lifestyles, to curb the “global epidemic” of obesity. Primary prevention plays a dominant role, and involves all educational figures that revolve around child, primarily family, teachers, Pediatricians and Institutions.

Riassunto:

La prevalenza dell'obesità nella popolazione infantile è in rapido incremento in tutto il mondo, e tale fenomeno determina importanti conseguenze sulla salute pubblica, poiché predispone e favorisce l'insorgenza delle principali malattie croniche, causa di mortalità nella popolazione, quali le malattie cardiovascolari, vari tipi di tumori, il diabete e l'ipertensione arteriosa. L'OMS ha istituito una serie di interventi di sorveglianza e promozione di abitudini alimentari e stili di vita salutari, volti ad arginare “l'epidemia globale” di obesità. La prevenzione primaria riveste un ruolo predominante e vede coinvolte tutte le figure educative che ruotano intorno al bambino, in primo luogo la famiglia, gli insegnanti, i Pediatri e le Istituzioni.

IL FENOMENO OBESITÀ

Nei paesi occidentali, le principali problematiche di salute della popolazione derivano dalle patologie croniche (malattie cardiovascolari, tumori, diabete, obesità)⁽¹²⁾, per le quali, pur non escludendo il ruolo di *fattori genetici* predisponenti, entrano prevalentemente in causa *fattori comportamentali*. Su questi ultimi è possibile intervenire con campagne informative, educative e di promozione della salute tendenti a facilitare l'adozione di stili di vita salutari, in particolare attraverso una sana alimentazione ed una regolare attività fisica.

La prevalenza di obesità nella popolazione infantile, adolescenziale ed adulta è in rapido incremento in tutto il mondo, in modo particolare nei paesi industrializzati, compresa l'Italia⁽¹⁾, tanto che è stato introdotto il termine di "epidemia di obesità". Questa situazione determina importantissime conseguenze sulla salute pubblica, perché predispone e favorisce l'insorgenza delle principali malattie croniche, quali le malattie cardiovascolari, vari tipi di tumori, il diabete e l'ipertensione arteriosa, che rappresentano alcune delle più importanti cause di mortalità nella popolazione⁽¹⁰⁾.

L'obesità è relativamente comune in Europa, in particolare tra le donne, soprattutto in quelle delle nazioni del sud e dell'est europeo. Recenti studi condotti nelle singole nazioni evidenziano che il range di prevalenza varia dal 10% al 27% per gli uomini, e dal 10% al 38% per le donne⁽⁸⁾. Nella "Conferenza sull'obesità, una sfida per l'Unione Europea" tenutasi a Copenaghen nel settembre 2002, il tema è stato analizzato nella sua gravità. È emerso tra l'altro che, nell'ultima decade, l'incidenza dell'obesità in Europa è aumentata del 10-40%. L'aumento più drammatico si è verificato nel Regno Unito dove la prevalenza è più che triplicata dal 1980.

In base a tali premesse, l'OMS ha recentemente perfezionato una "Strategia Globale su dieta, attività fisica e salute"⁽¹³⁾. Gli interventi di promozione di sani stili di vita sono tanto più efficaci quanto più essi sono in grado di coinvolgere persone di tutte le età e strato sociale e se esiste, a loro supporto, una identità di intenti da parte di decisori politici, amministratori locali, produttori, mondo della scuola.

LA SITUAZIONE ITALIANA

Nel nostro paese, i fattori di rischio per il sovrappeso e l'obesità si distribuiscono in maniera molto differente nella popolazione e sono molto più diffusi tra le persone delle classi socio-economiche più basse, le quali hanno una mortalità e una morbidità molto maggiori rispetto a chi, socialmente ed

economicamente, si trova in posizione più avvantaggiata. A compromettere il proprio patrimonio di salute sono soprattutto gli immigrati, a causa delle condizioni di vita in cui spesso si trovano in Italia.

Tali condizioni, inoltre, pur influenzate da comportamenti individuali, sono fortemente sostenute dall'ambiente di vita e da quello sociale. I comportamenti salutari, infatti, sono resi sempre più difficili dall'organizzazione e dal disegno urbano delle città, dall'automatizzazione, dai prezzi a volte più elevati degli alimenti più sani e dai condizionamenti del marketing. Ne consegue che i soggetti più esposti a questi rischi sono quelli più vulnerabili: i bambini e le famiglie più povere.

In Italia, dati recenti sull'obesità dell'adulto sono stati forniti dall'Indagine Multiscopo ISTAT, i quali hanno messo in evidenza che il sovrappeso è prevalente negli uomini, l'obesità è distribuita in ugual misura in donne e uomini, mentre il sottopeso è prevalente nelle donne giovani. Di particolare interesse è il monitoraggio dell'obesità nell'età infantile ed adolescenziale. Vari Autori evidenziano come un eccesso di peso nelle età giovanili predisponga al rischio di essere obesi da adulti⁽⁷⁾, in particolare se tale condizione si associa ad un eccesso di peso nei genitori⁽¹¹⁾.

Per quanto riguarda l'età in cui la correlazione con l'obesità dell'età adulta è maggiore, alcuni studi identificano due periodi principali: fra i 5 ed i 7 anni e la pubertà⁽⁶⁾. Di particolare interesse è proprio la fascia di età fra i 5-7 anni. In tale periodo si sviluppa infatti il cosiddetto "adiposity rebound", momento in cui si registra un fisiologico accrescimento del Body Mass Index (BMI), dopo la riduzione avviata a partire dal primo anno di vita. Le modalità e la tempistica con cui procede l'adiposity rebound possono rappresentare un indicatore dello sviluppo di obesità nel bambino⁽⁴⁾.

In un recente rapporto dell'International Obesity Taskforce (IOTF) e dell'European Association for the Study of Obesity (EASO) viene evidenziato come anche in molti paesi europei si assista ad un rapidissimo incremento di sovrappeso nella popolazione infantile.

In Italia, secondo quanto riportato da alcuni Autori⁽⁶⁾, la percentuale di bambini ed adolescenti in sovrappeso tra i 6 e i 17 anni raggiunge circa il 20%, mentre è pari al 4% la quota degli obesi; il problema interessa soprattutto la fascia di età 6-13 anni, e riguarda soprattutto i maschi.

Nell'ultimo decennio, nel nostro paese si è assistito ad un incremento dell'obesità nell'età evolutiva. Nei bambini della scuola primaria l'incremento oscilla al Centro-Sud tra il 14% e il 23% e al Nord tra il 14% e il 15% e negli studenti delle scuole medie, rispettivamente tra il 22% e il 27% e tra il 17,5% e il 19,5%. Recentemente, alcuni autori hanno evidenziato in bambini italiani

frequentanti la terza classe della scuola primaria, una prevalenza di sovrappeso del 23,9% e di obesità del 11,1%^(2,4).

CONSEGUENZE DELL'OBESITÀ

Un bambino o un adolescente con elevato BMI ha alto rischio di diventare un adulto sovrappeso o obeso. Bambini con eccesso ponderale grave (BMI > 95° pct) rimangono nel 77% dei casi obesi in età adulta. Le complicanze legate all'obesità sono rappresentate in prima istanza da **rischi a breve termine** costituiti da alterazioni ortopediche, neurologiche, polmonari, gastroenterologiche ed endocrine che si riscontrano solo in bambini con grave obesità; gli effetti a **medio termine** sono costituiti da sviluppo di fattori di rischio cardiovascolare che compaiono in età adulta e sono solo l'ultima fase di un processo aterosclerotico a carico dei vasi arteriosi iniziato in età pediatrica e progredito nel tempo. Infine, benché le ricerche a **lungo termine** sulla morbilità e sulla mortalità associate all'obesità siano ancora piuttosto scarse, gli studi suggeriscono che il rischio di malattie cardiovascolari e di tutte le cause di mortalità risultano aumentate nei soggetti che sono in sovrappeso durante l'infanzia e rimangono tali, anche se in età adulta viene perso il peso in eccesso.

È da considerare inoltre il peso sociale dell'obesità durante l'infanzia e l'adolescenza, costituito dagli effetti a lungo termine sull'autostima e sull'immagine corporea.

PREVENZIONE DELL'OBESITÀ

La prevenzione dell'obesità può essere primaria, secondaria o terziaria. L'obiettivo della *prevenzione primaria* è quello di ridurre l'incidenza dell'obesità, ossia la frequenza con cui nuovi casi si aggiungono alla popolazione.

La *prevenzione secondaria* mira a ridurre invece la prevalenza, ossia la proporzione di casi già riscontrati nella popolazione, cerca cioè di evitare che i bambini sovrappeso diventino obesi o che quelli obesi sviluppino le malattie legate all'obesità.

Infine la *prevenzione terziaria* è finalizzata a ridurre le complicanze associate all'obesità e coincide con il trattamento.

Prevenzione primaria

L'infanzia è un periodo cruciale per stabilire corretti comportamenti alimentari e stili di vita salutari che proteggano i bambini dal rischio di

sviluppare obesità. Un corretto approccio alla prevenzione dell'obesità deve essere multidisciplinare e deve investire diverse competenze^(3,9):

1. Responsabilità e interventi dei Pediatri

Nei programmi di prevenzione e trattamento dell'obesità il ruolo dei pediatri è fondamentale.

La gestione ambulatoriale dell'obesità in età pediatrica incontra molte criticità quali la scarsa motivazione e compliance dei pazienti, l'insufficiente diffusione in ambito medico (pediatri e medici di famiglia) delle raccomandazioni formulate dalle società scientifiche per la prevenzione ed il trattamento dell'obesità, l'insufficiente coinvolgimento dei genitori, la carenza di servizi di supporto.

Attraverso i “bilanci di salute” il Pediatra può riscontrare precocemente l'eventuale tendenza di un bambino a sviluppare eccesso ponderale ed agire tempestivamente attivando, se necessario, altre figure professionali.

Il pediatra dovrebbe quindi:

- Mostrare le conseguenze dei comportamenti scorretti ai genitori per promuovere ciò che è vantaggioso per la salute dei figli, puntando sul ruolo di modello che essi hanno.
- Consigliare:
 - se possibile l'allattamento al seno fino a 6 mesi e la sua prosecuzione dopo l'introduzione dei cibi solidi fino ai 12 mesi ed oltre,
 - l'inizio del divezzamento non prima del sesto mese.
 - di suddividere l'apporto alimentare in 4-5 pasti al giorno, evitando digiuni e, in particolare, di effettuare quotidianamente la prima colazione.
 - di limitare l'uso di televisione, computer e videogiochi ad un massimo di due ore al giorno e rimuovere TV, computer e videogiochi dalla camera da letto dei bambini.
 - la pratica di una regolare attività fisica e lo sviluppo di uno stile di vita attivo.
- Fornire ai genitori elementi metodologici per lo sviluppo di corrette abitudini alimentari, consigliando diete bilanciate
- Incoraggiare il consumo dei pasti in famiglia e limitare i pasti consumati al ristorante e specialmente nei fast food.
- Valutare almeno 1 volta all'anno le abitudini alimentari del bambino.
- Valutare l'accrescimento staturale-ponderale del bambino con frequenza adeguata all'età e alla velocità di crescita.

L'obiettivo è quello di una “prevenzione globale” finalizzata al benessere psicofisico del bambino e non solo dell'obesità.

2. Responsabilità e interventi degli operatori del Servizio di Igiene degli Alimenti e della Nutrizione (SIAN) - Dipartimento di Prevenzione

- Organizzare menù per le mense scolastiche corretti dal punto di vista nutrizionale.
- Sviluppare programmi di educazione alimentare diretti ai bambini ed agli adolescenti con l'eventuale utilizzo della mensa scolastica per esercitazioni pratiche. I laboratori del gusto per bambini di 8-10 anni si sono rivelati efficaci e molto bene accettati.
- Formare gli insegnanti per l'applicazione di corrette metodologie per la correzione di abitudini alimentari scorrette.
- Realizzare programmi di sorveglianza nutrizionale per monitorare gli effetti degli interventi di prevenzione.

3. Responsabilità e interventi dei genitori

La famiglia rappresenta il luogo più importante per la prevenzione dell'obesità in bambini e adolescenti. È noto che i bambini obesi sotto i 3 anni di età senza genitori obesi hanno un basso rischio di diventare obesi in età adulta, mentre l'obesità dei genitori aumenta più del doppio il rischio di diventare obesi in età adulta sia tra i bambini obesi che tra i non obesi, sotto i 10 anni di età.

L'eccesso ponderale dei genitori, il basso livello socio-economico e l'elevato peso alla nascita sono stati identificati come i fattori di rischio indipendenti più importanti per il sovrappeso e l'obesità per i bambini di 5-7 anni. In particolare, il BMI dei bambini, è significativamente correlato al BMI dei genitori.

Interventi suggeriti a livello familiare:

- Intervento sulle abitudini alimentari e attività fisica dei genitori
- Interventi sulle famiglie di ragazzi preadolescenti, sul miglioramento delle conoscenze alimentari, promozione di corrette abitudini alimentari e aumento di attività fisica hanno ottenuto risultati positivi con una diminuzione, anche se non significativa, del BMI
- Sane abitudini alimentari per tutta la famiglia:
 - consumare la prima colazione
 - utilizzare piatti di piccole dimensioni e porzioni moderate
 - condividere con i figli le scelte alimentari corrette

- evitare di utilizzare il cibo come premio o castigo
- evitare la proibizione di alcuni alimenti
- evitare l'uso di bevande zuccherate al posto dell'acqua e l'uso dei succhi di frutta come sostituti della frutta
- incrementare l'uso di frutta, verdura, legumi nell'alimentazione abituale della famiglia.

Controllare l'uso della televisione:

- spegnere la TV durante i pasti
- non permettere la TV nella stanza da letto dei bambini
- limitare il tempo di TV a non più di due ore al giorno
- spiegare ai bambini il vero scopo degli spot pubblicitari.

Incrementare le possibilità di praticare attività fisica per tutta la famiglia:

- promuovere l'abitudine a camminare insieme per raggiungere scuola, palestra, chiesa, ecc..., invece di utilizzare l'automobile
- permettere la pratica di attività sportive piacevoli e gradite ai figli, compatibilmente con le risorse economiche familiari.

4. Responsabilità e interventi degli insegnanti e dei dirigenti scolastici

a) Insegnanti:

- Inserire l'educazione alimentare nel curriculum
- Favorire l'uso di snack salutari durante la merenda con l'esempio
- Collaborare al momento del pasto con la ristorazione scolastica, invitando i bambini all'assaggio di alimenti nuovi e/o sgraditi con atteggiamento positivo ed evitando il "bis"
- Inserire principi di comprensione per la decodifica dei messaggi pubblicitari nei programmi scolastici.

b) Dirigenti scolastici

- Non permettere l'installazione di distributori di snack e bevande zuccherate nella scuola, permettere solo la vendita di snack corretti dal punto di vista nutrizionale
- Installare un numero di distributori di acqua potabile adeguato al numero degli studenti
- Incoraggiare l'incremento del tempo scolastico dedicato all'attività fisica

- Permettere l'uso delle palestre nel tempo extra-scolastico da parte di organizzazioni sportive allo scopo di permettere a studenti non abbienti di praticare attività sportiva a basso costo o gratuitamente
- Incoraggiare il raggiungimento della scuola a piedi da parte dei bambini e dei ragazzi, favorendo l'attuazione di iniziative quali il "Piedibus"

5. Responsabilità e interventi del Governo e delle istituzioni politiche

- Definire l'obesità come una malattia di interesse sociale
- Predisporre finanziamenti adeguati per programmi di prevenzione
- Implementare la qualità del trasporto pubblico ed incoraggiarne l'uso
- Implementare la sicurezza stradale con la costruzione di piste ciclabili e pedonali nei centri urbani
- Istituire facilitazioni economiche per il consumo di frutta e verdura
- Elevare le tasse su alimenti e bevande ricchi in grassi e/o zuccheri
- Rendere obbligatoria l'etichetta con informazioni nutrizionali chiare e dettagliate su tutti gli alimenti confezionati.
- Ridurre gli spot pubblicitari di alimenti diretti ai bambini e l'associazione di prodotti alimentari con collezioni, club e premi diretti ai bambini.

ATTIVITÀ FISICA

Il ruolo dell'attività fisica nella prevenzione dell'obesità (prevenzione primaria e secondaria) è importante quanto quello alimentare, sebbene meno studiato e divulgato. Tuttavia alcuni recenti interventi basati sugli interventi scolastici, diretti sia all'aumento dell'attività fisica e/o alla diminuzione dei comportamenti sedentari, hanno dimostrato risultati incoraggianti. Anche se in letteratura esiste una quantità limitata di dati, le strategie basate su riduzione della sedentarietà ed aumento dell'attività fisica si sono confermate più efficaci.

In un meeting tenutosi a Bangkok il 21-23/05/02 (IASO 1st Stock Conference and consensus statement) sono state accettate all'unanimità le seguenti linee guida:

- per gli adulti, 30 minuti di attività giornaliera di intensità moderata, per tutti i giorni della settimana, sono importanti per limitare i rischi di malattie croniche
- per le persone obese, se si vuole prevenire l'accumulo di peso, sono necessari almeno 60-90 minuti di attività giornaliera di intensità moderata oppure meno minuti di attività di intensità vigorosa.

- sembra inoltre che per prevenire il passaggio dal sovrappeso all'obesità occorranza circa 45-60 minuti di attività giornaliera di intensità moderata
- per i bambini infine è raccomandato un tempo ancora maggiore di attività fisica.

LA SORVEGLIANZA NUTRIZIONALE

Come per altri fenomeni, anche per le patologie correlate all'alimentazione è importante mantenere un attento monitoraggio della loro prevalenza ed incidenza e conoscere i determinanti socio-ambientali che possono influenzare le tendenze e le abitudini alimentari della popolazione di riferimento. Per far questo è necessario costruire ed organizzare un Sistema di Sorveglianza Nutrizionale.

L'OMS ha definito la sorveglianza nutrizionale un "sistema che si prefigge, quale obiettivo, lo studio e la descrizione in una determinata popolazione e/o territorio, delle patologie in qualche modo correlabili con la dieta, in termini di presenza, distribuzione, cause e fattori protettivi, tendenze evolutive nel tempo". Scopo finale di questo sistema è la prevenzione e/o il controllo delle malattie correlabili con fattori nutrizionali, con conseguente vantaggio in salute e risparmio nei costi, diretti ed indiretti, per la società⁽⁵⁾.

Un Sistema di Sorveglianza Nutrizionale deve, per le popolazioni considerate (per esempio, una popolazione regionale), consentire di individuare i problemi nutrizionali da affrontare con priorità, fornire specifiche indicazioni di carattere operativo, indirizzare le strategie di intervento preventivo per la correzione dei problemi evidenziati. Recentemente, l'importanza di realizzare Sistemi di Sorveglianza Nutrizionale nella popolazione è stata sottolineata dal Ministero della Salute, nell'ambito delle strategie per la prevenzione dell'obesità e delle malattie croniche ad essa correlate⁽⁸⁾. Per attivare un Sistema di Sorveglianza Nutrizionale è necessaria la creazione di una specifica rete di raccolta continua di dati, oltre a personale appositamente formato.

In Italia, come in altri Paesi europei, la necessità di seguire con attenzione la situazione nutrizionale della popolazione generale e, in particolare, dei nostri bambini è un'acquisizione molto recente e fortemente motivata dalla percezione, anch'essa piuttosto recente, dell'obesità come problema prioritario di salute pubblica.

Fino a oggi, sono stati condotti vari studi regionali o di AUSL basati su misurazioni dirette dei bambini per lo più tra 6 e 9 anni, ma tali studi differiscono per tempi, modalità, età campionate e diversi altri aspetti che ne rendono difficile il confronto. Le uniche fonti informative nazionali sono

rappresentate dalle indagini multiscopo dell'ISTAT (condizioni di salute e ricorso ai servizi sanitari 1999/2000, in cui però peso e altezza dei minori sono stati comunicati dai genitori e non misurati direttamente) che evidenziano come nel nostro paese il 24% dei ragazzi tra i 6 e i 17 anni presenti un eccesso ponderale, fenomeno che sembra interessare le fasce di età più basse ed essere più frequente nelle regioni del sud Italia.

Un iniziativa recente, attuata al fine di definire e mettere a regime un sistema di raccolta dati nazionale sullo stato nutrizionale dei bambini di età compresa tra i 6 e i 10 anni, con acquisizione di informazioni dirette su alcuni parametri antropometrici, abitudini alimentari e attività fisica, prende il nome **“OKkio alla SALUTE – Promozione della salute e della crescita sana dei bambini della scuola primaria”**, collegato al programma europeo “Guadagnare salute” (recepito in Italia con DPCM del 4 maggio 2007) e al “Piano nazionale della prevenzione”, la cui coordinazione è stata affidata dal Ministero della Salute/CCM e dalle Regioni al CNESPS-ISS. L'indagine OKkio alla Salute dell'Istituto Superiore di Sanità mette in evidenza che 1 milione e centomila bambini italiani tra i 6 e gli 11 anni sono sovrappeso o obesi: più di 1 bambino su 3, quindi, ha un peso superiore a quello che dovrebbe avere per la sua età.

Nel corso del 2008, sono stati pesati e misurati 45.590 alunni delle scuole terze primarie elementari in 18 regioni italiane. L'indagine ha visto una partecipazione elevatissima dei bambini e delle famiglie (solo il 3% ha deciso di non partecipare all'indagine). Gli alunni hanno compilato un breve questionario sulle abitudini alimentari e di attività fisica e sono stati poi pesati e misurati vestiti dagli operatori sanitari delle ASL, che hanno garantito l'uniformità e la qualità dei dati raccolti. Tra i genitori 46.469 hanno compilato un questionario fornendo informazioni sugli stili di vita dei propri figli e sulla propria percezione del problema. L'indagine ha messo in luce la grande diffusione tra i bambini di abitudini alimentari che non favoriscono una crescita armonica e che predispongono all'aumento di peso, specie se concomitanti. In particolare, emerge che:

- l'11% dei bambini non fa colazione
- il 28% la fa in maniera non adeguata
- l'82% fa una merenda di metà mattina troppo abbondante
- il 23% dei genitori dichiara che i propri figli non consumano quotidianamente frutta e verdura.

Anche i dati raccolti sull'attività fisica sono poco confortanti: solo 1 bambino su 10 fa attività fisica in modo adeguato per la sua età e 1 su 4 non ha svolto attività fisica il giorno precedente l'indagine. Quasi 1 bambino su 2 abusa di

TV e videogiochi (per cui si raccomanda di non superare le 2 ore al giorno): un comportamento favorito dal fatto che la metà dei bambini dispone di un televisore in camera propria. Inoltre, gli stessi genitori non sempre hanno un quadro corretto della situazione ponderale del proprio figlio: tra le madri di bambini con sovrappeso/obesità, ben 4 su 10 non ritengono che il proprio figlio abbia un peso eccessivo rispetto alla propria altezza.

L'esperienza di Parma

Nell'ambito del progetto "Mangiar sano allunga la vita" promosso dal Comune di Parma, si colloca uno studio condotto su un campione di 317 studenti delle Scuole Medie di Parma, di età compresa tra gli 11 e i 18 anni, volto ad indagare le abitudini alimentari e lo stile di vita dei ragazzi, al fine di promuovere una più consapevole e attenta prevenzione delle principali patologie legate all'eccesso di peso.

Gli strumenti utilizzati per rilevare comportamenti nutrizionali e stile di vita sono stati due questionari, anonimi:

1. **Questionario nutrizionale**, che si propone di indagare la giornata alimentare, i comportamenti alimentari e gli atteggiamenti psicologici nei confronti del cibo, le conoscenze possedute in campo alimentare.
2. **Questionario attività motoria**, che mira ad indagare il tipo di attività nel corso della giornata, la pratica dell'attività fisica, gli ostacoli oggettivi e soggettivi allo svolgimento di attività sportiva e le proposte per superarli, l'immagine corporea e il suo valore relazionale.

L'analisi delle risposte date ai questionari somministrati ha confermato l'esistenza di alcuni dei più comuni errori in ambito nutrizionale e nello stile di vita commessi dagli adolescenti, quali saltare la colazione; non aggiungere due spuntini ai pasti principali; preferire cibi confezionati, da mangiare in piedi e con le mani (snack dolci/salati, gelati, patatine fritte, pizza, panini e focacce farcite) e bevande gassate e zuccherate, soprattutto fuori pasto, davanti alla televisione o al computer. È emerso che la cena riveste il ruolo di pasto primario della giornata, rispetto a colazione e pranzo, per la maggiore durata, la presenza della famiglia riunita nel focolare domestico, l'interscambio; la colazione non viene fatta o viene consumata in fretta e in solitudine, talvolta (12% dei casi) al bar; il pranzo dura in genere dai 10 ai 30 minuti, viene consumato con i genitori o con i nonni ma spesso anche da soli, per lo più guardando la televisione; i mass media rivestono un ruolo non poco marginale nella scelta degli alimenti, facendo cadere la scelta su cibi ad alto contenuto calorico.

Per quanto riguarda l'attività motoria è emerso che i ragazzi dedicano ad essa poco tempo della propria giornata, utilizzano mezzi di trasporto quali l'autobus o l'automobile per recarsi a scuola e hanno uno stile di vita sedentario, passando molte ore davanti a televisione e computer.

Un dato degno di nota è la manifesta consapevolezza da parte dei ragazzi degli errori in cui incorrono in ambito nutrizionale e motorio, ma anche la difficoltà a trasformare la teoria in pratica.

In conclusione, la prevenzione primaria e secondaria del sovrappeso e dell'obesità, assumono un ruolo assimilabile alla terapia, pertanto si rende necessario un intervento multidisciplinare che coinvolga tutte le figure educative che ruotano intorno al bambino al fine di consentire l'individuazione dei problemi nutrizionali e motori da affrontare con priorità, di fornire specifiche indicazioni di carattere operativo e di indirizzare le strategie di intervento preventivo.

BIBLIOGRAFIA

1. Adamo D, Montecolle S, Ortenzi A, Orsini S, De Vitiis C, Ortenzi A: *Stili di vita e condizioni di salute. Indagine multiscope sulle famiglie. "Aspetti della vita quotidiana"*. Ed. ISTAT, 2003, Roma.
2. Angelini P, Mignani R, Di Martino E: *Sorveglianza nutrizionale. Determinanti e indicatori di rischio obesità nella popolazione infantile. "I Contributi"*. Ed. Regione Emilia Romagna, 2006, Bologna.
3. August GP, Caprio S, Fennoy I, Freemark M, Kaufman FR, Lustig RH, Silverstein JH, Speiser PW, Styne DM, Montori VM: *Prevention and treatment of pediatric obesity: an endocrine Society Clinical Practice Guidelines based on expert opinion*. J. Clin. Endocrin. Metab. 2008; 93: 4576-4599.
4. Bevilacqua N, Branca F, Cairella G, Censi L, D'Addesa D, D'Amicis A, Leclercq C, Rossi L, Saba A, Sette S, Tabacchi G, Turrini A: *Manuale di Sorveglianza Nutrizionale*. Ed. Istituto Superiore di Sanità per Istituto Nazionale di Ricerca degli Alimenti e della Nutrizione (IRAN), 2003, Roma.

5. Ferro-Luzzi A, Leclercq C: *Nutritional surveillance: an outline*. In "Food and Nutrition Policy in Europe". 1993: 113-117.
6. Gargiulo L, Granicolo E, Brescianini S: *Eccesso di peso in bambini ed adolescenti*. Atti del Convegno "Informazione statistica e politiche per la promozione della salute". Ed. ISTAT, 2002, Roma.
7. Guo SS, Wu W, Chumlea WC, Roche AF: *Predicting overweight and obesity in adulthood from body mass index values in childhood and adolescence*. Am. J. Clin. Nutr. 76: 653-658, 2002.
8. Lobstein T, Rigby N, Leach R: *International Obesity Task Force: EU Platform on Diet, Physical Activity and Health*. Ed. EASO, 2005, London.
9. Società Italiana di Nutrizione Umana: *Prevenire l'Obesità in Italia*. Ed. EDRA Medical Publishing & New Media, 2001, Milano.
10. Whitaker RC, Pepe MS, Wright JA, Seidel KD, Dietz WH: *Early Adiposity Rebound and the Risk of Adult Obesity*. Pediatrics. 1998; 3 (E5): 101.
11. Whitaker RC, Wright JA, Pepe MS, Seidel KD, Dietz WH: *Predicting obesity in young adulthood from children and parental obesity*. New. Engl. J. Med. 1997; 337, 869-873.
12. WHO: *Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases*. World Health Organization. Technical report series n. 916. Ed. WHO/FAO, 2003, Geneve.
13. WHO: *Global strategy on diet, physical activity and health*. Fifty-seventh world health assembly. Ed. WHO/FAO, Geneve.

**UN SECOLO DI AMIANTO:
DA MINERALE MAGICO A POLVERE MICIDIALE.
DEDICATO A FRANCO MOLLO**

Benedetto Terracini

(già) professore di Epidemiologia dei Tumori
Università degli Studi di Torino

Key words: *Asbestos / Amianto*
 Cancer / Cancro
 Remediation / Bonifica
 Piedmont / Piemonte
 Epidemiology / Epidemiologia

Abstract:

Asbestos related conditions are a major concern in Italy (where in the past industrial uses of asbestos were up to 150.000 tons per year). This paper is the text of a lecture on the impact of the industrial use of asbestos on the Italian population, addressed to a non-expert public of medical doctors and scientists. The bulk of the presentation consists in incidence and mortality data of asbestos-related conditions in Italy. Attention is focussed particularly on findings in Piedmont. In this region, a major chrysotile producing quarry was active in Balangero up to the late 80s, whereas in the area of Casale Monferrato a major asbestos-cement producing Eternit plant has caused dramatic consequences both in the workforce and in the general population. In 1992, production, trade, import and export of asbestos-containing materials have been banned in Italy. Some current data regarding remediation (which unfortunately proceeds slowly) are presented. Finally, the text indicates some suggestions about priorities for research in asbestos-contaminated areas such as Piemonte.

Riassunto:

Le malattie causate dall'amianto sono un grave problema in Italia, dove in passato la quantità di amianto utilizzata annualmente per l'industria si avvicinava alle 150.000 tonnellate. Il presente lavoro è il testo di una conferenza sull'impatto del pregresso uso industriale di amianto sulla popolazione italiana, rivolta a un pubblico di medici e ricercatori non esperti in tema di amianto.

Il nucleo della presentazione consiste nei dati di incidenza e mortalità delle malattie da amianto in Italia. L'attenzione è focalizzata principalmente sulle osservazioni in Piemonte. In questa regione, fino alla fine degli anni 80, la cava di Balangero è stata la principale sorgente del crisotilo utilizzato in Italia. A Casale Monferrato, lo stabilimento Eternit che produceva cemento amianto è stato causa di conseguenze drammatiche sulla salute dei dipendenti e della popolazione generale.

Nel 1992, produzione, commercio, importazione e esportazione di amianto e di prodotti contenenti amianto sono stati vietati in Italia. Vengono presentati alcuni dati correnti sulla decontaminazione che ha fatto seguito al bando, la quale purtroppo procede con grande lentezza.

Infine, il testo indica qualche suggerimento sulle priorità per la ricerca in aree contaminate con amianto come il Piemonte.

PREMESSA

Devo confessare che l'attraente titolo della mia presentazione non è originale, ma è mutuato da quello di un libro dello storico Tweedale⁽¹³⁾, la cui lettura raccomando agli interessati. In Piemonte, dove è ora in corso un importante processo giudiziario promosso dalle vittime della Eternit SpA, è da ricordare il centenario di una sentenza in tema di amianto pronunciata il 31 agosto 1906 dal Tribunale di Torino. Il caso originava da una segnalazione del "Progresso del Canavese" che – tra gli opifici in Nole Canavese – l'industria dell'amianto era la piu pericolosa, causando annualmente molte vittime e che nelle tavole necrologiche di quel comune appariva "con triste frequenza segnato il decesso di operai dell'amianto per tisi, bronchite e gastroenterite". L'azione contro il giornale era stata avviata da parte della British Asbestos Company, proprietaria di uno stabilimento di Nole. Nella sentenza, di tale azione il tribunale riconobbe l'infondatezza e condannò la parte attrice a sostenere le spese processuali e il costo della pubblicazione della sentenza sul "Progresso del Canavese". La sentenza a favore del giornale venne poi confermata in appello. Consulente per il giornale era il dottor Graziadei dell'Ospedale Mauriziano, mentre il perito per la British Asbestos era il professor Luigi Pagliani, igienista⁽³⁾.

Lungo tutto il secondo XX, e soprattutto dopo la seconda guerra mondiale l'utilizzo industriale delle diverse forme di amianto e la produzione di materiali contenenti amianto per uso domestico hanno avuto una incredibile diffusione. In Italia, il massimo utilizzo ha avuto luogo negli anni 70, con un picco intorno alle 150.000 tonnellate annuo (circa 3 chili per italiano), di cui circa tre quarti di produzione italiana. Il principale sito di produzione, in Italia, è stata la cava di cisotilo di Balangero, in provincia di Torino. Il crisotilo è un serpentino, mineralogicamente diverso dagli anfiboli (crocidolite, amosite, tremolite). Esso condivide con gli anfiboli la proprietà di produrre asbestosi e cancro, anche se – per unità di misura di esposizione – la sua potenza nociva è inferiore a quello degli anfiboli (è il caso di ricordare che il rischio di una malattia ambientale corrisponde al prodotto tra potenza nociva di un agente e entità della esposizione).

Lungo il secolo, le circostanze di esposizione lavorativa ad amianto sono mutate. Nella tipologia delle circostanze di esposizioni lavorative, si possono riconoscere tre fasi: corrispondenti a diverse circostanze di esposizione ad amianto, ovviamente con sovrapposizioni tra l'una e l'altra:

- 1 Estrazione e manifattura di materiali di amianto (ad es cemento amianto);
- 2 Impiego di prodotti contenenti amianto (ad es coibentazione, cantieristica navale);

3 Attività che determinano esposizione a *asbestos in place* (ad es manutenzione nell'industria chimica, edilizia).

In Italia, per le aziende di cui alla fase 3, non sussisteva l'obbligo del premio speciale di assicurazione per le malattie da amianto. Come si dirà più avanti, la proporzione di tumori da amianto dovute a questa forma di esposizione sta aumentando.

Nella storia delle patologia da amianto, è da aggiungere un ulteriore fase, quella dell'inquinamento dell'ambiente extralavorativo e della esposizione della popolazione generale. Di questo è ottimo esempio la tragedia di Casale Monferrato, nota a tutti.

I tumori primitivi delle sierose sono assai rari al di fuori di circostanze in cui vi è stata esposizione a fibre di amianto o asbestiformi. In tutto il mondo, le morti per cancro pleurico e peritoneale sono diverse decine di migliaia all'anno (10-15.000 nella sola Europa Occidentale). A seconda delle popolazioni, fino a 90% dei mesoteliomi sono attribuibili ad esposizioni lavorative ed ambientali ad amianto. L'amianto causa anche cancro polmonare, sia direttamente, sia interagendo con il fumo di tabacco. In passato, si stimava che il rapporto numerico tra cancri polmonari da amianto e mesoteliomi fosse maggiore di 1. Il rapporto è diminuito nei paesi che hanno posto in opera misure di controllo dell'amianto nel luogo di lavoro e delle abitudini tabagiche. Nel 2009, l'Agenzia Internazionale per le Ricerche sul cancro ha incluso anche l'ovaio e la laringe tra gli organi bersaglio della cancerogenicità dell'amianto⁽¹²⁾.

ALCUNI DATI EPIDEMIOLOGICI

Le sorgenti di informazione sulla distribuzione delle malattie da amianto in Italia sono – oltre alle statistiche dell'INAIL – le statistiche di mortalità, i dati dei registri tumori convenzionali (che servono all'incirca il 15% della popolazione italiana) e il Registro Nazionale dei Mesoteliomi – ReNaM –, che ha recentemente pubblicato il suo terzo rapporto⁽⁷⁾. Come segnalato più sopra, dato che l'unico fattore di rischio documentato per i mesoteliomi è l'esposizione ad amianto, l'occorrenza di mesoteliomi è un buon indicatore di pregresse circostanze di esposizione ad amianto.

Secondo le statistiche INAIL, negli anni tra il 2003 e il 2006 le denunce annue di cancri da asbesto (principalmente tumori polmonari e mesoteliomi) sono aumentate da 675 a 753, mentre quelle per asbestosi sono state stabili intorno a 600. All'incirca 85% delle denunce vengono riconosciute⁽⁶⁾.

Nel complesso delle popolazioni italiane servite da un registro tumori convenzionale, intorno al 2000 il tasso di incidenza (annuo, standardizzato

per età, per 100.000) era 2.3 negli uomini e 0.7 nelle donne, con importanti differenze tra le diverse popolazioni italiane. Negli uomini, il tasso massimo – superiore a 6 – era quello di Genova e nel Friuli Venezia Giulia, mentre nelle donne il tasso superava 1 a Genova, Torino, Napoli e Friuli Venezia Giulia⁽²⁾.

Il ReNaM⁽⁷⁾ ha stimato, per tutto il paese, nel 2004, un tasso di incidenza dei mesoteliomi (in qualsiasi sede, ed escludendo i casi a diagnosi probabile o possibile ma non certa), annuo per 100.000 di 3.1 negli uomini e di 1.0 nelle donne. Negli uomini, il tasso più alto (9.8 x 100.000 per anno) è stato stimato in Liguria.

Il ReNaM non si limita a rilevare i casi di mesotelioma, ma correda ogni caso dalla raccolta di una anamnesi professionale e residenziale. Questa anamnesi è oggetto di una analisi – con criteri standardizzati – per giudicare l’attendibilità di una pregressa esposizione ad amianto. Dall’interpretazione delle anamnesi raccolte fino al 2004 è stato giudicato che i casi attribuibili in modo certo, probabile o possibile ad esposizioni professionali negli uomini erano rispettivamente 55.6%, 11.4% e 14.9%. Le corrispondenti proporzioni nelle donne era 17.7%, 3.9% e 11.6%. Esposizioni nell’ambiente familiare, in quello extralavorativo o in occasione di attività nel tempo libero erano, negli uomini rispettivamente 1.0%, 2.7% e 0.9%. Nelle donne le proporzioni erano 15.2%, 10.6% e 2.8%. Per 13,5% dei casi negli uomini e 39.2% dei casi nelle donne, l’anamnesi non consentiva l’identificazione di occasioni di esposizioni ad amianto⁽⁷⁾.

In modo grossolano e prudenziale, si può stimare che nella presente decade, i nuovi casi di malattie causate dall’amianto che si verificano ogni anno in Italia siano 8-900 cancro polmonari, altrettanti mesoteliomi e qualche centinaio di casi di asbestosi.

Dalla distribuzione delle esposizioni professionali rilevata dal ReNaM, risulta che è mutata la frequenza relativa delle circostanze di esposizione tra i casi diagnosticati nei primi anni 90 e quelli più recenti. La proporzione dei casi attribuibili alla industria del cemento amianto è scesa dal 10.3% al 3.4%, e la corrispondente proporzione riguardante i cantieri navali è scesa da 13.3% a 6.6%, mentre i casi attribuibili a lavoro in edilizia sono aumentati da 11.4% a 16.3%.

LA BONIFICA

Rispetto all’Unione Europea, l’Italia ha anticipato (1992 rispetto a 1999) il bando di ogni forma di lavorazione, commercio, importazione ed esportazione di amianto e materiali contenenti amianto. È stato un importante intervento di

prevenzione, ma la rimozione dei materiali nocivi che erano presenti nel nostro paese al momento del bando (stimati in qualche decina di milioni di tonnellate) ha proceduto a rilento. Statistiche precise sono carenti e sono state oggetto di poche analisi. In Toscana, tra il 1996 e il 2006, sono state rimosse annualmente 15-20.000 tonnellate. È stata privilegiata la rimozione dell'amianto friabile (il più nocivo), che ha rappresentato circa 10% del materiale rimosso⁽¹¹⁾.

Non solo in Italia, ma in tutti i paesi europei, rimangono aperti alcune domande da affrontare con criterio scientifico: quanto materiale contenente amianto è attualmente presente nei luoghi di lavoro e nell'ambiente generale? Al momento del bando – o successivamente – vi è stato qualche tentativo di stimare la quantità di materiale contenente amianto che doveva essere eliminato? Sono a disposizione misure attendibili della attuale concentrazione di amianto nelle vicinanze di sorgenti di esposizione? Cosa è la rilevanza della presenza di amianto in edilizia? Che destino hanno i materiali contenenti amianto che vengono rimossi? Che prospettive vi sono per l'inertizzazione dell'amianto?

IL CASO DI CASALE MONFERRATO

In questa città, in cui uno dei principali stabilimenti della Eternit SpA ha prodotto cemento amianto fino al 1987, si è registrata una delle maggiori epidemie di malattie da amianto tra i lavoratori dell'azienda e una epidemia di mesoteliomi nella popolazione generale, in conseguenza della contaminazione con amianto dell'ambiente generale.

La mortalità nelle maestranze dell'azienda è stata seguita dal 1965 al 2003⁽⁹⁾. Nell'arco di 38 anni, negli uomini e nelle donne, si sono verificate rispettivamente 373.9 e 122.8 morti (per tutte le cause) in eccesso rispetto all'atteso sulla base dei dati piemontesi (all'incirca 10 uomini e tre donne morti ogni anno attribuibili al lavoro alla Eternit). Le morti per tumore maligno della pleura e per asbestosi sono state 96 e 162 negli uomini e 39 e 24 nelle donne. I morti per cancro polmonare in eccesso sono stati 139.3 uomini e 6.6 donne. Tutti questi eccessi persistono ancora in anni recenti, coerentemente con le nozioni sui tempi di latenza delle malattie da amianto.

Dal 1990, la popolazione della ex USL 76 di Casale Monferrato (circa 100.000 residenti) è servita da una registrazione attiva dei casi di mesotelioma (afferente al ReNaM). Complessivamente, tra il 1990 e 2006 sono stati registrati 626 nuovi casi di mesotelioma. Lungo tutto il periodo, il numero di casi annui di mesoteliomi diagnosticati a ex dipendenti Eternit si è mantenuto costante tra 4 e 6. Per contro, i casi annui in soggetti che non hanno mai lavorato alla

Eternit sono aumentati da 14 intorno al 1990 a 36 intorno al 2005⁽⁴⁾. Per i residenti nella zona, il rischio cumulativo di ammalarsi di mesotelioma nel corso della vita è intorno a 20 per mille per le donne e intorno a 35 per mille per gli uomini, dieci volte superiore ai corrispondenti rischio per i residenti in altre zone del Piemonte, e intorno a 100 volte il rischio per popolazioni non esposte ad amianto.

Dal mio gruppo di ricerca è anche stato effettuato uno studio epidemiologico retrospettivo di coorte tra 1780 mogli di lavoratori della Eternit che non erano state esse stesse dipendenti Eternit. Sono così state riconosciute 21 morti per tumore maligno della pleura⁽⁵⁾.

QUALE BISOGNO DI RICERCA SUGLI EFFETTI DELL'AMIANTO?

A quasi 20 anni dal bando dell'amianto, rimangono molti problemi ambientali, sanitari e clinici aperti ad approfondimenti scientifici, sia per affinare le conoscenze di base, sia anche per aspetti applicativi per la protezione dell'ambiente e della salute delle persone. Mi limito in questa sede a farne un elenco, raggruppandoli per grandi settori tematici:

- **Ambientali:** Sviluppo di nuove e più efficienti tecniche per l'inattivazione dell'amianto.
- **Medici:** Valutazione di efficacia di protocolli di screening per cancro asintomatico del polmone e della pleura. Protocolli per la terapia dei mesoteliomi. Valutazione della importanza e prevalenza della "asbestosi minima".
- **Epidemiologici:** Trend del rischio negli ex-esposti.
- **Tossicologici:** Meccanismi di tossicità e cancerogenicità delle fibre. Proprietà tossiche dei materiali con proprietà fisico-chimiche confrontabili con quelle dell'amianto e delle nanoparticelle.
- **Sociali ed economici:** Comunicazione del rischio. Percezione del rischio in popolazioni esposte. Costo dell'attenzione agli affetti da malattie da amianto. Storia delle grandi aziende e multinazionali operanti nella estrazione e lavorazione dell'amianto.

Vi sono diversi motivi per approfondire le conoscenze sui meccanismi di cancerogenicità dell'amianto. In primo luogo, cancerogeni ambientali che non sono ancora stati banditi possono agire con gli stessi meccanismi: la conoscenza di questi ultimi può agevolare la prevenzione. Inoltre, almeno teoricamente, a fini di prevenzione, potrebbe essere possibile interferire a livello individuale con i meccanismi patogenetici della malattia. Infine, i meccanismi

di cancerogenesi pleurica (e polmonare) sono attualmente al centro di dibattiti sul rapporto di causalità in diversi casi giudiziari, almeno in Italia.

Parte della ricerca sui meccanismi della cancerogenesi pleurica da amianto è rivolta al riconoscimento di indicatori di suscettibilità geneticamente determinata alla cancerogenesi pleurica. Curiosamente, nella produzione di studi sull'argomento, spiccano quelli italiani. Ad esempio, entrando (aprile 2010) in Medline con le parole chiave "Genetic susceptibility" + "asbestos" + "mesothelioma", vengono identificate 20 voci bibliografiche di cui ben 13 sono italiane. A tutt'oggi, i risultati di queste ricerche sono ben lontani da essere definitivi. Personalmente, non ritengo che questo filone di ricerca sia prioritario. Né vedo alcuno sbocco operativo. L'unico strumento per la prevenzione delle malattie da amianto è eliminare ogni circostanza di esposizione ad amianto.

Nel 2009, gli indirizzi suggeriti dal Comitato scientifico al Comitato Strategico del Centro Amianto della Regione Piemonte per investimenti della Ricerca Sanitaria finalizzata in relazione ai problemi causati dall'amianto in Piemonte sono stati (in ordine di priorità):

1. Studi con applicazioni a effetto immediato: metodiche più efficaci per la bonifica ambientale e verifica della esaustività di accesso ai migliori protocolli terapeutici degli affetti da mesotelioma o altri tumori da amianto.
2. Studi intesi a proteggere la salute degli esposti ad amianto, clinicamente sani.
3. Ricerche cliniche intese a identificare nuovi approcci terapeutici alla cura del mesotelioma.
4. Studi intesi a comprendere i meccanismi di azione biologica dell'amianto a livello cellulare.

Non dico nulla di nuovo ricordando che nel terzo millennio parlare di ricerca vuole dire anche parlare di finanziamento della ricerca. Vorrei quindi commentare la proposta della difesa Eternit del processo in corso nella nostra città, di creare un fondo per la ricerca sulle malattie da amianto alimentato dagli imputati al processo. Non solo c'è da essere perplessi per l'opportunità di questa proposta contestualmente all'avvio del processo. Ciò che è inaccettabile – a mio avviso – è il modo come si intende creare questo fondo: per ogni parte civile disposta ad accettare una transazione a condizione di ritirarsi dal processo, la difesa contribuirà al fondo con una cifra (credo, 20.000 euro). Il Comitato Tecnico Scientifico del Centro Amianto della Regione Piemonte ha espresso la sua perplessità per i seguenti motivi:

- i processi si fanno per fare giustizia, non per raccogliere fondi per la ricerca;
- viene data agli imputati una patina di legittimità alla vigilia di una valutazione della magistratura;
- ricerche così finanziate portano a ritenere “adeguato” il riconoscimento offerto a ciascuna parte civile per il danno subito;
- si interferisce nella delicata decisione che ogni parte civile deve prendere se accettare o meno la transazione;
- si trascurano contributi di altro genere che gli imputati potrebbero dare alla scienza, come la messa a disposizione degli studiosi degli archivi dell’azienda.

UN DOPPIO STANDARD DIFFICILMENTE ACCETTABILE

Negli ultimi anni, diversi paesi al di fuori della Unione Europea hanno vietato la lavorazione e commercio dell’amianto e materiali contenenti amianto con normative non molto diverse da quelle europee. Ciò non è accaduto tuttavia per i principali paesi che producono amianto (Canada, Russia, Cina, Kazackhistan, Brasile) o che lo utilizzano (come l’India). Anche negli ultimi decenni si è verificata un trasferimento delle lavorazioni con amianto dai paesi tradizionalmente industrializzati verso i paesi del cosiddetto terzo mondo⁽⁸⁾. In paesi dove sono disponibili statistiche attendibili di mortalità, come il Messico, è stato contestualmente registrato un drammatico aumento della mortalità per tumori della pleura⁽¹⁾. Si tratta di paesi dove la ricerca intesa a stimare le conseguenze delle lavorazioni e della contaminazione ambientale con amianto non ha raggiunto gli approfondimenti che ci sono stati negli Stati Uniti o in Europa. Ad esempio, al settembre 2005, le citazioni indicate da Medline entrando con le parole chiave “epidemiology” e “asbestos” erano 296 per l’Italia, 28 per il Brasile e 13 per il Messico.

Nel contesto dei trasferimenti internazionali delle produzioni industriali, la convenzione di Rotterdam⁽¹⁰⁾ prevede che – nel caso di lavorazioni nocive – il paese esportatore fornisca al paese importatore una informazione sui rischi legati all’operazione e che da parte del paese importatore venga sottoscritto una sorta di “consenso informato”. I paesi aderenti alla convenzione aggiornano ad intervalli – in modo consensuale – un elenco delle lavorazioni e dei materiali ai quali applicare tali regole. Il crisotilo – l’amianto prodotto dal Canada – è tuttora escluso da tale elenco, nonostante la sua provata cancerogenicità. Il maggiore oppositore a questa estensione è proprio il Canada.

CONCLUSIONE: UN RICONOSCIMENTO DOVUTO

Ho cercato di dare una panoramica estesa, anche se sicuramente superficiale, sui problemi causati dall'utilizzo dell'amianto. Ho anche cercato di dimostrare come, lungo i decenni, la problematica delle conseguenze dell'amianto si è fatalmente allargata da una visione convenzionalmente scientifica ad un approccio meta scientifico. In Italia, Franco Mollo è stato pioniere di questa progressione, senza mai perdere in considerazione critica e in rigore scientifico. Da parte mia, questo è un ulteriore elemento di riconoscenza per Franco Mollo, a integrazione di una amicizia di oltre 60 anni.

BIBLIOGRAFIA

1. Aguilar-Madrid G, Juárez-Pérez CA, Markowitz S, Hernández-Avila M, Sanchez Roman FR, Vázquez Grameix JH: *Globalization and the transfer of hazardous industry: asbestos in Mexico, 1979-2000*. Int. J. Occup. Environ. Health. 2003; 9: 272-279.
2. Associazione Italiana Registri Tumori: *I dati di incidenza e mortalità dei registri tumori per il periodo 1998-2002*. Epidemiol. Prev. 2006; 30 (suppl 2): 56-57.
3. Carnevale F: *Amianto: una tragedia di lunga durata. Argomenti utili per una ricostruzione storica dei fatti più rilevanti*. Epidemiol. Prev. 2007; 31 (suppl 1): 53-74.
4. Centro per la Prevenzione Oncologica della Regione Piemonte. Homepage: www.cpo.it.
5. Ferrante D, Bertolotti M, Todesco A, Mirabelli D, Terracini B, Magnani C: *Cancer mortality and incidence of mesothelioma in a cohort of wives of asbestos workers in Casale Monferrato, Italy*. Int. J. Occup. Environ. Health. 2003; 9: 272-279.
6. INAIL: *Il fenomeno infortunistico nelle statistiche Inail*. Roma, 21 giugno 2007.
7. ISPESL: *Registro Nazionale dei Mesoteliomi, III° rapporto*. Roma, 2010.
8. Kogevinas M, Pearce N, Susser, M, Boffetta P (editors): *Social Inequalities and Cancer. IARC Scientific Publication No. 138*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1997.
9. Magnani C, Ferrante D, Barone-Adesi F, Bertolotti M, Todesco A, Mirabelli D, Terracini B: *Cancer risk after cessation of asbestos exposure: a cohort study of Italian asbestos cement workers*. Environ. Health Perspect. 2007; 115: 1401-1405.

10. Rotterdam Convention. Homepage: www.pic.int.
11. Silvestri S: *Le problematiche connesse con il perdurare della presenza di manufatti contenenti amianto*. Epidemiol. Prev. 2011; 35: 139-143.
12. Straif K, Benbrahim-Tallaa L, Baan R, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Guha N, Freeman C, Galichet L, Cogliano V; WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group: *A review of human carcinogens - part C: metals, arsenic, dusts, and fibres*. Lancet Oncol. 2009; 10: 453-454.
13. Tweedale G: *Magic Mineral to Killer Dust. Turner & Newall and the Asbestos Hazard*. Oxford University Press, Oxford 2000.

ESPERIENZA, PLASTICITÀ, RIPARAZIONE DEL DANNO E RECUPERO DELLA FUNZIONE NERVOSA

Ferdinando Rossi

Centro Interdipartimentale per gli Studi Avanzati in Neuroscienze (NIT)
Dipartimento di Neuroscienze - Università degli Studi di Torino
Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO) - Università
degli Studi di Torino

Key words: *Axon regeneration / Rigenerazione assonale*
Neural plasticity / Plasticità neurale
Rehabilitation / Riabilitazione
Synaptogenesis / Sinaptogenesi
Growth control / Controllo della crescita
Neurodegeneration / Neurodegenerazione

Abstract:

Repair of brain damage induced by traumatic, vascular or degenerative injury depends on the ability of neurons to regenerate their axons or to reorganize spared circuits so to restore function. In the adult mammalian central nervous system regenerative processes are hampered by a set of molecules that actively inhibit neuritic elongation. Such factors are present in the intact nervous tissue, where they regulate physiological plasticity to maintain specific connection patterns. Neutralization of inhibitory mechanisms promotes neuritic elongation, but it is not sufficient to establish, or re-establish, functionally meaningful synaptic contacts. On the other hand, interaction with the external world favours plasticity by modulating regulatory mechanisms. Therefore, the outcome of brain repair depends on the triadic interaction between intrinsic neuronal properties, regulatory molecules in the nervous tissue and the external world. Molecular interactions between neurons and the surrounding microenvironment exert a primarily permissive function on neuritic growth, whereas external stimuli play an essential instructive role on the arrangement of newly-formed contacts. Hence, efficient therapeutic strategies for brain damage require the combination of specific molecular manipulations and targeted rehabilitation paradigms.

Riassunto:

La riparazione del danno cerebrale provocato da patologie traumatiche, vascolari o degenerative dipende dalla capacità dei neuroni di rigenerare i

loro assoni riorganizzare i circuiti superstiti in modo da ristabilire le funzioni alterate. Nel sistema nervoso centrale dei mammiferi adulti i processi rigenerativi sono ostacolati dall'azione di molecole che inibiscono attivamente l'accrescimento neuritico. Queste molecole sono presenti nel tessuto nervoso intatto, dove regolano i processi di plasticità fisiologica al fine di mantenere la specificità delle connessioni. La neutralizzazione dei meccanismi inibitori favorisce la crescita neuritica, ma non è sufficiente per stabilire, o ristabilire, l'organizzazione delle connessioni necessaria per sostenere la funzione normale. D'altro canto, l'interazione con l'ambiente esterno favorisce la plasticità modulando i meccanismi regolatori. L'esito dei processi di riparazione del sistema nervoso dipende, quindi, dalla triplice interazione fra le proprietà intrinseche dei neuroni, le molecole regolatrici presenti nell'ambiente del sistema nervoso centrale e il mondo esterno. Le interazioni molecolari fra neuroni e microambiente svolgono un ruolo principalmente permissivo sui processi di crescita, mentre gli stimoli provenienti dal mondo esterno esercitano una funzione istruttiva sulla distribuzione dei contatti neoformati. Lo sviluppo di strategie terapeutiche efficaci per il danno del sistema nervoso richiede quindi la combinazione sinergica di manipolazioni molecolari specifiche e protocolli di riabilitazione mirata.

INTRODUZIONE

La capacità del sistema nervoso centrale (SNC) adulto di riparare spontaneamente il danno prodotto da una lesione traumatica, vascolare o degenerativa è estremamente ridotta. Di conseguenza, i deficit funzionali provocati da una lesione cerebrale sono gravemente invalidanti e quasi sempre permanenti⁽¹⁰⁾. A prima vista, queste considerazioni suggeriscono che meccanismi biologici capaci di ripristinare l'integrità anatomica dei circuiti nervosi e di restituire una funzione adattativa non siano esistenti o funzionanti. Tuttavia, la capacità di rigenerare spontaneamente strutture complesse, compreso il SNC, è ben evidente nel corso dell'evoluzione e, perfino nei mammiferi, la rigenerazione è possibile nel sistema nervoso periferico^(10,11). Questo indica che la riparazione del SNC non è una *funzione inesistente*, ma piuttosto una *funzione soppressa*.

Negli ultimi decenni, la ricerca nel campo della rigenerazione del sistema nervoso ha registrato notevoli progressi, dimostrando che la mancata riparazione del danno neurale è principalmente dovuta a due ordini di fattori concorrenti:

- 1) da un lato, il potenziale intrinseco di crescita si riduce sensibilmente nei neuroni maturi^(10,26)
- 2) dall'altro, sostanze che inibiscono la crescita neuritica sono espresse nell'ambiente del SNC adulto^(12,15).

Sia la modificazione delle proprietà neuronali intrinseche che la comparsa di fattori regolatori estrinseci non sono conseguenti alla lesione o indotti da una condizione patologica, ma sono eventi connessi con il processo di maturazione fisiologica del tessuto nervoso. In altre parole, se si eccettuano i componenti dei tessuti cicatriziali, la cause che impediscono i processi rigenerativi sono da ricercarsi fra elementi costitutivi del tessuto nervoso intatto, deputati a regolare i fenomeni di crescita e plasticità fisiologica dei circuiti nervosi⁽²⁶⁾. È quindi chiaro che comprendere i meccanismi del controllo della crescita in condizioni normali è un prerequisito cruciale per risolvere il problema della rigenerazione nel SNC. Nelle sezioni seguenti si affronteranno questi quesiti e si discuteranno gli approcci volti a promuovere i processi rigenerativi interferendo con il meccanismo di regolazione della crescita neuritica.

I FATTORI CHE REGOLANO LA CRESCITA NEL SISTEMA NERVOSO

La riparazione di tessuti danneggiati è solitamente compiuta dalle cellule superstiti, le quali proliferano, si differenziano e si integrano nella trama della

struttura lesa. Nel SNC adulto, la generazione di nuovi neuroni è limitata da alcuni distretti specifici e riguarda poche categorie di neuroni⁽¹⁸⁾. Recenti studi nel campo dei trapianti neurali e delle cellule staminali suggeriscono la possibilità di introdurre nuovi neuroni nel SNC adulto⁽²⁵⁾. Anche in questo caso, tuttavia, il successo della procedura dipende dalla capacità delle cellule donatrici di integrarsi nei circuiti riceventi. La riparazione di una lesione nervosa non dipende quindi dall'aggiunta di nuovi elementi neo-generati, ma è primariamente sostenuta da modificazioni adattative dei neuroni sopravvissuti e delle loro connessioni. Tali modificazioni comprendono sia la ricrescita degli assoni sezionati, che la riorganizzazione di contatti pre-esistenti, non direttamente colpiti dalla noxa. In ogni condizione, la riparazione del danno nervoso è fondamentalmente determinata da processi di accrescimento neuritico e neo-sinaptogenesi.

Le modificazioni morfologiche dei prolungamenti nervosi ed il turnover delle connessioni sinaptiche, nell'insieme definiti "plasticità neurale", sono il substrato strutturale dei processi di apprendimento e di adattamento del sistema nervoso al mutare delle condizioni esterne. Da un punto di vista funzionale, la buona riuscita dei processi di plasticità neurale dipende dal mantenimento di connessioni nervose specifiche. Infatti, un processo di accrescimento non controllato potrebbe portare alla formazione di contatti aspecifici o abnormi, con gravi conseguenze sulla trasmissione delle informazioni attraverso i circuiti e sulle relative funzioni e comportamenti. Per tale ragione, il sistema nervoso centrale dei mammiferi è dotato di un sofisticato sistema di regolazione della crescita, il cui compito fondamentale è proprio di evitare la formazione di connessioni aberranti.

La regolazione della crescita nel SNC adulto si esplica a due livelli principali. Una serie di regolatori molecolari operano all'interno degli stessi neuroni, sopprimendo la trascrizione di geni associati ai processi di allungamento neuritico a favore dell'espressione di geni coinvolti nell'elaborazione e nella trasmissione delle informazioni^(9,21,26). Questi meccanismi tendono a bloccare processi di sdifferenziamento e impediscono ai neuroni di rientrare nel ciclo cellulare o di allungare l'assone. D'altro canto, il rimodellamento strutturale è controllato da diverse sostanze, dotate di attività inibitoria sulla crescita neuritica, che appartengono a due categorie principali: proteine associate alla mielina e componenti della matrice extracellulare^(10,12,33). Oltre a queste molecole, alcune proteine che guidano l'allungamento dei processi nervosi nel corso dell'assonogenesi embrionale contribuiscono al controllo della crescita nell'adulto, ma il loro ruolo preciso resta da definire⁽¹⁷⁾.

Le proteine inibitrici associate alla mielina centrale comprendono Nogo-A, la prima proteina di questa categoria scoperta in ordine di tempo, la glicoproteina della mielina degli oligodendrociti (Omgp) e la glicoproteina associata alla mielina (MAG)^(12,27). Queste tre proteine, che sono presenti nella mielina del sistema nervoso centrale, condividono un unico recettore espresso sulla superficie dell'assone, denominato "recettore di Nogo" (NgR). L'attivazione di NgR attiva una cascata di segnalazione intracellulare che, attraverso l'azione della piccola GTPasi RhoA, determina il collasso e la retrazione del cono di crescita assonale. Attraverso un altro dominio, detto amino-Nogo, Nogo-A può anche agire su un altro recettore, non condiviso con le altre proteine della mielina, che inibisce l'allungamento neuritico attraverso meccanismo molecolare simile a quello mediato da NgR⁽³¹⁾.

Fra i componenti della matrice extracellulare, i meglio caratterizzati come fattori inibenti la crescita neuritica sono i condroitin-solfato proteoglicani (CSPG)^(14,15). Diversi tipi di CSPG sono espressi nel SNC, dove costituiscono il componente principale delle cosiddette "reti perineuronali", fitti intrecci di matrice che avvolgono la superficie di alcune categorie di neuroni. I CSPG sono anche presenti in gran quantità nelle cicatrici gliali che si formano nel tessuto nervoso lesionato, dove contribuiscono formare una barriera insuperabile per gli assoni sezionati⁽⁷⁾. Il meccanismo d'azione attraverso il quale i CSPG arrestano l'allungamento neuritico non è del tutto chiaro, ma alcune osservazioni suggeriscono che anch'essi agiscano attivando la cascata di RhoA.

Negli ultimi decenni sono state sperimentate diverse procedure per promuovere la rigenerazione assonale neutralizzando le diverse molecole inibitorie o le relative cascate di trasduzione del segnale^(4,5,10,27). I risultati di questi esperimenti, che comprendono l'applicazione di anticorpi neutralizzanti, la degradazione enzimatica dei componenti della matrice extracellulare, manipolazioni genetiche ed altro ancora, hanno dimostrato che si può stimolare notevolmente i processi rigenerativi. In nessun caso, tuttavia, è stato possibile ottenere una *restitutio ad integrum* anatomica, e il relativo recupero funzionale è sempre parziale e sovente transitorio. Risultati sovrapponibili sono stati ottenuti attraverso manipolazioni dirette a potenziare le proprietà intrinseche di crescita dei neuroni danneggiati, inducendo l'espressione di proteine associate alla crescita assonale^(21,26). Di conseguenza, le strategie d'intervento esclusivamente dirette a interferire con i meccanismi molecolari della rigenerazione nervosa non paiono da sole sufficienti per risolvere il problema della riparazione del danno nel SNC.

IL SIGNIFICATO BIOLOGICO DEL CONTROLLO DELLA CRESCITA NEL SNC DEI MAMMIFERI

La maturazione delle guaine mieliniche e la deposizione delle reti perineuronali segnano il termine dello sviluppo del sistema nervoso e la chiusura dei periodi critici per la plasticità dipendente dell'esperienza^(3,10,14). Durante lo sviluppo postnatale, l'interazione con l'ambiente esterno modella i circuiti nervosi determinando l'emergere di funzioni e comportamenti complessi. Al termine di questo processo, le connessioni devono essere stabilizzate per permettere la normale esecuzione del compito funzionale. Di conseguenza, i meccanismi di crescita devono essere smorzati per mantenere la necessaria organizzazione della connettività. Nel corso dell'evoluzione, la crescente complessità dei circuiti nervosi e la comparsa di sempre maggiori capacità di adattamento hanno richiesto lo sviluppo parallelo di meccanismi di controllo sempre più stringenti. In assenza di appropriati sistemi di regolazione, il continuo modificarsi dei circuiti e delle connessioni nervose potrebbe portare a un progressivo deterioramento dell'organizzazione delle connessioni. Allo stesso modo, processi rigenerativi non adeguatamente guidati finirebbero per determinare la formazione di proiezioni aberranti e connessioni non specifiche. In ogni caso, lo sviluppo caotico delle connessioni nervose avrebbe severe ricadute sulla funzione del sistema nervoso e dell'intero organismo. In altre parole, l'inibizione della crescita sarebbe il prezzo da pagare per utilizzare al meglio le straordinarie proprietà plastiche del sistema nervoso. A sua volta, la perdita della capacità rigenerativa sarebbe un effetto collaterale del meccanismo di controllo che limita la crescita fisiologica. È davvero così?

Anche nelle migliori condizioni che possiamo produrre oggi in laboratorio, il numero di assoni che riescono a rigenerare nel SNC è talmente esiguo che ben poco si può concludere sulla specificità e sulla funzionalità delle connessioni ristabilite. Tuttavia, se consideriamo i vertebrati più antichi o il sistema nervoso periferico dei mammiferi, dove la rigenerazione assonale è vigorosa, possiamo trovare indizi utili per rispondere a questo quesito^(1,2,29). In tutti questi casi, gli assoni che rigenerano sono numerosi, ma la loro crescita non è adeguatamente diretta e le sinapsi neoformate non riproducono la struttura originaria. Ne consegue che il recupero funzionale è spesso limitato e, talvolta, insorgono nuovi disturbi e disfunzioni. La sindrome post-paralitica, che compare dopo anastomosi del nervo faciale, è un esempio paradigmatico del possibile esito maladattativo di un processo rigenerativo⁽¹⁾. Sembrerebbe, quindi, che i processi rigenerativi siano efficaci nel ripristinare i contatti a livello di singoli neuroni, ma non nel ricostruire i

complessi pattern di connessioni, necessari per sostenere funzioni complesse. Fortunatamente, è possibile influenzare il decorso dei processi compensatori in modo da favorire il recupero funzionale. Infatti, se si applicano specifici protocolli di addestramento o riabilitazione, è possibile ricostruire l'organizzazione originaria dei circuiti, migliorando significativamente le possibilità di recupero funzionale^(1,2,29). Queste osservazioni indicano che, sebbene le interazioni cellulari e molecolari non siano da sole sufficienti per rigenerare pattern sinaptici organizzati e funzionali, specifiche interazioni con l'ambiente esterno possono influenzare il rimodellamento strutturale in modo da favorire il recupero della funzione⁽²⁶⁾. È interessante notare come questi meccanismi dipendenti dall'esperienza non agiscano solo sul circuito direttamente danneggiato, ma possano anche riguardare strutture distanti, coinvolte negli stessi compiti funzionali. In questo modo, un significativo recupero funzionale può essere ottenuto non solo dalla riparazione locale nella sede della lesione, ma anche dalla riorganizzazione di strutture e circuiti distanti che assumono funzioni vicarianti.

Fenomeni simili a quelli che accadono dopo una lesione, si verificano quando si interferisce con i meccanismi di controllo della crescita nel cervello intatto^(3,14). Anche in assenza di danno, la neutralizzazione delle proteine della mielina o la rimozione enzimatica dei CSPG inducono immediati fenomeni di crescita assonale aberrante^(6,8,16). Gli assoni, liberati dal controllo inibitorio emettono nuovi processi che invadono territori normalmente proibiti. Tuttavia, questi effetti sono transitori e i pattern neuritici originari sono ristabiliti non appena le molecole regolatrici ricompaiono nel microambiente del SNC. Come ci attendevamo, la rimozione dei fattori inibenti scatena la crescita assonale. Sorprendentemente, però, questo fenomeno non sembra sufficiente per formare nuovi contatti stabili e funzionali. Perché è così? Perché la rimozione dei freni inibitori non induce la progressiva disorganizzazione della connettività?

Per sostenere una funzione adattativa, i circuiti nervosi nel cervello adulto o in via di sviluppo devono essere modellati attraverso una continua interazione con l'ambiente esterno. In altre parole, l'esperienza (in senso lato) determina specifici pattern di attività nervosa che plasmano i relativi circuiti e affinano le connessioni. Ne consegue che, anche quando viene meno il controllo inibitorio sui meccanismi di crescita, l'organizzazione dei contatti neoformati dipenderà dalla natura della specifica esperienza. Per esempio, la rimozione dei CSPG o degli inibitori mielinici nella corteccia visiva adulta non induce alcuna modificazione evidente della distribuzione delle afferenze provenienti dalle due retine, a meno che non sia associata alla chiusura di una palpebra (deprivazione monoculare), una procedura che modifica radicalmente l'esperienza visiva

binoculare^(3,22,23). In altri termini, le connessioni neoformate (o riparate) sono sempre congruenti con l'esperienza particolare che ne ha guidato lo sviluppo: una specifica interazione con l'ambiente circostante determinerà un'*appropriata* distribuzione delle connessioni nei circuiti coinvolti. Il risultato finale di qualsiasi processo plastico o rigenerativo dipenderà, quindi, dalla triplice interazione fra le proprietà neuronali intrinseche, le molecole regolatrici estrinseche e il mondo esterno⁽²⁶⁾. In questo meccanismo, l'equilibrio fra fattori neuronali e ambientali determina il livello di plasticità potenziale del circuito, mentre gli stimoli esterni dirigono la disposizione delle connessioni neo-formate. Le interazioni molecolari hanno una funzione essenzialmente permissiva, mentre l'esperienza svolge un ruolo principalmente istruttivo.

PROPRIETÀ NEURONALI INTRINSECHE, MOLECOLE REGOLATRICI ESTRINSECHE E INTERAZIONE CON IL MONDO ESTERNO

Per molti anni la ricerca sulla rigenerazione e sulla plasticità neuronale è stata diretta a comprendere i meccanismi cellulari e molecolari che regolano l'accrescimento dei processi nervosi. Contemporaneamente, osservazioni su animali da esperimento mantenuti in ambiente arricchito o sottoposti a regimi di intensa attività fisica hanno dimostrato come l'esposizione a stimoli ambientali significativi abbia effetti profondi sulla struttura e sulla funzione del sistema nervoso, anche in individui adulti^(30,32). Sorprendentemente, poca attenzione è stata rivolta a comprendere come gli stimoli esterni influenzano le interazioni molecolari fra cellule nervose e microambiente. Solo di recente si è iniziato ad affrontare questo problema.

Un aumento dell'attività nervosa, mediante stimolazione elettrica o farmacologica, modifica la composizione della matrice extracellulare di diverse regioni cerebrali, quali ad esempio l'ippocampo⁽²⁸⁾. Simili modificazioni possono essere prodotte anche da stimoli fisiologici. Per esempio, un sovraccarico di sale nella dieta determina fenomeni di plasticità sinaptica nei neuroni magnocellulari dell'ipotalamo che secernono vasopressina⁽³⁰⁾. La riorganizzazione sinaptica è accompagnata dalla contemporanea riduzione di alcune componenti delle reti pericellulari che avvolgono questi neuroni⁽¹⁹⁾. Nei topi adulti, l'esposizione per un mese ad ambiente arricchito induce profonde modificazioni dell'organizzazione delle proiezioni afferenti ai nuclei profondi del cervelletto, consistenti in una riduzione delle sinapsi inibitorie a favore di quelle eccitatorie⁽¹³⁾. Questo processo è facilitato dalla concomitante riduzione dei CSPG delle reti perineuronali. In particolare, nei neuroni nucleari si riduce

la sintesi dei componenti necessari per costruire la rete, mentre gli assoni afferenti mostrano un aumento di attività delle metallo-proteinasi (MMP2 e MMP9), gli enzimi che degradano la matrice⁽¹³⁾. Queste osservazioni indicano che le reti perineuronali sono strutture dinamiche, la cui composizione e proprietà inibitorie sono determinate dall'interazione fra gli elementi pre- e post-sinaptico. Variazioni dell'attività nervosa modificano la composizione delle reti in modo da modulare le proprietà plastiche del circuito che deve essere modificato dall'esperienza.

Gli stimoli esterni possono anche influenzare l'espressione di sostanze neuronali associate alla crescita. Ad esempio, un'intensa attività fisica accelera la rigenerazione dei nervi periferici e questo effetto è accompagnato da un aumento di espressione di geni neuronali, fra cui alcuni componenti dei coni di crescita e proteine coinvolte nella sinaptogenesi⁽³⁰⁾. L'attività motoria agisce direttamente sull'espressione di neurotrofine, come il Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF), che a loro volta modificano la trascrizione di geni associati alla crescita nei neuroni attivati. In accordo con questa idea, è stato recentemente dimostrato che gli effetti dell'ambiente arricchito sulla plasticità nello sviluppo del sistema visivo sono aboliti nei topi knockout per il gene che del BDNF. Nell'insieme, queste osservazioni indicano che gli stimoli ambientali inducono la plasticità neuritica modulando sia i determinanti intrinseci neuronali che le molecole regolatrici presenti nel microambiente del SNC. L'effetto sembra essere mediato dall'attività elettrica che fluisce attraverso i circuiti stimolati. In altri termini, l'attivazione di specifici circuiti nervosi produce uno spostamento dell'equilibrio fra meccanismi promoventi e inibenti la crescita assonale in modo da favorire le modificazioni plastiche.

Un aspetto rilevante di questi fenomeni è l'elevata specificità. Infatti, se la modulazione dei meccanismi di regolazione della crescita indotta da stimoli esterni è mediata dall'attivazione dei relativi circuiti nervosi, le modificazioni molecolari conseguenti sono circoscritte agli stessi. In questo modo, l'interazione con il mondo esterno regola i dispositivi di controllo e induce modificazioni plastiche solo nelle strutture che sono direttamente coinvolte nell'esecuzione di quel particolare compito funzionale⁽²⁶⁾.

Occorre infine ricordare che alcune particolari forme di esperienza possono indurre forme di plasticità aberrante accompagnate da chiare disfunzioni e comportamenti anomali⁽²⁴⁾. Movimenti rapidi e ripetitivi possono determinare una progressiva disorganizzazione delle rappresentazioni corticali somato-sensoriali o motorie, seguita da difetti del movimento e sindromi dolorose. Questi fenomeni di *plasticità patologica* sarebbero alla base di disturbi occupazionali, quali il crampo dello scrittore o le distonie focali nei musicisti. Recenti studi

mostrano che queste sindromi neurologiche sono effettivamente associate a fenomeni di rimodellamento strutturale aberrante, prodotti da un'attivazione eccessiva o anomala di particolari circuiti sensori-motori⁽²⁴⁾. È interessante notare che questi disturbi possono essere efficacemente trattati applicando specifici protocolli di rieducazione⁽²⁰⁾. La plasticità difettosa può essere corretta attraverso un nuovo processo plastico. Nonostante questi effetti collaterali, è chiaro che gli stimoli e ambientali, e l'esperienza in senso lato, sono in grado di influire sui meccanismi di regolazione della crescita ed influenzare i processi di rimodellamento neurale nella direzione di esiti funzionali adattativi.

CONCLUSIONI – NUOVE PROSPETTIVE PER LA RIPARAZIONE DEL DANNO CEREBRALE

Le osservazioni qui riportate indicano che il recupero funzionale in seguito a danno cerebrale deriva sia dalla rigenerazione di assoni sezionati che dalla riorganizzazione di circuiti risparmiati. La rigenerazione assonale è assolutamente necessaria per riparare una lesione traumatica del midollo spinale. D'altro canto, il rimodellamento dei circuiti sopravvissuti è fondamentale nel caso del danno prodotto da una patologia degenerativa o da noxa ischemica. Negli ultimi decenni, la maggior parte degli sforzi è stata diretta a stimolare le proprietà rigenerative dei neuroni o a rimuovere i fattori inibitori. Risultati recenti mostrano come l'interazione costante fra organismo e ambiente favorisca i processi di crescita e, fatto anche più importante, diriga l'organizzazione delle connessioni neoformate in accordo con specifiche necessità funzionali. L'acquisizione di queste conoscenze è importante comprendere i meccanismi biologici di base, ma è assolutamente necessaria per sviluppare procedure terapeutiche efficaci. È ormai chiaro che l'entità del recupero funzionale dipende da diversi fattori concorrenti, quali le proprietà delle cellule nervose, la composizione molecolare del microambiente del SNC e l'interazione dell'organismo (e quindi del suo sistema nervoso) con il mondo esterno. Queste considerazioni ci dimostrano che una terapia efficace del danno cerebrale deve essere basata sulla combinazione sinergica di manipolazioni molecolari, come la neutralizzazione dei meccanismi inibitori, e specifici paradigmi di stimolazione esterna, come quelli forniti da protocolli di riabilitazione mirata. L'azione coordinata di questi approcci permetterà di potenziare la crescita neuritica, garantendo la funzionalità delle connessioni neoformate. L'obiettivo di un'efficace riparazione del danno nel sistema nervoso è ancora lontano, ma la comprensione dei meccanismi biologici fondamentali della plasticità neurale ci apre nuove prospettive incoraggianti.

BIBLIOGRAFIA

1. Angelov DN: *Physical rehabilitation of paralysed facial muscles: functional and morphological correlates*. Adv. Anat. Embryol. Cell Biol. 2011; 210: 1-140.
2. Beazley LD, Rodger J, King CE, Bartlett CA, Taylor AL, Dunlop SA: *Optic nerve regeneration: molecular pre-requisites and the role of training. Restoring vision after optic nerve injury*. Adv. Exp. Med. Biol. 2006; 572: 389-395.
3. Berardi N, Pizzorusso T, Maffei L: *Extracellular matrix and visual cortical plasticity: freeing the synapse*. Neuron. 2004; 44: 905-908.
4. Bradbury EJ, Carter LM: *Manipulating the glial scar: chondroitinase ABC as a therapy for spinal cord injury*. Brain Res. Bull. 2010; 84: 306-316.
5. Büchli A, Schwab ME: *Inhibition of Nogo: A key strategy to increase regeneration, plasticity and functional recovery of the lesioned central nervous system*. Ann. Med. 2005; 36: 556-567.
6. Buffo A, Zagrebelsky M, Huber A, Skerra A, Schwab ME, Strata P, Rossi F: *Application of neutralising antibodies against NI-35/250 myelin-associated neurite growth inhibitory proteins to the adult rat cerebellum induces sprouting of uninjured Purkinje cell axons*. J. Neurosci. 2000; 20: 2275-2286.
7. Bush SA, Silver J: *The role of extracellular matrix in CNS regeneration*. Curr. Op. Neurobiol. 2007; 17: 120-127.
8. Corvetto L, Rossi F: *Degradation of chondroitin sulphate proteoglycans induces sprouting of intact Purkinje axons in the cerebellum of the adult rat*. J. Neurosci. 2005; 25: 7150-7158.
9. Di Giovanni S: *Molecular targets for axon regeneration: focus on the intrinsic pathways*. Expert Opin. Ther. Targets. 13, 1387-1398, 2009.
10. Fawcett JW, Rosser AE, Dunnett SB: *Brain damage, brain repair*. Oxford University Press, Oxford (UK), 2002.
11. Ferretti P: *Is there a relationship between adult neurogenesis and neuron generation following injury across evolution?* Eur. J. Neurosci. (in press), 2011.
12. Filbin MT: *Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS*. Nat. Rev. Neurosci. 2003; 4: 703-713.
13. Foscarin S, Ponchione D, Pajaj E, Leto K, Gawlak M, Wilczynski GM, Rossi F, Carulli D: *Experience-dependent plasticity and modulation of growth regulatory molecules at central synapses*. PLoS ONE 6, e16666, 2011.
14. Galtrey CM, Fawcett JW: *The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system*. Brain Res. Rev. 2007; 54: 1-18.
15. Gervasi NM, Kwok JC, Fawcett JW: *Role of extracellular factors in axon regeneration in the CNS: implications for therapy*. Regen. Med. 2008; 3: 907-923.
16. Gianola S, Savio T, Schwab M, Rossi F: *Cell-autonomous mechanisms and myelin-associated factors contribute to the development of Purkinje axon intracortical plexus in rat cerebellum*. J. Neurosci. 2003; 23: 4613-4624.
17. Giger RJ, Hollis ER 2nd, Tuszynski MH: *Guidance molecules in axon regeneration*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2, a001867, 2010.

18. Ming G.L., Song H.: *Adult neurogenesis in the Mammalian brain: significant answers and significant questions*. *Neuron*. 2011; 70: 687-702.
19. Miyata S, Akagi A, Hayashi N, Watanabe K, Oohira A: *Activity-dependent regulation of a chondroitin sulfate proteoglycan 6B4 phosphacan/RPTPbeta in the hypothalamic supraoptic nucleus*. *Brain Res*. 2004; 1017: 163-171.
20. Nudo RJ: *Retuning the misfiring brain*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100: 7425-7427.
21. Park KK, Liu K, Hu Y, He Z: *PTEN/mTOR and axon regeneration*. *Exp. Neurol*. 2010; 233: 45-50.
22. Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L: *Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex*. *Science*, 2002; 298: 1187-1189.
23. Pizzorusso T, Medini P, Landi S, Baldini S, Berardi N, Maffei L: *Structural and functional recovery from early monocular deprivation in adult rats*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103: 8517-8522.
24. Quartarone A, Siebner HR, Rothwell JC: *Task-specific hand dystonia: can too much plasticity be bad for you?* *Trends Neurosci*. 2006; 29: 192-199.
25. Rossi F, Cattaneo E: *Neural stem cell therapy for neurological diseases: dreams and reality*. *Nat. Rev. Neurosci*. 2002; 3: 401-409.
26. Rossi F, Gianola S, Corvetti L: *Regulation of intrinsic neuronal properties for axon growth and regeneration*. *Prog. Neurobiol*. 2007; 81: 1-28.
27. Schwab ME: *Nogo and axon regeneration*. *Curr. Op. Neurobiol*, 2004; 14: 118-124.
28. Schwarzacher SW, Vuksic M, Haas CA, Burbach GJ, Sloviter RS, Deller T: *Neuronal hyperactivity induces astrocytic expression of neurocan in the adult rat hippocampus*. *Glia* 2006; 53: 704-714.
29. Sinis N, Manoli T, Werdin F, Kraus A, Schaller HE, Guntinas-Lichius O, Grosheva M, Irintchev A, Skouras E, Dunlop S, Angelov DN: *Manual stimulation of target muscles has different impact on functional recovery after injury of pure motor or mixed nerves*. *Int. Rev. Neurobiol*. 2009; 87: 417-432.
30. Vaynman S, Gomez-Pinilla F: *License to run: exercise impacts functional plasticity in the intact and injured central nervous system by using neurotrophins*. *Neurorehabil. Neural Repair*, 2005; 19: 283-295.
31. Walmsley AR, Mir AK: *Targeting the Nogo-A signalling pathway to promote recovery following acute CNS injury*. *Curr. Pharm. Des*. 2008; 13: 2470-2484.
32. Will B, Galani R, Kelche C, Rosenzweig MR: *Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002)*. *Prog. Neurobiol*. 2004; 72: 167-182.
33. Xie F., Zheng B.: *White matter inhibitors in CNS axon regeneration failure*. *Exp. Neurol*. 2008; 209: 302-312.

APPROCCIO INTEGRATO AI TUMORI ASTROCITARI ENCEFALICI IN ETÀ PEDIATRICA

*Cristhian Carlino, Andrea Corrias, Anna Mussano,
Isabella Morra, Luca Cordero di Montezemolo*

Ospedale Infantile Regina Margherita Torino
Dipartimento di Scienze Pediatriche e dell'Adolescenza
Università degli Studi di Torino

Key words: *Childhood cancer / Tumore dei bambini*
 Intracranial tumors / Tumori intracranici
 Late effects of therapy / Effetti tardivi della terapia

Abstract:

Following a case report of one patient affected by an intracranial Low-grade Astrocytoma, the authors discuss the difficulties of the pathological diagnosis, therapy and late effects from a multidisciplinary point of view.

Riassunto:

Partendo dalla descrizione di un caso clinico di Astrocitoma Cerebrale a basso grado di malignità, gli autori affrontano il problema della diagnosi istologica, della terapia e della valutazione e dell'importanza dei danni a distanza in un'ottica multi-disciplinare

CASO CLINICO

Bambina di 11 aa, nata da parto gemellare, non riferite problematiche perinatali, non riferite allergie.

Storia di frequenti episodi cefalalgici associati ad episodi di vomito. Visto il persistere della sintomatologia in data 02/09/2010 la piccola veniva ricoverata presso altro Ospedale e in data 04/09/2010 veniva sottoposta a RMN encefalo con mdc; tale esame documentava la presenza di una voluminosa lesione occupante spazio a livello dei nuclei della base di dx, con contrast enhancement irregolare, shift della linea mediana e parziale oblitterazione del ventricolo omolaterale.

Visto l'esito della RMN encefalo la piccola veniva quindi trasferita presso il nostro Ospedale per competenza.

All'ingresso in data 17/09/10 l'EON era il seguente: vigile, cosciente, orientata e collaborante. Non deficit neurologici focali. Pupille isocoriche, isocicliche. Riflesso fotomotore diretto e consensuale presente bilateralmente, Non deficit dei MOE. Non riferita diplopia. Stazione eretta e deambulazione consentite ed autonome.

Veniva sottoposta ai seguenti accertamenti:

- VISITA OCULISTICA (06/09/10): visus 10/10 bilat, MOE di norma, fundus di norma
- SCREENING ORMONALE: non alterazioni patologiche
- RM ENCEFALO (07/09/10): lesione invariata rispetto al controllo del 07/09/10; acquisizioni per neuronavigatore; allo studio trattografico si evidenzia diradamento delle fibre del fascio corticospinale in corrispondenza della capsula interna omolaterale alla lesione.

In data 09/09/2010 la paziente veniva quindi sottoposta ad intervento neurochirurgico di asportazione parziale della lesione nota con ausilio di neuro navigatore per programmazione dell'accesso chirurgico.

La procedura chirurgica veniva condotta a termine senza complicazioni.

Esame istologico: astrocitoma pilocitico.

Il successivo decorso si svolgeva regolarmente, con rientro dalla Rianimazione in II giornata.

Una RM ENCEFALO post-operatoria (14/09/10) documentava la rimozione parziale della lesione nota con persistenza di residuo mesiale (diametro 26 mm) assumente irregolarmente mdc.

Dopo 14 giorni la paziente veniva sottoposta a nuovo intervento neurochirurgico con ausilio di neuro navigatore e monitoraggi neuro-fisiologici.

INTERVENTO (28/09/10): asportazione della lesione nota con modesto residuo.

Il successivo decorso si svolgeva regolarmente, con rientro dalla Rianimazione in I giornata.

L'EON post-operatorio documentava unicamente un minimo impaccio motorio distale all'arto superiore sin.

L'esame istologico effettuato sul pezzo operatorio confermava trattarsi di astrocitoma pilocitico.

Una RMN encefalo post-operatoria (05/10/2010) documentava una modesta impregnazione di contrasto in corrispondenza della porzione antero-mediale della cavità chirurgica, ascrivibile in parte a esito dell'intervento e in parte a verosimile modesto residuo lesionale.

Esame obiettivo alla dimissione

Vigile, cosciente, orientata e collaborante. Pupille isocoriche, isocicliche, normoreagenti. Non deficit dei MOE. Mingazzini AAII correttamente mantenuto. Mingazzini AASS: tendenza alla pronazione all'AS sn. Lieve impaccio motorio nello svolgimento dei movimenti fini con la mano sn. Stazione eretta e deambulazione consentite ed autonome. Apiretica.

CONSIDERAZIONI ANATOMO-PATOLOGICHE

I tumori del Sistema Nervoso Centrale rappresentano il 20% di tutti i tumori dell'età pediatrica e costituiscono per frequenza il secondo gruppo di neoplasie dopo le leucemie; sono inoltre la causa più frequente di morti infantili legate a neoplasie.

Questi tumori originano da precursori differenti, per cui la loro classificazione è complessa ed articolata, oltre che in continua evoluzione.

Universalmente adottata è la classificazione dell'OMS, la cui ultima versione è stata pubblicata nel 2007.

Le sedi più frequenti di insorgenza di queste lesioni nell'ambito del Sistema Nervoso Centrale sono diverse nel bambino rispetto all'adulto; infatti mentre negli adulti sono in prevalenza colpiti gli emisferi cerebrali, in età pediatrica la sede più frequente di malattia è la fossa cranica posteriore; inoltre i vari istotipi si manifestano con incidenza diversa: in età pediatrica prevalgono i tumori embrionari, gli ependimomi e i tumori astrocitari di basso grado, nell'età adulta si assiste a maggior incidenza di gliomi maligni, meningiomi e lesioni secondarie prevalentemente di origine epiteliale. La neoplasia pediatrica

del Sistema Nervoso Centrale probabilmente più frequente è l'astrocitoma pilocitico, tipico dei primi decenni di vita. Si tratta di un tumore relativamente circoscritto, spesso cistico, che può insorgere ovunque nel Sistema Nervoso Centrale, a volte nell'ambito della Neurofibromatosi di tipo I.

Le sedi preferenziali sono: i nervi ottici e il chiasma ottico, l'ipotalamo e la regione del terzo ventricolo, gli emisferi cerebrali, il cervelletto, il tronco cerebrale. Dal punto di vista della neuroradiologia, spesso questa neoplasia mostra presa di contrasto e margini ben delimitati, e molte volte si presenta sotto forma di nodulo murale nel contesto di una lesione cistica.

Dal punto di vista istologico si tratta di una lesione benigna (grado I sec. OMS), a densità cellulare variabile, ma per lo più bassa, costituita da cellule allungate, fusiformi, bipolari, immerse in uno stroma a tratti compatto, a tratti lasso, con formazione di microcisti. Lo stroma spesso contiene le cosiddette "fibre di Rosenthal" (strutture eosinofile allungate e tortuose) e i corpi granulari eosinofili di natura proteica, tipici delle lesioni di basso grado. È un tumore a volte riccamente vascolarizzato, in alcuni casi con vasi proliferati di tipo glomeruloide simili a quelli dei gliomi maligni. L'attività proliferativa è di solito bassa.

Negli anni '90 è stata descritta una variante, detta "pilomixoide", che insorge per lo più in bambini in età prescolare in corrispondenza della regione opto-chiasmatica, e presenta aspetto diffusamente mixoide e distribuzione perivascolare delle cellule neoplastiche. Questa variante mostra di solito attività proliferativa più elevata, a volte necrosi, e comportamento biologico più aggressivo, per cui viene classificata come grado II.

L'astrocitoma pilocitico ha una prognosi favorevole, soprattutto in seguito ad una resezione chirurgica completa; altrimenti la crescita è lenta, anche di decenni. Alcune volte però si può assistere ad una disseminazione negli spazi subaracnoidei.

Successivamente per la frequenza in età pediatrica bisogna considerare il medulloblastoma e l'ependimoma.

Il medulloblastoma è un tumore neuroectodermico maligno del cervelletto, per lo più sporadico, anche se rari esempi possono comparire nell'ambito di sindromi ereditarie, quali le sindromi di Gorlin, Li-Fraumeni Turcot ed altre.

Di solito nel bambino insorge in corrispondenza del verme cerebellare, causando ostruzione delle vie liquorali con idrocefalo. È una lesione radiologicamente solida, con variabile assunzione del mezzo di contrasto, spesso con aree di necrosi. È tipica l'estensione nello spazio subaracnoideo con diffusione a distanza nel nevrasso.

Istologicamente esistono vari sottotipi distinti in base alla morfologia, anche se è prevedibile una diversa sub-classificazione in base agli studi biomolecolari e genetici attualmente in corso:

- 1) variante classica, cioè indifferenziata,
- 2) variante nodulare/desmoplastica,
- 3) variante con estensiva nodularità,
- 4) variante anaplastica/a grandi cellule.

Si tratta di una neoplasia maligna, ad elevata densità cellulare, costituita da cellule con scarso citoplasma e nucleo voluminoso, per lo più ipercromatico, più o meno atipico, con distribuzione variabile, diffusa “a tappeto”, o con formazione di noduli, o di rosette, o con infiltrazione del parenchima in colonne, tipo “fila indiana”.

Le mitosi sono spesso numerose, e l'attività proliferativa elevata. Nonostante un approccio terapeutico integrato fra neurochirurgia, radio- e chemioterapia, la prognosi a distanza resta gravata dalle recidive locali e dalle disseminazioni nel nevrasse. Attualmente, la metà circa dei pazienti raggiunge una sopravvivenza superiore a 5 anni.

L'ependimoma infine in età pediatrica insorge soprattutto nella fossa cranica posteriore, o, più raramente, negli emisferi cerebrali e si presenta radiologicamente come una formazione solida assumente il mezzo di contrasto in fossa posteriore, più spesso cistica in sede sovratentoriale. All'istologia la neoplasia appare relativamente ben circoscritta, con aree ipercellulari e presenza di formazioni caratteristiche note come “pseudorosette perivascolari” costituite da aree perivascolari paucicellulari, povere in nuclei, con convergenza di processi cellulari verso le pareti vasali. Accanto a queste più raramente si riconoscono “canali ependimali” con lume di calibro variabile rivestito da elementi epitelioidi. L'attività mitotica è per lo più non elevata.

Si tratta, di solito, di una neoplasia ben differenziata, di grado II sec. l'OMS, ma esiste una variante più aggressiva, definita anaplastica, di grado III, sulla cui definizione non esistono ancora criteri univoci universalmente condivisi.

La lesione tende purtroppo alla recidiva locale, soprattutto se non asportata completamente, anche molteplice ed in seguito a trattamenti completati da radio- e chemioterapia.

Lo spettro dei tumori del Sistema Nervoso Centrale dell'età pediatrica comprende poi numerosi altri istotipi che si manifestano con minore frequenza.

Il fiorire recente di studi biologici molteplici, quali analisi genomiche, indagini proteomiche, studi dei micro-RNA, ed altri ancora sta fornendo

nuove informazioni che indubbiamente porteranno ad una revisione della corrente classificazione dei tumori del Sistema Nervoso Centrale, permettendo soprattutto di identificare nuovi sottogruppi di pazienti con diversa prognosi e diverso rischio biologico, da avviare a protocolli di cura differenziati, se non addirittura “personalizzati”, in modo da ottenere risultati terapeutici migliori insieme ad una riduzione degli effetti collaterali, anche a distanza, delle attuali terapie.

Compito fondamentale del patologo nel processo diagnostico e l’interazione con i colleghi clinici, neuroradiologi, chirurghi, oncologi, radioterapisti, sia per una precisa diagnosi di istotipo che per fornire indicazioni di tipo prognostico e predittivo.

TERAPIA E COMPLICANZE

L’incidenza delle neoplasie durante l’età evolutiva è in aumento nelle ultime decadi. Considerando tutte le neoplasie, è stato valutato un aumento dello 0.6% all’anno nel periodo tra il 1975 ed il 2002. Studi epidemiologici in USA riportano che l’incidenza del cancro in soggetti di età compresa tra 0 e 19 anni è aumentato da 15 casi /100000 soggetti /anno nel 2002 a 16.6/100000/anno nel 2006. La sopravvivenza dei soggetti con neoplasia diagnosticata e trattata durante l’età evolutiva è nettamente migliorata negli ultimi decenni passando dal 25% degli anni ’60 a circa l’80% a tutt’oggi e questo risultato è stato ottenuto tramite un perfezionamento della tecnica chirurgica e della radio- chemioterapia⁽²⁾. Si stima che 1/640 individui tra 20 e 39 anni di età è un soggetto con tumore superato in età evolutiva. Purtroppo, questo notevole successo è stato ottenuto a costo di vari di importanti effetti collaterali a carico di numerosi organi ed apparati, tra i quali quello endocrino è quello più coinvolto^(12,3).

Esiste numerosa letteratura che ha valutato gli effetti sia della radio che della chemioterapia sulla funzionalità delle ghiandole endocrine. Anche se generalmente si parla di effetti della radioterapia nei soggetti con tumore cerebrale, è importante ricordare che i danni sono legati almeno a due aspetti fondamentali: la sede di irradiazione e la dose radiante. A questi si può aggiungere anche il tipo di erogazione (cioè il frazionamento convenzionale e l’iperfrazionamento della dose somministrata).

Bisogna ricordare che, per quanto riguarda la sede irradiata, le tecniche sempre migliori di diagnosi neuroradiologica e di stadiazione del tumore, hanno portato ad una sempre più precisa radioterapia. Oggi la quasi totalità dei tumori intracranici viene trattato con irradiazione locale che è diversa a

seconda del tipo di tumore (ad es. un germinoma della pineale sarà trattato con radioterapia panventricolare, un ependimoma con radioterapia sovra o sottotentoriale a seconda della sua posizione). Unica eccezione rappresentata dal medulloblastoma, o secondo una più moderna definizione PNET, (che è comunque il più frequente istotipo di tumore cerebrale) che viene sottoposto a radioterapia coinvolgente tutto l'encefalo, con un boost in fossa cranica posteriore ed una irradiazione dell'asse spinale.

I danni auxoendocrini saranno nettamente superiori nei soggetti irradiati per medulloblastoma, negli altri il danno sarà conseguente alla zona irradiata.

Per quanto riguarda la dose erogata, si può sintetizzare che il danno è dose dipendente. Bisogna comunque precisare almeno 2 aspetti; il primo riguarda il fatto che non tutte le tropine ipofisarie rispondono allo stesso modo alla radioterapia cranica erogata nello stesso modo : dopo 10 anni dalla radioterapia, la possibilità di una ridotta secrezione di TSH è di circa il 25% , mentre quella del GH è quasi costante già dopo 4-5 anni⁽¹⁰⁾; quella delle gonadotropine e dell'acth si posizionano a livelli intermedi. Un altro importante dato da segnalare è il differente comportamento delle gonadotropine a seconda della dose radiante impiegata: a dosi di 18-24 Gy (quelle una volta impiegate costantemente, oggi solo in casi selezionati, in patologia ematologiche) si determina un quadro di pubertà precoce; a dosi di 30-50 Gy (quelle dei tumori cerebrali non della regione ipofisari), si può notare sia una accelerazione che un ritardo / arresto puberale ed infine a dosi > 50 Gy (impiegate nel carcinoma nasofaringeo o nei tumori della base cranica) oppure di 30-50Gy negli adenomi ipofisari, assistiamo solitamente ad iposecrezione gonadotropinica⁽⁴⁾.

Negli ultimi anni , una importante area di ricerca è quella di ridurre il volume di irradiazione nella età pediatrica: per alcune neoplasie oncoematologiche (LLA, retinoblastoma, sarcoma dei tessuti molli) lo scopo di ridurre la dose radioterapica è già stato realizzato; per altre, tra cui il Medulloblastoma, si è iniziato negli ultimi anni a tentare di modificare sia la dose erogata sia la modalità di somministrazione, passando a tecniche di iperfrazionamento della dose (da 1.5 Gy/die a 1.3 x 3 volte al giorno sino a raggiungere la dose totale erogabile) Allo stato attuale non abbiamo ancora dei dati chiari né sulla efficacia della cura della malattia, né del suo effetto sulla secrezione ormonale.

DIFETTO DI ACCRESCIMENTO E SECREZIONE DI ORMONE DELLA CRESCITA STATURALE E SECREZIONE DI ORMONE DELLA CRESCITA

La valutazione clinica nei soggetti sottoposti a terapia antineoplastica per tumore cerebrale evidenzia quasi costantemente un difetto accrescitivo che è determinato da diversi fattori.

Ne consegue che i pazienti devono essere sottoposti a controlli semestrali o perlomeno annuali in cui valutare la statura, il peso, lo sviluppo puberale e, nei casi trattati per medulloblastoma, la statura vertice ischiatica, in considerazione della diversa crescita corporea della colonna rispetto a quella degli arti inferiori.

Durante il trattamento della malattia tumorale la malnutrizione e i farmaci citotossici sono quelli maggiormente responsabili del ritardo accrescitivo in quanto compromettono la sintesi e/o l'azione delle somatomedine. Contemporaneamente sono risultati diminuiti i valori di IGF BP (cioè le proteine veicolanti le IGF I); questi reperti suggeriscono un'insensibilità epatica al GH, verosimilmente legata all'azione epatotossica dei farmaci utilizzati nella chemioterapia. Dopo la sospensione del trattamento radiante e chemioterapico altre cause condizionano il deficit staturale. La radioterapia rappresenta certamente il fattore che maggiormente determina una compromissione accrescitiva, mediante a varie patologie endocrine quali la pubertà precoce (possibile, ma non molto comune alle dosi impiegate nei tumori cerebrali) il deficit di secrezione di ormone della crescita (GH) e l'ipotiroidismo. Nei soggetti trattati per medulloblastoma, a questi fattori si aggiunge la displasia scheletrica radioindotta che si caratterizza per una ridotta crescita dei corpi vertebrali con conseguente alterato rapporto tra i segmenti corporei e prevalenza della lunghezza degli arti sul tronco. La ridotta crescita della colonna comporta una perdita di 7-10 cm sulla statura adulta che il soggetto avrebbe raggiunto in condizioni di benessere^(10,4). Se si eccettuano lavori che segnalano un quadro di neuroendocrinopatia già precedente la radioterapia oppure un difetto di secrezione di GH chemio-indotto^(8,9), è indubbio che la radioterapia rappresenti la causa principale del deficit di GH. Con l'aumento della dose, il danno biologico coinvolge inizialmente le strutture sovraipotalamiche ed ipotalamiche deputate alla secrezione di neurotrasmettitori e del realising ipotalamico (GHRH) e successivamente la secrezione di ipofisaria di GH (Jorgesen e Coll. 1993).

Negli ultimi anni, l'impiego di tecniche di immagine sempre più precise permette un calcolo più accurato della dose radiante che raggiunge l'ipotalamo - ipofisi. In ogni caso, dosi tra i 18-20 Gy sono responsabili di alterazioni transitorie, dosi superiori a 20 Gy condizionano difetti neurosecretori e dosi

superiori a 30 Gy quadri di deficit classici di GH. Più recentemente è stato effettuata una valutazione più precisa che ha permesso di constatare che già dosi radiante ridotte a livello encefalico (7-12 Gy) impiegate in patologie diverse dal tumore intracranico sono responsabili di ridotta secrezione in una percentuale di circa il 10% dei casi. Esiste successivamente una correlazione positiva tra dose erogata e deficit di GH. Nei soggetti sottoposti a 18-24 Gy la percentuale sale a circa il 30% e a dosi di 40-50% si raggiunge la quasi totalità del deficit⁽⁵⁾.

La terapia della ridotta secrezione di GH è rappresentata nella popolazione generale dalla somministrazione dell'ormone stesso. Nei soggetti trattati per patologia oncoematologica, è da anni oggetto di discussione la somministrazione di terapia sostitutiva, in quanto il Gh è un ormone mitogeno e le somatomedine (sostanze da esso dipendenti) hanno un effetto antiapoptosico. In definitiva si teme che la terapia possa determinare o una recidiva dello stesso tipo di patologia stesso o la comparsa di un'altra neoplasia. I dati più recenti non hanno rilevato per i vari tipi di patologia una differenza statistica tra i soggetti non trattati e quelli trattati con ormone della crescita^(1,6,11,5).

L'unica neoplasia che sembra presentare un rischio di recidiva o di secondo tumore statisticamente elevato è il retinoblastoma bilaterale. Ciononostante si raccomandano dei controlli periodici sia durante che dopo lo sospensione della terapia, in particolare nei soggetti sottoposti a radioterapia. In ogni caso comunque si consiglia di iniziare la terapia circa 2 anni dalla radioterapia, previo controllo della funzionalità surrenalica.

PATOLOGIA TIROIDEA

L'effetto della radioterapia cranica sulla secrezione di TSH è già stato precedentemente descritto. È utile ricordare che il quadro di ipotiroidismo centrale, molto raro, può essere misconosciuto ad una indagine clinica. Ne deriva l'importanza di una sorveglianza anche laboratoristica almeno annuale con un dosaggio di tsh ed ft4.

Nei soggetti con Medulloblastoma, l'irradiazione spinale determina invece un ipotiroidismo primitivo frequente e variabile, a seconda delle casistiche, tra 16 e 97%. Fattori correlati con l'ipotiroidismo sono la più alta dose radiante, l'età > 15 anni, il sesso femminile ed il periodo di follow-up dalla diagnosi (> 5 anni).

Anche in questi casi l'esame obiettivo può non essere indicativo di alterata funzionalità tiroidea, quindi l'indagine di laboratorio è essenziale. Il controllo annuale ormonale frequentemente evidenzia un quadro di ipotiroidismo subclinico (TSH elevato ed ft4 nella norma). È ancora dibattuta l'utilità in

questi casi di iniziare subito una terapia sostitutiva con L-tiroxina; comunque la maggior parte degli autori preferisce instaurare il trattamento anche in considerazione del fatto che la ecografia evidenzia frequentemente un volume tiroideo ridotto con ampie aree di fibrosi. Il meccanismo mediante il quale si sviluppa un ipotiroidismo dopo irradiazione al collo è legato ad un danno dei follicoli e dei vasi della ghiandola che inizia già con dosi di poco superiori a 2 Gy. Si è riscontrata una minore capacità proliferativa delle cellule tiroidee nei topi e una minore iperplasia a stimoli gozzigeni dopo dosi maggiori o uguali a 16 Gy. Si possono verificare emorragie, edemi e scarsa infiltrazione di cellule dell'infiammazione con incremento dello stroma fibroso e zone di ipertrofia, iperplasia e metaplasia; alcuni follicoli sono normali, mentre altri possono essere atrofici con scarsa colloide.

Come già detto precedentemente nei soggetti trattati con medulloblastoma, il danno primitivo legato alla radioterapia cervicale maschera l'ipotiroidismo centrale legata alla radioterapia cranica che avviene, mediamente, alcuni anni dopo. L'altro aspetto fondamentale nello studio della tiroide in questi soggetti è quello della possibile insorgenza dei carcinoma radioindotti (solitamente di tipo papillifero). Tra i vari elementi clinico-anamnestici che, in presenza di patologia nodulare tiroidea, indirizzano verso una diagnosi di carcinoma tiroideo, l'irradiazione su testa e collo rappresenta il dato di rischio maggiore, unitamente alla familiarità per carcinoma midollare. È importante peraltro ricordare che alcuni elementi rivestono ulteriore importanza per questo rischio. Il primo è rappresentato dalla età del soggetto (più giovane è il soggetto, maggiore è la possibilità di carcinoma), il secondo è rappresentato dalla dose erogata e soprattutto dalla dose assorbita dalla tiroide. Nella Tabella I, viene riportata la dose assorbita in relazione alla sede irradiata ed alla patologia.

È comunque importante che questi dati tendono ulteriormente a ridursi con l'impiego di tecniche sempre più moderne per ridurre la dose radiante che arriva alla tiroide.

Il rischio di un carcinoma cresce progressivamente fino ad una dose di circa 20-25 gy, mentre con dosi superiori si assiste ad una alterazione della morfologia ghiandolare fino ad una netta fibrosi. Ne consegue che, a differenza degli altri tumori cerebrali, il medulloblastoma presenta una possibilità di secondo tumore a livello tiroideo molto ridotta, in quanto la dose erogata per la malattia ed assorbita dalla tiroide è molto alta.

Infine, è utile segnalare che il tempo di latenza tra l'esposizione alle radiazioni e lo sviluppo della neoplasia è variabile ma raramente è inferiore ai 5-6 anni. Studi su lunghi periodi di osservazione, hanno evidenziato la comparsa di neoplasie tiroidee anche 20-30 anni dopo la radioterapia.

Sede irradiata	Patologia	Dose (Gy) assorbita dalla tiroide
Cranio	LLA / Tumori	0-10
Rinofaringe	Carcinoma rinofaringeo / Sarcoma	0-45
Colonna Cervicale	Medulloblastoma	30-35
Collo	Sarcomi	30-50
Regione sovraclaveare	Linfomi	0-10
Regione Collo eTorace (con la tecnica a Mantellina)	Hodgkin	20-25
Total Body irradiation per trapianto di midollo	Tutte le neoplasie	12

Tabella I.

PATOLOGIA DELLA FUNZIONALITÀ DELL'ASSE IPOTALAMO – IPOFISI – GONADI

Al contrario di quanto riferito per la funzionalità dell'asse ipofisi – tiroide, l'indagine clinica è dirimente per verso un corretto impiego del laboratorio. Il rilievo della comparsa dello sviluppo mammario nelle femmine prima degli 8 anni e del raggiungimento di volume testicolare di 4 ml nel maschio prima dei 9 anni, sono indicativi di uno sviluppo puberale precoce e necessitano di indagini ed eventualmente di terapia con LHRH analoghi. Al contrario l'assenza di segni di sviluppo sessuale ai 13 anni nella femmine ed ai 14 anni nel maschio oppure la loro lenta evoluzione o, infine, una alterazione della normale ciclicità mestruale, sono frequentemente indicativi di una ridotta funzionalità dell'asse ipotalamo – ipofisi – gonadi e necessitano frequentemente di terapia sostitutiva. Altro dato clinico rilevante è il rilievo anamnestico di irregolarità mestruali.

Nel caso di una pubertà precoce, l'indagine deve essere mirata ad una attivazione della regione ipotalamo-ipofisaria, al contrario nel caso di un ipogonadismo l'alterazione può essere sia ipotalamo-ipofisaria che gonadica. In quest'ultimo caso è utile ricordare l'importanza degli effetti collaterali di alcuni chemioterapie, in particolare i farmaci alchilanti.

La RT e la CT possono causare transitori o permanenti effetti sulla funzionalità ovarica, capacità riproduttiva e funzione sessuale. Si possono determinare alterazione ovarica primitiva, alterato sviluppo dei caratteri sessuali secondari, irregolarità mestruali.

La Radioterapia determina una diminuzione del numero dei follicoli ovarici, alterata maturazione dei follicoli, fibrosi corticale e atrofia, ipoplasia generalizzata e ialinizzazione della capsula. Le femmine trattate prima della pubertà hanno un numero di oociti superiore a quello delle donne di età superiore. Pertanto la funzionalità ovarica è solitamente preservata in modo superiore nelle femmine trattate quando prepuberi. Molti studiosi hanno provato ad identificare la dose di radioterapia che provoca sterilità nella donna in relazione alla età. La menopausa viene indotta da una dose di 12-15 Gy nelle donne sotto i 40 anni (vs 4-7 Gy in donne > 40 anni). Un quadro di sterilità permanente avviene nel 60% dei casi di 14-40 anni che siano stati sottoposti a 5-6 Gy. Una dose di 20-30 Gy che interessi tutto l'addome si associa ad alterazione ovarica in giovani donne.

Oltre ai danni sulla normale struttura e funzionalità ovarica, vengono riferiti anche danni uterini di queste pazienti: nonostante la terapia di supplemento somministrata in questi soggetti, si evidenziano alterazioni della crescita e del flusso sanguigno che possono determinare aborti o parti prematuri.

L'effetto della CT sulla funzione ovarica dipende sia dal tipo di farmaco che dalla dose e si somma al danno radioindotto nel caso il soggetto sia trattato con entrambi i presidi terapeutici.

Nella donna, i chemoterapici determinano una deplezione dei follicoli primordiali per apoptosi con conseguente arresto della maturazione follicolare e con la diminuzione della secrezione estrogenica; i protocolli più recenti tendono a ridurre la dose somministrata senza limitare l'effetto antitumorale.

Anche la CT determina maggiori conseguenze nelle femmine trattate in periodo puberale o post-puberale.

In considerazione della frequente alterazione della funzionalità ovarica, sono stati proposti nel tempo strategie di prevenzione delle alterazioni stesse e strategie terapeutiche.

Tra le prime, si segnalano, ovviamente, i tentativi di ridurre l'impiego sia della RT che del tipo e della dose di CT; l'ooforopessi che consiste nel

posizionare le ovaie, mediante intervento chirurgico, fuori dal campo della radioterapia, l'impiego di farmaci LHRH – analoghi (che secondo alcuni autori sembrano fornire discreti risultati), la criopreservazione del tessuto corticale ovarico o dell'oocita i cui risultati saranno evidenti solo tra diversi anni. Tra le strategie terapeutiche vi sono i farmaci estro- progestinici.

Raramente la causa della oligo-amenorrea è legata ad un quadro di iperprolattinemia radio-indotta che però viene segnalata solo dopo la erogazione di dosi radianti a livello cranico > 50 Gy.

Nel maschio la CT, la RT e la chirurgia possono interessare la funzionalità testicolare, esercitando un profondo effetto sulla futura funzionalità spermatogenetica. La differente sensibilità delle cellule di Sertoli che producono spermatozoi, in contrasto alle cellule di Leydig che producono testosterone, è causa di un danno maggiore sulla capacità riproduttiva che sulla funzione steroide secernente.

La disfunzione testicolare infatti rappresenta uno dei più importanti late effects della Ct nell'uomo. L'epitelio germinativo è particolarmente suscettibile dal 1948 quando fu evidenziata l'azione citotossica della mostarde azotate, agente alchilante impiegato nella terapia del linfoma numerosi altri lavori sono stati effettuati. Senza entrare nei particolari.

A differenza di quanto succede nelle femmine, nell'uomo è evidente che anche il testicolo prepubere è vulnerabile. L'alterazione della spermatogenesi può essere irreversibile dopo la chemio, sebbene sia stata riportata ripresa della spermatogenesi anche a 14 anni dalla terapia. È stato peraltro riportato che la possibilità di ripresa della spermatogenesi è farmaco e dose-dipendente. Tra i vari farmaci, quello che probabilmente è stato studiato è la ciclofosfamide. In una metanalisi di 30 studi è stato dimostrato che una dose > 300 mg/kg determina in più dell'80% dei casi disfunzione gonadica. Altri studi hanno dimostrato azoospermia in più del 90% dei soggetti trattati in epoca pediatrica con dosi $> 7.5-9$ gr/mq. Più recenti studi hanno valutato anche la gonadotossicità dell'ifosfamide e cisplastino. Gli studi che sembrano rilevare gonadotossicità hanno fornito dati che però devono essere confermati.

La CT solitamente non determina alterazione della produzione di Testosterone; vengono comunque segnalate alterazioni dopo terapia con farmaci alchilanti che si caratterizzano per pubertà ritardata o rallentata se il paziente viene trattato prima o durante la pubertà o per perdita della libido, disfunzione erettile se trattati alla fine o dopo il completamento dello sviluppo puberale.

Anche la RT determina un effetto citotossico testicolare. Per quanto riguarda il medulloblastoma, i testicoli comunque non sono direttamente nel campo di irradiazione e quindi, se non in casi eccezionali non si verificano danni.

PATOLOGIA SURRENALICA

È costituita dall'ipocorticismo centrale, quindi legato ad iposecrezione dell'ACTH, segnalato in casi trattati con dosi > 24 Gy che interessano la regione ipotalamo-ipofisaria. I sintomi sono spesso sottili e si caratterizzano per facile stancabilità, scarso accrescimento ponderale, anoressia e scarsa capacità di resistenza, lenta ripresa da situazioni febbrili.

La diagnosi non è molto agevole. Vengono riportati in letteratura dati assai contrastanti: viene riportata una frequenza di ipocorticismo variabile dallo 0 al 25%. Tale disparità di risultati può dipendere anche dal fatto che i test impiegati sono frequentemente differenti, oltre che dalla estrema variabilità del dosaggio.

È fondamentale che nei soggetti con altre alterazioni ormonali, il dosaggio di cortisolo venga comunque sempre effettuato; in particolare nei soggetti con ipotiroidismo ed ipocorticismo, la terapia cortisonica deve sempre precedere quella sostitutiva tiroidea. Nei casi di stress, è necessario triplicare le dosi.

OSTEOPENIA ED OSTEOPOROSI

Negli ultimi anni è stata sempre più segnalata la comparsa di alterazione della normale mineralizzazione ossea. Tra le varie neoplasie onco-ematologiche, quella maggiormente studiata per quest'aspetto è la leucemia linfoblastica acuta mentre dati meno rilevanti sono riferiti a tutti gli altri tipi di neoplasie. In ogni caso sono stati identificati vari fattori della osteopenia/osteoporosi: la malnutrizione tipica delle prime fasi della malattia, la somministrazione di alcuni farmaci tra i quali particolare rilevanza è rappresentata dai corticosteroidi che non sono usati di routine nei protocolli dei tumori cerebrali. Altri farmaci riportati in letteratura sono il bifosfamide e il metotrexate impiegati in alcuni cicli nei soggetti con Medulloblastoma ad alto rischio.

Per quanto riguarda l'aspetto endocrino, il GH e gli ormoni sessuali sono importanti nella normale formazione ossea; ne consegue che un quadro di deficitaria secrezione dell'ormone della crescita, che come riportato, è molto frequente nei tumori cerebrali e di ipogonadismo determinano una riduzione della normale densità ossea. La valutazione della densità ossea è stata effettuata con una metodica DEXA fino a pochi anni fa anche in età pediatrica per valutare la densità a livello della regione lombare e femorale. Più recentemente viene impiegata la densitometria ossea a ultrasuoni, metodo meno costoso che non emette radiazioni e permette di ottenere nel giro di qualche anno dei valori di normalità basati su uno studio di un numero molto elevato di soggetti.

In conclusione come si evidenzia da questo breve excursus sui danni della radio e chemioterapia nei soggetti trattati per tumore cerebrale in età evolutiva, è necessario un controllo periodico che deve perdurare per tutta l'età evolutiva e che deve continuare anche nella vita adulta, in quanto alcune alterazioni si evidenziano (quale ad es il tumore tiroideo) anche molto tempo dopo il trattamento oncologico.

BIBLIOGRAFIA

1. Bell J, Parker KL, Swinford RD, Hoffman AR, Maneatis T, Lippe B: *Long-term safety of recombinant human growth hormone in children*. J. Clin. Endocrinol. Metab. Jan 2010; 95: 167-177.
2. Brabant G, Toogood AA, Shalet SM, Frobisher C, Lancashire ER, Reulen RC, Winter DL, Hawkins MM: *Hypothyroidism following childhood cancer therapy-an under diagnosed complication*. Int. J. Cancer 2011 Mar 28. doi: 10.1002/ijc.26086 [Epub ahead of print].
3. Curry HL, Parkes SE, Powell JE, Mann JR: *Caring for survivors of childhood cancers: the size of the problem*. Eur. J. Cancer 2006; 42: 501-508.
4. Darzy KH, Shalet SM: *Hypopituitarism following Radiotherapy Revisited*. Endocr Dev. 2008; 15: 1-24.
5. Ergun-Longmire B, Mertens AC, Mitby P, Qin J, Heller G, Shi W, Yasui Y, Robison LL, Sklar CA: *Growth hormone treatment and risk of second neoplasms in the childhood cancer survivor*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2006; 91: 3494-3498.
6. Mills JL, Schonberger LB, Wysowski DK, Brown P, Durako SJ, Cox C, Kong F, Fradkin JE: *Long-term mortality in the United States cohort of pituitary-derived growth hormone recipients*. J. Pediatr. 2004; 144: 430-436.
7. Nicolino M., Chatelain P.: *Endocrine complications of treatment of brain tumors in children*. Pediatrie 1991; 46: 109-119.
8. Ogilvy-Stuart AL, Shalet SM: *Effect of chemotherapy on growth*. Acta Paediatr. 1995 (Suppl. Sep); 411: 52-56.

9. N Rose SR, Schreiber RE, Kearney NS, Lustig RH, Danish RK, Burghen GA, Hudson MM: *Hypothalamic dysfunction after chemotherapy*. J. Pediatr. Endocrinol. Metab. 2004; 17: 55-66.
10. Shalet SM, Gibson B, Swindell R, Pearson D: *Effect of spinal irradiation on growth*. Arch. Dis. Child. 1987; 62: 461-464.
11. Sklar CA, Mertens AC, Mitby P, Occhiogrosso G, Qin J, Heller G, Yasui Y, Robison LL: *Risk of disease recurrence and second neoplasms in survivors of childhood cancer treated with growth hormone: a report from the Childhood Cancer Survivor Study*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2002; 87: 3136-3141.
12. Stevens M.C., Mahler H., Parkes S.: *The health status of adult survivors of cancer in childhood*. Eur. J. Cancer 1998; 34: 694-698.

MENTE E CORPO IN ONCOLOGIA

Riccardo Torta

Dipartimento di Neuroscienze
Facoltà di Medicina e Chirurgia - Università di Torino

Key words: *Psycho-oncology / Psico-oncologia*
Bio-psycho-social model / Modello bio-psico-sociale
Mood depression / Depressione
Antidepressants / Antidepressivi

Abstract:

The medical model attributes a prevalent role to the body in the development of the disease and maintains a division between the psyche (mind) and the body. The bio-psycho-social model suggests that a correlation among biological, emotional and social pathogenic components contributes to the development of the disease. Depression, when in comorbidity with a somatic disease, worsens not only the patient's quality of life but also the prognosis of the physical illness. Mood depression has to be considered as a systemic disease and linked not only to a transmittitorial imbalance but also to hormonal, immunological and neurotrophic alterations. Indeed mood comorbid depression needs to be always diagnosed and treated. In its almost fifteen-years of experience the Psycho-Oncology Unit of the University of Turin has worked to better pin down diagnostic and therapeutic procedures for the cure and care of oncologic patients, in the framework of to the bio-psycho-social paradigm, in which interacting genetic, emotional and interpersonal aspects must be always considered, both in the diagnostic phase and in therapeutic one.

Riassunto:

Il modello medico attribuisce un ruolo prevalente alla componente somatica nello sviluppo di una malattia, mantenendo una separazione fra fattori psichici (mente) e fisici (corpo). Il modello bio-psico-sociale propone una correlazione reciproca fra fattori biologici, emozionali e sociali nel determinismo di una patologia. La depressione del tono dell'umore, quando in comorbilità con una malattia somatica, non solamente peggiora la qualità di vita del paziente ma compromette anche la prognosi della stessa malattia organica. In tale ottica è opportuno considerare la depressione come una reale malattia sistemica che

risulta correlata non solamente ad una disfunzione neurotrasmettitoriale, ma, contestualmente, ad alterazioni ormonali, immunologiche e neurotrofiche. La depressione in comorbilità quindi deve sempre essere diagnosticata e curata.

Nei suoi pressoché quindici anni di attività la Psiconcologia dell'Università di Torino ha lavorato nell'ottica di meglio definire procedure diagnostiche e terapeutiche tanto per curare che per prendersi carico dei pazienti oncologici, facendo sempre riferimento al paradigma bio-psico-sociale per il quale la relazione fra aspetti genetici, psichici ed ambientali deve costantemente essere tenuta in considerazione sia nel formulare una diagnosi, sia ancora nel pianificare una strategia di interventi.

LE RADICI STORICHE

L'interazione fra aspetti fisici e mentali è nota fin dall'antichità greca: molto precocemente la teoria degli elementi (fuoco, acqua, aria, terra), utilizzata per spiegare l'origine della malattia (Anassimene di Mileto, VI sec a.C.), venne integrata a quella ippocratica degli umori, nella quale, ai predetti elementi, venivano correlati degli umori (rispettivamente bile gialla, flegma, sangue, bile nera) a cui sono poi state aggiunte le corrispondenze con i temperamenti (rispettivamente collerico, flemmatico, sanguigno, melanconico).

Tale olistismo venne apparentemente posto in crisi da René Descartes (1596-1650) che propose la dicotomia fra *res extensa* (basi biologiche e cervello), dominio delle scienze, e *res cogitans* (basi psicologiche e mente), dominio della filosofia e della teologia. È peraltro noto come il grande pensatore francese utilizzasse tale dicotomia per motivi di legittimità di ricerca ma, in realtà, il suo pensiero fosse molto più vicino ad un concetto olistico della malattia di quanto non si creda abitualmente⁽¹⁴⁾.

Verso la fine degli anni '70 Engel propone il modello bio-psico-sociale, in cui, nella patogenesi di qualsiasi malattia, non solamente risultano presenti aspetti biologici ed emozionali, ma anche ambientali e relazionali⁽¹⁵⁾.

Sarà con la spinta culturale della “decade del cervello”, negli anni '90, che, attraverso le innovazioni del neuroimaging, verrà riproposto un progetto per una psicopatologia scientifica nel tentativo di correlare nuovamente la mente ed il cervello nello studio della malattia mentale⁽²⁾.

La Psico-Oncologia si inserisce in tale contesto culturale con un modello clinico che affronta la malattia oncologica non solamente sul versante della biologia del tumore, ma anche tenendo in considerazione gli aspetti emozionali ed ambientali che al cancro si correlano e come questi possano anche influenzare la qualità di vita del paziente ed il suo decorso di malattia⁽³⁴⁾. La Psico-Oncologia nasce all'intorno degli anni '50 presso il Memorial Sloan-Kettering Center di New York, dove viene attivato il primo servizio autonomo per l'assistenza psicologica alle pazienti affette da cancro al seno. Trent'anni dopo, presso l'Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro di Genova, viene aperto il primo Servizio italiano di Psicologia per l'assistenza del paziente oncologico. Nel 1984 viene fondata l'International Psychooncology Society (IPOS) e, l'anno successivo, la SIPO (Società Italiana di Psico-Oncologia). Nel 2005, a Torino, il Servizio di Psiconcologia della Chirurgia Oncologica viene trasformato nella prima, ed attualmente unica, struttura complessa universitaria italiana di Psiconcologia.

LEVOLUZIONE DEL CONCETTO DEI RAPPORTI FRA PSICHE E SOMA

Negli anni '50 la manifestazione di sintomi somatici in corso di depressione viene assimilato al concetto di “*depressione mascherata*” e su tale concetto si approfondisce il dibattito sulla malattia psicosomatica e la classificazione nosografica dei cosiddetti disturbi somatoformi⁽²⁰⁾.

L'esperienza sul campo dei rapporti fra psiche e soma della nostra Psicologia Clinica Oncologica nasce negli anni '80, quando, a proposito degli esiti dei by-pass aorto-coronarici (CABG), è risultato evidente come, su 629 pazienti operati di CABG, il 50% presentasse un disturbo depressivo nel peri- e post-operatorio e che tale sintomatologia dell'umore risultasse ancora presente nel 44% dei pazienti ad un anno dall'intervento, con una persistenza di depressione del 36 % del campione totale (226/629) nei pazienti già depressi al basale e con la comparsa di un 8% di depressione (51/629) nei soggetti non depressi al basale. I pazienti con depressione presentavano una peggiore qualità di vita, rispetto ai non depressi, a parità di condizioni organiche⁽²⁵⁾. In allora l'ipotesi prevalente, addotta per spiegare l'insorgenza della depressione, era quella di tipo reattivo alla presenza della malattia organica.

Sempre alla fine degli anni '80 i lavori di Wells e colleghi riportano l'attenzione sul fatto che la depressione del tono dell'umore si presenti con una elevata prevalenza, abitualmente all'intorno del 30% dei soggetti, in varie patologie organiche, con una ratio di circa tre volte superiore alla popolazione generale⁽⁴⁰⁾, dati poi ancor più enfatizzati nelle popolazioni neurologiche⁽³⁵⁾. Il problema, in allora, era distinguere una depressione su base reattiva, causata dalle limitazioni funzionali determinate dalla malattia, da una depressione secondaria ad alterazioni biologiche, riguardante circuiti coinvolti nella regolazione dell'umore, aspetto che quindi coinvolgeva soprattutto la depressione in corso di malattie del SNC.

Fu la cardiologa Nancy Frasure-Smith fra i primi ad osservare come la depressione del tono dell'umore potesse significativamente aumentare il tasso di mortalità cumulativa a sei mesi nei pazienti dopo un infarto miocardico: a parità di parametri biologici (frazione di eiezione, ipertensione, aggregazione piastrinica, dislipidemia, etc.) i pazienti non depressi presentavano un tasso di mortalità inferiore al 5%, mentre i cardiopatici depressi dimostravano una mortalità superiore al 15%⁽¹⁶⁾. Nello stesso periodo altri Autori rilevarono un incremento dei tassi di mortalità, in corso di disturbi depressivi, in varie patologie, con una frequenza doppia, rispetto alla popolazione con lo stesso problema organico ma non depressa, quando in corso di ipertensione, ma del triplo in corso di stroke e diabete, e sino al quadruplo in corso di malattie

cardiovascolari ed oncologiche⁽⁶⁾. Anche recentemente tali dati di prevalenza sono stati confermati in un nostro ampio studio osservazionale sulla comparsa di depressione post-stroke, nel quale è stato riscontrato come un paziente su tre dopo stroke possa presentare un disturbo dell'umore, prevalentemente di tipo distimico⁽³⁷⁾. In tale ottica, quando cioè la depressione complica una patologia organica, diviene importante non solamente il criterio di una peggiore prognosi *quoad vitam*, ma anche quello di una peggior prognosi *quoad valetudinem*: nello studio Destro abbiamo infatti riscontrato come, ad ogni rilevazione di follow-up, la compromissione della disabilità, misurata con la Modified Ranking Scale, fosse più elevata nei pazienti depressi rispetto ai non depressi⁽²³⁾. Di particolare rilievo, analogamente a quanto avviene in altre comorbilità fra malattia organica e depressione, l'attenzione terapeutica al disturbo dell'umore nella cultura medica è ancora scarsa, nonostante il rischio di peggiore prognosi precedentemente descritto: anche nello studio osservazionale Destro la percentuale di pazienti depressi spontaneamente trattati con antidepressivi non raggiunge il 38%⁽²³⁾.

IL CONCETTO DI DEPRESSIONE COME MALATTIA SISTEMICA

Occuparsi di Psiconcologia o, in generale di psicologia e psichiatria di liason, porta a prendere in considerazione sia come i disturbi emozionali non possano essere "solamente" attribuiti a parametri biologici, ma come debbano essere iscritti in una chiave di lettura più allargata, di tipo bio-psico-sociale, sia ancora come anche la patogenesi biologica della depressione non possa essere letta "solamente" come correlata a fattori neurotrasmettitoriali, ma anche legata a fattori ormonali, immunitari, neurotrofici che, almeno in alcuni pazienti, possono prevalere, od essere a monte, rispetto ad alterazioni dei neurotrasmettitori^(28,34).

In tale ottica si pone un nuovo approccio al vecchio concetto di sintomi somatici in corso di depressione e cioè che la depressione non debba essere intesa come a latere della malattia organica, reattiva a disagio e limitazione indotti dalla malattia fisica, ma come possa farne intrinsecamente parte: in altre parole i sintomi somatici della depressione esprimono le alterazioni del soma che la depressione induce e la presenza di sintomi depressivi, in molteplici patologie organiche, sono le conseguenze di alterazioni che la malattia provoca a livello psichico⁽²⁸⁾. Tale ipotesi è stata recentemente avvalorata, in uno studio multicentrico italiano, dal fatto che il numero di sintomi somatici presenti in un paziente correla direttamente con la gravità della depressione⁽²⁴⁾. Attualmente quindi tale rapporto fra sintomi somatici

e psichici viene interpretato sulla base del fatto che la depressione non possa più essere considerata quale una patologia psichica, che può anche riflettersi sul soma, ma piuttosto come una malattia sistemica che si presenti con sintomi sia psichici che somatici⁽²⁸⁾. Inoltre la depressione dell'umore non riconosce solamente una ipotesi biologica basata su alterazioni neurotrasmettitoriali, ma risulta correlata ad alterazioni ormonali, immunitarie e neurotrofiche; inoltre tali fattori patogenetici possono dimostrare un peso differenziato fra di loro, venendosi così a configurare vari tipi di depressione, con sottese diverse patogenesi. Ad esempio in una depressione “funzionale” o “primitiva”, quale osservabile in un paziente squisitamente psichiatrico, l'ipotesi causale più plausibile rimane quella di una alterazione dei livelli di serotonina, noradrenalina o dopamina; per contro una depressione in corso di menopausa o post-partum riconoscerà come primaria una causa ormonale, da caduta dei livelli estrogenici, così come una depressione in corso di altre patologie organiche può riconoscere, come prevalente, una patogenesi da incrementato livello di citochine pro infiammatorie⁽²⁸⁾. Sono peraltro evidenti le correlazioni fra i vari sistemi coinvolti nella patogenesi depressiva, cioè neurotrasmettitori, ormoni, citochine, fattori neurotrofici: basti pensare come, nella pratica clinica psiconcologica, gli antidepressivi possano essere impiegati per il controllo degli hot flushes derivanti da deprivazione estrogenica, nelle donne operate al seno che non possono assumere terapia estrogenica sostitutiva. L'ipotesi, in tale caso è che l'incremento di 5HT e/o di NE determini un aumento correlato di estrogeni a livello dei centri ipotalamici della termoregolazione^(5,26).

LA DEPRESSIONE IN ONCOLOGIA: UNITARIETÀ FRA PSICHE E SOMA

È da tempo noto il rapporto fra depressione dell'umore ed un incrementato sviluppo di una patologia oncologica: tale intuizione della medicina greca è stata oramai confermata da recenti dati di metanalisi⁽¹²⁾ che hanno preso in considerazione i reciproci rapporti di potenziamento patologico fra stress, depressione, immunità e cancro⁽³⁹⁾. Così gli aspetti emozionali e cognitivi, che codificano quanto un evento abbia un peso stressogeno per ogni individuo, determinano anche l'attivazione e la persistenza del circuito somatico, correlato all'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA), i cui principali componenti sono i livelli di cortisolo, di ACTH, di citochine pro infiammatorie, vasopressina, noradrenalina, fattori di crescita neuronali, etc. in un recupero unitario delle precedenti ipotesi patogenetiche della depressione⁽²⁸⁾.

Tale unitarietà non riguarda solamente le cause della depressione ma, ad esempio, anche gli stretti legami fra comparsa della malattia oncologica ed il manifestarsi dei sintomi depressivi. In tal senso è noto come la serotonina, fondamentale modulatore anche emozionale nel cervello, derivi dal triptofano attraverso l'enzima triptofano idrossilasi. Ora, in una fase precoce dello sviluppo tumorale, un altro enzima, l'indolamina 2,3 diossigenasi (IDO), indotto dalle cellule neoplastiche, sposta il triptofano sulla via delle chinurenine, determinando così una ridotta disponibilità di serotonina, a cui consegue precocemente una sintomalogia emozionale (ansia e depressione), in una fase in cui il tumore non è stato ancora diagnosticato e quindi in un periodo in cui la depressione non può essere considerata reattiva alla comunicazione diagnostica⁽²²⁾.

Un ulteriore esempio dell'unitarietà fra aspetti emozionali e biologici nella depressione è l'ipotesi neurotrofica: in corso di stress è noto come abbia luogo un incremento del rilascio del cortisolo e di glutammato, neurotrasmettitore eccitatorio. Entrambi, nel lungo termine, determinano una sofferenza neuronale eccitotossica a livello ippocampale, determinando prima apoptosi, poi morte neuronale, inducendo alterazioni neurofunzionali correlate a depressione ed ansia. È interessante considerare come gli antidepressivi siano in grado di aumentare la produzione di fattori di crescita neuronale (Brain Derived Neurotrophic Factor-BDNF; Nerve Growth Factor-NGF) che, a sua volta, può contrastare e revertire tale sofferenza neuronale, contribuendo al ripristino del normale tono dell'umore⁽²⁸⁾. Nella nostra esperienza la somministrazione di AD determina un incremento di BDNF nei pazienti oncologici depressi, mentre lo stesso fenomeno non risulta significativo nei pazienti oncologici non depressi⁽²⁹⁾.

La diagnosi di depressione diviene quindi fondamentale nella comorbidità, per poter precocemente evitare che tale disturbo emozionale contribuisca non solo ad un peggioramento della qualità di vita dei pazienti, ma determini inoltre una peggior prognosi della malattia somatica.

LO SCREENING DEI DISTURBI EMOZIONALI IN ONCOLOGIA

Frequentemente la diagnosi di depressione non viene posta in ambito oncologico finché i sintomi della stessa divengono apertamente interferenti con la gestione del malato (non aderenza alla terapia, aumento degli effetti collaterali, difficoltà relazionali, etc.). D'altro canto non sempre è possibile il ricorso routinario ad uno psiconcologo per porre una diagnosi precoce di un disturbo emozionale.

In tale ottica sono stati proposti strumenti autovalutativi, che possono ad esempio essere compilati dai pazienti nel corso dell'attesa delle visite oncologiche: in particolare è stata utilizzata la HADS (Hospital Anxiety Depression Scale), compilabile in pochi minuti. In caso di rilevazione di un punteggio superiore al cut-off, che segnala la presenza di sintomi depressivi o ansiosi (rispettivamente nelle due sottoscale), la valutazione testistica può essere seguita da un approfondimento diagnostico mediante intervista semistrutturata e/o colloquio clinico. L'efficacia di tale scala come strumento di screening, utilizzando un cut-off di 8 (rispetto a quello diagnostico di 11) è stata recentemente validata dal nostro gruppo^(10,11).

Il problema non è tuttavia così semplicemente risolvibile in quanto, in talune popolazioni con bassa consapevolezza di malattia, per problemi cognitivi e/o di abuso e/o di basso livello socioeconomico, come più frequentemente avviene in patologie oncologiche del capo-collo, gli stessi strumenti possono risultare scarsamente efficaci nel rilevare un disagio psichico di cui vi sia scarso insight. In tali popolazioni aumenta il gap di rilevazione fra scale di autovalutazione (30% di prevalenza di depressione) verso gli strumenti di eterovalutazione, ad esempio la Montgomery Asberg Depression Rating Scale (MADRS) che, nella stessa popolazione, consente un rilievo di una prevalenza depressiva intorno al 44%. In tale popolazione utile, nella nostra esperienza, è risultato il Draw Person Test, nel quale si richiede al paziente di disegnarsi così come si percepisce, per evidenziare eventuali problemi nella propria immagine corporea⁽¹⁾.

Un altro parametro che risulta fondamentale valutare, in un paziente oncologico, specialmente in fase iniziale, è quello dello stile di coping, cioè come un paziente si ponga di fronte alla propria malattia oncologica ed agli interventi terapeutici che gli vengono proposti. La prima nostra esperienza, una quindicina di anni or sono, ha riguardato la rilevazione di come pazienti con un prevalente stile di coping fondato sulla negazione fossero a rischio di sviluppare una depressione dopo l'impianto di un Port⁽³⁸⁾. Tali pazienti infatti se prima dell'impianto riuscivano ad utilizzare il meccanismo di negazione per dimenticarsi della malattia fra i vari accertamenti ed interventi terapeutici, dovevano, dopo l'impianto del Port, confrontarsi, quotidianamente ed ineluttabilmente, con la presenza del cancro evocata dalla percezione di un visibile apparato sottocutaneo. Lo screening dello stile di coping, attraverso la scala Mini-Mac⁽¹⁷⁾ consentiva una presa in carico degli stessi pazienti a rischio per evitare, od almeno contenere, il disagio emozionale derivante dal Port.

Come già precedentemente riportato lo stress è un parametro fortemente coinvolto nella patogenesi dell'ansia e soprattutto della depressione, ma nella

dimensione mente-corpo rappresenta un paradigmatico esempio di come un meccanismo psichico sia legato a parametri somatici predisponenti e come, a sua volta, lo stesso parametro emozionale possa facilitare alterazioni somatiche anche sul versante delle difese immunitarie. È stato quindi rilevante validare uno strumento di screening anche per lo stress, quale il Distress Thermometer (DT), atto ad identificare rapidamente livelli patologici di tale situazione psicofisica, in funzione di interventi contenitivi sulla stessa⁽²⁷⁾. Un secondo passaggio è stato quello di valutare se esistessero parametri biologici misurabili di predisposizione allo stress, ad esempio su base genetica, che potessero consentire l'identificazione di popolazioni a rischio. Abbiamo in tal senso valutato se l'essere portatori di un allele corto per il trasportatore della serotonina (5HTTR), fattore che comporta una minore efficacia della regolazione serotoninergica, così come osservato per la depressione⁽⁹⁾, potesse correlare con un incrementato rischio di stress. A conferma di tale ipotesi è stato il riscontro che i portatori di allele corto presentassero un aumentato livello di stress (DT: 7.11), valutato con il Distress Thermometer (DT), rispetto ai portatori di un allele lungo (DT: 4.91)⁽²⁷⁾. Quindi anche la rilevazione di tale possibile fattore di rischio può rappresentare un elemento di screening aggiuntivo per focalizzare il monitoraggio nel corso del follow up, incentrandolo su popolazioni numericamente più limitate.

APPROCCIO TERAPEUTICO NEI PAZIENTI ONCOLOGICI CON DEPRESSIONE

In accordo con la lettura patogenetica del modello biopsicosociale, riguardante per le cause della depressione una stretta interazione fra alterazioni biologiche, aspetti psichici e relazionali, anche sul versante della cura un adeguato approccio terapeutico deve tener in conto la possibilità di utilizzare interventi di tipo farmacologico, psicoterapico o psicosociale.

Che dimensioni attinenti al contesto psicosociale possano inferire su di una risposta biologica è un dato oramai acquisito, ad esempio per gli aspetti epigenetici riguardanti il fatto che un adeguato maternage renda i piccoli di ratto e di scimmia più resilienti, nell'età adulta, allo stress⁽²⁸⁾. Nella nostra esperienza psicologica clinica in ospedale abbiamo rilevato come il consentire la presenza di un adeguato accudimento familiare in reparto riduca l'incidenza di delirium dal 15.2% in strutture geriatriche con orari di visita chiusi rispetto al 6.6% nei reparti con orari di visita aperti⁽⁷⁾.

Sul versante dell'intervento psicofarmacologico, uno dei problemi che la Psiconcologia ha dovuto affrontare è stato quello di validare, nel malato

oncologico, l'efficacia e la tollerabilità degli antidepressivi che non poteva essere *tout court* considerata sovrapponibile a quella osservata nel paziente depresso primitivo o funzionale. Un altro problema era rappresentato dal fatto che molte delle depressioni in comorbidità potessero essere considerate resistenti, sulla base dei meccanismi biologici sottesi o del loro collegamento reattivo ad una patologia di base persistente. Di conseguenza, nel paziente depresso con comorbidità potrebbe essere necessario applicare strategie peculiari (add-on fra antidepressivi, switch fra classi di farmaci), come quelle poste in atto nei pazienti funzionali con risposta parziale o non risposta agli antidepressivi⁽¹⁸⁾.

Il nostro gruppo ha così cominciato a studiare l'impiego degli antidepressivi nei pazienti oncologici, principalmente per valutare i parametri di efficacia e tollerabilità di tale molecole.

Fra le molteplici rilevazioni farmacologiche, possono essere sinteticamente riportate alcune considerazioni come il fatto che alcuni effetti di un farmaco, considerati come indesiderati nel paziente funzionale, possano, per contro, divenire fortemente utili nel paziente oncologico: ad esempio l'aumento dell'appetito e del peso con l'amisulpride⁽³³⁾. Un altro aspetto di risposta alla terapia antidepressiva, che avalla l'ipotesi della depressione sistemica, e quindi di sintomi somatici intrinseci alla depressione, è il fatto che la risposta migliorativa verso un antidepressivo non si manifesta solamente sul versante dei sintomi emozionali ma anche, con la stessa significatività, a livello dei cosiddetti sintomi fisici della depressione⁽³²⁾. Alcuni nostri recenti dati poi smentiscono l'asserto che un paziente oncologico depresso dimostri una risposta al farmaco antidepressivo minore che quella dimostrata dal paziente psichiatrico funzionale: la riduzione della MADRS si dimostra sovrapponibile fra pazienti oncologici e psichiatrici depressi, raggiungendo dopo otto settimane di trattamento la stessa significatività di riduzione per le due popolazioni⁽³⁰⁾.

Un fondamentale aspetto nella pratica psiconcologica è quello degli interventi psicoterapici, talora in monoterapia, più frequentemente associati ad interventi psicofarmacologici. In molti pazienti che ricusano un psicofarmaco, per svariate motivazioni (timore di tossicità, presenza di altre farmacoterapie impegnative come quelle oncologiche, timore di dipendenza, rifiuto di una etichetta emozionale dei propri disturbi di cui è ben riconosciuta una causa organica), la psicoterapia diviene un intervento fondamentale che, in seconda battuta, può anche riaprire la strada ad un approccio farmacologico inizialmente ricusato. Tuttavia i tempi di risposta ad una psicoterapia e la valutazione di efficacia della stessa non possono, e non debbono, essere

valutati con gli stessi parametri con cui viene misurata l'efficacia di una farmacoterapia⁽³⁴⁾: la psicoterapia infatti stabilizza i propri risultati in tempi più lunghi dell'intervento farmacologico, ma con modalità più duratura.

Un altro aspetto che è stato necessario sfatare è stato quello della non possibilità di utilizzare una psicoterapia anche nelle fasi avanzate di malattia. In accordo con la scuola canadese di Chochinov (2006)⁽¹³⁾, nella nostra esperienza, è stato interessante osservare come anche aspetti cognitivi come la consapevolezza, facilitati da un intervento psicologico supportivo, possano migliorare la qualità di vita dei pazienti terminali, riducendo la depressione e potenziando meccanismi di coping più efficaci ed adattivi, come lo spirito combattivo⁽⁸⁾.

IL CONTRIBUTO DELLA PSICONCOLOGIA ALLA TERAPIA DEL DOLORE

Nel contesto della crescente attenzione al problema del diritto del paziente a non soffrire, anche recentemente riconosciuto dalla Legge 38 del 2010, la Psiconcologia si occupa del dolore sia sul versante patogenetico del rapporto fra dolore e depressione, sia sul versante del trattamento, farmacologico e non, del dolore stesso.

Il dolore riconosce tre principali dimensioni: quella nocicettiva, quella emozionale e quella cognitiva. Sovente, nell'approccio medico, si dà rilevanza solamente alla prima, scotomizzando le altre due, sovente ricorrendo con analgesici un dolore resistente, in cui magari aspetti psichici e cognitivi sono prevalenti e non riconosciuti⁽³⁶⁾. Le stesse aree cerebrali coinvolte nella modulazione e filtro del dolore confermano tali asserzioni: la processazione somatosensoriale del dolore avviene principalmente a livello della corteccia somatosensoriale a cui provengono afferenze dal talamo laterale. A tale processazione si associa quella emozionale, correlata ai circuiti affettivi limbici (insula, amigdala, corteccia cingolata anteriore) e quella cognitiva, principalmente riferibile alla corteccia prefrontale⁽¹⁹⁾: è dall'insieme della modulazione di tale aree che origina la percezione del dolore ed è sulla contestualità di tali circuiti che si fonda una efficace strategia terapeutica sul dolore.

Sul versante clinico è ben noto il rapporto fra depressione e dolore: il dolore cronico favorisce la depressione, a causa dell'incrementata disabilità, della riduzione del senso di capacità e delle relazioni sociali; d'altro lato la depressione causa, attraverso una sensibilizzazione centrale, una riduzione della soglia del dolore^(21,36).

Nella nostra ipotesi, la spiegazione dei rapporti fra depressione e dolore si fonda sulla possibilità che esistano meccanismi causali comuni fra le alterazioni del tono affettivo e la patologia algica⁽³¹⁾. In particolare la riduzione del tono serotoninergico e noradrenergico sono contestualmente correlabili tanto ad una alterazione in senso depressivo del tono dell'umore (in accordo con l'ipotesi neurotrasmettitoriale della depressione), quanto ad una minore efficacia del circuito inibitore discendente del dolore, che va dalle aree del griseum periacqueduttale a quelle midollari posteriori, ed impiega 5HT, NE ed oppioidi come trasmettitori. Un'altra comunanza patogenetica è rappresentata dall'incremento delle citochine pro-infiammatorie, osservabile sia nella depressione (da attivazione principalmente della risposta agli ormoni dello stress), sia nel dolore, come ben noto ad esempio nel dolore neuropatico. Altre sovrapposizioni riguardano l'aspetto dei neurosteroidi, degli ormoni sessuali e dei fattori di crescita neuronale^(28,31).

Interessante, nella nostra esperienza clinica, è che nel trattamento adiuvante del dolore, accanto all'utilizzo degli analgesici (FANS, oppioidi deboli ed oppioidi forti) risultino altrettanto efficaci sia gli antidepressivi, grazie al loro ampio spettro d'azione (su trasmettitori, citochine, oppioidi, fattori neurotrofici), sia le psicoterapie. L'integrazione fra un antidepressivo duale (ad azione sia su serotonina che su noradrenalina) ed una psicoterapia (di tipo psicodinamico breve) è in grado di produrre una maggiore risposta analgesica rispetto alla sola terapia analgesica ed alla terapia analgesica ed antidepressiva associate⁽⁸⁾.

Per concludere, un aspetto fondamentale nella terapia del dolore, ma comunque di ogni terapia, è quello dell'aspettativa del paziente. Benedetti e collaboratori^(3,4) hanno ben dimostrato come in un paradigma aperto (dove il paziente è in rapporto relazionale con i curanti) la risposta ad un analgesico possa essere anche doppia rispetto ad un paradigma chiuso (in cui il paziente riceve il farmaco attraverso un sistema computerizzato in assenza di relazione con i curanti). La differenza fra l'efficacia nel paradigma aperto rispetto a quello chiuso sta nell'aspettativa e nel rapporto di cura, portando anche alla considerazione che molta dell'azione terapeutica di un farmaco risieda in meccanismi non farmacologici e che, fra questi meccanismi, il rapporto terapeutico fra curante e paziente mantenga un ruolo prioritario che, proprio in un contesto psiconcologico, non deve essere mai dimenticato.

CONCLUSIONI

I rapporti fra mente e corpo sono dibattuti da secoli da parte della medicina e della filosofia. Sul versante medico-clinico una dicotomia fra psiche e soma risulta non più sostenibile, alla luce non solamente dell'applicazione del modello bio-psico-sociale della malattia ma, soprattutto delle attuali conoscenze dei rapporti fra meccanismi genetici ed epigenetici, psiche ed ambiente. La Psiconcologia, al di là delle sue implicanze cliniche e sociali, è un'area scientifica che fortemente supporta, sul versante diagnostico e terapeutico, l'unitarietà delle causalità patogenetiche di malattia e degli interventi, riportando l'attenzione sulla centralità del paziente (e non della malattia) e sull'importanza, anche ai fini biologici, del rapporto di cura esistente fra medico, paziente e familiari.

BIBLIOGRAFIA

1. Airoidi M, Garzaro M, Raimondo L, Pecorari G, Giordano C, Varetto A, Caldera P, Torta R: *Functional and psychological evaluation after flap reconstruction plus radiotherapy in oral cancer*. Head Neck. 2011; 33: 458-468.
2. Andreasen N: *Linking Mind and Brain in the Study of Mental Illnesses: A Project for a Scientific Psychopathology*. Science. 1997; 14: 1586-1593.
3. Benedetti F, Carlino E, Pollo A: *How placebos change the patient's brain*. Neuropsychopharmacology. 2011; 36: 339-354.
4. Benedetti F: *Mechanisms of placebo and placebo-related effects across diseases and treatments*. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2008; 48: 33-60.
5. Biglia N, Torta R, Roagna R, Maggiorotto F, Cacciari F, Ponzone R, Kubatzki F, Sismondi P: *Evaluation of low-dose venlafaxine for the therapy of hot flushes in breast cancer survivors*. Maturitas. 2005; 52: 78-85.
6. Black SA, Markides KS: *Depressive symptoms and mortality in older Mexican Americans*. Ann. Epidemiol. 1993; 9: 45-52.

7. Bo M, Martini B, Ruatta C, Massaia M, Ricauda NA, Varetto A, Astengo M, Torta R: *Geriatric ward hospitalization reduced incidence delirium among older medical inpatients*. Am. J. Geriatr. Psychiatry. 2009; 17: 760-768.
8. Bovero A, Torta R: *Consapevolezza di prognosi in pazienti oncologici terminali a domicilio: analisi dei risultati*. Riv. Ital. Cure Pall. 2010; 4: 40-45.
9. Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R: *Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene*. Science. 2003; 18: 386-389.
10. Castelli L, Binaschi L, Caldera P, Torta R: *Depression in lung cancer patients: is the HADS an effective screening tool?* Support Care Cancer. 2009; 17: 1129-1132.
11. Castelli L, Binaschi L, Caldera P, Mussa A, Torta R: *Fast screening of depression in cancer patients: the effectiveness of the HADS*. European Journal of Cancer Care. 2011; 20: 528-533.
12. Chida Y, Hamer M, Steptoe A: *Do stress-related psychosocial factors contribute to cancer incidence and survival?* Nature Clinical Practice Oncology 2008; 5: 466-475.
13. Chochinov HM: *Dying, Dignity, and New Horizons in Palliative End-of-Life Care*. CA Cancer. J Clin. 2006; 56: 84-103.
14. Duncan G: *Mind-Body Dualism and the Biopsychosocial Model of Pain: What Did Descartes Really Say?* J. Med. Phylos. 2000; 25: 485-513.
15. Engel GL: *The Clinical Application of the Biopsychosocial Model*. Am. J. Psych. 137, 1980.
16. Frasure-Smith N, Lesperance F: *Depression and other psychological risks following myocardial infarction*. Arch Gen Psychiatry. 2003; 60: 627-636.
17. Grassi L, Buda P, Cavana L, Annunziata MA, Torta R, Varetto A: *Styles of coping with cancer: the Italian version of the mini-mental Adjustment to cancer (mini-mac) scale*. Psycho-Oncology 2005; 14: 115-124.
18. Hirschfeld RM, Montgomery SA, Aguglia E, Amore M, Delgado PL, Gastpar M, Hawley C, Kasper S, Linden M, Massana J, Mendlewicz J, Möller HJ, Nemeroff CB, Saiz J, Such P, Torta R, Versiani M: *Partial response and nonresponse to antidepressant therapy: current approaches and treatment options*. J. Clin. Psychiatry. 2002; 63: 826-837.
19. Klossika I, Flor H, Kamping S, Bleichhardt G, Trautmann N, Treede RD, Bohus M, Schmal C: *Emotional modulation of pain: a clinical perspective*. Pain. 2006; 124: 264-268.
20. Kradin RL: *Psychosomatic disorders: the canalization of mind into matter*. J Anal Psychol. 2011; 56: 37-55.
21. Leo RJ: *Pain Management for Psychiatrist*. American Psychiatric Publishing Inc, 2003, Washington DC.
22. Miura H, Ozaki N, Sawada M, Isobe K, Ohta T, Nagatsu T: *A link between stress and depression: Shifts in the balance between the kynurenine and serotonin pathways of tryptophan metabolism and the etiology and pathophysiology of depression* Stress. 2008; 11: 198-209.
23. Paolucci S, Gandolfo C, Provinciali L, Torta R, Sommacal S, Toso V: *DESTRO Study Group Quantification of the risk of poststroke depression: the Italian multicenter observational study DESTRO*. Acta Psychiatr Scand. 2005; 112: 272-278.

24. Perugi G, Canonico PL, Carbonato P, Mencacci C, Muscettola G, Pani L, Torta R, Vampini C, Fornaro M, Parazzini F, Dumitriu A: *Come To Me Study Group. Unexplained Somatic Symptoms during Major Depression: Prevalence and Clinical Impact in a National Sample of Italian Psychiatric Outpatients*. *Psycho-pathology*. 2011; 44: 116-124.
25. Pinna Pintor P, Torta R, Bartolozzi S, Borio R, Caruzzo E, Cicolin A, Giammaria M, Mariani F, Ravarino G, Triumbari F: *Clinical Outcome and Emotional-Behavioural Status after Isolated Coronary Surgery*. *Quality of Life Research*. 1992; 1: 177-185.
26. Torta R: *Antidepressivi in oncologia: indicazioni e limiti*. Noos, 2011 (in press).
27. Torta R: *Cancer pain: psycho-oncological aspects and interventions*. Proceedings of 20th World Congress on Psychosomatic Medicine, 2009, Turin. *Panminerva Medica* 2009; 51 (3): 115.
28. Torta R: *La depressione come malattia sistemica e lo spettro d'azione delle terapie antidepressive*. Critical Medicine Publishing, 2008, Roma.
29. Torta R, Amodeo L, Leombruni P, Tascetta F, Brunello N: *Duloxetine increases BDNF in depressed but not in non-depressed oncological patients*. Submitted.
30. Torta R, Leombruni P, Borio R, Castelli L: *Duloxetine for the treatment of mood disorder in cancer patients: a 12-week case-control clinical trial*. *Hum. Psychopharmacol*. 2011; Jul 12. doi: 10.1002/hup.1202.
31. Torta RG, Munari J: *Symptom cluster: Depression and pain*. *Surg Oncol*. 2010; 19: 155-159.
32. Torta R, Siri I, Caldera P: *Sertraline effectiveness and safety in depressed oncological patients*. *Support Care Cancer*. 2008; 16: 83-91.
33. Torta R, Berra C, Binaschi L, Borio R: *Amisulpride in the short-term treatment of depressive and physical symptoms in cancer patients during chemotherapies*. *Support Care Cancer*. 2007; 15: 539-546.
34. Torta R, Mussa A: *Psiconcologia. Il modello bio-psico-sociale*, Centro Scientifico Editore, 2007, Torino.
35. Torta R, Caldera P, Torta D: *Depressive Disorders in Neurological Disease: From Clinical Features to Therapeutic Approaches*. *Confinia Neuropsichiatria*. 2007; 2: 1-17.
36. Torta R, Lacerenza M: *Depressione e dolore*. UTET Periodici, 2002, Milano.
37. Toso V, Gandolfo C, Paolucci S, Provinciali L, Torta R, Grassivaro N: *On behalf of DESTRO Study Group* Post-stroke depression: research methodology of a large multicentre observational study (DESTRO)*. *Neurol. Sci*. 2004; 25: 38-144.
38. Varetto A, Salvatico F, Torta R: *Totally Implantable Venous Systems (Port) And Quality Of Life*. *Annals of Oncology*. 2000; 11: 2-29.
39. Vissoci Reiche EM, Vargas Nunes SO, Kaminami Morimoto H: *Stress, depression, the immune system, and cancer*. *Lancet Oncol*. 2004; 5: 617-625.
40. Wells KB, Rogers W, Burnam MA, Camp P: *Course of depression in patients with hypertension, myocardial infarction, or insulin-dependent diabetes*. *Am. J. Psychiatry* 1993; 150: 632-638.

CUORE E VETTE: APPUNTI DI MEDICINA DI MONTAGNA

Oriana Pecchio

Società Italiana di Medicina di Montagna

Key words: *Hypoxia / Ipossia*
Heart / Cuore
Cardiovascular system / Sistema cardiovascolare

Abstract:

Since man began to climb mountains and reach high altitudes by balloons, the effects on heart and the whole cardiovascular system had been observed. Hypobaric hypoxia is the most important climate variable in producing these effects. This review focuses on the effects of short or long time exposure to hypobaric hypoxia on cardiovascular system of healthy individuals. The pulmonary circulation, the heart function in relation with blood volume, acid-bases status, blood viscosity, autonomic nervous system changes and myocardial contractility, the coronary circulation, and the systemic blood pressure will be considered.

Riassunto:

Da quando l'uomo ha cominciato a scalare le montagne e a raggiungere le alte quote con gli aerostati si sono osservati effetti sul cuore e sull'intero apparato cardiovascolare. L'ipossia ipobarica è la variabile climatica più importante nel determinare questi effetti. In questa breve rassegna si considerano gli effetti dell'ipossia a breve e lungo termine sul sistema cardiovascolare di soggetti sani, analizzando la circolazione polmonare, la funzione cardiaca in rapporto alla volemia, allo stato acido-base, alla viscosità ematica, al sistema nervoso autonomo e alla contrattilità miocardica, la circolazione coronarica e la pressione arteriosa sistemica.

INTRODUZIONE

“Cuore e vette” è binomio che da una parte lega le montagne alle emozioni, alla passione che spinge gli alpinisti ad avventurarsi in alto, su sentieri erti e non sempre facili, dall'altra alla funzione fisiologica del cuore, muscolo che fa il suo dovere nel fornire nutrimento a tutto il corpo, incluso se stesso, quando l'aria diventa sottile. Da quando l'uomo ha cominciato a salire sulle montagne o a raggiungere rapidamente l'alta quota con gli aerostati, è stata studiata la risposta del cuore e dell'intero apparato cardiovascolare alle mutate condizioni ambientali al fine di un adattamento complessivo dell'organismo.

Di tutte le caratteristiche del clima di montagna, elencate nella Tabella 1, le più importanti per la fisiologia dell'alta quota sono la diminuzione della pressione barometrica e quindi della pressione parziale dell'ossigeno e la diminuzione della temperatura. La conoscenza degli adattamenti dell'apparato cardiovascolare all'altitudine, sia nel soggetto sano sia nel portatore di patologie cardiovascolari note, è importante per valutare il rischio di eventi avversi specifici attribuibili in primis all'ipossia (il mal di montagna acuto, subacuto e cronico, l'edema cerebrale e l'edema polmonare da alta quota) o secondari ad una patologia preesistente.

Man mano che si sale di quota si osserva:
1. Riduzione della pressione barometrica
2. Riduzione della pressione inspiratoria dell'ossigeno
3. Riduzione della temperatura
4. Riduzione dell'umidità relativa
5. Riduzione della densità dell'aria
6. Riduzione di inquinanti ed aeroallergeni (particelle di polvere, acari e pollini che producono reazioni allergiche)
7. Incremento della ventosità
8. Incremento delle radiazioni solari

Tabella 1. Le variazioni del clima salendo di quota.

Che il cuore reagisse alla rarefazione dell'aria in "alta quota" è noto da tempo. Mosso nella sua opera "La Fisiologia dell'uomo sulle Alpi" descrive la "stanchezza del cuore": «Il numero delle pulsazioni cresce notevolmente quando si fa un'ascensione. Su tale punto siamo tutti d'accordo. Ma ora si crede che il polso sia molto più frequente sulle montagne, anche quando uno trovasi nello stato di profondo riposo»⁽²⁴⁾. Osservava anche che a riposo l'influenza dell'aria rarefatta era "piccola", come desumeva dalle misurazioni del polso al mattino a riposo in cinque soldati, durante la spedizione alla Capanna Regina Margherita del 1894.

Gli effetti dell'ipossia dipendono dal suo grado e quindi dalla quota e dalla durata dell'esposizione e possono essere modulati da altri fattori ambientali o situazionali, quali freddo, stress, scarse o comunque diverse alimentazione e idratazione, tanto che già Angelo Mosso conduceva parte delle sue sperimentazioni in laboratorio, per isolare l'azione dell'ipossia.

Oggi si intende per alta quota quella che è compresa tra i 3.000 e i 5.000 m; tra 1.800 e 3.000 m si parla di media quota, al di sopra dei 5.000 m di altissima quota.

Alcuni autori in realtà definiscono l'alta quota a partire dai 2.500 m, altitudine cui alle nostre latitudini, corrisponde una saturazione ossiemoglobinica inferiore al 90%⁽³⁰⁾. In sostanza a partire dai 2.500 – 3.000 m di altitudine l'ipossiemia provoca una serie di adattamenti polmonari e cardiovascolari volti a mantenere un'adeguata ossigenazione dei differenti organi e tessuti.

EFFETTI DELL'IPOSSIA SUL SISTEMA CARDIOVASCOLARE DI SOGGETTI NORMALI

L'ipossia determina direttamente una vasodilatazione sistemica e una vasoconstrizione a livello polmonare e, attraverso la stimolazione dei chemocettori periferici, aumenta la ventilazione e l'attività simpatica. Le azioni indirette interagiscono con quelle dirette modulando la risposta vascolare sistemica e polmonare⁽³⁾ (Figura 1). Verosimilmente alla base di molte di queste modificazioni c'è la sintesi di Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF1). È noto che l'ipossia attraverso l'HIF1 stimola la produzione di NO e la vasodilatazione delle arteriole del distretto ipossico, così come la produzione di eritropoietina. Quando successivamente la risposta ventilatoria e l'aumento dell'emoglobina (Hb) aumentano il contenuto di O₂ del sangue, la risposta cardiovascolare si attenua. Se l'ipossia aumenta (per esempio si sale ulteriormente di quota) l'attività dei chemocettori periferici aumenta in modo iperbolico per aumento della loro sensibilità⁽¹⁶⁾.

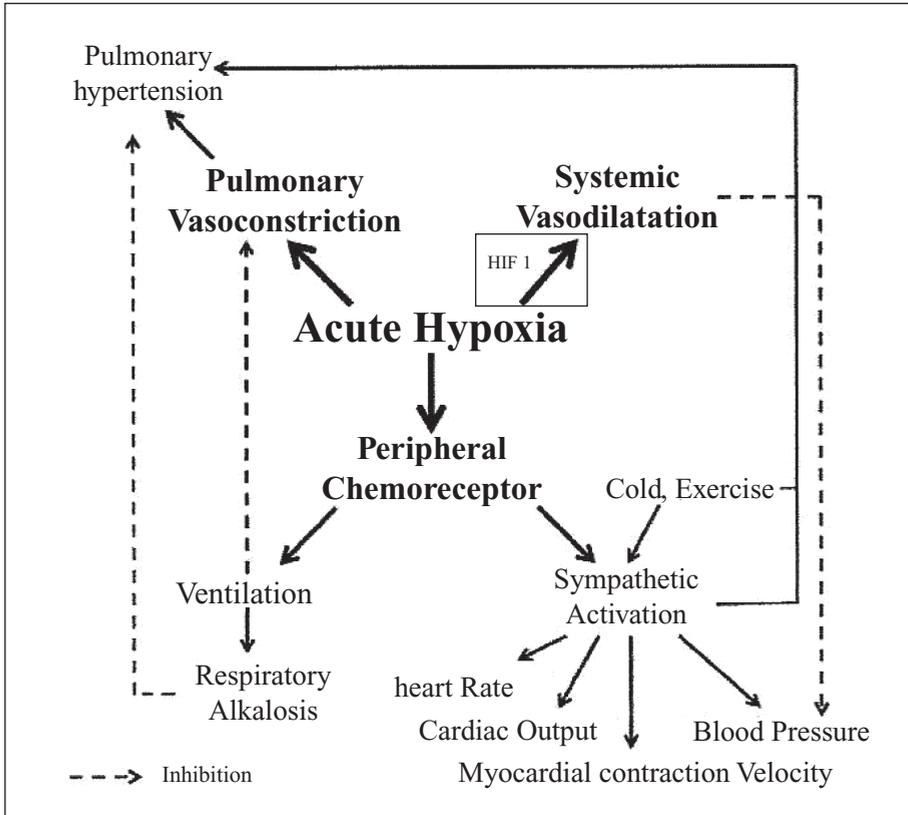


Figura 1. Da Bartsch P et Gibbs SR: Effect of Altitude on the Heart and the Lungs. *Circulation* 2007; 116: 2191-2202 modificato.

LA CIRCOLAZIONE POLMONARE

La vasocostrizione polmonare ipossica fu descritta da Von Euler e Liljestrand nel 1946. La vasocostrizione in risposta ad un'ipossia zonale, per esempio in un focolaio bronco pneumonico, è funzionale alla riduzione dello sfasamento tra ventilazione e perfusione, ma quando è l'intero organismo a trovarsi in ipossia, allora la vasocostrizione può essere svantaggiosa perché determina aumento delle resistenze vascolari polmonari e della pressione arteriosa polmonare⁽¹⁵⁾ (PAP). L'aumento della PAP è stato osservato sia in soggetti esposti acutamente alla quota, sia nelle popolazioni andine residenti in alta quota, sia, seppure in misura inferiore, in soggetti tibetani residenti in alta quota da generazioni. "Di solito" l'ipertensione polmonare che ne risulta

è moderata con pressioni arteriose polmonari medie intorno ai 25 mmHg, ma esiste una notevole variabilità soggettiva e si è osservato che nei soggetti suscettibili all'edema polmonare da alta quota, l'aumento della PAP è di molto superiore.

La vasocostrizione polmonare ipossica è intrinseca alle cellule muscolari lisce delle arterie polmonari, è indipendente dall'endotelio ed è mediata da un aumento di ioni Calcio all'interno delle cellule. L'ingresso del Calcio nelle cellule è aumentato da meccanismi sensibili a cambiamenti nella concentrazione di ROS (Reactive Oxygen Species), perossidi e ioni ossigeno. La vasocostrizione polmonare ipossica può essere aumentata da un'azione indiretta dell'ipossia attraverso l'attivazione simpatica e l'interessamento dell'endotelina e può essere attenuata dall'aumentata sintesi di NO, dall'iperventilazione con aumento della PO₂ alveolare e dall'alcalosi respiratoria⁽²⁵⁾.

Sono state dimostrate due fasi della vasocostrizione polmonare ipossica, la prima endotelio indipendente, rapida, con picco a due minuti dall'esposizione all'ipossia; la seconda con picco dopo circa 40 minuti, endotelio dipendente⁽³⁷⁾.

È stato osservato che la vasocostrizione non è omogenea. La risonanza magnetica ha evidenziato una disomogenea distribuzione della vasocostrizione ipossica anche in soggetti con una risposta normale all'ipossia⁽⁸⁾ e questa disomogeneità sembra aumentare nei soggetti suscettibili all'edema polmonare da alta quota (High Altitude Pulmonary Edema HAPE)⁽¹⁸⁾. I possibili meccanismi alla base di questa disomogeneità sono:

- 1) la presenza di disomogeneità basali del rapporto ventilazione/perfusione
- 2) differenze regionali nel rilascio di NO endoteliale
- 3) la distribuzione disomogenea delle cellule muscolari lisce a livello delle arteriole polmonari

Proprio la disomogeneità della vasocostrizione polmonare ipossica è alla base dell'ipotesi patogenetica dell'HAPE, formulata da Hultgren e da West. Le aree a valle delle arteriole vaso costrette sono protette, mentre le altre zone sono soggette ad un aumento di flusso, con distensione delle arteriole e dei capillari e fuoriuscita di acqua, albumina e infine globuli rossi^(19,38).

LA RISPOSTA DEL CUORE

La risposta del cuore anche a riposo è immediata ed è un aumento della portata cardiaca, quasi interamente sostenuto dall'aumento della frequenza cardiaca. L'aumento della portata cardiaca è inversamente proporzionale

alla diminuzione del contenuto arterioso di ossigeno con il risultato che la distribuzione dell'ossigeno ai tessuti rimane pressoché invariata. L'aumento della frequenza cardiaca è secondaria all'attivazione del sistema nervoso simpatico e all'aumento delle catecolamine circolanti (epinefrina prima e norepinefrina successivamente)⁽²⁶⁾. Questa risposta cardiovascolare è immediata, ma transitoria e nel giro di pochi giorni (da tre a otto) la portata cardiaca ritorna ai valori pre-ipossia. La frequenza rimane invece elevata mentre la gittata cardiaca progressivamente diminuisce, sia a riposo, sia durante esercizio e questo “assetto” rimane stabile nel tempo. Il ritorno della portata cardiaca ai valori di base precede l'aumento dell'emoglobina e dei globuli rossi circolanti, la cui produzione aumenta per effetto della secrezione di eritropoietina. Per mantenere costante la cessione di ossigeno a livello tissutale si può ipotizzare un aumento dell'estrazione dell'ossigeno⁽²¹⁾.

Il massimo consumo di Ossigeno ($VO_2\text{max}$) diminuisce parallelamente alla diminuzione della pressione parziale dell'ossigeno nell'aria inspirata (PO_2). Per ogni dato livello di esercizio, la FC è maggiore in altitudine, sebbene la massima frequenza cardiaca si riduca rispetto al livello del mare. Con l'acclimatazione i rapporti tra la portata cardiaca, il carico di lavoro e il consumo di ossigeno si mantengono simili a quelli osservati a livello del mare, ma il picco si raggiunge per valori minori di $VO_2\text{max}$, carico di lavoro, portata cardiaca e frequenza⁽²⁸⁾.

Arricchendo l'aria con ossigeno, in modo da aumentare la PO_2 come a livello del mare, aumentano sia la capacità lavorativa, sia la portata cardiaca che torna ai valori di base. Se invece si blocca il vago con glicopirrolato solo la frequenza cardiaca torna ai valori del livello del mare, indicando il coinvolgimento del parasimpatico per quanta riguarda il ridotto aumento della FC durante esercizio, ma altri meccanismi sono in causa per la diminuzione della massima portata cardiaca⁽⁵⁾.

Nell'esame dei possibili meccanismi della diminuzione della massima portata cardiaca ad alta quota si sono considerati:

- 1) l'attivazione del sistema nervoso simpatico
- 2) l'effetto di depressione del miocardio dell'ipossia
- 3) l'ipocapnia
- 4) l'ipovolemia
- 5) l'aumento della viscosità ematica
- 6) l'ipertensione polmonare
- 7) la diminuita domanda periferica

- 1) L'attivazione del sistema nervoso simpatico era stata riportata già nel classico lavoro di Cunningham e Kreuzer alla Capanna Regina Margherita del 1965⁽⁷⁾ ed è stata confermata in studi successivi^(4,23). Sono anche state osservate una diminuita risposta all'isoproterenolo e una ridotta attività dei recettori β adrenergici^(29,20). Il blocco parasimpatico con glicopirrolato riporta la frequenza cardiaca massimale ai valori di base, ma non ripristina la massima portata cardiaca né il $VO_2\text{max}$ ⁽⁵⁾. Rimane quindi difficile da capire come un aggiustamento delle interazioni tra sistema nervoso simpatico e parasimpatico possa essere in causa per l'aumento della frequenza cardiaca a riposo e la diminuzione della massima frequenza cardiaca.
- 2) Si è osservato che l'ipossia ha effetto inotropo negativo sia in preparazioni animali sia in fibre miocardiche isolate, ma le pressioni di riempimento ventricolare sia destro sia sinistro si mantengono elevate in esperimenti ad alta quota simulata e anche l'andamento del rapporto tra la pressione sistolica di picco e il volume telesistolico a riposo e durante esercizio aumenta in alta quota simulata⁽³³⁾, indicando quindi una buona contrattilità del miocardio.
- 3) L'ipocapnia era già stata invocata da Mosso come una delle cause del mal di montagna acuto. La gittata sistolica potrebbe essere influenzata dall'alcalosi secondaria all'aumentata ventilazione indotta dall'ipossia. Se a soggetti esposti a ipossia ipobarica (4.500 m) si fa respirare aria addizionata con CO_2 (3,7%), il pH e la PCO_2 rimangono invariati, mentre la gittata sistolica a riposo e durante esercizio aumenta. Tuttavia nei soggetti trattati con CO_2 il $VO_2\text{max}$ diminuisce in quota del 32%, rispetto al 29% del gruppo non trattato. La PO_2 arteriosa è infatti più bassa, diminuendo verosimilmente il passaggio di ossigeno ai tessuti. Supplementi di CO_2 prevengono anche l'aumento acuto dell'ematocrito, suggerendo assenza di variazione del volume plasmatico⁽¹⁴⁾.
- 4) Variazioni del volume plasmatico.
Il volume plasmatico in alta quota diminuisce. L'ipossia acuta determina un aumento della concentrazione di emoglobina, suggerendo un passaggio di liquidi dallo spazio vascolare a quello extravascolare⁽²⁷⁾, ma successivamente il volume plasmatico diminuisce sia per perdita di liquidi da aumento della ventilazione, della perspiratio insensibile e della diuresi (secondaria ad aumento del rilascio di ANP e diminuita sintesi di aldosterone), sia per diminuito apporto di liquidi⁽³¹⁾. Non è chiaro ancora quanto la diminuzione del precarico sia in causa nella diminuzione della massima portata cardiaca. In letteratura ci sono dati controversi sull'utilizzo dell'espansione del

volume plasmatico per aumentare la massima portata cardiaca^(31,6), mentre la somministrazione di ossigeno con la correzione dell'ipossiemia aumenta rapidamente la massima portata cardiaca⁽²⁸⁾.

5) Aumento della viscosità ematica.

Nei soggetti sani l'ematocrito aumenta inizialmente per emoconcentrazione, poi per aumento dell'eritropoiesi, il cui effetto si evidenzia dopo circa due settimane. L'aumento della viscosità ematica potrebbe essere in causa nella diminuzione della portata cardiaca, ma l'emodiluizione isovolumetrica non aumenta il massimo consumo di ossigeno e aumenta solo lievemente la massima portata cardiaca e la gittata sistolica⁽³²⁾. Supplementi di ossigeno invece aumentano in quota il VO_2 max e la massima portata.

6) Ipertensione polmonare.

Tutti i soggetti in ipossia presentano aumenti della pressione arteriosa polmonare, che sono modesti nei non suscettibili all'edema polmonare e marcati in quelli suscettibili. L'aumento della pressione arteriosa polmonare potrebbe contribuire alla limitazione del VO_2 max. È stato dimostrato che l'assunzione di un inibitore della 5-fosfodiesterasi, il Sildenafil, sia nell'esposizione acuta sia in quella cronica, riduce la PAP, migliora l'ossigenazione arteriosa e aumenta la portata cardiaca e la capacità d'esercizio^(11,9). Anche l'assunzione in via profilattica del Desametasone da parte di soggetti suscettibili all'edema polmonare da alta quota e con una forte risposta vaso costrittiva all'ipossia, migliora il VO_2 max e riduce la PAP⁽¹⁰⁾.

7) Diminuita richiesta periferica.

Non potendo spiegare il decremento della massima portata cardiaca con gli altri fattori, Peter Wagner ha ipotizzato che l'esposizione all'alta quota potrebbe associarsi a una diminuzione della domanda periferica di Ossigeno⁽³⁶⁾.

CIRCOLAZIONE CORONARICA

L'ipossia è il più energico vasodilatatore coronarico. Lo aveva già osservato Hilton nel 1925⁽¹⁷⁾ ed è stato confermato da studi recenti⁽⁴⁰⁾ e dalla fisiologia molecolare che ha identificato alcuni mediatori, HIF1 e NO. Un aumento del flusso coronarico a riposo compensa il ridotto contenuto di O_2 del sangue. La riserva coronarica, almeno fino a 4.500 m, è conservata. Per altro nell'operazione Everest II non sono stati osservati segni di ischemia miocardica nei volontari portati alla quota simulata della vetta dell'Everest⁽²²⁾.

Dopo circa dieci giorni di esposizione all'alta quota (misurazioni effettuate a 3100 m) il flusso coronarico diminuisce⁽¹³⁾. La cessione di O₂ a livello tissutale probabilmente diventa dipendente più dal contenuto di O₂ del sangue, aumentato per la poliglobulia secondaria, che dal flusso coronarico.

FUNZIONE CARDIACA

Si è visto che la contrattilità cardiaca aumenta acutamente dopo esposizione all'ipossia e la portata sub massimale, spiegata dall'aumento della frequenza cardiaca, può essere mascherata dalla riduzione della gittata sistolica. La gittata diminuisce durante la prima settimana e poi tende a stabilizzarsi. Dopo 21 giorni a 4.300 m gittata e portata sono ridotte del 25% del basale⁽¹⁾.

La caduta della gittata sistolica è associata a riduzione delle dimensioni del ventricolo sinistro e delle pressioni di riempimento, in parte conseguenti ad aumento della diuresi e alla riduzione del volume plasmatico, che diminuisce nelle prime settimane a 4.300 m anche del 20%⁽¹²⁾.

Anche il sovraccarico pressorio cronico del ventricolo destro può giocare un ruolo nel ridurre la gittata sistolica del ventricolo sinistro. Quando il ventricolo destro si dilata in risposta all'aumento delle resistenze vascolari polmonari, il volume diastolico ventricolare sinistro è ridotto. Potrebbe essere alterata la geometria ventricolare sinistra da deviazione del setto verso il ventricolo sinistro con possibile disfunzione diastolica, ma questa nell'ipossia acuta sembra controbilanciata dall'aumento della contrazione atriale⁽²⁾.

In conclusione la funzione ventricolare sinistra e l'apporto di ossigeno al miocardio sono mantenuti in soggetti sani anche durante esercizio massimale alla quota di 7.625 m, quota alla quale la FC massimale è ridotta del 20% e la portata e il VO₂max sono ridotti del 40 - 50%⁽³⁴⁾.

LA PRESSIONE ARTERIOSA SISTEMICA

La pressione arteriosa sistemica in soggetti non ipertesi non cambia o aumenta lievemente dopo esposizione di breve durata all'ipossia⁽³⁵⁾. L'ipossia determina vasodilatazione e possibile diminuzione della pressione arteriosa, ma l'attivazione del sistema nervoso simpatico con vasocostrizione di solito controbilancia l'effetto precedente⁽³⁹⁾. Nei pazienti ipertesi l'effetto ipertensivo della stimolazione simpatica può essere accentuato se è presente disfunzione endoteliale. Per altro la riduzione del volume plasmatico (per secchezza dell'aria ambiente, aumento della ventilazione e perdita di liquidi da sforzo

fisico, aumentata diuresi) può contribuire alla diminuzione della pressione arteriosa. L'uso dei diuretici può esaltare questo aspetto e viene quindi sconsigliato⁽³⁰⁾.

BILIOGRAFIA

1. Alexander JK, Grover RF: *Mechanism of reduced cardiac stroke volume at high altitude*. Clin. Cardiol. 1983; 6: 301-303.
2. Allemann Y, Rotter M, Hutter D, Lipp E, Sartori C, Scherrer U, Seiler C: *Impact of acute hypoxic pulmonary hypertension on LV diastolic function in healthy mountaineers at high altitude*. Am. J. Physiol. 2004; 286: H856-862.
3. Bartsch P, Gibbs SR: *Effect of Altitude on the Heart and the Lungs*. Circulation 2007; 116: 2191-2202.
4. Bogaard HJ, Hopkins SR, Yamaya Y, Niizeki K, Ziegler MG, Wagner PD: *Role of Autonomic Nervous System in the reduced maximal cardiac output at altitude*. J. Appl. Physiol. 2002; 93: 271-279.
5. Boushel R, Calbet JA, Radegran G, Sondergaard H, Wagner PD, Saltin B: *Parasympathetic neural activity accounts for the lowering of exercise heart rate at high altitude*. Circulation. 2001; 104: 1785-1791.
6. Calbet JA, Radegran G, Boushel R, Sondergaard H, Saltin B, Wagner PD: *Plasma volume expansion does not increase cardiac output or VO_2 max in lowlanders acclimatized to altitude*. Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2004; 287: H1214-1224.
7. Cunningham WL, Becker EJm, Kreuzer F: *Catecholamines in plasma and urine at high altitude*. J. Appl. Physiol. 1965; 20: 607-610.
8. Dehnert C, Risse F, Ley S, Kuder TA, Buhmann R, Puderrbach M, Menold E, Mereles D, Kauzior H-U, Bartsch P, Fink C: *Magnetic resonance imaging of uneven pulmonary perfusion in hypoxia in humans*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2006; 174: 1132-1138.
9. Faoro V, Lamotte M, Deboeck G, Pavelescu A, Huez S, Guenard H, Martinot JB, Naeije R: *Effects of sildenafil on exercise capacity in hypoxic normal subjects*. High Alt. Med. Biol. 2007; 8: 155-163.

10. Fischler M, Maggiorini M, Dorschner L, Debrunner J, Bernheim A, Kiencke S, Mairbaurl H, Block K.E, Naeije R, Brunner-La Rocca HP: *Dexamethasone but not Tadalafil improves exercise capacity in adults prone to high-altitude pulmonary edema*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2009; 180: 346-352.
11. Ghofrani HA, Reichenberger F, Kohstall MG, Mrosek EH, Seeger T, Olschewski H, Seeger W, Grimminger F: *Sildenafil increased exercise capacity during hypoxia at low altitudes and at Mount Everest base camp: a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover trial*. Ann. Intern. Med. 2004; 141: 169-177.
12. Grover RF, Bartsch P: *Blood* in Hornbein T.F., Schoene R.B. editors "High altitude: an exploration to human adaptation" New York NY: Marcel Dekker inc; 2001; 161: 493-523.
13. Grover R.F, Lufschanowski R, Alexander JK: *Alterations in the coronary circulation of man following ascent to 3,100 m altitude*. J. Appl. Physiol. 1976; 41: 832-838.
14. Grover RF, Reeves JT, Maher JT, McCullough RE, Cruz JC, Denniston JUC, Cymerman A: *Maintained stroke volume but impaired arterial oxygenation in man at high altitude with supplemental CO₂*. Circ. Res. 1976; 38: 391-396.
15. Groves BM, Reeves JT, Sutton JR, Wagner PD, Cymerman A, Malconian MK, Rock PB, Young PM, Houston CS: *Operation Everest II: elevated high altitude pulmonary resistance unresponsive to oxygen*. J. Appl. Physiol. 1987; 63: 521-530.
16. Hansen J, Sander M: *Sympathetic Neural Overactivity in healthy humans after prolonged exposure to hypobaric hypoxia*. J. Physiol. 2003; 546: 921-929.
17. Hilton R, Eicholtz F: *The influence of some chimica factors on the coronary circulation*. J. Physiol. 1925; 9: 413-425.
18. Hopkins SR, Garg J, Bolar DS, Balouch J, Levin DL: *Pulmonary blood flow heterogeneity during hypoxia and high altitude pulmonary edema*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2005; 171: 83-87.
19. Hultgren HN: *Pathophysiology of High Altitude Pulmonary Edema: the Overperfusion Concept in High altitude Medicine*. Hultgren Publications, Stanford Ca., 1997.
20. Kacimi R, Richalet JP, Corsinh A, Abousahl I, Crozatier B: *Hypoxia – induced down regulation of β -adrenergic responses in rat heart*. J. Appl. Physiol. 1982; 73: 1377-1382.
21. Klausen K: *Cardiac output in man at rest and work during and after acclimatization to 3,800 m*. J. Appl. Physiol. 1967; 22: 1124-1128.
22. Malconian M, Rock P, Hultgren H, Donner H, Cymerman A, Groves B, Reeves J, Alexander J, Sutton J, Nitta M, Houston C: *The electrocardiogram at rest and exercise during a simulated ascent of Mt Everest (Operation Everest II)*: Am. J. Cardiol. 1990; 65: 1475-1480.
23. Mazzeo BS, Brooks GA, Butterfield GE, Podolin DA, Wolfel EE, Reeves JT: *Acclimatization to high altitude increases muscle sympathetic activity both at rest and during exercise*. Am. J. Physiol. 1995; 269: R201-R207.
24. Mosso A: *La fisiologia dell'uomo sulle Alpi Fratelli Treves*. Milano 1897 - pag. 73.
25. Moudgil R, Michelakis ED, Archer SL: *Hypoxic pulmonary vasoconstriction*. J. Appl. Physiol. 2005; 98: 390-403.
26. Naeije R: *Physiological Adaptation of the Cardiovascular System to High Altitude*. Progress. Cardiovasc. Dis. 2010; 52: 456-466.

27. Poulsen TD, Klausen T, Richalet JP, Kanstrup IL, Fogh-Andersen N, Olsen NV: *Plasma volume in acute Hypoxia: comparison of a carbon monoxide rebreathing method and dye dilution with Evan's blue*. Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol. 1998; 77: 457-461.
28. Reeves JT, Groves BM, Sutton JR, Wagner PD, Cymerman Y, Malconian MK, Rock PB, Young PM, Houston CS: *Operation Everest II: preservation of cardiac function at high altitude*. J. Appl. Physiol. 1987; 63: 531-539.
29. Richalet JP, LOarmignat P, Rathat C, Keromes A, Baud P, Lhoste F: *Decreased human cardiac response to isoproterenol infusion in acute and chronic hypoxia*. J. Appl. Physiol. 1988; 65: 1957-1961.
30. Rimoldi SF, Sartori C, Seller C, Delacrétaz C, Mattle HP, Scherrer U, Allemann Y: *High-altitude Exposure in Patients with cardiovascular disease: Risk Assessment and Practical Recommendations*. Prog. Cardiovasc. Dis. 2010; 52: 512-524.
31. Robach P, Déchaux M, Jarrot S, Vaysse J, Schneider JC, Mason NP, Herry JP, Gardette B, Richalet JP: *Operation Everest III: role of plasma expansion on VO_2 max during prolonged high altitude exposure*. J. Appl. Physiol. 2000; 89: 29-37.
32. Sarnquist FH, Schoene RB, Hackett PH, Townes BDI: *Hemodilution of polycythemic mountaineers: effects on exercise and mental function*. Aviat. Space Environm. Med. 1986; 57: 313-317.
33. Suarez J, Alexander JK, Houston CS: *Enhanced left ventricular systolic performance at high altitude during Operation Everest II*. Am. J. Cardiol. 1987; 60: 137-142.
34. Sutton JR, Reeves JT, Wagner PD, Groves BM, Cymerman A, Malconian MK, Rock PB, Young PM, Walter SD, Houston CS: *Operation Everest II: Oxygen transport during exercise at extreme simulated altitude*. J. Appl. Physiol. 1988; 64: 1309-1321.
35. Veglio M, Maule S, Cametti G, Cogo A, Lussiana L, Madrigale G, Pecchio O: *The effects of exposure to moderate altitude on cardiovascular autonomic function in normal subjects*. Clin. Auton. Res. 9: 1999; 123-127.
36. Wagner PD: *Gas Exchange and peripheral diffusion limitation*. Med. Sci. Sports Exerc. 1992; 24: 54-58.
37. Ward JPT, Robertson TP: *The role of the endothelium in hypoxic pulmonary vasoconstriction*. Exp. Physiol. 1995; 80: 793-801.
38. West JB, Colice GL, Lee YL, Namba Y, Kurdak SS, Fu Z, Ou LC, Mathieu-Costello O: *Pathogenesis of high-altitude pulmonary oedema: direct evidence of stress failure of pulmonary capillaries*. Eur. Respir. J. 1995; 8: 523-29.
39. Wolfel EE, Selland MA, Mazzeo RS, Reeves JT: *Systemic hypertension at 4300 m is related to sympathoadrenal activity*. J. Appl. Physiol. 1994; 76: 1643-1650.
40. Wyss CA, Koepfli P, Fretz G, Seebauer M, Schirlo C, Kaufmann PA: *Influence of altitude exposure on coronary flow reserve*. Circulation 2003; 108: 1202-1207.

IL PAZIENTE CARDIOPATICO IN ALTA QUOTA

Enrico Donegani

SCDO di Cardiocirurgia - AOU Maggiore della Carità di Novara
Commissione Centrale Medica del Club Alpino Italiano
Full-member Medical Commission Union International des Associations
d'Alpinisme (International Mountaineering and Climbing Federation)

Key words: *Cardiac diseases / Cardiopatia*
 High-altitude / Alta quota
 Altitude-related diseases / Malattie in alta quota

Abstract:

Because of the development of modern transportation facilities, an ever rising number of individuals including many patients with pre-existing cardiac diseases visit high-altitude locations. High-altitude exposure triggers a series of physiologic responses intended to maintain an adequate tissue oxygenation. Altitude exposure is associated with major changes in cardiovascular function: an increase in cardiac output with tachycardia, no changes in stroke volume, slightly increase in blood pressure, pulmonary pressure increase, decrease in maximal oxygen consumption. Even in normal subjects, there is enormous inter-individual variability in these responses that may be further amplified by environmental factors as cold temperature, low humidity, exercise and stress. These adaptive mechanisms, although generally tolerated by most healthy subjects, may induce major problems in patients with pre-existing cardiovascular diseases in which the functional reserves are already limited. Here, we briefly review how high-altitude adjustments may interfere with and aggravate/decompensate pre-existing cardiovascular diseases. Moreover, we provide practical recommendations on how to investigate and counsel patients with cardiovascular disease desiring to travel to high-altitude locations.

Riassunto:

Grazie allo sviluppo di moderni mezzi di trasporto, un numero sempre più grande di persone raggiunge località in alta quota e fra queste anche soggetti cardiopatici.

L'esposizione all'alta quota causa nell'organismo una serie di risposte fisiologiche atte a mantenere un'adeguata ossigenazione periferica. L'esposizione all'alta quota induce l'aumento della portata cardiaca per la

tachicardia ma senza aumento della gettata sistolica, il modesto aumento della pressione arteriosa, l'aumento della pressione arteriosa polmonare e la riduzione del massimo consumo di ossigeno.

Anche nei soggetti normali esiste un'ampia variabilità di risposta, la quale può essere variamente amplificata dai fattori ambientali tipici dell'alta quota, quali il freddo, la bassa umidità, lo sforzo e lo stress. Questi meccanismi di adattamento, sebbene generalmente ben tollerati nei soggetti normali, possono invece creare grossi problemi in soggetti portatori di cardiopatia, nei quali la riserva funzionale risulta già ridotta.

In questo articolo, brevemente si descrivono come gli adattamenti all'alta quota possano aggravare/scompensare una malattia cardiovascolare pre-esistente. Inoltre, vengono forniti consigli pratici su come indagare i pazienti cardiopatici che desiderano soggiornare in alta montagna.

INTRODUZIONE

Lo sviluppo del turismo, delle infrastrutture e dei mezzi di salita, al giorno d'oggi rendono molto facile l'accesso alle alte quote, divenute ormai un luogo di divertimento, vacanze, ma anche di lavoro, molto popolare, frequentato da milioni di persone non solo sane, ma anche da individui cardiopatici.

D'altra parte è noto come le malattie cardiovascolari rappresentino nel mondo la prima causa di mortalità: il 12% di tutte le morti nel mondo (dati della WHO del 2004) e nei soli USA il 33.6% cioè 1 decesso ogni 3^(2,11).

Uno studio sulla prevalenza delle malattie cardiovascolari condotto nelle Alpi Austriache nel 2007 ha dimostrato che il 12.7% degli alpinisti e l'11.2% degli sciatori erano affetti da ipertensione arteriosa o coronaropatia o aritmie⁽³⁾.

Non sorprende che esista abbondante letteratura sull'argomento, cioè se persone con problemi cardiovascolari possano salire ad alte quote. Ovviamente questa non è una decisione semplice, dipendendo dalla quota che si vuole raggiungere, dalla natura della cardiopatia preesistente e da altri fattori quali l'età e le condizioni generali del soggetto.

La montagna di per sé è pericolosa. Le attività fisiche che tipicamente si eseguono in montagna sono generalmente caratterizzate da sforzi fisici importanti in un ambiente fisico particolare in grado di scatenare nell'organismo umano una serie di risposte fisio-patologiche di adattamento che interessano essenzialmente i sistemi cardiovascolare, respiratorio, neuro-endocrino e renale allo scopo di mantenere una ossigenazione tissutale adeguata.

Tutti questi eventi possono creare seri problemi fisici nel soggetto a rischio⁽¹⁷⁾. L'esatta quota alla quale questi cambiamenti fisio-patologici che interessano il sistema cardiopolmonare avvengono non è costante, ma tipicamente incominciano a manifestarsi oltre i 2500 metri.

L'ALTA QUOTA E LE IMPLICAZIONI FISIOPATOLOGICHE

L'aumento della quota, come noto, è caratterizzato dalla riduzione della pressione barometrica e di conseguenza della pressione parziale dell'ossigeno, e questo è causa di ipossia ipossiémica.

Ma l'ipossia non è la sola variabile ambientale dell'alta quota; infatti bisogna considerare anche il freddo, la bassa umidità, il vento e l'aumento delle radiazioni solari.

Inoltre, in montagna si fanno sforzi, è possibile il brutto tempo, può esserci lo stress (da ansia, paura, fretta) e, infine, molto spesso in montagna ci si trova in zone lontane o, più semplicemente, prive di collegamenti radio o telefonici.

Tutto questo può comportare già grossi problemi per le persone normali, ancora più gravi in un soggetto cardiopatico.

L'esposizione all'ipossia acuta produce numerosi effetti sul sistema cardiovascolare di un individuo normale (Figura 1): prima di tutto un aumento dell'attività nervosa simpatica che induce una vasocostrizione sistemica, l'aumento della frequenza cardiaca e della contrattilità miocardica e quindi un'aumentata richiesta di ossigeno, l'aumento del flusso coronarico, l'iperventilazione e conseguente alcalosi respiratoria, e un'aumentata aggregazione piastrinica. Un secondo importante meccanismo in risposta all'ipossia si realizza a livello del circolo polmonare con una vasocostrizione arteriosa. Infine, mediante un complesso ruolo dei chemiorecettori periferici, l'ipossia agisce direttamente sui vasi periferici con una vasodilatazione che smussa o annulla l'azione simpatica vasocostrittrice^(9,1).

Tutti questi complessi effetti sull'organismo sano, nell'individuo cardiopatico possono risultare variamente alterati (o aumentati o ridotti), potendosi così realizzare situazioni cliniche gravi.

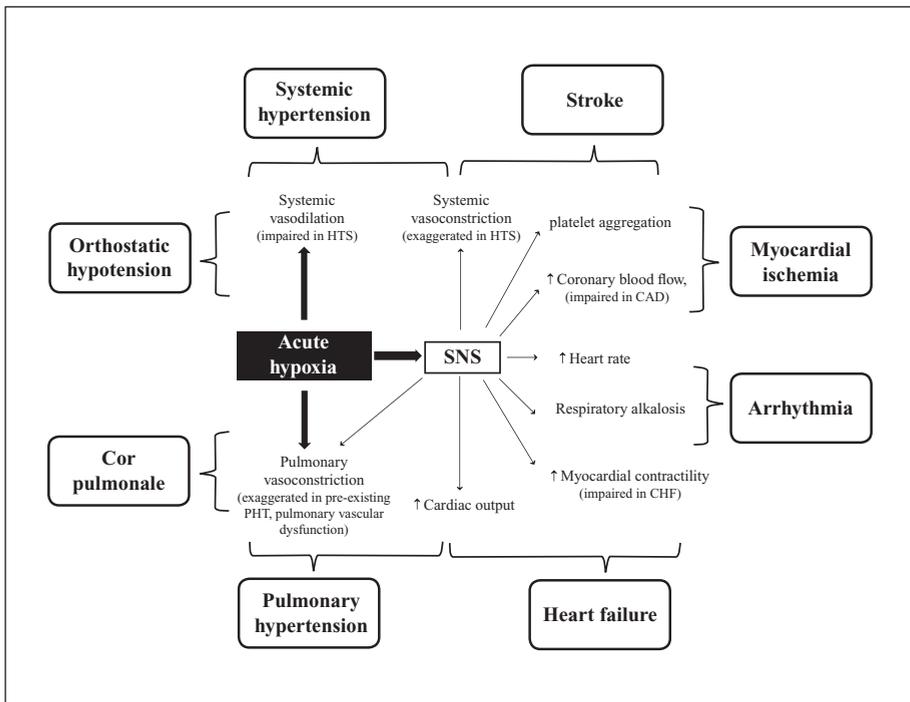


Figura 1. Il complesso insieme di effetti che l'ipossia acuta produce sul sistema cardiovascolare.

Ma esistono anche meccanismi protettivi indotti dall'ipossia, mediante la produzione di una proteina composta da due sub-unità α e β , l'HIF-1, fattore indotto dall'ipossia, il quale induce l'espressione di multipli geni⁽¹²⁾. I prodotti mediati da questi geni sono molti e tra questi:

- l'ossido nitrico sintetasi (NOS) un potente vasodilatatore anche del tono coronarico e inibitore dell'aggregazione piastrinica;
- l'eritropoietina (EPO), che aumenta la capacità del sangue di trasportare l'ossigeno aumentando il numero dei globuli rossi;
- il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) che induce la proliferazione e la migrazione di cellule endoteliali e la formazione di vasi sanguigni, aumentando la vascolarità dei tessuti;
- la proteina-kinasi II calcio-calmodulino-dipendente, (CaMK II) che riduce i livelli del calcio intracellulare, proteggendo il miocita dalla necrosi e dalla morte cellulare.

Non è facile sintetizzare tutti i dati che sono stati prodotti sulla fisiologia del cuore in alta quota. Quello che si può affermare è che non ci sono prove che il cuore normale, anche alle altitudini più estreme, possa limitare l'attività umana e, viceversa, non ci sono prove che a sua volta l'altitudine possa in qualche modo far soffrire il cuore sano.

Semmai i problemi sono stabilire con certezza quando un cuore è sano e quali cuori malati non devono andare in alta quota.

IL CARDIOPATICO IN ALTA QUOTA

Dal punto di vista medico, in base alle numerose esperienze acquisite, attualmente non esiste più il limite degli 800 metri per il cardiopatico. Se il paziente è stabile e ben compensato, il rischio non è significativamente aumentato dall'ipossia fino a 3500 metri.

Ovviamente il soggetto deve adeguare la sua attività alla quota. È molto importante il tipo di attività fisica che si svolge: quella ideale è un tipo di attività aerobica isotonica a livello submassimale con componente essenzialmente muscolare (per esempio il camminare, lo sci da fondo, lo sci alpinismo)⁽¹⁴⁾.

Inoltre è importante valutare la durata, l'intensità e la frequenza dello sforzo fisico. E anche l'aspetto psicologico del soggetto, cioè il modo, la 'grinta', lo stato d'animo con cui si dedica all'attività fisica.

I fattori di rischio per il cardiopatico in alta quota risultano essere, da un punto di vista generale:

- i primi giorni di soggiorno in alta quota
- l'attività fisica non abituale, eccessiva
- l'ansietà, lo stress, la disidratazione e la scarsa assunzione di cibo
- il freddo

Mentre, da un punto di vista fisiopatologico, i parametri cardiocircolatori legati all'esposizione all'alta quota che possono essere fattori di rischio per il cardiopatico sono:

- l'aumento del lavoro cardiaco e della richiesta di ossigeno
- l'alcalosi respiratoria da iperventilazione
- l'aumento delle resistenze vascolari periferiche e l'ipertensione polmonare
- il sovraccarico di pressione per il cuore che ne deriva
- l'inversione dello shunt intracardiaco a livello del forame ovale pervio
- la riduzione della massa circolante da disidratazione
- l'ipopotassiemia dovuta al vomito, alla diarrea o all'uso di diuretici

Si possono sinteticamente elencare le raccomandazioni e controindicazioni generali per i soggetti cardiopatici in alta quota^(7,16):

- a bassa quota, tutti i pazienti devono essere in condizioni cliniche stabili, asintomatici a riposo, in classe funzionale NYHA I o II.
- quando si è in quota, si deve salire lentamente al di sopra dei 2000 metri, meglio dormire ad una quota non superiore a 300 metri rispetto alla quota della notte precedente, evitare l'esercizio eccessivo, evitare la salita diretta con mezzi meccanici a quota superiore a 3000 metri.

Le controindicazioni assolute all'alta quota comprendono⁽¹⁰⁾:

- soggetti con angina instabile o con segni/sintomi di ischemia durante sforzo moderato;
- scompenso cardiaco;
- infarto miocardico o intervento di rivascolarizzazione miocardica o episodio di scompenso cardiaco acuto nei 6 mesi precedenti;
- aritmia atriale o ventricolare non controllata;
- ipertensione arteriosa non controllata;
- ipertensione polmonare grave;

- gravi valvulopatie anche se asintomatiche;
- cardiopatie congenite gravi cianotiche;
- impianto di defibrillatore o scarica di defibrillatore per aritmia ventricolare nei 6 mesi precedenti.

In particolare, considerando brevemente i principali gruppi di cardiopatie, si possono fornire alcuni consigli medici.

Nei soggetti **ipertesi** ben controllati, la terapia non va modificata. Poiché la risposta della pressione all'altitudine è imprevedibile e variabile, i soggetti dovrebbero sapere automisurarsi la pressione e adeguare, se necessario, la terapia⁽⁵⁾.

Nei soggetti con **insufficienza cardiaca**, bisogna fare attenzione all'uso dei diuretici per non peggiorare il quadro di disidratazione⁽⁶⁾.

Nei pazienti con **coronaropatia** stabile la salita in quota è relativamente sicura, anche con una funzione contrattile moderatamente ridotta. L'esposizione prolungata a 2000-2500 metri ha dimostrato di avere effetti favorevoli sulla mortalità. Non ci sono controindicazioni per i pazienti operati di by-pass o sottoposti ad angioplastica, se sono asintomatici a bassa quota^(8,13).

L'attivazione simpatica, l'ischemia ipossica del miocardio, l'ipopotassiemia secondaria all'alcalosi, all'uso di diuretici, da vomito e diarrea possono esporre al rischio di **aritmie** gravi. Una salita rapida può provocare una frequenza cardiaca molto elevata nei soggetti con fibrillazione o flutter atriale⁽¹⁸⁾.

I soggetti portatori di **protesi cardiaca** devono essere in grado di automisurarsi l'INR e sapersi dosare la terapia anticoagulante, poiché l'efficacia del farmaco è alterata dalla quota⁽¹⁵⁾.

Nei pazienti con **cardiopatía congenita** l'esposizione all'alta quota è sconsigliata in caso di ipertensione polmonare⁽⁴⁾.

È utile fornire un breve accenno sull'uso di alcuni farmaci cardiologici, alcuni dei quali utilizzati per la prevenzione o il trattamento del mal di montagna nelle sue varie espressioni^(7,16):

- l'acetazolamide: usato per la profilassi del mal di montagna, aumenta la tossicità dell'aspirina, da utilizzare con attenzione nei soggetti che già assumono diuretici o la digitale, per il rischio di disidratazione e ipopotassiemia,
- la nifedipina: è il farmaco di scelta per la prevenzione e il trattamento dell'edema polmonare da alta quota ma, nel paziente iperteso se associato ad altri ipotensivi, può causare gravi ipotensioni sistemiche,

- i beta-bloccanti: possono limitare la capacità lavorativa, riducendo la frequenza cardiaca e l'iperventilazione. Inoltre interferiscono con i meccanismi di termoregolazione,
- la clonidina: è un farmaco alfa-litico che riduce l'iperventilazione compensatoria,
- gli inibitori della 5-fosfodiesterasi, utilizzati per il trattamento dell'edema polmonare da alta quota, non vanno somministrati nei pazienti coronaropatici che già assumono nitrati,
- il salmeterolo, utilizzato talvolta per la profilassi del mal di montagna, riduce l'attività dei beta-bloccanti,
- l'aspirina può dare emorragie retiniche o gastriche,
- il warfarin ha un funzione ridotta in alta quota.

Infine, di seguito l'elenco delle **raccomandazioni** che il paziente cardiopatico dovrebbe scrupolosamente seguire prima di iniziare la spedizione o di salire in quota^(7,16):

- controllo medico;
- non partire se non si è in buone condizioni;
- essere ben allenati;
- stipulare una buona assicurazione che copra l'eventuale rimpatrio o il trasporto a bassa quota;
- continuare ad assumere regolarmente i farmaci se non ci sono indicazioni diverse da parte del medico;
- discutere con il medico l'eventuali interazioni farmacologiche con i farmaci per il trattamento del mal di montagna;
- portarsi sempre dietro dosi supplementari di farmaci, tenendo le scorte in posti separati;
- viaggiare con compagni o in gruppo;
- avvisare il responsabile del gruppo o i compagni delle proprie condizioni di salute;
- mantenere una alimentazione ed un'idratazione adeguata;
- dedicare un tempo più lungo all'acclimatazione limitando l'attività fisica in questo periodo iniziale;
- se compaiono disturbi, scendere immediatamente a quota più bassa.

RIASSUNTO

Lo sviluppo del turismo, delle infrastrutture e dei mezzi di salita, al giorno d'oggi rendono molto facile l'accesso alle alte quote, divenute ormai un luogo di divertimento, vacanze, ma anche di lavoro, molto popolare, frequentato da milioni di persone non solo sane, ma anche da individui cardiopatici. La domanda che ci si pone è se persone con problemi cardiovascolari possano salire in altitudine, dipendendo dalla quota che si vuole raggiungere, dalla natura della cardiopatia preesistente e da altri fattori quali l'età e le condizioni generali del soggetto.

L'aumento della quota è caratterizzato dalla riduzione della pressione barometrica e di conseguenza della pressione parziale dell'ossigeno, e questo è causa di ipossia ipossiêmica.

Ma in altitudine bisogna considerare anche il freddo, la bassa umidità, il vento e l'aumento delle radiazioni solari. Inoltre, in montagna si fanno sforzi, è possibile il brutto tempo, può esserci lo stress (da ansia, paura, fretta) e, infine, molto spesso in montagna ci si trova in zone lontane prive di collegamenti radio o telefonici.

Dal punto di vista medico non esiste più il limite degli 800 metri per il cardiopatico. Se il paziente è stabile e ben compensato, il rischio non è significativamente aumentato dall'ipossia fino a 3500 metri.

Da un punto di vista fisiopatologico, i parametri cardiocircolatori legati all'esposizione all'alta quota che possono essere fattori di rischio per il cardiopatico sono: l'aumento del lavoro cardiaco e della richiesta di ossigeno; l'alcalosi respiratoria da iperventilazione; l'aumento delle resistenze vascolari periferiche e l'ipertensione polmonare; il sovraccarico di pressione per il cuore che ne deriva; l'inversione dello shunt intracardiaco a livello del forame ovale pervio; la riduzione della massa circolante da disidratazione e l'ipopotassiemia dovuta al vomito, alla diarrea o all'uso di diuretici.

Le controindicazioni assolute all'alta quota comprendono: soggetti con angina instabile o con segni/sintomi di ischemia durante sforzo moderato; scompenso cardiaco; infarto miocardico o intervento di rivascolarizzazione miocardica o episodio di scompenso cardiaco acuto nei 6 mesi precedenti; aritmia atriale o ventricolare non controllata; ipertensione arteriosa non controllata; ipertensione polmonare grave; gravi valvulopatie anche se asintomatiche; cardiopatie congenite gravi cianotiche; impianto di defibrillatore o scarica di defibrillatore per aritmia ventricolare nei 6 mesi precedenti.

Ai soggetti cardiopatici che salgono in alta quota si raccomanda di essere, a bassa quota, in condizioni cliniche stabili, asintomatici a riposo, in classe funzionale NYHA I o II.

Quando si è in quota, salire lentamente al di sopra dei 2000 metri, meglio dormire ad una quota non superiore a 300 metri rispetto alla quota della notte precedente, evitare l'esercizio eccessivo, evitare la salita diretta con mezzi meccanici a quota superiore a 3000 metri.

BIBLIOGRAFIA:

1. Bärtsch P, Gibbs JS: *Effect of altitude on the heart and the lungs*. Circulation. 2007; 116: 2191-2202.
2. *Cardiovascular diseases (CVDs)*. Fact sheet n° 317, www.who.int, January 2011.
3. Faulhaber M, Flatz M, Gatterer H, Schobersberger W, Burtscher M: *Prevalence of cardiovascular diseases among alpine skiers and hikers in the Austrian Alps*. High Alt. Med. Biol. 2007; 28: 245-252.
4. Luks AM: *Can patients with pulmonary hypertension travel to high altitude?* High Alt. Med. Biol. 2009; 10: 215-219.
5. Luks AM: *Should travellers with hypertension adjust their medications when travelling to high altitude?* High. Alt. Med. Biol. 2009; 10: 11-15.
6. Mazzuero G, Imparato A, Mazzuero A, Giannuzzi P: *Left ventricular dysfunction in coronary heart disease at high altitude*. (abstr) High Alt. Med. Biol. 2002; 3: 136.
7. Mieske K, Flaherty G, O'Brien T: *Journeys to high altitude – Risks and recommendations for travellers with pre-existing medical conditions*. J. Travel Med. 2010; 17: 48-62.
8. Morgan BJ, Alexander JK, Nicoli SA, Brammel HL: *The patients with coronary heart disease at altitude: observations during acute exposure to 3100 m*. J. Wilderness Med. 1990; 1: 154-161.
9. Naeije R: *Physiological adaptation of the cardiovascular system to high altitude*. Progr. Cardiovasc. Dis. 52, 456-466, 2010.
10. Ponchia A, Biasin R, Tempesta T, Thiene M, Dalla Volta S: *Cardiovascular risk during physical activity in the mountains*. J. Cardiovasc. Med. 7, 129-135, 2006.
11. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, ASdams RJ, Berry JD, Brown TM et al: *AHA Statistical Update. Heart diseases and stroke statistic. 2011 - Update*. Circulation. 2011; 123: e18-e209.

12. Scherrer U, Allemann Y, Jayet PY, Rexhaj E, Sartori C: *High altitude, a natural research laboratory for the study of cardiovascular physiology and pathophysiology*. *Progr. Cardiovasc. Dis.* 2010; 52: 451-455.
13. Schmid JP, Noveanu M, Gaillet R, Hellige G, Wahl A, Saner H: *Safety and exercise tolerance of acute high altitude exposure (3454 m) among patients with coronary artery disease*. *Heart* 2006; 92: 921-925.
14. Thompson PD, Buchner D, Pina IL.: *Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the Council on clinical cardiology and the Council on nutrition, physical activity and metabolism*. *Circulation* 2003; 17: 3109-3116.
15. Tissot Van Patot MC, Hill AE, Dingmann C, Gaul L, Fralick K, Christians U, Honigman B, Salman MD: *Risk of impaired coagulation in warfarin patients ascending to altitude (> 2400 m)*. *High Alt. Med. Biol.* 2006; 7: 39-46.
16. West JB, Schoene RB, Milledge JS: *Pre-existing medical conditions at altitude*. *High Altitude Medicine and Physiology*. 4th ed. London: Hodder Arnold, 2000; 337-348.
17. Windsor JS, Firth PG, Grocott MP, Rodway GW, Montgomery HE: *Mountain mortality: a review of deaths that occur during recreational activities in the mountains*. *Postgrad. Med. J.* 2009; 85: 316-321.
18. Woods DR, Allen S, Betts TR, Gardiner D, Montgomery H, Morgan JM, Roberts PR: *High altitude arrhythmias*. *Cardiology* 2008; 111: 239-246.

PROBLEMI ETICI PER IL MEDICO, OGGI

Edmondo Comino

Primario Emerito di Radiologia - Ospedale S. Giovanni Bosco - Torino

Key words: *Ethical problems / Problemi etici*
Medicine / Medicina
Doctors / Medici

Abstract:

After a short mention about the origin of bioethics and after recalling that its first aim is to deal with much-discussed problems such as assisted procreation, genetic handling, cell and organ transplant, therapeutic persistence and euthanasia, the Author focuses his attention on some less known and discussed problems which every doctor, daily, confront himself with and for which our Code of Ethics, Bioethics and our own conscience answer primly at times and on other occasions leave deep doubts.

Hence the Author deals with informed acceptance, diagnostic-therapeutic persistence, ethics of scientific knowledge, relationship with industry and use of health resources, submitting –on the base of the limited contributes in the literature about the subject-possible solutions or more in-depth study.

Riassunto:

Dopo un breve cenno sulle origini della bioetica e dopo avere ricordato che essa si occupa oggi principalmente dei più grandi e più discussi problemi quali la riproduzione assistita, la manipolazione genetica, i trapianti di organi e cellule, l'accanimento terapeutico e l'eutanasia, l'Autore si sofferma su alcuni meno noti e dibattuti problemi con i quali si confronta quotidianamente ogni medico e per i quali il nostro Codice Deontologico, la Bioetica e la nostra personale coscienza danno talora precise risposte e talora lasciano dubbi profondi.

L'Autore tratta pertanto di consenso informato, di accanimento diagnostico-terapeutico, di etica della conoscenza scientifica, di rapporti con l'industria e di utilizzazione delle risorse sanitarie, proponendo – sulla base della non abbondante letteratura sull'argomento – soluzioni possibili o suggerendo la necessità di ulteriori approfondimenti.

Oggi più di ieri, da quando cioè, in un lontano passato, il noto Giuramento di Ippocrate aveva posto le basi etiche della professione medica, il medico si incontra quotidianamente con problemi morali di grande profondità e di non facile soluzione, talora sottovalutati o ignorati ma sovente fonte di incertezze, preoccupazioni, angoscia come il compianto Professor Adriano Vitelli, a lungo Presidente dell'Accademia di Medicina di Torino, aveva ripetutamente ricordato nelle Sue parole e nei Suoi scritti.

Anzitutto, una necessaria premessa. L'etica e la morale sono quasi universalmente considerati sinonimi: entrambi i termini designano infatti quella parte della filosofia che si occupa del costume (greco: *etos*; latino: *mos*) ovvero del comportamento umano.

In un senso più ampio l'etica può riguardare qualsiasi forma di comportamento umano (giuridico, politico, religioso...), ma nel senso più stretto è la morale che si occupa essenzialmente della sfera del bene e del male, delle azioni buone o cattive ed è quindi impegnata nella difesa di determinati valori dell'individuo singolo e della società.

Il termine etica fu coniato da Aristotele che così intitolò le sue trattazioni di morale e di politica, ma sorse prima con Socrate che fece in parte cadere la fede nell'esistenza di norme oggettive dettate da un'autorità o imposte da una religione e considerò l'uomo degno di giudicare da solo mediante un'autonoma riflessione sui motivi del suo stesso operare.

Una semplice, singolare definizione di etica è quella riportata da Maurizio Mori nel suo libro "Bioetica": l'etica è quella cosa che ti impedisce di fare molte delle cose che ti piacerebbe fare": È quindi una "cosa", cioè un insieme di norme e di vincoli che si confronta e in parte si sovrappone con altre istituzioni normative quali il diritto, il costume, i regolamenti, le norme associative (Codice Deontologico, Statuti delle Società scientifiche).

La bioetica è considerata una parte dell'etica e può definirsi⁽¹⁸⁾ come "lo studio sistematico della condotta umana nell'ambito delle scienze della vita e della cura della salute, in quanto tale condotta sia esaminata alla luce dei valori e dei principi morali". Il termine fu usato per la prima volta nel 1970 da Van Potter che scrisse un volume dal titolo *Bioethics: bridge to the future*, ma la sua diffusione avvenne nel 1978 con la pubblicazione della *Enciclopedia of Bioethics*. La nascita delle riflessioni bioetiche è però anteriore e può essere fatta risalire al noto Processo di Norimberga dei criminali nazisti quando venne evidenziato il problema centrale di questa disciplina e cioè se quello che è tecnicamente possibile possa e debba essere ritenuto eticamente lecito.

Nel campo delle professioni sanitarie l'etica e la bioetica si sovrappongono in parte alla deontologia, cioè a "quel complesso di norme che regolano i

rapporti del medico con i malati, i colleghi, la società e l'autorità, costituendo un corpo di regole interne di una comunità professionale"⁽⁹⁾.

Il termine, mutuato dalla filosofia, è del 1834 quando Bentham diede alla sua *Science of Morality* il nome appunto di *Deontology*, ma le origini della deontologia sono però antichissime ed i principi essenziali sono riassunti nel celebre (e più volte modificato) Giuramento di Ippocrate. L'evoluzione del costume e della professione sanitaria hanno infatti fatto sì che le regole deontologiche si modificassero e si evolessero nel tempo: in Italia il più recente Codice di Deontologia Medica è del 2006.

In un'ipotetica scala di priorità e di valore per noi medici si trova sul gradino più alto la Costituzione che nel suo Art.32 *tutela la salute come fondamentale diritto dell'individuo e interesse della collettività...*; al disotto vi sono le Leggi dello Stato ed ancora al disotto il Codice Deontologico che non è una legge ma di cui la Giurisprudenza si serve da sempre come guida per la valutazione della responsabilità professionale, civile e penale. L'etica e con essa la bioetica non sono di per se stesse né una legge né una regola, ma una prezioso quanto non sempre ascoltato richiamo ai nostri doveri e alle nostre responsabilità.

Il progresso tecnologico in campo medico ha subito, negli ultimi decenni, accelerazioni importanti quanto inattese con pesanti ricadute sulla vita individuale e collettiva specie a riguardo dell'origine e della conclusione della vita stessa^(4,5,13,16,27,31,34).

La bioetica, con le sue principali riviste italiane e internazionali (Bioetica, Medicina e Morale,...) si occupa oggi essenzialmente di:

- riproduzione assistita,
- manipolazione genetica,
- trapianti di organi e cellule,
- accanimento terapeutico e eutanasia.

Potrebbe quindi sembrare che la medicina di ogni giorno e più ancora la radiologia (chi scrive è un medico radiologo), oggi giustamente chiamata diagnostica per immagini, non sia toccata dai più importanti problemi bioetica; ma è comunque riconosciuto che alcuni problemi, anche se poco dibattuti nella stampa di informazione ed in televisione, toccano da vicino la nostra professione e la nostra coscienza.

In questo breve saggio mi soffermerò brevemente su alcuni argomenti che toccano da vicino non solo la mia specialità radiologica, ma l'intera professione medica.

CONSENSO INFORMATO

Rappresenta *“l’assenso che viene richiesto dal personale sanitario ai singoli pazienti prima di sottoporli ad accertamenti diagnostici o ad atti terapeutici o di coinvolgerli in una sperimentazione”*⁽²²⁾ ed è dallo stesso giustamente considerato *“il fulcro della valutazione della relazione paziente-medico”*. Su di esso il magistrato fonda gran parte delle sue valutazioni di colpa o di dolo nel giudizio sull’operato di noi medici e su tale argomento la letteratura italiana e internazionale è particolarmente ricca di importanti contributi^(2,3,5,11,14,17,21, 25,28,29,35).

Il nostro Codice Deontologico (Art.33) chiarisce il valore ed i limiti dell’informazione e del successivo consenso:

- *il medico deve fornire al paziente la più idonea informazione sulla diagnosi, sulla prognosi...*
- *dovrà comunicare con il soggetto tenendo conto delle sue capacità di comprensione al fine di promuoverne la massima partecipazione alle scelte decisionali...*
- *le informazioni riguardanti prognosi gravi o infauste... devono essere fornite con prudenza... e senza escludere elementi di speranza...*
- *la documentata volontà della persona assistita di non essere informata o di delegare ad altro soggetto l’informazione deve essere rispettata.*

La letteratura e la personale esperienza di noi medici ci ricorda però che accanto alla chiarezza di queste espressioni vi sono ancora problemi etici di non facile soluzione.

La verità al malato

Il Codice Deontologico ne ricorda il preciso dovere e ciò segna il passaggio definitivo dalla medicina paternalistica, ippocratica e poi cristiana della *pietas*, che era portata a nascondere la verità, ad una moderna medicina basata sull’*“alleanza”*⁽³⁵⁾ fra medico e paziente che rende appunto necessaria la verità. Il pericolo consiste però in una sua visione riduttiva, intendendola come semplice informazione e non come una prassi comunicativa che presuppone sempre l’accertamento della volontà del paziente ed un’approfondita riflessione su quante e quali conoscenze possono essergli utili.

Qualità e modalità dell’informazione

È essenziale e comunque di difficile realizzazione un adatto **linguaggio**, senza cedere *“all’insidiosa tentazione di comunicare tra pari, come se si*

trattasse di un collega. Occorre vigilare sempre attentamente, con sensibilità, per non rischiare di imporre più conoscenze di quante siano necessarie, o gradite all'interlocutore"⁽¹⁵⁾.

Come è difficile ma altrettanto doveroso scegliere **quando** informare: non sempre l'immediato è il momento più adatto, quando cioè l'emozione quando non il fastidio o il dolore dell'esame rendono più fragile il paziente. Attendere un poco potrebbe essere utile.

Essenziale è poi che l'informazione contenga con chiarezza le **alternative diagnostico-terapeutiche** legate alla malattia, al suo stato presente, alle diverse possibilità di affinamento diagnostico e di adeguata terapia.

Qualità e modalità del consenso

Dopo l'adeguata informazione viene ovviamente la richiesta di consenso ad ulteriori accertamenti diagnostici e/o all'eventuale terapia. Tale consenso deve essere richiesto, se del caso, con insistenza e sollecitudine evitando però l'inganno di un più facile ottenimento negando o nascondendo i rischi e i disagi che l'intervento diagnostico o terapeutico comporta. Come pure è da evitarsi l'estorcere tale consenso con l'autorità imposta con frasi del tipo "se non accetta non potrò più interessarmi di lei...".

Un problema di grande importanza è poi la modalità del consenso, che un'ormai inveterata tradizione di ispirazione medico-legale fa richiedere per scritto. Quel freddo modulo che vuole di solito comprendere sia l'informazione che il consenso è abitualmente letto distrattamente e frettolosamente firmato da un paziente ansioso e sofferente e, "*nato come strumento di difesa del malato si è trasformato in strumento di garanzia per il medico. È l'eterogenesi dei fini*"⁽³¹⁾ che, consciamente o inconsciamente perseguita, può condurre alla deresponsabilizzazione del medico e avere ricadute negative sulle condizioni stesse del malato (agitazione, depressione) e sulla sua accettazione convinta dell'iter diagnostico-terapeutico.

Esigenze diverse dei pazienti

È evidente che la giovane età, l'età anziana e lo stato di malattia e sofferenza rappresentano sovente "*un inevitabile condizionamento della volontà e quindi una limitazione del potere decisionale e pertanto il consenso o dissenso sul programma procedurale comunicato dal medico non sarà mai libero. Ed è appunto la consapevolezza della sua incompetenza e della sua ridotta capacità di autodeterminazione che induce il paziente sofferente ad affidarsi ad un competente che ispiri fiducia*"⁽³¹⁾.

Sovente ci sentiremo dire “faccia lei, dottore, io preferisco non sapere” e dovremo accettare questo desiderio che è anche un diritto poiché *“è compreso nel diritto all’autodeterminazione il rifiuto di sapere per non essere costretti a decidere in proprio dal momento che l’informazione, in particolare se di segno negativo e quindi nociva all’equilibrio mentale di chi la riceve, non può essere imposta ma fornita soltanto su esplicita richiesta dell’interessato”*⁽¹⁷⁾. Una preziosa raccolta della giurisprudenza a questo proposito è contenuta nel recente saggio di Grassini e Pacifico⁽¹⁹⁾.

ACCANIMENTO DIAGNOSTICO-TERAPEUTICO

I suoi limiti sono definiti dal Codice Deontologico che, all’Art.16 ricorda che *“il medico, anche tenendo conto delle volontà del paziente laddove espresse, deve astenersi dall’ostinazione in trattamenti diagnostici e terapeutici da cui non si possa fondatamente attendere un beneficio per la salute del malato e/o un miglioramento della qualità della vita”*.

Pur limitando la trattazione al solo accanimento diagnostico, più strettamente legato alla professione medica e radiologica, esistono a questo proposito alcuni non facili problemi etici a tutt’oggi ancora oggetto di discussione e di approfondimenti.

Anzitutto, la necessità della certezza diagnostica. È quella che quotidianamente sollecita il nostro orgoglio e la nostra cultura professionale e che ci fa talora richiedere o attuare sempre più sofisticate indagini talora anche fastidiose quando non dolorose o pericolose per il paziente, dimenticando che lo stesso codice deontologico non ne fa menzione ma anzi limita la nostra frequente ostinazione al solo scopo di un beneficio per la salute del malato e/o di un miglioramento della sua qualità di vita.

Quanti esami radiologici, quante endoscopie, quante ago-biopsie in malati inoperabili o non chemio-trattabili quando non in stadio terminale solo per sapere il tipo istologico di una neoplasia o l’esatto punto di partenza di una metastatizzazione diffusa...

Il trattamento soltanto palliativo di una malattia sembra sovente una sconfitta ed è quasi un dolore per noi medici che dimentichiamo come invece sia quanto e soltanto desiderano quelli che più soffrono e che sono più anziani. È l’incerto confine fra accanimento e abbandono, è la *medical futility* della recente letteratura specie tedesca e anglosassone^(6,26,30,36) e la nostra etica ci impone quotidianamente scelte difficili e sempre diverse decidendo con il nostro paziente se e quando è possibile, altrimenti da soli.

Non è infatti accettabile che i familiari decidano al posto del paziente, anche se in condizioni gravi, a quali accertamenti diagnostici ed a quale procedura terapeutica sottoporlo; è invece nostro dovere di medici resistere ad indebite pressioni e a più o meno esplicite minacce (“se non gli fate la TC potrei anche denunciarvi... se non lo operate...”) in piena coscienza e con coraggiosa determinazione.

Sono di grande utilità i poco conosciuti Comitati Etici.

Essi hanno avuto definitiva attuazione in Italia con un DM del 1998, possono avere competenza regionale o limitata a ASL o ad Aziende Ospedaliere ed hanno lo scopo, meglio definito da un nuovo DM del 2006, della

- valutazione dei protocolli di ricerca scientifica,
- valutazione di linee guida diagnostico-terapeutiche,
- consulenza etica in singoli casi clinici.

È soprattutto quest’ultima voce che può talora esserci preziosa, aiutandoci e anche difendendoci in talune difficili e sofferte scelte.

ETICA DELLA CONOSCENZA SCIENTIFICA

Secondo il Codice Deontologico *“il medico ha l’obbligo di mantenersi aggiornato in materia tecnico-scientifica...”*: Articolo 19 che non difetta certamente né di chiarezza né di genericità, ma che è sovente dimenticato dal medico specie da quello più giovane che sovente nasconde con un temerario coraggio la sua ancora incompleta dottrina e la sua ancora scarsa esperienza, come pure da quello più anziano sovente demotivato e restio ad aggiornarsi per allargare e approfondire le sue conoscenze.

È da ricordare a questo punto che la medicina ha oggi due livelli di intervento: l’assistenza e la ricerca di nuovi mezzi diagnostici e terapeutici. Per secoli si è limitata all’assistenza, ma da quando, nel secolo scorso, la medicina si è trovata in quello stato di fermento che si chiama progresso, il lavoro del medico è stato messo a dura prova e la sua stessa figura è cambiata. Viene fatto giustamente osservare⁽²³⁾ che

“negli ultimi decenni, nonostante (o forse per) il tumultuoso e irrefrenabile avanzamento delle scienze biologiche e delle tecnologie, la medicina è diventata una scienza debole che spesso non permette di giungere a conclusioni sicure. Ciò ha portato

- a una perdita di autorevolezza del medico,
- a uno sviluppo eccessivo delle branche specialistiche,

- alla difficoltà ed inadeguatezza del giudizio diagnostico-terapeutico del singolo medico,
- alla necessità di un continuo e diverso approccio scientifico.”

Senza lasciare alcuno spazio alla depressione e/o all’abbandono della professione o anche solo ad un triste e solitario rifugio nella più banale quotidianità, la bioetica offre^(1,7,13,20,24,31,33) alcuni preziosi consigli:

- conoscenza più approfondita delle malattie e dei malati,
- accettazione e miglioramento delle linee-guida,
- minore sudditanza alla tecnologia,
- accettazione e discussione dell’errore,
- accettazione del lavoro di équipe.

Tutti questi punti meritano un breve commento.

La più approfondita conoscenza delle malattie è, secondo i suddetti Autori, legata essenzialmente alla Medicina basata sulle Evidenze (Evidence Based Medicine), cioè a quella straordinaria tecnologia che porta immediatamente al letto del malato i risultati della ricerca scientifica mondiale, più completa di ogni trattato e più aggiornata di qualsiasi rivista, da conoscere e utilizzare sempre con umiltà (dimenticando un poco la nostra esperienza che nasconde sovente approssimazione ed errori) e con un minimo di conoscenza informatica che permetta di “entrare” nelle cliniche e nei laboratori di tutto il mondo per impadronirsi dei più recenti e collaudati metodi di diagnosi e cura.

A proposito del malato, la letteratura anglosassone ricorda argutamente che è nostro dovere di medici l’offrire al malato *clinical, psychological and social confort*. Non è quindi sufficiente il nostro impegno clinico senza un adeguato sostegno psicologico, specie nei pazienti più fragili, ma è talora necessario anche un nostro preciso impegno sociale (senza lasciarlo come è ormai nell’uso alle assistenti sociali) per le loro migliori condizioni di vita o anche solo di sopravvivenza.

Le linee guida, che siamo sempre tenuti a conoscere, migliorare e aggiornare, non devono però essere considerate come uno strumento di difesa che ci evita di assumere responsabilità anche pesanti: il bene del singolo malato può rendere necessarie scelte rischiose e difficili quanto doverose.

Le più moderne tecnologie, ed è sempre un radiologo che scrive, possono sovente portare a trascurare l’anamnesi, a sottovalutare i sintomi riferiti o a non cercare segni talora utilissimi per la diagnosi, ma soprattutto hanno pericolosamente ridotto il tempo del colloquio con il malato, ritenuto inutile,

riducendo ad una fredda formalità la ricerca del consenso e della preziosa “alleanza terapeutica”.

Come aveva in precedenza ricordato Marano, la moderna medicina rende inadeguato il giudizio diagnostico-terapeutico del singolo e rende necessario un costante lavoro di gruppo che va ricercato e quotidianamente perfezionato senza eccessive costrizioni di gerarchia né di esperienza discutendo anche degli inevitabili errori che non vanno mai nascosti né ammessi sottovoce ed in una ristretta cerchia di “sodali” come è nostra inveterata abitudine. È proprio dalla conoscenza e dalla discussione degli errori diagnostico-terapeutici nostri e altrui che si affina appunto l’esperienza e si possono ragionevolmente migliorare le linee guida. Ed è proprio questo che l’etica perentoriamente ci suggerisce.

RAPPORTI CON L’INDUSTRIA

Ne fa cenno il Codice Deontologico (Art. 30) a proposito del conflitto di interesse: *Il Conflitto di interesse riguarda aspetti economici e non, e si può manifestare nella ricerca scientifica, nella formazione e nell’aggiornamento professionale... e nei rapporti individuali e di gruppo con industrie, enti.”*

Si tratta di un argomento scottante e per questo ben poco discusso nei nostri congressi (spesso sponsorizzati quando non organizzati dalle industrie) e nelle nostre riviste, in una situazione che, secondo Cosmacini e Satolli⁽¹⁵⁾, è ormai tragica: *“Ingenti forze economiche spingono a trasformare la salute in una merce e a considerare gli atti medici alla stregua di prodotti che si offrono e si acquistano sul mercato. Un mercato che ha bisogno di gonfiarsi e consolidarsi, estendendo il proprio dominio su tutti gli aspetti della vita.*

Persino la ricerca scientifica, che dovrebbe garantire la propria neutralità come condizione statutaria, è spesso posta in vendita...”

È oggi preoccupante, dal punto di vista etico e sovente anche da quello giuridico, come la morale ormai corrente consideri la maggior parte di noi medici del tutto estranea a questo conflitto, dimenticando che⁽⁸⁾ *“non esiste un livello di soglia oltre il quale si possa parlare di conflitto di interessi, ma esiste un continuum tra un conflitto potenziale che, per la sua modestia non interferisce con il proprio giudizio e un conflitto attuale, economicamente rilevante, che condiziona pesantemente l’operato del professionista.*

Non si può certo costringere il medico a vivere come in una fortezza quotidianamente assediata da soldati nemici (i collaboratori scientifici delle industrie) né a limitare con loro gli incontri talora utilissimi né la talora preziosa offerta di collaborazione nella ricerca applicata, ma esistono e sono ben evidenti alcuni nostri punti deboli che meritano di essere approfonditi.

I regali, il turismo congressuale

Sono l'oggetto più frequente e rischioso del rapporto di noi medici con l'industria, anche se sovente indispensabile o quasi per la nostra cultura professionale (libri, riviste) e per la nostra partecipazione a Congressi e Convegni sovente negata o resa quanto mai difficoltosa dall'Università o dalle Aziende Sanitarie. Non accenno neppure ad altri regali dall'impianto stereo all'automobile che pure fanno parte della storia non sempre esaltante della nostra categoria, né ai viaggi solamente turistici in località amene ma neppure congressuali, magari con la compagnia di moglie e figli...

Gli acquisti

Un rapporto con l'industria è in questi casi obbligatorio se non vogliamo rinunciare alle nostre responsabilità ed al nostro diritto di fare alcune scelte strettamente professionali. Talora però sono le Ditte stesse a suggerire alcuni dettagli determinanti del capitolato d'appalto sfruttando la nostra relativa ignoranza sugli stessi dettagli tecnici ed allora la nostra buona fede può essere messa seriamente in discussione...

L'informazione, la ricerca finalizzata

È un argomento poco considerato ma di grande importanza perché le nostre conoscenze e le nostre esperienze possono e sono talora inquinate da un'informazione non sempre corretta che poco si discosta dalla propaganda. È il caso dei Convegni e dei Simposi organizzati dalle Ditte stesse in cui si parla sempre e soltanto (e bene) dei loro prodotti, è il caso delle ricerche finalizzate sulla validità diagnostica o terapeutica di apparecchiature o di farmaci nelle quali è davvero difficile giungere a provare e soprattutto a comunicare la loro eventuale scarsa efficacia o il trascurabile vantaggio nei confronti di altri venduti ad un prezzo ben minore.

L'etica⁽⁸⁾ ci dà alcuni suggerimenti che possono essere così riassunti:

- *opporsi e fare il proprio dovere,*
- *promuovere e espandere il dibattito sul tema,*
- *realizzare un Codice di Autoregolamentazione,*
- *promuovere la realizzazione di fondi "ciechi",*
- *rendere pubblica la possibilità o la presenza di conflitto,*
- *non stare troppo vicini (Stendhal).*

Il primo punto, bellissimo e romantico, trasformerebbe il medico in un eroe ma è di ben difficile realizzazione nel mondo di oggi; ben più concreti sono invece i successivi.

È invece possibile, e sarebbe certamente auspicabile, un ampio dibattito sul tema, sulle nostre riviste o in occasioni congressuali, ma stranamente (o a maggior prova di un esistente, costante situazione conflittuale più o meno palese?) non è mai stato realizzato e forse neppure proposto dalle nostre Società Scientifiche. E sarebbe auspicabile realizzare in tali occasioni, come è avvenuto per i farmacisti e anche per le Ditte produttrici di farmaci (!), un Codice di Autoregolamentazione che sia un riferimento abituale per noi e per le stesse Società scientifiche (alcune delle quali recentemente lo hanno proposto).

È stata ripetutamente proposta alle Ditte produttrici di farmaci o apparecchiature l'istituzione di fondi "ciechi" con lo scopo di premiare lavori meritevoli o di promuovere partecipazioni congressuali o *stages* in Italia o all'estero per giovani medici anch'essi meritevoli, a giudizio insindacabile delle Società scientifiche: la risposta è stata piuttosto modesta e potrebbe e dovrebbe essere migliorata da una ben maggiore insistenza da parte nostra rifiutando eventualmente altri tipi di sponsorizzazione.

Ci viene ancora utilmente suggerito di rendere pubblica la possibilità o la presenza di conflitto in modo che i colleghi, le Amministrazioni e le Società Scientifiche ne siano preventivamente e chiaramente consapevoli e possano valutare adeguatamente eventuali risultati di ricerche finalizzate.

"Non stare troppo vicini" (all'industria) è mutuato dal noto esempio stendhaliano sulla vita invernale dei porcospini che, nelle loro tane, si avvicinano l'un l'altro per scaldarsi ma sanno però che, se l'abbraccio diventa troppo stretto, possono pungersi!

UTILIZZAZIONE DELLE RISORSE SANITARIE

Si considerano come tali⁽²²⁾ "tutto l'insieme dei mezzi con cui si interviene a garantire o a ripristinare la salute dei cittadini. Fra questi mezzi vanno fatti rientrare non solo il denaro, ma anche le attrezzature, i farmaci, lo stesso tempo di disponibilità del personale sanitario".

Non ne fa cenno il Codice Deontologico, ma la bioetica da anni si fa carico^(12,22,27,31,32) di questo importante problema sottolineando come il principio fondamentale al quale ispirare ogni comportamento debba essere quello dell'equità. Non solo e non tanto come una pericolosa equità senza aggettivi, ma intesa piuttosto come *"la virtù che tende ad accordare le esigenze della giustizia con la varietà delle situazioni soggettive per dare vita ad una giustizia migliore"*⁽³¹⁾.

È un concetto che trova noi medici certamente d'accordo, anche se nella pratica esistono alcuni punti deboli specie a proposito delle cosiddette

“microallocazioni” che riguardano i criteri con cui selezionare i pazienti da sottoporre a trattamenti diagnostici o terapeutici quando il personale e le risorse (cioè le “macroallocazioni” che spettano alle Regioni, alle ASL, ecc) non permettono di far fronte alle esigenze di tutti.

È successo anni fa nell’ASL 33 della Regione Veneto che per la cura farmacologica di una giovane con Morbo di Willebrand fu necessario impegnare più di ¼ del budget regionale per la sanità rinunciando ad altre progettate necessità riguardanti in specie la medicina preventiva: i medici si trincerarono (giustamente?) dietro allo stato di necessità, come forse avrebbe fatto ognuno di noi. All’estero, però, è noto che scelte di questo tipo avvengono in modo diverso.

Rimangono comunque alcune responsabilità tutte nostre che Alessandra Codignola ha sottolineato in un brillante articolo dell’Espresso del 2007 rivolto in particolare ai radiologi:

- lo spreco di attrezzature,
- la loro cattiva utilizzazione,
- il “machismo” radiologico,
- l’incompleta osservanza di leggi (specie la 187/2000),
- le liste d’attesa.

E a quanto sopra si deve certamente aggiungere la cosiddetta “medicina difensiva”, che si verifica, come è stato stabilito a Washington, nel Congresso Internazionale di Medicina del 1994, “quando il medico ordina esami, procedure o visite, o evita pazienti a rischio o procedure ad alto rischio per ridurre la sua possibile esposizione ad un contenzioso legale”.

Senza dilungarmi su ciascuno dei punti sopra ricordati, non posso non ricordare che lo spreco e la cattiva utilizzazione di apparecchiature, locali, farmaci e personale sono sovente alla base di sprechi non lievi; come pure il cosiddetto “machismo” che ci porta a cercare sempre le più sofisticate anche se talora inutili raffinatezze diagnostiche (Risonanza Magnetica, Tomografia a Positroni...) e l’inosservanza frequente della legge 187/2000 che permette allo specialista radiologo di rifiutare richieste di esami non sufficientemente giustificati come di sostituirli con altri con minore dose di radiazioni o anche solo meno costosi.

Una parola a parte meritano le liste d’attesa. Ogni Ministro della sanità e ogni Assessore regionale afferma da molti anni di volerle eliminare o quanto meno ridurre, ma senza alcun risultato apprezzabile. Anche a questo proposito è indispensabile una riflessione etica domandandoci se e in quale misura anche noi medici siamo responsabili di questo.

Vi sono responsabilità dei “prescrittori” che non sempre hanno un aggiornato (e computerizzato!) archivio-pazienti, non sempre conoscono le reali potenzialità degli esami (di laboratorio come di imaging) ed il loro migliore protocollo di utilizzazione, quando non si servono di esami e visite specialistiche solo per tranquillizzare o per guadagnare tempo.

D’altro canto, vi sono da parte di noi “erogatori” responsabilità etiche ben precise^(27,31) quali

- la frequente assenza di analisi dettagliate dei bisogni (nuove malattie e nuove tecnologie),
- l’assenza di una selezione e di un controllo della domanda (urgenza e gravità),
- l’assenza di un serio dibattito, ad ogni livello, su questo problema.

Si potrebbero forse ridurre le liste d’attesa con una migliore utilizzazione di apparecchiature e personale (penso a quanti ecografi fanno ben pochi esami al giorno!), con una più approfondita analisi della domanda e con un migliore indirizzo culturale della stessa (quanto poco si comunica con i medici di base!), con una codifica della domanda sulla falsariga di quanto avviene in Pronto Soccorso (codice di gravità e urgenza); ma soprattutto sarebbe il momento di parlare di questo mai risolto e sempre aggravato problema nelle nostre Società scientifiche e negli incontri con i dirigenti delle A.S.L. e degli Ospedali.

Questi che ho elencato e brevemente commentato sono fra i principali quanto poco discussi problemi etici per il medico, oggi.

Credo fermamente che un maggiore impegno morale da parte nostra debba essere doveroso e possa contribuire non poco alla loro soluzione. Se poi questo saggio stimolerà dibattiti o altri interventi sull’argomento, il suo scopo essenziale sarà pienamente raggiunto.

BIBLIOGRAFIA

1. Armstrong JD: *Morality, Ethics in the Era of Evidence Based Medicine*. A.J.R. 1999; 173: 279-286.
2. Barron JS, Duffey PL, Byrd LJ: *Informed consent in frail older persons*. Aging. Clin. Exp. Res. 2004; 16: 79-85.
3. Bassetto MA, Zuliani S, Cetto GL: *L'informazione alla persona affetta da cancro e alla famiglia*. Medicina e Morale 2005; 55: 1199-1207.
4. Beauchamp TL: *A history of Theory of Informed Consent*. New York Ed. New York, 1986.
5. Beauchamp TL: *Principles of Biomedical Ethics* Oxford Ed. London, 1989.
6. Becker G, Blum HE: *Medical futility: the doctor between the demands for and the limitations of treatment*. Dtsch. Med. Woch. 2004; 123: 694-701.
7. Berlinguer G: *Bioetica quotidiana*. Giunti Ed. Milano 2000.
8. Bobbio M: *Giuro di esercitare la medicina in libertà e indipendenza*. Einaudi Ed. Milano 2004.
9. Cardinale AE: *Bioetica e radiologia: un modello possibile tra necessità e immaginario*. Radiologia Med. 1993; 86: 569-572.
10. Cardinale AE: *Nuova sanità e compatibilità di valori in "Sfera Armillare"*. 196-210, Idelson-Gnocchi Ed. Napoli, 1998.
11. Carrasco De Paula I: *La comunicazione medico-paziente: elementi per una fondazione etica*. Medicina e Morale 2002; 52: 609-704.
12. Caselli L: *Globalizzazione e bene comune*. Ed. Lavoro Roma, 2007.
13. Cattorini P: *Bioetica*. Masson Ed. Milano 1996.
14. CENSIS: *La comunicazione medico-paziente nella società italiana*. Forum Ricerca Biomedica 2007; 3: 1.
15. Cosmacini G, Satolli R: *Lettera a un medico sulla cura degli uomini*. Laterza Ed. Bari 2003.
16. Engelhardt HT: *Manuale di Bioetica*. Guerini Ed. Milano 1994.
17. Ermini M: *Il consenso informato tra teoria e pratica*. Medicina e Morale 2002; 52: 493-502.
18. Fornero G: *Bioetica cattolica e bioetica laica*. Bruno Mondadori Ed. Milano 2005.
19. Grassini E, Pacifico R: *Il consenso informato. Le basi e la pratica*. SE Ed. Torino. 2008.
20. Hollingworth W., Jarvik J.G. *Technology Assessment in Radiology*. Radiology 2007; 244: 31-40.
21. Kondziolka D, Jannetta P: *Improving the patient informed consent process*. Medical News Today 2006; 2: 5-11.
22. Lecaldano E: *Dizionario di bioetica*. Laterza Ed. Bari, 2002.
23. Marano P: *Crisi della Medicina Accademica*. Franco Angeli Ed. Milano, 2006.
24. Marano P: *Ritorno al paziente*. Franco Angeli Ed. Milano, 2010.
25. Marra A: *Il consenso informato*. Osp. Maggiore, Milano 1999; 2: 159-166.

26. Moratti S: *The development of medical futility: towards a procedural approach based on the role of the medical profession*. J. Medical Ethics 2009; 36: 369-372.
27. Mori M: *Bioetica*. Bruno Mondadori Ed. Milano, 2002.
28. Pattinson SD: *Consent and informational responsibility*. J. Medical Ethics 2009; 35: 176-179.
29. Pecora S, Cingolati M: *Evoluzione del processo informativo tra medico e paziente: dall'esigenza contrattual-formalistica a quella umana*. Medicina e Morale 2005; 55: 769-785.
30. Pessina A: *Il malato critico: accanimento o abbandono*. Cultura cattolica italiana. 2004.
31. Piana G: *Bioetica*. Garzanti Ed. Milano, 2002.
32. Picozzi M, Banfi F: *Management ed etica delle risorse in sanità*. Franco Angeli Ed. Milano, 2007.
33. Raymond J, Trop I: *The Practice of Ethics in the Era of Evidence Based Medicine*. Radiology 2007; 244: 643-649.
34. Sgreccia E: *Manuale di Bioetica*. Vita e Pensiero Ed. Milano, 2002.
35. Spinsanti S, Pappalepore V: *Dall'educazione sanitaria al consenso informato*. Mediamix Ed. Milano, 1995.
36. Wreen M: *Medical futility and physician discretion*. Med. Ethics 2004; 30: 275-280.

PATHOPHYSIOLOGY OF HYPOPHOSPHATEMIC SYNDROMES

Roberto Civitelli, Konstantinos Ziambaras

Division of Bone and Mineral Diseases, Department of Internal Medicine
Washington University School of Medicine, Saint Louis

Key words: *Phosphorus homeostasis*
 Rickets
 Klotho
 Osteomalacia
 FGF23

Abstract:

Phosphate, one of the most abundant anions in mammals, is essential to many vital physiological processes, making the maintenance of its homeostasis crucial for survival. A delicate coordinated mechanism involving the intestine, bone, parathyroid gland, and the kidneys maintains serum phosphate concentration within a narrow range. Over the past 10 years, considerable advances have been made in establishing the molecular mechanisms of inherited and acquired causes of hypophosphatemia. The discovery of factors and hormones regulating phosphorus homeostasis has led to the definition of common pathophysiologic mechanisms for X-linked hypophosphatemic rickets and tumor-induced osteomalacia. New autosomal dominant and recessive hypophosphatemic syndromes have been identified. A better understanding of the pathophysiologic mechanism of phosphate disorders should in the future aid in devising appropriate therapeutic approaches.

Disclosure Statement:

R. Civitelli is in the speakers' bureau of Amgen and Novartis, and holds stock of Eli-Lilly, Merck & Co., and Amgen. K. Ziambaras has nothing to disclose.

INTRODUCTION

Phosphorus is essential to many vital physiological processes, including bone mineralization, cell signalling and energy storage in the form of ATP. Therefore, a tight control of plasma phosphate is crucial for survival. Several organs participate in maintaining serum phosphate concentration within a narrow range by facilitating intestinal absorption, bone mineralization and resorption, and renal excretion/reabsorption. Regulation of these processes is driven by several factors, the most important being the active form of vitamin D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) and parathyroid hormone. New players in phosphate homeostasis have been recently identified, and considerable advances have been made in our understanding of the pathogenesis of the various forms of hypophosphatemic rickets thus helping unravel the mechanisms surrounding bone mineralisation, the control of serum phosphorus concentrations and phosphorus homeostasis.

PHYSIOLOGY OF PHOSPHATE HOMEOSTASIS

Eighty five percent of total body phosphate resides in bones, where it associates with calcium; 14% of phosphate is in cells as a component of lipids, proteins, nucleic acids, and small molecules of metabolic and signalling pathways. The remaining 1% of phosphate is in serum and extracellular fluids. Normal serum phosphate concentration is maintained within a range (2.5 - 3.6 mg/dl) to allow an optimal calcium-phosphate ion product, which is essential for normal bone mineralization, while avoiding deposition of calcium-phosphorus mineral in ectopic tissues. Phosphate is relatively abundant in a wide variety of foods making nutritional phosphate deficiency infrequent. The average daily phosphate intake is usually between 800 and 1600 mg. Unlike dietary calcium, ingested phosphate is generally efficiently absorbed (60-80% of dietary phosphate) by the small intestine through two mechanisms, an active, vitamin D dependent process and a passive, concentration-dependent diffusional process. The active transcellular absorption of phosphate occurs predominantly at the ileum⁽¹⁵⁾. This process requires sodium phosphate co-transporters that use the inward sodium gradient established and maintained by the activity of the $\text{Na}^+\text{-Pi -ATPase}$ pump (NTP2b isoform)^(15,21). Passive transport is the major route of phosphate absorption, and this mechanism depends upon the electrochemical gradient between the luminal and vascular sides of the intestinal mucosa.

Serum phosphate homeostasis is largely maintained through the control of renal phosphate reabsorption, and, in a steady state urine phosphate excretion

reflects dietary intake. Very rapidly after phosphate has been withdrawn from the diet, before any measurable fall in blood phosphate occurs, phosphate reabsorption by renal proximal tubules increases. Eighty-five percent of phosphate reabsorption normally takes place almost exclusively in the proximal renal tubule, through a transcellular pathway. The limiting step of this transepithelial transport system is the entry of phosphate at the apical domain of proximal tubular cells, via NTP2a and NTP2c transporters⁽¹⁴⁾.

HORMONAL REGULATION OF PHOSPHORUS HOMEOSTASIS

Renal reabsorption of phosphate is controlled by several hormones, a few of them only recently identified. *Parathyroid hormone* (PTH) is the main regulator of phosphorus homeostasis. It decreases serum phosphate level by increasing urinary phosphate excretion. This action is mediated by down-regulation of NPT2a abundance in the proximal tubule apical membrane. Consequently, the capacity of the proximal tubule to reabsorb phosphate falls in hyperparathyroidism. The phosphate lowering effect of PTH is counteracted by $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, which increases intestinal calcium and phosphate absorption, and – at high concentrations – stimulates phosphate mobilization from bone through increased osteoclast activity. These opposite effects of PTH and $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on the kidney and the intestine keep phosphate levels in balance in normal conditions. However, these hormones are not the only regulators of phosphate homeostasis, and the existence of a “phosphatonin”, had been postulated as the cause of some hypophosphatemic conditions that are not driven by PTH or $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ abnormalities.

Central for understanding phosphorus homeostasis has been the discovery of *fibroblast growth factor-23* (FGF23), a protein predominantly expressed in osteoblasts and osteocytes is now recognized as potent phosphaturic factor⁽¹³⁾. Similar to PTH, FGF23 increases urinary phosphate excretion by down-regulating renal NPT2a and also NPT2c⁽¹⁹⁾. However, unlike PTH, FGF23 inhibits $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ synthesis by down-regulating 1α -hydroxylase expression (*Cyp27b1* gene) and stimulating other hydroxylases that convert calcitriol into inactive forms (for example, *Cyp24*)⁽¹⁷⁾. This effect contributes to the negative phosphate balance by reducing phosphate absorption from the intestine. The physiologic role of FGF23 as hypophosphatemic factor is demonstrated by the development of rickets/osteomalacia in transgenic mice overexpressing *Fgf23*⁽¹⁹⁾, a phenotype similar to patients with most of the hypophosphatemic syndromes described below. By contrast, *Fgf23* null mice have the opposite phenotype, with severe hyperphosphatemia, elevated renal phosphate

reabsorption, low serum PTH and elevated $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ resulting in soft tissue calcifications, growth retardation, and abnormal bone mineralization.

FGF23 synthesis, biologic action and degradation are under the control of factors that because of their role in FGF23 biology can be the cause of hypophosphatemia when their function is abnormal as the consequence of a genetic mutation. One of these factors is *klotho*, which binds to FGFR1, the main receptor for FGF23 in the kidney⁽⁵⁾, thereby increasing the affinity of FGFR1 for FGF23⁽⁹⁾. Disruption of FGF23–*klotho* interaction by inhibitory antibodies, or ablation of the *klotho* gene cause a phenotype similar to that of *Fgf23* knockout mice, except that the plasma FGF23 concentration is markedly increased⁽²³⁾. Such FGF23 resistance phenotype is fully consistent with the role of FGFR1 as the main receptor for FGF23. By contrast, *klotho* overexpressing mice have hypophosphatemia⁽⁶⁾. The first human case of *klotho* deficiency was recently reported in a patient who presented with tumoral calcinosis despite significantly elevated serum levels of FGF23. Genetic analysis confirmed a homozygous missense mutation of *klotho*⁽⁷⁾.

A membrane endopeptidase expressed by bone cells is believed to be involved in FGF23 cleavage and inactivation. This endopeptidase is encoded by the X-chromosome gene *PHEX*⁽²⁰⁾; and loss-of-function mutations of *PHEX* lead to high circulating FGF23⁽²²⁾. However, it is not yet certain whether FGF23 is the substrate for *PHEX*; and intermediate substrates that in turn would control circulating FGF23 levels have been proposed, such as matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE)⁽⁴⁾. Recently, *dental matrix protein-1* (DMP-1), also highly expressed in osteocytes has been shown to suppress FGF23 production directly. DMP1 is a member of the SIBLING family of matrix proteins, which also include osteopontin, bone sialoprotein, dentin sialophosphoprotein, and others⁽¹¹⁾. The major discovery that uncovered this function of DMP-1 was the unexpected finding of an isolated renal phosphate wasting disorder with elevated FGF23 in *Dmp1* null mice, which develop rickets and osteomalacia⁽³⁾. It is also not yet clear whether DMP-1 directly represses *Fgf23* gene transcription, or whether this is an indirect action via intermediate factors.

MECHANISM OF DISEASE IN HYPOPHOSPHATEMIC SYNDROMES

The discovery of FGF23 and its regulatory factors has led to a more precise understanding of the causes of the homeostatic defects in hypophosphatemic syndromes. This review focuses on hypophosphatemic disorders caused by an isolated abnormality of tubular phosphate handling.

Complex renal tubular defects which include other abnormalities in addition to hypophosphatemia, such as Fanconi syndrome, Lowe or Dent disease⁽²⁾, will not be reviewed here. Although caused by different molecular mechanisms, an increased level of circulating FGF23 is a feature common to most if not all the isolated hypophosphatemic syndromes. It should also be noted that increased FGF23 production has also been reported in patients with fibrous dysplasia and some rare neurocutaneous syndromes that may present with hypophosphatemia⁽¹⁶⁾. Excess FGF23 leads to abnormally low tubular phosphate reabsorption relative to the filtered phosphate load, thus resulting in hyperphosphaturia and hypophosphatemia. Also typical in these syndromes, serum 1,25(OH)₂D concentration is “inappropriately low or normal”, as the physiological response to the prevailing hypophosphatemia should be an increase in 1,25(OH)₂D. The abnormally muted 1,25(OH)₂D response to low serum phosphate is most likely due to the inhibitory action of FGF23 on 1 α -hydroxylase in the kidney. These pathophysiologic changes explain the need of administering 1,25(OH)₂D to these patients, in addition to a high phosphorus diet, to rise their serum phosphorus levels; and the failure of plain vitamin D to correct the hypophosphatemia in more severe cases.

X-LINKED HYPOPHOSPHATEMIA (XLH)

XLH is caused by inactivating mutations of *PHEX*, which result in increased circulating concentrations of FGF23 and resultant phosphaturia⁽²²⁾. Although FGF23 concentrations are not invariably increased in XLH, an inverse relationship between FGF23 and the degree of hypophosphatemia has been found⁽²⁴⁾. A large number of *PHEX* mutations has been reported in XLH, without predominance of a single mutation⁽⁸⁾. The pathophysiology of XLH is accurately reproduced in the Hyp mice, which harbour *Phex* mutation and exhibit high FGF23 expression in the bone, elevated serum FGF23 levels, hypophosphatemia, and impaired bone mineralization⁽¹⁰⁾. Aside the hypophosphatemia and increased urinary phosphate excretion, typical laboratory findings include elevated alkaline phosphatase, inappropriately normal and normal or slightly elevated serum PTH levels. Radiological findings are characteristic of rickets. Early treatment with calcitriol and high phosphate intake can prevent the development of rachitic deformities and bowing of long bones and restore normal growth. Doses of calcitriol should be adjusted to avoid hypercalciuria and hypercalcemia, as well as limit the stimulatory effect of 1,25(OH)₂D on FGF23, which may lead to a vicious cycle of increasing

need of phosphate supplements, in turn worsening the hyperparathyroidism and lead to ectopic calcifications (nephrocalcinosis).

AUTOSOMAL DOMINANT HYPOPHOSPHATEMIC RICKETS (ADHR)

ADHR is a rare cause of hypophosphatemic rickets and was the first disease to be associated with FGF23 abnormalities. The mutations described in this condition are clustered around a protease cleavage site, which result in the mutant FGF23 being resistant to cleavage. Although the protease that inactivates FGF23 remains to be identified, it is known that it cleaves FGF23 at the 176RXXR179 motif^(25,1). Consequently, the mutant FGF23 has a longer circulating half-life⁽¹⁾, resulting in elevated FGF23 levels and hypophosphatemia in ADHR. As typical in these syndromes, ADHR patients exhibit hyperphosphaturia, hypophosphatemia, and clinical features of rickets. Serum calcitriol concentration is typically normal.

AUTOSOMAL RECESSIVE HYPOPHOSPHATEMIC RICKETS (ARHR)

ARHR is also a rare hypophosphatemic disorder, inherited in a recessive fashion, and it is caused by loss-of-function mutations of *DMP1*^(11,3). Although serum FGF23 concentration is markedly increased in *DMP1* knockout mice, this increase is not always associated with autosomal recessive hypophosphatemia in humans. Since this disorder is so rare, not much information about specific clinical features is available.

HEREDITARY HYPOPHOSPHATEMIC RICKETS WITH HYPERCALCIURIA (HHRH)

HHRH is a recessive disorder caused by recently identified mutations of *SLC34A*, the gene encoding for NTP2c⁽¹²⁾. The condition can be readily differentiated from other forms of rickets associated with renal phosphate wasting, as the disease is associated with hypercalciuria and elevated 1,25(OH)₂D concentrations. Unlike the other forms of hypophosphatemic rickets described above, HHRH is the only one caused by a primary defect in phosphate transport across the renal tubular cells. Thus, the homeostatic responses to the resultant hypophosphatemia lead to a rise in serum 1,25(OH)₂D, and this in turn causes hypercalciuria and suppression of PTH. It is important that a correct diagnosis is made, as in this condition phosphate supplementation alone results in a correction of the biochemical perturbations, without need of calcitriol, as the 1,25(OH)₂D concentrations are already elevated in HHRH.

TUMOR-INDUCED OSTEOMALACIA (TIO)

TIO, or oncogenic osteomalacia, is a paraneoplastic syndrome, typically caused by small tumours of mesenchymal origin (generally diagnosed as haemangiopericytomas or non-ossifying fibromas). The majority of these tumours is small and benign and may be found anywhere in soft tissue or bone, which make detection very difficult. TIO leads to overt and sometimes severe osteomalacia; more rarely rickets when occurring in children. Some clinical features differentiate this condition from the other hypophosphataemic syndromes, primarily severe muscle weakness, and suppressed $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ concentrations. Moreover, TIO occurs more frequently in adults, and patients frequently present with stress fractures and more severe bone pain than that in XLH. Elevations of serum alkaline phosphatase activity are typical, and the severity of this abnormality can exceed that seen in XLH, underscoring the severity of osteomalacia. Serum levels of parathyroid hormone can vary but most frequently they are normal. Tumor production of FGF23 is the cause of the syndrome in most but not all patients with TIO, and other factors have been found in some cases, including MEPE and frizzled related protein-4^(26,18). Removal of the tumour results in a rapid decline in FGF23 concentrations and a restoration of normal biochemistry and healing of the osteomalacia/rickets.

REFERENCES

1. Bai XY, Miao D, Goltzman D, Karaplis AC.: *The autosomal dominant hypophosphatemic rickets R176Q mutation in fibroblast growth factor 23 resists proteolytic cleavage and enhances in vivo biological potency.* J. Biol. Chem. 2003; 278: 9843-9849.
2. Cho HY, Lee BH, Choi HJ, Ha IS, Choi Y, Cheong HI: *Renal manifestations of Dent disease and Lowe syndrome.* Pediatr. Nephrol. 2008; 23: 243-249.
3. Feng JQ, Ward LM, Liu S, Lu Y, Xie Y, Yuan B, Yu X, Rauch F, Davis SI, Zhang S, Rios H, Drezner MK, Quarles LD, Bonewald LF, White KE: *Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism.* Nat. Genet. 2006; 38: 1310-1315.
4. Garabedian M: *Regulation of phosphate homeostasis in infants, children, and adolescents, and the role of phosphatonins in this process.* Curr. Opin. Pediatr. 2007; 19: 488-491.
5. Gattineni J, Bates C, Twombly K, Dwarakanath V, Robinson ML, Goetz R, Mohammadi M, Baum M: *FGF23 decreases renal NaPi-2a and NaPi-2c expression and induces hypophosphatemia in vivo predominantly via FGF receptor 1.* Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 2009; 297: F282-F291.
6. Hu MC, Shi M, Zhang J, Pastor J, Nakatani T, Lanske B, Razzaque MS, Rosenblatt KP, Baum MG, Kuro-o M, Moe OW: *Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule.* FASEB J. 2010; 24 (9): 3438-3450.
7. Ichikawa S, Imel EA, Kreiter ML, Yu X, Mackenzie DS, Sorenson AH, Goetz R, Mohammadi M, White KE, Econs MJ: *A homozygous missense mutation in human KLOTHO causes severe tumoral calcinosis.* J. Clin. Invest. 2007; 117: 2684-2691.
8. Ichikawa S, Traxler AS, Estwick SA, Curry LR, Johnson ML, Sorenson AH, Imel EA, Econs MJ: *Mutational Survey of the PHEX Gene in Patients with X-linked Hypophosphatemic Rickets.* Bone. 2008; 43 (3): 663-666.
9. Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Baum MG, Schiavi S, Hu MC, Moe OW, Kuro-o M: *Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho.* J. Biol. Chem. 2006; 281 (10): 6120-6123.
10. Liu S, Zhou J, Tang W, Jiang X, Rowe DW, Quarles LD: *Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice.* Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2006; 291: E38-E49.
11. Lorenz-Depiereux B, Bastepé M, Benet-Pages A, Amyere M, Wagenstaller J, Müller-Barth U, Badenhop K, Kaiser SM, Rittmaster RS, Shlossberg AH, Olivares JL, Loris C, Ramos FJ, Glorieux F, Vikkula M, Juppner H, Strom TM: *DMP1 mutations in autosomal recessive hypophosphatemia implicate a bone matrix protein in the regulation of phosphate homeostasis.* Nat. Genet. 2006; 38: 1248-1250.
12. Lorenz-Depiereux B, Benet-Pages A, Eckstein G, Tenenbaum-Rakover Y, Wagenstaller J, Tiosano D, Gershoni-Baruch R, Albers N, Lichtner P, Schnabel D, Hochberg Z, Strom TM: *Hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria is caused by mutations in the sodium-phosphate cotransporter gene SLC34A3.* Am. J. Hum. Genet. 2006; 78: 193-201.
13. Mirams M, Robinson BG, Mason RS, Nelson AE: *Bone as a source of FGF23: regulation by phosphate?* Bone. 2004; 35: 1192-1199.
14. Murer H, Hernando N, Forster I, Biber J: *Proximal tubular phosphate reabsorption: molecular mechanisms.* Physiol. Rev. 2000; 80: 1373-1409.

15. Radanovic T, Wagner CA, Murer H, Biber J: *Regulation of intestinal phosphate transport. I. Segmental expression and adaptation to low-Pi diet of the type IIb Na⁺-Pi cotransporter in mouse small intestine.* Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2005; 288: G496-500.
16. Riminucci M, Collins MT, Fedarko NS, Cherman N, Corsi A, White KE, Waguespack S, Gupta A, Hannon T, Econs MJ, Bianco P, Gehron Robey P: *FGF-23 in fibrous dysplasia of bone and its relationship to renal phosphate wasting.* J. Clin. Invest. 2003; 112: 683-692.
17. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Fukumoto S, Yamashita T: *FGF23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis.* J. Bone Miner. Res. 2004; 19: 429-435.
18. Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T: *Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumorinduced osteomalacia.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001; 98: 6500-6505.
19. Shimada T, Urakawa I, Yamazaki Y, Hasegawa H, Hino R, Yoneya T, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T: *FGF23 transgenic mice demonstrate hypophosphatemic rickets with reduced expression of sodium phosphate cotransporter type IIa.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004; 314: 409-414.
20. The HYP Consortium: *A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets.* The HYP Consortium. Nat Genet. 1995; 11: 130-136.
21. Xu H, Bai L, Collins JF, Ghishan FK: *Molecular cloning, functional characterization, tissue distribution and chromosomal localization of a human, small intestinal sodium-phosphate (Na⁺-Pi) transporter (SLC34A2).* Genomics. 1999; 62 (2): 281-284.
22. Yamazaki Y, Okazaki R, Shibata M, Hasegawa Y, Satoh K, Tajima T, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Yamashita T, Fukumoto S: *Increased circulatory level of biologically active full-length FGF-23 in patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia.* J. Clin. Endocrinol. Metab. 2002; 87: 4957-4960.
23. Yamazaki Y, Tamada T, Kasai N, Urakawa I, Aono Y, Hasegawa H, Fujita T, Kuroki R, Yamashita T, Fukumoto S, Shimada T: *Anti-FGF23 neutralizing antibodies show the physiological role and structural features of FGF23.* J. Bone Miner. Res. 2008; 23: 1509-1518.
24. Weber TJ, Liu S, Indridason OS, Quarles LD: *Serum FGF23 levels in normal and disordered phosphorus homeostasis.* J. Bone Miner. Res. 2003; 18: 1227-1234.
25. White KE, Carn G, Lorenz-Depiereux B, Benet-Pages A, Strom TM, Econs MJ: *Autosomal-dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) mutations stabilize FGF-23.* Kidney Int. 2001; 60: 2079-2086.
26. White KE, Larsson TE, Econs MJ: *The roles of specific genes implicated as circulating factors involved in normal and disordered phosphate homeostasis: frizzled related protein-4, matrix extracellular phosphoglycoprotein, and fibroblast growth factor 23.* Endocr. Rev. 2006; 27: 221-241.

RICHTER SYNDROME: FROM MOLECULAR GENETICS TO THERAPEUTIC STRATEGIES

*Marco Fangazio¹, Silvia Rasi¹, Valeria Spina¹,
Alessio Brusca¹, Stefania Cresta¹, Clara Deambrogi¹,
Sara Monti¹, Lorenzo De Paoli¹, Laura Pasqualucci²,
Riccardo Dalla-Favera², Davide Rossi¹, Gianluca Gaidano¹*

¹ Division of Hematology - Department of Clinical and Experimental Medicine
Amedeo Avogadro University of Eastern Piedmont - Novara - Italy

² Institute for Cancer Genetics - Columbia University - New York - USA

Key words: *Richter syndrome / Sindrome di Richter*
Chronic lymphocytic leukemia / Leucemia linfatica cronica
Diffuse large B-cell / Linfoma diffuso
lymphoma a grandi cellule B
Prognostic stratification / Stratificazione prognostica
NOTCH1 / NOTCH1

Abstract:

Transformation of chronic lymphocytic leukemia (CLL) to diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is known as Richter syndrome (RS). In the CLL population considered as a whole, the cumulative prevalence of RS development steadily increases at a rate of 1% per year. Considering conventional prognosticators of CLL, patient subgroups at high risk of RS development are characterized by: *i*) expression of CD38; *ii*) absence of del13q14; and *iii*) lymph node size ≥ 3 cm. Novel risk factors for predicting RS development at CLL diagnosis have been recently identified, and include: *i*) host genotype of the *CD38* and *LRP4* loci; *ii*) telomere length of CLL cells; *iii*) stereotyped B cell receptor; and *iv*) usage of specific immunoglobulin variable genes (*IGHV4-39*). Importantly, although some risk factors predict both CLL progression and transformation to RS, other (*CD38* genotype, absence of del13q14; *IGHV4-39* usage; stereotyped B cell receptor) specifically predict RS. The definition of RS encompasses at least two different conditions: *i*) DLBCL that are clonally related to the pre-existing CLL, accounting for most cases; *ii*) DLBCL unrelated to the CLL clone. The transition from CLL to clonally related RS is accompanied by acquisition of novel genetic alterations, that might account for the chemorefractoriness of RS. These include *TP53* disruption by mutation and/or deletion, *c-MYC* activation by chromosomal translocation or amplification, and *NOTCH1* gain-of-function mutations that have been recently revealed by genome wide sequencing studies.

Among molecular lesions implicated in RS, some (e.g. *NOTCH1*) might represent a suitable target for future therapeutic strategies. Once that transformation has occurred, RS prognosis may be predicted by integrating the genetic features of the RS clone with the clinical RS score, based on performance status, LDH, platelet count, tumour size and number of prior therapies. Depending on patient's age and RS score, the therapeutic options for RS may range from conventional immunochemotherapy to allogeneic bone marrow transplantation.

Riassunto:

La trasformazione da leucemia linfatica cronica (LLC) a linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) è nota come sindrome di Richter (RS). Nella popolazione globale di LLC, la prevalenza cumulativa di sviluppo di RS incrementa stabilmente con un tasso annuo pari a 1%. Considerando i markers prognostici convenzionali di LLC, i pazienti ad alto rischio di sviluppare RS sono caratterizzati da: *i*) espressione di CD38; *ii*) assenza di del13q14; e *iii*) linfadenopatia con diametro ≥ 3 cm. Recentemente sono stati identificati nuovi fattori di rischio per predire lo sviluppo di RS già alla diagnosi di LCC; essi includono: *i*) il genotipo dell'ospite dei geni *CD38* e *LRP4*; *ii*) la lunghezza del telomero delle cellule di LLC; *iii*) la presenza di B cell receptor stereotipato; e *iv*) l'utilizzo di specifici geni variabili delle immunoglobuline (*IGHV4-39*). Sebbene alcuni fattori di rischio predicano sia la progressione della LLC sia la trasformazione a RS, altri (genotipo di *CD38*, assenza di del13q14; utilizzo di *IGHV4-39*; B cell receptor stereotipato) predicano specificamente RS. La definizione di RS comprende almeno due condizioni differenti: *i*) DLBCL clonalmente correlati alla LLC pre-esistente, che rappresentano la maggior parte dei casi; *ii*) DLBCL non clonalmente correlati al clone LLC. La transizione da LLC a RS clonalmente correlata si accompagna alla acquisizione di nuove alterazioni genetiche, che possono spiegare la chemiorefrattarietà della RS. Queste includono la inattivazione di *TP53* mediante mutazione e/o delezione, la attivazione di *MYC* per traslocazione cromosomica o amplificazione, e le mutazioni "gain-of-function" di *NOTCH1* che sono state recentemente rivelate da studi di genomica. Tra le lesioni molecolari implicate in RS, alcune (e.g. *NOTCH1*) possono rappresentare un adeguato bersaglio per future strategie terapeutiche. Una volta avvenuta la trasformazione, la prognosi di RS può essere predetta integrando le caratteristiche genetiche del clone RS con il cosiddetto "RS clinical score", basato su performance status, LDH, conta piastrinica, dimensione della massa tumorale e numero di terapie pregresse. In base all'età del paziente ed allo RS score, le opzioni terapeutiche per RS possono variare dalla immunochemioterapia convenzionale al trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche.

DEFINITION OF RICHTER SYNDROME

Over time, a fraction of chronic lymphocytic leukemia (CLL) develop Richter syndrome (RS), representing the clinico-pathologic transformation of CLL to an aggressive lymphoma, most commonly diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)^(16,36,40). Histologic documentation is mandatory for diagnosing RS, that otherwise can only be clinically suspected, but not proven. The clinical definition of RS maintains a certain degree of heterogeneity, and may be molecularly distinguished into at least two biologically different entities:

- i) transformation of CLL to a clonally related DLBCL;
- ii) development of a DLBCL that is unrelated to the CLL clone^(16,18,38,40,44,53).

Transformation of CLL to a clonally related DLBCL is by large the most frequent of the two conditions, accounting for approximately 80-90% of all RS cases^(6,26,27,28,44,48,52). In clonally related RS, the pathogenetic link between CLL and the emerging DLBCL clone is apparently obvious, and is substantiated by gain of novel molecular lesions at a certain time point of the natural history of the CLL clone. On the other hand, the mechanisms underlying the development of a DLBCL clonally unrelated to CLL cells are not fully understood, and may be related to the increased risk of CLL patients of developing a second lymphoid malignancy⁽²⁵⁾. With the advent of novel immunotherapies for CLL, and especially after the introduction of alemtuzumab, occasional CLL patients have been reported to develop clinically aggressive lymphomas characterized by Epstein-Barr virus (EBV) infection^(22,29). These cases of alemtuzumab-associated aggressive lymphomas are clinically and biologically distinct from RS, and should be considered as a novel type of immunodeficiency-related lymphoma developing after T-cell depleting therapies in patients already immunocompromised because of the underlying disease and/or because of previous chemotherapy.

PATHOLOGY OF RICHTER SYNDROME

Classically, RS is pathologically represented by DLBCL^(44,50). The disease involves most frequently the lymph nodes, but extra-nodal localizations are also not uncommon^(1,30,31,32,35,44,50). In some patients, transformation from CLL to RS does not occur simultaneously at all sites, but, at a certain time point, might be restricted to one single lesion, either nodal or extra-nodal. From a practical standpoint, this knowledge mandates that any biopsy aimed at exploring whether RS has occurred should be directed at the index lesion, i.e.

the lesion displaying the largest diameter by imaging. The PET characteristics of the lesion, in particular the standardized uptake value (SUV), may also guide the choice of the site to be biopsied, since sites affected by RS are expected to have SUVs overlapping those of *de novo* DLBCL⁽⁴⁾. Based on the Hans classifier of *de novo* DLBCL, approximately 90% of RS belong to the post-germinal center phenotype^(19,44). The proportion of RS with a post-germinal center phenotype differs substantially from that detected in *de novo* DLBCL⁽⁴⁴⁾. CD20 is generally expressed by RS cells, and represents an important target for immunotherapy with anti-CD20 monoclonal antibodies, including rituximab.

CLINICAL EPIDEMIOLOGY OF RICHTER SYNDROME

Since RS diagnosis requires pathological assessment, heterogeneity in biopsy policies among institutions represents a substantial factor influencing the incidence of RS observed in different CLL series^(16,40). The hematologist's perception of RS as a rare complication of CLL may be due, at least in part, to under-recognition of RS in the current clinical practice. We reported on the incidence of RS in a consecutive series of CLL who, according to our institution policy, homogeneously underwent biopsy of the index lesion during CLL follow-up or at CLL diagnosis^(16,38,40). The strict application of these homogeneous criteria to a consecutive CLL series revealed that the cumulative incidence of RS at 5 and 10 years exceeds 10% and 15%, respectively. RS is generally regarded as a very late event in the clinical history of CLL. Data from consecutive series, however, document that a significant fraction of RS cases may occur relatively early after CLL diagnosis^(16,38,40). In some cases, the diagnosis of RS and CLL are concomitant. In one recent study, median time to RS transformation was 23.0 months from CLL diagnosis^(16 38 40). Also, RS was not observed after 82.4 months of follow-up, and the rate of transformation remained at 16.2% from that timepoint onward. Data from this and other series suggest that, in a fraction of patients, predisposition to RS transformation may be related to biological characteristics that are intrinsic to the CLL clone already at the time of CLL diagnosis. Novel molecular data support this hypothesis and document that cells with the molecular characteristics of the RS clone that will subsequently develop are already identifiable at the time of CLL diagnosis⁽⁴⁵⁾. This notion prompts the need of the early identification of CLL patients who are at risk of subsequent RS development.

MOLECULAR AND CLINICAL PREDICTORS OF RICHTER SYNDROME DEVELOPMENT

Early recognition of RS may be clinically useful in order to avoid the exposure of patients to multiple lines of therapy that, being targeted to CLL progression, are of little efficacy on the transformed clone^(40,54). This notion prompts the need for a close monitoring of CLL patients harboring clinical and/or biological risk factors of RS development. Recent advancements in the field have disclosed a number of risk factors, both clinical and biological, that might be helpful for RS prediction^(5,13,38,41,42,43,46). Several of the predictors identified to date are specific for CLL transformation to RS, and are not related to other markers predicting CLL clinical progression, documenting that RS transformation and CLL progression without histological transformation are distinct events both clinically and biologically (Figure 1 and Table I). Of the

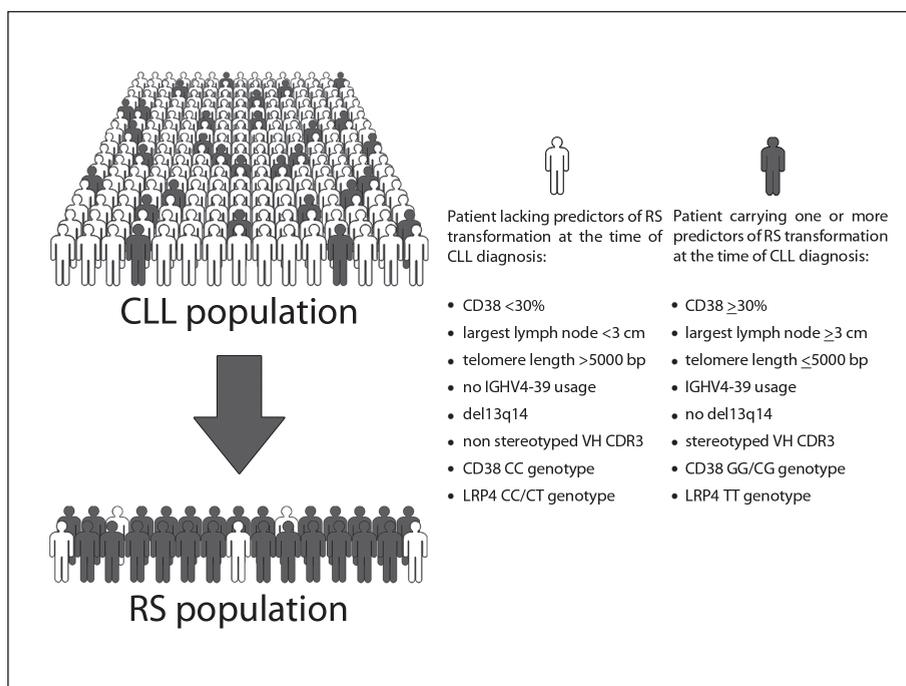


Figure 1. Clinical and molecular risk factors that, at the time of CLL diagnosis, predict RS transformation. At the time of CLL diagnosis, several risk factors predict an increased risk of RS transformation, including: expression of CD38, lymph node size, telomere length, absence of del13q14, immunogenetic features of the CLL clone, GG/CG genotypes of the CD38 rs6449182 SNP, and TT genotype of the LRP4 rs2306029 SNP.

	Progression	Transformation
Biological features at diagnosis		
Telomere length	Yes	Yes
CD38 \geq 30%	Yes	Yes
del17p13	Yes	No
del11q22-q23	Yes	No
<i>IGHV</i> homology \geq 98%	Yes	No
Absence of del13q14	No	Yes
<i>IGHV4-39</i> usage	No	Yes
Stereotyped VH CDR3	No	Yes
<i>CD38</i> genotype	No	Yes
<i>LRP4</i> genotype	No	Yes
Clinical features at diagnosis		
Largest node \geq 3 cm	Yes	Yes
Rai stage III-IV	Yes	No
Splenomegaly	Yes	No

Table I. Predictors of CLL progression and/or of RS transformation at the time of CLL diagnosis. See refs. (3,28,29,50,51).

biological risk factors that have been tested, the following have been scored as independent predictors of RS development^(5,13,38,41,42,43,46):

- i) absence of del13q14;
- ii) usage of specific immunoglobulin heavy chain variable genes, namely *IGHV4-39*;
- iii) usage of a stereotyped B cell receptor (BCR);
- iv) expression of CD38 (Figure. 2);
- v) genetic background of the host;
- vi) telomere length.

Among clinical predictors, lymph node size \geq 3 cm, a parameter of solid disease, was the sole clinical risk factor of RS selected by two models of

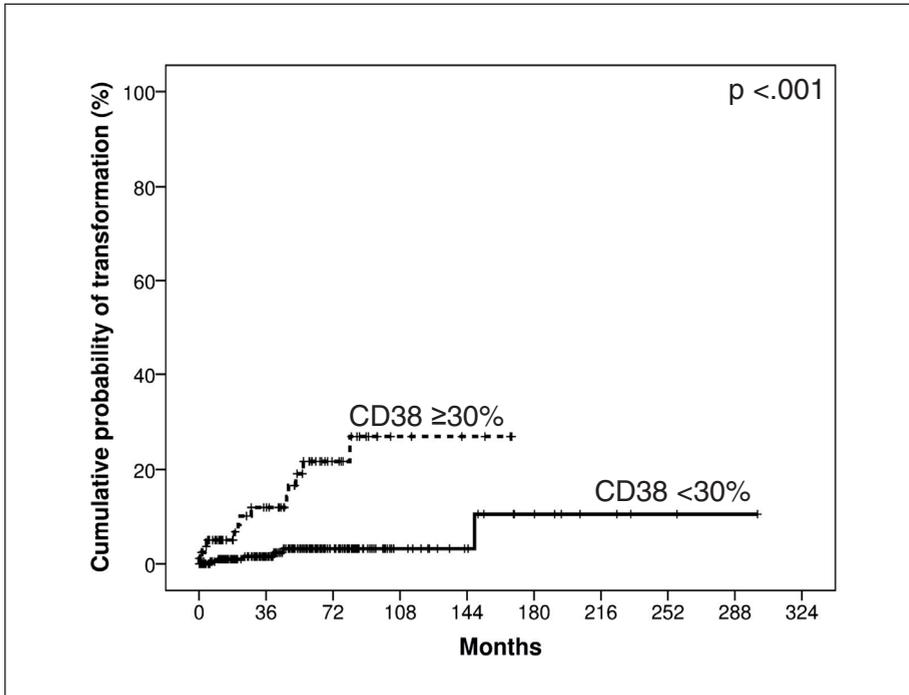


Figure 2. **Prediction of RS transformation according to CD38 expression at CLL diagnosis.** Kaplan-Meier curves showing the value of CD38 in predicting RS transformation in the CLL series ($n = 360$) from the Division of Hematology of the Amedeo Avogadro University of Eastern Piedmont (years 2000-2010).

multivariate analysis⁽³⁸⁾. Conversely, parameters of leukemic disease, namely lymphocyte count, advanced Rai stage, splenomegaly, and percentage and pattern of bone marrow involvement, were not scored as independent clinical risk factors of RS. As expected, parameters of leukemic disease did predict for short time to progression without transformation, further reinforcing the notion that RS transformation and CLL progression according to NCI guidelines are distinct events in the natural history of CLL (Table 1).

As stated above, FISH karyotype at CLL diagnosis predicts RS⁽³⁸⁾. In particular, absence of del13q14 confers an independent risk of RS development. Conceivably, pathogenetic differences between CLL with and without del13q14 underlie the different predisposition of these two CLL subsets toward RS transformation^(5,23). A sizeable fraction of CLL (30%) show a high degree of structural similarity in the BCR because of homology of

the expressed heavy chain complementarity determining region 3^(3,49). This phenomenon is known as stereotyped BCR and strongly suggests the role of antigen stimulation in disease development. Recently, we have shown that carrying a stereotyped BCR at CLL diagnosis may help in the identification of patients at risk of RS transformation. Comparing the immunogenetic features of 69 cases of RS with those of 714 cases of CLL, the prevalence of stereotyped BCR was significantly higher in RS than in non-transformed CLL (49.3% vs 21.3%)⁽⁴³⁾. Of note, applying an actuarial approach to this cohort, stereotyped VH CDR3 at the time of CLL diagnosis was revealed to be an independent predictor of RS transformation⁽⁴³⁾. Among CLL carrying a stereotyped BCR, patients utilizing the *IGHV4-39* gene in a stereotyped fashion (so called BCR “subset 8”) had the highest risk of RS transformation (17-fold higher than cases without a stereotyped BCR; 5-year risk 68% vs 4%). In multivariate analysis, usage of *IGHV4-39* along with stereotyped VH CDR3 was an independent risk factor of RS development⁽⁴³⁾. This observation, beside being of clinical interest, points to the role of antigen stimulation in RS development. The role of antigen stimulation in favoring RS development is further sustained by the observation that the BCR expressed by CLL belonging to subset 8 is characterized by the highest affinity for non-muscle myosin II, an autoantigen that might be involved in CLL promotion⁽⁷⁾.

Both CD38 expression and lymph node size have been shown to be independent predictors of RS⁽³⁸⁾ (Figure 2). From a pathogenetic standpoint, this observation suggests that molecular circuits in CLL lymph nodes may be important for determining the risk of RS in individual patients, and may directly contribute to CLL transformation to DLBCL. The lymph node may thus provide an optimal microenvironment for proliferation and blastic transformation of CD38 expressing CLL cells. In fact, interactions with other cells and cytokines that take place in the lymph node may provide adequate stimulation for CD38 up-regulation and signalling in CLL cells^(10,11,12,14,20,21). Intriguingly, *in vitro* activation of CD38 signalling induces transformation of CLL cells to plasmablasts that are reminiscent of the blasts appearing during RS evolution.

Expression of *CD38* is regulated at multiple levels. The 5' end of intron 1 of the *CD38* gene is involved in the induction of CD38 expression by transcription factors. Within the same region maps a well-characterized single nucleotide polymorphism (SNP), leading to a C > G variation at position 184 (*CD38* rs6449182). The presence of the minor G allele, either in a heterozygous or in a homozygous condition, strongly associates with RS⁽²⁾. Compared to CC homozygotes, GG homozygote CLL patients had a 30.6% increase in

the relative risk of developing RS, whereas GC heterozygotes showed an intermediate probability of 12.4%. At 5 years, GG homozygotes showed an increase in probability of developing RS that approximately doubled that associated with GC heterozygotes⁽²⁾. These observations document that the host genetic background may be of relevance in predicting RS development among individuals affected by CLL.

Analysis of a large number of SNPs has revealed that also the genetic background of the *LRP4* gene (rs2306029) is an important predictor of RS transformation⁽³⁴⁾. In particular, patients that are homozygotes for the minor allele of *LRP4* rs2306029 display a significantly higher 5-year cumulative probability of transformation to aggressive lymphoma compared to patients carrying the CT/CC genotypes that contain the wild type allele⁽³⁴⁾. *LRP4* encodes for a protein involved in the Wnt/beta-catenin signaling pathway, that is known to be activated in CLL cells⁽²⁴⁾.

When assessed at the time of diagnosis, telomere length of CLL cells has also been shown to be an independent predictor of RS transformation⁽⁴¹⁾. As already demonstrated for other neoplasms, telomere length recapitulates the cell proliferative history, and short telomere length denotes an aggressive clinical phenotype and chemo-refractoriness.

	5-year risk of RS transformation	Reference
Stereotyped VH CDR3	14,4%	[28]
<i>IGHV4-39</i> usage	35,4%	[28]
Telomere length \leq 5000 bp	18,9%	[29]
<i>CD38</i> GG/CG genotype	14,2%	[50]
<i>LRP4</i> TT genotype + stereotyped VH CDR3	30,4%	[51]

Table II. Risk of RS transformation at 5 years according to different RS biological predictors.

MOLECULAR PATHOGENESIS AND CLINICO-MOLECULAR CORRELATES OF RICHTER SYNDROME

The molecular mechanisms leading to transformation of CLL to RS have been recently clarified, at least to a certain extent. In classic RS represented by DLBCL, immunogenotypic studies have revealed that the majority (approximately 80%), though not the totality, of RS cases are clonally related to the pre-existing CLL clone⁽⁴⁴⁾. Cases of RS that are clonally related to the pre-existing CLL phase conceivably stem from the progressive accumulation of molecular lesions, either genetic and/or epigenetic, that favor the emergence and predominance of a large cell population causing clinical aggressiveness. In all available RS series, a fraction (10-20%) of RS cases is not related to the pre-existing CLL clone⁽⁴⁴⁾. Accumulation of molecular lesions in the CLL clone cannot be considered as a relevant factor in the development of clonally unrelated RS. Rather, these RS cases may be favoured by alterations of the host genetic background and immunologic function, or by derangements in the lymph node microenvironment induced by CLL cells.

Until recently, the scarcity of biologic information about RS has hampered the identification of molecular predictors of RS outcome. We recently addressed this issue by performing a comprehensive molecular characterization of 86 pathologically-proven RS⁽⁴⁴⁾. *TP53* disruption (47.1%) was the most frequent genetic lesion, consistent with the association of *TP53* lesions with high risk CLL^(17,39). By multivariate analysis and model validation, *TP53* disruption was selected as an independent predictor of RS survival, along with achievement of CR after RS treatment and ECOG PS > 1⁽⁴⁴⁾. By recursive-partitioning analysis, *TP53* status, response to RS treatment and ECOG PS were used to build an algorithm for stratifying RS survival⁽⁴⁴⁾. Patients presenting with ECOG PS > 1 had short survival, irrespective of *TP53* status and type of response to RS treatment (median: 7.8 months). Patients presenting with ECOG PS ≤ 1, but harboring *TP53* disruption or not achieving CR after RS treatment, had an intermediate survival (median: 24.6 months). Patients presenting with ECOG PS ≤ 1, no *TP53* disruption, and achieving CR after RS treatment displayed a long survival (70% at 5 years). Compared to clonally related RS, clonally unrelated RS harbored less frequently *TP53* disruption and stereotyped BCR, and were characterized by a significantly longer survival⁽⁴⁴⁾. These data document that *TP53* disruption, a well known marker of chemorefractoriness in lymphoid malignancies, is one of the major factors affecting RS survival. This observation provides the rationale for testing pre-transplant induction treatments with agents circumventing *TP53* disruption. Also, our results document that clonally unrelated RS is clinically and biologically distinct

from clonally related RS and should be considered as a secondary DLBCL arising *de novo* in the context of CLL⁽⁴⁴⁾. Therefore, the diagnosis of RS should be restricted to clonally related cases⁽⁴⁴⁾.

In order to further elucidate the pathogenesis of RS, we recently embarked on a whole exome sequencing program aiming at identifying novel mutations of the RS coding genome. This analysis has revealed the frequent involvement of mutations of the *NOTCH1* proto-oncogene in RS⁽¹⁵⁾. The frequency of *NOTCH1* mutations in RS (31.0%) is significantly higher than in CLL at diagnosis. *NOTCH1* mutations in RS are mostly represented by a recurrent two bp frameshift deletion (Δ CT7544-7545, P2515fs), and are predicted to cause *NOTCH1* impaired degradation through the truncation of the C-terminal PEST domain⁽¹⁵⁾. In order to establish the timing of acquisition of *NOTCH1* mutations during the clinical history of RS patients, we investigated paired sequential samples collected at the time of CLL diagnosis. The data suggest that clonally represented mutations of RS might already be present years before RS transformation, and that the clone harboring the mutation is progressively selected during the CLL clinical history ending into RS transformation. The comparison of *NOTCH1* activation in RS with the distribution of other genetic alterations that are recurrently associated with this disease revealed a potentially important pathogenetic pathway⁽¹⁵⁾. In fact, in RS, *NOTCH1* mutations are largely mutually exclusive with *MYC* oncogenic activation, that occur in ~ 20% of RS cases⁽⁴⁴⁾. This finding is consistent with the observation that *NOTCH1* directly stimulates *MYC* transcription and suggests that activation of oncogenic *MYC* may be one common final pathway selected for RS tumorigenesis. Combining *NOTCH1* mutations and *MYC* activation, 50% of RS might eventually have a genetic lesion deregulating the *MYC* pathway⁽¹⁵⁾. Conversely, both *NOTCH1* mutational activation and *MYC* deregulation often co-exist with inactivation of the *TP53* tumor suppressor gene, an event that is commonly observed in association with *MYC* activation in tumors, and that may be selected to prevent the apoptotic effects and the response to genomic instability, both induced by *MYC* overexpression⁽¹⁵⁾.

The role of EBV infection has been suggested by some studies as a potentially relevant factor for RS pathogenesis. The observation that the overwhelming majority of RS do not carry EBV infection in the malignant cells, however, does not favor this hypothesis⁽⁴⁴⁾. The presence of EBV sequences has been documented in some, though not all, cases of RS originating in patients previously treated with fludarabine for their pre-existent CLL^(8,51). EBV infection in these cases is thought to be related to the immune deregulation caused by purine analogues and/or alemtuzumab.

Aberrant somatic hypermutation of proto-oncogenes, a well known pathogenetic feature of DLBCL arising *de novo*, is not involved in RS pathogenesis, further substantiating the biological differences between DLBCL arising in the context of RS versus *de novo* DLBCL^(33,37). These molecular differences have also been confirmed by genome wide studies focusing on the profile of DNA copy number aberrations⁽⁴⁷⁾.

PROGNOSIS OF RICHTER SYNDROME

Prognosis of RS is generally considered highly unfavourable because of chemorefractoriness. However, survival of RS is not uniform, ranging from few weeks to 15 years, and may be predicted on clinical grounds by the RS score⁽⁵⁴⁾. Remarkably, risk factors that are relevant to the International Prognostic Index, namely number of extranodal sites of disease, age and stage, were not relevant to the RS score, confirming the notion that RS and *de novo* DLBCL are very different diseases. In contrast, survival prognostication in RS takes advantage of parameters reflecting marrow failure, such as thrombocytopenia, and parameters reflecting immune system exhaustion and selective pressure to chemorefractory clones, such as number of prior lines of treatment. Recent data from our group indicate that, in addition to the clinical risk factors included in the RS score, survival post-transformation of RS may also be predicted by the tumor genotype, namely the occurrence of *TP53* disruption, and by the clonal relationship of the RS phase with the pre-existing CLL clone⁽⁴⁴⁾. Cases of RS that are clonally unrelated to the CLL phase and/or have intact *TP53* alleles display a significantly superior survival advantage compared to clonally related cases and cases harbouring *TP53* disruption⁽⁴⁴⁾.

TREATMENT OF RICHTER SYNDROME

Treatment of RS is not an easy task, and no current approach can be considered as standard therapy or satisfactory. Although most RS cases are histologically classified as DLBCL, treatment results are far less impressive than those obtained in *de novo* DLBCL, and most cases will eventually fail. Three intuitive reasons for the poor results achieved in RS treatment compared to *de novo* DLBCL are represented by:

- i) the transformed nature of these DLBCL;
- ii) tumour burden and
- iii) the frailty of RS patients.

As for other transformed lymphomas, i.e. DLBCL emerging from a previous diagnosis of follicular lymphoma, cases of RS are intrinsically more chemoresistant, and display high risk genomic aberrations, such as *TP53* disruption, that render these disorders refractory to conventional regimens⁽⁴⁴⁾. Extensive disease involvement, high tumour burden and rapid disease kinetics are common features of RS affecting up to 50% of cases^(44,54). In addition, tumour burden is an independent predictor of poor survival in RS patients⁽⁵⁴⁾. Patient frailty because of poor performance status, poor bone marrow function or immunodeficiency is a common feature in the context of RS^(38,44,54), and represents an independent predictor of poor survival after transformation⁽⁵⁴⁾. The frailty of RS patients precludes the use of high dose chemotherapy with stem cell rescue in a substantial fraction of patients, thus limiting the therapeutic options and the possible benefit derived from myeloablative regimens⁽⁵⁴⁾. Because of these biological and clinical characteristics of RS, the median survival time with conventional chemotherapy with or without rituximab is less than 12 months⁽⁴⁰⁾.

Regimens that have been used in RS treatment are heterogeneous and were developed initially for other lymphoid disorders, namely aggressive non-Hodgkin lymphoma or acute lymphoblastic leukemia. In the prerituximab era, regimens used for RS included, but were not limited to, CHOP-bleo, MACOP-B, ASHAP, VAD and hyper-CVXD⁽⁴⁰⁾. Rituximab-CHOP, that is considered standard therapy for *de novo* DLBCL, is currently used in many instances of RS, although the results are far from satisfactory^(9,54). Combination of rituximab with fractionated regimens, namely rituximab hyper-CVAD, has also been used⁽⁴⁰⁾. Combinations of rituximab with CHOP or hyper-CVXD variants induced responses in 47% of patients compared to a 34% response rate with chemotherapy alone⁽⁴⁰⁾. Although differences did not reach statistical significance, the data suggest that rituximab-containing immunochemotherapy may exert some benefit in RS treatment. Recently, a phase I–II trial of oxaliplatin, fludarabine, cytarabine and rituximab, a regimen termed as OFAR, has been tested in RS patients⁽⁵⁵⁾. The rationale for developing the OFAR regimen was threefold:

- i) preclinical data had shown synergistic cytotoxicity between oxaliplatin and the nucleoside analogues cytarabine and fludarabine
- ii) the administration of fludarabine before cytarabine increases the intracellular concentration of the active metabolite, that is cytarabine triphosphate;
- iii) oxaliplatin-based regimens containing high dose cytarabine have shown activity in relapsed *de novo* DLBCL as well as other lymphoma types⁽⁵⁵⁾.

Fifty percent of RS patients attained a complete response or a partial response with the OFAR regimen⁽⁵⁵⁾. OFAR was generally well tolerated, and grade 3-4 toxicities were mainly haematological. Despite these promising results, the median duration of responses achieved with OFAR was only 10 months, with a 6-month survival rate of 60%⁽⁵⁵⁾. Patients who had achieved a CR or PR had longer survival than patients whose disease failed to respond to OFAR⁽⁵⁵⁾.

Because results with conventional immunochemotherapy, including OFAR, may not be considered satisfactory, novel approaches need to be explored for RS. One option is to use consolidation or maintenance therapy, once that a complete response or a partial response has been achieved by R-CHOP, OFAR or other regimens. Despite poor activity as single agents for induction treatment of RS⁽⁴⁰⁾, immunotherapy with rituximab and alemtuzumab or radioimmunotherapy may be attractive options for consolidation and maintenance therapy in RS patients in the context of multistep approaches already tested in CLL and DLBCL⁽⁴⁰⁾. Approaches based on alemtuzumab or radioimmunotherapy should be considered investigative at the moment, and require testing in dedicated clinical trials. Younger patients with RS are candidate to autologous or allogeneic stem cell transplantation (SCT). Allogeneic SCT may be particularly promising⁽⁵⁴⁾. According to a non-randomized comparison of two RS cohorts, the estimated cumulative survival at 3 years has been reported to be 75% for patients who received allogeneic SCT after a CR, CRu or PR, compared to 27% for patients who responded to initial therapy but received no allogeneic SCT⁽⁵⁴⁾. Remarkably, allogeneic SCT has no benefit in RS patients who are refractory to induction regimens⁽⁵⁴⁾.

CONCLUDING REMARKS

Advancements during the last few years have revitalized the interest on Richter syndrome, and our ability to predict the development of this clinical condition has grown. A limited but growing number of molecular and phenotypic markers have been identified that may facilitate the identification of CLL patients who are at risk of RS development at some point during the natural history of their disease. The availability of biological predictors of RS transformation suggests the adoption of a close surveillance and of a dedicated biopsy policy for patients who are judged to be at high risk. A close surveillance and an aggressive biopsy policy may anticipate the timing of RS recognition, that is clinically relevant since late diagnosis is an adverse factor in RS prognosis post-transformation. A combined effort of candidate gene studies and genome wide technologies have clarified the molecular

pathogenesis of RS to a certain extent, and have identified novel biological prognosticators for this disease. Elucidation of the genetic complexity of RS might also be possibly useful for the future design of modalities of target therapy against this disorder.

REFERENCES

1. Armitage JO, Dick FR, Corder MP: *Diffuse histiocytic lymphoma complicating chronic lymphocytic leukemia*. Cancer 1978; 41: 422-427.
2. Aydin S, Rossi D, Bergui L, D'Arena G, Ferrero E, Bonello L, Omedé P, Novero D, Morabito F, Carbone A, Gaidano G, Malavasi F, Deaglio S: *CD38 gene polymorphism and chronic lymphocytic leukemia: a role in Richter syndrome?* Blood 2008; 111: 5646-5653.
3. Bomben R, Dal Bo M, Capello D, Forconi F, Maffei R, Laurenti L, Rossi D, Del Principe MI, Zucchetto A, Bertoni F, Rossi FM, Bulian P, Cattarossi I, Ilariucci F, Sozzi E, Spina V, Zucca E, Degan M, Lauria F, Del Poeta G, Efremov DG, Marasca R, Gaidano G, Gattei V: *Molecular and clinical features of chronic lymphocytic leukaemia with stereotyped B cell receptors: results from an Italian multi center study*. Br. J. Haematol. 2009; 144: 492-506.
4. Bruzzi JF, Macapinlac H, Tsimberidou AM, Truong MT, Keating MJ, Marom EM, Munden RF: *Detection of Richter's transformation of chronic lymphocytic leukemia by PET/CT*. J. Nucl. Med. 2006; 47: 1267-1273.
5. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM: *A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia*. N. Engl. J. Med. 2005; 353:1793-1801.
6. Cherepakhin V, Baird SM, Meisenholder GW, Kipps TJ: *Common clonal origin of chronic lymphocytic leukemia and high grade lymphoma of Richter's syndrome*. Blood 1993; 82: 3141-3147.
7. Chu CC, Catera R, Zhang L, Didier S, Agagnina BM, Damle RN, Kaufman MS, Kolitz JE, Allen SL, Rai KR, Chiorazzi N: *Many chronic lymphocytic leukemia antibodies recognize apoptotic cells with exposed nonmuscle myosin heavy chain IIA: implications for patient outcome and cell of origin*. Blood 2010; 115: 3907-3915.

8. Cohen Y, Da'as N, Libster D, Amir G, Berrebi A, Polliack A: *Large-cell transformation of chronic lymphocytic leukemia and follicular lymphoma during or soon after treatment with fludarabine-rituximab containing regimens: natural history or related therapy complication.* Eur. J. Hematol. 2002; 68: 80-83.
9. Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, Morel P, Van Den Neste E, Salles G, Gaulard P, Reyes F, Lederlin P, Gisselbrecht C: *CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma.* N. Engl. J. Med. 2002; 346: 235-242.
10. Deaglio S, Capobianco A, Bergui L, Dürig J, Morabito F, Dührsen U, Malavasi F: *CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells.* Blood 2003; 102: 2146-2155.
11. Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, Bergui L, D'Arena G, Bonello L, Omedé P, Scatolini M, Jaksic O, Chiorino G, Efremov D, Malavasi F: *CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential.* Blood 2007; 110: 4012-4021.
12. Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, Ferrero E, Malavasi F: *In-tandem insights from basic science combined with clinical research: CD38 as both marker and key component of the pathogenetic network underlying chronic lymphocytic leukemia.* Blood 2006; 108: 1135-1144.
13. Deambrogi C, Cresta S, Cerri M, Rasi S, De Paoli L, Ramponi A, Gaidano G, Rossi D: *14q32 translocations and risk of Richter's transformation in chronic lymphocytic leukaemia.* Br. J. Haematol. 2009; 144:131-133.
14. Del Poeta G, Maurillo L, Venditti A, Buccisano F, Epiceno AM, Capelli G, Tamburini A, Suppo G, Battaglia A, Del Principe MI, Del Moro B, Masi M, Amadori S: *Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia.* Blood 2001; 98: 2633-2639.
15. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabani H, Ma J, Grunn A, Fangazio M, Capello D, Monti S, Cresta S, Gargiulo E, Forconi F, Guarini A, Arcaini L, Paulli M, Laurenti L, Larocca LM, Marasca R, Gattei V, Oscier D, Bertoni F, Mullighan CG, Foá R, Pasqualucci L, Rabadan R, Dalla-Favera R, Gaidano G: *Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation.* J. Exp. Med. 2011; 208: 1389-401.
16. Fangazio M, De Paoli L, Rossi D, Gaidano G: *Predictive markers and driving factor behind Richter syndrome development.* Exp. Rev. Anticancer Ther. 2011; 11: 433-442.
17. Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, Inghirami G, Neri A, Newcomb EW, Magrath IT, Knowles DM, Dalla-Favera R: *p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991; 88: 5413-5417.
18. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ for the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia: *International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines.* Blood 2008; 111: 5446-5456.
19. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Müller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES, Pan Z, Farinha P, Smith LM, Falini B, Banham AH, Rosenwald A, Staudt LM, Connors JM, Armitage JO, Chan WC: *Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray.* Blood 2004; 103: 275-282.

20. Ibrahim S, Keating M, Do KA, O'Brien S, Huh YO, Jilani I, Lerner S, Kantarjian HM, Albitar M: *CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood 2001; 98: 181-186.
21. Jaksic O, Paro MM, Kardum Skelin I, Kusec R, Pejsa V, Jaksic B: *CD38 on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells has higher expression in lymph nodes than in peripheral blood or bone marrow*. Blood 2004; 103: 1968-1969.
22. Janssens A, Berth M, De Paepe P, Verhasselt B, Van Roy N, Noens L, Philippé J, Offner F: *EBV negative Richter's syndrome from a coexistent clone after salvage treatment with alemtuzumab in a CLL patient*. Am. J. Hematol. 2006; 81: 706-712.
23. Kienle DL, Korz C, Hosch B, Benner A, Mertens D, Habermann A, Kröber A, Jäger U, Lichter P, Döhner H, Stilgenbauer S: *Evidence for distinct pathomechanisms in genetic subgroups of chronic lymphocytic leukemia revealed by quantitative expression analysis of cell cycle, activation, and apoptosis-associated genes*. J. Clin. Oncol. 2005; 23: 3780-3792.
24. Lu D, Zhao Y, Tawatao R, Cottam HB, Sen M, Leoni LM, Kipps TJ, Corr M, Carson DA: *Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 2004; 101: 3118-3123.
25. Maddocks-Christianson K, Slager SL, Zent CS, Reinalda M, Call TG, Habermann TM, Bowen DA, Hoyer JD, Schwager S, Jelinek DF, Kay NE, Shanafelt TD: *Risk factors for development of a second malignancy in patients with chronic lymphocytic leukaemia*. Br. J. Haematol. 2007; 139: 398-404.
26. Mao Z, Quintanilla-Martinez L, Raffeld M, Richter M, Krugmann J, Burek C, Hartmann E, Rudiger T, Jaffe ES, Müller-Hermelink HK, Ott G, Fend F, Rosenwald A: *IgVH mutational status and clonality analysis of Richter's transformation: diffuse large B-cell lymphoma and Hodgkin lymphoma in association with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) represent 2 different pathways of disease evolution*. Am. J. Surg. Pathol. 2007; 31: 1605-1614.
27. Matolcsy A, Inghirami G, Knowles DM: *Molecular genetic demonstration of the diverse evolution of Richter's syndrome (chronic lymphocytic leukemia and subsequent large cell lymphoma)*. Blood 1994; 83: 1363-1372.
28. Nakamura N, Kuze T, Hashimoto Y, Hoshi S, Tominaga K, Sasaki Y, Shirakawa A, Sato M, Maeda K, Abe M: *Analysis of the immunoglobulin heavy chain gene of secondary diffuse large B-cell lymphoma that subsequently developed in four cases with B-cell chronic lymphocytic leukemia or lymphoplasmacytoid lymphoma (Richter syndrome)*. Pathol. Int. 2000; 50: 636-643.
29. O'Brien SM, Kantarjian HM, Thomas DA, Cortes J, Giles FJ, Wierda WG, Koller CA, Ferrajoli A, Browning M, Lerner S, Albitar M, Keating MJ: *Alemtuzumab as treatment for residual disease after chemotherapy in patients with chronic lymphocytic leukemia*. Cancer 2003; 98: 2657-2663.
30. Omoti CE, Omoti AE: *Richter syndrome: a review of clinical, ocular, neurological and other manifestations*. Br. J. Haematol. 2008; 142: 709-716.
31. Ott MM, Ott G, Roblick U, Linke B, Kneba M, de Leon F, Müller-Hermelink HK: *Localized gastric non-Hodgkin's lymphoma of high-grade malignancy in patients with pre-existing chronic lymphocytic leukemia or immunocytoma*. Leukemia 1995; 9: 609-614.
32. Parrens M, Sawan B, Dubus P, Lacombe F, Marit G, Vergier B, Reiffers J, de Mascarel A, Merlio JP: *Primary digestive Richter's syndrome*. Mod. Pathol. 2001; 14: 452-457.

33. Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, Nanjangud G, Chaganti RS, Küppers R, Dalla-Favera R: *Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas*. Nature 2001; 412: 341-346.
34. Rasi S, Spina V, Brusca A, Vaisitti T, Tripodo C, Forconi F, De Paoli L, Fangazio M, Sozzi E, Cencini E, Laurenti L, Marasca R, Visco C, Xu-Monette ZY, Gattei V, Young KH, Malavasi F, Deaglio S, Gaidano G, Rossi D: *A variant of the LRP4 gene affects the risk of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome*. Br. J. Haematol. 2011; 152: 284-294.
35. Ratnavel RC, Dunn-Walters DK, Boursier L, Frazer-Andrews E, Orchard G, Russell-Jones R, Calonje E: *B-cell lymphoma associated with chronic lymphocytic leukaemia: two cases with contrasting aggressive and indolent behaviour*. Br. J. Dermatol. 1999; 140: 708-714.
36. Richter MN: *Generalized reticular cell sarcoma of lymph nodes associated with lymphatic leukaemia*. Am. J. Pathol. 1928; 4: 285-292.
37. Rossi D, Berra E, Cerri M, Deambrogi C, Barbieri C, Franceschetti S, Lunghi M, Conconi A, Paulli M, Matolcsy A, Pasqualucci L, Capello D, Gaidano G: *Aberrant somatic hypermutation in transformation of follicular lymphoma and chronic lymphocytic leukemia to diffuse large B-cell lymphoma*. Haematologica 2006; 91: 1405-1409.
38. Rossi D, Cerri M, Capello D, Deambrogi C, Rossi FM, Zucchetto A, De Paoli L, Cresta S, Rasi S, Spina V, Franceschetti S, Lunghi M, Vendramin C, Bomben R, Ramponi A, Monga G, Conconi A, Magnani C, Gattei V, Gaidano G: *Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome*. Br. J. Haematol. 2008; 142: 202-215.
39. Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, Sozzi E, Cresta S, Rasi S, De Paoli L, Spina V, Gattei V, Capello D, Forconi F, Lauria F, Gaidano G: *The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness*. Clin. Cancer Res. 2009; 15: 995-1004.
40. Rossi D, Gaidano G: *Richter syndrome: molecular insights and clinical perspectives*. Hematol. Oncol. 2009; 27: 1-10.
41. Rossi D, Lobetti Bodoni C, Genuardi E, Monitillo L, Drandi D, Cerri M, Deambrogi C, Ricca I, Rocci A, Ferrero S, Bernocco E, Capello D, De Paoli L, Bergui L, Boi M, Omedè P, Massaia M, Tarella C, Passera R, Boccadoro M, Gaidano G, Ladetto M: *Telomere length is an independent predictor of survival, treatment requirement and Richter's syndrome transformation in chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia 2009; 23: 1062-1072.
42. Rossi D, Rasi S, Capello D, Gaidano G: *Prognostic assessment of BCL2-938C>A polymorphism in chronic lymphocytic leukemia*. Blood 2008; 111: 466-468.
43. Rossi D, Spina V, Cerri M, Rasi S, Deambrogi C, De Paoli L, Laurenti L, Maffei R, Forconi F, Bertoni F, Zucca E, Agostinelli C, Cabras A, Lucioni M, Martini M, Magni M, Deaglio S, Ladetto M, Nomdedeu JF, Besson C, Ramponi A, Canzonieri V, Paulli M, Marasca R, Larocca LM, Carbone A, Pileri SA, Gattei V, Gaidano G: *Stereotyped B-cell receptor is an independent risk factor of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome*. Clin. Cancer Res. 2009; 15: 4415-4422.
44. Rossi D, Spina V, Deambrogi C, Rasi S, Laurenti L, Stamatopoulos K, Arcaini L, Lucioni M, Rocque GB, Xu-Monette ZY, Visco C, Chang J, Chigrinova E, Forconi F, Marasca R, Besson C, Papadaki T, Paulli M, Larocca LM, Pileri SA, Gattei V, Bertoni F, Foà R, Young KH, Gaidano G: *The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation*. Blood 2011; 117: 3391-3401.

45. Rossi D, Spina V, Forconi F, Capello D, Fangazio M, Rasi S, Martini M, Gattei V, Ramponi A, Larocca LM, Bertoni F, Gaidano G: *Molecular history of Richter syndrome: Origin from a cell already present at the time of chronic lymphocytic leukemia diagnosis*. Int. J. Cancer 2001; doi: 10.1002/ijc.26322.
46. Rossi D, Zucchetto A, Rossi FM, Capello D, Cerri M, Deambrogi C, Cresta S, Rasi S, De Paoli L, Bodoni CL, Bulian P, Del Poeta G, Ladetto M, Gattei V, Gaidano G: *CD49d expression is an independent risk factor of progressive disease in early stage chronic lymphocytic leukemia*. Haematologica 2008; 93: 1575-1579.
47. Scandurra M, Rossi D, Deambrogi C, Rancoita PM, Chigrinova E, Mian M, Cerri M, Rasi S, Sozzi E, Forconi F, Ponzoni M, Moreno SM, Piris MA, Inghirami G, Zucca E, Gattei V, Rinaldi A, Kwee I, Gaidano G, Bertoni F: *Genomic profiling of Richter's syndrome: recurrent lesions and differences with de novo diffuse large B-cell lymphomas*. Hematol. Oncol. 2010; 28: 62-67.
48. Smit LA, van Maldegem F, Langerak AW, van der Schoot CE, de Wit MJ, Bea S, Campo E, Bende RJ, van Noesel CJ: *Antigen receptors and somatic hypermutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia with Richter's transformation*. Haematologica 2006; 91: 903-911.
49. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Boudjoghra M, Guida G, Smilevska T, Belhou L, Stella S, Stavroyianni N, Crespo M, Hadzidimitriou A, Sutton L, Bosch F, Laoutaris N, Anagnostopoulos A, Montserrat E, Fassas A, Dighiero G, Caligaris-Cappio F, Merle-Béral H, Ghia P, Davi F: *Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: pathogenetic implications and clinical correlations*. Blood 2007; 109: 259-270.
50. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW: *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2008.
51. Thornton PD, Bellas C, Santon A, Shah G, Pocock C, Wotherspoon AC, Matutes E, Catovsky D: *Richter's transformation of chronic lymphocytic leukemia. The possible role of fludarabine and the Epstein-Barr virus in its pathogenesis*. Leukemia Res. 2005; 29: 389-395.
52. Timár B, Fülöp Z, Csernus B, Angster C, Bognár A, Szepesi A, Kopper L, Matolcsy A: *Relationship between the mutational status of VH genes and pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma in Richter's syndrome*. Leukemia 2004; 18: 326-330.
53. Tsimberidou A-M, Keating MJ: *Richter syndrome. Biology, incidence, and therapeutic strategies*. Cancer 2005; 103: 216-228.
54. Tsimberidou A-M, O'Brien S, Khouri I, Giles FJ, Kantarjian HM, Champlin R, Wen S, Do KA, Smith SC, Lerner S, Freireich EJ, Keating MJ: *Clinical outcomes and prognostic factors in patients with Richter's syndrome treated with chemotherapy or chemoimmunotherapy with or without stem-cell transplantation*. J. Clin. Oncol. 2006; 24: 2343-2351.
55. Tsimberidou AM, Wierda WG, Plunkett W, Kurzrock R, O'Brien S, Wen S, Ferrajoli A, Ravandi-Kashani F, Garcia-Manero G, Estrov Z, Kipps TJ, Brown JR, Fiorentino A, Lerner S, Kantarjian HM, Keating MJ: *Phase I-II study of oxaliplatin, fludarabine, cytarabine, and rituximab combi-nation therapy in patients with Richter's syndrome or fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia*. J. Clin. Oncol. 2008; 26: 196-203.

L'ECOGRAFIA NELLA DIAGNOSTICA E NELLA TERAPIA DELLA PATOLOGIA NODULARE TIROIDEA: ATTUALITÀ E PROSPETTIVE

*Federico Ragazzoni¹, Alberto Mormile¹, Maurilio Deandrea¹,
Francesca Garino¹, Maria Josefina Ramunni¹, Gabriella Magliona¹,
Filippo Molinari², Roberto Garberoglio³, Paolo Limone¹*

¹ S.C. Endocrinologia, Diabetologia e Malattie del Metabolismo
Azienda Ospedaliera Ordine Mauriziano - Torino

² Dipartimento di Elettronica - Politecnico di Torino

³ Fondazione Scientifica Mauriziana ONLUS

Parole chiave: *Thyroid ultrasound / Ecografia tiroidea*
Elastography / Elastografia
Contrast enhanced / Ecografia con mezzo
ultrasound di contrasto
Radiofrequency thermal ablation / Termoablazione

Abstract:

Thyroid nodules are a common occurrence in clinical practice. Palpable nodules account for 4-7% in the general population, which means that most of these are detected by ultrasound. High resolution US has become the imaging modality of choice for the investigation of thyroid nodules. Well-known sonographic criteria suggesting malignancy are marked hypoechogenicity, presence of spot microcalcifications, irregular or microlobulated margins, absence of halo sign and increased intranodular vascularization. However, the specificity of thyroid US parameters only increases at the expense of its sensitivity, offering poor diagnostic accuracy in differentiating benign and malignant nodules. New techniques have been developed to improve the predictivity of thyroid US. Elastography is a dynamic technique that evaluates the degree of tissue distortion under the application of an external force. By analyzing the modifications of radiofrequency signalling before and after compression, elastography is able to differentiate harder and softer areas within the tissue parenchyma, and displays it as an image (elastogram) following a colour-coded scale. Contrast-enhanced ultrasound studies the microvascular pattern of thyroid nodules by injecting gas-filled microbubbles in the systemic circulation. The difference in echogenicity between the gas microbubbles and the thyroid parenchyma is immense. The microbubbles diffuse within the vessels allowing the reproduction of the nodule microvascularization. Here we report the Author's experience with these two novel techniques.

Besides its role as diagnostic tool, thyroid US is used as guide for minimvasive procedures such as percutaneous ethanol injection, laser thermoablation and radiofrequency thermoablation. Thermoablation techniques are becoming valid alternatives to thyroid surgery, thanks to low costs and rare side effects, and are to be considered as first choice treatments for benign compressive thyroid nodules in patients in which surgery is contraindicated due to high surgical risk.

Riassunto:

L'ecografia tiroidea ha profondamente modificato l'approccio alla patologia nodulare tiroidea. La capacità di individuare lesioni non palpabili e la rapidità dell'esame rendono l'ecografia tiroidea un fondamentale complemento all'esame clinico. Il problema fondamentale nella gestione clinica dei nodi tiroidei è la differenziazione tra forme benigne e neoplastiche. Parametri ecografici quali ipoecogenicità, irregolarità dei margini, presenza di microcalcificazioni, assenza di halo sign sono ampiamente riconosciuti come elementi di sospetto. L'introduzione dello studio doppler ha aggiunto ulteriori elementi di distinzione. Ciò nonostante, nessun parametro ecografico preso singolarmente gode di sensibilità e potere predittivo consensualmente elevati. L'elastografia e l'ecografia con ecoamplificatore rappresentano nuove metodiche finalizzate a incrementare il potere predittivo dell'esame ecografico. L'elastografia valuta il diverso grado di deformabilità di un tessuto in risposta a una forza esterna applicata usando la sonda ecografica, rappresentandola mediante una scala cromatica pre-definita che viene sovrimposta all'immagine ecografica. L'ecografia con ecoamplificatore consiste nell'iniezione endovenosa di un bolo di microbolle di gas inerte che diffondono all'interno dei vasi generando un aumento di contrasto che consente di visualizzare la microvascolarizzazione del nodo. In questa breve rassegna prenderemo in esame il ruolo diagnostico delle tecniche ecografiche tradizionali e delle tecniche ultrasonografiche più innovative, richiamando i dati della letteratura e riportando l'esperienza clinica degli Autori.

Oltre al suo ruolo di individuazione e caratterizzazione dei nodi tiroidei, l'ecografia viene utilizzata come guida per procedure minimvasive quali l'alcoolizzazione percutanea, la termoablazione mediante laser e la termoablazione mediante radiofrequenza. Le tecniche termoablativo si stanno affermando come valide alternative alla chirurgia, forti di una eccellente sicurezza e di un costo più contenuto rispetto alla chirurgia, proponendosi come trattamento elettivo per nodi tiroidei benigni compressivi in pazienti ad elevato rischio chirurgico.

L'introduzione dell'ecografia nella pratica clinica ha profondamente modificato l'approccio al paziente con patologia nodulare tiroidea. L'esame clinico, pur fondamentale nella valutazione del paziente con malattie della tiroide, è infatti caratterizzato da un'ampia variabilità e risulta fortemente condizionato dall'esperienza dell'esaminatore. L'esame ecografico tiroideo ha invece il vantaggio di essere una metodica diagnostica non invasiva, ben accettata dal paziente, in grado di individuare anche lesioni non palpabili ed a costi relativamente bassi. Tali caratteristiche hanno reso l'ecografia un fondamentale complemento all'esame clinico.

Il riscontro di formazioni nodulari in ambito tiroideo è un evento clinico frequente, in particolare nelle aree a carenza iodica e nella popolazione anziana. In generale, si stima che il 4-7% della popolazione adulta presenti un nodo tiroideo palpabile^(13,20). L'introduzione dell'ecografia tiroidea ha incrementato la capacità di individuare i nodi tiroidei, tanto che oltre il 50% della popolazione risulta in realtà portatore di una lesione nodulare tiroidea. La maggior parte dei nodi tiroidei è di natura benigna: il carcinoma tiroideo è infatti una malattia relativamente rara, interessando solo il 5% dei nodi riscontrati⁽²³⁾; peraltro, il problema fondamentale nella gestione clinica dei nodi tiroidei è proprio la differenziazione tra forme benigne e neoplastiche, a cui l'ecografia, grazie ai continui progressi tecnologici, ha fornito un contributo via via più importante. Scopo di questa breve rassegna è prendere in esame il ruolo diagnostico sia delle tecniche ecografiche tradizionali sia delle tecniche ultrasonografiche più innovative, alla luce dell'esperienza clinica degli autori. Nella seconda parte verrà effettuata una breve messa a punto del ruolo dell'ecografia come supporto a metodiche terapeutiche "mini invasive" per il trattamento dei nodi tiroidei, in alternativa al trattamento chirurgico, con particolare riferimento all'attività interventistica svolta presso l'Ospedale Mauriziano di Torino.

ANATOMIA ECOGRAFICA DELLA TIROIDE NORMALE

Nello studio della ghiandola tiroidea vengono utilizzate sonde con frequenza compresa tra 7.5 e 12 MHz che permettono una risoluzione nell'ambito della ghiandola inferiore ai 3 mm.

La densità ecografica del parenchima tiroideo è nettamente superiore a quella delle strutture circostanti, consentendo, in condizioni normali, di visualizzare la ghiandola senza difficoltà. Nella scansione trasversa i due lobi hanno una forma grossolanamente triangolare, collegati dall'istmo, nella scansione longitudinale i lobi tiroidei hanno una forma grossolanamente ellissoide e

sono delimitati anteriormente dai muscoli pretiroidei e posteriormente dai muscoli lunghi del collo.

Le dimensioni della ghiandola si studiano utilizzando i diametri sagittale, antero-posteriore e latero-laterale per ciascuno dei lobi e i diametri antero-posteriore e sagittale per l'istmo. Per valutare l'incremento dimensionale della tiroide si utilizza essenzialmente il diametro antero-posteriore massimo dei lobi, valutato in sezione longitudinale. Si considera normale un valore compreso tra 10 e 18 mm. Il diametro anteroposteriore dell'istmo è normalmente inferiore a 5 mm.

La normale ecostruttura della tiroide è omogenea e compatta. Una alterazione della struttura anatomica con riduzione dell'interfaccia cellula/colloide aumenta la quantità di echi che diffonde nel tessuto e non viene riflessa alla sonda, alterando il normale aspetto omogeneo della ghiandola.

L'indagine color doppler del parenchima ghiandolare mette in evidenza vasi arteriosi e venosi periferici, in particolare quelli venosi costituiti da cisterne venose che fanno riferimento al peduncolo vascolare superiore e inferiore; all'interno del parenchima si apprezzano numerosi spot arteriosi e venosi, regolarmente distribuiti.

L'applicazione del color doppler allo studio tiroideo viene schematizzato in 4 pattern fondamentali:

- PATTERN I: assenza di segnale colore
- PATTERN II: segnale colore evidente alla periferia della lesione nodulare
- PATTERN III: segnale colore in periferia e all'interno della lesione nodulare
- PATTERN IV: segnale colore diffuso a tutta la ghiandola

L'avvento del power doppler, metodica maggiormente sensibile ai flussi lenti, ha drasticamente ridimensionato il riscontro di formazioni totalmente avascolari (tipo I), e ha consentito di riclassificare il pattern vascolare secondo un criterio ecoangiografico:

- TIPO A, o “ring sign”, caratterizzato da circolo vascolare perinodale
- TIPO B, o “complex ring sign”, caratterizzato da vascolarizzazione per e intralesionale, distinto in due sottotipi: B1, con vasi intranodulari sottili e a disposizione regolare, e B2, con vasi intranodulari più numerosi, grossolani e a disposizione irregolare
- TIPO C, o “delta sign”, caratterizzato da un circolo vascolare peri e intranodulare nutrito da un grosso vaso arterioso (raro)

LECOGRAFIA CONVENZIONALE NELLA PATOLOGIA NODULARE TIROIDEA

La diagnosi e caratterizzazione dei nodi tiroidei si basano sui seguenti criteri:

- ecostruttura
- ecogenicità
- presenza e morfologia delle calcificazioni
- presenza di aree colliquative e cistiche
- caratteristiche dei margini
- presenza e morfologia dell'orletto ipoecogeno periferico
- forma
- entità e distribuzione della vascolarizzazione

Fin dall'avvento dell'ecografia nello studio della patologia nodulare tiroidea, numerosi studi sono stati condotti per stabilirne la validità nel differenziare noduli benigni e maligni. Sono ormai ampiamente riconosciute come caratteristiche ecografiche di sospetto, e pertanto indicative della necessità di approfondimento citologico, la presenza di margini irregolari e sfumati, la struttura ipoecogena priva di rinforzo posteriore, l'alone ipoecogeno periferico grossolano e incompleto, la presenza di microcalcificazioni, la tendenza allo sviluppo in profondità ("more tall than wide"), l'invasione di strutture circostanti (capsula tiroidea, muscoli pre-tiroidei, trachea, esofago, vasi), la presenza di adenopatie satelliti con pattern ecostrutturale analogo a quello del nodo "genitore". Sono caratteristiche di benignità la regolarità dei margini, la presenza di un sottile alone ipoecogeno periferico, la struttura iso o ipoecogena disomogenea con segni di involuzione tissutale sia sul versante cistico sia su quello fibrocalcifico, la presenza di grossolane macrocalcificazioni intranodulari^(4,9,18,25,27).

L'introduzione dello studio doppler ha aggiunto ulteriori elementi di discriminazione. Il pattern vascolare di tipo I (assenza di segnale) è tipico delle lesioni nodulari iperplastiche di piccole dimensioni o delle formazioni colloidocistiche. Il pattern vascolare di tipo II (segnale peri-nodulare) è tipico delle lesioni nodulari colloidocistiche di dimensioni superiori ai 3 cm e delle lesioni solide verosimilmente benigne. Il pattern vascolare di tipo III (IIIa intranodulare, IIIb perinodulare e intranodulare) è tipico sia delle lesioni adenomatose quanto di quelle carcinomatose.

L'avvento del power doppler ha ulteriormente modificato la classificazione dei nodi tiroidei: il tipo A è associabile generalmente a patologie nodulari

benigne, il tipo B1 alle lesioni iperplastiche benigne mentre il tipo B2 è frequentemente associato alle lesioni follicolari ed alle lesioni neoplastiche; il tipo C, di raro riscontro, è altamente specifico per la presenza di neoplasia.

Sensibilità, specificità e potere predittivo delle principale caratteristiche ecografiche sono riportate in Tabella I.

	Sensibilità (%)	Specificità (%)	Potere predittivo positivo (%)	Potere predittivo negativo (%)
Microcalcificazioni	26.1 – 59.1	85.8 – 95.0	24.3 – 70.7	41.8 – 94.2
Ipoecogenicità	26.5 – 87.9	43.4 – 94.3	11.4 – 68.4	73.5 – 93.8
Margini irregolari o assenza orletto	17.4 – 77.5	38.9 – 85.2	9.3 – 60.0	38.9 – 97.8
Vascolarizzazione intranodale	54.3 – 74.2	78.6 – 80.8	24.0 – 41.9	85.7 – 97.4
Forma (A/T > 1)	32.7	92.5	66.7	74.8

Tabella I. Sensibilità, specificità e predittività dei principali segni ecografici.

Il pattern ipoecogeno, pur presentando elevata sensibilità, ha una bassa specificità essendo riscontrabile anche in numerose formazioni benigne. D'altra parte esistono situazioni in cui valutare l'ecogenicità di un nodo può essere difficile a causa delle caratteristiche ecostrutturali del tessuto circostante. In particolare la presenza di tireopatia infiammatoria cronica riduce l'ecogenicità del parenchima ghiandolare, aumentandone la disomogeneità e rendendo più difficile la classificazione dei nodi. Alcune formazioni nodulari ad esempio possono essere confuse con le aree pseudonodulari tipiche delle tireopatie infiammatorie autoimmuni, che all'esame bioptico mettono in evidenza aree di flogosi molto intensa⁽²⁶⁾.

La presenza di microcalcificazioni all'interno di un nodo tiroideo è l'elemento più fortemente predittivo di malignità, con una specificità del 85.8-95%. A seconda delle casistiche, le microcalcificazioni sono riscontrabili nel 29-59% dei tumori tiroidei^{;(4,9,18,22,25-27)}. Si tratta di piccoli

aggregati di corpi psammomatosi, concrezioni multilaminari concentriche di diametro compreso tra 10 e 100 μm la cui immagine ecografica è quella di microspot iperecogeni privi di cono d'ombra posteriore. Sono caratteristiche dei carcinomi papillari tiroidei, ma la loro presenza è stata documentata anche nei carcinomi follicolari e nei carcinomi scarsamente differenziati ed in carcinomi anaplastici; peraltro le si riscontra occasionalmente anche in lesioni benigne quali adenomi follicolari e tiroiditi di Hashimoto (Figura 1).

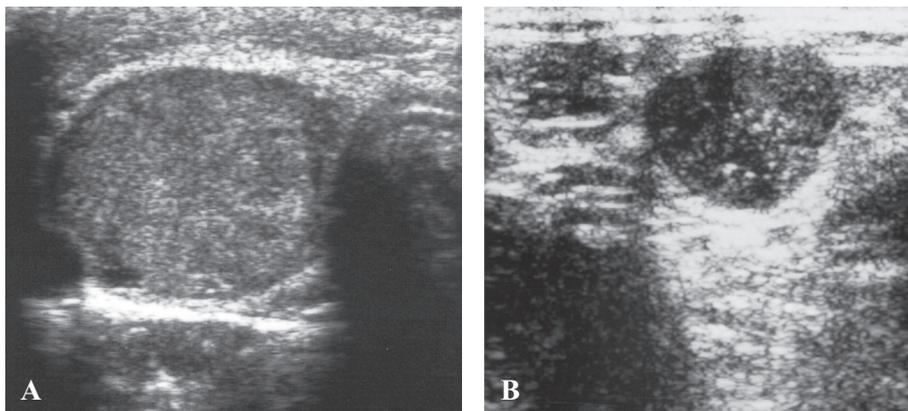


Figura 1. Nodo ipoecogeno (A). Nodo con microcalcificazioni (B).

Macrocalcificazioni sono comunemente riscontrabili in gozzi multinodulari, e sono secondarie a necrosi tissutale. Solitamente sono espressione di benignità, sebbene possano associarsi a malignità quando appaiono assieme a microcalcificazioni o al centro di un nodo ipoecogeno. Le calcificazioni periferiche che circondano il nodo (calcificazione a guscio) sono uno dei pattern più facilmente riscontrabili nei gozzi multinodulari. Sono tuttavia riscontrabili anche nelle lesioni maligne, talvolta con interruzione del guscio calcifico a indicare una invasione del parenchima extranodale⁽¹¹⁾.

I margini del nodo tiroideo possono essere regolari e ben definiti oppure irregolari e microlobati. L'irregolarità dei margini è il risultato del superamento della pseudocapsula del nodo con microinvasione del parenchima circostante. La valutazione dei margini ha una elevata variabilità interoperatore che ne riduce in parte l'utilità diagnostica⁽³²⁾. I dati della letteratura riportano una sensibilità compresa tra il 17.4 e il 77.5% e una specificità compresa tra 38.9 e 85%. Una percentuale significativa di nodi tiroidei benigni infatti può presentare margini mal definiti con macro e microlobulazioni.

L'orletto periferico (halo sign) viene descritto come un sottile anello ipoecogeno che circonda il nodulo, espressione della compressione dei vasi extranodulari. Nelle lesioni maligne, come il carcinoma papillare ed il carcinoma midollare, l'orletto periferico è solitamente assente. L'assenza di halo sign viene pertanto considerata come elemento di forte sospetto, alla stregua della presenza di microcalcificazioni e della marcata ipoecogenicità del nodulo⁽⁹⁾.

La forma del nodo, intesa come rapporto tra diametro anteroposteriore (A) e diametro trasverso (T), è un elemento emerso solo negli ultimi anni quale possibile caratteristica di sospetto, sebbene i dati della letteratura siano ancora in parte contraddittori. L'aspetto più alto che largo (ossia con un rapporto $A/T > 1$) è verosimilmente dovuto alla crescita centrifuga delle lesioni tumorali, che non avviene in maniera uniforme in tutte le dimensioni. Se tale conclusione appare applicabile soprattutto nelle lesioni di piccole dimensioni (diametro massimo < 10 mm), è pur vero che nelle lesioni maggiori il rapporto A/T perde predittività, soprattutto nelle lesioni a struttura mista dove la presenza di raccolte cistiche tende a conferire una forma più sferica anche in lesioni di natura benigna⁽⁵⁾.

Il pattern vascolare che più frequentemente si associa alla malignità è quello di una vascolarizzazione prevalentemente intranodale (Figura 2). Tale aspetto è riscontrato nel 69-74% delle neoplasie tiroidee. Non può essere considerato un segno specifico di malignità, ed il suo peso reale come fattore predittivo è



Figura 2. Vascolarizzazione endonodale tipo B2.

ancora dibattuto. I dati riportati in letteratura rimangono contraddittori, con Autori che ne sottolineano il valore predittivo ed altri che ritengono non aumenti l'accuratezza diagnostica^(10,14,25,27). Frates et al, ad esempio, hanno riportato che la presenza di intensa vascolarizzazione intranodale aumenta di circa il 45% la probabilità di malignità della lesione, ma allo stesso tempo segnalano che l'assenza di vascolarizzazione intranodale non può escludere competamente la malignità, dal momento che il 14% delle lesioni solide avascolari sono risultate di natura maligna⁽¹⁰⁾. D'altra parte una vascolarizzazione prevalentemente perinodale non può escludere completamente la natura maligna di un nodulo tiroideo: Chan et al in uno studio retrospettivo su 55 carcinomi papillare hanno riportato una percentuale di vascolarizzazione perinodale del 22%⁽¹⁷⁾. Il potere predittivo della vascolarizzazione intranodale aumenta quando considerato in associazione con altri elementi ecografici quali la presenza di microcalcificazioni e l'ipoecogenicità, come dimostrato da Rago et al in uno studio del 1998 in cui tale associazione ha mostrato la più alta specificità (97.25%) con un forte potere predittivo (71.1%), sebbene a scapito di una bassa sensibilità (16.6%)⁽²⁷⁾.

NUOVE TECNICHE ECOGRAFICHE

Nonostante l'elevata capacità di individuare e caratterizzare i nodi tiroidei, tanto i parametri b-mode quanto quelli color-power doppler non sono in grado di distinguere con certezza le lesioni maligne da quelle benigne, soprattutto se considerati singolarmente. D'altro canto, l'associazione di più parametri aumenta la specificità a scapito della sensibilità.

Da qui l'esigenza di sviluppare nuove metodiche in grado di incrementare il potenziale diagnostico dell'ecografia tiroidea.

Due metodiche si stanno affermando in tal senso: l'elastografia e l'ecografia con ecoamplificatori.

L'elastografia è una tecnica ultrasonografica introdotta per la prima volta nel 1991, e diventata successivamente modalità di imaging in real-time. Si basa sul principio secondo cui la componente elastica di un tessuto si deforma maggiormente rispetto alla componente rigida in risposta alla compressione esercitata sul tessuto stesso da parte di una forza esterna⁽²⁴⁾. In ambito ecografico, il grado di deformazione, o elasticità, può essere quantificato misurando il livello di distorsione dell'onda ultrasonora in risposta a movimenti perpendicolari di compressione e rilasciamento esercitati dalla sonda ecografica in maniera leggera ma costante sul tessuto in esame. Il modulo elastografico riproduce in real-time l'analisi della deformabilità

del tessuto, rappresentandola mediante una scala cromatica predefinita e sovrapponendola all'immagine B-mode. .

Numerosi organi si prestano alla valutazione elastografica. Mammella, prostata, utero, tessuti muscolo-scheletrici sono stati analizzati mediante elastografia con buoni risultati in termini di sensibilità e predittività^(15-17,30). Un principio simile all'elastografia (Fibroscan) trova ormai applicazione routinaria nell'ambito della patologia epatica⁽⁶⁾.

In ambito tiroideo la prima applicazione è di Lyshchik et al nel 2005⁽¹⁹⁾, ma è solo a partire dal 2007, con l'introduzione del modulo elastografico in real-time con sistema di autocorrelazione combinata (CAM), che riduce al minimo gli artefatti dovuti allo spostamento laterale della sonda, che avviene la diffusione su ampia scala. Rago et al, in uno studio su 92 nodi singoli in attesa di tiroidectomia per disturbi compressivo o sospetto di malignità all'esame citologico, ha riportato per l'elastografia una sensibilità del 97% e una specificità del 100%, indipendentemente dalle dimensioni del nodo in esame⁽²⁸⁾. Da allora sono stati pubblicati diversi studi, sia su nodi in attesa di tiroidectomia sia su nodi analizzati solamente con esame citologico: i risultati sono concordi nel confermare l'elevata predittività dell'elastografia, tuttavia ampi studi prospettici sono necessari per valutare in modo più accurato la potenzialità diagnostica dell'elastografia nell'ambito della patologia nodulare tiroidea⁽³⁾. La nostra esperienza con l'elastografia si riferisce a 115 pazienti in attesa di tiroidectomia (92 F e 23 M, età media 54 ± 13.37), per un totale di 132 nodi analizzati. Come per lo studio di Rago et al, anche nella nostra casistica le indicazioni all'intervento erano la presenza di sintomi compressivi o il sospetto citologico di malignità. I nodi analizzati mediante elastografia sono stati suddivisi in 4 categorie, in base al grado crescente di rigidità del nodo (score 1: nodo completamente elastico, score 2: nodo prevalentemente elastico, score 3: nodo prevalentemente rigido, score 4: nodo completamente rigido). All'istologico, 40 nodi sono risultati maligni e 92 benigni. Dal punto di vista dell'elastografico, 34 dei 40 nodi maligni sono stati classificati con score 3 o 4, mentre 77 dei 92 nodi benigni sono stati classificati con score 1 o 2, per una sensibilità complessiva dell'85%, una specificità dell'83.7%, un potere predittivo positivo del 69.3% e negativo del 92.7% e una accuratezza diagnostica dell'84.1%. Rapportata all'ecografia convenzionale e all'ecocolordoppler mediante regressione logistica, l'elastografia ha dimostrato maggior potere predittivo (p 0.0002, OR 29.09), seguita dalla presenza di microcalcificazioni (p 0.0003, OR 26.89).

La seconda metodica ecografica che si sta diffondendo anche allo studio della tiroide è quella basata sull'utilizzo dell'ecoamplificatore. Essa si pone

come obiettivo la valutazione della microcircolazione dei nodi, non valutabile mediante tecniche tradizionali di color- e powerdoppler. L'ecografia con ecoamplificatore consiste nell'iniezione di un bolo endovenoso di microbolle (circa 10 μm) composte da gas inerti fluorurati ad elevato peso molecolare avvolti in una capsula fosfolipidica. Una volta iniettate nel circolo ematico, diffondono rapidamente in tutti i vasi, inclusi i capillari, generando un aumento di contrasto (ecoamplificazione). L'applicazione in ambito ecografico si basa sul presupposto che le lesioni neoplastiche abbiano una vascolarizzazione endonodale piú intensa, piú caotica e tortuosa rispetto ai nodi di origine benigna (Figura 3). I primi studi con ecoamplificatore hanno mostrato pattern differenti tra nodi benigni e nodi maligni, con i primi che tendono a mostrare un enhancement periferico ad anello, mentre i secondi mostrano un enhancement piú eterogeneo^(2,33).

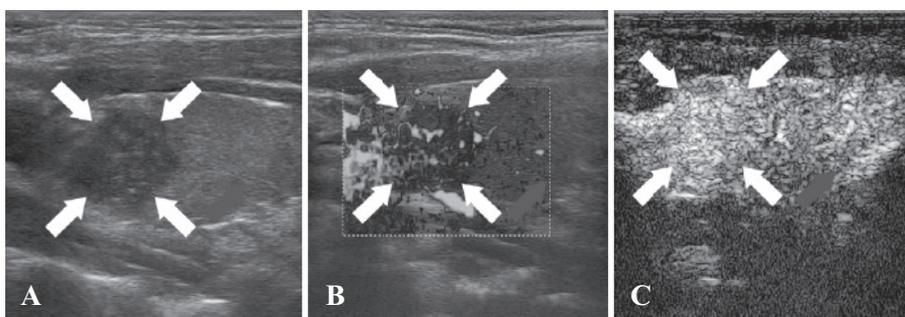


Figura 3. Confronto tra ecografia B-mode, ecocolordoppler ed ecografia con ecoamplificatore in un caso di carcinoma papillare della tiroide.

Recentemente abbiamo condotto, in collaborazione con il Dipartimento di Elettronica del Politecnico di Torino, uno studio preliminare sulla microvascolarizzazione delle lesioni nodulari tiroidee partendo dalla ricostruzione 3-D della vascolarizzazione intranodale dopo iniezione dell'ecoamplificatore⁽²¹⁾. Sono stati analizzati 20 nodi in attesa di intervento chirurgico. All'istologico 10 nodi sono risultati benigni e 10 maligni. Ciascun nodo è stato sottoposto a scansione B-mode e color-doppler, quindi, dopo iniezione endovenosa dell'ecoamplificatore, si è proceduto all'acquisizione del volume in esame. Le immagini sono state quindi trasferite ad un computer e processate. Il processo di elaborazione consente di ottenere la skeletonizzazione del nodo, ossia la riduzione di un volume ad una struttura piú semplice che mantenga le informazioni riguardanti la morfologia e la

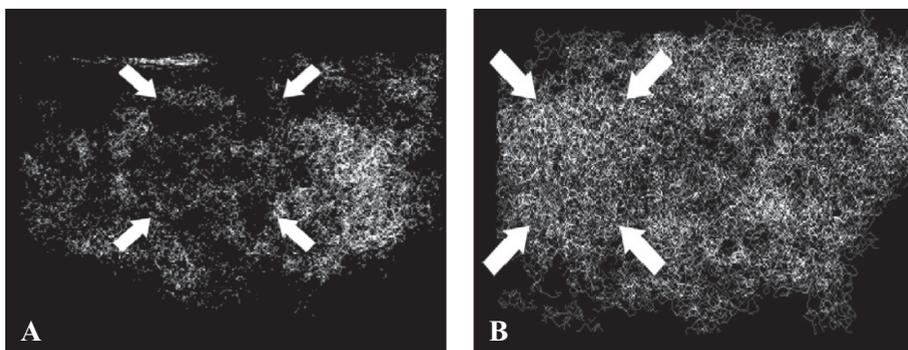


Figura 4. Skeleton di un nodo di struma (A) e di carcinoma papillifero (B).

connettività dell'oggetto originale (Figura 4). Tale tecnica consente di delineare il percorso 3D dei vasi all'interno della lesione, da cui sono stati estratti 7 parametri quantitativi indicativi (numero di alberi vascolari principali e numero di diramazioni secondarie, densità vascolare, calibro medio dei vasi, tortuosità sviluppata nel piano e nello spazio, indice di inflessione dei vasi). Dall'analisi dei nodi selezionati per lo studio è emersa una differenza statisticamente

	nodi benigni (media ± DS)	nodi maligni (media ± DS)
Numero alberi vascolari	33.2 ± 27.4	76.0 ± 38.8 *
Densità di vascolarizzazione	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.01 *
Numero di diramazioni	659.0 ± 982.8	1385.0 ± 797.7 *
Raggio medio dei vasi	1.8 ± 1.1	1.9 ± 1.1
Tortuosità nel piano	20.8 ± 18.4	47.0 ± 24.7
Indice di inflessione	9.5 ± 6.2	20.5 ± 11.7
Tortuosità nello spazio	10.8 ± 7.3	25.9 ± 13.4 *

Tabella II. Parametri quantitativi di microvascolarizzazione: distinzione tra nodi benigni e nodi maligni (con indicazione delle differenze significative).

significativa tra nodi benigni e maligni per alcune delle caratteristiche esaminate (numero degli alberi vascolari, numero di diramazioni, densità vascolare, tortuosità nello spazio), a confermare per la prima volta in maniera oggettiva la vascolarizzazione “anarchica” delle lesioni maligne (Tabella II) È attualmente in corso una estensione dello studio su una più ampia casistica per valutare la possibilità di applicazione nella pratica clinica.

ECOGRAFIA INTERVENTISTICA

Oltre che per il suo ruolo diagnostico di individuazione e caratterizzazione dei nodi tiroidei, l'ecografia viene utilizzata come guida per procedure miniinvasive quali alcoolizzazione percutanea e tecniche di termoablazione mediante laser o radiofrequenza. L'alcoolizzazione percutanea era stata inizialmente introdotta per il trattamento di nodi iperfunzionanti e successivamente applicata con successo anche su nodi solidi normofunzionanti, in particolare quelli a struttura mista con prevalente componente liquida. L'iniezione di etanolo sterile al 95%, previa aspirazione della quota liquida, induce trombosi dei vasi intra- e perinodali e conseguente necrosi coagulativa che evolve verso una progressiva riduzione della vascolarizzazione con sclerosi intranodale, ispessimento fibrotico della capsula e comparsa di microcalcificazioni confluenti^(12,29). L'alcolizzazione percutanea viene considerata a tutt'oggi il trattamento di prima scelta per le lesioni cistiche.

La termoablazione laser percutanea ecoguidata è un intervento ambulatoriale in grado di ridurre di oltre il 50% il volume dei noduli tiroidei. Consiste nel posizionamento di sottili fibre ottiche (diametro 300 µm) all'interno del nodulo attraverso cui viene convogliato un raggio laser Nd:YAG (lunghezza d'onda 1064 µm). Il passaggio di energia dalla fibra ottica al tessuto intranodale induce un danno termico che determina una necrosi coagulativa pressoché istantanea. Il successivo riassorbimento del tessuto distrutto dal laser determina una progressiva riduzione volumetrica che richiede alcuni mesi ed è massima ad un anno dal trattamento. L'intervento è ben tollerato, richiede solo una analgesia superficiale e consente di distruggere sino ad un massimo di 30 ml in una singola seduta. Valcavi et al in uno studio su 122 pazienti sottoposti a termoablazione laser e seguiti per 3 anni dopo il trattamento hanno riportato una riduzione di volume media del 47.8% rispetto al volume iniziale (da 23.1 ml a 12.5 ml, $p < 0.001$). Il 73% dei pazienti ha riportato un miglioramento dei disturbi compressivi e il 71.3% un miglioramento dal punto di vista estetico. Tutti i pazienti, tranne 4, sono rimasti eutiroidei (2 pazienti hanno sviluppato ipotiroidismo, entrambe

AbTPO positivi pre-trattamento e 2 hanno sviluppato ipertiroidismo, di cui uno solo transitoriamente)⁽³¹⁾.

La termoablazione mediante radiofrequenza sfrutta anch'essa la necrosi tissutale indotta dal danno termico per indurre riduzione volumetrica della formazioni nodulari trattate, ma si differenzia dall'ablazione mediante laser sia per il tipo di energia utilizzata (corrente elettrica alternata ad alta frequenza) sia per il tipo di elettrodo. Sono stati utilizzati sia aghi da 14-17 gauge dotati di uncini singoli o multipli estraibili, che migliorano la stabilità dell'elettrodo all'interno del nodo e consentono di trattare un volume maggiore, sia aghi di 18 gauge con raffreddamento interno. Per la termoablazione tiroidea con radiofrequenza si possono utilizzare due differenti tecniche operative: la tecnica con ago fermo ("fixed-needle technique") e la tecnica con ago in movimento ("moving-shot technique"). La tecnica "moving-shot" e di più recente introduzione, utilizza aghi appositi di minor calibro (18 gauge) e pare più promettente in termini di riduzione volumetrica dei nodi trattati, anche se non sono disponibili lavori di confronto diretto tra le due metodiche operative (Figura 5)⁽¹⁾.

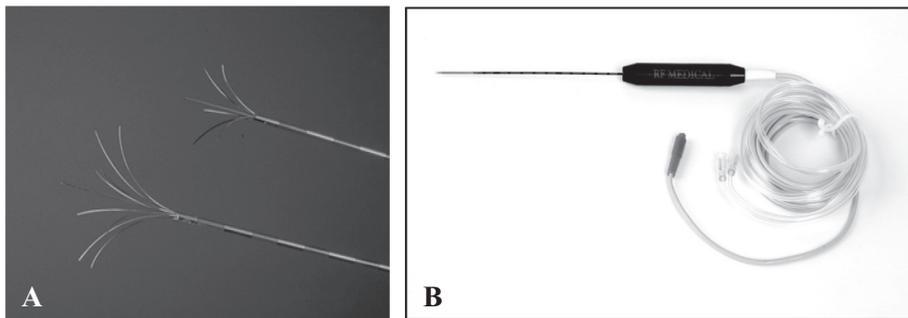


Figura 5. A: Ago RITA Starbust 14G a 9 punte (RITA Medical Systems, Mountain View, California); B: Ago 18G a punta raffreddata (RF Medical Co., Ltd, Gasan-Dong, Geumcheon-Gu Seoul, Korea).

Tra il 2005 e il 2007 abbiamo sottoposto a termoablazione mediante radiofrequenza 57 pazienti (16 M - 41 F, età 28-88 aa, media 63.6 aa) con nodi solidi compressivi o iperfunzionanti che rifiutavano o presentavano controindicazioni alla terapia chirurgica o radiometabolica con I^{131} , per un totale di 59 nodi trattati. Tutti i nodi sono stati sottoposti ad agobiopsia ecoguidata prima del trattamento al fine di confermarne la natura benigna. La termoablazione è stata effettuata utilizzando un ago RITA[®] Starbust con 9

punte estraibili; il tempo totale di esposizione è stato di 6-10 minuti a 95°C per ogni area del nodo trattata (durata massima del trattamento 30 minuti). Ciascun paziente è stato sottoposto ad un'unica seduta ablativa. Come per la termoablazione laser, è stata somministrata solo un'anestesia locale ed il trattamento è avvenuto ambulatorialmente. Il volume basale medio era 34.5 ml. Il follow-up ecografico è stato condotto a 1, 3, 6 e 12 mesi dopo trattamento. Come per il trattamento laser, anche con la termoablazione mediante radiofrequenza si assiste a una progressiva riduzione volumetrica che è massima ad un anno dal trattamento: 26.4 ml a 1 mese (-29.5% vs basale; $p < 0.001$), 23.1 ml a 3 mesi (-41.0%; $p < 0.001$), 22.3 ml a 6 mesi (-44.5%; $p < 0.001$), 18.6 ml a 12 mesi (-48.4%; $p < 0.001$)⁽⁸⁾ (Figura 6).

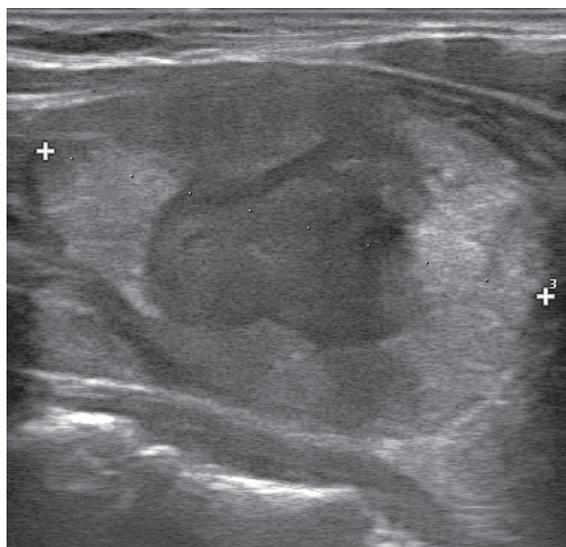


Figura 6. Controllo a 3 mesi in nodo di struma sottoposto a trattamento di termoablazione mediante radiofrequenza.

Da circa un anno anche nel nostro centro abbiamo iniziato ad utilizzare la radiofrequenza con tecnica “moving-shot”, messa a punto da JH Baek in Corea, che prevede l’uso di un ago più sottile che viene mosso continuamente all’interno del nodo, in modo da ottenere un trattamento diffuso a tutto il nodo; questo riduce ulteriormente l’invasività della metodica e, sulla base dei primi dati in nostro possesso, sembra più efficace in termini di riduzione volumetrica dei nodi trattati.

CONCLUSIONI

I notevoli avanzamenti tecnologici e l'affinamento della metodica, rendono l'ecografia tiroidea un formidabile strumento a disposizione del clinico. All'esame ecografico non si chiede più soltanto di dimostrare la presenza o meno di lesioni nodulari, ma di fornire informazioni sulla loro natura e di segnalare le lesioni che potrebbero beneficiare di un approfondimento citologico. Per quanto nessun parametro ultrasonografico preso singolarmente goda di una sensibilità e di un potere predittivo sufficientemente elevati, è ormai evidente come l'associazione di più parametri sia in grado di indirizzare il clinico sulla natura della lesione in esame. In tale contesto, lo sviluppo di nuove metodiche quali l'elastografia e l'ecografia con ecoamplificatore si inserisce con lo scopo di fornire nuove informazioni sulla natura delle lesioni nodulari tiroidee e di incrementare l'accuratezza diagnostica dell'esame ecografico. Infine, accanto al suo ruolo diagnostico, l'ecografia ha consentito lo sviluppo di tecniche mininvasive per il trattamento della patologia nodulare tiroidea. Le tecniche termoablative mediante laser e radiofrequenza rappresentano infatti opzioni terapeutiche che, per quanto di introduzione più recente, hanno ormai dimostrato una eccellente sicurezza, unita al vantaggio di poter essere praticate, ad un costo più contenuto rispetto alla chirurgia, in regime ambulatoriale; esse si propongono quindi come valida alternativa alla chirurgia, se non addirittura come trattamento elettivo per noduli tiroidei benigni compressivi in pazienti a maggior rischio chirurgico.

BIBLIOGRAFIA

1. Baek JH, Lee JH, Valcavi R, Pacella CM, Rhim H, Na DG: *Thermal ablation for benign thyroid nodules: radiofrequency and laser*. Korean J. Radiol. 2011; 12: 525-540.
2. Bartolotta TV, Midiri M, Galia M, Runza G, Attard M, Savoia G, Lagalla R, Cardinale AE: *Qualitative and quantitative evaluation of solitary thyroid nodules with contrast-enhanced ultrasound: initial results*. Eur. Radiol. 2006; 16: 2234-2341.
3. Bojunga J, Herrmann E, Meyer G, Weber S, Zeuzem S, Friedrich-Rust M: *Real-time elastography for the differentiation of benign and malignant thyroid nodules: a meta-analysis*. Thyroid. 2010; 20: 1145-1150.
4. Cappelli C, Castellano M, Pirola I, Cumetti D, Agosti B, Gandossi E, Agabiti Rosei E: *The predictive value of ultrasound findings in the management of thyroid nodules*. QJM. 2007; 100: 29-35.
5. Cappelli C, Pirola I, Cumetti D, Micheletti L, Tironi A, Gandossi E, Martino E, Cherubini L, Agosti B, Castellano M, Mattanza C, Rosei EA: *Is the anteroposterior and transverse diameter ratio of nonpalpable thyroid nodules a sonographic criteria for recommending fine-needle aspiration cytology?* Clin. Endocrinol. (Oxf) 2005; 63:689-693.
6. Castéra L, Le Bail B, Roudot-Thoraval F, Bernard PH, Foucher J, Merrouche W, Couzigou P, de Lédinghen V: *Early detection in routine clinical practice of cirrhosis and oesophageal varices in chronic hepatitis C: comparison of transient elastography (FibroScan) with standard laboratory tests and non-invasive scores*. J. Hepatol. 2009; 50: 59-68.
7. Chan BK, Desser TS, McDougall IR, Weigel RJ, Jeffrey RB Jr: *Common and uncommon sonographic features of papillary thyroid carcinoma*. J. Ultrasound. Med. 2003; 22:1083-1090.
8. Deandrea M, Limone P, Basso E, Mormile A, Ragazzoni F, Gamarra E, Spiezia S, Faggiano A, Colao A, Molinari F, Garberoglio: *US-guided percutaneous radiofrequency thermal ablation for the treatment of solid benign hyperfunctioning or compressive thyroid nodules*. Ultrasound Med. Biol. 2008; 34: 784-791.
9. Frates MC, Benson CB, Charboneau JW, Cibas ES, Clark OH, Coleman BG, Cronan JJ, Doubilet PM, Evans DB, Goellner JR, Hay ID, Hertzberg BS, Intenzo CM, Jeffrey RB, Langer JE, Larsen PR, Mandel SJ, Middleton WD, Reading CC, Sherman SI, Tessler FN: *Society of Radiologists in Ultrasound. Management of thyroid nodules detected at US: Society of Radiologists in Ultrasound consensus conference statement*. Radiology 2005; 237: 794-800.
10. Frates MC, Benson CB, Doubilet PM, Cibas ES, Marqusee E: *Can color Doppler sonography aid in the prediction of malignancy of thyroid nodules?* J. Ultrasound Med. 2003; 22: 127-131.
11. Frates MC, Benson CB, Doubilet PM, Kunreuther E, Contreras M, Cibas ES, Orcutt J, Moore FD Jr, Larsen PR, Marqusee E, Alexander EK: *Prevalence and distribution of carcinoma in patients with solitary and multiple thyroid nodules on sonography*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2006; 91: 3411-3417.
12. Guglielmi R, Pacella CM, Bianchini A, Bizzarri G, Rinaldi R, Graziano FM, Petrucci L, Toscano V, Palma E, Poggi M, Papini E: *Percutaneous ethanol injection treatment in benign thyroid lesions: role and efficacy*. Thyroid. 2004; 14: 125-131.
13. Hegedüs L: *Clinical practice. The thyroid nodule*. NEJM 2004; 351:1764-1771.

14. Iannuccilli JD, Cronan JJ, Monchik JM: *Risk for malignancy of thyroid nodules as assessed by sonographic criteria: the need for biopsy*. J. Ultrasound. Med. 2004; 23:1455-1464.
15. Itoh A, Ueno E, Tohno E, Kamma H, Takahashi H, Shiina T, Yamakawa M, Matsumura T: *Breast disease: clinical application of US elastography for diagnosis*. Radiology 2006; 239: 341-350.
16. Kamoi K, Okihara K, Ochiai A, Ukimura O, Mizutani Y, Kawauchi A, Miki T: *The utility of transrectal real-time elastography in the diagnosis of prostate cancer*. Ultrasound Med. Biol. 2008; 35:1025-1032.
17. Klausner AS, Peetrons P: *Developments in musculoskeletal ultrasound and clinical applications*. Skeletal Radiol. 2009; 35: 125-131.
18. Kovacevic DO, Skurla MS: *Sonographic diagnosis of thyroid nodules: correlation with the results of sonographically guided fine-needle aspiration biopsy*. J. Clin. Ultrasound. 2007; 35: 63-67.
19. Lyschchik A, Higashi T, Asato R, Tanaka S, Ito J, Mai JJ, Pellot-Barakat C, Insana MF, Brill AB, Saga T, Hiraoka M, Togashi K: *Thyroid gland tumor diagnosis at US elastography*. Radiology. 2005; 237: 202-211.
20. Mazzaferri EL: *Management of a solitary thyroid nodule*. NEJM 1993; 328: 553-559.
21. Molinari F, Mantovani A, Deandrea M, Limone P, Garberoglio R, Suri JS: *Characterization of single thyroid nodules by contrast-enhanced 3-D ultrasound*. Ultrasound Med. Biol. 2010; 36: 1616-1625.
22. Moon WJ, Jung SL, Lee JH, Na DG, Baek JH, Lee YH, Kim J, Kim HS, Byun JS, Lee DH; Thyroid Study Group, Korean Society of Neuro- and Head and Neck Radiology: *Benign and malignant thyroid nodules: US differentiation - multicenter retrospective study*. Radiology 2008; 247: 762-770.
23. Nam-Goong IS, Kim HY, Gong G, Lee HK, Hong SJ, Kim WB, Shong YK: *Ultrasonography-guided fine-needle aspiration of thyroid incidentaloma: correlation with pathological findings*. Clin. Endocrinol. (Oxf) 2004; 60: 21-28.
24. Ophir J, Alam SK, Garra B, Kallel F, Konofagou E, Krouskop T, Varghese T: *Elastography: ultrasonic estimation and imaging of the elastic properties of tissues*. Proc. Inst. Mech. Eng. H. 1999; 213: 203-233.
25. Papini E, Guglielmi R, Bianchini A, Crescenzi A, Taccogna S, Nardi F, Panunzi C, Rinaldi R, Toscano V, Pacella CM: *Risk of malignancy in nonpalpable thyroid nodules: predictive value of ultrasound and color-Doppler features*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2002; 87: 1941-6.
26. Popowicz B, Klencki M, Lewiński A, Słowińska-Klencka D: *The usefulness of sonographic features in the selection of thyroid nodules for biopsy in relation to the nodule's size*. Eur. J. Endocrinol. 2009; 161: 103-111.
27. Rago T, Vitti P, Chiovato L, Mazzeo S, De Liperi A, Miccoli P, Viacava P, Bogazzi F, Martino E, Pinchera A: *Role of conventional ultrasonography and color flow-doppler sonography in predicting malignancy in "cold" thyroid nodules*. Eur. J. Endocrinol. 1998; 138: 41-46.
28. Rago T, Santini F, Scutari M, Pinchera A, Vitti P: *Elastography: new developments in ultrasound for predicting malignancy in thyroid nodules*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2007; 92: 2917-2922.

29. Tarantino L, Francica G, Sordelli I, Sperlongano P, Parmeggiani D, Ripa C, Parmeggiani U: *Percutaneous ethanol injection of hyperfunctioning thyroid nodules: long-term follow-up in 125 patients*. Am. J. Roentgenol. 2008; 190: 800-808.
30. Thomas A, Kümmel S, Gemeinhardt O, Fischer T: *Real-time sonoelastography of the cervix: tissue elasticity of the normal and abnormal cervix*. Acad. Radiol. 2007; 14: 193-200.
31. Valcavi R, Riganti F, Bertani A, Formisano D, Pacella CM: *Percutaneous laser ablation of cold benign thyroid nodules: a 3-year follow-up study in 122 patients*. Thyroid. 2010; 20: 1253-1261.
32. Wienke JR, Chong WK, Fielding JR, Zou KH, Mittelstaedt CA: *Sonographic features of benign thyroid nodules: interobserver reliability and overlap with malignancy*. J. Ultrasound Med. 2003; 22: 1027-1031.
33. Zhang B, Jiang YX, Liu JB, Yang M, Dai Q, Zhu QL, Gao P: *Utility of contrast-enhanced ultrasound for evaluation of thyroid nodules*. Thyroid. 2010; 20: 51-57.

PARAMETRI CLINICO PATOLOGICI DEL LINFONODO SENTINELLA NEL MELANOMA CUTANEO

Premio “Giampiero Gaidano”

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

*Simone Ribero, Giuseppe Macripò,
Anna Sapino, Maria Grazia Bernengo*

Dipartimento di Scienze Biomediche ed Oncologia Umana
Presidio Ospedaliero San Lazzaro - AOU San Giovanni Battista Molinette

Key words: *Sentinel Lymph node / Linfonodo sentinella
Melanoma / Melanoma
SLN index risk / SLN indice di rischio*

Abstract:

Objective: Significant morbidity is associated to Completion Lymph Node Dissection (CLND) practiced for melanoma patients with positive Sentinel Lymph Node (SLN). So we tried to find the variable more predictable on NSLN involvement and overall survival (OS).

Methods: A retrospective review of 603 patients submitted to SLNB between 2000 and 2009 was done. 100 SLN resulted positive. Demographic variables, primary melanoma, SLN features and result of CLND were analysed with Logistic regression and OS analysis. A SLN index risk was performed.

Results: Breslow, ulceration and micro-/macrometastatic pattern of invasion carried an independent likelihood on NSLN involvement; Starz classification did not maintain a statistical role in multivariate analysis. SLN index risk based on number of positive SLN, micro/macro pattern of invasion and Starz resulted predictive on NSLN involvement and OS.

Conclusion: Our study suggests a clinically useful and easily applicable means of identifying patients with an unfavourable disease course.

Riassunto:

Obiettivo: La CLND è l'attuale pratica in pazienti con SLN positivo da melanoma, ma non è scevra da rischi, quindi abbiamo cercato quali parametri influenzino effettivamente il coinvolgimento dei NSLN e la sopravvivenza.

Metodi: Dal 2000 al 2009 sono stati sottoposti a SLNB 603 pazienti, dei quali 100 risultarono positivi. Le variabili demografiche, il melanoma e le caratteristiche del SLN sono state poste in relazione al coinvolgimento dei NSLN con regressioni logistiche e all'analisi della sopravvivenza.

Risultati: Il Breslow, l'ulcerazione, e il pattern micro/macrometastasi risultavano indipendenti sul coinvolgimento dei NSLN; lo Starz non manteneva una significatività all'analisi multivariata. Il SLN index risk basato sul numero di SLN positivi, micro/macro pattern di invasione e lo Starz risultava significativamente predittivo sul coinvolgimento dei NSLN e sulla sopravvivenza.

Conclusioni: il nostro studio suggerisce un'utilità clinica e un modo facilmente applicabile di selezionare pazienti da sottoporre a CLND e da inserire in un follow-up più ristretto.

INTRODUZIONE

Fin dall'introduzione della biopsia del SLN da parte di Morton et al.⁽⁸⁾ nei primi anni 90 per i pazienti con melanoma cutaneo, questa tecnica è stata utilizzata come standard diagnostico. La biopsia del linfonodo sentinella (SLNB) resta al momento il più accurato metodo di staging per la precoce individuazione delle metastasi linfonodali regionali. Le micrometastasi sono prognosticamente significative nel melanoma⁽⁵⁾ e sono state inserite nel American Joint Committee on Cancer (AJCC) Classification⁽¹⁾. Il ritrovamento di un SLN positivo identifica pazienti che potrebbero beneficiare di una CLND.

Nonostante ciò solo dal 14 al 28%^(3,6,7,10,13) dei pazienti con SLN positivo presenterà metastasi nei NSLN del bacino interessato, sottoponendo la restante parte ad un trattamento potenzialmente superfluo e non totalmente scevro da complicanze e rischi^(11,12,14,17,18). Infatti teoricamente solo i pazienti con coinvolgimento di altri NSLN beneficiano del trattamento di CLND.

L'obiettivo del nostro studio è stato quello di individuare quali caratteristiche clinico patologiche del melanoma primitivo e del SLN siano predittive sul coinvolgimento dei NSLN e che mantengano un ruolo prognostico sul decorso clinico.

MATERIALI E METODI

La biopsia del SLN è stata effettuata in 603 pazienti con melanoma cutaneo nel nostro dipartimento dal Gennaio 2000 al Marzo 2009. Di questi, 100 sono risultati positivi alla ricerca di metastasi. I pazienti sono stati selezionati in base alle linee guida^(1,2,9,15). La biopsia del SLN è stata effettuata in quei pazienti con melanoma > 1 mm, o con dimensioni minori ma presenza di fattori prognostici negativi come ulcerazione, Clark IV-V, o presenza di mitosi maggiori o uguali a 1 per mm². La SLNB non è stata effettuata a pazienti con più di 75 anni. In accordo con le linee guida italiane è stata effettuata una corretta valutazione radiologica per l'eventuale reperimento di metastasi occulte viscerali che avrebbero quindi reso non corretta la biopsia del SLN.

Il SLN è reperito mediante linfoscintigrafia e iniezione intraoperatoria di blu patent. Un numero mediano di 2 SLN (range 1-4) è stato asportato, successivamente i linfonodi sono stati fissati in formaldeide e bisecati sull'asse lungo della regione ilare per poi esser fissati in blocchetti di paraffina⁽⁴⁾. I vetrini sono preparati secondo l'istopatologia convenzionale (ematossilina-eosina) e immunoistochimica (S-100 e HMB-45). Il pattern del coinvolgimento del SLN è stato definito come macro o microscopico sulla base della presenza o dell'assenza di un'estensione extracapsulare⁽¹⁾.

Il “tumour penetrative depth” è stato misurato con un occhiale micrometrico come la massima distanza dalla capsula delle cellule tumorali che penetrano nel parenchima linfonodale come descritto da Starz et al.⁽¹⁶⁾ La presenza di cellule tumorali fino a 0.3 mm è definita come Starz I, tra 0.3 e 1 mm come Starz II e maggiori di 1 mm come Starz III. I NSLN sono solo analizzati con l’ematossilina eosina.

Le caratteristiche dei pazienti includono i dati demografici (sesso ed età), le caratteristiche istologiche del melanoma primitivo (spessore di Breslow, livello di Clark, sottotipo istologico, ulcerazione), caratteristiche del SLN: numero di SLN prelevati, numero di SLN positivi, localizzazione del SLN (capo/collo, ascella, inguine), pattern di invasione (micro/macrometastasi), profondità di invasione dalla capsula (Starz Classification⁽¹⁶⁾).

L’analisi statistica è stata effettuata con il programma Stata. Sono state applicate regressioni logistiche univariate e multivariate per valutare la predittività sul coinvolgimento dei NSLN. L’OS è stato calcolato dalla data dell’escissione chirurgica del SLN fino alla data della morte o dell’ultimo controllo per ciascun paziente.

RISULTATI

Le caratteristiche dei pazienti in riferimento al coinvolgimento dei NSLN è fornito in Tabella I.

La regressione logistica univariata mostrava che i parametri con un più alto rischio di coinvolgimento dei NSLN erano lo spessore di Breslow (OR = 1.52), l’ulcerazione (OR = 4.59), il pattern micro/macrometastasi (OR = 6.42) e la classificazione di Starz (OR = 2.32). La più alta percentuale di coinvolgimento dei NSLN è stata riscontrata nei pazienti con spessore di Breslow > 4 mm (52%), ulcerazione (53.6%), pattern macrometastasi (70%) e stadio III secondo Starz (40%).

L’analisi multivariata di regressione logistica mostrava il valore indipendente dello spessore di Breslow, ulcerazione, pattern micro/macrometastasi, mentre la Classificazione di Starz non manteneva la significatività all’analisi multivariata. Solo un paziente (4.3%) senza fattori prognostici negativi (spessore di Breslow < 2 mm, non ulcerato, SLN micrometastasi) mostrava coinvolgimento dei NSLN, la percentuale sale al 33% con un fattore prognostico e al 55.9% per due o più fattori prognostici ($p < 0.0001$, OR = 4.4, intervallo di confidenza 2.1-9.0).

Per quanto riguarda lo studio di sopravvivenza, il follow-up mediano è di 2.5 anni (range: 6 mesi- 9.6 anni). L’analisi univariata sull’OS è stato sviluppato per tutti i parametri riportati nella Tabella I.

		NSLN negativi (N = 69)	NSLN positivi (N = 31)	p value
<i>Parametri clinici</i>				
Genere	F	29	12	NS
	M	40	19	
Età mediana		54	55	NS
<i>Melanoma primitivo</i>				
Tipo di melanoma	Superficial spreading	53	17	NS
	Acrale	4	2	
	Nodulare	10	12	
	Lentigo maligna	2	0	
Breslow	Mediano	2,92 ± 1,48	4,23 ± 2,11	< 0.001
	1,01 - 2 mm	23	3	0.008
	2,01 - 4 mm	34	15	
	> 4 mm	12	13	
Livello di Clark	III	26	6	NS
	IV	38	22	
	V	5	3	
Ulcerazione	Si	13	15	0.005
	No	56	16	
Localizzazione	Testa/collo	6	2	NS
	Tronco	30	12	
	Arti	33	17	

Tabella I. Caratteristiche dei pazienti in accordo con il coinvolgimento dei NSLN (continua →).

		NSLN negativi (N = 69)	NSLN positivi (N = 31)	p value
<i>Sentinel lymph node (SLN)</i>				
Numero di SLN	1	30	15	NS
	> 1	39	16	
Numero di pazienti con SLN	collo	6	3	NS
	ascella	33	9	
	inguine	30	19	
Numero di linfonodi ottenuti alla CLND	1 - 10	9	5	NS
	11 - 20	33	16	
	21 - 30	17	5	
	> 30	10	5	

<i>Tumor burden</i>				
	Cut-off	NSLN negativi (N = 69)	NSLN positivi (N = 31)	p value
Numero di SLN positivi	1	55	22	NS
	> 1	14	9	
Pattern di invasione del SLN	micrometastasi	66	24	0.0049
	macrometastasi	3	7	
Starz	SI	17	1	0.025
	SII	22	10	
	SIII	30	20	

Tabella I. (← segue).

L'analisi univariata sull'OS mostra che le variabili con un significato statistico prognostico erano le stesse ritrovate associate con un maggior percentuale di coinvolgimento dei NSLN, in particolare Breslow > 2 mm (tasso a 5 anni: 87.4% vs 50.8%, $p = 0.0069$), ulcerazione (tasso a 5 anni: 67.9% vs 41.3%, $p = 0.0495$) e pattern micro/macrometastasi (63.1% vs 35%, $p = 0.0190$) (Figura. 1).

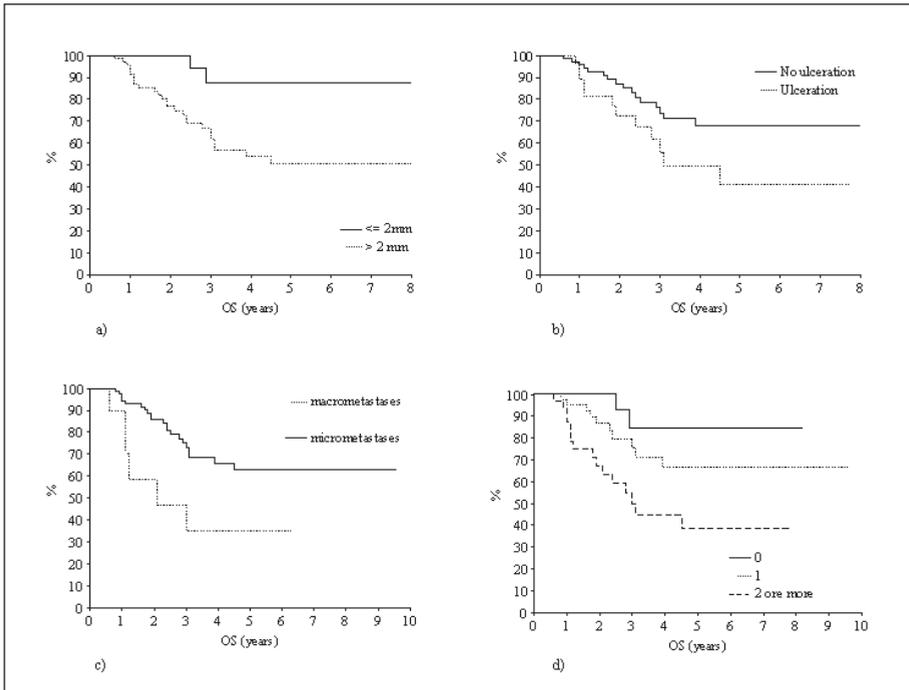


Figura 1.

Sulla base dell'analisi univariate, i tre fattori prognostici delle caratteristiche del SLN sono stati raggruppati in un cosiddetto "SLN index risk". I pazienti sono stati stratificati assegnando 1 punto per la presenza di più di un SLN positivo, macrometastasi e Starz = III.

Il SLN index risk era significativamente associato con una più alta percentuale di coinvolgimento dei NSLN ($P = 0.0356$), con un HR di 1.9 (intervallo di confidenza 1.0 - 3.6). Il modello di regressione logistica multivariata ha confermato che il SLN index risk ha una rilevanza prognostica indipendente sul coinvolgimento dei NSLN corretto per lo spessore di Breslow e l'ulcerazione (Tabella II).

Regressione logistica univariata	p	OR	95 CI
N° SLN	Ns	1.6071	0.6077 4.2501
Micro/macro	0.010	6.4167	1.5341 26.8387
Starz	0.05	2.3636	0.9840 5.6773
SLN index risk	0.0356	1.9223	1.0336 3.5753

Regressione logistica multivariata	p	OR	95 CI
Breslow	0.05	1.0029	0.9999 1.0059
Ulcerazione	0.013	3.6995	1.3098 10.4497
SLN index risk	0.0029	2.6442	1.3948 5.0125

Tabella II. SLN index risk.

Il SLN index risk è stato anche analizzato sulla base del OS. L'OS ($p < 0.0009$) dei pazienti con un indice di rischio di 2 o più era significativamente più basso (34.7%) quando comparato con quei pazienti con 0 o 1 (68.9% e 62.0% rispettivamente).

La Tabella III riporta i risultati dell'analisi multivariate sull'OS, nella quale il Breslow, l'ulcerazione, il SLN index risk sono state messe a confronto.

Cox regression Multivariata	SE	HR	95% CI	p
Breslow	0.0012	1.0040	1.0017 1.0064	0.0008
Ulceration	0.4902	1.1929	0.4564 3.1180	ns
SLN index risk	0.2706	1.7244	1.0145 2.9309	0.0441

Tabella III. Analisi Multivariata sull'OS.

L'analisi multivariata sull'OS costruita sull'intera coorte identificava il SLN index risk (HR: 1.72) come il più importante indicatore prognostico.

CONCLUSIONI

Molti sono stati gli sforzi effettuati per cercare di individuare quali caratteristiche del melanoma primitivo o del SLN potessero esser dirimenti sulla diatriba riguardo all'esecuzione della dissezione linfonodale in pazienti con SLN positivo.

In attesa dei risultati del MSLT II, che con una notevole casistica e un maggiore follow-up potranno dare forti indicazioni, noi abbiamo cercato di identificare 3 variabili del SLN (numero di SLN positivi, micro-/macro-pattern di metastasi e Starz classification) che possano esser combinate insieme a costruire un cosiddetto SLN index risk, variabile da 0 a 3. Questo score è stato provato esser correlato significativamente con il rischio di coinvolgimento dei NSLN e anche alla sopravvivenza globale. Anche all'analisi multivariata questo score mantiene un valore se corretto con le variabili prognostiche identificate dall'AJCC⁽¹⁾ (spessore di Breslow e ulcerazione).

L'utilità clinica del nostro score si associa ad una sua facile valutazione da parte del patologo e del clinico.

BIBLIOGRAFIA

1. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK: *Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification*. J. Clin. Oncol. 2009; 27: 6199-6206.
2. Cochran AJ, Balda BR, Starz H, Bachter D, Krang DN, Cruse CW, Pijpers R, Morton DL: *The Augsburg Consensus Techniques of lymphatic mapping, sentinel lymphadenectomy, and completion lymphadenectomy in cutaneous malignancies*. Cancer. 2000; 89: 236-241.
3. Cochran AJ, Wen DR, Huang RR, Wang HJ, Elashoff R, Morton DL: *Prediction of metastatic melanoma in nonsentinel nodes and clinical outcome based on the primary melanoma and the sentinel node*. Mod. Pathol. 2004; 17: 747-755.
4. Cook MG, Di Palma S: *Pathology of sentinel lymph nodes for melanoma*. J. Clin. Pathol. 2008; 6: 897-902.
5. Gershenwald JE, Thompson W, Mansfield PF, Lee JE, Colome MI, Tseng CH, Lee JJ, Balch CM, Reintgen DS, Ross MI: *Multi-institutional melanoma lymphatic mapping experience: the prognostic value of sentinel lymph node status in 612 stage I or II melanoma patients*. J. Clin. Oncol. 1999; 17: 976-983.
6. Gershenwald JE, Andtbacka RH, Prieto VG, Johnson MM, Diwan AH, Lee JE, Mansfield PF, Cormier JN, Schacherer CW, Ross MI: *Microscopic Tumor Burden in Sentinel Lymph Nodes Predicts Synchronous Nonsentinel Lymph Node Involvement in Patients With Melanoma*. J. Clin. Oncol. 2008; 26: 4296-4303.
7. Guggenheim M, Dummer R, Jung FJ, Mihic-Probst D, Steiner H, Rousson V, French LE, Giovanoli P: *The influence of sentinel lymph node tumour burden on additional lymph node involvement and disease-free survival in cutaneous melanoma-a retrospective analysis of 392 cases*. Br. J. Cancer. 2008; 98: 1922-1928.
8. Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, Cochran AJ: *Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma*. Arch. Surg. 1992; 127: 392-399.
9. Quaglino P, Borgognoni L, Bottoni U, Calvieri Sm Carli P, Catricalà C, Eibenschutz L, Manganoni A, Moretti S, Pellacani G, Pimpinelli N, Seidenari S, Bernengo MG: *Italian guidelines for staging and follow-up of stage I-II cutaneous melanoma patients*. G. It. Dermatol. Venereol. 2007; 142: 41-47.
10. Roka F, Mastan P, Binder M, Okamoto I, Mittiboeck M, Horvat R, Pehamberger H, Diem E: *Prediction of non-sentinel node status and outcome in sentinel node-positive melanoma patients*. Eur. J. Surg. Oncol. 2008; 34: 82-88.
11. Sabel MS, Griffith K, Sondak VK, Lowe L, Schwartz JL, Cimmino VM, Chang AE, Rees RS, Bradford CR, Johnson TM: *Predictors of nonsentinel lymph node positivity in patients with a positive sentinel node for melanoma*. J. Am. Coll. Surg. 2005; 201: 37-47.
12. Salti GI, Das Gupta TK: *Predicting residual lymph node basin disease in melanoma patients with sentinel lymph node metastases*. Am. J. Surg. 2003; 186: 98-101.
13. Satzger I, Volker B, Meier A, Kapp A, Gutzmer R: *Criteria in Sentinel Lymph Nodes of Melanoma Patients that Predict Involvement of Nonsentinel Lymph Nodes*. Ann. Surg. Oncol. 2008; 15: 1723-1732.

14. Scolyer RA, Li LX, McCarthy SW, Shaw HM, Stretch JR, Sharma R, Thompson JF: *Immunohistochemical stains fail to increase the detection rate of micrometastatic melanoma in completion regional lymph node dissection specimens.* Melanoma Res 2004; 14: 263-268.
15. Sober AJ, Chuang TY, Duvic M, Farmer ER, Grichnik JM, Halpern AC, Ho V, Holloway V, Hood AF, Johnson TM, Lowery BJ: *Guidelines of care for primary cutaneous melanoma.* J. Am. Acad. Dermatol. 2001; 45: 579-586.
16. Starz H, Siedlecki K, Balda BR: *Sentinel lymphonodectomy and s-classification: A successful strategy for better prediction and improvement of outcome of melanoma.* Ann. Surg. Oncol. 2004; 11: 162S-168S.
17. Van der Ploeg IM, Kroon BB, Antonini N, Valdés Olmos RA, Nieweg OE: *Is Completion Lymph Node Dissection Needed in Case of Minimal Melanoma Metastasis in the Sentinel Node?* Ann. Surg. 2009; 249: 1003-1007.
18. Wagner JD, Gordon MS, Chuang TY, Coleman JJ 3rd, Hayes JT, Jung SH, Love C: *Predicting sentinel and residual lymph node basin disease after sentinel lymph node biopsy for melanoma.* Cancer 2000; 89: 453-462.

INIBIZIONE FARMACOLOGICA DELLA TIROSINA-CINASI SRC NELLA TUMORIGENESI SOSTENUTA DALL'ONCOGENE *MET*

Premio “Italo Arneodo”

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

Cecilia Bracco

Divisione di Oncologia Molecolare - Istituto per la Ricerca e la Cura del Cancro (IRCC)
Facoltà di Medicina e Chirurgia - Università degli Studi di Torino

Key words: *Met receptor / Oncogene Met*
Src tyrosine kinase / Tirosina-cinasi Src
Targeted therapies / Terapie a bersaglio molecolare
Oncogene addiction / Oncogene addiction
Drug resistance / Farmacoresistenza

Abstract:

In recent years, traditional cancer chemotherapies have been flanked by the so called cancer-targeted therapies, which exploit the oncogene addiction of a neoplastic cell to a particular protein or pathway.

Unfortunately, clinical responses to cancer-targeted therapies are limited by the emergence of drug resistance. One way to overcome this drawback relies on the identification of substitute signals that, once blocked, can impair neoplastic progression in the place of the primary resistant target.

Here we demonstrate that pharmacologic inhibition of the Src tyrosine kinase, a downstream effector of the *MET* oncogene, hinders the malignant properties of gastric tumors dependent on the *MET* oncogene for growth and survival. Treatment of ‘Met-addicted’ gastric carcinoma cells with AZD0530, an orally bioavailable Src small molecule inhibitor currently in phase II clinical trials:

- 1) decreased the phosphorylation/activation levels of signaling intermediates involved in cell proliferation and protection from apoptosis;
- 2) reduced anchorage-independent growth;
- 3) delayed tumorigenesis in xenotransplantation models.

Based on *in situ* analysis of tumor xenografts, systemic blockade of Src resulted in a cell-autonomous attenuation of malignant traits – including lower proliferation index, higher apoptotic index, and reduced phospho-Fak and phospho-paxillin staining –

without influencing microenvironmental parameters such as tumor angiogenesis or inflammatory infiltration.

As Src is a key downstream transducer of Met-driven tumor growth, targeting it might provide therapeutic benefit in Met-addicted tumors.

Riassunto:

Negli ultimi tempi, alle tradizionali chemioterapie si sono affiancate le cosiddette terapie a bersaglio molecolare (*targeted therapies*), che sfruttano la dipendenza di una cellula tumorale da una specifica proteina o via di segnalazione molecolare.

Sfortunatamente, la risposta clinica alle terapie a bersaglio molecolare è limitata dallo sviluppo di resistenze a questi farmaci. Per aggirare questo inconveniente, si può cercare di inibire una via di segnalazione alternativa, impedendo così la progressione tumorale, anche in presenza della resistenza al primo bersaglio molecolare.

In questo lavoro, si dimostra che l'inibizione della tirosina-cinasi Src, effettore a valle della proteina codificata dall'oncogene *MET*, diminuisce il potenziale maligno dei tumori gastrici che dipendono da Met (*Met-addicted*) per la sopravvivenza e la crescita cellulare. Il trattamento di cellule di carcinoma gastrico dipendenti da Met con AZD0530, inibitore chimico (*small-molecule*) di Src, biodisponibile *per os*, attualmente in trial clinico di fase II:

- 1) diminuisce l'attivazione tramite fosforilazione dei trasduttori molecolari coinvolti nella proliferazione cellulare e nella protezione dall'apoptosi;
- 2) riduce la crescita indipendente dall'ancoraggio;
- 3) ritarda la tumorigenesi in modelli di xenotrapianto.

Tramite analisi *in situ* su xenotrapianti, si è osservato che la riduzione del potenziale maligno conseguente l'inibizione di Src (valutata come diminuzione dell'indice di proliferazione, aumento dell'indice apoptotico e riduzione della fosforilazione di Fak e paxillina) è legata selettivamente all'inibizione di Src nelle cellule tumorali e non all'azione dell'inibitore sul microambiente (valutato come infiltrato infiammatorio e angiogenesi).

Si può pertanto pensare che l'inibizione di Src, trasduttore cruciale nella tumorigenesi sostenuta dall'oncogene *MET*, possa portare a un beneficio nel trattamento dei tumori *Met-addicted*.

INTRODUZIONE

Recettori tirosina-cinasi

I recettori tirosina-cinasi svolgono un ruolo essenziale nella regolazione del ciclo cellulare, della migrazione, del metabolismo, della sopravvivenza, della proliferazione e della differenziazione cellulare⁽⁷⁾, tramite il reclutamento di trasduttori intracellulari del segnale⁽¹³⁾.

Tra essi, Met, recettore di HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), favorisce la proliferazione e la motilità cellulare, protegge dall'apoptosi e promuove l'angiogenesi, in un processo detto crescita invasiva.

Essa ha un ruolo fisiologico, sia nello sviluppo embrionario sia nell'individuo adulto, e un ruolo patologico nell'indurre la trasformazione cellulare maligna e la progressione neoplastica.

L'attivazione aberrante della via di HGF-Met può avvenire in tre modi. Può essere conseguenza di un *loop* autocrino di HGF, grazie al quale la cellula diventa indipendente dai fattori di crescita paracrini; può derivare da aumentata espressione del recettore, che favorisce la sua oligomerizzazione e transattivazione anche in assenza del ligando; oppure può essere conseguenza di alterazioni strutturali del recettore che lo rendono costitutivamente attivo⁽²¹⁾.

Src

Tra le proteine intracellulari regolate da Met, svolge un ruolo essenziale Src, tirosina-cinasi non recettoriale, regolato da diversi segnali: recettori tirosina-cinasi, recettori accoppiati a proteine G, recettori Fc, recettori delle citochine, recettori tirosina-fosforilasi, recettori per gli steroidi e integrine⁽¹⁹⁾.

Src è coinvolto nella regolazione della proliferazione e migrazione cellulare e nell'angiogenesi. Esso è espresso nelle cellule ematopoietiche, nelle piastrine, nei neuroni e in alcuni tessuti epiteliali e si è osservato essere super-attivato in diversi tumori: carcinoma del colon-retto e della mammella, più raramente melanomi, carcinoma dell'ovaio, gastrico, tumori del collo, carcinoma pancreatico, polmonare, del cervello, tumori del sangue⁽¹⁸⁾, carcinoma epatocellulare e esofageo⁽²⁵⁾.

Nelle cellule tumorali, Src non subisce lesioni genetiche, quali amplificazioni o mutazioni. Vi è invece un aumento della sua attività, che può avvenire attraverso aumentata affinità per i propri ligandi, defosforilazione della tirosina regolatrice, ridotta attività di Csk⁽¹⁸⁾ modificazioni post-trascrizionali⁽³⁾, quali la miristilazione del dominio SH4.

Sia la tirosina-cinasi non recettoriale Src sia la tirosina-cinasi recettoriale Met sono coinvolte nei processi cellulari di proliferazione, protezione dall'apoptosi, migrazione, invasione e neoangiogenesi e sono inoltre funzionalmente correlate e cronicamente attive in diversi tipi di tumore^(4,8).

Oncogene addiction e terapie a bersaglio molecolare

Le cellule tumorali mostrano aumentata espressione di centinaia di geni e diminuita espressione di altrettanti, anomalie cromosomiche tra cui aneuploidie e perdita di eterozigotità, alterazioni genetiche e epigenetiche che coinvolgono numerosi geni. Tuttavia, è oramai noto che alcuni tumori sono costituiti da cellule per la cui proliferazione un unico gene è necessario, ossia le cellule tumorali sono dipendenti da esso⁽²³⁾. I meccanismi più accreditati per cui si ritiene si manifesti il suddetto fenomeno (*oncogene addiction*) sono lo shock oncogenico^(15,16,17), la letalità sintetica⁽⁹⁾, l'ottimizzazione genomica⁽¹⁰⁾ e il salvataggio sintetico.

Da alcuni anni, si sono sviluppate nuove terapie antiblastiche, le terapie a bersaglio molecolare (*targeted therapies*) che sfruttano il fenomeno della *oncogene addiction*⁽⁹⁾. Numerosi sono gli esempi di terapie a bersaglio molecolare attualmente in uso clinico (Tabella I): il trastuzumab (Herceptin), anticorpo efficace nei tumori della mammella con aumentata espressione del recettore tirosina-cinasi HER2; il cetuximab (Erbix), anticorpo monoclonale anti-EGFR, si sta affiancando alle terapie citotossiche nel trattamento del carcinoma del colon; l'imatinib (Gleevec), nato per la terapia della leucemia mieloide cronica, è ora utilizzato anche nel trattamento dei tumori stromali gastrointestinali (GIST), dal momento che inibisce anche l'oncogene c-Kit; il gefitinib (Iressa) e l'erlotinib (Tarceva) inibiscono la tirosina-cinasi recettoriale EGFR e sono entrati nella pratica clinica nella terapia del cancro del polmone non a piccole cellule, del pancreas e del glioblastoma; ancora discusso è invece l'utilizzo del bevacizumab (Avastin), anticorpo monoclonale anti-VEGF⁽²⁴⁾, che talvolta affianca i chemioterapici tradizionali nel trattamento di seconda o terza linea del carcinoma del colon-retto.

Molti altri sono i farmaci a bersaglio molecolare attualmente in sperimentazione pre-clinica e clinica, tra questi anche inibitori di Met⁽¹⁷⁾ e di Src^(1,11), che si stanno mostrando efficaci e ben tollerati. Il passaggio alla fase III dei *trial* e successivamente all'impiego nella pratica clinica è ritardato dalla difficoltà nell'individuare un razionale con cui selezionare i pazienti potenzialmente responsivi.

Oncogene	Tumori <i>addicted</i>	Terapie approvate
HER2	Mammella, ovaio, NSCLC	Trastuzumab (Herceptin); Lapatinib (Tykerb) in seconda linea
BRAF	Melanoma, tiroide, colon-retto	Sorafenib (Nexavar)
EGFR	NSCLC	Gefitinib (Iressa)
	NSCLC, pancreas	Erlotinib (Tarceva)
	Colon-retto, capo-collo	Cetuximab (Erbitux)
	Colon-retto	Panitumumab (Vectibix)
ABL	Leucemia mieloide cronica	Imatinib (Gleevec)
PDGFR	Glioma, GIST	Imatinib (Gleevec); Sunitinib (Sutent) in seconda linea
KIT	GIST	Imatinib (Gleevec)
VEGF	Colon-retto, tumori metastatici	Bevacizumab (Avastin)
	GIST, rene	Sunitinib (Sutent)
	Rene	Sorafenib (Nexavar)

Tabella I. Esempi di anticorpi monoclonali e inibitori chimici in uso clinico, modificata da Sharma and Settleman, 2006⁽¹⁷⁾.

L'utilizzo delle terapie a bersaglio molecolare è limitato, oltre che dalla difficoltà a individuare il “tallone d’Achille” di un tumore⁽²²⁾, dallo sviluppo di resistenze. Infatti, vi è una selezione positiva delle cellule che sviluppano nuove mutazioni che rendono inefficace la molecola inibitoria o che rendono le cellule dipendenti da un altro oncogene, in un processo di fuga dalla originaria *oncogene addiction*.

Un modo per eludere la farmacoresistenza è l'utilizzo di più farmaci che agiscono su diversi bersagli coinvolti nella stessa via di segnalazione o in vie di segnalazione diverse ma sinergiche⁽²⁴⁾.

SCOPO DEL LAVORO

In considerazione della collaborazione funzionale tra Met e Src e alla luce delle numerose evidenze che suggeriscono che l'inibizione farmacologica di Src sia

in grado di compromettere la regolazione dei processi cellulari primariamente dipendenti da Met, si è valutato, con saggi *in vitro* e *in vivo*, l'effetto dell'inibizione di Src con un inibitore chimico (AZD0530, AstraZeneca), in linee cellulari di tumore gastrico caratterizzate dall'amplificazione del gene *MET* e dipendenti, per la loro proliferazione, dall'attivazione di questo recettore.

In particolare è stata studiata la capacità delle cellule in cui Src è inibito di formare colonie in assenza di ancoraggio, con saggi in soft agar, e la capacità di formare tumori *in vivo*, tramite xenotrapianti sottocute in topi nudi.

MATERIALI E METODI

Le GTL-16, HS-746-T, SNU-5 e MKN-45 sono cellule di adenocarcinoma gastrico con amplificazione di *MET*.

Per i western blot e i soft agar si sono utilizzati i protocolli classici.

Per gli xenotrapianti, le cellule sono state inoculate sottocute in topi femmine immunodeficienti *nu/nu* CD1. I topi sono stati trattati tramite gavage con 0 mg/kg/die (veicolo), 12.5 mg/kg/die (solo GTL-16), 25 mg/kg/die (solo GTL-16) o 50 mg/kg/die di AZD0530.

I tumori sono stati inclusi in paraffina, per essere analizzati in immunohistochimica (decorati con anticorpi anti-Met, paxillina, Fak, Ki67, caspasi-3 attivata) o immunofluorescenza (anticorpi anti-CD31 e anti-CD45).

RISULTATI

L'inibizione di Src in linee cellulari dipendenti da Met riduce la proliferazione cellulare indipendente dall'ancoraggio

È noto che gli inibitori di Met bloccano la proliferazione delle GTL-16, linea cellulare di carcinoma gastrico contenente una amplificazione dell'oncogene *MET*.

Attraverso un saggio in soft agar si è valutato l'effetto dell'inibizione di Src sulla capacità tumorigenica delle GTL-16, intesa come capacità di crescita indipendente dall'ancoraggio *in vitro*. Il trattamento con dosi crescenti di AZD0530 ha mostrato una diminuzione della formazione di colonie statisticamente significativa ($p = 0.03$) a una concentrazione di $0.5\mu\text{M}$ (Figura 1A).

Per confermare tale risultato, si è inibito Src tramite l'utilizzo di shRNA (short hairpin RNA). Anche in questo caso, si è osservata una riduzione della formazione di colonie statisticamente significativa (dati non mostrati).

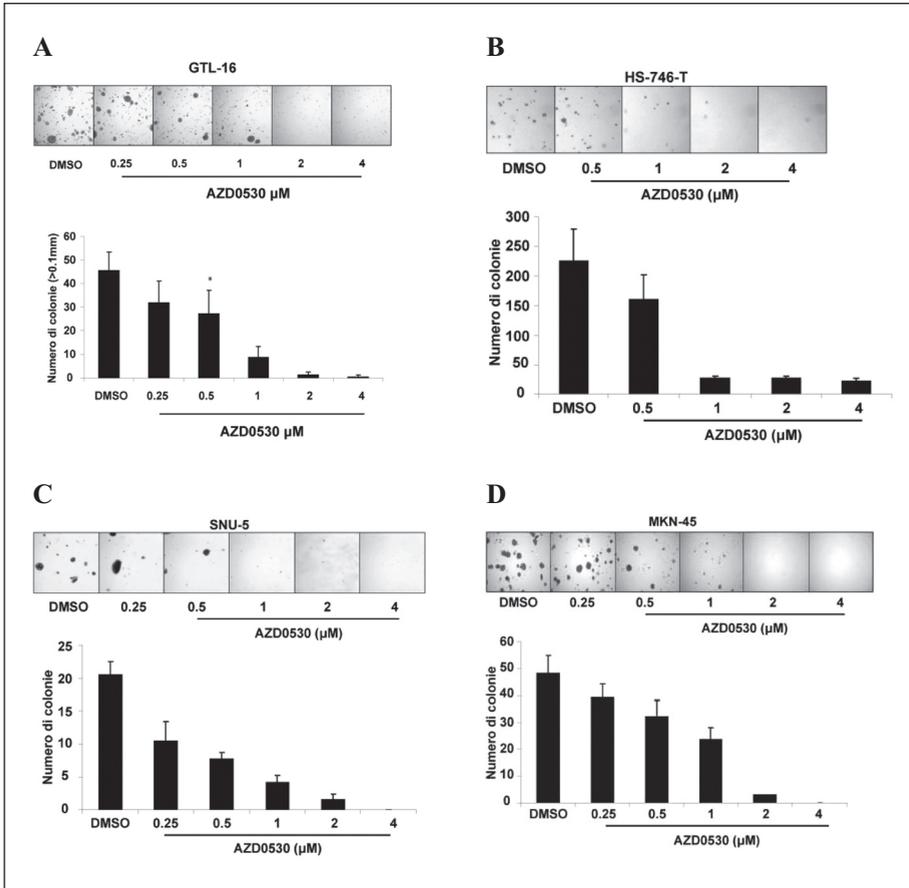


Figura 1. Crescita in soft agar. Le cellule sono state tenute in coltura per due settimane con AZD0530.

- A) GTL-16, riduzione della formazione statisticamente significativa ($p = 0.03$) a $0.5\mu\text{M}$.
 B) HS-746-T, abbattimento della formazione di colonie a partire da $1\mu\text{M}$.
 C) SNU-5, riduzione della formazione di colonie statisticamente significativa ($p = 0.002$) a $0.25\mu\text{M}$.
 D) MKN-45, riduzione della formazione di colonie statisticamente significativa ($p = 0.04$) a $0.5\mu\text{M}$.
 Barre \pm deviazione standard.

Per validare tale risultato, si è valutato l'effetto di AZD0530 in ulteriori linee cellulari di carcinoma gastrico che presentano amplificazione di Met, in particolare le HS-746-T, le SNU-5 e le MKN-45.

In tutti i casi si è confermata la riduzione dose-dipendente della crescita indipendente dall'ancoraggio in seguito a inibizione con AZD0530 a una concentrazione simile a quella efficace nelle GTL-16 (Figura 1B-D).

Dai dati *in vitro*, si può quindi sostenere che l'inibizione di Src riduca la capacità tumorigenica in linee cellulari in cui la via di HGF-Met è permanentemente attiva. Verosimilmente, l'inibizione di Src altera l'equilibrio venutosi a formare nelle cellule dipendenti da Met tra le vie a favore della sopravvivenza cellulare e quelle a favore della morte cellulare, con predominio di queste ultime.

Effetti biochimici dell'inibizione di Src nelle GTL-16

Si è quindi verificato che l'inibizione di AZD0530 fosse specifica per Src, analizzando il livello di fosforilazione di Met in western blot: il trattamento acuto (2 ore) con AZD0530 nelle GTL-16, anche a dosi molto alte, non influenza la fosforilazione né delle tirosine catalitiche (Tyr 1234/1235) né di quelle di ancoraggio (Tyr 1349/1356) del recettore Met (Figura 2A), indicando che l'inibitore non ha effetti *off-target* su di esso.

Il passaggio successivo è stato quello di studiare gli aspetti molecolari dell'inibizione di Src, analizzando il livello di attivazione delle vie a valle della cinasi. Si è pertanto valutato il livello di fosforilazione di Fak e paxillina, substrati canonici di Src (così come di Met) e di Akt e Erk, trasduttori di segnali di crescita e di sopravvivenza cellulare.

Si è così potuta osservare una riduzione della fosforilazione di Fak, paxillina e Akt, che si manifesta in maniera dose-dipendente (Figura 2B), confermando in questo modo che l'inibizione di Src blocca le vie a valle della cinasi e quindi presumibilmente i processi cellulari da essa regolati. Si è invece osservato un aumento della fosforilazione di Erk (Figura 2B) che si può spiegare ipotizzando che Src blocchi un *feedback* negativo che agisce su questa cinasi.

L'inibizione di Src in xenotrapianti di tumori dipendenti da Met porta a un rallentamento della crescita tumorale

Per consolidare i dati ottenuti *in vitro*, si è valutato il ruolo di Src nella tumorigenesi sostenuta da Met *in vivo*, tramite xenotrapianti, ottenuti con inoculo sottocute di 3×10^6 di GTL-16 in topi nudi.

I topi sono stati trattati tramite gavage con veicolo ($n = 10$) o con 12.5 mg/kg/die ($n = 10$), 25 mg/kg/die ($n = 8$), 50 mg/kg/die ($n = 11$) di AZD0530.

Il trattamento non ha modificato la latenza del tumore ma ha influenzato il volume massimo raggiunto. La dose più bassa utilizzata ha rallentato la crescita in maniera non statisticamente significativa (riduzione del volume finale del 29%). L'effetto sulla crescita tumorale con 25 mg/kg/die o con 50 mg/kg/die di inibitore è sovrapponibile, provoca una riduzione della massa

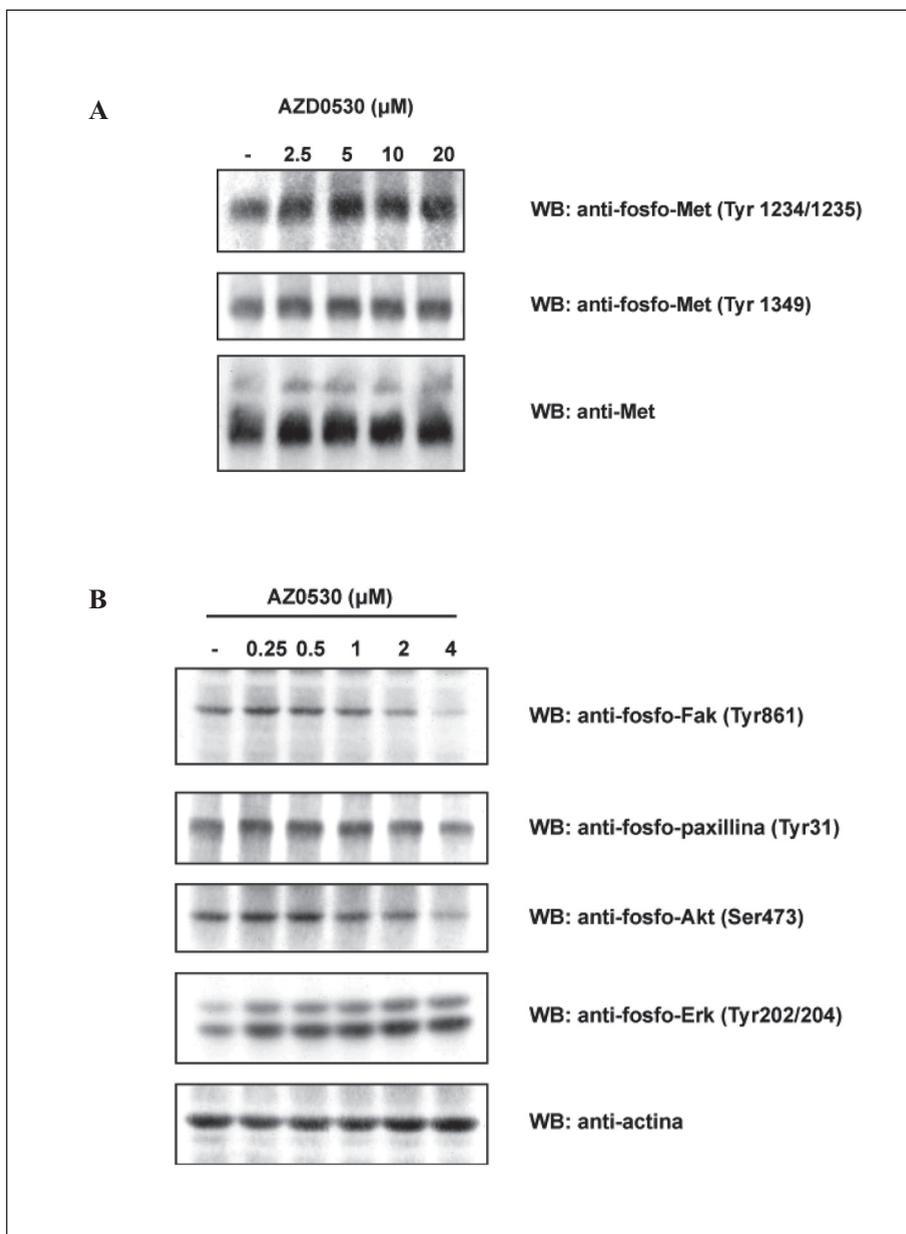


Figura 2. Western blot (WB) su lisati di GTL-16 dopo 2 ore di inibizione con AZD0530.

A) Non vi è effetto sulla fosforilazione di Met.

B) Riduzione della fosforilazione dei trasduttori canonici di Src (Fak e paxillina) e di Akt e aumento paradossso della fosforilazione di Erk.

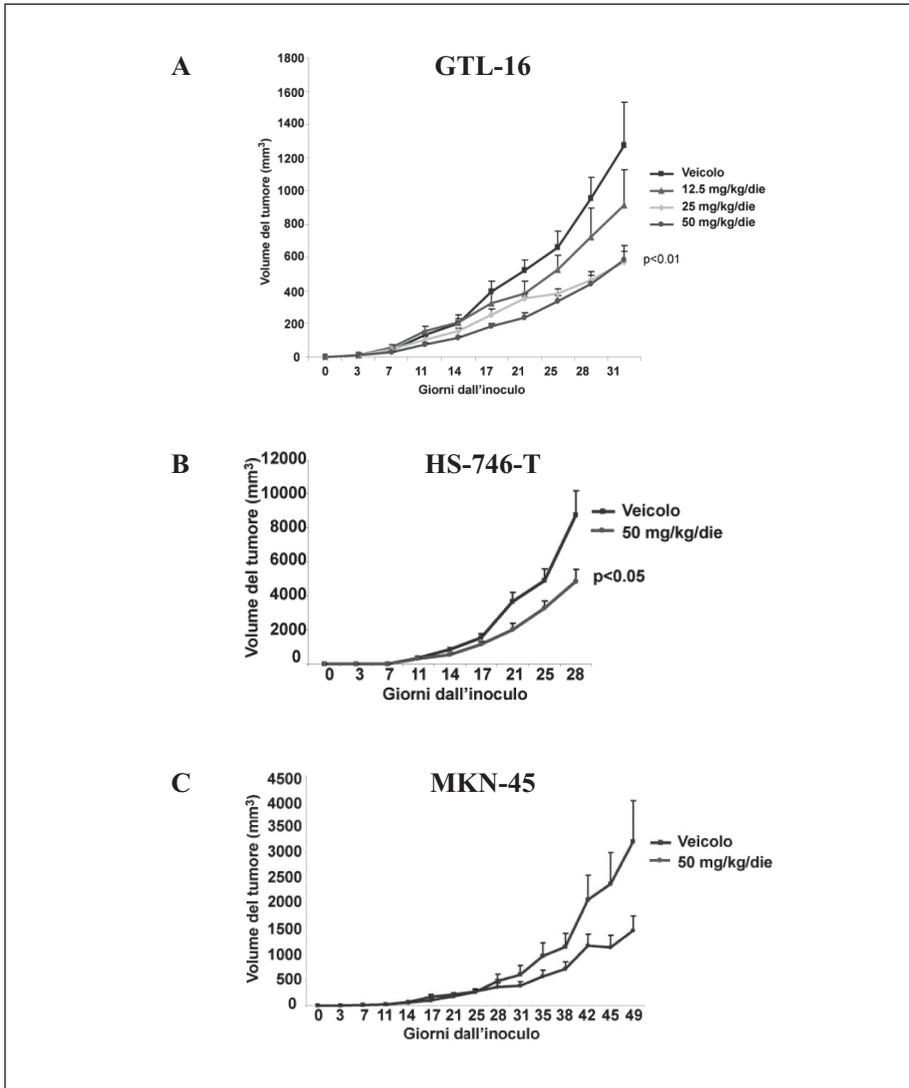


Figura 3. Xenotrapianti in topi nudi trattati con veicolo o AZD0530.

- A) Formazione di tumori dopo inoculo di 3 milioni di GTL-16 e trattamento con veicolo, 12.5 mg/kg/die, 25 mg/kg/die o 50 mg/kg/die di AZD0530: riduzione statisticamente significativa ($p < 0.01$) con 25 o 50 mg/kg/die.
- B) Dopo inoculo di 4 milioni di HS-746-T sottocute, il trattamento con 50 mg/kg/die di AZD0530 provoca una riduzione statisticamente significativa ($p < 0.05$) del volume finale della massa.
- C) Il trattamento con 50 mg/kg/die di AZD0530 in topi inoculati sottocute con MKN-45 provoca una riduzione della crescita tumorale non statisticamente significativa. Curve di crescita + errore standard.

del 55% rispetto al veicolo ed è statisticamente significativo, con $p < 0.01$ (Figura 3A).

Successivamente si è analizzata la capacità di formare tumori sottocute delle altre linee cellulari precedentemente analizzate in soft agar.

I tumori formati in seguito a inoculo di 4×10^6 di HS-746-T hanno mostrato una crescita più lenta nei topi ($n = 6$) trattati con AZD0530 rispetto a quelli trattati con veicolo ($n = 6$), con una riduzione del volume finale della massa tumorale del 45%, statisticamente significativa, con $p < 0.05$ (Figura 3B).

I tumori formati dall'inoculo sottocute di 1×10^6 di MKN-45 hanno parzialmente confermato il dato. Infatti, dopo 49 giorni di trattamento, i tumori provenienti dai topi ($n = 5$) trattati con AZD0530 hanno raggiunto un volume minore dei tumori provenienti dai topi ($n = 5$) trattati con veicolo. In questo caso, non vi è una differenza statisticamente significativa, ma si evidenzia una tendenza a una crescita più lenta nei casi trattati con il farmaco (Figura 3C).

Nel caso delle SNU5 non si è riusciti a ottenere una soglia di attecchimento sufficiente a portare avanti l'esperimento.

Si può quindi affermare che l'inibizione di Src rallenta la crescita di tumori gastrici dipendenti da Met, senza bloccarla completamente.

Gli effetti dell'inibizione di Src dipendono dalla sua azione sul tessuto tumorale e non sul microambiente (effetto *cell-autonomous*)

Appurata l'efficacia del trattamento con AZD0530, si sono voluti studiare gli aspetti molecolari dell'inibizione di Src *in vivo*, valutando sia il livello di attivazione delle vie a valle di Src sia l'effetto sui processi biologici in cui esso è coinvolto.

Tramite decorazione in immunostochimica di fettine di tumore di GTL-16 di topi trattati con veicolo o con 50mg/kg/die di AZD0530, si sono potuti confermare i dati precedentemente ottenuti dagli esperimenti *in vitro*. Infatti, anche in questo caso, la fosforilazione di Met non è influenzata dal trattamento con AZD0530 (dati non mostrati) e vi è una diminuzione della fosforilazione dei trasduttori a valle di Src, come si può vedere dalla decorazione in immunostochimica, con anticorpi anti-fosfo-paxillina (Figura 4A) e anti-fosfo-Fak (Figura 4B).

Per quanto riguarda l'azione di AZD0530 sul ciclo cellulare, si è analizzata in immunostochimica la decorazione con anticorpi anti-Ki67, per valutare la proporzione di cellule proliferanti, e con anticorpi anti-caspasi 3-attivata, per valutare l'indice apoptotico. Come si può osservare in Figura 5, l'inibizione di Src comporta una riduzione dell'indice di proliferazione del 75% e un aumento

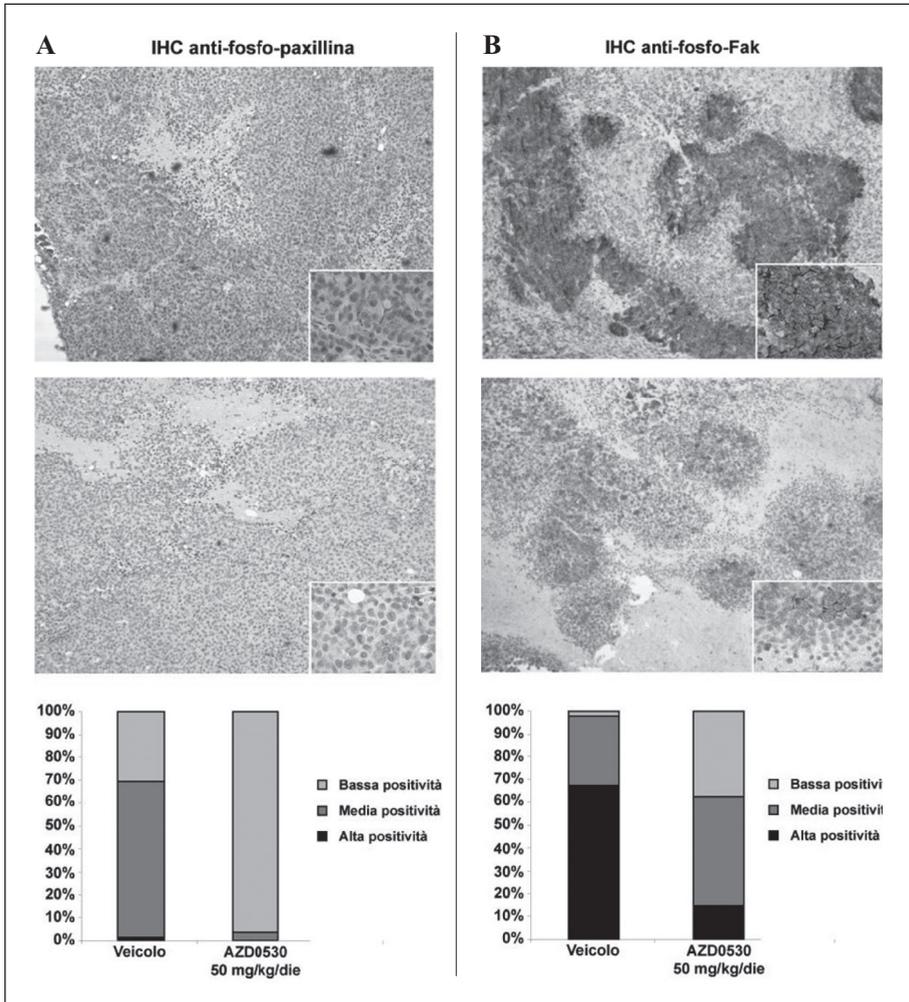


Figura 4. Immunoistochimica (IHC) su fettine di tumori formati da GTL-16. Diminuzione della fosforilazione di paxillina (A) e Fak (B) in seguito a trattamento con 50 mg/kg/die di AZD0530. Obiettivo: 5x e 40x.

di tre volte dell'indice apoptotico. Pertanto, si può ritenere che l'inibizione di Src rallenti la crescita tumorale *in vivo* riducendo sia la proliferazione sia la sopravvivenza cellulare, in accordo con i dati *in vitro*.

Dal momento che Src è coinvolto in ulteriori processi cellulari, tra cui la neoangiogenesi e la permeabilità vascolare, ci si è chiesti se l'effetto dell'inibizione sistemica di Src non potesse dipendere da alterazioni a livello

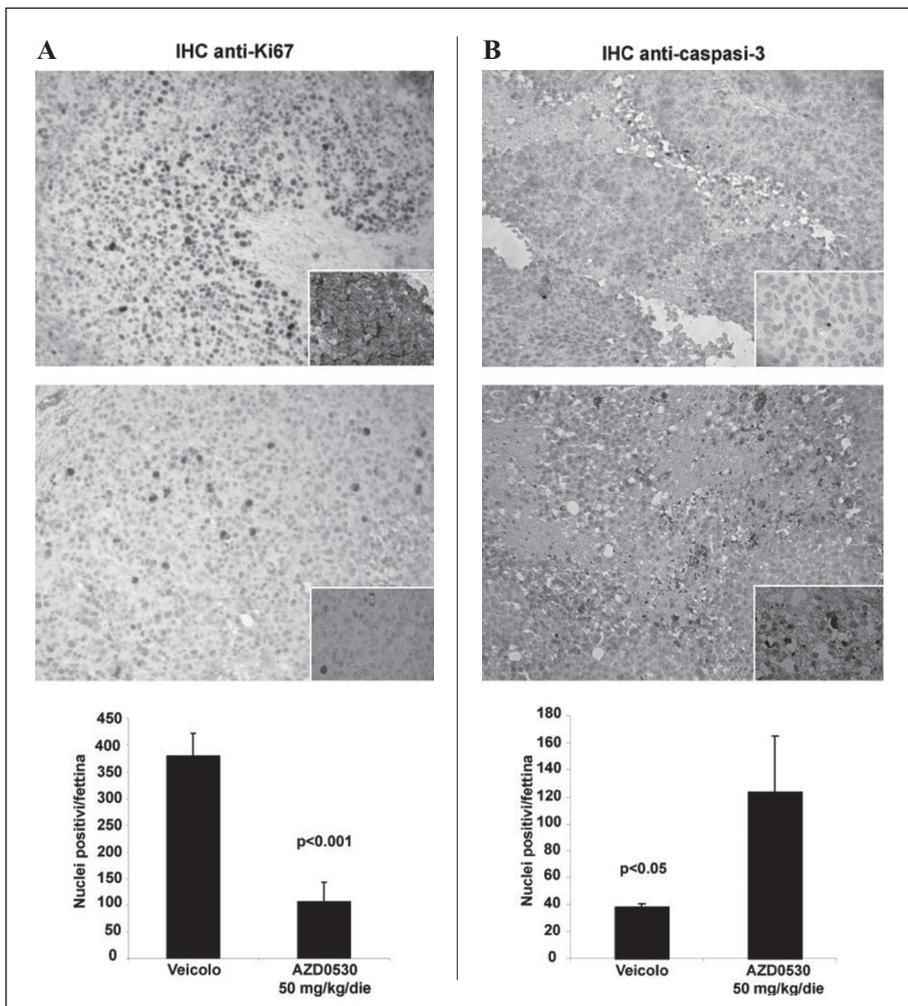


Figura 5. Immunoistochimica (IHC) su fettine di tumori formati da GTL-16. Diminuzione della proliferazione cellulare (A) e aumento dell'apoptosi (B), in seguito a trattamento con AZD0530 50 mg/kg/die. Obiettivo: 5x e 40x. Barre \pm deviazione standard.

del microambiente. In particolare, la neutralizzazione di Src potrebbe ridurre la neoangiogenesi e, in seguito alla riduzione della permeabilità vascolare, l'infiltrato infiammatorio intra- e peri-tumorale.

Pertanto, si è studiata su fettine di tumore sia la morfometria dei vasi (numero e dimensione per ciascun campo), decorando in immunofluorescenza con un anticorpo anti-CD31, marcatore endoteliale, sia l'infiltrato infiammatorio,

decorando in immunofluorescenza con un anticorpo anti-CD45, marcatore pan-leucocitario (estensione dell'area positiva per CD45 rispetto all'area totale della fettina).

Si è così osservato (Figura 6A) che non vi è alcuna differenza significativa né nel numero né nella dimensione dei vasi tra i topi trattati e quelli non trattati (vasi con diametro minore di 10 μm per sezione: 32 ± 10 nei non trattati vs 28 ± 14 nei trattati, $p = 0.42$; vasi con diametro maggiore di 10 μm per sezione: 23 ± 5 nei non trattati vs 22 ± 9 nei trattati, $p = 0.66$). Analogamente, non si è evidenziata alcuna differenza né nel numero né nella disposizione (area centrale vs periferia) delle cellule infiammatorie (Figura 6B).

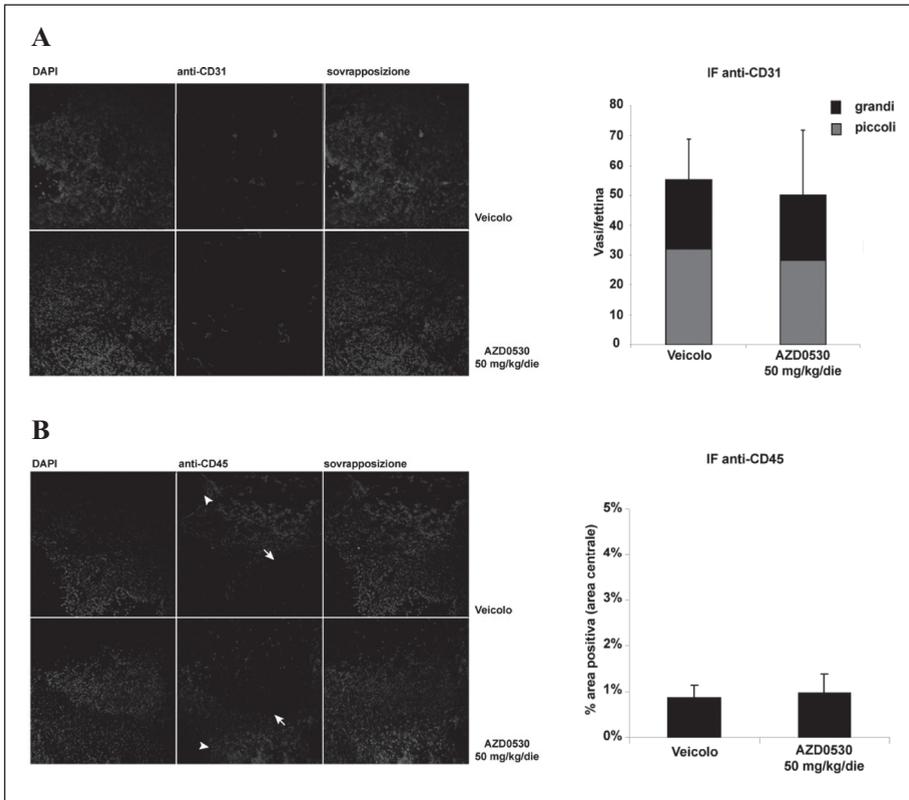


Figura 6. Immunofluorescenza (IF) con decorazione endoteliale (A) e pan-leucocitaria (B) su tumori formati da GTL-16 in topi nudi. Il trattamento con 50 mg/mg/die di AZD0530 non influenza né il numero o la dimensione dei vasi né il numero o la distribuzione (centro vs periferia) delle cellule dell'infiammazione. Freccia: centro del tumore. Testa di freccia: periferia del tumore. Obiettivo 20x. Barre \pm deviazione standard.

Si può quindi concludere che il rallentamento della crescita tumorale nei topi trattati con AZD0530 sia legato selettivamente all'inibizione di Src nelle cellule tumorali e non all'azione dell'inibitore sul tessuto stromale. La riduzione del volume della massa tumorale dopo un mese di trattamento è quindi conseguenza delle modificazioni che AZD0530 provoca sul ciclo cellulare della cellula neoplastica e non dell'azione sulla vascolarizzazione o sull'infiltrato infiammatorio. Una ridotta vascolarizzazione potrebbe infatti portare a sofferenza cellulare mentre l'infiltrato infiammatorio potrebbe liberare fattori di crescita in grado di esacerbare le caratteristiche intrinseche di malignità delle cellule tumorali.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Effetti dell'inibizione di Src

I risultati di questo studio mostrano che l'inibizione di Src comporta un rallentamento, e non un arresto, della crescita tumorale. Questo non dovrebbe stupire visto che si è neutralizzato solo uno degli innumerevoli trasduttori di Met, mentre le altre vie, inalterate, erano costantemente sostenute dall'attività aberrante di Met, in particolare, la via di Ras, che sfocia in due rami, attivando le vie di Raf-Mek-Erk e di PI3K-Akt.

Anche alla luce delle ultime evidenze in merito alle terapie a bersaglio molecolare⁽¹⁴⁾, si può quindi pensare di utilizzare gli inibitori di Src come terapia di seconda linea in tumori dipendenti da Met in associazione ad altri farmaci, quali inibitori della via di Ras-RAF-Mek-Erk o di PI3K-Akt⁽²⁾. Tra questi gli inibitori di Raf, Mek, PI3K sono attualmente in sperimentazione clinica^(5,24).

In questo modo si potrebbe probabilmente aggirare, almeno in parte, lo sviluppo di resistenze a una singola molecola, conseguenza della fuga dalla originaria *oncogene addiction*, che la cellula attua mediante l'instaurarsi di una dipendenza da un nuovo oncogene. In quest'ottica, Src si presenta come ottimo bersaglio, dato che è un anello fondamentale di una rete segnalatoria che coinvolge più recettori, non solo tirosina-cinasici, ma anche recettori per gli steroidi, recettori accoppiati a proteine G, recettori per le citochine e integrine.

Questioni aperte sull'utilizzo delle terapie a bersaglio molecolare

Il razionale per la somministrazione di farmaci a bersaglio molecolare non è ancora del tutto chiaro. Infatti, nonostante si tenda a pensare che questi farmaci

possano essere utilizzati con successo esclusivamente nei tumori costituiti da cellule che esprimono una forma alterata della proteina bersaglio, è noto che in alcuni casi vi è una risposta clinica anche in presenza di una proteina *wild type* normalmente espressa.

A ciò si aggiunge il fatto che conoscere il genotipo di un tumore è sì necessario per ipotizzare da quale oncogene le cellule siano dipendenti, ma non è ancora sufficiente per stabilire con certezza se esse saranno responsive a un determinato farmaco.

Inoltre, lo sviluppo di nuove mutazioni che rendono la cellula insensibile al trattamento intrapreso oppure dipendente da un nuovo oncogene ha fatto sì che si pensasse di associare diversi farmaci a bersaglio molecolare tra loro o di affiancarli agli agenti citotossici.

Per quanto riguarda l'utilizzo in politerapia di farmaci a bersaglio molecolare, da studi recenti, si è osservato un aumento degli effetti collaterali non sempre accompagnato da un aumento dell'intervallo libero da progressione o da un aumento della sopravvivenza^(6,12,20).

Invece, allo stato attuale, l'associazione di un singolo farmaco a bersaglio molecolare con cicli standard di farmaci citotossici sembra essere sicura ed efficace.

È pertanto necessario continuare gli studi in questo ambito, al fine di conseguire un approccio clinico razionale alla terapia delle neoplasie, evitando l'uso *ex juvantibus* dei nuovi farmaci a disposizione.

BIBLIOGRAFIA

1. Aleshin A, Finn RS: *SRC: a century of science brought to the clinic*. Neoplasia. 2010; 12: 599-607.
2. Bertotti A, Burbridge MF, Gastaldi S, Galimi F, Torti D, Medico E, Giordano S, Corso S, Rolland-Valognes G, Lockhart BP, Hickman JA, Comoglio PM, Trusolino L: *Only a subset of Met-activated pathways are required to sustain oncogene addiction*. Sci. Signal. 2009; 2: er80.
3. Bolen JB, Veillette A, Schwartz AM, Deseau V, Rosen N: *Analysis of pp60c-src in human colon carcinoma and normal human colon mucosal cells*. Oncogene Res. 1987; 1: 149-168.
4. Comoglio PM, Giordano S, Trusolino L: *Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience*. Nat. Rev. Drug Discov. 2008; 7: 504-516.
5. Engelman JA, Chen L, Tan X, Crosby K, Guimaraes AR, Upadhyay R, Maira M, McNamara K, Perera SA, Song Y, Chirieac LR, Kaur R, Lightbown A, Simendinger J, Li T, Padera RF, Garcia-Echeverria C, Weissleder R, Mahmood U, Cantley LC, Wong KK: *Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers*. Nature Med. 2008; 14: 1351-1356.
6. Hecht JR, Mitchell E, Chidiac T, Scroggin C, Hagenstad C, Spigel D, Marshall J, Cohn A, McCollum D, Stella P, Deeter R, Shahin S, Amado RG: *A randomized phase IIIB trial of chemotherapy, bevacizumab, and panitumumab compared with chemotherapy and bevacizumab alone for metastatic colorectal cancer*. J. Clin. Oncol. 2009; 27: 672-680.
7. Hunter T: *The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1998; 353: 583-605.
8. Ishizawar R, Parsons SJ: *c-Src and cooperating partners in human cancer*. Cancer Cell. 2004; 6: 209-214.
9. Kaelin WG Jr.: *The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy*. Nat. Rev. Cancer. 2005; 5: 689-698.
10. Kamb A.: *Consequences of nonadaptive alterations in cancer*. Mol. Biol. Cell. 2003; 14: 2201-2205.
11. Kopetz S, Shah AN, Gallick GE: *Src continues aging: current and future clinical directions*. Clin. Cancer Res. 2007; 13: 7232-7236.
12. Meyerhardt JA, Stuart K, Fuchs CS, Zhu AX, Earle CC, Bhargava P, Blaszkowsky L, Enzinger P, Mayer RJ, Battu S, Lawrence C, Ryan DP: *Phase II study of FOLFOX, bevacizumab and erlotinib as first-line therapy for patients with metastatic colorectal cancer*. Ann. Oncol. 2007; 18: 1185-1189.
13. Pawson T, Schlessinger J: *SH2 and SH3 domains*. Curr. Biol. 1993; 3: 434-442.
14. Sawyers CL: *Calculated resistance in cancer*. Nat. Med. 2005; 11: 824-5.
15. Sharma SV, Fischbach MA, Haber DA, Settleman J: *"Oncogenic shock": explaining oncogene addiction through differential signal attenuation*. Clin. Cancer Res. 2006; 12: 4392s-4395s.
16. Sharma SV, Gajowniczek P, Way IP, Lee DY, Jiang J, Yuza Y, Classon M, Haber DA, Settleman J: *A common signaling cascade may underlie "addiction" to the Src, BCR-ABL, and EGF receptor oncogenes*. Cancer Cell 2006; 10: 425-435.

17. Sharma SV, Settleman J: *Oncogenic shock: turning an activated kinase against the tumor cell*. Cell Cycle 2006; 5: 2878-2880.
18. Summy JM, Gallick GE: *Src family kinases in tumor progression and metastasis*. Cancer Metastasis Rev. 2003; 22: 337-358.
19. Thomas SM, Brugge JS: *Cellular functions regulated by Src family kinases*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 1997; 13: 513-609.
20. Tol J, Koopman M, Cats A, Rodenburg CJ, Creemers GJ, Schrama JG, Erdkamp FL, Vos AH, van Groeningen CJ, Sinnige HA, Richel DJ, Voest EE, Dijkstra JR, Vink-Börger ME, Antonini NF, Mol L, van Krieken JH, Dalesio O. and Punt CJ: *Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer*. N. Engl. J. Med. 2009; 360: 563-572.
21. Trusolino L, Comoglio PM: *Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth*. Nat. Rev. Cancer. 2002; 2: 289-300.
22. Weinstein IB: *Cancer. Addiction to oncogenes - the Achilles heal of cancer*. Science. 2002; 297: 63-64.
23. Weinstein IB, Joe AK: *Mechanisms of disease: Oncogene addiction-a rationale for molecular targeting in cancer therapy*. Nat. Clin. Pract. Oncol. 2006; 3: 448-457.
24. Wong KK: *Recent developments in anticancer agents targeting the Ras/Raf/MEK/ERK pathway*. Recent Pat. Anticancer Drug Discov. 2009; 4: 28-35.
25. Yeatman TJ: *A renaissance for SRC*. Nat. Rev. Cancer 2004; 4: 470-480.

VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ DEGLI OVOCITI UMANI NELLE STRATEGIE DI FECONDAZIONE ASSISTITA

Premio “Italo Arneodo”

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

Celeste Cagnazzo

Centro FIVER
Ospedale OIRM/Sant'Anna - Torino

Key words: *Intracytoplasmatic / Iniezione intracitoplasmatica
sperm injection dello spermatozoo
Polarized light microscopy / Microscopia a luce polarizzata
Meiotic Spindle / Fuso meiotico
Zona Pellucida / Zona pellucida
Retardance / Ritardanza*

Abstract:

Introduction: The approval of “Decree 40/2004” emphasized that only an early selection of quality oocytes ensures a good chance of becoming pregnant. In the past, the assessment of the oocyte's potential of fertilization and embryo implantation was based only on morphological criteria, evaluated by light microscopy. Moreover, there are many conflicting data in literature and for many years important oocyte structures, such as the meiotic spindle and zona pellucida, have not been analyzed in detail.

The introduction of *polarized light microscopy*, capable of displaying macromolecular structures of the cell through their reflectivity (ability to deflect the light), represents a great innovation: it allows to study the desired structure in a non-traumatic way for the oocyte and in a suitable time for the application in clinical routine.

Methods: 101 oocytes were collected from 35 patients and subjected to intracytoplasmic sperm injection (ICSI); the fertilized and cleaved ones and the related embryos were analyzed with polariscope and classified into two groups: associated with pregnancy (CC Group) and not associated (NCC Group). Clinical data about age, smoking, body mass index and response to hormonal ovarian stimulation protocol were collected from the same patients and a linear regression analysis was made.

Results: 77.2% of the retrieved oocytes (78/101) developed till the embrionic stage, with a fertilization rate of 83.2% (n = 84) and a cleavage rate of 92.8% (n = 78). In the 37.2% of cases (n = 13) the embryo transfer gave rise to pregnancy. The retardance of

the meiotic spindle did not show any significant difference between the two groups, while its area and length were significantly greater in the NCC Group (Area: $353.40 \pm 143.87 \mu\text{m}$ vs. $230.30 \pm 155.84 \text{ mM}$, $p = 0.001$; length $23.04 \pm 3.91 \mu\text{m}$ vs $17.71 \pm 6.92 \text{ mM}$, $p < 0.0001$). The retardance of the zona pellucida, both in oocyte and embryo, did not show any significant difference between the two groups, while the area was significantly greater in the NCC Group (oocytes: $\text{NCC } 9005.21 \pm 4008.28$ vs $\text{DC } 6020.86 \pm 4324.40 \mu\text{m}$ vs $\text{DC } \text{mM}$, $p < 0.0001$; embryos: $\text{NCC } 12755.99 \pm 3428.15 \mu\text{m}$ vs $\text{CC } 9219.77 \pm 5654.52 \text{ mM}$, $p = 0.001$).

Ovarian response to stimulation is significantly related to length and area of the meiotic spindle and to the area of the zona pellucida.

Conclusion: The polarized light – based selection of oocytes and embryos can significantly increase the chance of a positive outcome after the first cycle of in vitro fertilization.

Riassunto:

Introduzione: L'approvazione del DL 40/2004 ha sottolineato come solo la selezione a monte di un ovocita di ottima qualità garantisca buone probabilità di ottenere una gravidanza.

In passato la valutazione del potenziale di fertilizzazione dell'ovocita e di impianto dell'embrione erano basate esclusivamente su criteri morfologici, valutati mediante microscopia ottica; la letteratura è però ricca di dati contrastanti e per anni non sono state analizzate nel dettaglio strutture ovocitarie importanti, come fuso meiotico e zona pellucida.

L'uso della *microscopia a luce polarizzata*, in grado di visualizzare le strutture macromolecolari della cellula in base alla loro rifrangenza (capacità di deviare la luce), ha rappresentato una grossa novità: permette di studiare le strutture desiderate in maniera non traumatica per l'ovocita e con tempi adatti all'applicazione nella routine clinica.

Metodi: Da 35 pazienti sono stati raccolti e sottoposti ad iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI) 101 oociti; quelli fertilizzati e clivati e i relativi embrioni sono stati analizzati con polariscopio e classificati in due gruppi: associati a gravidanza (Gruppo CC) e non (Gruppo NCC).

Delle stesse pazienti sono stati raccolti i dati clinici relativi ad età, abitudine al fumo, indice di massa corporea e risposta al protocollo di stimolazione ormonale ovarica, ed è stata effettuata una analisi di regressione lineare.

Risultati: 78 degli oociti recuperati (77,2%) si sono sviluppati fino allo stadio di embrione, con un tasso di fertilizzazione dell' 83,2% ($n = 84$) e di clivaggio del 92,8% ($n = 78$). Nel 37,2% dei casi ($n = 13$) il transfer dell'embrione ha dato esito a gravidanza. La ritardanza del fuso non mostra

differenze significative tra i due gruppi, mentre l'area e la lunghezza dello stesso sono significativamente maggiori nel Gruppo NCC (Area: $353,40 \pm 143,87 \mu\text{m}$ vs $230,30 \pm 155,84 \mu\text{m}$, $p = 0,001$; lunghezza $23,04 \pm 3,91 \mu\text{m}$ vs $17,71 \pm 6,92 \mu\text{m}$, $p < 0,0001$). La ritardanza della zona pellucida, sia nell'ocita che nell'embrione, non mostra differenze significative tra i due gruppi; l'area è sensibilmente maggiore nel gruppo NCC (ociti: $9005,21 \pm 4008,28 \mu\text{m}$ vs $6020,86 \pm 4324,40 \mu\text{m}$, $p < 0,0001$; embrioni: $12755,99 \pm 3428,15 \mu\text{m}$ vs $9219,77 \pm 5654,52 \mu\text{m}$, $p = 0,001$).

La risposta ovarica alla stimolazione è correlata in maniera significativa all'area e alla lunghezza del fuso e all'area della zona pellucida.

Conclusioni: la selezione di oociti ed embrioni basata sull'analisi con luce polarizzata permette di aumentare in maniera significativa le probabilità di ottenere un esito positivo già al primo ciclo di fecondazione assistita.

INTRODUZIONE

L'infertilità è un problema rilevante nel mondo occidentale e spinge milioni di coppie a ricorrere all'uso della Fecondazione Assistita. Secondo l'Istituto Superiore di Sanità, le coppie italiane incapaci di ottenere una gravidanza sono circa il 20% e a livello mondiale i dati sono ancor più preoccupanti.

In Italia il dibattito sul tema si è acceso nel 2004, con l'approvazione del Decreto Legge 40⁽⁵⁸⁾, che vietava fecondazione eterologa, crioconservazione degli embrioni e inseminazione di un numero di oociti superiore a tre. Prima di tale legge il biologo poteva ottenere numerosi embrioni, selezionare quelli con maggiore potenziale di impianto e crioconservare i soprannumerari. L'introduzione delle nuove restrizioni ha sottolineato l'importanza di una accurata selezione a monte: solo l'uso di un ovocita di ottima qualità può garantire buone probabilità di ottenere embrioni competenti, con massima possibilità di impianto e di esito in una gravidanza evolutiva.

In passato la valutazione del potenziale di fertilizzazione dell'ovocita e della probabilità di impianto dell'embrione erano basate esclusivamente su criteri morfologici, valutati mediante microscopia ottica.

La qualità ovocitaria si valuta tenendo conto di due parametri: maturità nucleare (solo gli oociti allo stadio di Metafase II hanno raggiunto la maturità necessaria per l'inseminazione) e citoplasma. In linea generale un ovocita di buona qualità ha un citoplasma chiaro, uniforme, senza granulazioni, inclusioni, vacuoli e/o corpi retrattili. La presenza di specifici fenotipi dismorfici (differenze di forma, colore, granularità e omogeneità del citoplasma, eventuale presenza di inclusioni, vacuoli, corpi retrattili) è stata associata a difetti intrinseci, che potrebbero influire negativamente sulle potenzialità dello sviluppo embrionale^(105,117).

Anche gli oociti con citoplasma apparentemente normale possono presentare caratteristiche extracitoplasmatiche che influiscono negativamente sullo sviluppo, come l'aumento dello spazio perivitellino e la frammentazione del primo globulo polare^(54,117). In aggiunta, la morfologia del globulo polare è stata messa in relazione al tasso di fertilizzazione e alla qualità oocitaria^(12,37,80): gli oociti con globulo frammentato e/o largo e di forma anomala hanno riportato tassi di fertilizzazione significativamente inferiori rispetto a quelli con globulo rotondo/ovale con superficie liscia/rugosa ed inoltre presentano anomalie multiple nel citoplasma, associate ad aumento di anomalie cromosomiche⁽¹⁰⁵⁾.

I risultati degli esperti sono tutt'altro che concordi: alcuni^(11,32) hanno messo in evidenza che la scarsa qualità dell'ovocita non influisce negativamente sulla fertilizzazione e sull'impianto dopo la ICSI, ma è in relazione con un aumento

delle percentuali di aborto prematuro⁽¹⁾. Altri, al contrario, osservano una riduzione dei tassi di fertilizzazione ed impianto di embrioni derivati da oociti con inclusioni citoplasmatiche^(95,117). A queste contraddizioni va aggiunto un fattore confondente, ovvero la soggettività dell'operatore.

Altri autori hanno valutato la concentrazione nel liquido follicolare di alcuni ormoni⁽⁴⁾ (*Omocisteina*⁽¹⁶⁾, *FSH*⁽⁹⁰⁾, *ormone anti-Mulleriano*⁽³⁴⁾, *leptina*⁽²⁹⁾) e fattori di crescita come l'*EGF*⁽⁵⁵⁾, per tentare di stabilire un'eventuale correlazione con la maturità oocitaria e con la probabilità di fertilizzazione; effettivamente la concentrazione di alcuni parametri varia con gli stadi di maturazione ovocitaria, ma non è stata individuata alcuna differenza significativa tra oociti fertilizzati e non e comunque si tratta di test che mal conciliano con i ritmi della routine clinica.

Per quanto riguarda l'embrione, la selezione è basata essenzialmente sulla tradizione clinica^(8,22), senza vere e proprie evidenze mediche; nonostante ciò moltissimi studi mostrano che la qualità degli embrioni è uno dei più importanti fattori prognostici circa la possibilità di gravidanza^(46,50,101,103,106). La mancanza di dati scientifici è attribuibile prevalentemente alla difficoltà di seguire il destino del singolo embrione, tanto che in letteratura si trovano pochi studi che possano vantare un'associazione certa tra esso ed il suo impianto^(46,106,107,117).

Attualmente nelle tecniche di fecondazione assistita vengono usati diversi criteri di "*embryo scores*"^(27,29,33,39,42,44,45,54,59,64,67,71,91,94,96,97,103,109,120), basati sull'osservazione dell'oocita fecondato in diversi stadi maturativi; tali metodi offrono il vantaggio di non essere invasivi, ma rimane il problema della soggettività e non danno adeguate informazioni circa possibili anomalie cromosomiche/genetiche.

Alcuni Autori hanno focalizzato i propri studi sulla valutazione delle performance metaboliche dell'embrione^(13,20,36,43,48) ma i metodi usati sono molto dispendiosi in termini di tempo e denaro, quindi non rientrerebbero nella routine di clinica.

Tutti i metodi di osservazione citati non tengono conto di due strutture fondamentali dell'ovocita: il *fuso meiotico*, struttura citoscheletrica che permette la separazione dei cromosomi durante meiosi e mitosi, e la *zona pellucida*, rivestimento extracellulare che avvolge uova ed embrioni di mammifero prima dell'impianto⁽¹¹⁴⁾.

La presenza del fuso è indispensabile per il corretto allineamento cromosomico^(118,84): la sua distruzione ha conseguenze drammatiche, come il riarrangiamento o lo spargimento dei cromosomi nel citoplasma^(2,3,10,74,83,85), che possono portare a fenomeni di aneuploidia, causa più comune di fertilizzazione

anomala^(9,15,76,86) e fattore maggiormente responsabile di morte embrionale precoce, aborto spontaneo e malattie ereditarie⁽⁷⁶⁾.

La zona pellucida funziona come porta d'accesso per lo spermatozoo: grazie ad appositi recettori, il gamete maschile può legare e penetrare la zona e fondersi con la membrana plasmatica dell'ovocita, consentendo la fertilizzazione⁽⁷⁾. Consente, poi, il blocco della polispermia^(17,40,41) e, al termine della fertilizzazione, protegge l'embrione in divisione per tutto il tragitto che compie verso l'utero, dove si libera della zona per potersi impiantare^(115,108).

I metodi convenzionali per visualizzare il fuso si basano sul fissaggio del campione^(2,3,10,14,38,62,74,83,85), quindi sulla morte dell'oocita, il che li rende assolutamente inutili durante la pratica clinica. Un problema si presenta anche per la zona pellucida: le normali tecniche di microscopia ottica ce la mostrano come un'unica struttura di formazione omogenea, tuttavia nella realtà è molto più complessa.

L'uso del fuso e della zona pellucida come markers prognostici è stato possibile grazie all'applicazione in biologia della microscopia a luce polarizzata, nata come importante strumento per lo studio dei minerali, per la determinazione dei parametri ottici dei cristalli e per l'analisi delle strutture fini delle fibre⁽⁵⁴⁾.

MICROSCOPIA A LUCE POLARIZZATA

La *polarizzazione* è una caratteristica delle onde elettromagnetiche e dei fotoni che le compongono e indica la direzione di oscillazione del campo elettrico: ogni fotone oscilla in un determinato "*piano di vibrazione*" e si definisce polarizzato. La radiazione di un'usuale sorgente di luce nel suo complesso è costituita da un gran numero di fotoni che oscillano in piani orientati a caso e ciò fa sì che globalmente essa risulti non polarizzata.

Il fascio può essere polarizzato mediante appositi dispositivi (*polarizzatori*), simili ad un filtro, in grado di selezionare i fotoni che l'attraversano, lasciando passare solo quelli che oscillano in una data direzione; la radiazione emergente è polarizzata perché tutti i fotoni vibrano nello stesso piano.

Un sistema di due filtri polarizzanti, in mezzo ai quali si possa porre un oggetto illuminabile per trasparenza, costituisce un elementare "*Polariscopio*"; il primo (*polarizzatore in senso stretto*), trasforma un fascio di radiazione "naturale" in polarizzato; il secondo (*Analizzatore*) rivela lo stato di polarizzazione del fascio incidente, che può essere stato modificato dall'oggetto trasparente interposto. Abbinando al polariscopio un microscopio (un filtro è posto nel condensatore, uno nel tubo porta-ottica) si ha un *microscopio polarizzatore* (Figura 1).

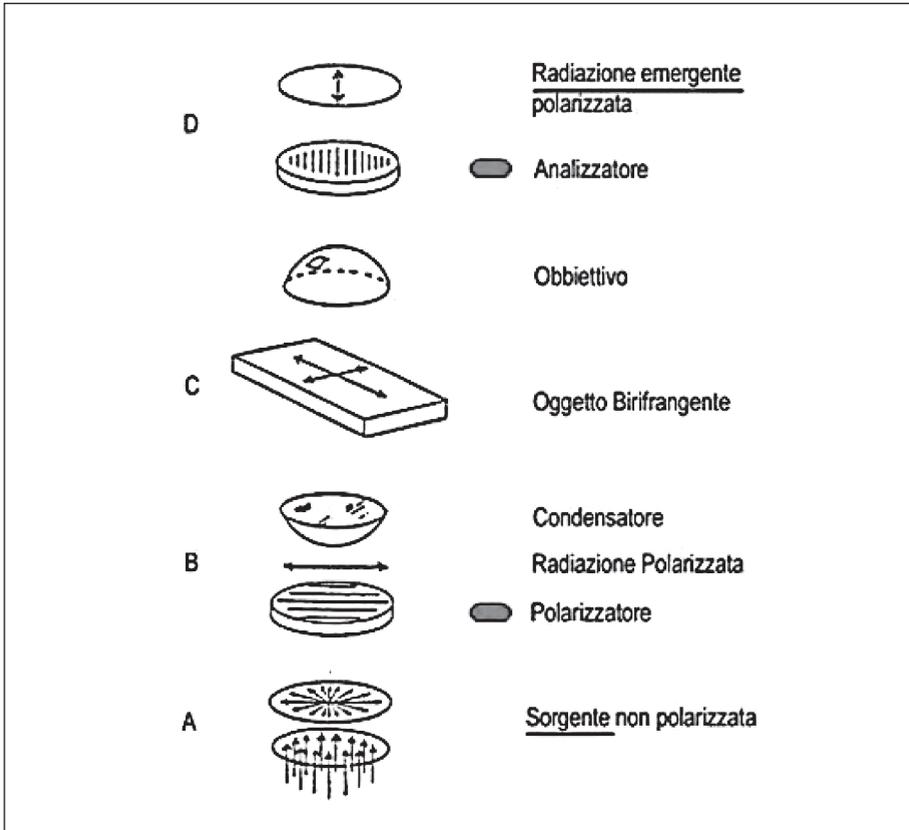


Figura 1. Schema di un microscopio polarizzatore. Se si ignorano i due sistemi ottici essenziali del microscopio (obbiettivo e condensatore), rimangono le due componenti necessarie per molte delle osservazioni in polarizzazione: il polarizzatore e l'analizzatore. Si tratta di due filtri polarizzanti, identici come caratteristiche essenziali, diversi per la funzione. Il "polarizzatore" in senso stretto trasforma un fascio di radiazione "naturale", non polarizzata (A), in un fascio polarizzato (B). L'analizzatore (D) invece rivela lo stato di polarizzazione del fascio che incide su di esso, fascio che può essere stato modificato da un "oggetto" trasparente interposto (C).

La microscopia a luce polarizzata si basa sul comportamento che le diverse sostanze presentano quando attraversate da un fascio di luce polarizzata. Alcune, otticamente omogenee (ISOTROPE), hanno le stesse proprietà ottiche in tutte le direzioni e il raggio di luce che le attraversa esce inalterato. Altre (rocce, cristalli, parti solide dei tessuti vegetali, alcuni tessuti animali come quelli corneo, osseo, connettivo, muscolare) hanno, invece, la capacità di modificare lo stato di polarizzazione della luce che le attraversa, e vengono dette ANISOTROPE o RIFRANGENTI. Queste

sostanze posseggono per lo più due indici di rifrazione diversi (strutture *birifrangenti*).

Un fascio, se attraversa un oggetto birifrangente, viene decomposto in due fasci che oscillano in piani perpendicolari fra loro e che incidono sull'analizzatore obliquamente, attraversandolo in parte. Dopo essi vibrano nello stesso piano e possono interferire; grazie a questa interferenza, l'immagine finale acquista dei colori e delle caratteristiche da cui è possibile risalire a talune proprietà ottiche.

La *birifrangenza* è data dall'orientamento di unità elementari, di ordine di grandezza assai inferiore al limite di risoluzione del microscopio ottico; le due radiazioni emergenti da una struttura birifrangente sono sfasate, a causa della diversa velocità di trasmissione all'interno della struttura. Lo sfasamento tra i due raggi (*ritardazione*) dipende, oltre che dalla differenza tra gli indici di rifrazione, dallo spessore della struttura, per cui, noto l'uno, si ricava l'altro.

La *ritardanza* va a misurare l'entità della birifrangenza, costituendo una misura indiretta del grado di ordine della struttura; più è ordinata, più essa devia il fascio di luce polarizzatore: la sua birifrangenza, e di conseguenza la sua ritardanza, saranno maggiori^(77,93).

Grazie a questa tecnica è possibile visualizzare e misurare le strutture birifrangenti oocitarie^(56,61), come il fuso meiotico e la zona pellucida, senza rovinare o uccidere la cellula (Figura 2).

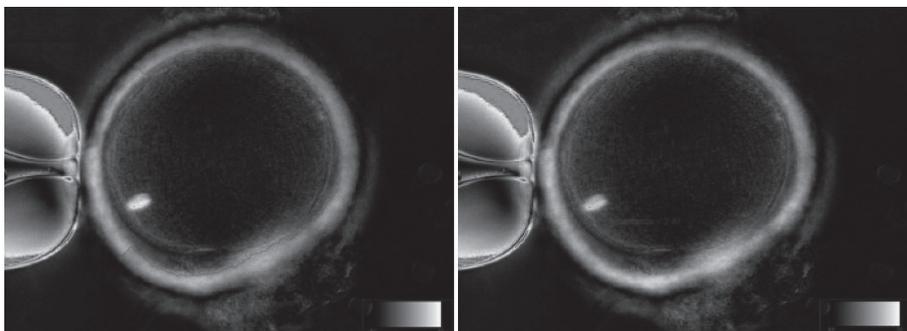


Figura 2. Analisi delle strutture birifrangenti dell'oocita mediante microscopia a luce polarizzata: Misura della ritardanza del fuso meiotico. e della ritardanza della zona pellucida.

METODI

Lo studio è stato condotto su 35 coppie candidate a ICSI. Le pazienti, delle quali sono stati raccolti i dati clinici relativi ad età, abitudine al fumo, indice di massa corporea e risposta al protocollo di stimolazione ormonale ovarica, sono

state trattate farmacologicamente per indurre la maturazione simultanea di più follicoli. Raggiunti i parametri desiderati (dimensione dei follicoli ovarici e livelli di estradiolo sierici) è stato effettuato il prelievo degli oociti (*pick-up*).

Gli oociti recuperati sono stati subito puliti, posti in terreno di coltura e conservati in incubatore, nell'attesa di essere sottoposti all'osservazione con microscopio a luce polarizzata e alla ICSI.

L'analisi delle strutture birifrangenti è stata effettuata misurando area e densità dello strato interno della ZP e area, densità e lunghezza dell'asse maggiore del fuso meiotico.

Subito dopo aver archiviato le immagini, gli oociti sono stati sottoposti ad ICSI, coltivati singolarmente e posti nuovamente in incubatore, in attesa di verificare l'eventuale fertilizzazione.

A 12-16 ore dalla ICSI sono stati analizzati mediante invertoscopio: quelli fertilizzati sono stati mantenuti nelle stesse condizioni di coltura; gli oociti non fertilizzati/fertilizzati in modo anomalo, sono stati invece scartati.

A 48-72 h dalla ICSI è stata effettuata una ulteriore osservazione e gli embrioni correttamente divisi sono stati selezionati per il *transfer*.

Poco prima di effettuare il *transfer*, gli embrioni correttamente clivati sono stati osservati con le medesime modalità descritte per gli oociti, in modo da misurare l'area e la densità dello strato interno della ZP (Figura 3).

Tutti i risultati sono stati analizzati utilizzando il test *t* di Student con distribuzione a due code e, per evidenziare l'eventuale correlazione dei parametri morfologici di oociti ed embrioni con i parametri clinici delle

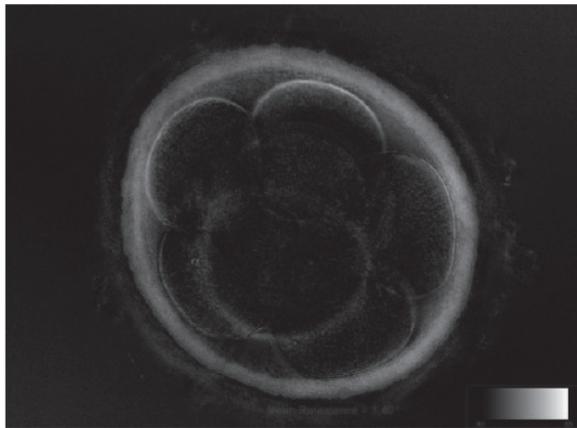


Figura 3. Analisi delle strutture birifrangenti dell'embrione mediante microscopia a luce polarizzata: misura della ritardanza dello strato interno della zona pellucida.

pazienti, è stata eseguita l'analisi statistica di regressione lineare. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

RISULTATI

Partendo da 101 oociti raccolti, è stato raggiunto un tasso di fertilizzazione dell'83,2% ($n = 84$) e di clivaggio del 92,8% ($n = 78$). Scartati gli oociti non fertilizzati e non clivati, sono stati sottoposti ad osservazione con luce polarizzata il 77,2% degli oociti raccolti ($n = 78$).

Complessivamente, la percentuale di gravidanza è stata del 37,2% (13 gravidanze su 35 transfer). La probabilità di impianto di ogni embrione è risultata pari al 16.7 % (13 su 78 embrioni trasferiti).

Per le 13 pazienti appartenenti al gruppo CC (pazienti che hanno concepito) sono stati trasferiti in utero complessivamente 30 embrioni; nel 53,8% dei casi ($n = 7$) sono stati trasferiti 3 embrioni, nel 23,1% ($n = 3$) 2 e nel restante 23,1% ($n = 3$) è stato effettuato un transfer singolo. In quest'ultimo caso gli embrioni si sono sicuramente impiantati in utero ed è quindi possibile l'identificazione certa di quali siano gli embrioni impiantati tra quelli trasferiti (embrioni "sicuramente impiantati", $n = 3$).

Nel gruppo NCC (pazienti che non hanno concepito) sono stati complessivamente trasferiti 48 embrioni ed in tutti i casi non si è verificato l'impianto; in 6 casi è stato effettuato un transfer singolo (embrioni sicuramente non impiantati).

Parametri clinici

Le pazienti hanno età media $35 \pm 3,5$ anni; le donne del gruppo CC hanno età di poco minore ($35 \pm 3,2$ anni) rispetto a quelle del gruppo NCC ($35,04 \pm 3,8$ anni). La differenza tra i gruppi non è comunque significativa.

Per il 37% delle pazienti ($n = 13$) non è stato possibile reperire il dato relativo all'abitudine al fumo; del restante 63% solo una minoranza, pari a 0.1% ($n = 2$), fuma abitualmente. Entrambe le fumatrici appartengono al Gruppo NCC.

Per quanto riguarda l'indice di massa corporea (BMI), le pazienti mostrano un valore medio $24,05 \pm 3,3$ kg/m². I valori sono minori nelle pazienti del Gruppo NCC ($23,8 \pm 3,37$ kg/m² vs $24,43 \pm 3,27$ kg/m² nel gruppo CC) ma la differenza non è significativa.

L'indice di resistenza ovarica media calcolato è pari a $442,99 \pm 342,63$ UI/oocita; i valori risultano maggiori nel gruppo NCC ($475,52 \pm 369,93$ UI/oocita vs $393,11 \pm 294,97$ UI/oocita nel Gruppo CC). La differenza tra i due gruppi non è significativa.

Analisi a luce polarizzata

Gli oociti analizzati mostrano un valore medio di ritardanza del fuso pari a $1,77 \pm 0,46$ nm; la differenza tra Gruppo CC ($1,79 \pm 0,47$ nm) ed NCC ($1,75 \pm 0,46$ nm) non risulta significativa; valutando con l'analisi di regressione lineare il rapporto tra questo parametro e i dati clinici delle pazienti non è stata evidenziata alcuna correlazione.

Per quanto riguarda l'area del fuso, le pazienti presentano un valore medio pari a $307,24 \pm 159,13$ μ m; la differenza tra i due gruppi è significativa ($p = 0,001$, Figura 4): nel Gruppo CC i valori sono sensibilmente minori ($230,30 \pm 155,84$ μ m) rispetto al Gruppo NCC ($353,40 \pm 143,87$ μ m).

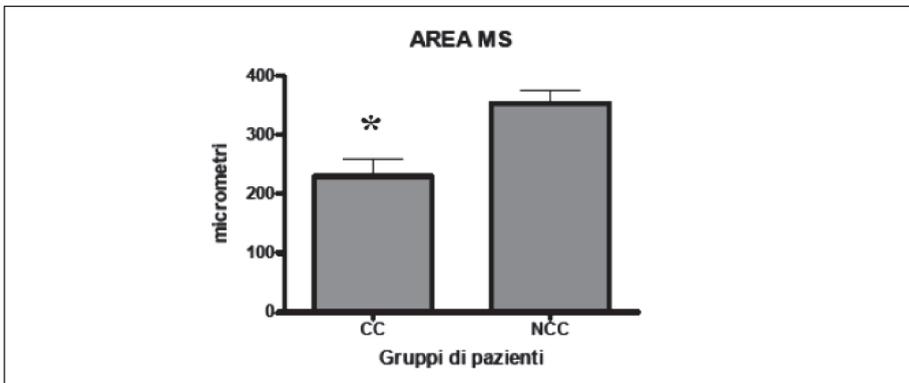


Figura 4. Misurazione dell'area del fuso meiotico. I valori nel gruppo associato a cicli di concepimento (Gruppo CC: $230,30 \pm 155,84$ μ m) sono significativamente minori rispetto al gruppo non associato a cicli di concepimento (Gruppo NCC: $353,40 \pm 143,87$ μ m). (* $p = 0,001$).

PREGN	Coef	SE	z	P>z	95% Conf Interval
ZP area OO	-.0002361	.0000605	-3.90	0.000	-.0003547 -.0001175
ZP ret OO	-.0799166	.3381904	-0.24	0.813	-.7427575 .5829244
AGE	.0897118	.0774591	1.16	0.247	-.0621052 .2415289
Respons	-.0024213	.0011385	-2.13	0.033	-.0046527 -.0001899
BMI	.1858149	.0744261	2.50	0.013	.0399423 .3316874

Figura 5. Analisi di regressione lineare applicata agli oociti. L'area della zona pellucida (ZP area OO), la resistenza ovarica (Respons) e l'indice di massa corporea (BMI) mostrano una correlazione significativa con il concepimento mentre età della donna (AGE) e ritardanza della ZP (ZP ret OO) non sono correlate alla gravidanza.

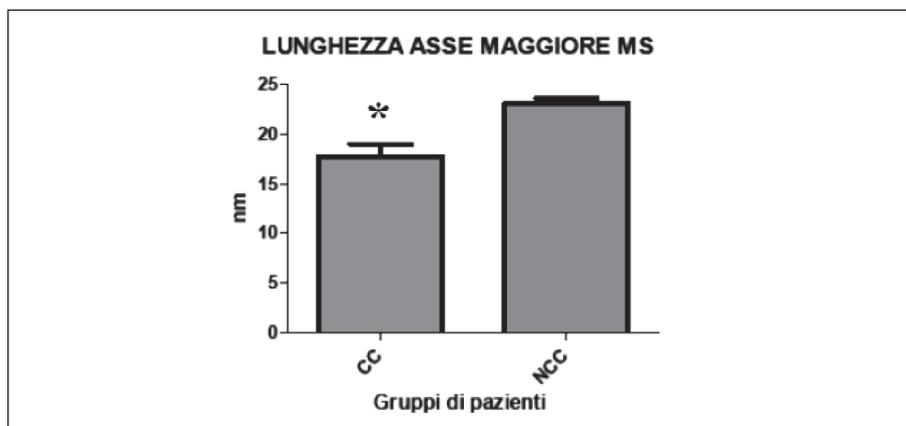


Figura 6. Lunghezza dell'asse maggiore del fuso meiotico. I valori osservati sono significativamente maggiori nel gruppo di pazienti senza concepimento (Gruppo NCC: $23,04 \pm 3,91$ nm) rispetto al gruppo di pazienti che hanno avuto una gravidanza (Gruppo CC: $17,71 \pm 6,92$). La differenza tra i due gruppi è significativa. (* $p < 0,0001$).

L'analisi di regressione lineare ha evidenziato una correlazione significativa tra l'area del fuso e la risposta al trattamento: con l'aumentare della resistenza ovarica si nota un aumento dello spessore del fuso e della sua area (Figura 5).

La lunghezza dell'asse maggiore del fuso misura in media $20,95 \pm 5,88$ μm ; i valori osservati sono sensibilmente maggiori nel Gruppo NCC ($23,04 \pm 3,91$ μm) rispetto al Gruppo CC ($17,71 \pm 6,92$ μm). La differenza è altamente significativa ($p < 0,0001$, Figura 6).

Grazie all'uso del Poloscopio è stato possibile distinguere i tre stati che compongono la Zona Pellucida (Figura 7): interno, intermedio ed esterno, costituiti da filamenti organizzati in maniera diversa e caratterizzati da diversi valori di birifrangenza e ritardanza^(79,101). A risaltare è soprattutto lo strato interno, maggiormente spesso e luminoso, fatto di filamenti orientati radialmente e caratterizzato da alti valori di ritardanza; su questo strato sono state effettuate le nostre misurazioni. La ritardanza media è pari a $2,12 \pm 0,64$ nm; la differenza tra Gruppo CC ($2,03 \pm 0,63$ nm) e NCC ($2,16 \pm 0,65$ nm) non è significativa e l'analisi di regressione lineare non ha mostrato alcuna correlazione tra ritardanza e parametri clinici della paziente.

Più rilevanti i dati relativi all'area della zona pellucida (valore medio: $9005,21 \pm 4008,28$ μm): nel Gruppo CC è notevolmente ridotta ($6020,86 \pm 4324,40$ μm) rispetto al Gruppo NCC ($10592,63 \pm 2761,56$ μm); la differenza è altamente significativa ($p < 0,0001$, Figura 8). L'analisi di regressione lineare ha inoltre evidenziato una forte correlazione tra la responsività ovarica e l'area

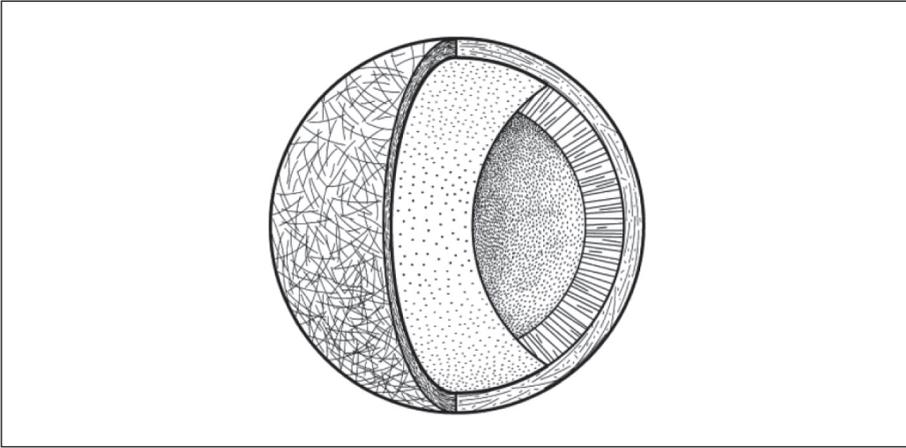


Figura 7. Rappresentazione schematica della struttura della ZP basata sull'osservazione con il microscopio a luce polarizzata: lo strato interno ed esterno sono costituiti da filamenti disposti in modo da creare strati distinti orientati perpendicolarmente tra loro. Lo strato più interno (IL) è formato da filamenti orientati radialmente, quello più esterno (OL) tangenzialmente. Lo strato intermedio (ML) non mostra proprietà birifrangenti; ciò indica che è caratterizzato da una struttura ordinata. (Keefe et al., 1997).

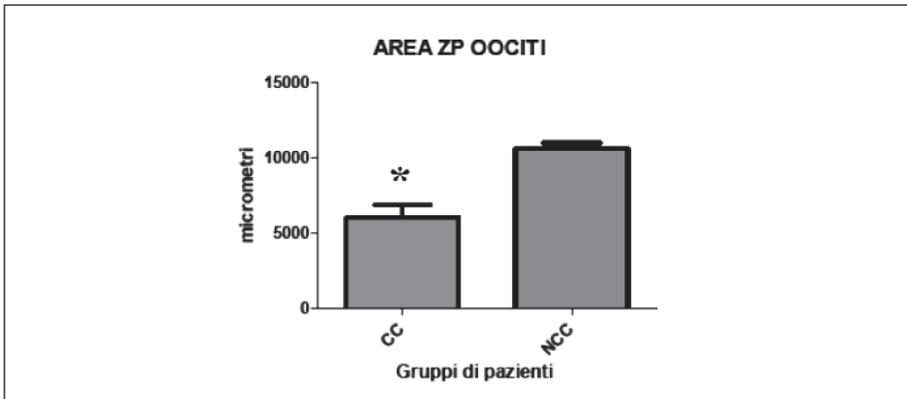


Figura 8. Area dello strato interno della zona pellucida negli oociti. Nel gruppo associato a concepimento (Gruppo CC: $6020,86 \pm 4324,40 \mu\text{m}$) l'area risulta significativamente ridotta rispetto al gruppo non associato a concepimento (Gruppo NCC: $10592,63 \pm 2761,56 \mu\text{m}$). (* $p < 0,0001$).

della struttura: all'aumentare dei valori di ovaio-resistenza aumentano i valori relativi all'area dello strato interno della zona pellucida.

L'analisi della ritardanza e dell'area della zona pellucida è stata ripetuta sugli embrioni ottenuti dagli oociti analizzati.

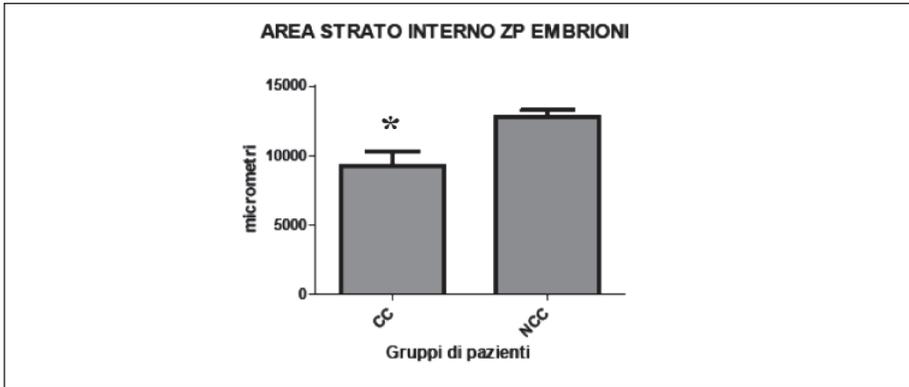


Figura 9. Area dello strato interno della zona pellucida negli embrioni. I valori nel gruppo associato a concepimento (Gruppo CC: $9219,77 \pm 5654,52 \mu\text{m}$) sono significativamente minori rispetto a quelli osservati nelle pazienti che non hanno avuto una gravidanza (Gruppo NCC: $12755,99 \pm 3428,15 \mu\text{m}$). (* $p = 0,001$).

Le pazienti mostrano in media un valore di ritardanza $2,22 \pm 0,67 \text{ nm}$; confrontando i valori del Gruppo CC ($2,21 \pm 0,78 \text{ nm}$) con quelli del Gruppo NCC ($2,23 \pm 0,60 \text{ nm}$) non si osservano differenze significative. I dati raccolti nell'embrione, però, mostrano un'importante correlazione con gli stessi dati raccolti nel pool di oociti dai quali gli embrioni derivano.

Come accade per gli oociti, nessun parametro clinico associato alla paziente sembra correlato con il valore di ritardanza.

L'area dello strato interno della zona pellucida (valore medio $11424,17 \pm 4692,77 \mu\text{m}$) mostra lo stesso trend osservato negli oociti: i valori nel Gruppo CC ($9219,77 \pm 5654,52 \mu\text{m}$) sono sensibilmente minori rispetto a quelli osservati nelle pazienti del Gruppo NCC ($12755,99 \pm 3428,15 \mu\text{m}$). La differenza è significativa ($p = 0,001$, Figura 9) e i dati raccolti nell'embrione mostrano una correlazione con gli stessi dati raccolti nel pool di oociti dai quali gli embrioni derivano. Ancora una volta l'analisi di regressione lineare rivela una stretta dipendenza tra l'area della zona pellucida e la risposta ovarica al trattamento (Figura 10).

All'interno della coorte di pazienti gravide si sono verificati 3 casi di transfer singolo, situazione ideale nello studio di fattori determinanti la qualità oocitaria ed embrionaria poiché permette di identificare con certezza quale sia l'oocita da cui deriva l'embrione "sicuramente impiantato".

Le 3 pazienti che hanno concepito in seguito a transfer di singolo embrione (Gruppo SI) sono state confrontate con le pazienti che non hanno concepito ($n = 22$, Gruppo SNI) ma una casistica così ristretta consente semplicemente

PREGN	Coef	SE	z	P>z	95% Conf Interval	
ZP area EMB	-.0001289	.0000399	3.23	0.001	-.0002071	-.0000507
ZP ret EMB	.2564063	.2572589	1.00	0,221527778	-.2478118	.7606244
AGE	.0597032	.0535041	1.12	0,183333333	-.0451628	.1645692
Respons	-.0018919	.0007333	-2.58	0.010	-.0033292	-.0004547
BMI	.1373366	.0573821	2.39	0.017	.0248698	.2498034

Figura 10. Analisi di regressione lineare applicata agli embrioni. L'area della zona pellucida (ZP area EMB), la resistenza ovarica (Respons) e l'indice di massa corporea (BMI) mostrano una correlazione significativa con il concepimento. Al contrario, età della donna (AGE) e ritardanza della ZP (ZP ret EMB) non sono correlate alla gravidanza.

considerazioni preliminari, che dovranno essere confermate/smentite ampliando il numero di osservazioni.

I dati relativi alla ritardanza delle strutture birifrangenti sono molto simili nei due gruppi; nel gruppo di pazienti gravide la ritardanza è poco minore rispetto a quello che si osserva nelle pazienti non gravide, sia per quanto riguarda il fuso ($1,41 \pm 0,71$ nm vs $1,75 \pm 0,46$ nm), sia per lo strato interno della zona pellucida ($1,67 \pm 1,15$ nm vs $2,16 \pm 0,65$ nm nell'oocita e $1,58 \pm 0,97$ nm vs $2,23 \pm 0,60$ nm nell'embrione).

Il gruppo di pazienti gravide presenta un fuso più corto ($18,70 \pm 7,25$ μ m vs $23,04 \pm 3,91$ μ m) e con area ridotta ($232,68 \pm 138,02$ μ m vs $353,40 \pm 143,87$ μ m) ed una zona pellucida con area minore ($3891,87 \pm 2225,02$ μ m vs $10592,63 \pm 2761,56$ μ m nell'oocita e $7451,08 \pm 4991,23$ μ m vs $12755,99 \pm 3428,15$ μ m nell'embrione). Per quello che riguarda l'area della zona pellucida le differenze sono significative, sia nell'oocita ($p = 0,001$) che nell'embrione ($p = 0,01$).

DISCUSSIONE

Negli ultimi anni ha preso piede l'ipotesi che la morfologia di zona pellucida e fuso meiotico possa essere un marker prognostico di qualità ovocitaria^(24,25,60,72,73,81,88,89,104,112); l'introduzione nella pratica clinica di nuove tecniche di osservazione, come la microscopia a luce polarizzata, ha consentito di indagare nel dettaglio la struttura delle due componenti e di correlarle alla qualità della cellula uovo e al suo potenziale di fertilizzazione, il tutto senza compromettere la vitalità della cellula.

La letteratura da sempre sottolinea che l'età della donna è un fattore determinante per la qualità di oociti ed embrioni: l'invecchiamento cellulare è

correlato a maggiore incidenza di alterazioni a carico del DNA e di anomalie strutturali dell'ocita. È stato dimostrato, ad esempio, che la proporzione di oociti con fuso anomalo è maggiore nelle donne anziane⁽¹⁴⁾ e che questo dato è legato ad un'alta prevalenza di aneuploidie cromosomiche.

La nostra analisi non ha mostrato correlazione tra qualità delle strutture birifrangenti ed età della donna, tuttavia è necessario considerare che gli ovociti osservati nello studio derivavano esclusivamente da pazienti la cui diagnosi di sterilità fosse associata a danno tubarico o oligoteratozoospermia di diverso grado, pertanto sono state escluse donne con riserva ovarica ridotta, condizione tipica dell'età avanzata. Ciò può aver notevolmente attenuato l'effetto dell'età sui dati osservati.

Numerosi studi sottolineano che il fumo può influire negativamente sulla capacità di procreare: alcune indagini epidemiologiche hanno mostrato come le donne che in età fertile fumano abitualmente siano più soggette ad aborti spontanei, gravidanze ectopiche, infertilità tubarica e ritardi nel concepimento rispetto alle non fumatrici^(5,6,18,19,23,28,32,75,82,92,99,102,110). L'abitudine al fumo è stata correlata con l'incidenza di menopausa precoce⁽⁵¹⁾, con un ridotto periodo di transizione verso la menopausa^(27,70) e con una ridotta riserva ovarica⁽¹¹⁶⁾. Studi più recenti hanno ipotizzato, inoltre, che l'associazione tra somministrazione di FSH e uso di nicotina potrebbe causare accelerata atresia oocitaria e diminuzione della qualità follicolare⁽⁶³⁾.

I numeri ridotti del nostro studio ovviamente non consentono congetture in tal senso ma in futuro sarebbe interessante espandere le coorti in studio, per capire se vi siano correlazioni tra il parametro ed eventuali danni a carico di oocita ed embrione.

Per quanto riguarda l'indice di massa corporea, la letteratura tenta da tempo di comprendere se i valori di BMI siano in qualche modo correlabili con la probabilità di ottenere una gravidanza ma finora i dati sono contrastanti^(35,68). Le pazienti con BMI troppo elevato vanno incontro ad alterata secrezione di *gonadotropin releasing hormone*, elevati livelli circolanti di insulina, ridotti livelli della globulina che lega gli ormoni sessuali⁽⁸⁷⁾ e aumentata produzione di androgeni⁽¹¹³⁾; sono, inoltre, maggiormente predisposte a *Sindrome dell'ovaio policistico*, aborto, parti pretermine, parti cesarei e complicanze prenatali^(47,57,51,77,79). Dati recenti sottolineano come l'aumento di BMI sia inversamente proporzionale alla diminuzione di hCG follicolare e come ciò possa essere correlato a minore qualità embrionaria e diminuzione dei tassi di gravidanza^(21,66). Di contro, vi sono Autori convinti che nelle donne giovani il BMI non influisca in alcun modo sull'esito di un ciclo di fecondazione assistita^(65,69). Nel nostro studio la maggior parte delle pazienti ha mostrato

valori al di sotto del limite patologico del sovrappeso e non si sono osservate differenze significative tra i gruppi analizzati.

La responsività dell'ovaio alla stimolazione controllata tipica dei cicli di fecondazione assistita viene misurata in termini di “*resistenza ovarica*” (rapporto tra unità di gonadotropine somministrate e numero di oociti recuperati). Un ovaio per essere considerato normalmente sensibile alla stimolazione deve avere una resistenza compresa tra 200 e 900 UI/oocita; valori minori indicano eccessiva responsività, con il possibile rischio di *Sindrome da iperstimolazione ovarica* (OHSS); valori maggiori indicano, al contrario, un ovaio fortemente resistente alla terapia.

I valori riscontrati nelle pazienti sono risultati più alti nel gruppo non associato a cicli di concepimento e tale associazione sembra confermata dall'analisi dei transfer singoli. Un dato interessante riguarda la correlazione tra l'ovaio-resistenza e i parametri morfologici di oocita ed embrione: all'aumentare dell'ovaio-resistenza aumentano notevolmente l'area della zona pellucida, sia negli oociti sia negli embrioni, e l'area del fuso.

Alla luce dei numerosi studi che propongono la presenza del fuso meiotico come fattore determinante in termini di probabilità di sviluppo embrionario^(24,25,72,73,88,89,112,113), nel nostro studio sono stati usati esclusivamente oociti con fuso visibile. Il fuso è stato oggetto di numerosi studi nell'ultimo decennio: i parametri associati, come spessore e ritardanza, sono stati proposti come indice di qualità oocitaria⁽⁸⁸⁾. La letteratura si focalizza in particolar modo sulla ritardanza: Trimarchi⁽¹⁰⁴⁾ l'ha correlata allo sviluppo embrionario; Shen ha riportato che la ritardanza media è correlata positivamente allo score dei pronuclei e al tasso di concepimento.

I risultati del nostro studio non concordano con queste evidenze: non è stata notata alcuna differenza significativa tra la ritardanza degli oociti del gruppo associato a cicli di concepimento e di quelli appartenenti al gruppo non associato a cicli di concepimento; tale parametro non sembra, quindi, correlato ad una maggiore probabilità di sviluppo embrionario.

Una differenza importante riguarda invece le dimensioni del fuso; la presenza di un fuso con area e lunghezza dell'asse maggiore ridotti sembra essere associato ad una maggiore probabilità di gravidanza. Tale tendenza risulta confermata anche dall'osservazione dei transfert singoli anche se, quasi sicuramente a causa della scarsità dei dati a disposizione, la differenza tra i gruppi “sicuramente impiantati” e “sicuramente non impiantati” non è risultata significativa. Il dato va a rafforzare l'ipotesi avanzata in passato da altri Autori i quali, dopo osservazione con semplice microscopia ottica, avevano proposto che la presenza di un globulo polare grande e di forma

anomala potesse correlare negativamente con il tasso di fertilizzazione ed essere associato ad anomalie cromosomiche⁽¹⁰⁵⁾. L'aumento di dimensioni del globulo potrebbe esser dovuto al disassemblamento del fuso meiotico in seguito ad uno stress che ha subito l'oocita o a qualche errore durante la transizione telofase-metafase.

Come accaduto per il fuso, la scoperta delle proprietà birifrangenti della zona pellucida ha dato il via a tutta una serie di studi che hanno tentato di correlare la birifrangenza allo sviluppo embrionario^(81,98); l'unico strato con importanza significativa per l'outcome sembra quello interno, tanto che esso può essere considerato un fattore predittivo nella valutazione del potenziale dell'oocita^(88,98).

Nel nostro studio i valori di ritardanza della zona pellucida non sono risultati significativamente differenti tra i due gruppi in analisi, né per l'oocita né per l'embrione: non è stata trovata alcuna correlazione tra le proprietà birifrangenti della zona pellucida e la pregnancy rate. L'area è invece un parametro che mostra differenze significative tra i due gruppi: gli embrioni appartenenti al gruppo non associato a cicli di concepimento mostrano uno strato interno della zona pellucida sensibilmente più spesso e risalendo al pool di oociti da cui l'embrione può essersi sviluppato, questo trend risulta confermato.

L'analisi di correlazione sembra comprovare questa evidenza: esiste una correlazione significativa tra l'area dello strato interno della zona pellucida dell'embrione e quella dello strato interno della zona pellucida dell'oocita. Verosimilmente gli embrioni con zona pellucida spessa una volta arrivati allo stadio di blastocisti faticano a completare il processo di fuoriuscita dalla zona pellucida, quindi difficilmente riescono ad impiantarsi con successo nell'endometrio.

Le evidenze raccolte osservando i gruppi CC e NCC risultano confermate dall'analisi degli embrioni sicuramente impiantati vs sicuramente non impiantati.

La visualizzazione di oociti ed embrioni mediante microscopia a luce polarizzata ci ha permesso di studiare il fuso meiotico e la zona pellucida in maniera non traumatica per la cellula uovo e con tempi adatti alla applicazione durante la routine clinica dei cicli di fecondazione assistita.

Benché la maggior parte degli studi in merito si siano concentrati prevalentemente sulla ritardanza, il nostro studio mostra come essa potrebbe non essere il parametro maggiormente predittivo della qualità ovocitaria ed embrionaria.

Dai nostri dati emerge invece la presenza di una stretta correlazione tra l'insorgenza di gravidanza e l'area dello strato interno della zona pellucida

dell'embrione: se la zona è spessa, l'embrione ha meno probabilità di impianto. Questa evidenza, che finora non era stata osservata da altri, è confermata se si analizzano i dati raccolti sugli oociti da cui gli embrioni si sono sviluppati: un embrione con zona pellucida spessa deriva da un oocita con la stessa caratteristica. Questo parametro, se la nostra osservazione venisse confermata su casistiche maggiori, potrebbe essere impiegato come marker di qualità ovocitaria e di elevata probabilità di impianto dell'embrione derivato da un dato ovocita.

I valori di area, insieme a quelli di lunghezza dell'asse maggiore, si sono rivelati marker importanti anche per il fuso meiotico: un fuso troppo largo e spesso è indice di cattiva qualità dell'oocita ed è associato a bassa probabilità di concepimento, anche se il suo potere predittivo risulta minore rispetto all'area dello strato interno della zona pellucida.

Sarebbe interessante ampliare la casistica in modo da individuare veri e propri cut off che consentano un processo di validazione clinica applicando questi parametri di birifrangenza alla routine della fecondazione in vitro. Se si confermasse che questi parametri rappresentano markers attendibili e predittivi di qualità ovocitaria, essi potrebbero essere impiegati sia per la selezione degli oociti da fertilizzare a fresco, sia per quelli da crioconservare, in modo da scegliere solo quelli che, una volta scongelati, avranno le maggiori probabilità di sopravvivere.

BIBLIOGRAFIA

1. Alikani M, Palermo G, Adler A, Bertoli M, Blake M, Cohen J: *Intracytoplasmic sperm injection in dysmorphic human oocytes*. *Zygote*. 1995; 3: 283-288.
2. Almeida PA, Bolton VN: *The effect of temperature fluctuations on the cytoskeletal organisation and chromosomal constitution of the human oocyte*. *Zygote*. 1995; 3: 357-365.
3. Aman RR, Parks J: *Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro-matured bovine oocytes*. *Biol Reprod*. 1994; 50: 103-110.
4. Artini PG, Battaglia C, D'Ambrogio G, Barreca A, Droghini F, Volpe A, Genazzani AR: *Relationship between human oocyte maturity, fertilization and follicular fluid growth factors*. *Hum. Reprod*. 1994; 9: 902-906.
5. Atrash HK, Hughes JM, Hogue CJ: *Ectopic pregnancy in the United States, 1970-1983*. *MMWR CDC Surveill Summ*. 1986; 35: 29SS-37SS.
6. Augood C, Duckitt K, Templeton AA: *Smoking and female infertility: a systematic review and meta-analysis*. *Hum. Reprod*. 1998; 13: 1532-1539.
7. Austin CR: *Fertilization of mammalian eggs in vitro*. *Int. Rev. Cytol*. 1961; 12: 337-359.
8. Baczkowski T, Kurzawa R, Głabowski W: *Methods of embryo scoring in in vitro fertilization*. *Reprod. Biol*. 2004; 4: 5-22.
9. Bahce M, Cohen J, Munné S: *Preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy: were we looking at the wrong chromosomes?* *J. Assist. Reprod. Genet*. 1999; 16: 176-181.
10. Baka SG, Toth TL, Veeck LL, Jones HW Jr, Muasher SJ, Lanzendorf SE: *Evaluation of the spindle apparatus of in-vitro matured human oocytes following cryopreservation*. *Hum. Reprod*. 1995; 10: 1816-1820.
11. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R: *Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection*. *Hum. Reprod*. 1998; 13: 3431-3433.
12. Balaban B, Urman B, Isikilar A: *The effect of the polar body morphology on embryo quality, implantation and pregnancy rates*. *Hum. Reprod*. 1998; 76: S7.
13. Battaglia C, Ciotti P, Notarangelo L, Fratto R, Facchinetti F, de Alosio D: *Embryonic production of nitric oxide and its role in implantation: a pilot study*. *J. Assist. Reprod. Genet*. 2003; 20: 449-454.
14. Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR.: *Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women*. *Hum. Reprod*. 1996; 11: 2217-2222.
15. Benadiva CA, Kligman I, Munné S: *Aneuploidy 16 in human embryos increases significantly with maternal age*. *Fertil. Steril*. 1996; 66: 248-255.
16. Berker B, Kaya C, Aytac R, Satiroglu H: *Homocysteine concentrations in follicular fluid are associated with poor oocyte and embryo qualities in polycystic ovary syndrome patients undergoing assisted reproduction*. *Hum. Reprod*. 2009; 24: 2293-2302.
17. Bleil JD, Wassarman PM: *Synthesis of zona pellucida proteins by denuded and follicle-enclosed mouse oocytes during culture in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980; 77: 1029-1033.
18. Bouyer J: *Epidemiology of ectopic pregnancy: incidence, risk factors and outcomes*. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod*. 2003; 32: S8-17.

19. Burguet A, Agnani G: *Smoking, fertility and very preterm birth*. J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. 32, 19-16, 2003.
20. Butcher L, Coates A, Martin KL, Rutherford AJ, Leese HJ: *Metabolism of pyruvate by the early human embryo*. Biol. Reprod. 1998; 58: 1054-1056.
21. Carrell DT, Jones KP, Peterson CM, Aoki V, Emery BR, Campbell BR: *Body mass index is inversely related to intrafollicular HCG concentrations, embryo quality and IVF outcome*. Reprod. Biomed. Online 2001; 3: 109-111.
22. Child TJ, Abdul-Jalil AK, Tan SL: *Embryo morphology, cumulative embryo score, and outcome in an oocyte in vitro maturation program*. Fertil. Steril. 2002; 77: 424-425.
23. Chow WH, Daling JR, Weiss NS, Voigt LF: *Maternal cigarette smoking and tubal pregnancy*. Obstet. Gynecol. 1988; 71: 167-170.
24. Cohen Y, Malcov M, Shwartz T, Mey-Raz N, Carmon A, Cohen T, Lessing JB, Amit A, Azem F: *Spindle imaging: a new marker for optimal timing of ICSI?* Hum. Reprod. 2004; 19: 649-654.
25. Cooke S, Tyler JP, Driscoll GL: *Meiotic spindle location and identification and its effect on embryonic cleavage plane and early development*. Hum. Reprod. 2003; 18: 2397-2405.
26. Cooper GS, Baird DD, Hulka BS, Weinberg CR, Savitz DA, Hughes CL Jr.: *Follicle-stimulating hormone concentrations in relation to active and passive smoking*. Obstet. Gynecol. 1995, 8: 407-411.
27. Copperman AB, Selick CE, Grunfeld L, Sandler B, Bustillo M.: *Cumulative number and morphological score of embryos resulting in success: realistic expectations from in vitro fertilization-embryo transfer*. Fertil. Steril. 1995; 64: 88-92.
28. Daling JR: *Cigarette smoking and primary tubal infertility*. In Smoking and Reproductive Health Edited by: MJ R. Littleton, MA, PSG Publishers 1987; 40-46.
29. De Placido G, Alviggi C, Clarizia R, Mollo A, Alviggi E, Strina I, Fiore E, Wilding M, Pagano T, Matarese G: *Intra-follicular leptin concentration as a predictive factor for in vitro oocyte fertilization in assisted reproductive techniques*. J. Endocrinol. Invest. 2006; 29: 719-726.
30. De Placido G, Wilding M, Strina I, Alviggi E, Alviggi C, Mollo A, Varicchio MT, Tolino A, Schiattarella C, Dale B: *High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate*. Hum. Reprod. 2002; 17: 2402-2409.
31. De Sutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M: *Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection*. Hum. Reprod. 1996 11: 595-597.
32. Dekeyser-Boccaro J, Milliez J: *Smoking and ectopic pregnancy: is there a causal relationship*. J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris) 34, Spec No 2005; 1: 3S119-123.
33. Desai NN, Goldstein J, Rowland DY, Goldfarb JM: *Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study*. Hum. Reprod. 2000; 15: 2190-2196.
34. Desforges-Bullet V, Gallo C, Lefebvre C, Pigny P, Dewailly D, Catteau-Jonard S.: *Increased anti-mullerian hormone and decreased FSH levels in follicular fluid obtained in women with polycystic ovaries at the time of follicle puncture for in vitro fertilization*. Fertil Steril. 2009; 94: 198-204.

35. Detti L, Rode A, Yelian FD, Kruger M, Diamond, MP, Puscheck EE: *Serum human chorionic gonadotropin level after ovulation triggering is influenced by the patient's body mass index and the number of larger follicles*. Fertil. Steril. 2007; 88: 152-155.
36. Devreker F, Hardy K, Van den Bergh M, Winston J, Biramane J, Englert Y: *Noninvasive assessment of glucose and pyruvate uptake by human embryos after intracytoplasmic sperm injection and during the formation of pronuclei*. Fertil. Steril. 2000; 73: 947-954.
37. Ebner T, Yaman C Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, Tews G: *Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection*. Hum. Reprod. 2000; 15: 427-430.
38. Eichenlaub-Ritter U, Stahl A, Luciani JM: *The microtubular cytoskeleton and chromosomes of unfertilized human oocytes aged in vitro*. Hum. Genet. 1988; 80: 259-264.
39. Fisch JD, Rodriguez H, Ross R, Overby G, Sher G: *The Graduated Embryo Score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos*. Hum. Reprod. 2001; 16: 1970-1975.
40. Florman HM, Wassarman PM: *O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity*. Cell. 1985; 41: 313-324.
41. Florman HM, Bechtol KB, Wassarman PM: *Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm*. Dev. Biol. 1984; 106: 243-255.
42. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB: *Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer*. Fertil. Steril. 2000; 73: 1155-1158.
43. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB: *Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential*. Fertil. Steril. 2001; 76: 1175-1180.
44. Garello C, Baker, H Rai J, Montgomery S, Wilson P, Kennedy CR, Hartshorne GM: *Pronuclear orientation, polar body placement, and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization: further evidence for polarity in human oocytes?* Hum. Reprod. 1999; 14: 2588-2595.
45. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fortini D, Grieco N: *Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection*. Fertil. Steril. 2003, 80: 341-349.
46. Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmann J, Roulier R: *Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers*. Hum. Reprod. 1995; 10: 2427-2431.
47. Goswamy N, Feldman J, Grazi RV: *Body mass index in patients with polycystic ovary syndrome: a comparison of treatment outcomes with clomiphene and gonadotropins*. Fertil. Steril. 2002; 78: S222.
48. Gott AL, Hardy K, Winston RM, Leese HJ: *Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos*. Hum. Reprod. 1990; 5: 104-108.
49. Green BB, Weiss NS, Daling JR: *Risk of ovulatory infertility in relation to body weight*. Fertil. Steril. 1988; 50: 721-726.

50. Hardarson T, Hanson C, Sjögren A, Lundin K: *Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation.* Hum. Reprod. 2001; 16: 313-318.
51. Harlow BL, Signorello LB: *Factors associated with early menopause.* Maturitas. 2000; 35: 3-9.
52. Hartshorne NH, Stuart A: *The teaching of the use of the polarizing microscope.* J. R. Microsc. Soc. 1951; 71: 200-208.
53. Hassan-Ali H, Hisham-Saleh A, El-Gezeiry D, Baghdady I, Ismaeil I, Mandelbaum J: *Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection.* Hum. Reprod. 1998; 13: 3425-3430.
54. Holte J, Berglund L, Milton K, Garello C, Gennarelli G, Revelli A, Bergh T: *Construction of an evidence-based integrated morphology cleavage embryo score for implantation potential of embryos scored and transferred on day 2 after oocyte retrieval.* Hum. Reprod. 2007; 22: 548-557.
55. Hsieh M, Zamah AM, Conti M: *Epidermal growth factor-like growth factors in the follicular fluid: role in oocyte development and maturation.* Semin. Reprod. Med. 2009; 27: 52-61.
56. Inoue S: *Polarization optical studies of the mitotic spindle. I. The demonstration of spindle fibers in living cells.* Chromosoma. 1953; 5: 487-500.
57. Isaacs JD, Magann EF, Martin RW, Chauhan SP, Morrison JC: *Obstetric challenges of massive obesity complicating pregnancy.* J. Perinatol. 1994; 14: 10-14.
58. *Italian Ministry of Health Guidelines on medically-assisted reproduction Law Decree 21 July 2004.* Gazzetta Ufficiale n. 191 (August 16, 2004).
59. Kahraman S, Kumtepe Y, Sertyel S, Dönmez E, Benkhalifa M, Findikli N, Vanderzwalmen P: *Pronuclear morphology scoring and chromosomal status of embryos in severe male infertility.* Hum. Reprod. 2002; 17: 3193-3200.
60. Keefe D, Liu L, Wang W, Silva C: *Imaging meiotic spindles by polarization light microscopy: principles and applications to IVF.* Reprod Biomed Online. 2003; 7: 24-29.
61. Keefe D, Tran P, Pellegrini C, Oldenbourg R, et al: *Polarized light microscopy and digital image processing identify a multilaminar structure of the hamster zona pellucida.* Hum. Reprod. 1997; 12: 1250-1252.
62. Kim NH, Moon SJ, Prather RS, Day BN: *Cytoskeletal alteration in aged porcine oocytes and parthenogenesis.* Mol. Reprod. Dev. 1996; 43: 513-518.
63. Kinney A, Kline J, Kelly A, Reuss ML, Levin B: *Smoking, alcohol and caffeine in relation to ovarian age during the reproductive years.* Hum. Reprod. 2007; 22, 1175-1185.
64. Laasch C, Puscheck E: *Cumulative embryo score, not endometrial thickness, is best for pregnancy prediction in IVF.* J. Assist. Reprod. Genet. 2004; 21: 47-50.
65. Lashen H, Ledger W, Bernal AL, Barlow D: *Extremes of body mass do not adversely affect the outcome of superovulation and in-vitro fertilization.* Hum. Reprod. 5, 1914, 712-7199.
66. Loveland JB, McClamrock HD, Malinow AM, Sharara FI: *Increased body mass index has a deleterious effect on in vitro fertilization outcome.* J. Assist. Reprod. Genet. 2001; 18: 382-386.

67. Ludwig M, Schopper B, Al-Hasani S, Diedrich K: *Clinical use of a pronuclear stage score following intracytoplasmic sperm injection: impact on pregnancy rates under the conditions of the German embryo protection law*. Hum. Reprod. 2000; 15: 325-329.
68. Maheshwari A, Stofberg L, Bhattacharya S: *Effect of overweight and obesity on assisted reproductive technology - a systematic review*. Hum. Reprod. Update 2007; 13: 433-444.
69. Martinuzzi K, Ryan S, Luna M, Copperman AB: *Elevated body mass index (BMI) does not adversely affect in vitro fertilization outcome in young women*. J. Assist. Reprod. Genet. 2008; 25: 169-175.
70. McKinlay SM, Brambilla DJ, Posner JG: *The normal menopause transition*. Maturitas. 1992; 14: 103-115.
71. Milki AA, Hinckley MD, Gebhardt J, Dasig D, Westphal LM, Behr B: *Accuracy of day 3 criteria for selecting the best embryos*. Fertil. Steril. 2002; 77: 1191-1195.
72. Moon JH, Hyun CS, Lee SW, Son WY, Yoon SH, Lim JH: *Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the Polscope enables the prediction of embryonic developmental competence after ICSI*. Hum. Reprod. 2003; 18: 817-820.
73. Moon JH, Hyun CS, Lee SW, Son WY, Yoon SH, Lim JH: *Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the PolScope enables the prediction of embryonic developmental competence after ICSI*. Hum. Reprod. 2003; 18: 817-820.
74. Moor RM, Crosby IM: *Temperature-induced abnormalities in sheep oocytes during maturation*. J. Reprod. Fertil. 1985; 75: 467-473.
75. Munafo M, Murphy M, Whiteman D, Hey K et al: *Does cigarette smoking increase time to conception?* J. Biosoc. Sci. 2002; 34: 65-73.
76. Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J: *Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities*. Fertil. Steril. 1995; 64: 382-391.
77. Nam YS, Jeong CJ, Kim NK, Yoon TK, Cha KY: *Clinical consideration of obese infertile women*. Korean J. Fertil. Steril. 2002; 29: 209-214.
78. Oldenbourg R: *A new view on polarization microscopy*. Nature. 1996; 381: 811-812.
79. Pasquali R, Casimirri F, Vicennati V: *Weight control and its beneficial effect on fertility in women with obesity and polycystic ovary syndrome*. Hum. Reprod. 12 Suppl 1997; 1: 82-87.
80. Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. et al: *Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography*. Hum. Reprod. 1997; 12: 532-541.
81. Pelletier C, Keefe DL, Trimarchi JR: *Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos*. Fertil. Steril. 81 Suppl 2004; 1: 850-856.
82. Phipps WR, Cramer DW, Schiff I, Belisle S, Stillman R : *The association between smoking and female infertility as influenced by cause of infertility*. Sterility and Fertility 1987; 48: 377-382,
83. Pickering SJ and Johnson MH: *The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte*. Hum. Reprod. 1987; 2: 207-216.

84. Pickering SJ, Johnson MH, Braude PR, Houlston E: *Cytoskeletal organization in fresh, aged and spontaneously activated human oocytes*. Hum. Reprod. 1988; 3: 978-989.
85. Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J: *Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte*. Fertil. Steril. 1990; 54: 102-108.
86. Plachot M: *Aneuploidy rates in blastomeres*. Fertility and reproductive medicine 1998; 711-720.
87. Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z, Giudice LC: *The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease*. Endocr. Rev. 1999; 20: 535-582.
88. Rama Raju GA, Prakash GJ, Krishna KM, Madan K: *Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using PolScope imaging*. Reprod. Biomed. Online 2007; 14: 166-174.
89. Rienzi L, Martinez F, Ubaldi F, Minasi MG, Iacobelli M, Tesarik J, Greco E: *PolScope analysis of meiotic spindle changes in living metaphase II oocytes during the freezing and thawing procedures*. Hum. Reprod. 2004; 19: 655-659.
90. Rosen MP, Zamah AM, Shen S, Dobson AT, McCulloch CE, Rinaudo PF, Lamb JD, Cedars MI: *The effect of follicular fluid hormones on oocyte recovery after ovarian stimulation: FSH level predicts oocyte recovery*. Reprod. Biol. Endocrinol. 2009; 7: 35.
91. Salumets A, Hyden-Granskog C, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T: *The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality*. Hum. Reprod. 2001; 16: 2177-2181.
92. Saraiya M, Berg CJ, Kendrick JS, Strauss LT, Atrash HK, Ahn YW: *Cigarette smoking as a risk factor for ectopic pregnancy*. Am. J. Obstet. Gynecol. 1998; 178: 493-498.
93. Sato H, Ellis GW, Inoué S: *Microtubular origin of mitotic spindle form birefringence. Demonstration of the applicability of Wiener's equation*. J. Cell. Biol. 1975; 67: 501-517.
94. Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B: *The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation*. Hum. Reprod. 15, 2394-2403, 2000.
95. Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM: *Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection*. Hum. Reprod. 1997; 12: 1267-1270.
96. Shapiro BS, Harris DC, Richter KS: *Predictive value of 72-hour blastomere cell number on blastocyst development and success of subsequent transfer based on the degree of blastocyst development*. Fertil. Steril. 2000; 73: 582-586.
97. Shen S, Wong H, Ho K, Telles T, Fujimoto V, Cedars M: *The morphology of 2 pronuclear (2PN) embryos is related to the quality of day 3 embryos*. Fertility and Sterility. 2002; 78: 52-53.
98. Shen Y, Stalf T, Mehnert C, Eichenlaub-Ritter U, Tinneberg HR: *High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycle*. Hum. Reprod. 2005; 20: 1596-1606.
99. Shiverick KT, Salafia C: *Cigarette smoking and pregnancy I: ovarian, uterine and placental effects*. Placenta 1999; 20: 265-272.
100. Silva CP, Kommineni K, Keefe D: *Effect of in vitro culture of mammalian embryos on the architecture of the zona pellucida*. Biol. Bull. 1997; 193: 235-236.

101. Steer CV, Mills CL, Tan SL, Campbell S, Edwards RG: *The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme*. Hum. Reprod. 1992; 7: 117-119.
102. Stillman RJ, Rosenberg MJ, Sachs BP : *Smoking and Reproduction*. Fertil and Sterility 1986; 46: 545-566.
103. Terriou P, Sapin C, Giorgetti C, Hans E, Spach JL, Roulier R: *Embryo score is a better predictor of pregnancy than the number of transferred embryos or female age*. Fertil. Steril. 2001; 75: 525-31.
104. Trimarchi JR, Karin RA, Keefe D: *Average spindle retardance observed using the polscope predicts cell number in day 3 embryos*. Fertil. Steril. 2004; 82: S268.
105. Van Blerkom J, Henry G: *Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation*. Hum. Reprod. 1992; 7: 379-390.
106. Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, Eestermans W, Gerris J: *Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer*. Hum. Reprod. 1999; 14: 2345-2349.
107. Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Laureys I, Ryckaert G, Gerris J: *Calculating the implantation potential of day 3 embryos in women younger than 38 years of age: a new model*. Hum. Reprod. 2001; 16: 326-332.
108. Vanroose G, Nauwynck H, Soom AV, Ysebaert MT, Charlier G, Oostveldt PV, de Kruif A: *Structural aspects of the zona pellucida of in vitro-produced bovine embryos: a scanning electron and confocal laser scanning microscopic study*. Biol. Reprod. 2000; 62: 463-469.
109. Visser DS and Fourie FR: *The applicability of the cumulative embryo score system for embryo selection and quality control in an in-vitro fertilization/embryo transfer programme*. Hum. Reprod. 1993; 8: 1719-1722.
110. Wald NJ and Hackshaw AK: *Cigarette smoking: an epidemiological overview*. Br. Med. Bull. 1996; 52: 3-11.
111. Wang JX, Davies M, Norman RJ: *Body mass and probability of pregnancy during assisted reproduction treatment: retrospective study*. Bmj. 2000; 321: 1320-1321.
112. Wang WH , Meng L, Hackett RJ, Odenbourg R, Keefe DL: *Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling-rewarming observed using polarized light microscopy*. Hum. Reprod. 2001; 16: 2374-2378.
113. Wang WH, Meng L, Rickard JH , Oldenbourg R, Keefe D: *Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling-rewarming observed using polarized light microscopy*. Hum. Reprod. 2001; 16: 2374-2378.
114. Wassarman PM: *The zona pellucida: a coat of many colors*. Bioessays. 1987; 6: 161-166.
115. Wassarman PM, Mortillo S: *Structure of the mouse egg extracellular coat, the zona pellucida*. Int. Rev. Cytol. 1991; 130: 85-110.
116. Westhoff C, Murphy P, Heller D: *Predictors of ovarian follicle number*. Fertil. Steril. 2000; 74: 624-628.
117. Xia P: *Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality*. Hum. Reprod. 1997; 12: 1750-1755.

118. Zamboni L: *Fine morphology of mammalian fertilization*. Harper & Row 1971.
119. Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN: *Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization*. Hum. Reprod. 1997;12: 1545-1549.
120. Zollner U, Zollner KP, Hartl G, Dietl J, Steck T: *The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience*. Hum. Reprod. 2002; 17: 1327-1333.

*Tesi di Laurea vincitrice del
PREMIO FONDAZIONE FERRERO ONLUS
in memoria del Prof. Giampiero GAIDANO
Anno Accademico 2009/2010*

Candidato: Marco FANGAZIO

Relatore: Prof. Gianluca GAIDANO

Titolo: **Il ruolo del profilo genetico dell'ospite nel rischio di trasformazione da leucemia linfatica cronica a sindrome di Richter**

Tesi di Laurea vincitrici del
PREMIO IN MEMORIA DEL DOTT. ITALO ARNEODO
Anno Accademico 2009/2010

Candidato: Davide BALMATIVOLA

Relatore: Prof.ssa Anna SAPINO

Titolo: **Morfologia micropapillare nel carcinoma della mammella: studio sperimentale e clinico**

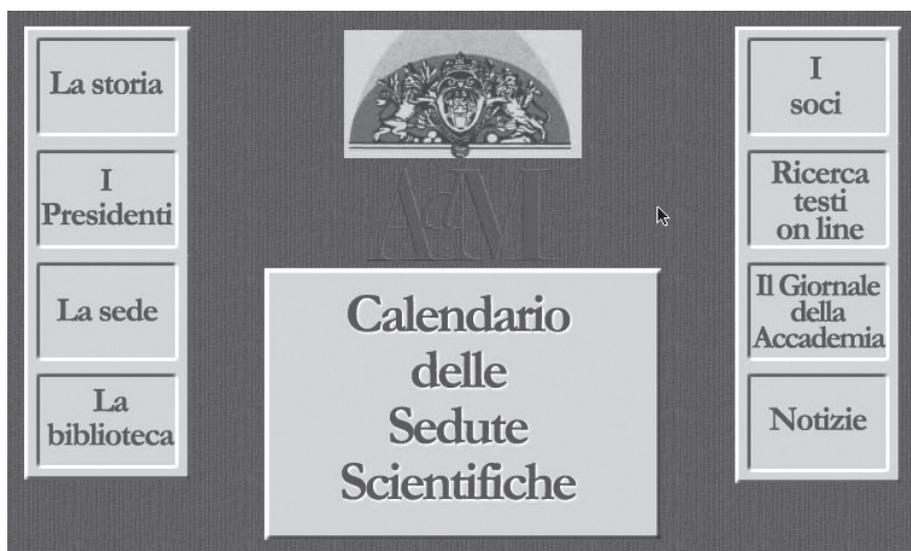
Candidato: Alessandro FALCONE

Relatore: Prof. Mario NANO

Titolo: **Alterazione dei segnali cellulari mediati da TG β 1 nella cancerogenesi del colon-retto: ruolo promovente dei prodotti di ossidazione lipidica di origine animale**

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

Alberto Angeli	33	Marilena Garrubba	102
Sergio Bernasconi	102	Giovanni Carlo Isaia	50
Maria Grazia Bernengo	254	Paolo Limone	235
Mario Bo	90	Giuseppe Macripò	254
Cecilia Bracco	265	Gabriella Magliona	235
Stefania Bruno	76	Elsa Margaria	55
Alessio Bruscazzin	216	Filippo Molinari	235
Celeste Cagnazzo	283	Guido Monga	59
Giovanni Camussi	76	Sara Monti	216
Cristhian Carlino	138	Alberto Mormile	235
Rossana Cavallo	63	Isabella Morra	138
Roberto Civitelli	207	Anna Mussano	138
Edmondo Comino	192	Laura Pasqualucci	216
Luca Cordero di Montezemolo	138	Oriana Pecchio	169
Andrea Corrias	138	Federico Ragazzoni	235
Stefania Cresta	216	Maria Josefina Ramunni	235
Riccardo Dalla-Favera	216	Andrea Ranghino	76
Clara Deambrogi	216	Silvia Rasi	216
Maurilio Deandrea	235	Simone Ribero	254
Lorenzo De Paoli	216	Davide Rossi	216
Maria Chiara Deregibus	76	Ferdinando Rossi	126
Francesco Di Carlo	41	Anna Sapino	254
Enrico Donegani	181	Chiara Sartori	102
Marco Fangazio	216	Valeria Spina	216
Gianluca Gaidano	216	Benedetto Terracini	115
Roberto Garberoglio	235	Riccardo Torta	154
Francesca Garino	235	Konstantinos Ziambaras	207

Questo volume è stato realizzato
grazie al contributo della
Fondazione Cassa di Risparmio di Torino

Il Direttore Responsabile del Giornale
dell'Accademia di Medicina di Torino
ringrazia vivamente i giovani Colleghi
che hanno contribuito alla revisione degli elaborati:

Elena Bonardo

Luisa Balcet

Francesca Greppi

Laura Leto

Simonetta Piano

Irene Sciarrillo

Autorizzazione del Tribunale di Torino n. 477
Finito di stampare nel mese di novembre 2011

Stampato da: Tipografia Bodrato s.n.c.
Via Vanchiglia 31 - 10124 Torino - Tel. 011.817.71.44