

FONDAZIONE  CRT



Anno CLXXIV

2011

GIORNALE  
DELLA  
ACCADEMIA DI MEDICINA  
DI TORINO

*Comitato di Redazione*

<b>Giorgio Agati</b>	<b>Mario Umberto Dianzani</b>
<b>Alberto Angeli</b>	<b>Guido Filogamo</b>
<b>Paolo Arese</b>	<b>Gian Franco Pagano</b>
<b>Alessandro Bargoni</b>	<b>Alessandro Pileri</b>
<b>Teresa Cammarota</b>	<b>Giuseppe Poli</b>
<b>Renato Cirillo</b>	<b>Nicola Riccardino</b>
<b>Alessandro Comandone</b>	<b>Gian Luca Sannazzari</b>
<b>Edmondo Comino</b>	<b>Francesco Scaroina</b>

*Direttore Responsabile*

**Giovanni Carlo Isaia**

# ACCADEMIA DI MEDICINA DI TORINO

## Ufficio di Presidenza

---

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

# *SOMMARIO*

## **PARTE I**

**Elenco dei Presidenti della Società Medico-Chirurgica  
e dell'Accademia di Medicina di Torino ..... 11**

**Elenco dei Soci ..... 13**

## **PARTE II**

**Sedute dell'Accademia di Medicina, anno 2011 ..... 29**

## **PARTE III**

### **Contributi**

*Alberto Angeli*

**Relazione del Presidente alla seduta inaugurale  
dell'Accademia Anno 2011/2012 ..... 35**

<i>Franco Veglio, Michele Covella, Elena Berra, Chiara Fulcheri, Silvia Totaro, Franco Rabbia</i>	
<b>Ipertensione arteriosa resistente</b> .....	45
<i>Roberta Pacifici, Alessandra Di Pucchio</i>	
<b>Gli stili di vita e la tutela della salute</b> .....	62
<i>Annalisa Chiappella, Chiara Ciochetto, Umberto Vitolo</i>	
<b>I linfomi aggressivi a cellule B: progressi terapeutici dalla chemioterapia alla “target therapy”</b> .....	76
<i>Ines Destefano, Rossella Morra, Cinzia Rastello, Mario Nano</i>	
<b>Approccio olistico al perineo</b> .....	94
<i>Paolo Rossi, Antonio Marmotti, Filippo Castoldi, Roberto Rossi, Davide Edoardo Bonasia, Matteo Bruzzone, Federico Dettoni, Davide Blonna, Lorenzo Silengo, Corrado Tarella</i>	
<b>Cellule staminali in ortopedia: realtà, mito o opportunità?</b> .....	107
<i>Lorenzo Capussotti, Fabio Forchino, Dario Ribero</i>	
<b>Strategie terapeutiche per l’epatocarcinoma: la chirurgia resettiva</b> .....	121
<i>Mauro Salizzoni, Gianluca Paraluppi, Paolo Strignano</i>	
<b>Epatocarcinoma: strategie terapeutiche</b> .....	134

*Mario Morino, Marco Ettore Allaix,  
Federico Famiglietti, Simone Arolfo*

**Fattori di rischio per la recidiva locale dopo  
transanal endoscopic microsurgery per neoplasie del retto  
extraperitoneale** ..... 137

*Cristiana Barbera, Monica Surace, Laura Garassino, Maria Kuvidi*

**La celiachia oggi: patogenesi e sintomi in età pediatrica** ..... 154

*Mauro Bruno, Alida Andrealli*

**La malattia celiaca oggi: quadro clinico nell'adulto, diagnosi,  
trattamento e nuove prospettive** ..... 165

*Luigi Dogliotti, Anna Ferrero, Alfredo Berruti*

**I tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici** ..... 176

*Vittorio Modena*

**Le spondiloartriti: recenti acquisizioni** ..... 186

*Raffaele Pellerito*

**L'arterite gigantocellulare di Horton** ..... 197

*Chiara Benedetto, Roberta De Fazio, Gabriele Lanzo*

**La salute della donna nell'era della globalizzazione** ..... 204

<i>Lorenzo Moretta, Franco Locatelli, Alessandro Moretta</i>	
<b>Le cellule Natural Killer dal laboratorio alla cura di leucemie ad alto rischio</b> .....	217
 <i>Alessandro Bargoni</i>	
<b>Progresso scientifico e coscienza nazionale: le riunioni degli scienziati italiani in età risorgimentale. La lunga attesa della medicina</b> .....	228
 <i>Sandro Potecchi</i>	
<b>Gli scienziati italiani a Congresso prima dell'Unità</b> .....	240
 <i>Davide Schiffer, Marta Mellai, Valentina Caldera, Laura Annovazzi</i>	
<b>Cellule staminali tumorali fenotipo nei gliomi maligni</b> .....	264
 <i>Roberto Mutani, Riccardo Torta, Marco Mula</i>	
<b>Ricordo del Prof. Francesco Monaco (1946 - 2011)</b> .....	277
 <i>Franco Brunello, Patrizia Carucci, Silvia Gaia, Alessandro Cantamessa, Mario Rizzetto</i>	
<b>Epatocarcinoma: strategie terapeutiche</b> .....	284
 <i>Gilberto Calzolari, Valeria Data, Renato Carignola, Laura Saba, Alberto Angeli</i>	
Premio "Gianpiero Gaidano" 2007/2008 Tesi di Laurea premiata dalla Fondazione Piera, Pietro e Giovanni Ferrero in collaborazione con l'Accademia di Medicina di Torino	
<b>Danno macrovascolare ed osseo nella sclerosi sistemica progressiva</b> .....	300

*Antonia Rotolo, Daniela Cilloni, Giuseppe Saggio*  
Premio “Italo Arneodo” 2007/2008  
Tesi di Laurea premiata in collaborazione con l’Accademia  
di Medicina di Torino  
**Nuove opzioni terapeutiche nelle leucemie acute mieloidi** ..... 318

*Marco Fangazio, Silvia Rasi, Valeria Spina, Alessio Bruscatin,  
Lorenzo De Paoli, Sara Monti, Carmela Ciardullo, Rosella Famà,  
Stefania Cresta, Davide Rossi, Gianluca Gaidano*  
Premio “Gianpiero Gaidano” 2009/2010  
Tesi di Laurea premiata dalla Fondazione Piera, Pietro e Giovanni Ferrero  
in collaborazione con l’Accademia di Medicina di Torino  
**Il ruolo del profilo genetico dell’ospite nel rischio  
di trasformazione da leucemia linfatica cronica  
a sindrome di Richter** ..... 335

*Davide Balmativola*  
Premio “Italo Arneodo” 2009/2010  
Tesi di Laurea premiata in collaborazione con l’Accademia  
di Medicina di Torino  
**Morfologia micropapillare nel carcinoma della mammella:  
studio sperimentale e clinico** ..... 355

*Alessandro Falcone, Fiorella Biasi, Mario Nano, Tina Guina,  
Marco Maina, Giorgio Maria Saracco, Mauro Papotti, Giuseppe Poli*  
Premio “Italo Arneodo” 2009/2010  
Tesi di Laurea premiata in collaborazione con l’Accademia  
di Medicina di Torino  
**Alterazione dei segnali cellulari mediata TGFβ1  
nella cancerogenesi del colon-retto: ruolo promovente  
dei prodotti di ossidazione lipidica di origine animale** ..... 372

## **PARTE IV**

Tesi di Laurea vincitrice del Premio Fondazione Ferrero Onlus in memoria del Prof. Gianpiero Gaidano Anno Accademico 2010/2011 .....	393
Tesi di Laurea vincitrici del Premio in Memoria del Dott. Italo Arneodo Anno Accademico 2010/2011 .....	394
Tesi di Laurea vincitrici della Menzione d’Onore del Consiglio di Presidenza dell’Accademia di Medicina Anno Accademico 2010/2011 .....	395
Sito web dell’Accademia di Medicina di Torino .....	397
Norme redazionali per la pubblicazione sul “Giornale dell’Accademia di Medicina di Torino” .....	399
Indice degli Autori .....	401

*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	2010-2012	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 2012)****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)*

**Antonio Bertolotto**

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

**Irma Dianzani**

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

**Giovanni Camussi**

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

**Alessandro Maria Gaetini**

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

**Stefano Carossa**

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

**Guido Monga**

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

**Claudio Fabris**

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

**Umberto Ricardi**

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

**Giovanni Succo**

*Professore di Clinica  
Otorinolaringoiatrica  
Università di Torino  
(12 Dicembre 2008)*

**Dario Roccatello**

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

**Alessandro Bargoni**

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

**Mariella Trovati**

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

**Giuseppe Boccuzzi**

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

**Maria Consuelo Valentini**

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

**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)*

**Fiorella Altruda**

*Professore di Genetica Molecolare  
Università di Torino  
(16 Dicembre 2011)*

**Gianni Bona**

*Professore di Pediatria  
Università del Piemonte Orientale - Novara  
(16 Dicembre 2011)*

**Guido Bongioannini**

*Primario di Otorinolaringoiatria  
A.O. Ordine Mauriziano di Torino  
(16 Dicembre 2011)*

**Giovanni Di Perri**

*Professore di Malattie Infettive  
Ospedale Amedeo di Savoia - Torino  
(16 Dicembre 2011)*

**Pier Paolo Donadio**

*Primario di Anestesia e Rianimazione  
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino  
(16 Dicembre 2011)*

**Carlo Faletti**

*Primario di Radiologia  
A.O.U. CTO - CRF - Maria Adelaide di Torino  
(16 Dicembre 2011)*

**Guido Gasparri**

*Professore di Chirurgia Generale ed Esofagea  
Università di Torino  
(16 Dicembre 2011)*

**Fiorenzo Gaita**  
*Professore di Cardiologia*  
*Università di Torino*  
 (16 Dicembre 2011)

**Maria Giuseppina Robecchi**  
*Professore di Anatomia Umana Normale*  
*Università di Torino*  
 (16 Dicembre 2011)

**Franco Nessi**  
*Primario di Chirurgia Vascolare*  
*AO Ordine Mauriziano di Torino*  
 (16 Dicembre 2011)

### **Soci Onorari Nazionali**

**Bruno Zanobio**  
*Professore di Storia della Medicina*  
*Università di Pavia*  
 (13 Febbraio 1981)

**Lucio Di Guglielmo**  
*Professore di Radiologia*  
*Università di Pavia*  
 (16 Dicembre 1994)

**Rita Levi Montalcini**  
*CNR, Roma*  
 (11 Dicembre 1981)

**Ludovico Dalla Palma**  
*Professore di Radiologia*  
*Università di Trieste*  
 (12 Dicembre 1997)

**Ludovico Giulio**  
*Professore di Fisiologia*  
*Università di Torino*  
 (9 Dicembre 1988)

**Gian Gastone Neri Serneri**  
*Professore di Clinica Medica*  
*Università di Firenze*  
 (11 Dicembre 1998)

**Ernesto Quagliariello**  
*Professore di Biochimica e Biologia Molecolare*  
*Università di Bari*  
 (20 Dicembre 1991)

**Umberto Marinari**  
*Professore di Patologia Generale*  
*Università di Genova*  
 (15 Dicembre 2000)

**Elio Guido Rondanelli**  
*Professore di Clinica delle Malattie Infettive*  
*Università di Pavia*  
 (18 Dicembre 1992)

**Beniamino Tesaro**  
*Professore di Chirurgia Generale*  
*Università di Napoli Federico II*  
 (15 Dicembre 2000)

**Francesco De Matteis**  
*Professore di Tossicologia*  
*Università di Torino*  
 (17 Dicembre 1993)

**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****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)

**Ronald J. Linden**

*Londra*  
 (20 Dicembre 1991)

## 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)*

**Ottavio Davini**

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

**Giovanni Ceriotti**

*Professore di Chimica Clinica  
Università di Padova  
(16 Dicembre 1994)*

**Oscar Bertetto**

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

**Roberto Frairia**

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

**Alberto Biglino**

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

**Donatella Gattullo**

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

**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)*

**Giuseppe Ottavio Armocida**

*Professore di Storia della Medicina  
Università degli Studi dell'Insubria  
(16 Dicembre 2011)*

**Soci Corrispondenti Esteri****Jean Pierre Changeux**

*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)*

**Neville A. Marsh**

*Londra  
(30 Novembre 1990)*

**Nicolas Westerhof**

*Amsterdam  
(18 Dicembre 1992)*

## Soci Emeriti

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

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

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

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

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

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

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

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

**Angelo Emilio Paletto**  
*Professore di Chirurgia Generale*  
*Università 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)

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

**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)

**Ing. Walter Ceresa**  
 (16 Dicembre 2005)

**Dott. Piero Sola**  
 (16 Dicembre 2005)

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

**Notaio Alberto Morano**  
 (22 Febbraio 2010)

**Sig. Alessio Giuseppe Lucca**  
 (4 Ottobre 2010)

**Dott. Ugo Riba**  
 (11 Febbraio 2011)

**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*

**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 Otorinolaringoiatria  
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 Palmò**

*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 2011*

*14 Gennaio*     **Ipertensione arteriosa resistente**  
*Relatore: Franco Veglio*  
*Presentato dal Socio: Alberto Angeli*

*PREMIO ARNEODO 2010*  
**Inibizione della tirosina-cinasi Src nella tumorigenesi  
sostenuta dall'oncogene MET**  
*Relatore: Cecilia Bracco*

*28 Gennaio*     **Gli stili di vita e la tutela della salute**  
*Relatore: Roberta Pacifici*  
Istituto Superiore di Sanità (Roma)  
*Presentata dal Socio: Nicola Riccardino*

*11 Febbraio*     **I linfomi aggressivi a cellule B: progressi terapeutici  
dalla chemioterapia alla “Target Therapy”**  
*Relatore: Umberto Vitolo*

*PREMIO ARNEODO 2009*  
**Nuove opzioni terapeutiche nelle leucemie acute mieloidi**  
*Relatore: Antonia Rotolo*

*25 Febbraio*    **L'approccio olistico al perineo**  
*Relatori: Ines Destefano, Rossella Morra*  
*Presentate dal Socio: Mario Nano*

*PREMIO FERRERO 2010*  
**Parametri clinico-patologici del linfonodo sentinella  
nel melanoma cutaneo**  
*Relatore: Simone Ribero*

*11 Marzo*    **Cellule staminali in Ortopedia:  
realità, mito o opportunità?**  
*Relatore: Paolo Rossi*

*PREMIO FERRERO 2009*  
**Danno macrovascolare ed osseo nella sclerosi  
sistemica progressiva**  
*Relatore: Gilberto Calzolari*

*25 Marzo*    **La Medicina Legale dei nostri giorni  
e la morte di Napoleone Bonaparte**  
*Relatore: Pier Luigi Baima Bollone*

*PREMIO ARNEODO 2010*  
**Valutazione della qualità degli ovociti umani  
nelle strategie di fecondazione assistita**  
*Relatore: Celeste Cagnazzo*

*8 Aprile*    **Epatiti virali: dall'antigene Australia  
ai successi di oggi**  
*Relatore: Mario Rizzetto*

- 19 Aprile*      **Epatocarcinoma: strategie terapeutiche**  
*Relatori: Franco Brunello, Lorenzo Capussotti,  
Mario Salizzoni*
- 6 Maggio*      **Carcinoma del retto: strategie terapeutiche**  
*Relatori: Mario Morino, Umberto Ricardi*
- 20 Maggio*      **La malattia celiaca oggi**  
*Relatori: Cristiana Barbera, Mauro Bruno*
- 10 Giugno*      **Progressi nella terapia delle malattie infiammatorie  
intestinali (IBD)**  
*Relatore: Angelo Pera*
- 21 Giugno*      **Tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici**  
*Relatori: Alfredo Berruti, Claudio De Angelis  
Luigi Dogliotti*
- 14 Ottobre*      **Progressi in Reumatologia: spondiloartriti,  
arterite di Horton e polimialgia reumatica**  
*Relatori: Vittorio Modena, Raffaele Pellerito*
- 28 Ottobre*      **La salute della donna nell'era della globalizzazione**  
*Relatore: Chiara Benedetto*

*11 Novembre* **Mente, coscienza e anima:  
lezioni dalle malattie neurologiche**

*Relatore: Francesco Monaco*  
(Novara)

*Presentato dal Socio: Roberto Mutani*

*25 Novembre* **Seduta inaugurale Anno Accademico 2011-2012**

*Relazione del Presidente: Alberto ANGELI*

**Le cellule Natural Killer:  
dal laboratorio alla cura di leucemie ad alto rischio**

*Relatore: Lorenzo Moretta*  
(Genova)

*Presentato dal Socio: Giuseppe Poli*

*2 Dicembre* *presso l'Accademia delle Scienze di Torino*

SEDUTA CONGIUNTA CON  
L'ACCADEMIA DELLE SCIENZE  
E L'ACCADEMIA DI AGRICOLTURA DI TORINO

**Progresso scientifico e coscienza nazionale:  
le riunioni degli scienziati italiani in età risorgimentale**

*Relatori: Alessandro Bargoni, Luigi Cerruti,  
Alberto Conte, Giacomo Giacobini,  
Sandro Potecchi*

*Sedute Private*

*11 Febbraio*    **Approvazione rendiconto consuntivo 2010  
e bilancio di previsione 2011**

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

## *Sedute Straordinarie*

23 Maggio *Presentazione del libro*  
**“Patologie Ambientali e Lavorative.  
MCS – Amianto e Giustizia”**  
*di Ezio Bonanni e Giancarlo Ugazio*

16 Dicembre *Presentazione del libro*  
**“Attraverso il microscopio”**  
*di Davide Schiffer*

**RELAZIONE DEL PRESIDENTE  
ALLA SEDUTA INAUGURALE DELL'ACCADEMIA  
ANNO 2011-2012**

*A*utorità, cari Soci, cari colleghi, signore e signori, innanzitutto, un cordialissimo benvenuto nella storica aula della nostra Accademia. Con il Presidente Vicario e il Segretario Generale, qui al tavolo accanto a me, a nome dell'intero Consiglio di Presidenza, desidero esprimere a tutti Voi il più vivo ringraziamento per la partecipazione alla cerimonia di apertura del nuovo Anno Accademico della nostra istituzione. Ringrazio anche coloro, Soci e Autorità, che impossibilitati a partecipare, hanno espresso in lettere ed e-mail il loro rammarico di non poter intervenire. Ringrazio infine, a nome dell'intera comunità accademica, il prof. Lorenzo Moretta, per aver accettato l'invito a inaugurare l'attività del nuovo Anno Accademico con una lettura magistrale dal titolo "Le cellule Natural Killer: dal laboratorio alla cura di leucemie ad alto rischio". La personalità del prof. Moretta, immunologo di altissimo prestigio internazionale, verrà presentata dal prof. Giuseppe Poli, già Presidente della nostra Accademia nel quadriennio 2004-2008.

Com'è noto, l'Accademia di Medicina, con i suoi 165 anni d'età, 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. Al prof. Pietro Rossi, Presidente dell'Accademia delle Scienze, e al prof. Pietro Piccarolo, Presidente dell'Accademia di Agricoltura, un particolare amichevole saluto. Siamo molto onorati, come Accademia di Medicina, della attenzione e della continua, preziosa e stimolante collaborazione che le due Accademie "sorelle", così ricche di storia e cultura, hanno voluto testimoniarcì. Collaborazione che si sostanzia, ormai da non pochi anni, in una annuale seduta scientifica congiunta, con relatori provenienti dalle tre istituzioni. In quest'anno celebrativo dei 150 anni dell'Unità Nazionale, la seduta congiunta delle tre Accademie Sabaude, verrà ad assumere un particolare valore aggiunto, almeno per quanti, come noi

*tutti, sono convinti che l'attenzione appassionata alle conoscenze scientifiche e l'impegno a dare concretezza a quest'attenzione nella vita personale siano elementi nobili dell'esperienza umana, da valorizzare e non da oscurare. Anche per i messaggi, non pedanti né retorici, che dobbiamo trasmettere alle più giovani generazioni. E in quest'ottica sono molto lieto di invitarvi al primo evento ufficiale dell'Anno Accademico che sta per iniziare: proprio la seduta congiunta delle tre Accademie, programmata per Venerdì prossimo 2 Dicembre. Ci ritroveremo alle 16 nella prestigiosa, recentemente restaurata Sala dei Mappamondi dell'Accademia delle Scienze. Un grazie particolare al prof. Rossi e a tutto lo staff direzionale di quell'Accademia per l'ospitalità che ci ha concesso. Sarà l'occasione per rivisitare le " Riunioni degli scienziati italiani ", organizzate a partire dal 1839 e negli anni successivi itineranti in diverse città italiane, allora ovviamente poste in diversi Stati. La seconda di queste riunioni si tenne a Torino nel 1840, sotto gli auspici del re Carlo Alberto di Savoia e la presidenza dell'allora Presidente della Reale Accademia delle Scienze, il conte Alessandro di Saluzzo. Sentiremo come queste riunioni siano state un variegato intreccio di luci e ombre, di emergente coscienza nazionale e di ricercato, talora soffocato, dialogo con l'Europa scientifica, di vibranti passioni civili e anche di ottuse meschinità intellettuali. Fra i congressisti vi furono non pochi eroi delle guerre risorgimentali e non pochi artefici dello Stato unitario post-risorgimentale.*

*Ritorniamo ora alla seduta odierna di inaugurazione del nuovo Anno Accademico, occasione tradizionale e attesa dai soci per ripercorrere l'attività dell'anno trascorso e apprendere le linee programmatiche per il prossimo futuro. È giunto a conclusione il biennio del mio mandato presidenziale. Il tempo è volato, come suol dirsi. Dopo tanti anni di intenso, onesto impegno come studioso nella comunità scientifica, e come clinico nella medicina interna nazionale, ho vissuto una nuova esperienza, stimolante e gratificante. I sentimenti di chi vi parla oggi sono molteplici: commozione, innanzitutto, e poi riconoscenza, e consapevolezza che si sarebbe potuto e dovuto fare di più ma che il compito era ed è tutt'altro che facile, e che comunque – per usare un'altra frase abusata – ci si è difesi bene. Se nel corso dell'Anno Accademico testé concluso, l'Accademia è riuscita a mantenere appieno la sua missione di alta divulgazione scientifica e di stimolo culturale, ciò è dovuto a un efficace gioco di squadra, che ha visto in campo tutti i componenti del Consiglio di Presidenza. Non posso quindi che rinnovare a questi cari amici, Paolo Arese, Alessandro Bargoni, Teresa Cammarota, Alessandro Comandone, Carlo De Sanctis, Giancarlo Isaia, insieme ai due Past-President Giuseppe Poli e*

*Nicola Riccardino il mio ringraziamento per il loro supporto. Vorrei ripetere le parole dello scorso anno, perché non è cambiata l'atmosfera di amicizia e di partecipazione emotiva alle sorti dell'istituzione: collaborazione costruttiva, critica, stimolante, insomma superlativa. Preziosissimo è stato l'apporto della nostra Segretaria, sig.ra Lidia Morea, sempre disponibile, positiva, anche in circostanze impreviste, con problemi non sempre facili da gestire. E puntuali, utilissimi sono anche giunti i consigli e i suggerimenti di Alda Riva, che dopo tanti anni e tanto impegno ha da qualche mese lasciato la Segreteria, ma è sempre nel nostro cuore. E ancora Gino Zanchi, mitico custode e prezioso testimone della migliore tradizione dell'Accademia, e il giovane Domenico Spano, bibliotecario attivo e partecipe dell'evoluzione informatica della nostra biblioteca.*

*E veniamo all'attività svolta. Le sedute scientifiche istituzionali si sono svolte in un arco temporale segnato, all'inizio e alla fine, dalla presentazione in quest'aula di due libri e dalla partecipazione organizzativa a due convegni commemorativi di illustri accademici. Nel Novembre 2010: presentazione della ristampa anastatica del volume "La Paura" di Angelo Mosso con una bellissima prefazione, direi interpretazione, del socio Filippo Bogetto, e Convegno Celebrativo del Centenario della morte dello stesso Angelo Mosso, personalità poliedrica di fisiologo, archeologo, antropologo, che fu Presidente della nostra Accademia fra il 1893 e il 1895. Presidenza che si inserì fra quella precedente di Giulio Bizzozzero e quella successiva di Cesare Lombroso e che abbiamo voluto ricordare, collaborando con l'Accademia delle Scienze, promotrice appunto di un Convegno dedicato alle Sue grandi intuizioni e realizzazioni di fisiologo muscolare, e di studioso della biologia adattativa in montagna. Nel Novembre 2011: presentazione del nuovo libro del Socio Emerito Davide Schiffer: "Attraverso il microscopio. Neuroscienze e basi del ragionamento clinico". Riprendendo dalla bella recensione di Nicola Ferraro su Torino Medica, un'esperienza di osservazione diagnostica e di ricerca clinica al tempo stesso scientifica ed etica, una riflessione sul valore aggiunto che la cultura umanistica porta al rigore metodologico e all'oggettività della scienza. L'evento commemorativo è stato quello in onore di Aurelio Costa, illustre primario medico dell'Ospedale Mauriziano, Socio Emerito della nostra Accademia, prestigioso studioso della tiroide, ricordato dalla Fondazione Scientifica Mauriziana e dall'Azienda Ospedaliera che ha intitolato al nome di Aurelio Costa il Centro per le Malattie della Tiroide. Un vivo ringraziamento al Socio corrispondente Paolo Limone per il coinvolgimento dell'Accademia in questa iniziativa. A metà dell'arco temporale dell'Anno Accademico,*

nel Maggio scorso, un terzo libro, di un nostro Socio, è stato ufficialmente presentato in quest'aula. Si tratta del volume "Patologia ambientale, MCS. Multiple Chemical Sensitivity", del Socio Giancarlo Ugazio. È intervenuto alla presentazione anche il co-autore, l'avvocato Ezio Bonanni di Latina, che ha illustrato la normativa e i contenziosi giuridico-amministrativi relativi all'inquinamento ambientale da sostanze chimiche. Sempre in tema editoriale, è stato pubblicato dagli Editori Laterza il volume "Il Giacobino pentito. Carlo Botta da Napoleone a Washington" che raccoglie contributi dei relatori al Convegno su Carlo Botta, medico intellettuale canavesano che ebbe vita tumultuosa e molteplici interessi, e che Ugo Cardinale, linguista e preside del liceo classico "Carlo Botta" di Ivrea ha voluto valorizzare coinvolgendo in un importante iniziativa bipolare (Torino-Ivrea) la nostra Accademia. Com'è tradizione, è oggi in distribuzione, fresco di stampa, pubblicato grazie al contributo della Fondazione CRT di Torino, il Volume 173 del Giornale dell'Accademia che raccoglie i testi delle relazioni scientifiche e delle commemorazioni dei Soci scomparsi. È più corposo del precedente Volume 172<sup>esimo</sup>. Questi numeri – 172, 173 – evidenziano un lungo percorso di testimonianza culturale, un impegno che viene di lontano a coniugare, d'un lato, progresso scientifico e ricerca avanzata, con particolare attenzione ai contributi torinesi e piemontesi, e dall'altro lato, radici storiche e continuità dei valori fondanti e tuttoggi preziosi della comunità accademica. In questo senso, ritengo importante segnalare come il nuovo Volume contenga novità rispetto ai precedenti. E cioè: abbiamo richiesto, e ottenuto, contributi dei nuovi Soci corrispondenti e dei giovani ricercatori vincitori dei premi di laurea dell'Accademia, consegnati nella cerimonia inaugurale dello scorso anno. Ricerca up-to-date, firmata da giovani impegnati: anche questo è un segnale che l'Accademia è viva, e guarda avanti. Ma ho parlato anche dello sguardo indietro, delle radici storiche e, in particolare, della storia medica piemontese di cui siamo orgogliosi. A questo proposito, debbo dirvi che abbiamo già in tipografia la nuova monografia storica del nostro straordinario, infaticabile Socio Emerito Mario Umberto Dianzani, Rettore, Preside della Facoltà medica, Presidente della nostra Accademia e storico appassionato di quello che lui stesso definisce il mezzo secolo d'oro della Medicina e dell'Università torinesi, il secondo Ottocento, un arco di tempo nel quale la nostra città era punto di riferimento della scienza italiana. Dopo la monografia su Alessandro Riberi, ormai esaurita e continuamente richiesta (stiamo per farne una seconda edizione), ecco quella su Giacinto Pacchiotti, professore universitario e uomo politico. Utilizzeremo la stessa veste grafica dei precedenti volumi e, naturalmente, presenteremo il nuovo volume in

*Accademia. Al prof. Dianzani, a nome di tutti, un ringraziamento particolare, ammirato e affettuoso. Alla tipografia Bodrato, al sempre disponibile Andrea Bodrato, l'apprezzamento di noi tutti per una collaborazione di alto livello professionale, davvero preziosa.*

*Nel corso dell'Anno Accademico testé concluso, abbiamo svolto 17 sedute scientifiche pubbliche, oltre alle tradizionali due sedute private dei Soci Ordinari ed Emeriti dedicate, rispettivamente, all'elezione dei nuovi Soci e alla rendicontazione e approvazione dei bilanci annuali. Abbiamo iniziato nel Novembre-Dicembre 2010 con Psico-Oncologia e Medicina di Montagna, per proseguire nel corrente 2011 con gli argomenti riportati nei calendari riprodotti nelle tre schermate che si succedono alle mie spalle. Abbiamo sentito e apprezzato le presentazioni dei vincitori dei premi di laurea, inserite nelle sedute scientifiche ufficiali, istituzionali, e a questi giovani colleghi rinnovo il ringraziamento per il loro impegno. Due parole su una iniziativa che ha caratterizzato l'attività accademica nella scorsa primavera e che non ha dato i risultati attesi. Mi riferisco al Corso accreditato ECM, dedicato ai Progressi in Gastroenterologia, articolato su sei Conferenze e svolto in modo superlativo, per chiarezza espositiva, eleganza iconografica e impegno personale dei relatori, tutti prestigiosi esperti dei vari argomenti trattati. Desidero ringraziarli in modo particolare, con grande stima e amicizia, per la considerazione nei confronti dell'Accademia, che così bene hanno voluto testimoniare. Desidero anche ringraziare la Symposium, e gli amici Sandro Cuccu e Chiara Palieri, per l'attività di supporto organizzativo tutt'altro che facile, in mesi di ridefinizione legislativa dell'attività ECM e dell'acquisizione dei necessari crediti formativi. E allora? Semplicemente, è venuto meno il pubblico, l'audience, il target dei professionisti medici cui il corso era dedicato: forse la necessità di legge di essere sempre presenti – a tutti gli incontri programmati –, conditio sine qua non per acquisire i sei crediti concessi, ha scoraggiato i colleghi, ridotti a poco più che una pattuglia di attenti frequentatori. Forse le ore serali al venerdì; forse un insufficiente advertising mediatico; forse l'affollarsi di impegni in mesi sempre ricchi di eventi congressuali, e la conseguente overdose di offerta formativa. Al Consiglio di Presidenza la patogenesi di questo insuccesso di pubblico è parsa multifattoriale, com'è spesso con i nostri malati; nel prossimo Anno Accademico non ripeteremo un Corso ECM monotematico, ma attueremo altri tentativi di espansione, se così si può dire, della nostra offerta formativa, dentro e fuori di quest'aula. Offerta formativa significa comunicazione. Comunicazione a voi soci, ovviamente, ma anche a un pubblico più vasto*

*di persone interessate ai nostri temi, e pensiamo soprattutto a giovani interessati, non escludendo certo quanti sono direttamente desiderosi di salute e qualità di vita, nel loro ambiente di lavoro e di vita sociale. Ecco che con la collaborazione della Fondazione Piera, Pietro e Giovanni Ferrero di Alba (qui abbiamo il Segretario Generale prof. Mario Strola e il responsabile dei Servizi Medici dott. Ettore Bologna) e della Fondazione Adriano Olivetti di Ivrea (qui abbiamo il nostro nuovo Socio Benemerito dott. Tito Gavazzi, già convinto collaboratore e amico di Adriano Olivetti) daremo vita a iniziative che ci auguriamo di maggior successo rispetto al corso di cui abbiamo parlato, e che consentano presenza e visibilità della nostra Accademia e della sua missione di catalizzatore culturale. Staremo a vedere. E intanto abbiamo provveduto a implementare presenza e visibilità informatiche, in particolare per quanto attiene alla nostra Biblioteca e al suo prezioso patrimonio librario. È completamente aggiornato il sito web dell'Accademia ([www.accademiadimedicina.unito.it](http://www.accademiadimedicina.unito.it)), già da tempo strutturato e strumento irrinunciabile di informazione. Un grazie particolare ai nostri webmasters Paolo Arese e Alessandro Bargoni, cari amici del Consiglio di Presidenza. A loro va anche il gran merito di avere impostato, sviluppato e realizzato un importante progetto strategico per il nostro patrimonio librario, quello, cioè, della digitalizzazione e della immissione nella rete informatica dei testi antichi, in primo luogo di quelli di età pre-risorgimentale e risorgimentale. Questo progetto, co-finanziato dall'Assessorato alla Cultura della Regione Piemonte nell'ambito di una strategia di valorizzazione culturale dei 150 anni dell'Unità nazionale, e supportato da un contributo dedicato della Compagnia di San Paolo, ha consentito di acquisire una strumentazione (BookDrive della ditta ATIZ) che consente la riproduzione di tutti i formati librari possibili unitamente ad una elevatissima qualità fotografica. Il software in dotazione consente poi la riduzione delle immagini memorizzate e la loro composizione in file fruibili con processo automatizzato. Il progetto, che vorrei denominare Arese-Bargoni è ambizioso. Ci metterà alla pari di ben più grandi e importanti istituzioni culturali italiane che hanno da tempo intrapreso il programma di riproduzione digitale e archiviazione digitale di testi antichi e della loro pubblicazione sul web. Due delle tre fasi previste le possiamo già considerare concluse: digitalizzazione e archiviazione; immissione in rete sul sito dell'Accademia. Nel prossimo futuro completeremo il progetto con il rifacimento del sito web attualmente online, con posizionamento di supporti informatici dedicati, come contenuti e grafica, alla consultazione bibliografica tramite parole-chiave dei testi inseriti e non più solo alla loro visione. Naturalmente, questo apre la possibilità di offrire un servizio per*

*analoghe digitalizzazioni di testi presenti in altre biblioteche, ed è del tutto recente una convenzione in tal senso con il Dipartimento di Scienze Letterarie e Filologiche dell'Università di Torino, diretto dal Prof. Alessandro Vitale Brovarone.*

*Ecco un ulteriore tassello della collaborazione con l'Università, che ha utilizzato la nostra Aula nello scorso Anno Accademico per il Corso di Studi Superiori, e che si fa carico, totalmente o parzialmente, di non pochi problemi di manutenzione ordinaria e straordinaria dello storico palazzo che condividiamo con Dipartimenti e istituzioni universitarie. L'Università ci ha testimoniato in tante circostanze un'attenzione della quale siamo molto onorati. Grazie, non posso citare tutti i nomi, che sono tanti, a tutto lo staff direzionale e operativo che fa capo al Rettore prof. Ezio Pelizzetti e al Direttore Amministrativo dott.ssa Loredana Segreto.*

*Ed eccoci giunti alla consegna dei diplomi per i nuovi Soci Ordinari, Corrispondenti, Emeriti e Benemeriti dell'Accademia, e dei premi di laurea a tre giovani neo-dottori in Medicina e Chirurgia dell'Università di Torino e dell'Università del Piemonte Orientale. Questi premi testimoniano la generosità e la sensibilità nei confronti dell'Accademia della famiglia Arneodo e della Fondazione Piera, Pietro e Giovanni Ferrero di Alba. Sono presenti in sala, la dott.ssa Severina Arneodo e il prof. Mario Strola, già ricordato prima, Segretario Generale della Fondazione Ferrero. Le borse di studio sono intitolate alla memoria del dott. Italo Arneodo e del nostro indimenticabile socio prof. Gianpiero Gaidano. È anche presente in sala la sig.ra Elena Gaidano, che ogni anno vuole testimoniarci il suo apprezzamento per questa iniziativa. Pregherò, al momento della consegna dei premi, la dott.ssa Arneodo e il prof. Strola di salire qui accanto a me e di consegnare loro stessi i premi ai vincitori.*

*Ma prima di procedere alla chiamata dei nuovi Soci, è mio compito ricordare a tutti, con commozione intensa, i Soci che sono recentemente scomparsi. Nell'Anno Accademico che si è appena concluso, abbiamo avuto una singola perdita, quella di Enrico Madon, illustre studioso e clinico pediatra, noto e caro a tutti, fondatore e indiscusso leader dell'Oncologia Pediatrica nella nostra regione, per molti anni Direttore del Dipartimento di Oncologia e Oncoematologia Pediatrica all'Ospedale Infantile Regina Margherita. La sua figura e le sue realizzazioni saranno a breve commemorate in una seduta scientifica.*

*Chiamo adesso al tavolo della Presidenza i nuovi Soci Ordinari, Corrispondenti, Emeriti, Benemeriti.*

***Soci Ordinari:***

*Prof.ssa Fiorella ALTRUDA*  
*Prof. Gianni BONA*  
*Dott. Guido BONGIOANNINI*  
*Prof. Giovanni DI PERRI*  
*Dott. Pier Paolo DONADIO*  
*Dott. Carlo FALETTI*  
*Prof. Fiorenzo GAITA*  
*Prof. Guido GASPARRI*  
*Dott. Franco NESSI*  
*Prof.ssa Maria Giuseppina ROBECCHI*

***Socio Corrispondente:***

*Prof. Giuseppe Ottavio ARMOCIDA*

***Soci Emeriti:***

*Prof. Italo FARALDI*  
*Prof. Giuseppe HEER*  
*Prof. Luigi RAVIZZA*  
*Prof. Davide SCHIFFER*

***Socio Benemerito:***

*Dott. Tito GAVAZZI*

*E adesso è il momento dei Vincitori dei premi di laurea.*

*Due premi sono intitolati alla memoria del Dott. Italo Arneodo e, come ogni anno, saranno consegnati dalla sorella Dott.ssa Severina Arneodo:*

*Dott. Davide BALMATIVOLA*  
*Dott. Alessandro FALCONE*

*Ora è la volta di un premio sostenuto dalla Fondazione Ferrero Onlus, in memoria del nostro Socio Prof. Gianpiero Gaidano:*

*Dott. Marco FANGAZIO*

*Siamo in dirittura finale. Due parole sulla situazione economica: la si può definire con parecchi aggettivi, facilmente intuibili in questi tempi di tagli*

*feroci da parte delle Istituzioni pubbliche: diciamo situazione difficile ma non disastrosa. Sopravviviamo grazie all'Università e al mecenatismo privato; quest'ultimo ci ha consentito non soltanto di premiare giovani laureati meritevoli, ma anche di perseguire progetti ambiziosi, come quello della digitalizzazione e conseguente fruibilità informatica del nostro patrimonio librario. Un rinnovato ringraziamento e l'apprezzamento di tutti noi per la scelta di supportare iniziative culturali durature, e non magari manifestazioni appariscenti ma effimere. Nel corso di questa esposizione ho qua e là ringraziato chi ci ha supportato economicamente sulle varie iniziative citate, ed è possibile che abbia fatto inavvertite e improvvide omissioni. Vorrei qui riprendere un breve elenco di istituzioni alle quali va la nostra gratitudine: oltre all'Università di Torino, al Ministero per i Beni e le Attività Culturali, alla Regione Piemonte – Settore Musei e Patrimonio Culturale – l'elenco include la Fondazione CRT, la Compagnia di San Paolo, la Fondazione Piera, Pietro e Giovanni Ferrero, l'azienda farmaceutica AMGEN. Illustri e cari Soci, come sempre l'appello è a Voi, perché non solo vi siano da parte di tutti le quote associative e il prezioso 5%, ma vi sia la partecipazione attiva alla vita dell'Accademia anche attraverso il recupero di elargizioni magari finalizzate a Convegni, Incontri, Presentazioni di iniziative, eventi per i quali la nostra aula è perfettamente organizzata e disponibile. Abbiamo ospitato alcuni convegni nel corso del passato Anno Accademico e speriamo di farlo anche e ancor più nel prossimo. Proprio l'altro ieri, negli interventi che hanno così bene valorizzato la presentazione del recente libro di Davide Schiffer, sono emerse alcune parole-chiave (per usare un termine bibliografico) che sottolineano il valore gratificante, e soprattutto etico, della cultura e della razionalità scientifica applicate ai comportamenti clinici, siano essi diagnostici, anche lontani dal malato, oppure direttamente finalizzati alla sua gestione quotidiana. Sono parole semplici: comunicazione, partecipazione, umiltà, amicizia, magistero, esperienza, studio, fatica, crescita, passione. È questa l'Accademia, questo mix di elementi vissuti con emozione ed entusiasmo che non vengono meno con l'età, e che ci stimolano a una continua rivisitazione interiore, della quale dobbiamo essere orgogliosi, soprattutto in questi tempi che eufemisticamente diciamo difficili. No alla deriva dell'incultura, teniamo ferma la barra del timone. Con questi sentimenti concludo il mio mandato biennale, fiducioso che il Presidente e il Consiglio del prossimo biennio sapranno fare di più e meglio di quanto con umile, continuo impegno abbiamo fatto, il sottoscritto e il Consiglio tutto. Un grazie ancora a tutti Voi per avermi gratificato con quest'esperienza; un grazie doveroso, ancora, ai professionisti esterni che anche quest'anno hanno fornito con generosità e professionalità indiscusse le*

*loro consulenze in ambito notarile, contabile, legale. E infine un grazie con il cuore a mia moglie Annita, alle care amiche Wanda Amato e Lalla Spertino, che hanno preparato una decorazione floreale all'insegna dell'Italia Unita e che ci hanno portato una nota di simpatico colore e di rinnovata fiducia nel futuro del nostro Paese.*

*Dichiaro quindi ufficialmente aperto l'Anno Accademico 2011-2012 dell'Accademia di Medicina di Torino, 166<sup>esimo</sup> dalla sua fondazione sancita dal re Carlo Alberto di Savoia.*

*Prof. Alberto Angeli*

## IPERTENSIONE ARTERIOSA RESISTENTE

*Franco Veglio, Michele Covella, Elena Berra  
Chiara Fulcheri, Silvia Totaro, Franco Rabbia*

Cattedra di Medicina Interna e Centro Ipertensione  
Dipartimento di Scienze Mediche - Università degli Studi di Torino

Key words: *Resistant hypertension / Ipertensione resistente*

### **Abstract:**

Resistant Hypertension (RH) is defined as failure to achieve target blood pressure despite treatment with 3 antihypertensives at optimal dosing, including a diuretic. It is a rather common condition, with a prevalence of 10-15% among treated hypertensives. Cardiovascular events are more frequent and mortality rates are higher among this subgroup when compared to patients with controlled hypertension.

Resistant hypertension must be distinguished from uncontrolled hypertension, whose occurrence is much more common. Factors associated with pseudo-resistance must therefore be ruled out. Inadequate antihypertensive treatment, lack of adherence to prescribed therapy, white-coat RH and poor blood pressure measuring technique are the main causes of pseudoresistance. Once true RH has been diagnosed, patients should be evaluated for conditions associated with resistance. If RH is caused by excessive salt intake, alcohol abuse, obesity, or use of certain classes of drugs, behavioural changes might be sufficient for achieving target blood pressure. Secondary causes of hypertension are frequently diagnosed among patients with RH: chronic kidney disease, primary aldosteronism and obstructive sleep apnea are the most common. Optimization of antihypertensive treatment remains the mainstay of treatment of essential RH. Specifically, adjustment in diuretic therapy and the addition of an aldosterone receptor antagonist to standard combination therapy are effective in many cases. A few highly selected patients who fail to reach target blood pressure despite optimal treatment may be eligible for invasive treatment of RH by techniques such as baroreflex activation therapy and renal denervation.

### **Riassunto:**

L'ipertensione arteriosa resistente, definita dal mancato raggiungimento del controllo pressorio nonostante terapia con almeno 3 antipertensivi a dosi adeguate, è una condizione di riscontro relativamente frequente, con una prevalenza del 10-15% tra gli ipertesi in terapia. L'incidenza di eventi

cardiovascolari e la mortalità risultano più elevate in questi pazienti rispetto a soggetti con ipertensione controllata.

L'ipertensione resistente non deve essere confusa con la semplice ipertensione non controllata, condizione molto più comune nella pratica clinica. In primo luogo deve perciò essere indagata la presenza di fattori di pseudo-resistenza quali inadeguatezza della terapia, non aderenza al trattamento prescritto, effetto "camice bianco" e inappropriata tecnica di misurazione. Una volta confermata la presenza di ipertensione resistente è necessario valutare se esistano condizioni associate passibili di correzione. Tra queste, l'eccessivo introito di sodio, il consumo di alcol, l'obesità, l'abuso di farmaci e altre sostanze ad azione ipertensivante sono potenzialmente modificabili con provvedimenti di tipo comportamentale. Tra gli ipertesi resistenti si osserva inoltre un'aumentata prevalenza di ipertensione secondaria: oltre alle forme nefroparenchimali risultano particolarmente frequenti l'iperaldosteronismo primitivo e le apnee ostruttive del sonno. Il potenziamento della terapia antipertensiva costituisce il cardine del trattamento dell'ipertensione resistente; in particolare l'ottimizzazione della terapia diuretica e l'uso di antagonisti recettoriali dei mineralcorticoidi si sono dimostrati in grado di migliorare il controllo pressorio in una significativa percentuale di pazienti. Pazienti attentamente selezionati nei quali sia stata esclusa ogni causa reversibile di resistenza e che non raggiungano il target pressorio nonostante terapia massimale possono essere candidati a misure terapeutiche invasive quali la denervazione renale e la stimolazione del baroriflesso.

## **DEFINIZIONE DI IPERTENSIONE RESISTENTE**

Le Linee Guida ESH/ESC 2007<sup>(24)</sup> definiscono come ipertesi resistenti i pazienti i cui valori pressori rimangono non controllati nonostante l'aderenza ad una adeguata terapia comportamentale e ad una terapia farmacologica costituita da 3 farmaci a dosi adeguate, di cui un diuretico. Secondo un più recente statement dell'AHA<sup>(6)</sup> sono da considerarsi resistenti anche gli ipertesi che raggiungono l'obiettivo pressorio richiedendo l'impiego di 4 o più antipertensivi.

## **PREVALENZA E PROGnosi**

I dati circa la prevalenza di ipertensione resistente derivano per lo più da analisi a posteriori effettuate su pazienti arruolati in grandi trial clinici. Queste stime portano a considerare l'ipertensione resistente come un'entità di riscontro non raro nella pratica clinica. Tra il campione dello studio ALLHAT è stata stimata una prevalenza di ipertesi resistenti del 15% circa<sup>(12)</sup>. Tra i pazienti dello studio CONVINCe dopo un follow-up medio di 3 anni, il 33% non aveva raggiunto il target pressorio, con il 18% del campione in esame che assumeva almeno tre antipertensivi<sup>(4)</sup>. Dall'analisi dei pazienti arruolati nello studio VALUE è risultato come il 15% dei pazienti abbia ricevuto almeno 3 antipertensivi, e il 61% di essi non abbia comunque raggiunto l'obiettivo pressorio entro 30 mesi<sup>(20)</sup>.

Recentemente, il crescente interesse degli specialisti nei confronti di questa condizione ha portato alla pubblicazione di nuovi dati di prevalenza. Lo studio spagnolo HIPERFRE ha valutato 1.724 pazienti ipertesi calcolando la prevalenza di ipertensione resistente secondo la definizione ESH 2007; il 13,2% rientrava nella definizione di iperteso resistente mentre il 45,2% non raggiungeva il controllo pressorio senza tuttavia assumere un numero di farmaci sufficiente per essere considerato resistente. I fattori predittivi di resistenza sono risultati essere il sesso maschile, l'età avanzata, il diabete mellito, l'obesità e la sindrome metabolica<sup>(31)</sup>. Persell in un recente lavoro ha analizzato i dati della popolazione americana del National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) relativi al periodo 2003-2008, calcolando una prevalenza del 12,9% tra gli ipertesi in terapia. De La Sierra e collaboratori hanno pubblicato dati epidemiologici derivati dall'analisi dei monitoraggi pressori ambulatoriali (ABPM) effettuati in Spagna dal 2004 al 2009, raccolti in un unico registro nazionale. Dei quasi 70 mila ipertesi in terapia, il 14,8% rientrava nella classificazione di ipertensione resistente (12,2% se non si considerano i pazienti con valori pressori controllati con 4 o più farmaci)<sup>(10)</sup>.

Informazioni sulla popolazione italiana provengono dall'Olivetti Heart Study, che ha valutato 794 lavoratori di sesso maschile in due visite a distanza di circa 8 anni, stimando una incidenza di ipertensione resistente nel periodo intercorso tra le due visite del 10,1% tra pazienti già ipertesi alla valutazione basale<sup>(3)</sup>. In Figura 1 sono riassunti i dati derivati dai lavori che abbiano valutato nello specifico la prevalenza di ipertensione resistente.

Studio	Numerosità e caratteristiche del campione	Definizione di Ipertensione Resistente adottata	Prevalenza di Ipertensione Resistente
<b>Studio HIPERFRE</b>	1724 ipertesi in terapia Spagna	ESH 2007	13,2 %
<b>NHANES 2003-2008</b>	Circa 4000 ipertesi in terapia USA	AHA 2008 modificata (controllo pressorio a 140/90 in tutti i pazienti)	12,8 %
<b>Registro spagnolo ABPM</b>	68045 ipertesi in terapia Spagna	ESH 2007	12,2 %
		AHA 2008	14,8 %
<b>Olivetti Heart Study</b>	794 maschi adulti di cui 307 ipertesi noti Italia	AHA 2008	Incidenza in 10 anni di follow-up: 4,8 % Incidenza tra gli ipertesi noti: 10,1 %

Figura 1. Prevalenza di ipertensione resistente in quattro studi clinici.

Ipertesi resistenti sembrano andare incontro a peggiore prognosi rispetto ad ipertesi con valori controllati dalla terapia farmacologica. Poichè il rischio cardiovascolare, il rischio cerebrovascolare e il rischio di danno renale correlano direttamente con i valori pressori, i resistenti dovrebbero essere considerati ad alto rischio sulla base del semplice dato pressorio. La prognosi può risultare aggravata dalla frequente associazione dell'ipertensione resistente con comorbilità quali obesità, diabete mellito e insufficienza renale<sup>(38)</sup>. Un recente

studio<sup>(33)</sup> ha esaminato l'incidenza di eventi cardiovascolari fatali e non fatali nelle seguenti popolazioni:

- 1) ipertesi con valori pressori controllati;
- 2) ipertesi resistenti;
- 3) ipertesi con ipertensione mascherata;
- 4) pazienti con pseudo-resistenza da effetto camice bianco.

Sia i pazienti con ipertensione resistente sia quelli con ipertensione mascherata avevano un'incidenza di eventi significativamente maggiore rispetto ai soggetti con controllo pressorio; non è stata invece evidenziata alcuna differenza significativa tra pazienti con pseudo-resistenza da effetto camice bianco e pazienti con valori pressori controllati (Figura 2). Recenti lavori hanno dimostrato come diversi marcatori di danno d'organo utilizzati nella popolazione ipertesa generale per identificare soggetti a rischio cardiovascolare elevato mantengono il ruolo prognostico anche all'interno della popolazione con ipertensione resistente (albuminuria<sup>(36)</sup>, ipertrofia ventricolare sinistra<sup>(35)</sup>, durata della ripolarizzazione ventricolare<sup>(37)</sup>, assenza di dipping notturno<sup>(29)</sup>).

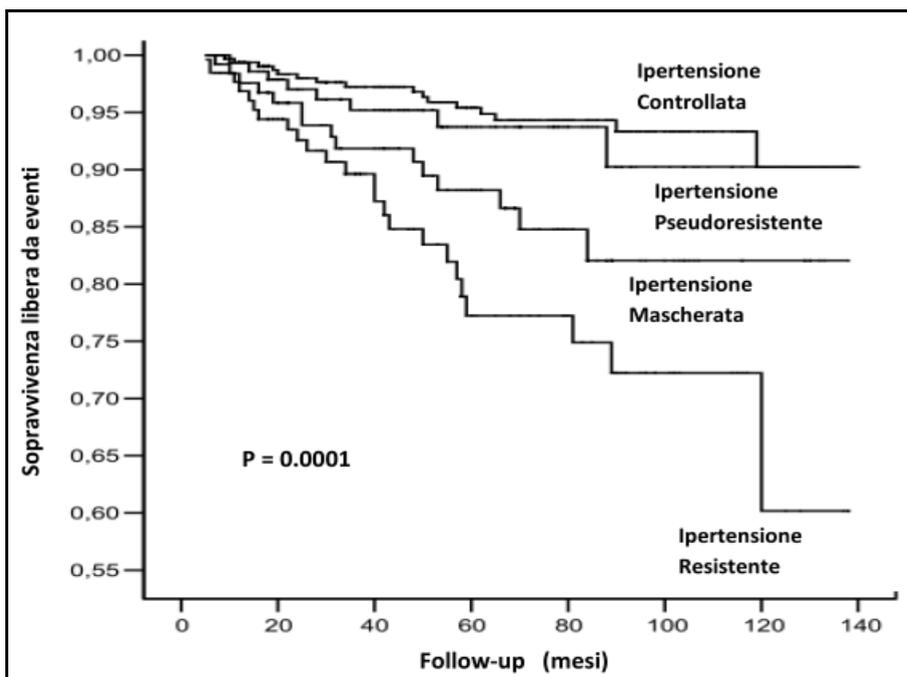


Figura 2. Curve di sopravvivenza libera da eventi di pazienti con ipertensione controllata, ipertensione pseudoresistente, ipertensione mascherata e ipertensione resistente. Tradotto da Pierdomenico et al<sup>(33)</sup>.

## **IPERTENSIONE PSEUDORESISTENTE**

Il primo step nella valutazione dell'ipertensione resistente consiste nell'escludere tutte le condizioni responsabili di pseudo-resistenza, ossia i fattori che potrebbero portare a considerare resistente un paziente in realtà responsivo a terapia antipertensiva. Questi includono:

- 1) inadeguatezza della tecnica di misurazione;
- 2) pseudoipertensione;
- 3) pseudo-resistenza da effetto camice bianco;
- 4) scarsa compliance al trattamento farmacologico;
- 5) inerzia clinica.

L'utilizzo di bracciali di dimensioni non congrue al braccio del paziente, l'esecuzione della misurazione prima di avere lasciato il paziente seduto in condizioni di riposo per almeno 5 minuti, il mancato rispetto dell'astinenza da fumo e caffè nella mezz'ora precedente la misurazione e l'errata posizione del braccio del paziente rispetto al cuore e un suo supporto non adeguato, l'esecuzione di una misurazione singola piuttosto che il calcolo di valori medi di almeno due misurazioni sono i più comuni fattori legati alla tecnica di misurazione che possono portare a sovrastimare i valori pressori effettivi<sup>(32)</sup>.

Si parla di pseudoipertensione in presenza di vasi arteriosi con pareti calcifiche che impediscono il collabimento del vaso anche quando la pressione esercitata dalla camera d'aria sia superiore a quella intraluminale. Si ritiene che possa portare a una sovrastima significativa dei valori sistolici in particolare nella popolazione anziana<sup>(40)</sup>.

L'ipertensione da camice bianco, o ipertensione clinica isolata, è definita dalla presenza di elevati valori pressori alla misurazione da parte del medico e dell'infermiere, con valori domiciliari nella norma. Si stima che possa interessare fino al 15% della popolazione generale e contribuire a un terzo delle presunte nuove diagnosi di ipertensione<sup>(24)</sup>. Secondo i dati del registro spagnolo dei monitoraggi pressori ambulatoriali, il 37,5% di 8.295 ipertesi resistenti aveva valori domiciliari nella norma<sup>(11)</sup>. Considerando l'elevata prevalenza del fenomeno e le implicazioni prognostiche dell'effetto camice bianco, il monitoraggio ambulatoriale della pressione arteriosa delle 24 ore dovrebbe sempre fare parte della disamina diagnostica dell'iperteso con sospetta resistenza<sup>(34)</sup>.

La mancata aderenza alla terapia prescritta è un problema di riscontro comune nel trattamento di una condizione cronica e per lo più asintomatica quale l'ipertensione arteriosa. In uno studio italiano su una vasta coorte di più di 400 mila pazienti con nuova diagnosi di ipertensione, informazioni sulla

persistenza sono state ottenute attraverso l'accesso ai database amministrativi del servizio sanitario nazionale per la regione Lombardia. Il 33% dei pazienti aveva interrotto l'assunzione dell'antipertensivo entro 6 mesi dalla prescrizione, il 41% a 1 anno, il 50% a 5 anni. La compliance è risultata maggiore per farmaci ad azione sull'asse RAA<sup>(9)</sup>. Tra i pazienti che aderivano al trattamento senza episodi di sospensione della terapia (definiti come latenza superiore a 90 giorni tra due prescrizioni consecutive) il rischio di eventi era del 37% inferiore rispetto a pazienti per i quali era segnalato almeno un episodio di sospensione.

L'inerzia terapeutica è uno dei maggiori responsabili dello scarso controllo pressorio tra la popolazione ipertesa generale. Nella specifica situazione della pseudoresistenza, si può parlare di inerzia clinica nel caso in cui ad un paziente vengano prescritti 3 o più antipertensivi a dosaggi non ottimali e/o in associazione non razionale<sup>(15)</sup>.

Uno studio del 2005 ha sottoposto 141 ipertesi presunti resistenti ad una accurata disamina per la ricerca di cause identificabili di resistenza: solo in una minoranza di pazienti (6%) è stata confermato un quadro di ipertensione resistente essenziale, mentre la non aderenza alla terapia (16%) e l'inadeguatezza della terapia prescritta (58%) sono risultate le principali cause di pseudoresistenza<sup>(15)</sup> (Figura 3).

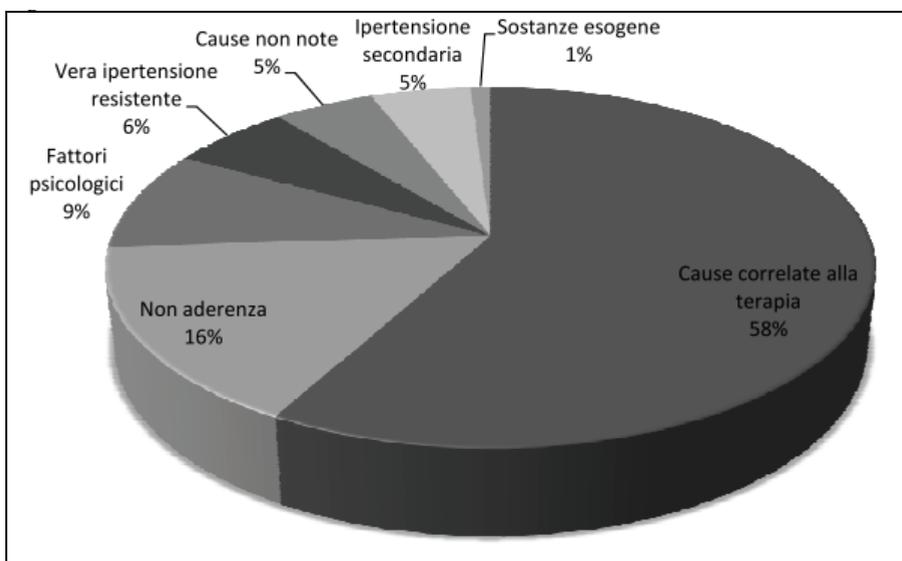


Figura 3. Cause di ipertensione resistente, identificate nel 94% di soggetti con sospetta ipertensione resistente essenziale. Adattato da Garg et al<sup>(15)</sup>.

## **FISIOPATOLOGIA E CONDIZIONI ASSOCIATE A IPERTENSIONE RESISTENTE**

**Farmaci e altre sostanze ipertensivanti.** Molti farmaci e sostanze esogene di natura non medicamentosa possono interagire con i meccanismi di controllo pressorio. I principali farmaci che possono determinare un rialzo pressorio o interferire con la risposta agli antipertensivi sono: FANS, glucocorticoidi, steroidi anabolizzanti, contraccettivi orali, decongestionanti, anoressizzanti, midodrina, modafinil, ciclosporina, tacrolimus, eritropoietina, farmaci biologici anti-VEGF. Anche sostanze d'abuso (in particolare cocaina e amfetamine), e sostanze naturali (liquirizia, succo di pompelmo) possono essere responsabili di mancato controllo pressorio<sup>(38)</sup>.

**Eccessivo apporto di sodio.** Un apporto di sodio elevato è responsabile tanto di un effetto diretto sui valori pressori quanto di una ridotta efficacia dei farmaci antipertensivi. Gli effetti sono più marcati in pazienti di razza nera, anziani e nefropatici. La determinazione della sodiuria delle 24 ore è una metodica efficace per verificare la compliance alle raccomandazioni circa il consumo di sale giornaliero (< 100 mmol/die).

**Tabagismo.** Gli effetti del fumo di sigaretta sul rischio cardiovascolare sono accertati, ma non sembra che si estrinsechino attraverso una maggiore suscettibilità all'ipertensione arteriosa. La cessazione del fumo deve comunque essere considerata la singola misura comportamentale più efficace per l'abbattimento del rischio cardiovascolare, e in quest'ottica deve essere raccomandata a tutti gli ipertesi.

**Obesità.** L'eccesso di massa grassa rende più difficile l'ottenimento del controllo pressorio attraverso diversi meccanismi, tra cui: iperattivazione del sistema nervoso simpatico e dell'asse RAA, più elevata gittata cardiaca, alterata sensibilità del baroriflesso, sviluppo di insulino-resistenza<sup>(19)</sup>. Inoltre l'obesità si può associare ad apnee ostruttive del sonno (OSA), causa nota di ipertensione secondaria. Una metanalisi di 25 studi randomizzati che hanno valutato la riduzione pressoria conseguente alla perdita di peso ottenuta con sole misure dietetiche ha evidenziato come ad una riduzione di 1 kg di peso corporeo corrisponda un calo pressorio medio di 1,05/0,92 mmHg<sup>(30)</sup>. Il calo ponderale ottenuto con interventi di chirurgia bariatrica, per quanto consistente, pare invece avere un'efficacia inferiore nel determinare riduzioni pressorie<sup>(39)</sup>.

**Diabete Mellito.** Secondo recenti dati di Bramlage e collaboratori, a livello globale il 25,3% del totale degli ipertesi non diabetici risulta essere a controllo pressorio (< 140/90); la prevalenza di controllo ottimale tra i diabetici (PA < 130/80) del solo 8,3%<sup>(5)</sup>. L'aumentato tono simpatico, la ritenzione di sodio,

l'elevato grado di disfunzione endoteliale e l'aumentata stiffness arteriosa rendono conto di come sia particolarmente difficile per gli individui diabetici rispettare l'obiettivo pressorio. Inoltre i diabetici di lunga data mostrano quasi costantemente una ridotta funzionalità renale, e ciò rappresenta un altro importante fattore predittivo di resistenza alla terapia antipertensiva.

**Insufficienza renale cronica.** L'ipertensione nefroparenchimale è ritenuta essere da diversi Autori la causa più frequente di ipertensione secondaria farmaco-resistente<sup>(27)</sup>. Inoltre la nefropatia può rappresentare, oltre che una causa di scarso controllo pressorio, una sua prevedibile conseguenza a medio-lungo termine: oltre alla nefropatia diabetica, quella ipertensiva rappresenta infatti la forma più frequente negli ipertesi resistenti. I meccanismi biologici responsabili di ipertensione arteriosa in pazienti nefropatici sono numerosi, ed accanto ai più noti e meglio caratterizzati – in particolare l'eccesso di volume intravascolare e l'iperattivazione dell'asse RAA – sembrano esservene numerosi altri<sup>(8)</sup>: aumento dell'attività simpatica renale afferente in risposta al danno renale; alterata variabilità circadiana dei valori pressori, attribuibile in particolare agli effetti del sovraccarico di volume e alla neuropatia uremica; alterato equilibrio tra i fattori endoteliali ad azione vasodilatatrice e vasoconstrictrice; alterazioni funzionali e morfologiche dell'albero arterioso risultanti in aumentata stiffness.

**Apnee ostruttive del sonno - OSA.** Le aumentate resistenze delle vie aeree superiori e l'ipossia intermittente che si verifica nelle ore di sonno in pazienti con OSA sono responsabili di un aumentato tono simpatico; questo a sua volta causerebbe un rialzo pressorio attraverso incrementi della gittata cardiaca e delle resistenze vascolari periferiche. Nei pazienti con OSA è stato inoltre dimostrato un incremento dello stress ossidativo, una disfunzione endoteliale più severa e una ridotta disponibilità di ossido nitrico<sup>(6)</sup>. La polisonnografia è l'esame di scelta per la diagnosi di OSA e per la valutazione della severità tramite il calcolo dell'indice apnea-ipopnea. Il trattamento con cPAP è in grado di migliorare il controllo pressorio nell'iperteso resistente con OSA<sup>(22)</sup>.

**Iperaldosteronismo primitivo (PA).** L'iperaldosteronismo primitivo (PA) è una delle forme di ipertensione secondaria a maggiore prevalenza tra gli ipertesi resistenti, secondo alcuni autori la principale<sup>(34)</sup>. Si stima che la prevalenza di questo disordine tra gli ipertesi aumenti con la crescente severità dell'ipertensione: dal 2% nei soggetti con ipertensione di grado I al 20% tra gli ipertesi resistenti. Proprio a causa dell'elevata prevalenza di PA in questa categoria di pazienti, nella disamina del paziente con ipertensione resistente è indicato eseguire il test di screening per iperaldosteronismo primitivo tramite dosaggio di aldosterone e attività reninica plasmatica. Soggetti

risultati positivi al test devono essere sottoposti ad uno dei test di conferma validati e, se ulteriormente positivi, alla diagnosi di sottotipo attraverso esami di imaging ed eventuale cateterismo delle vene surrenaliche. Una corretta diagnosi di sottotipo è fondamentale per guidare la terapia: adenomi produttori aldosterone possono essere trattati chirurgicamente, mentre per l'iperplasia bilaterale è indicata la terapia medica con antagonisti recettoriali dei mineralcorticoidi<sup>(28)</sup>. L'eccesso di aldosterone nell'ipertensione resistente potrebbe avere un ruolo anche nei pazienti senza evidenza laboratoristica e strumentale di iperaldosteronismo primitivo, come testimoniato dall'efficacia dell'aggiunta di un antagonista dei mineralcorticoidi alla terapia antipertensiva di pazienti classificati come resistenti<sup>(1)</sup>.

Molto spesso non è comunque possibile identificare un unico fattore responsabile della mancata risposta al trattamento farmacologico. Si ritiene che la maggioranza dei casi di ipertensione resistente sia in effetti multifatoriale, con componenti di natura sia genetica sia ambientale a determinare il quadro. I principali meccanismi fisiopatologici chiamati in causa nell'ipertensione resistente essenziale sono:

- 1) il sovraccarico di volume, in parte spiegato da aumentati livelli di aldosterone circolante anche in pazienti senza forme classiche di PA;
- 2) l'aumentato drive simpatico;
- 3) l'aumento delle resistenze vascolari periferiche, in parte correlato a disfunzione endoteliale, evidenziata in misura maggiore in ipertesi resistenti rispetto a soggetti con ipertensione controllata<sup>(23)</sup>.

La conoscenza dei meccanismi fisiopatologici alla base del mancato controllo pressorio costituisce il fondamento per un'approccio terapeutico razionale.

## **TERAPIA DELL'IPERTENSIONE RESISTENTE**

### **Misure comportamentali**

Nei pazienti con ipertensione resistente deve essere incoraggiata l'aderenza a tutte le misure comportamentali valide per la popolazione ipertesa generale. Dovranno pertanto essere consigliati il calo ponderale nei soggetti sovrappeso o obesi, la cessazione del fumo, la moderazione del consumo di alcol, la limitazione dell'introito di sodio, l'incremento dell'attività fisica. Queste condotte si sono dimostrate efficaci, se pure in grado variabile, nei soggetti ipertesi, pertanto la loro adozione è da raccomandare anche nei resistenti<sup>(2)</sup>.

## **Cronoterapia**

La distribuzione dell'assunzione dei diversi antipertensivi durante la giornata sembra poter condizionare significativamente l'efficacia terapeutica: assumere la totalità dei farmaci al momento del risveglio potrebbe non garantire una copertura adeguata e uniforme delle 24 ore, determinando un'aumentata incidenza di ipertensione resistente e un pattern pressorio caratterizzato da mancato dipping notturno<sup>(16)</sup>. Per questo motivo nei pazienti con ipertensione resistente dovrebbe essere privilegiato l'uso di farmaci a lunga emivita e parte della terapia dovrebbe essere assunta nelle ore serali.

## **Adeguamento della tipologia e della posologia del diuretico**

L'ottimizzazione della terapia diuretica rappresenta uno step fondamentale nel trattamento dell'ipertensione resistente. In pazienti con funzionalità renale conservata dovrebbe essere sempre impiegato un diuretico tiazidico. Il clortalidone può rappresentare una scelta migliore rispetto all'idroclorotiazide in ragione di dati che evidenziano come anche a dosaggio inferiore (25 mg/die di clortalidone vs 50 mg/die di idroclorotiazide) fornisca un maggiore beneficio in termini di efficacia antipertensiva<sup>(13)</sup>. Pazienti con ridotta funzionalità renale (GFR < 40-50 ml/min) dovrebbero essere trattati con un diuretico dell'ansa, la cui dose quotidiana deve essere suddivisa in un numero di assunzioni adeguato alla farmacocinetica del principio attivo scelto<sup>(38)</sup>. Ipertesi resistenti con valori pressori non controllati nonostante terapia diuretica a pieno dosaggio possono giovare dell'aggiunta di un secondo diuretico con meccanismo d'azione complementare, in particolare se parametri clinici (segni di congestione di circolo) e/o laboratoristici (elevati livelli di peptidi natriuretici, attività reninica plasmatica soppressa) inducono a ritenere che la diuresi sia subottimale<sup>(18)</sup>. Associare ad un diuretico dell'ansa il diuretico simil-tiazidico metolazone può essere utile per correggere l'eccesso di volume in ipertesi resistenti con insufficienza renale<sup>(25)</sup>.

## **Antagonisti recettoriali dei mineralcorticoidi (MRA)**

Una revisione recente ha analizzato i dati di 5 studi prospettici e di uno studio retrospettivo che hanno valutato, tra il 2002 e il 2007, l'impiego di spironolattone nell'ipertensione resistente, per un totale di 1848 soggetti (Figura 4). È risultato un calo pressorio medio di 22/10 mmHg<sup>(26)</sup>. L'efficacia nella terapia dell'ipertensione resistente è stata recentemente dimostrata anche per eplerenone, dotato di maggiore selettività per i recettori dei mineralcorticoidi e bassa affinità per i recettori degli ormoni sessuali<sup>(7)</sup>. In virtù dell'elevata

efficacia, l'impiego di MRA quale antipertensivo aggiuntivo deve essere preso in considerazione in tutti i pazienti ipertesi resistenti con funzionalità renale conservata e in assenza di iperkaliemia<sup>(26)</sup>.

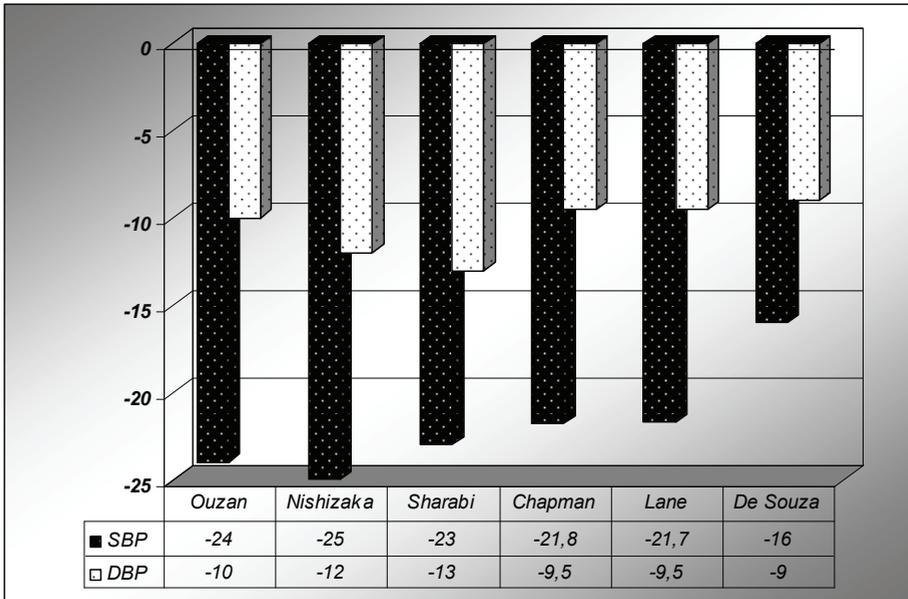


Figura 4. Revisione di sei studi clinici circa l'impiego di spironolattone nella terapia dell'ipertensione resistente. Da Marrs et al<sup>(26)</sup>.

### Approccio sequenziale alla terapia dell'ipertensione resistente<sup>(25)</sup>

Nonostante le definizioni di ipertensione resistente considerino tali i pazienti che assumono almeno tre antipertensivi, la scelta dei primi due farmaci riveste un ruolo chiave e l'iniziale terapia di associazione può garantire nella maggior parte dei casi il raggiungimento del target pressorio. In genere deve essere privilegiata l'associazione di un farmaco diretto verso l'eccesso di sodio-volume (un diuretico o un calcio antagonista diidropiridinico) con uno ad azione sull'asse RAA (un ACE inibitore, un sartano, un inibitore diretto della renina o un beta bloccante). Il beta bloccante è generalmente considerato in seconda linea rispetto agli altri, tuttavia l'utilizzo in pazienti con fenotipo caratterizzato da ipertono simpatico può consentire di ottenere il controllo pressorio in modo fisiologico.

La scelta del terzo farmaco deve essere indirizzata al meccanismo fisiopatologico prevalente tra l'eccesso di sodio-volume e l'ipertono simpatico.

Nel primo caso dovrà essere potenziata la terapia diuretica, con la possibilità di impiegare antagonisti recettoriali dell'aldosterone in pazienti con buona funzionalità renale. Elementi suggestivi della necessità di potenziare la terapia diuretica sono l'elevato apporto di sale, il sovrappeso o l'obesità, la presenza di edema, bassi livelli di PRA, l'insufficienza renale cronica. Nel secondo caso si assocerà un beta-bloccante, o eventualmente la combinazione di un beta-bloccante e un alfa-litico. Diversi aspetti possono suggerire una prevalente componente neurogena: la presenza di tachicardia sinusale, di elevata variabilità dei valori pressori, di ipertensione severa non altrimenti spiegata, o la semplice non risposta ad un trattamento indirizzato a correggere l'eccesso di volume. Inoltre, gli alcolisti, i pazienti ipertesi con OSA e quelli con anamnesi di stroke hanno frequentemente un'importante componente neurogena. Pazienti che non mostrano risposta al potenziamento della terapia diuretica possono beneficiare di un farmaco indirizzato verso la componente neurogena, e viceversa.

In soggetti con ipertensione non controllata con 3 farmaci a pieno dosaggio, l'aggiunta di spironolattone rappresenta in genere lo step successivo. Può inoltre essere preso in considerazione l'aumento della dose di farmaci già assunti. Questa strategia può portare ad un aumento considerevole della risposta soprattutto per i diuretici, mentre per altre classi di antipertensivi l'efficacia è spesso limitata oppure la fattibilità è compromessa dall'insorgenza di effetti indesiderati. L'utilizzo di antipertensivi ad azione centrale (clonidina) di vasodilatatori diretti (idralazina) e di antagonisti alfa-adrenergici, se non ancora impiegati, può essere quindi presa in considerazione in caso di valori ancora non controllati. Farmaci verso i quali non vi è stata risposta soddisfacente dovrebbero essere eliminati dalla terapia, in particolar modo se è stato raggiunto il controllo pressorio.

### **Terapia invasiva non farmacologica**

Le principali metodiche invasive attualmente utilizzate per il trattamento dell'ipertensione arteriosa resistente consistono nella stimolazione elettrica del baroriflesso e nella denervazione simpatica renale. Ambedue le tecniche, pur utilizzando due approcci differenti, sfruttano la riduzione del drive ortosimpatico centrale per ottenere una riduzione dei valori pressori<sup>(21)</sup>.

La tecnologia BAT (terapia di attivazione del baroriflesso) prevede l'attivazione dei barocettori carotidei mediante un generatore di impulsi barorecettoriali impiantabile. La metodica prevede l'impianto di uno stimolatore sottocute (come i comuni pacemaker), e di due elettrodi posti nel

collo intorno alla biforcazione delle arterie carotidi. Quando i barocettori si attivano, inviano segnali al cervello che vengono interpretati come aumento di pressione arteriosa. Il cervello reagisce a questo percepito aumento di pressione arteriosa, modulando l'attività efferente verso altri organi (cuore, vasi arteriosi e reni) con conseguente vasodilatazione e inibizione della produzione di ormoni vasocostrittori<sup>(17)</sup>.

Nella terapia non farmacologica dell'ipertensione arteriosa resistente infine è di recente acquisizione l'utilizzo negli Stati Uniti ed in Europa di una tecnologia che prevede la denervazione renale al fine di ridurre l'attività del Sistema Nervoso Simpatico (SNS). Il ruolo dei reni e del SNS nella progressione della patologia ipertensiva è documentato da numerosi lavori scientifici. La denervazione renale si propone di interrompere radicalmente la trasmissione afferente ed efferente tra cervello e reni che fisiologicamente avviene attraverso fibre del SNS che decorrono nella parete dell'arteria renale. La tecnica, totalmente endoarteriosa, consente, mediante un catetere a radio frequenza, di effettuare l'ablazione di queste fibre del SNS riducendo così la pressione arteriosa<sup>(14)</sup>.

Attualmente, il ruolo di tali interventi è per lo più limitato a pazienti con ipertensione resistente severa nei quali sia stata esclusa ogni possibile causa reversibile di resistenza e nei cui confronti il potenziamento della terapia farmacologica non sia tollerato o non consenta di migliorare il controllo pressorio.

## BIBLIOGRAFIA

1. Acelajado MC, Calhoun DA: *Aldosteronism and resistant hypertension*. Int. J. Hypertens. 2011; Epub ID: 837817.
2. Acelajado MC, Calhoun DA, Oparil S: *Reduction of blood pressure in patients with treatment-resistant hypertension*. Expert. Opin. Pharmacother. 2009; 18: 2959-2971.
3. Barbato A, Galletti F, Iacone R, Cappuccio FP, Rossi G, Ippolito R, Venezia A, Farinaro E, Strazzullo P: *Predictors of resistant hypertension in an unselected sample of an adult male population in Italy*. Intern. Emerg. Med. 2011; [Epub ahead of print].
4. Black HR, Elliott WJ, Grandits G, Grambsch P, Lucente T, White WB, Neaton JD, Grimm RH, Jr., Hansson L, Lacourciere Y, Muller J, Sleight P, Weber MA, Williams G, Wittes J, Zanchetti A, Anders RJ: *Principal results of the Controlled Onset Verapamil Investigation of Cardiovascular End Points (CONVINCE) trial*. JAMA 2003; 16: 2073-2082.
5. Bramlage P, Bohm M, Volpe M, Khan BV, Paar WD, Tebbe U, Thoenes M: *A global perspective on blood pressure treatment and control in a referred cohort of hypertensive patients*. J. Clin. Hypertens. (Greenwich.) 2010; 9: 666-677.
6. Calhoun DA, Jones D, Textor S, Goff DC, Murphy TP, Toto RD, White A, Cushman WC, White W, Sica D, Ferdinand K, Giles TD, Falkner B, Carey RM: *Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research*. Circulation 2008; 25: e510-e526.
7. Calhoun DA, White WB: *Effectiveness of the selective aldosterone blocker, eplerenone, in patients with resistant hypertension*. J. Am. Soc. Hypertens. 2008; 6: 462-468.
8. Campese VM, Mitra N, Sandee D: *Hypertension in renal parenchymal disease: why is it so resistant to treatment?* Kidney Int. 2006; 6: 967-973.
9. Corrao G, Zambon A, Parodi A, Poluzzi E, Baldi I, Merlino L, Cesana G, Mancina G: *Discontinuation of and changes in drug therapy for hypertension among newly-treated patients: a population-based study in Italy*. J. Hypertens. 2008; 4: 819-824.
10. de la Sierra A, Segura J, Banegas JR, Gorostidi M, de la Cruz JJ, Armario P, Oliveras A, Ruilope LM: *Clinical features of 8295 patients with resistant hypertension classified on the basis of ambulatory blood pressure monitoring*. Hypertension 2011; 5: 898-902.
11. Elliott WJ: *High prevalence of white-coat hypertension in spanish resistant hypertensive patients*. Hypertension 2011; 5: 889-890.
12. Epstein M: *Resistant hypertension: prevalence and evolving concepts*. J. Clin. Hypertens. (Greenwich.) 2007; 1 Suppl 1: 2-6.
13. Ernst ME, Carter BL, Goerdt CJ, Steffensmeier JJ, Phillips BB, Zimmerman MB, Bergus GR: *Comparative antihypertensive effects of hydrochlorothiazide and chlorthalidone on ambulatory and office blood pressure*. Hypertension 2006; 3: 352-358.
14. Esler MD, Krum H, Sobotka PA, Schlaich MP, Schmieder RE, Bohm M: *Renal sympathetic denervation in patients with treatment-resistant hypertension (The Symplicity HTN-2 Trial): a randomised controlled trial*. Lancet 2010; 9756: 1903-1909.
15. Garg JP, Elliott WJ, Folker A, Izhar M, Black HR: *Resistant hypertension revisited: a comparison of two university-based cohorts*. Am. J. Hypertens. 2005; 5 Pt 1: 619-626.

16. Hermida RC, Ayala DE, Calvo C, Lopez JE, Mojon A, Fontao MJ, Soler R, Fernandez JR: *Effects of time of day of treatment on ambulatory blood pressure pattern of patients with resistant hypertension*. Hypertension 2005; 4: 1053-1059.
17. Heusser K, Tank J, Engeli S, Diedrich A, Menne J, Eckert S, Peters T, Sweep FC, Haller H, Pichlmaier AM, Luft FC, Jordan J: *Carotid baroreceptor stimulation, sympathetic activity, baroreflex function, and blood pressure in hypertensive patients*. Hypertension 2010; 3: 619-626.
18. Hirsch S: *A different approach to resistant hypertension*. Cleve. Clin. J. Med. 2007; 6: 449-456.
19. Jordan J, Grassi G: *Belly fat and resistant hypertension*. J. Hypertens. 2010; 6: 1131-1133.
20. Julius S, Kjeldsen SE, Brunner H, Hansson L, Platt F, Ekman S, Laragh JH, McInnes G, Schork AM, Smith B, Weber M, Zanchetti A: *VALUE trial: Long-term blood pressure trends in 13,449 patients with hypertension and high cardiovascular risk*. Am. J. Hypertens. 2003; 7: 544-548.
21. Krum H, Sobotka P, Mahfoud F, Bohm M, Esler M, Schlaich M: *Device-based antihypertensive therapy: therapeutic modulation of the autonomic nervous system*. Circulation 2011; 2: 209-215.
22. Lozano L, Tovar JL, Sampol G, Romero O, Jurado MJ, Segarra A, Espinel E, Rios J, Untoria MD, Lloberes P: *Continuous positive airway pressure treatment in sleep apnea patients with resistant hypertension: a randomized, controlled trial*. J. Hypertens. 2010; 10: 2161-2168.
23. Magen E, Feldman A, Cohen Z, Alon DB, Minz E, Chernyavsky A, Linov L, Mishal J, Schlezinger M, Sthoeger Z: *Circulating endothelial progenitor cells, Th1/Th2/Th17-related cytokines, and endothelial dysfunction in resistant hypertension*. Am. J. Med. Sci. 2010; 2: 117-122.
24. Mancia G, De BG, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L, Rynkiewicz A, Schmieder RE, Boudier HA, Zanchetti A, Vahanian A, Camm J, DE CR, Dean V, Dickstein K, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hellems I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano JL, Erdine S, Kiowski W, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Lindholm LH, Viigimaa M, Adamopoulos S, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Bertomeu V, Clement D, Erdine S, Farsang C, Gaita D, Lip G, Mallion JM, Manolis AJ, Nilsson PM, O'Brien E, Ponikowski P, Redon J, Ruschitzka F, Tamargo J, van ZP, Waeber B, Williams B: *2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC)*. J. Hypertens. 2007; 6: 1105-1187.
25. Mann SJ: *Drug therapy for resistant hypertension: simplifying the approach*. J. Clin. Hypertens. (Greenwich.) 2011; 2: 120-130.
26. Marrs JC: *Spironolactone management of resistant hypertension*. Ann. Pharmacother. 2010; 11: 1762-1769.
27. Moser M, Setaro JF: *Clinical practice. Resistant or difficult-to-control hypertension*. N. Engl. J. Med. 2006; 4: 385-392.
28. Mulatero P, Monticone S, Veglio F: *Diagnosis and treatment of primary aldosteronism*. Rev. Endocr. Metab. Disord. 2011; 12: 3-9.
29. Muxfeldt ES, Cardoso CR, Salles GF: *Prognostic value of nocturnal blood pressure reduction in resistant hypertension*. Arch. Intern. Med. 2009; 9: 874-880.

30. Neter JE, Stam BE, Kok FJ, Grobbee DE, Geleijnse JM: *Influence of weight reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials*. Hypertension 2003; 5: 878-884.
31. Otero FR, Grigorian LS, Lado ML, Lado AL, Turrado VT, Santos JA, Pazo CP, Vazquez JA, Vaamonde LM, Gonzalez JR: *Association between refractory hypertension and cardiometabolic risk. The HIPERFRE study*. Nefrologia 2008; 4: 425-432.
32. Pickering TG, Hall JE, Appel LJ, Falkner BE, Graves J, Hill MN, Jones DW, Kurtz T, Sheps SG, Roccella EJ: *Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals: part 1: blood pressure measurement in humans: a statement for professionals from the Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research*. Circulation 2005; 5: 697-716.
33. Pierdomenico SD, Lapenna D, Bucci A, Di TR, Di MR, Manente BM, Caldarella MP, Neri M, Cuccurullo F, Mezzetti A: *Cardiovascular outcome in treated hypertensive patients with responder, masked, false resistant, and true resistant hypertension*. Am. J. Hypertens. 2005; 11: 1422-1428.
34. Pisoni R, Ahmed MI, Calhoun DA: *Characterization and treatment of resistant hypertension*. Curr. Cardiol. Rep. 2009; 6: 407-413.
35. Salles GF, Cardoso CR, Fiszman R, Muxfeldt ES: *Prognostic impact of baseline and serial changes in electrocardiographic left ventricular hypertrophy in resistant hypertension*. Am. Heart J. 2010; 5: 833-840.
36. Salles GF, Cardoso CR, Fiszman R, Muxfeldt ES: *Prognostic importance of baseline and serial changes in microalbuminuria in patients with resistant hypertension*. Atherosclerosis 2011; 216: 199-204.
37. Salles GF, Cardoso CR, Muxfeldt ES: *Prognostic value of ventricular repolarization prolongation in resistant hypertension: a prospective cohort study*. J. Hypertens. 2009; 5: 1094-1101.
38. Sarafidis PA, Bakris GL: *Resistant hypertension: an overview of evaluation and treatment*. J. Am. Coll. Cardiol. 2008; 22: 1749-1757.
39. Straznicki N, Grassi G, Esler M, Lambert G, Dixon J, Lambert E, Jordan J, Schlaich M: *European Society of Hypertension Working Group on Obesity Antihypertensive effects of weight loss: myth or reality?* J. Hypertens. 2010; 4: 637-643.
40. Zuschke CA, Pettyjohn FS: *Pseudohypertension*. South. Med. J. 1995; 12: 1185-1190.

## GLI STILI DI VITA E LA TUTELA DELLA SALUTE

*Roberta Pacifici, Alessandra Di Pucchio*

Osservatorio Fumo, Alcol e Droga  
Reperto Farmacodipendenza, Tossicodipendenza e Doping  
Dipartimento Del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità - Roma

Key words: *Lifestyle / Stili di vita*  
*Physical Activity / Attività fisica*  
*Tobacco use / Fumo di tabacco*  
*Harmful use of Alcohol / Consumi a rischio di Alcol*  
*Healty diet / Corretta Alimentazione*

### **Abstract:**

According to the World Health Organization (WHO), many factors contribute to the health of individuals and communities. The main determinants of health include the social and economic environment, the physical environment, and the person's individual characteristics and behaviors.

Lifestyle is defined as the aggregation of personal decisions and behaviors that contribute to or cause illness or death. Several studies suggested that individuals can improve their health via exercise, enough sleep, maintaining a healthy body weight, limiting alcohol use, and avoiding smoking.

Importance of healthy lifestyles is well recognized. Indeed, healthy lifestyle depends on their lifestyle a lot.

Nowadays chronic non-communicable diseases such as cancers, cardiovascular diseases, chronic respiratory diseases and diabetes, are the major causes of death and disability worldwide. However, they have common risk factors such as tobacco use, unhealthy diet, physical inactivity and harmful use of alcohol.

The global burden of non-communicable diseases continues to grow and tackling it constitutes one of the major challenges for the development in the twenty-first century. Prevention becomes the key to fight the risk factors and to prevent these diseases by promoting small changes in people's behavior.

A full description of diseases, injuries and the risk factors that cause them is vital for health decision-making and planning.

### **Riassunto:**

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), sono molti i determinanti della salute, ossia i fattori che contribuiscono a determinare lo

stato di salute delle persone, che includono fattori socio-economici, ambientali, individuali, comportamentali e relativi allo stile di vita.

Negli ultimi anni molta attenzione viene data agli stili di vita delle persone ossia all'insieme di comportamenti e decisioni che riguardano principalmente l'alimentazione, l'attività fisica, l'abitudine al fumo di tabacco e i consumi di alcol. È infatti ormai ampiamente riconosciuta la relazione fra salute e stili di vita e il peso che questi ultimi hanno nell'alterare le condizioni di salute nel corso della vita.

L'attenzione agli stili di vita è sempre più sostenuta dall'aumento delle malattie croniche non trasmissibili, quali le malattie cardiovascolari, il diabete, i tumori, le malattie respiratorie croniche legate principalmente a condizioni ambientali e a stili di vita scorretti, quali l'uso del tabacco, l'alimentazione scorretta, l'inattività fisica ed i consumi a rischio di alcol. Il peso globale delle malattie croniche non trasmissibili continua a crescere ed affrontarle costituisce una delle principali sfide per lo sviluppo nel XXI secolo.

La prevenzione è sicuramente la migliore soluzione al problema e molte di queste malattie potrebbero infatti essere prevenute attraverso piccoli cambiamenti nei comportamenti delle persone.

Pertanto, la descrizione della perdita della salute associata a stili di vita scorretti è utile per la programmazione di interventi di tutela della salute.

## INTRODUZIONE

La centralità degli stili di vita nel determinare lo stato di salute e il benessere delle persone, in particolare nei giovani in prospettiva della loro salute come persone adulte, è ormai ampiamente riconosciuta a livello internazionale<sup>(24)</sup>.

Fin dal 1948 l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) aveva definito la salute come uno stato di completo benessere psico-fisico-sociale e dal 1986 con la presentazione della Carta di Ottawa per la promozione della salute<sup>(27)</sup>, si sono fatti strada nuovi approcci e pratiche di prevenzione e di intervento che hanno posto al centro del proprio interesse il comportamento delle persone e il concetto di benessere psico-fisico.

In questo ambito, i modelli ecologici<sup>(5)</sup> hanno dato particolare enfasi ai determinanti di salute, ossia ai fattori che influenzano lo stato di salute di individui e popolazioni. Gli stili di vita delle persone sono costituiti da un insieme di comportamenti relativi all'alimentazione, all'attività fisica, all'abitudine al fumo di tabacco ed ai consumi di alcol; insieme alle condizioni socio-economiche, ambientali, individuali e di accesso ai servizi rappresentano determinanti di salute che interagiscono nell'impostare, mantenere, alterare le condizioni di salute nel corso della vita<sup>(21,24)</sup>.

L'attenzione agli stili di vita è sempre più sostenuta dall'evidenza che se in passato le più importanti cause di morte riguardavano le malattie infettive, oggi il peso globale delle malattie croniche non trasmissibili, quali le malattie cardiovascolari, il diabete, i tumori, le malattie respiratorie croniche, continua a crescere ed affrontarle costituisce una delle principali sfide per lo sviluppo nel XXI secolo<sup>(19,21)</sup>. Le malattie ad andamento cronico sono legate principalmente a condizioni ambientali e a stili di vita scorretti. Anche l'allungamento dell'aspettativa di vita è accompagnato da un incremento degli anni vissuti in disabilità, pertanto diventa ancora più importante assumere stili di vita quotidiani in grado di contrastare l'insorgenza di patologie.

Di seguito vengono approfonditi i principali fattori di rischio legati agli stili di vita che sono al centro del dibattito internazionale in quanto in grado di mettere in pericolo la salute individuale e collettiva.

## STILI DI VITA: L'ATTIVITÀ FISICA

L'attività fisica fa bene alle persone di ogni età: nei bambini promuove uno sviluppo fisico armonico, favorisce la socializzazione e contrasta l'obesità, mentre negli adulti diminuisce il rischio di malattie croniche e migliora la salute mentale. Per gli anziani, i benefici riguardano l'autonomia funzionale, la diminuzione del rischio di cadute e di fratture e la protezione dalle malattie

correlate all'invecchiamento. Sono queste alcune delle indicazioni della Carta di Toronto per l'attività fisica<sup>(7)</sup> che sintetizza i benefici derivanti dall'attività fisica nel senso della promozione del benessere, della salute fisica e mentale, della prevenzione delle malattie, del migliorare le relazioni sociali e la qualità della vita, della produzione di benefici economici e del contributo alla sostenibilità ambientale.

L'inattività fisica è un fattore di rischio primario per la salute in Europa e nel mondo. I dati sulla sedentarietà sono allarmanti: l'OMS stima che il 63% di adulti non raggiunge i livelli minimi raccomandati di attività fisica e di questi il 20% è considerato "inattivo"<sup>(21)</sup>.

Le persone hanno perso l'abitudine a muoversi. In tutto il mondo le nuove tecnologie, l'urbanizzazione, gli ambienti di lavoro che favoriscono sempre di più la sedentarietà e la configurazione di paesi e città centrata sull'uso dell'automobile, hanno reso difficile la pratica dell'attività fisica nella vita quotidiana. Anche gli stili di vita frenetici, le priorità contrastanti, le strutture familiari che cambiano e la mancanza di interazione sociale possono contribuire a favorire l'inattività<sup>(18,22)</sup>.

Le opportunità per svolgere attività fisica continuano a diminuire mentre la prevalenza di stili di vita sedentari sta aumentando nella maggior parte dei paesi, con gravi conseguenze per la salute e con ricadute a livello sociale ed economico.

Dalla metà del secolo scorso, ha avuto inizio la ricerca delle raccomandazioni più efficaci a garantire, al maggior numero di persone possibile, i benefici per la salute derivanti dall'attività fisica.

In uno studio osservazionale retrospettivo condotto su 2.200 individui si è osservato che svolgere sin dall'età giovanile una regolare attività motoria di 60 minuti al giorno o almeno camminare almeno un'ora al giorno, aiuta ad invecchiare bene; astenersi dal fumo ed essere normopeso protegge dalle patologie cronico-degenerative<sup>(15)</sup>.

Questi risultati sono in linea con quanto sostenuto dall'OMS che nelle raccomandazioni più recenti pone l'accento sulla promozione della pratica di un'attività fisica di intensità più moderata, ma più frequente nell'arco della settimana. Questo cambiamento è motivato sia dalla consapevolezza che per le persone sedentarie può essere molto difficile e molto poco attraente mantenere un regime di attività regolari ed intense, mentre può risultare più agevole fare tanti piccoli sforzi di breve durata e di intensità più moderata. Inoltre a livello epidemiologico l'OMS ha evidenziato la possibilità di ottenere grandi benefici di salute anche con moderati incrementi dei livelli di attività fisica<sup>(31,22)</sup>.

Le ultime raccomandazioni dell'OMS indicano per i bambini e i giovani l'importanza di svolgere attività fisica quotidiana di almeno 60 minuti che dovrebbe includere gioco, sport, trasporto, attività ricreative, educazione fisica o esercizio programmato svolto nel contesto dell'attività in famiglia, scuola, comunità. Per gli adulti e adulti senior viene raccomandata attività fisica per almeno 150 minuti a settimana che include attività ricreative nel tempo libero, come andare in bicicletta o camminare, lavoro, lavori in casa, gioco, sport o esercizio programmato, nel contesto delle attività quotidiane, in famiglia e in comunità<sup>(22)</sup>.

Di contro a questa diffusa disattenzione per l'attività fisica, un crescente numero di persone si rivolge alla pratica sportiva e all'attività motoria per ottenere risultati in termini di fitness o di prestazione sportiva attraverso il ricorso a metodi vietati per doping o praticando le attività sportive fino a procurarsi danni alla salute.

In alcuni studi sono stati evidenziati risultati discordanti sugli effetti della pratica sportiva riscontrando che gli atleti che avevano praticato sport di resistenza avevano un minor rischio di sviluppare patologie coronariche e diabete di tipo 2, mentre tale protezione non era stata riscontrata negli atleti che avevano praticato sport di potenza<sup>(10)</sup>. Risale al 1992 il riconoscimento della "Female Athlete Triad" una condizione osservata in donne che praticano sport in modo molto intenso che comprende disordini alimentari, anoressia e osteoporosi<sup>(9)</sup>.

Un rischio elevato per la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è stata osservata in uno studio che ha coinvolto i giocatori di calcio italiani. I dati epidemiologici fanno ipotizzare una possibile connessione tra integratori alimentari o farmaci utilizzati per migliorare le prestazioni sportive e la patogenesi SLA<sup>(2)</sup>.

Il fenomeno ormai noto come "medicalizzazione dell'atleta"<sup>(33)</sup> riguarda il consumo, maggiore fra gli sportivi e gli atleti rispetto alla popolazione generale, di farmaci non vietati per doping, di prodotti salutistici inclusi vitamine, sali minerali, prodotti fitoterapici. Si tratta di una prassi molto diffusa non sempre giustificata da valide motivazioni scientifiche che espone atleti e sportivi al rischio di reazione avverse note e non note, soprattutto in quanto tali prodotti vengono assunti con modalità e dosaggi diversi da quelli terapeutici, da persone sane, e in stati fisiologici al limite delle proprie condizioni.

I dati evidenziati nell'ambito dei controlli condotti su indicazione della Commissione per la Vigilanza ed il Controllo del Doping e per la Tutela della Salute nelle Attività Sportive (CVD) del Ministero della Salute indicano che i

farmaci più assunti dagli atleti nel 2011 sono stati i farmaci antinfiammatori, gli antiasmatici, e i farmaci per le malattie da raffreddamento. Più della metà degli sportivi, inoltre, ha usato prodotti salutistici e integratori. I dati di tutta l'attività di controllo della CVD dal 2003 ad oggi indicano il 3% di atleti risultati positivi ai controlli antidoping. Nel 2011 le sostanze vietate più utilizzate sono state i diuretici e gli agenti mascheranti, seguite dagli agenti anabolizzanti e dagli stimolanti<sup>(13)</sup>.

Questi dati risultano ancora più allarmanti per il fatto che l'intervento di controllo della CVD si rivolge ai settori dilettantistici, giovanili, alle serie minori e alle discipline meno controllate dal CONI e dunque le positività rappresentano dati significativi del fenomeno del doping che è in espansione nello sport amatoriale e nella popolazione generale.

Data l'importanza dell'attività fisica per il benessere psicofisico e per la qualità della vita nel corso degli anni, rivestono notevole importanza gli interventi che promuovono il raggiungimento almeno dei livelli minimi raccomandati, ad esempio trenta minuti giornalieri di camminata sostenuta, che sono lontani dall'essere praticati con continuità e dal diventare un elemento caratterizzante lo stile di vita della popolazione.

## **STILI DI VITA: IL FUMO DI TABACCO**

L'esposizione al fumo di tabacco è uno dei maggiori fattori di rischio nello sviluppo di patologie neoplastiche, cardiovascolari e respiratorie e rappresenta uno dei più grandi problemi di sanità pubblica a livello mondiale.

Per l'OMS l'uso del tabacco rappresenta la seconda causa di morte nel mondo ed una delle principali cause prevenibili di morte. L'epidemia mondiale di tabacco durante il XX secolo ha ucciso 100 milioni di persone ed uccide quasi 6 milioni di persone ogni anno, di cui oltre 600.000 sono esposte a fumo passivo. Si stima che, se non verranno messe in atto azioni di contrasto, il tabacco sarà responsabile della morte di 8 milioni di persone entro il 2030, di cui oltre l'80% di paesi a basso e medio reddito<sup>(29)</sup>.

Ogni anno in Italia muoiono circa 85.000 persone per cause attribuibili al fumo di tabacco. I dati dell'indagine Doxa, commissionata dall'Osservatorio Fumo, Alcol e Droga (OssFAD) dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) indicano che nel 2011 i fumatori in Italia sono stati il 20,8% della popolazione di più di 15 anni, per un totale di 10,8 milioni di fumatori. A fumare sono circa 2 Italiani su 10, la prevalenza più bassa registrata dal 1957 ad oggi, segno di graduale successo delle politiche antifumo adottate<sup>(14)</sup>.

Secondo i dati Doxa tra i principali motivi per i quali i giovani fra i 15 e 24 anni dichiarano di aver iniziato a fumare, si trova l'influenza di amici fumatori, e a seguire l'idea del piacere collegato al fumare e per sentirsi più grande, collegato al senso di emancipazione. I motivi di salute e la maggiore consapevolezza dei danni provocati sono le principali motivazioni che hanno determinato la decisione dei fumatori che hanno smesso. Tuttavia "l'abitudine" al fumo è molto radicata e oltre l'80% dei fumatori ha una scarsissima consapevolezza del rischio al quale si espone fumando tanto da ritenere di essere in buona salute. Inoltre, nonostante i fumatori dichiarino diversi tentativi di smettere, e il 78% pensa di effettuare un tentativo nei successivi sei mesi, è ancora molto basso l'accesso ai circa 400 Centri Antifumo del Servizio Sanitario Nazionale e di Organizzazioni ONLUS impegnati a fornire un aiuto specialistico a quanti vogliono smettere di fumare. Il 90% dei fumatori ha tentato di smettere nell'ultimo anno senza alcun tipo di supporto e senza ottenere alcun successo. Sono altresì ancora pochi i medici, soprattutto Medici di Medicina Generale, che forniscono consigli per smettere e di conseguenza solo pochissimi fumatori (il 4% nel 2011) chiede l'aiuto del medico di famiglia per smettere di fumare<sup>(14)</sup>.

A differenza di altri determinanti di salute, il fumo di tabacco è un fattore di rischio teoricamente eliminabile e per il quale è documentata l'efficacia della sospensione del comportamento dannoso per la riduzione dei rischi correlati.

La prevenzione e la promozione della cessazione dal fumo sono i principali strumenti di contrasto dell'epidemia del tabacco.

Negli ultimi anni notevole impulso è stato dato a livello internazionale attraverso la Convenzione Quadro sul Controllo del Tabacco<sup>(20,28,29)</sup> e, parallelamente, grande attenzione è stata data da tutti gli stati aderenti e firmatari al contrasto dei tentativi dell'industria del tabacco di indebolire la forza di questo trattato internazionale.

Tra le iniziative, il contrasto della pubblicizzazione diretta e indiretta dei prodotti del tabacco è tornato di grande attualità, soprattutto in quanto i nuovi media possono aggirare i divieti di pubblicità. Basti pensare che nel 2010 sono stati presi in esame su YouTube 163 video legati a marche di industrie di tabacco<sup>(14)</sup>.

In questa prospettiva, al fine di facilitare la divulgazione dell'informazione scientifica, l'ISS, attraverso l'OssFAD, progetta, realizza e diffonde materiali di informazione/formazione sul fumo. Tra questi molta importanza hanno assunto negli anni la disseminazione delle evidenze disponibili sui metodi per smettere di fumare<sup>(1,3,32)</sup>, la diffusione delle informazioni sui servizi territoriali per la cessazione dal fumo di tabacco<sup>(6)</sup>, la disponibilità di sostegno

ai fumatori per smettere di fumare e ai loro familiari attraverso il counselling telefonico del Telefono Verde contro il Fumo e la diffusione di informazioni e di materiali di sensibilizzazione anche attraverso il sito internet dell'OssFAD ([www.iss.it/ofad](http://www.iss.it/ofad)).

## **STILI DI VITA: I CONSUMI DI ALCOL**

L'alcol è uno dei più importanti fattori di rischio per la salute dell'uomo e, insieme al fumo, rappresenta una delle principali cause di mortalità e morbilità in Europa e nel mondo.

Il consumo di alcol e il bere eccessivo nella popolazione sono associati ad un sostanziale aumento della mortalità generale e del rischio diretto ed indiretto di numerose malattie (cirrosi epatica, alcolismo, psicosi alcolica, intossicazione etilica, gastrite alcolica, cardiomiopatia e polineuropatia alcolica, stroke emorragico, sindrome fetto-alcolica ecc.) e della morbilità alcol-correlata, di incidenti, principalmente quelli stradali, di violenza intenzionale sia verso se stessi che verso gli altri, suicidi, violenza familiare, crimini violenti, comportamenti criminali e danni prodotti alle persone in quanto vittime, inclusi il furto e lo stupro<sup>(23)</sup>.

A differenza del fumo, i cui effetti negativi per la salute possono presentarsi dopo molti anni di consumo di tabacco, l'alcol può esporre a forti rischi anche come conseguenza di un singolo o occasionale episodio di consumo, spesso erroneamente valutato come moderato.

Poichè non è possibile parlare di quantità di consumo alcolico raccomandabili o "sicure" per la salute, ai fini della tutela della salute è più adeguato parlare di quantità "a basso rischio", evidenziando che il livello di rischio aumenta progressivamente con l'incremento delle quantità di bevande alcoliche consumate<sup>(8)</sup>.

Secondo le raccomandazioni dell'OMS è da considerare a basso rischio una quantità di alcol giornaliera da assumersi durante i pasti principali (non fuori pasto) che non deve superare i 20-40 grammi per gli uomini e i 10-20 grammi per le donne. Queste quantità devono essere ulteriormente ridotte negli anziani e nei giovani. La "regola" dell'Organizzazione Mondiale della Sanità "meno è meglio", ben interpreta questo concetto.

In Italia, il consumo a rischio di alcol interessa oltre 8 milioni di persone e sono più di 4 milioni quelli che rientrano nella categoria dei binge drinker<sup>(12)</sup>.

I più recenti dati rilevati sui consumi alcolici e i modelli di consumo del nostro Paese consolidano la percezione di un avvenuto passaggio dal tradizionale modello mediterraneo, con consumi quotidiani e moderati,

incentrati prevalentemente sul vino, a un modello più articolato, che risente sempre più dell'influsso culturale dei Paesi del Nord Europa, pur restando ancora legato, soprattutto fra i soggetti più anziani, alle tradizionali bevande alcoliche e abitudini di consumo.

Il decennio 2000-2010 ha visto in particolare la crescita fra i giovani e i giovani adulti dell'abitudine al consumo, oltre che di vino e birra, anche di superalcolici, aperitivi e amari, che implicano spesso consumi lontano dai pasti e con frequenza occasionale. L'aumento dei consumi fuori pasto è stato rilevante nel decennio e si è particolarmente radicato tra i più giovani e i giovanissimi.

Anche il binge drinking, modalità di bere di importazione nordeuropea che implica il consumo di numerose unità alcoliche in un breve arco di tempo, si è ormai diffuso stabilmente a partire dal 2003, registrando un costante aumento in entrambi i sessi, e nel 2010 ha riguardato il 13,4% degli uomini e il 3,5% delle donne<sup>(12)</sup>.

Queste nuove abitudini di consumo sono fenomeni indubbiamente preoccupanti, in quanto comportano l'esposizione della popolazione a nuovi rischi alcolcorrelati, legati ad una assunzione di alcol episodica, lontana dai pasti, spesso in quantità eccessive, che si aggiungono a quelli legati al consumo tradizionale, quotidiano e protratto nel tempo, ancora persistente nel nostro Paese e che può essere dannoso quando non si accompagna alla necessaria, rigorosa moderazione.

I nuovi rischi derivanti dalle nuove modalità di bere mettono a repentaglio più facilmente, oltre alla salute del singolo bevitore, anche la sicurezza sociale, quando il consumo di alcol avviene in contesti e situazioni particolari quali la guida o lo svolgimento di attività lavorative. La mortalità per incidente stradale, altro importante indicatore di danno indirettamente causato dall'alcol, continua ad essere un grave problema nel nostro Paese, soprattutto per i più giovani ed in particolare nella classe di età 20-24 anni.

I giovani, più vulnerabili rispetto agli effetti fisici e psichici dell'alcol a causa di una ridotta capacità del loro organismo a metabolizzare l'alcol, insieme alle donne e agli anziani sono considerati particolarmente a rischio.

Una adeguata conoscenza delle modalità con cui si consumano le bevande alcoliche è determinante per mantenere un buono stato di salute. Questo è importante poichè in molte circostanze anche quantità di alcol comunemente considerate minime espongono a rischi di problemi o malattie.

Ci sono situazioni in cui è raccomandata l'astensione completa dal consumo di bevande alcoliche: se si ha meno di 16 anni di età; se è stata programmata una gravidanza; se si è in gravidanza o si sta allattando; se si assumono farmaci; se

si soffre di una patologia acuta o cronica; se si è alcolisti; se si hanno o si sono avuti altri tipi di dipendenza; se si è a digiuno o lontano dai pasti; se ci si deve recare al lavoro o durante l'attività lavorativa; se si deve guidare un veicolo o usare un macchinario.

In questo quadro le politiche e le azioni di salute pubblica mirate a ridurre i danni causati dall'alcol sono quindi considerate di massima priorità. Gli Stati Membri della Regione Europea dell'OMS hanno approvato la "Risoluzione del Piano Europeo per ridurre il consumo dannoso di alcol 2012-2020"<sup>(30)</sup> in cui, tenendo conto sia delle strategie specifiche dell'OMS che dei Piani d'Azione Europei sull'Alcol precedentemente stilati, si sottolinea l'importanza del Piano d'Azione per ridurre il consumo dannoso di alcol nel periodo 2012-2020.

## **STILI DI VITA: L'ALIMENTAZIONE**

La nutrizione è uno dei maggiori determinanti di salute ed è fortemente correlata all'insorgenza di tumori, malattie cardiovascolari, diabete di tipo 2, ictus, ipertensione e osteoartriti.

Obesità e sovrappeso, prima considerati problemi solo dei Paesi ricchi, sono ora in crescita anche nei Paesi a basso e medio reddito, specialmente negli insediamenti urbani, e sono ormai riconosciuti come veri e propri problemi di salute pubblica<sup>(11,22,26)</sup>. La condizione di eccesso ponderale è infatti il quinto fattore di rischio per i decessi a livello mondiale, causando ogni anno la morte di circa 2,8 milioni di adulti. Secondo i dati forniti dall'OMS, 1,5 miliardi di adulti nel mondo, di età maggiore di 20 anni, è in sovrappeso. Di questi, 200 milioni di uomini e circa 300 milioni di donne sono obesi. Anche in molti Paesi della Regione europea dell'OMS la prevalenza di obesità si è triplicata dagli anni Ottanta e continua a crescere, in particolare tra i bambini. L'obesità infantile suscita preoccupazione, avendo raggiunto livelli allarmanti: nel 2010, circa 43 milioni di bambini sotto i 5 anni di età sono stimati in sovrappeso e di questi circa 35 milioni vivono in Paesi in via di sviluppo<sup>(4,17)</sup>. La gravità della diffusione dell'obesità infantile sta anche nel fatto che i bambini obesi rischiano di diventare adulti obesi.

Abitudini alimentari scorrette, sedentarietà, sovrappeso e obesità contribuiscono a grande parte del peso di malattie croniche che affliggono la popolazione europea, essendo responsabili dell'86% dei decessi e del 77% del carico di malattia nella Regione.

In Italia, i dati confermano livelli preoccupanti di cattive abitudini alimentari, stili di vita sedentari ed eccesso ponderale: nel 2010 un bambino su tre è risultato in sovrappeso o in condizioni di obesità<sup>(17)</sup>.

Tra gli adulti il 32% risulta in sovrappeso, mentre l'11% risulta obeso: complessivamente, quindi, più di quattro adulti su dieci (42%) è in eccesso ponderale<sup>(16)</sup>.

Le linee guida dell'INRAN<sup>(8)</sup> evidenziano molteplici aspetti per una sana alimentazione italiana, considerando anche l'importanza del giusto apporto idrico dell'organismo e l'alimentazione di gruppi particolari della popolazione, rappresentati da bambini, adolescenti, nutrici, donne in gravidanza, donne in menopausa e anziani.

Il Progetto "Giovani In-Forma" coordinato dall'ISS, per arginare il crescente problema dell'obesità, ha richiamato l'attenzione sul controllo periodico del peso corporeo e ha proposto il metodo delle "Mezze porzioni" per aiutare a mangiare nella giusta quantità. Questo progetto è stato orientato alla divulgazione delle evidenze che mangiando più del necessario si danneggia lo stato di salute, favorendo l'obesità e le malattie correlate.

## **LA PROMOZIONE DEGLI STILI DI VITA A TUTELA DELLA SALUTE**

La tutela della salute può essere perseguita con interventi sui determinanti di salute e, tra questi, particolare importanza rivestono gli interventi sugli stili di vita, collegati a comportamenti modificabili.

A livello internazionale ed europeo sono molteplici i documenti che individuano i principi d'azione per intervenire sugli stili di vita connessi alle malattie croniche non trasmissibili e sono sempre più diffuse strategie che propongono un approccio globale e integrato per affrontarle in modo complessivo.

In questo ambito sono ormai consolidati gli approcci di promozione della salute che promuovono il processo che consente alle persone di esercitare un maggiore controllo sulla propria salute e di migliorarla. Alle persone viene chiesta una partecipazione attiva ai processi che promuovono la salute sia sul piano individuale che sociale. La salute in quest'ottica è il risultato del contributo della società e dei singoli individui, una risorsa di vita quotidiana che va difesa e ricercata con l'impegno quotidiano del singolo e degli amministratori<sup>(25)</sup>.

In questa linea l'OssFAD da anni è impegnato in progetti di promozione della salute con particolare attenzione agli stili di vita, che hanno come principali destinatari i giovani e giovanissimi. La diffusione dei documenti, dei progetti e delle iniziative viene veicolata attraverso vari canali tra cui il sito istituzionale dell'OssFAD ([www.iss.it](http://www.iss.it)). Tra le iniziative dell'OssFAD molto interesse hanno suscitato il Progetto "Gli stili di vita per la prevenzione

delle tossicodipendenze”, il progetto “Giovani In-Forma”, “Palestra sicura”, “Naso Rosso” nei quali sono stati organizzati materiali didattici e informativi per affrontare diverse tematiche collegate agli stili di vita: fumo, alcol, droga, corretta alimentazione, sport e attività motoria.

In ultima analisi i consumi a rischio di alcol, il fumo di tabacco, l’inattività fisica e l’alimentazione scorretta, rappresentano i determinanti di salute individuati dal comportamento personale e dallo stile di vita che possono essere modificati nel senso della promozione della salute individuale e collettiva.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Amato L, Mitrova Z, Davoli M, Zuccaro P, Pichini S, Solimini R, Pacifici R: *Sintesi delle revisioni sistematiche Cochrane sulla efficacia degli interventi di cessazione e prevenzione del fumo di tabacco*. Dipartimento del Farmaco - Istituto Superiore di Sanità, 2011, Roma.
2. Belli S, Vanacore N: *Proportionate mortality of Italian soccer players: is amyotrophic lateral sclerosis an occupational disease?* Eur. J. Epidemiol. 2005; 20: 237-242.
3. Clementi F, Dragani L, Gorio R, Principe R, Pacifici R, Bacosi A, Di Carlo S, Di Giovannandrea R, Di Pucchio A, Minutillo A, Pichini S, Pizzi E, Zuccaro P: *Manuale di sensibilizzazione e informazione sulle tematiche collegate al fumo di tabacco*. Istituto Superiore di Sanità, Azienda Ospedaliera San Camillo Forlanini, 2012, Roma.
4. Cole JT, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH: *Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: International survey*. BMJ 2000; 320:1240-1245.
5. Dahlgren G, Whitehead M: *Policies and strategies to promote social equity in health*. Institute for Futures Studies, 1991, Stockholm.
6. Di Pucchio A, Pizzi E, Bacosi A, Di Carlo S, Di Giovannandrea R, Gori P, Martucci L, Mastrobattista L, Mortali C, Palmi I, Solimini R, Pichini S, Pacifici R: *Guida ai servizi territoriali per la cessazione dal fumo di tabacco (aggiornamento 2011)*. Strumenti di Riferimento, 2012, 12/S1, Istituto Superiore di Sanità, Roma.
7. Global Advocacy Council for Physical Activity (GAPA), International Society for Physical Activity and Health: *The Toronto Charter for Physical Activity: A global Call to Action*. 20 maggio 2010 In: <http://www.globalpa.org.uk/charter/download.php> (Ultimo Accesso: 15/06/2012).

8. Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (INRAN): *Linee Guida per una Sana Alimentazione Italiana*. ed. 2003.
9. Julie A, Hobart MD, Douglas R, Smucker MD: *The Female Athlete Triad*. Am. Fam. Physician. 2000; 61: 3357-3364.
10. Kujala UM: *Essay: Does training adversely affect long-term health?* Lancet 2005; 366: S55-S56.
11. Ministero della Salute: *Appropriatezza clinica, strutturale, tecnologica e operativa per la prevenzione, diagnosi e terapia dell'obesità e del diabete mellito*. Quaderni del Ministero della Salute 2011; 10, Roma.
12. Ministero della Salute: *Relazione del Ministro della Salute al Parlamento sugli interventi realizzati ai sensi della legge 30.3.2001 N. 125 "Legge Quadro in Materia di Alcol e problemi Alcolcorrelati"*. 2011, Roma.
13. Pacifici R, Bacosi A, Di Carlo S, Di Giovannandrea R, Minutillo A, Solimini R, Toth G, Palmi I: *Reporting System. Doping Antidoping 2011*. Commissione per la vigilanza ed il controllo sul doping e per la tutela della salute nelle attività sportive (CVD) - Ministero della Salute, 2012, Roma.
14. Pacifici R: *Rapporto sul fumo in Italia 2011*. Istituto Superiore di Sanità, 2012, Roma In: <http://www.iss.it/fumo/rann/cont.php?id=283&lang=1&tipo=3> (Ultimo Accesso: 15/06/2012).
15. Pacifici R: *Relazione al XII Congresso Nazionale FADOI*. 4-7 maggio 2008, Firenze.
16. *Rapporto nazionale Passi 2010: sovrappeso e obesità*. In: <http://www.epicentro.iss.it/passi/R2010SovrappesoObesita.asp> (Ultimo Accesso: 15/06/2012).
17. Spinelli A, Lamberti A, Nardone P, Andreozzi S, Galeone D: *Sistema di sorveglianza OKkio alla SALUTE: risultati 2010*. Rapporti ISTISAN, 2012; 12/14, Istituto Superiore di Sanità, Roma.
18. WHO: *Physical inactivity: a global public health problem. Reason for physical inactivity*. 2012. In: [http://www.who.int/dietphysicalactivity/factsheet\\_inactivity/en/index.html](http://www.who.int/dietphysicalactivity/factsheet_inactivity/en/index.html).
19. WHO: *2008-2013 Action Plan for the Global Strategy for the Prevention and Control of Noncommunicable Diseases*. 2008, Switzerland.
20. WHO: *2010 global progress report on the implementation of the WHO Framework Convention on Tobacco Control*. 2010, Switzerland.
21. WHO: *Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks*. 2009, Switzerland.
22. WHO: *Global Recommendations on Physical Activity for Health*. 2010, Switzerland.
23. WHO: *Global status report on alcohol and health, 2011*. 2011, Switzerland.
24. WHO: *Health Promotion Glossary*. 1998, Switzerland.
25. WHO: *Milestones in Health Promotion. Statements from Global Conferences*. 2009, Switzerland.
26. WHO: *Obesity and overweight*. 2012. In: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html> (Ultimo Accesso: 15/06/2012).
27. WHO: *Ottawa Charter for Health Promotion*. 1986, Switzerland.

28. WHO: *WHO Framework Convention on Tobacco Control 2003*. 2003, Switzerland.
29. WHO: *WHO Report on the Global Tobacco Epidemic 2011. Warning about the dangers of tobacco*. 2011, Switzerland.
30. WHO-Europe: *Risoluzione del Piano Europeo per ridurre il consumo dannoso di alcol 2012-2020*. 2011. In: <http://www.iss.it/alco/docu/cont.php?id=75&lang=1&tipo=16> (Ultimo Accesso: 15/06/2012).
31. WHO-Europe: *Step to health. An European framework to promote physical activity*. 2007, Denmark.
32. Zuccaro P, Amato L, Caraffa G, Corti FM, Davoli M, Enea D, Fogliani V, Galeone D, Malvezzi E, Minozzi S, Nardini S, Pacifici R, Vanuzzo D, Carosi G, Di Pucchio A, Martucci L, Mastrobattista L, Mattioli D, Mazzola M, Modigliani G, Mortali C, Pizzi E, Rossi S, Scaravelli G, Solimini R: *Linee guida cliniche per promuovere la cessazione dell'abitudine al fumo. Aggiornamento 2008*. Ministero della Salute - Istituto Superiore di Sanità 2008, Roma.
33. Zuccaro P, Rossi S, Mazzola M, Mortali C, Pacifici R, Ferrara SD, Snenghi R, Terranova C, Cavarzeran F, Favretto D, Caprino L, Licata S: *Reporting System. Doping Antidoping 2003-2004*. Commissione per la vigilanza ed il controllo sul doping e per la tutela della salute nelle attività sportive (CVD) - Ministero della Salute, 2006, Roma.

**I LINFOMI AGGRESSIVI A CELLULE B:  
PROGRESSI TERAPEUTICI DALLA CHEMIOTERAPIA  
ALLA “TARGET THERAPY”**

*Annalisa Chiappella, Chiara Ciochetto, Umberto Vitolo*

Ematologia 2 - Dipartimento di Oncologia  
Azienda Ospedaliera Universitaria San Giovanni Battista - Torino

Key words: *Non-Hodgkin Lymphoma / Linfomi non Hodgkin  
Diffuse Large B-cell Lymphoma / Linfoma a grandi cellule B  
Target therapy / Target therapy  
Monoclonal antibodies / Anticorpi monoclonali  
Chemoimmunotherapy / Chemoimmunoterapia*

**Abstract:**

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) are the most common histotype of non-Hodgkin lymphoma (30%). DLBCL have an aggressive outcome. At diagnosis, the identification of prognostic factors represents an important role for therapeutic decision; the use of International Prognostic Index (IPI) and the use of 18F-FDG-positron emission tomography (18F-FDG-PET) for evaluation of response, was well established. The heterogeneity of biological features of DLBCL is related to different outcome; DNA tissue microarray analysis identifies two groups of DLBCL, Germinal Center B Cell (GCB) and Activated B Cell (ABC), with different prognosis. The golden standard in first line treatment of DLBCL is the addition of immunotherapy to chemotherapy, according to R-CHOP scheme (rituximab, cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisone). With R-CHOP, 30-40% of patients have a relapse or are refractory to first line therapy. In order to obtain a better outcome, dose-dense therapy and high-dose therapy plus autologous stem cell transplantation (ASCT) are tested, with promising results. Relapsed or refractory patients after chemoimmunotherapy have dismal prognosis. The role of prognostic index at relapse is important to better define the salvage treatment. Young patients relapsed after R-CHOP are treated with high-dose chemotherapy plus ASCT. Patients not eligible to high-dose chemotherapy or relapsed after autologous or allogeneic transplant, may be treated with novel drugs in clinical trials. Novel drugs are: immunomodulatory drugs (IMiDs), mTOR inhibitors, histone deacetylase inhibitors, NF- $\kappa$ B inhibitors or Bruton-Kinase inhibitors. Clinical trials with novel drugs in association with first line chemotherapy or salvage therapy are ongoing.

**Riassunto:**

I linfomi a grandi cellule B (DLBCL) rappresentano il 30% dei linfomi non Hodgkin e hanno un comportamento aggressivo all'insorgenza. Alla diagnosi riveste un ruolo fondamentale, per adattare la miglior strategia terapeutica alla malattia, identificare fattori prognostici clinici quali l'International Prognostic Index (IPI) e l'utilizzo di strumenti quali la tomografia ad emissione di positroni (18F-FDG PET) per la valutazione della risposta. Limite dei fattori prognostici è legato al fatto che essi non tengono conto dell'estrema variabilità biologica dei DLBCL; l'analisi tramite DNA tissue microarray, ha permesso di identificare due categorie maggiori di DLBCL, Germinal Center B Cell (GCB) e Activated B Cell (ABC), a diversa prognosi. La terapia standard di prima linea consiste in una chemioimmunoterapia secondo lo schema R-CHOP (rituximab, ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina, prednisone). Tuttavia, ancora il 30-40% dei pazienti recidiva o è refrattario alla terapia di prima linea. Per migliorare l'outcome di questi pazienti sono quindi state sperimentate la terapia dose-dense o la chemioterapia ad alte dosi con reinfusione di cellule staminali autologhe (ASCT), con risultati promettenti. La prognosi dei pazienti in recidiva o con malattia refrattaria dopo la prima linea contenente R-CHOP è infausta. È pertanto importante fare una valutazione prognostica anche dei fattori di rischio alla recidiva al fine di scegliere la terapia di salvataggio più idonea. Per i pazienti giovani è indicata una chemioterapia di salvataggio seguita da chemioterapia ad alte dosi con ASCT. Per i pazienti non eleggibili alla chemioterapia ad alte dosi o in recidiva dopo schemi di terapia intensificata con trapianto autologo o allogenico, sono stati sperimentati nuovi farmaci biologici, con risultati promettenti; tra questi, i farmaci immunomodulatori (IMiDs), gli inibitori di mTOR, gli inibitori dell'istone deacetilasi, gli inibitori del proteasoma NF-K $\beta$  e gli inibitori della bruton-chinasi. Tali farmaci sono in sperimentazione anche in associazione alla chemioimmunoterapia standard nel trattamento di prima o seconda linea.

## INTRODUZIONE

I linfomi non Hodgkin sono un gruppo eterogeneo di malattie del sistema emolinfopoietico; ad oggi rappresentano la quinta neoplasia con un'incidenza stimata di 280.000 nuovi casi, in continuo aumento (Figura 1).

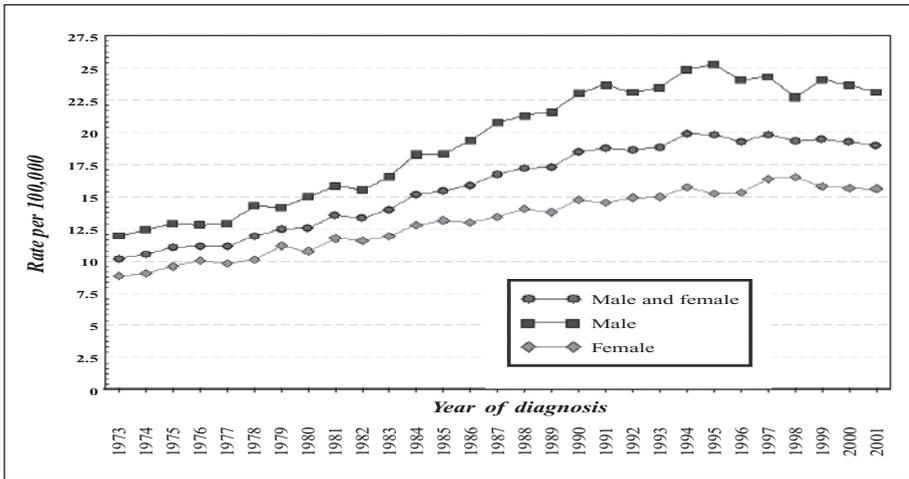


Figura 1. Incidenza del Linfoma non Hodgkin. SEER Surveillance Report.

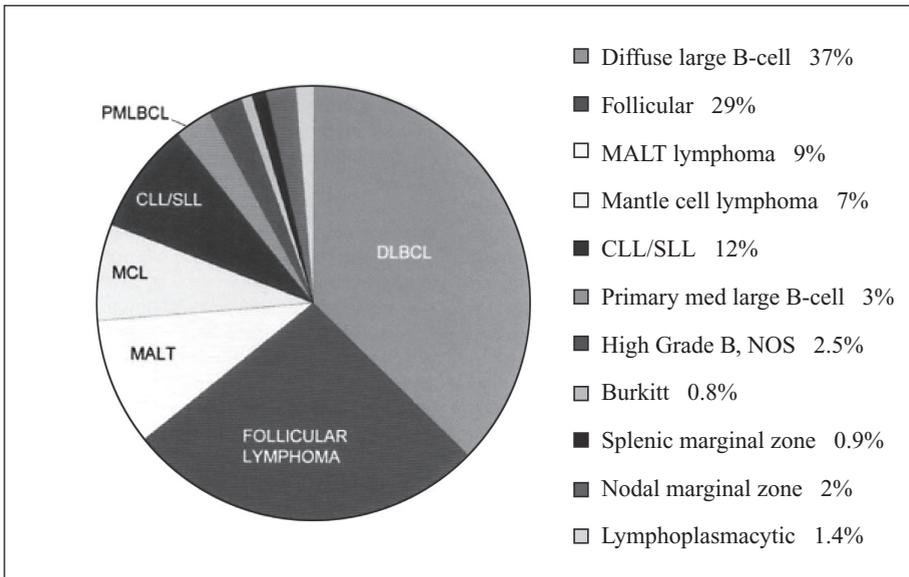


Figura 2. Distribuzione dei Linfomi non Hodgkin a cellule B per istologia.

L'istologia più frequente è rappresentata dal linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) che rappresenta fino al 30% di tutti i linfomi non Hodgkin dell'adulto (Figura 2) con un'età media di insorgenza di 55-60 anni<sup>(15,29)</sup>.

Il DLBCL alla diagnosi può presentarsi con localizzazioni nodali e nel 40% dei casi con localizzazioni extranodali; tra queste, le più frequenti sono a livello del tratto gastrointestinale e osseo, più raramente a carico di testicolo, anello di Waldeyer, ghiandole salivari, tiroide, fegato, reni, ghiandole surrenali e sistema nervoso centrale.

Dal punto di vista clinico i DLBCL si caratterizzano alla diagnosi per la presenza di una massa tumorale a rapida crescita, con un coinvolgimento midollare in circa 11-27% dei casi di DLBCL di nuova diagnosi, identificabile mediante biopsia osseo-midollare e nel 50% dei casi con malattia in stadio avanzato (II-IV secondo la stadiazione di Ann Arbor). I sintomi sistemici B quali profusa sudorazione notturna, febbre serotina e calo ponderale > 10% negli ultimi mesi possono essere osservati alla diagnosi.

L'approccio al paziente affetto da linfoma è multidisciplinare; l'esame clinico obiettivo, la biopsia chirurgica linfonodale, la stadiazione radiologica e la diagnosi istologica portano infine alla decisione clinica terapeutica.

## FATTORI PROGNOSTICI

Alla diagnosi è necessario identificare fattori clinici, radiologici e molecolari che consentono una stratificazione prognostica dei pazienti.

L'International Prognostic Index (IPI) basato su cinque fattori prognostici negativi (età > 60 anni, stadio III-IV, LDH elevato, PS > 1, > di una sede extralinfonodale) permette di identificare quattro differenti gruppi di rischio con un 5-year OS compresa fra il 26% per i pazienti a peggior prognosi e il 73% per i pazienti con malattia più favorevole<sup>(28)</sup>. Tale score prognostico mantiene la sua validità anche nei pazienti trattati con rituximab<sup>(37)</sup>.

La tomografia ad emissione di positroni (18F-FDG PET) si è dimostrata essere un ottimo strumento nella valutazione della risposta nei DLBCL in considerazione dell'avidità delle cellule linfomatose per il glucosio. La valutazione finale della risposta in PET è altamente predittiva della PFS e OS nei linfomi aggressivi con o senza massa residua in TAC. Sulla base dell'International Workshop Criteria (IWC) e dell'International Harmonization Project per la PET, da uno studio retrospettivo condotto su 54 pazienti affetti da linfoma non Hodgkin sono emerse le raccomandazioni per i criteri di risposta per i linfomi aggressivi; la PET negativa diventa quindi indispensabile per definire la remissione completa<sup>(6)</sup>. Il valore della valutazione intermedia



I casi con MIB1 > 80-90% devono essere rivisti da un patologo con esperienza nella diagnosi delle sindromi linfoproliferative e richiedono analisi immunohistochimiche, citogenetiche (FISH) e di biologia molecolare per identificare la traslocazione c-myc e discriminare così fra DLBCL, linfoma di Burkitt e forme intermedie di recente introduzione nella classificazione WHO (unclassified aggressive lymphoma, double-hit lymphoma). Tale distinzione è fondamentale per guidare la scelta terapeutica in quanto, pur non essendo ancora stata identificata la miglior terapia per questo sottogruppo di pazienti, la loro prognosi è infausta se trattati con chemioimmunoterapia standard secondo schema R-CHOP.

L'analisi tramite DNA tissue microarray ha permesso di identificare due categorie maggiori sulla base di patterns di espressione genica di diversi stadi di differenziazione delle cellule B: un profilo caratteristico delle cellule B del centro germinativo (Germinal Center B Cell) e un profilo simile a quello delle cellule B periferiche attivate (Activated B Cell)<sup>(1)</sup> (Figura 3).

Il gruppo di Hans<sup>(18)</sup> ha studiato 152 casi di DLBCL de novo con la metodica dei tissue microarray; sono stati testati gli anticorpi diretti contro CD20, CD10, Bcl-6, MUM1, Bcl-2, Ciclina D2, FOXP1 che da precedenti studi in cDNA microarray avevano dimostrato di riconoscere molecole la cui espressione di mRNA era fortemente associata con i gruppi GCB o non-GCB. I risultati delle colorazioni con immunoperossidasi per CD10, Bcl-6 e MUM1 sono stati usati per sottoclassificare i casi in GCB e non-GCB (Figura 4).

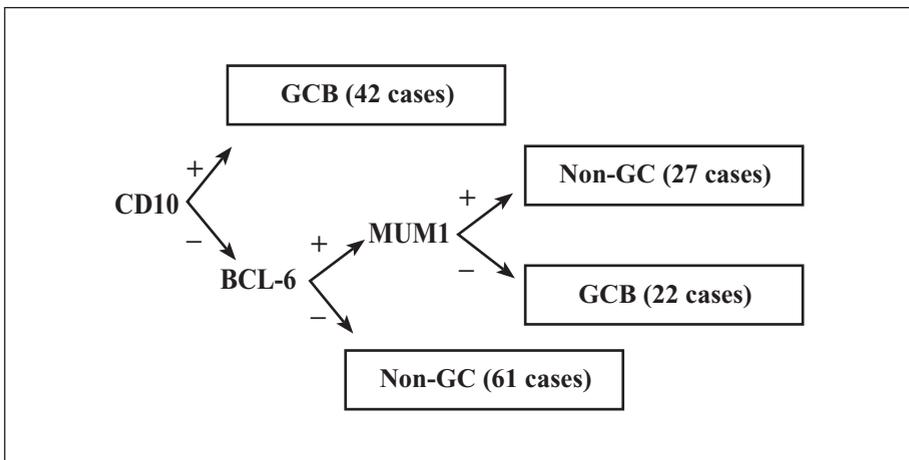


Figura 4. Albero decisionale di Hans per la classificazione dei DLBCL sulla base dell'immunoperossidasi/Tissue Microarray.

Nonostante il gruppo di linfomi ABC abbia prognosi più sfavorevole, la rilevanza clinica della distinzione GCB e ABC non è del tutto chiara. Data la presenza di un'attivazione costitutiva di NFκB nei linfomi ABC Dunleavy ha condotto uno studio per testare l'associazione del Bortezomib, inibitore di NFκB, alla chemioterapia di prima linea (DA-EPOCH) dimostrando un possibile vantaggio di tale regime nel gruppo ABC rispetto al gruppo GCB<sup>(12)</sup>.

Oltre alla biologia della cellula tumorale rivestono un ruolo determinante anche le caratteristiche genetiche dell'ospite che sono alla base degli studi di farmacogenetica; tali studi hanno documentato che i polimorfismi dell'ospite, host's single nucleotide polymorphisms (SNPs), sono coinvolti nel metabolismo e nella detossificazione dei farmaci e sono responsabili, almeno in parte, della variabilità interindividuale dello stesso trattamento in termini di efficacia e tossicità<sup>(25,26)</sup>.

## **TRATTAMENTO DEI DLBCL IN PRIMA LINEA**

Lo schema CHOP (Ciclofosfamide, Doxorubicina, Vincristin, Prednisone) ha rappresentato per molti decenni il cardine della terapia dei linfomi; l'introduzione dell'anticorpo monoclonale anti CD20 Rituximab in associazione alla chemioterapia standard ha permesso di migliorare l'outcome dei pazienti affetti da DLBCL. Lo studio randomizzato condotto dal Group d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) ha dimostrato, per pazienti anziani affetti da DLBCL alla diagnosi, un vantaggio significativo di R-CHOP21 rispetto a CHOP21 con un tasso di remissione completa (RC) del 75% vs 63%<sup>(7)</sup>. Con un follow up di 10 anni l'Overall Survival (OS) è 43,5% vs 27,6% e la Progression Free Survival (PFS) del 36,5% vs 20,1% per R-CHOP21 e CHOP21 rispettivamente<sup>(8)</sup>.

Lo studio RICOVER60, nel tentativo di migliorare l'outcome dei pazienti affetti da DLBCL e grazie all'introduzione di fattori di crescita granulocitari, ha studiato in pazienti anziani l'utilizzo di un regime di chemioterapia dose-dense RCHOP14 (ogni due settimane) che si è dimostrato superiore rispetto a CHOP14 da solo<sup>(21)</sup>.

Nel tentativo di migliorare ulteriormente la prognosi sono stati impiegati regimi di chemioterapia ad alte dosi con reinfusione di cellule staminali autologhe periferiche ma con risultati contrastanti in epoca pre-rituximab<sup>(14)</sup>. Nonostante i vari schemi utilizzati circa il 40% dei pazienti recidiva o è refrattario alla terapia di prima linea. Risulta quindi di fondamentale importanza una precisa stratificazione prognostica alla diagnosi in modo da identificare i pazienti ad alto rischio per poter attuare strategie terapeutiche mirate.

Rispetto all'era pre rituximab l'introduzione dell'immunoterapia con l'anticorpo anti CD20 in associazione a CHOP14 o CHOP21 ha consentito un significativo miglioramento della prognosi dei pazienti affetti da DLBCL. Nonostante ciò i pazienti a prognosi sfavorevole hanno una possibilità di cura solo nel 45-55% dei casi; in tale gruppo di pazienti vanno quindi presi in considerazione approcci terapeutici sperimentali nell'ambito di studi clinici per incrementare le possibilità terapeutiche (Figura 5).

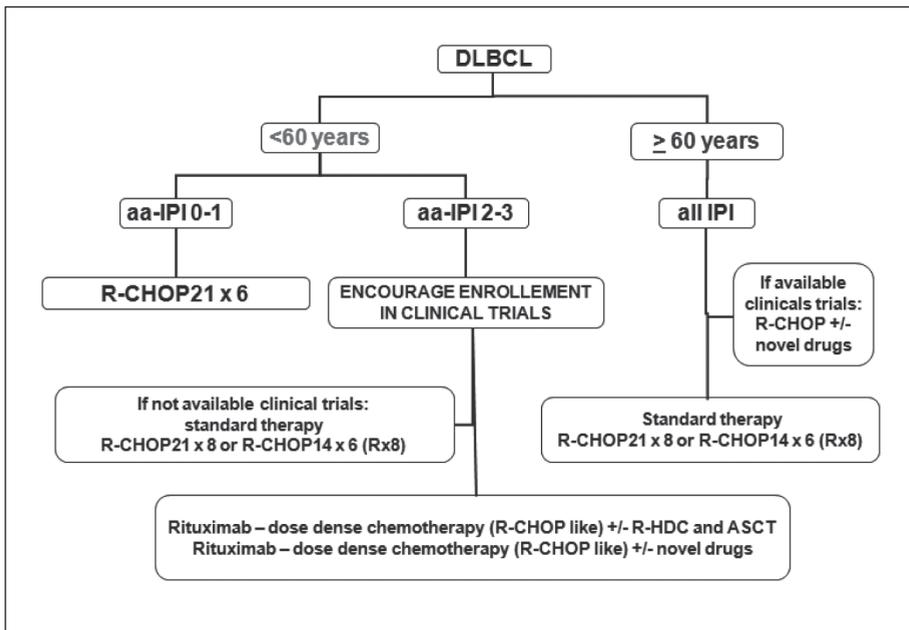


Figura 5. Algoritmo di terapia per DLBCL: Prima Linea.

## PAZIENTI GIOVANI

La scelta terapeutica nei pazienti giovani deve essere guidata dalla valutazione del rischio sulla base dell'IPI; nei pazienti a basso rischio (IPI 0-1), in accordo con i dati dello studio MinT, lo standard terapeutico è rappresentato da chemioimmunoterapia secondo R-CHOP per 6 cicli con consolidamento radioterapico sulle masse bulky e sulle localizzazioni extranodali<sup>(22)</sup>.

Per i pazienti ad alto rischio numerosi studi di fase II hanno dimostrato che l'associazione del Rituximab ad una chemioterapia dose dense secondo schema R-CHOP è fattibile ed efficace. Brusamolino et al.<sup>(4)</sup> hanno dimostrato

la fattibilità di R-CHOP14 con supporto di pegfilgrastim in 50 pazienti affetti da linfoma aggressivo di nuova diagnosi; la dose-intensity del trattamento è stata del 95% con bassa incidenza di neutropenie febbrili. Da questo studio è però emerso un elevato rischio di polmoniti da P. Carinii in corso di chemioimmunoterapia per cui la profilassi con cotrimoxazolo è mandatoria in questo gruppo di pazienti.

Al fine di migliorare la prognosi dei pazienti affetti da DLBCL di nuova diagnosi ad alto rischio sono stati sperimentati schemi di chemioterapia ad alte dosi con reinfusione di cellule staminali autologhe (HDC + ASCT); ad oggi tale approccio è raccomandato nei pazienti giovani eleggibili a procedura trapiantologica che non abbiano ottenuto una RC dopo terapia di prima linea o in pazienti con recidiva chemiosensibile di malattia. L'impiego di HDC + ASCT in prima linea, secondo le linee guida della Società italiana di Ematologia (SIE), è indicato solo all'interno di protocolli clinici sperimentali<sup>(2)</sup>.

Dato il rischio di recidiva a livello del sistema nervoso centrale (SNC) che si verifica circa nel 5% dei casi le linee guida SIE sottolineano la necessità di eseguire una profilassi con punture lombari medicate nei pazienti ad alto rischio di coinvolgimento SNC; caratteristiche considerate ad alto rischio sono localizzazione midollare, LDH elevato, coinvolgimento di più di due sedi extranodali, coinvolgimento di siti al di sopra della linea pterigopalatina, orbita, seni paranasali, palato duro, presenza di masse endocanalari o paravertebrali e coinvolgimento testicolare.

In epoca pre-Rituximab i risultati di studi randomizzati di confronto fra chemioterapia e HDC + ASCT erano contrastanti con tassi di sopravvivenza sovrapponibili nei due bracci di trattamento<sup>(14)</sup>.

Dal 2002 al 2005 il Gruppo Italiano Multiregionale linfomi e leucemie ha condotto uno studio di fase II (clinicaltrials.gov NCT00556127) su 94 pazienti affetti da DLBCL alla diagnosi e IPI sfavorevole per valutare l'efficacia di una chemioimmunoterapia dose dense R-MegaCEOP seguita da intensificazione con chemioterapia ad alte dosi con citarabina ad alte dosi e mitoxantrone e da consolidamento con autologo condizionato con BEAM. Da questo studio sono emersi risultati incoraggianti con RC 82%, 4 year PFS 73% e 4 year OS 80%<sup>(32)</sup>.

Numerosi studi clinici sono stati condotti in pazienti affetti da DLBCL a prognosi sfavorevole per testare l'efficacia di schemi di chemioterapia dose dense con o senza Rituximab, seguiti o meno da intensificazioni con HDC + ASCT. Tali studi suggeriscono che uno schema di chemioimmunoterapia ad alte dosi con trapianto autologo di cellule staminali è efficace in pazienti giovani affetti da DLBCL a prognosi sfavorevole. Sono quindi stati condotti

studi randomizzati di fase III per confrontare la chemioterapia ad alte dosi alla terapia standard con R-CHOP14/R-CHOP21. Da uno studio di fase III condotto dal gruppo tedesco di confronto fra dose dense R-CHOP14 vs dose escalated R-CHOEP + ASCT e da uno del gruppo francese tra R-CHOP14 e R-CEEP + HDC + ASCT emergono o una superiorità del braccio standard o una sua sostanziale equivalenza rispetto al braccio di intensificazione, verosimilmente imputabile ad un'eccessiva tossicità e alla non fattibilità dello schema intensificato<sup>(20,27)</sup>. La Fondazione italiana Linfomi ha condotto uno studio randomizzato di fase III, IIL-DLCL04; dal 2005 al 2009, 400 pazienti affetti da DLBCL alla diagnosi a prognosi sfavorevole sono stati randomizzati a ricevere Rituximab-chemioterapia dose-dense a due diversi livelli di intensificazione (R-CHOP14/R-MegaCHOP14) da sola o seguita da intensificazione con chemioterapia ad alte dosi con ASCT. I risultati preliminari evidenziano un vantaggio in termini di Progression-free survival per il gruppo di pazienti trattati con la chemioimmunoterapia dose-dense seguita da intensificazione e ASCT<sup>(33)</sup>.

## PAZIENTI ANZIANI

Circa metà dei pazienti affetti da DLBCL ha più di 60 anni al momento della diagnosi. Un trattamento adeguato è potenzialmente in grado di indurre le stesse risposte sia nei pazienti giovani sia in quelli anziani ed è quindi essenziale trattare il maggior numero possibile di pazienti anziani con una terapia convenzionale adeguata. A tale fine risulta fondamentale distinguere fra età anagrafica ed età biologica, discriminando i pazienti anziani fragili da quelli non fragili in base ai parametri del Comprehensive Geriatric Assessment (CGA) : età  $\geq$  80 anni, capacità di svolgere la attività quotidiane (ADL), l'indice di comorbidità geriatriche cumulative (CIRS-G), sindrome geriatrica (Figura 6).

Il trattamento standard per i pazienti anziani affetti da DLBCL è rappresentato da R-CHOP, in base ai risultati dello studio randomizzato CHOP vs R-CHOP di Coiffier<sup>(7)</sup>.

Il gruppo German High Grade Non Hodgkin' Lymphoma Group (DSHNHL) ha coordinato lo studio randomizzato RICOVER60 su 122 pazienti con nuova diagnosi di DLBCL; lo studio prevedeva 6 o 8 cicli CHOP 14 con o senza Rituximab e successiva radioterapia sulle localizzazioni bulky. I risultati hanno mostrato una superiorità di 6 cicli R-CHOP14 seguiti da ulteriori 2 dosi di Rituximab con miglioramento della prognosi in termini di EFS, PFS e OS rispetto a CHOP14 (3Year OS 78,1% vs 67,7%); non è invece emersa alcuna differenza nell'aggiunta di due ulteriori cicli di chemioterapia<sup>(21)</sup>.

<b>Comorbidity <math>\geq 3</math></b>	<b>Geriatric syndrome</b>	<b>CGA parameters</b>
Heart	Dementia	✓ Age $\geq 80$ years
Vascular	Delirium	✓ Activity of daily living (ADL)
Hypertension	Depression	✓ Cumulative Illness Rating Score for Geriatrics (CIRS-G)
Respiratory	Incontinence	✓ Geriatric syndrome
Diabetes	Falls	
Gastrointestinal	Osteoporosis	
Liver	Neglect and abuse	
Kidney	Failure to thrive	
Genitourinary	<b>Activity in daily living</b>	
Musculoskeletal	Bathing	<b>FIT patients</b>
Neurological	Dressing	✓ age $< 80$
Eyes-ears-nose-throat-larynx	Toileting	✓ ADL score = 6
Endocrine-metabolic	Transferring	✓ $< 3$ grade III and no grade IV CIRS-G comorbidities
	Continence	✓ No Geriatric syndrome
	Feeding	

Figura 6. Comprehensive Geriatric Assessment (CGA).

Studi randomizzati di confronto fra R-CHOP21 e R-CHOP14 sono stati condotti dal gruppo GELA<sup>(11)</sup> e dal gruppo inglese British National Cancer Research Institute (NCRI)<sup>(9)</sup> con l'obiettivo di valutare se RCHOP14 potesse diventare lo standard terapeutico in questi pazienti. Nello studio del GELA che prevedeva una randomizzazione fra 8 RCHOP21 e 6 RCHOP14 i risultati nel gruppo dose-dense sono stati inferiori all'atteso per scarsa aderenza alla terapia di supporto con fattori di crescita granulocitari; va tuttavia sottolineato che il dato di confronto proveniva dalla studio RICOVER60 in cui le caratteristiche della popolazione analizzata non erano del tutto sovrapponibili a quelle dei pazienti dello studio francese.

Lo studio inglese, randomizzato fra 6 RCHOP14 e 8 RCHOP21, pur non avendo la potenza statistica per determinare un vantaggio fra i due schemi, ha permesso di dimostrare che non ci sono differenze statisticamente significative in termini di tossicità fra i due approcci terapeutici.

In conclusione nella pratica clinica entrambi gli approcci possono essere utilizzati in prima linea per la terapia dei pazienti anziani affetti da DLBCL; la scelta dell'intervallo fra i cicli deve essere quindi basata sulle condizioni generali del paziente (comorbidità e performance status) e sulla scelta del singolo centro.

Un diverso approccio per migliorare l'outcome nei pazienti anziani non fragili affetti da DLBCL è l'introduzione in prima linea, in associazione alla chemioimmunoterapia standard, di farmaci biologici precedentemente studiati in un setting di pazienti recidivati. Fra questi rivestono un particolare interesse gli agenti immunomodulatori (IMiDs) quali la Lenalidomide<sup>(19)</sup>. La Fondazione Italiana Linfomi ha condotto uno studio pilota di fase I-II, REAL07, che prevede l'associazione di Lenalidomide assunta per via orale dal giorno 1 al giorno 14 in associazione a R-CHOP21 al fine di valutare la dose massima tollerata di lenalidomide in tale associazione, la tossicità, la fattibilità e l'efficacia di tale schema nel trattamento di prima linea di pazienti anziani affetti da DLBCL. L'analisi della fase I, disegnata sul Continual Reassessment Method, ha permesso di concludere che la massima dose tollerata di Lenalidomide in associazione con R-CHOP21 è 15 mg; i risultati preliminari della fase II sono promettenti<sup>(34)</sup>.

## TRATTAMENTO PER DLBCL IN RECIDIVA O REFRATTARI

La prognosi per i pazienti in recidiva o con malattia refrattaria dopo la prima linea è infausta con una sopravvivenza libera da malattia inferiore al 10% nei pazienti trattati in II linea con sola chemioterapia di salvataggio. Nei pazienti giovani con recidiva di malattia la terapia standard, secondo quanto dimostrato dai risultati del PARMA trial, è rappresentata da una chemioterapia di induzione seguita da HDC + ASCT; tale approccio consente di ottenere un outcome favorevole in circa il 50% dei pazienti<sup>(23)</sup> (Figura 7).

I fattori prognostici alla recidiva, predittori della risposta alla terapia di II linea, sono rappresentati dall' IPI alla recidiva, dal tempo alla recidiva dalla I linea, dove la recidiva a meno di dodici mesi (refrattarietà) correla con outcome infausto<sup>(16)</sup> e dalla chemiosensibilità alla chemioterapia di induzione

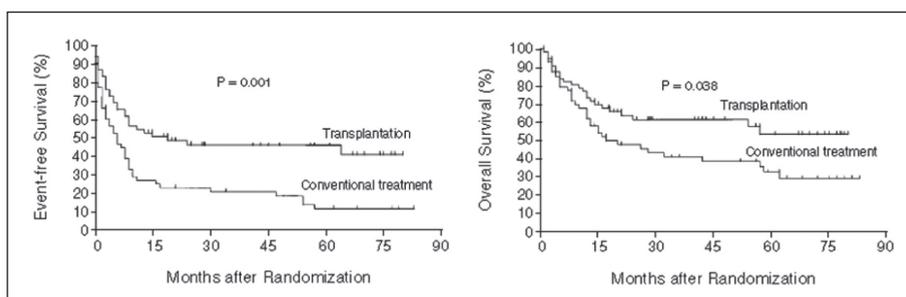


Figura 7. Event-Free Survival e Overall Survival. PARMA Trial. By Philip.

pre trapianto. Tali dati sono dimostrati dallo studio CORAL, condotto su 396 pazienti randomizzati a ricevere R-ICE o R-DHAP pre ASCT; da tale studio emerge inoltre un ruolo prognostico negativo del peggior trattamento con Rituximab<sup>(13)</sup>. Nel gruppo di pazienti a pessima prognosi alla recidiva, sono da valutare anche approcci comprendenti trapianto allogenico nei pazienti giovani con disponibilità di donatore familiare o MUD.

Obiettivo della terapia di salvataggio è indurre una remissione completa prima del consolidamento con HDC + ASCT, superando eventuali chemioresistenze e favorendo la mobilizzazione delle cellule staminali autologhe periferiche. Nel trattamento di seconda linea dei pazienti affetti da DLBCL sono stati utilizzati numerosi schemi chemioterapici ma ad ora non è ancora stato possibile identificare uno standard terapeutico; seppure i risultati dello studio CORAL non abbiano evidenziato una differenza statisticamente significativa fra R-ICE e R-DHAP, tuttavia da un'analisi combinata fra fattori clinici e biologici è emerso come nel pattern GCB vi sia un vantaggio a favore di R-DHAP mentre nel pattern ABC la prognosi rimane infausta con entrambi gli schemi<sup>(30)</sup>.

Risulta quindi necessario studiare strategie che possano migliorare la prognosi anche in questi sottogruppi più sfavorevoli e meno responsivi.

I pazienti non eleggibili a terapie ad alte dosi o i pazienti anziani con malattia refrattaria/recidiva possono essere i candidati per l'impiego di nuovi farmaci, di terapie sperimentali con farmaci biologici. Tra questi rivestono particolare interesse gli agenti immunomodulatori (IMiDs) come Lenalidomide, gli inibitori di m-TOR, quali Everolimus e Temsirolimus, gli inibitori del proteasoma NF- $\kappa$ B, come Bortezomib, gli inibitori dell'istone deacetilasi (Vorinostat e Panobinostat) e gli inibitori di bruton-kinase (Ibrutinib). Gli studi condotti su pazienti a prognosi sfavorevole con malattia refrattaria o in recidiva non candidabili a terapia ad alte dosi hanno dato risultati incoraggianti.

La Lenalidomide è stata testata in monoterapia in una serie di 73 pazienti affetti da DLBCL refrattario/in recidiva con risposta globale del 29% e tossicità contenuta<sup>(10)</sup>. In un altro studio su 49 pazienti fortemente pretrattati è stata utilizzata Lenalidomide al dosaggio di 25 mg/die per 21 giorni ogni 28 giorni; la risposta globale è stata del 35%, con un tasso di RC del 12% e una tossicità prevalentemente ematologica<sup>(35)</sup>.

L'utilizzo della target therapy in monoterapia o in associazione a schemi di chemioimmunoterapia di salvataggio è un campo in continua evoluzione, e la ricerca clinica sta ottenendo risultati promettenti da tali associazioni.

## CONCLUSIONI

R-CHOP21 e R-CHOP14 rappresentano lo standard terapeutico nel trattamento di prima linea dei pazienti affetti da DLBCL. L'identificazione di fattori prognostici permette una classificazione del rischio e l'identificazione dei pazienti a prognosi più sfavorevole per i quali attualmente è fortemente consigliato l'inserimento in protocolli clinici sperimentali. L'introduzione di nuovi farmaci alla terapia convenzionale permettono, verosimilmente, di superare la chemiorefrattarietà in pazienti a prognosi più infausta.

## BIBLIOGRAFIA

1. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM: *Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling*. Nature 2000; 403: 504-511.
2. Barosi G, Carella A, Lazzarino M, Marchetti M, Martelli M, Rambaldi A, Tarella C, Vitolo U, Zinzani PL, Tura S: *Management of nodal diffuse large B-cell lymphomas: practice guidelines from the Italian Society of Hematology, the Italian Society of Experimental Hematology and the Italian Group for Bone Marrow Transplantation*. Haematologica 2006; 91: 96-103.
3. Blay JY, Gomez F, Sebban C, Bachelot T, Biron P, Guglielmi C, Hagenbeek A, Somers R, Chauvin F, Philip T: *The International Prognostic Index correlates to survival in patients with aggressive lymphoma in relapse: analysis of the PARMA trial*. Blood 1998; 92: 3562-3568.
4. Brusamolino E, Rusconi C, Montalbetti L, Gargantini L, Uziel L, Pinotti G, Fava S, Rigacci L, Pagnucco G, Pascutto C, Morra E, Lazzarino M: *Dose-dense R-CHOP-14 supported by pegfilgrastim in patients with diffuse large B-cell lymphoma: a phase II study of feasibility and toxicity*. Haematologica 2006; 91: 496-502.
5. Cashen AF, Dehdashti F, Luo J, Homb A, Siegel BA, Bartlett NL: *18F-FDG PET/CT for early response assessment in diffuse large B-cell lymphoma: poor predictive value of international harmonization project interpretation*. J. Nucl. Med. 2011; 52: 386-392.

6. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ, Coiffier B, Fisher RI, Hagenbeek A, Zucca E, Rosen ST, Stroobants S, Lister TA, Hoppe RT, Dreyling M, Tobinai K, Vose JM, Connors JM, Federico M, Diehl V; International Harmonization Project on Lymphoma: *Revised response criteria for malignant lymphoma*. J. Clin. Oncol. 2007; 25: 579-586.
7. 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.
8. Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, Lepeu G, Plantier I, Castaigne S, Lefort S, Marit G, Macro M, Sebban C, Belhadj K, Bordessoule D, Fermé C, Tilly H: *Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing Rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients; a study by the Group d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte*. Blood 2010; 116: 2040-45.
9. Cunningham D, Smith P, Mouncey P, Qian W, Jack AS, Pocock C, Ardeschna K, Radford JA, Davies AJ, McMillan A, Linch MD: *A phase III trial comparing R-CHOP 14 and R-CHOP 21 for the treatment of patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma*. J. Clin. Oncol. 2009; 27: 435.
10. Witzig TE, Vose JM, Zinzani PL, Reeder CB, Buckstein R, Polikoff JA, Bouabdallah R, Haioun C, Tilly H, Guo P, Pietronigro D, Ervin-Haynes AL, Czuczman MS: *An international phase II trial of single-agent lenalidomide for relapsed or refractory aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma*. Ann. Oncol. 2011; 22:1622-1627.
11. Delarue R, Tilly H, Salles G, Gisselbrecht C, Mounier N, Fournier M, Molnar M, Bonmati C, Ghesquieres H, Blanc M, Germain D, Girard L, Haioun C, Bosly A: *R-CHOP14 Compared to R-CHOP21 in Elderly Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Results of the Interim Analysis of the LNH03-6B GELA Study*. Blood 2009; 114: 406.
12. Dunleavy K, Pittaluga S, Czuczman MS, Dave SS, Wright G, Grant N, Shovlin M, Jaffe ES, Janik JE, Staudt LM, Wilson WH: *Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma*. Blood 2009; 113: 6069-6076.
13. Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N, Gill D, Linch DC, Trneny M, Bosly A, Ketterer N, Shpilberg O, Hagberg H, Ma D, Brière J, Moskowitz CH, Schmitz N: *Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the Rituximab era*. J. Clin. Oncol. 2010; 28: 4184-4190.
14. Greb A, Bohlius J, Trelle S, Schiefer D, De Souza CA, Gisselbrecht C, Intragumtornchai T, Kaiser U, Kluin-Nelemans HC, Martelli M, Milpied NJ, Santini G, Verdonck LF, Vitolo U, Schwarzer G, Engert A: *High-dose chemotherapy with autologous stem cell support in first-line treatment of aggressive non-Hodgkin lymphoma - Results of a comprehensive meta-analysis*. Cancer Treat Rev 2007; 33: 338-346.
15. Greiner TC, Medeiros LJ, Jaffe ES: *Non-Hodgkin's lymphoma*. Cancer 1995; 75: 370-380.
16. Guglielmi C, Gomez F, Philip T, Hagenbeek A, Martelli M, Sebban C, Milpied N, Bron D, Cahn JY, Somers R, Sonneveld P, Gisselbrecht C, Van Der Lelie H, Chauvin F: *Time to relapse has prognostic value in patients with aggressive lymphoma enrolled into the Parma trial*. J. Clin. Oncol. 1998; 16: 3264-3269.

17. Haioun C, Itti E, Rahmouni A, Brice P, Rain JD, Belhadj K, Gaulard P, Garderet L, Lepage E, Reyes F, Meignan M: *[18-F]fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography in aggressive lymphoma: an early prognostic tool for predicting patients outcome*. Blood 2005; 106: 1376-1381.
18. 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.
19. Leonard JP, Martin P, Barrientos J, Elstrom R: *Targeted treatment and new agents in diffuse large B-cell lymphoma*. Semin Hematol 2008; 45: 11-16.
20. Le Gouill S, Milpied NJ, Lamy T, Delwail V, Gressin R, Guyotat D, Damaj GL, Foussard C, Cartron G, Maisonneuve H, Deconinck E, Dreyfus F, Gyan E, Sutton L, Morineau N, Alexis M, Perry F, Sauvezie M: *First-line rituximab (R) high-dose therapy (R-HDT) versus R-CHOP14 for young adults with diffuse large B-cell lymphoma: Preliminary results of the GOELAMS 075 prospective multicenter randomized trial*. J. Clin. Oncol. 2011; 29: 8003.
21. Pfreundschuh M, Schubert J, Ziepert M, Schmits R, Mohren M, Lengfelder E, Reiser M, Nickenig C, Clemens M, Peter N, Bokemeyer C, Eimermacher H, Ho A, Hoffmann M, Mertelsmann R, Trümper L, Balleisen L, Liersch R, Metzner B, Hartmann F, Glass B, Poeschel V, Schmitz N, Ruebe C, Feller AC, Loeffler M; German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group (DSHNHL): *Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without Rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-Cell Lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60)*. Lancet Oncol 2008; 9: 105-116.
22. Pfreundschuh M, Trumper L, Osterborg A, Pettengell R, Trneny M, Imrie K, Ma D, Gill D, Walewski J, Zinzani PL, Stahel R, Kvaloy S, Shpilberg O, Jaeger U, Hansen M, Lehtinen T, López-Guillermo A, Corrado C, Scheliga A, Milpied N, Mendila M, Rashford M, Kuhnt E, Loeffler M; MabThera International Trial Group: *CHOP-like chemotherapy plus Rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis Diffuse Large-B-Cell Lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group*. Lancet Oncol. 2006; 7: 379-391.
23. Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A, Somers R, Van Der Lelie H, Bron D, Sonneveld P, Gisselbrecht C, Cahn JY, Harousseau JL, Coiffier B, Biron P, Mandelli F, Chauvin F: *Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma*. N. Engl. J. Med. 1995; 333: 1540-1545.
24. Pregno P, Chiappella A, Bellò M, Botto B, Ferrero S, Franceschetti S, Giunta F, Ladetto M, Limerutti G, Menga M, Nicolosi M, Priolo G, Puccini B, Rigacci L, Salvi F, Vaggelli L, Passera R, Bisi G, Vitolo U: *Interim 18-FDG-PET/CT failed to predict the outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated at the diagnosis with rituximab-CHOP*. Blood 2012; 119: 2066-2073.
25. Rossi D, Rasi S, Di Rocco A, Fabbri A, Forconi F, Gloghini A, Bruscazzin A, Franceschetti S, Fangazio M, De Paoli L, Bruna R, Capello D, Chiappella A, Lobetti Bodoni C, Giachelia M, Tisi MC, Pogliani EM, Lauria F, Ladetto M, Hohaus S, Martelli M, Vitolo U, Carbone A, Foà R, Gaidano G: *The host genetic background of DNA repair mechanisms is an independent predictor of survival in diffuse large B-cell lymphoma*. Blood 2011; 117: 2405-2413.

26. Rossi D, Rasi S, Franceschetti S, Capello D, Castelli A, De Paoli L, Ramponi A, Chiappella A, Pogliani EM, Vitolo U, Kwee I, Bertoni F, Conconi A, Gaidano G: *Analysis of the host pharmacogenetic background for prediction of outcome and toxicity in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP21*. *Leukemia* 2009; 23: 1118-1126.
27. Schmitz N, Nickelsen M, Ziepert M, Haenel M, Borchmann P, Schmidt C, Viardot A, Bentz M, Peter N, Ehninger G, Doelken G, Truemper LH, Loeffler M, Pfreundschuh M, Glass B: *Conventional chemoimmunotherapy (R-CHOEP-14) or high-dose therapy (R-Mega-CHOEP) for young, high-risk patients with aggressive B-cell lymphoma: Final results of the randomized Mega-CHOEP trial of the German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group (DSHNHL)*. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29: 8002.
28. Shipp MA, Harrington DP: *A predictive model for aggressive NHL: the International non-Hodgkin's lymphoma prognostic factors project*. *N. Engl. J. Med.* 1993; 329: 987-994.
29. The non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project: *A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's Lymphoma*. *Blood* 1997; 89: 3909-3918.
30. Thieblemont C, Briere J, Mounier N, Voelker HU, Cuccuini W, Hirschaud E, Rosenwald A, Jack A, Sundstrom C, Cogliatti S, Trougouboff P, Boudova L, Ysebaert L, Soulier J, Chevalier C, Bron D, Schmitz N, Gaulard P, Houlgatte R, Gisselbrecht C: *Prognostic Impact of Germinal Center (GC)/ Activated B-Cell (ABC) Classification Analysed by Immunocytochemistry, FISH Analysis and GEP, In Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL): The BioCORAL Study*. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29: 4079-4087.
31. Tucci A, Ferrari S, Bottelli C, Borlenghi E, Drera M, Rossi G: *A comprehensive geriatric assessment is more effective than clinical judgment to identify elderly diffuse large cell lymphoma patients who benefit from aggressive therapy*. *Cancer*. 2009; 115: 4547-4553.
32. Vitolo U, Chiappella A, Angelucci E, Rossi G, Liberati AM, Cabras MG, Botto B, Ciccone G, Gaidano G, Falchi L, Freilone R, Novero D, Orsucci L, Pavone V, Pogliani E, Rota-Scalabrini D, Salvi F, Tonso A, Tucci A, Levis A; Gruppo Italiano Multiregionale Linfomi e Leucemie (GIMURELL): *Dose-dense and high-dose chemotherapy plus Rituximab with autologous stem cell transplantation for primary treatment of diffuse large-B-cell lymphoma at poor prognosis: a phase II multicenter study*. *Haematologica* 2009; 94: 1250-1258.
33. Vitolo U, Chiappella A, Brusamolino E, Angelucci E, Balzarotti M, Carella AM, Ciccone G, Gaidano G, Merli F, Pane F, Pavone V, Rossi G, Rigacci L, Stelitano C, Zaja F, Martelli M: *A randomized multicentre phase III study for first line treatment of young patients with high risk (aa-IPi 2-3) diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): rituximab (R) plus dose-dense chemotherapy CHOP14/MegaCHOP14 with or without intensified high-dose chemotherapy (HDC) and autologous stem cell transplantation (ASCT). Results of DLCL04 trial of Italian Lymphoma Foundation (FIL)*. *Ann. Oncol.* 2011; 22: 072.
34. Vitolo U, Chiappella A, Carella AM, Baldi I, Ciccone G, Congiu A, Gaidano G, De Masi P, Ladetto M, Levis A, Liberati AM, Orsucci L, Pavone V, Peticone S, Tucci A, Zanni M, Rossi G: *Prospective, multicenter phase I-II pilot trial to evaluate efficacy and safety of Lenalidomide plus Rituximab-CHOP21 (LR-CHOP21) for elderly patients with untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL): interim analysis of the Intergruppo Italiano Linfomi (IIL) REAL07 study*. *Blood* 2010; 116: 2871.

35. Wiernik PH, Lossos IS, Tuscano JM, Justice G, Vose JM, Cole CE, Lam W, McBride K, Wride K, Pietronigro D, Takeshita K, Ervin-Haynes A, Zeldis JB, Habermann TM: *Lenalidomide monotherapy in relapsed or refractory aggressive non Hodgkin's lymphoma*. J. Clin. Oncol. 2008; 26: 4952-4957.
36. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jasse ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW; World Health Organization: *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. WHO Press; 2008, Geneva, Switzerland.
37. Ziepert M, Hasenclever D, Kuhnt E, Glass B, Schmitz N, Pfrendschuh M, Loeffler M: *Standard International Prognostic Index Remains a Valid Predictor of Outcome for Patients With Aggressive CD20+ B-Cell Lymphoma in the Rituximab Era*. J. Clin. Oncol. 2010; 28: 2373-2380.

## APPROCCIO OLISTICO AL PERINEO

*Ines Destefano<sup>1</sup>, Rossella Morra<sup>2</sup>, Cinzia Rastello<sup>1</sup>, Mario Nano<sup>1</sup>*

Università degli Studi di Torino  
Dipartimento di Oncologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia  
A.O.U. S. Luigi Gonzaga - Orbassano (TO)

<sup>1</sup> S.C.D.U. di Chirurgia Generale

<sup>2</sup> S.C.D.O. Rianimazione e Terapia Intensiva

Key words: *Pelvic floor / Pavimento pelvico*  
*Holistic approach / Approccio olistico*  
*Osteopathy / Osteopatia*  
*Acupuncture / Agopuntura*

### **Abstract:**

The holistic approach to the perineal pathologies, particularly as functional constipation, pelvic pain, it's important to allow a correct diagnosis, often multidisciplinary and multimodality therapy. The diagnosis must take into account the signs and those submerged, often unrecognized (iceberg syndrome) in order to define syndromes that are cared for in every aspect for optimal results. The therapies are equally varied and may also include techniques and non-conventional disciplines as osteopathy and acupuncture. It is essential that these therapies are understood in a scientific circuit, controlled in a specialized environment, and in execution that in results. The correct understanding of syndromes and treatment options is the winning to have good results on patients often very difficult to treat.

### **Riassunto:**

L'approccio globale/olistico alle patologie perineali, in particolare quelle funzionali come la stipsi, il dolore pelvico, è fondamentale per permettere una diagnosi corretta, una terapia multimodale e multidisciplinare. La diagnosi deve tener conto dei segni evidenti e di quelli sommersi, spesso misconosciuti (sindrome dell'iceberg) al fine di definire sindromi che vanno curate in ogni loro aspetto per avere risultati ottimali. Le terapie sono altrettanto variegata e possono anche comprendere tecniche e discipline non convenzionali come l'osteopatia e l'agopuntura. È fondamentale che tali terapie vengano comprese in un circuito scientifico, controllate in un ambiente specialistico,

sia nell'attuazione che nei risultati. La corretta conoscenza delle sindromi e delle possibilità terapeutiche è l'arma vincente per avere risultati soddisfacenti su pazienti spesso molto difficili da curare.

La Medicina e la Chirurgia si stanno sempre più parcellizzando e stanno diventando iperspecialistiche, troppo concentrate sull'organo da trattare a discapito della concezione "olistica" che prevede maggiore "...importanza dell'organismo in quanto totalità, attribuendogli maggior valore di completezza e di perfezione rispetto alla somma delle parti in cui è suddiviso" (Devoto-Oli. Vocabolario della lingua italiana 2012 - Mondadori Education). Ci si concentra troppo sull'organo bersaglio e si perdono di vista le cause e le concause che hanno portato ad una malattia e hanno creato una disfunzione. Ci si concentra sulle tecniche migliori per riportare un danno anatomico il più possibile alla sua situazione di normalità dimenticando che quell'organo interagisce con molti altri organi a volte anche fisicamente lontani e ci si dimentica troppo spesso che correggere una alterazione anatomica non vuol sempre dire ripristinare una funzione.

Il difetto anatomico è spesso solo la conseguenza di un meccanismo complesso che si è alterato e la sua correzione darà un ripristino funzionale a volte solo parziale.

Questo concetto si applica in particolar modo alle patologie perineali che sono molto spesso polifattoriali nella loro genesi. Consideriamo l'approccio olistico al perineo nei confronti dell'anatomia, della diagnosi e della terapia.

L'ANATOMIA classica, statica, comprende una serie numerosa di ossa, articolazioni, muscoli, fasce, organi che formano il diaframma pelvico, il triangolo urogenitale e il triangolo anale ma anche le ossa, le articolazioni i muscoli che collegano il diaframma pelvico al resto della colonna.

L'anatomia dinamica introdotta dalle teorie di De Lancey<sup>(3)</sup>, prevede tre livelli di sospensione:

- I Livello: sospensione apicale (legamento utero-sacrale, fasce pubo-cervicali).
- II Livello: sospensione laterale del terzo medio della vagina (legamenti pubouretrali, fascia retto-vaginale).
- III Livello: supporto perineale (legamento uretrale esterno, membrana perineale, corpo del perineo)<sup>(5)</sup>.

Questa teoria ha rivoluzionato lo staticismo dell'anatomia classica e il perineo con il suo centro tendineo sono diventati un'amaca su tre piani correlati e interagenti nella funzione perineale (espulsione, sostegno).

La rottura di uno dei livelli di sospensione può comportare il crollo o la disfunzione degli altri due livelli. L'intuizione descrittiva anatomica di De

Lancey ha dettato legge sulla ricostruzione del difetto anatomico prima visto solo su un'unica dimensione.

Papa Petros<sup>(5)</sup> ha ulteriormente evoluto questo concetto dinamico attribuendogli un risvolto funzionale. Nella sua "Teoria integrale del pavimento pelvico" (PP), egli ha posto l'accento sull'"..indebolimento di una qualsiasi parte della struttura (forma) può nuocere all'equilibrio, alla resistenza e alla funzionalità dell'intero sistema" (Figura 1).

## TEORIA INTEGRALE DEL PAVIMENTO PELVICO (PP)

PP considerato come un sistema bilanciato e integrato  
costituito da Muscoli, Tessuto Connettivo e Nervi.



**P.Papa Petros**

*Figura 1. Teoria integrale del Pavimento Pelvico.*

Al centro della sua teoria c'è la fibra collagena<sup>(5)</sup> che nel corso degli anni subisce traumatismi e modificazioni fisio-patologiche importanti con conseguenze strutturali e funzionali molto evidenti in alcune disfunzioni perineali (la stipsi, l'incontinenza, la dispareunia ecc). La ricostruzione del difetto che parte da questo presupposto, unito al miglioramento dei materiali chirurgici (reti a trama variabile, mesh biologiche), ha portato a molte modifiche di tecnica ricostruttiva per tali organi.

La DIAGNOSI delle patologie perineali richiede un'attenzione ancor maggiore nell'approccio olistico ai problemi. Il perineo viene inserito in una visione ancora più complessa che è quella della PNEI olistica (Figura 2). Si

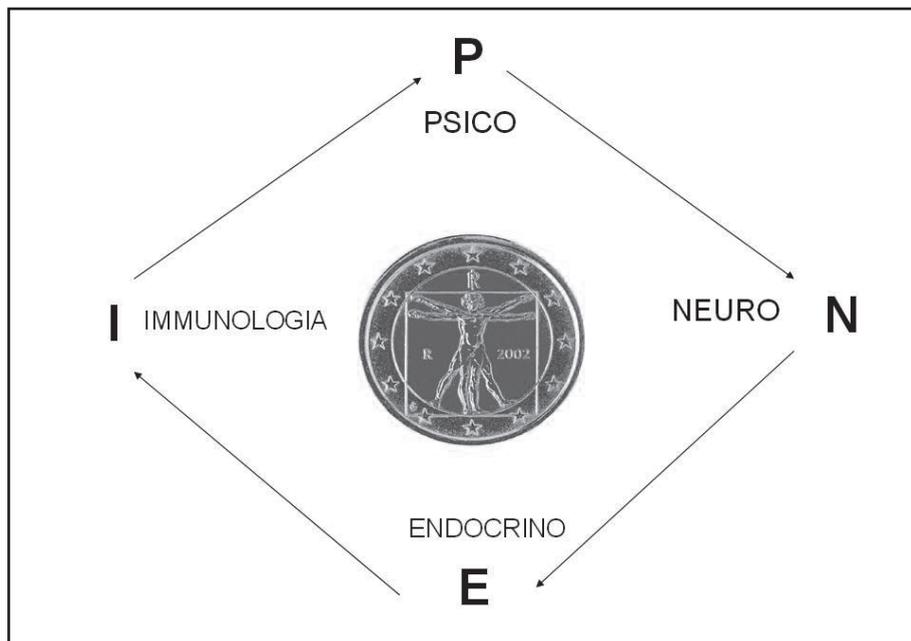


Figura 2. Sistema PNEI.

deve tenere conto della componente psicologica, neurologica, endocrinologica, immunologia del paziente per porre una corretta diagnosi e questo supera quindi anche le competenze delle varie specialità classiche chirurgiche che da sempre si sono occupate di malattie perineali (Urologo, Ginecologo, Proctologo).

“La visione unitaria delle funzioni degli organi pelvici crea una sorta di superspecialità che deve aprire nuovi spazi alla ricerca e assicurare ai pazienti delle soluzioni più razionali. La **perineologia** è quindi una branca medica di cui si dovrà sentir parlare di più”<sup>(4)</sup>.

Nella pratica quotidiana è in realtà molto difficile trovare Centri in cui il paziente venga valutato in modo collegiale e le decisioni terapeutiche vengano discusse in modo interdisciplinare. Fino a pochi anni fa il perineo era di pertinenza di tre grandi specialità: l’Urologia, la Ginecologia e la Proctologia (che in realtà continua ad essere, almeno in Italia, una sottospecialità della chirurgia generale). Ogni specialista valutava il suo segmento perineale spesso dimenticando quello ad esso adiacente. Alla Cleveland Clinic in Florida (Figura 3) vengono descritti almeno 7 Specialisti che interagiscono sul paziente con problema perineale<sup>(9)</sup>.

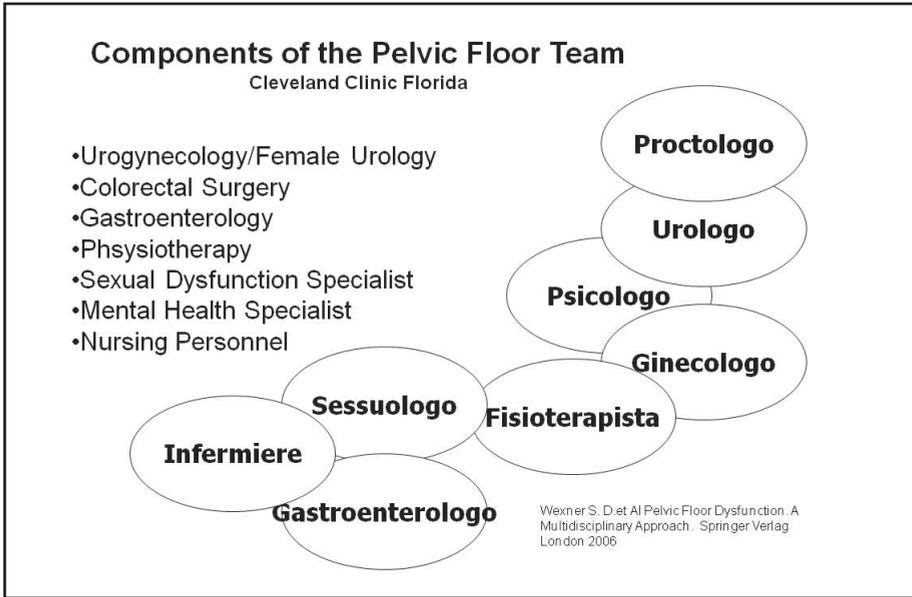


Figura 3. Componenti Unità del Pavimento Pelvico alla Cleveland Clinic in Florida.

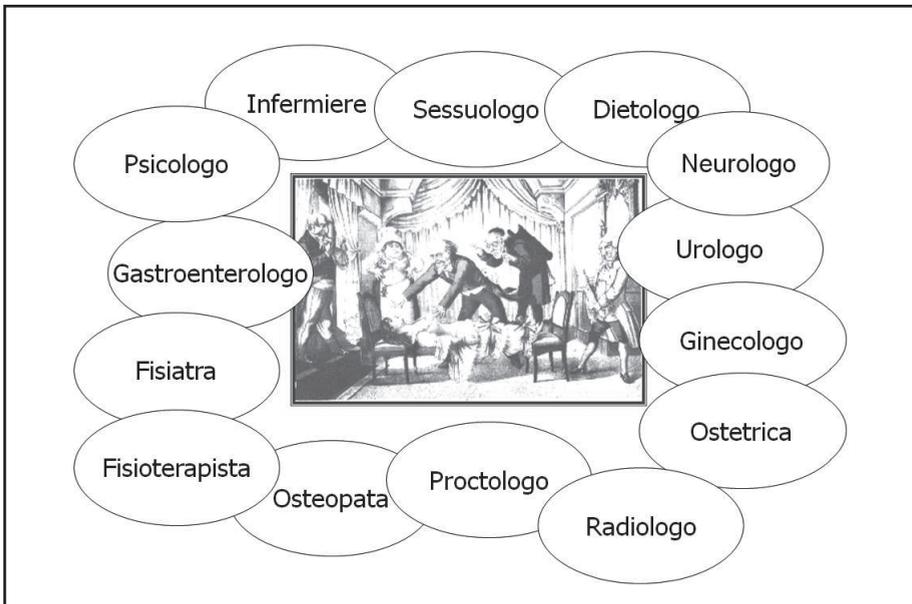


Figura 4. Componenti teorici di una Unità di Cura per il Perineo.

Nella nostra pratica quotidiana si è visto che il numero degli Specialisti che possono avere a che fare con questi pazienti può anche essere il doppio (Figura 4).

L'approccio olistico alla diagnosi delle disfunzioni perineali comporta la collaborazione di molti Specialisti che devono essere coordinati da un leader. Egli dovrebbe definire la diagnosi e decidere la tempistica della terapia per le patologie perineali, soprattutto per quelle funzionali.

Alcune patologie di tipo funzionale (un esempio è la stipsi) richiedono una grande sensibilità nel porre la diagnosi. Una buona parte dei sintomi sono spesso sommersi rispetto al problema emergente che può essere il meno significativo e importante: "When dealing with obstructed defecation... beware of the *"Iceberg syndrome!"*"<sup>(8)</sup>.

La complessità della diagnosi fa sì che la terapia divenga ancora più complicata poiché spesso essa può limitarsi a trattare solo il problema emergente. È proprio qui che con l'approccio olistico si affrontano tutte le patologie emerse e sommerse e si valutano tutte le terapie classiche e alternative che possono risolvere sia la disfunzione che l'alterazione anatomica.

La TERAPIA diventa quindi sempre personalizzata e quasi mai standardizzabile.

Per quanto riguarda la chirurgia si è passati negli anni attraverso fasi diverse.

Per anni si è parlato di chirurgia demolitiva. Per risolvere i prolapsi urogenitali o totali si è asportato l'utero, si è ridotta la vagina con plastiche che hanno spesso creato l'infelicità di molte donne poiché si sconvolgeva l'anatomia, creandone una nuova in cui non c'era più il prollasso ma veniva a mancare la funzione.

Con l'avvento di nuove concezioni dinamiche e poi funzionali dell'anatomia e il miglioramento della tecnologia e dei materiali, la chirurgia ha trovato nuove strade di tipo conservativo, ricostruttivo, miniinvasivo.

Ma il vero gold standard lo si sta ottenendo con la terapia integrata che corregge il difetto anatomico in modo il più conservativo possibile insieme alla correzione della dissinergia che spesso è alla base del formarsi del difetto anatomico.

Questo nuovo approccio sottintende che si sia a conoscenza di tutte le terapie alternative che possono aiutare nel curare le disfunzioni perineali.

Anche nel trattamento di una patologia comune come le emorroidi è importante scegliere il giusto rimedio poiché anche esse possono essere la

punta dell'iceberg di un altro problema funzionale che può peggiorare se si sbaglia il tipo di chirurgia che si propone.

Nell'ambito della riabilitazione perineale, che costituisce il punto di forza del nostro ambulatorio, è altrettanto variegato il quadro delle possibilità riabilitative che si offrono al paziente.

Esiste la riabilitazione strumentale come l'elettrostimolazione (ES), il biofeedback (BF) facilmente ripetibile nei vari ambulatori perché spesso affidata a programmi pre selezionati su un dispositivo meccanico. Essi richiedono uno scarso impegno da parte del personale ma i risultati di questo tipo di riabilitazione sono però altrettanto scarsi.

La riabilitazione o meglio la rieducazione perineale comprende un ventaglio di possibilità molto vasto che va dall'igiene di vita (fondamentale per la buona riuscita di qualunque terapia) all'ES funzionale, al BF nelle sue varie forme e possibilità, alla chinesiterapia eseguibile al domicilio con un blocco di fogli standard prestampati o eseguita sotto il controllo di un tutor a scadenza settimanale all'interno di un ambulatorio polispecialistico.

I risultati sono, come è ovvio nettamente diversi e richiedono una fatica del paziente e dell'operatore di gran lunga superiori alle soluzioni più facili di tipo strumentale.

Altre possibilità riguardano terapie alternative che devono essere vagliate nel metodo e nei risultati solo in Centri dedicati. L'osteopatia, la terapia naturale, l'agopuntura sono alcune delle possibilità che aiutano il paziente con disfunzioni perineali.

## **TECNICHE DI RIABILITAZIONE**

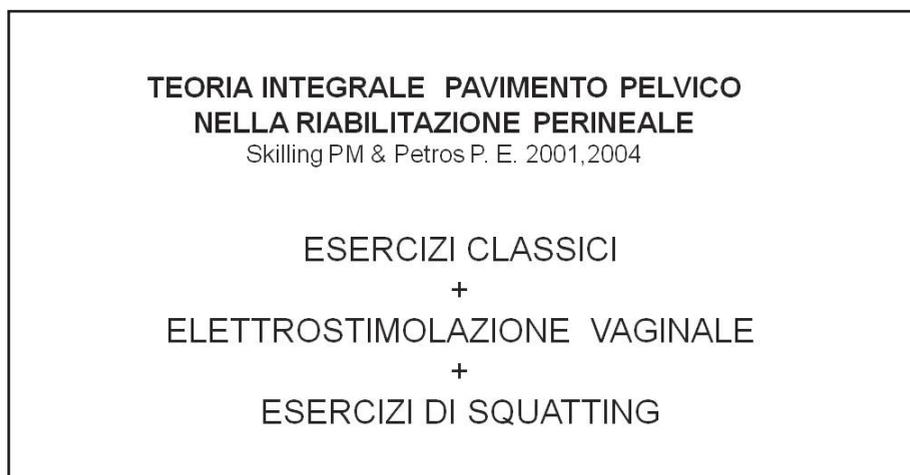
- BIOFEEDBACK
- STIMOLAZIONE ELETTRICA FUNZIONALE
- CHINESITERAPIA PELVI-PERINEALE
  
- BLADDER/COLON RETRAINING
- TECNICHE DI RILASSAMENTO
- PSICOTERAPIA
- TERAPIE NON CONVENZIONALI

*Figura 5. Tecniche di riabilitazione.*

È molto importante proprio in questo campo, in cui è possibile ingannare i pazienti con false promesse, che vengano identificati e allontanati i millantatori di facili risultati. È altrettanto importante che gli studi di fattibilità di alcune tecniche o la pubblicazione di dati relativi alla attività svolta avvengano sotto controllo di veri specialisti del perineo, e pubblicati su riviste accreditate e indicizzate. Tutto quello che nasce prima sui media e fa il percorso inverso deve essere guardato con sospetto e va evitato.

Nell'ambito delle tecniche riabilitative è altrettanto vasto e spesso misconosciuto il bagaglio di possibilità che ha il terapeuta nel trattare le disfunzioni perineali (Figura 5).

La collaborazione con gli Osteopati ha allargato moltissimo il bagaglio di intervento della chinesiterapia e ha portato al netto miglioramento dei risultati funzionali.



*Figura 6. Teoria integrale del Pavimento pelvico nella riabilitazione perineale.*

Gli esercizi del pavimento pelvico non sono più solamente gli esercizi di chinesiterapia ma si rivolgono al versante fascio-connettivale, allo stretching, al trattamento dei difetti posturali. Nella terapia integrale di Papa Petros la chinesiterapia è associata agli esercizi di squatting e alla elettrostimolazione vaginale (Figura 6)<sup>(5)</sup>. Si sono fatti molti tentativi di standardizzare le metodiche e si è cercato di creare flow chart che indicassero la tempistica della riabilitazione strumentale rispetto alle altre tecniche conservative. Un tentativo non semplice è stato proposto partendo dai dati forniti dalla manometria (Figura 7).

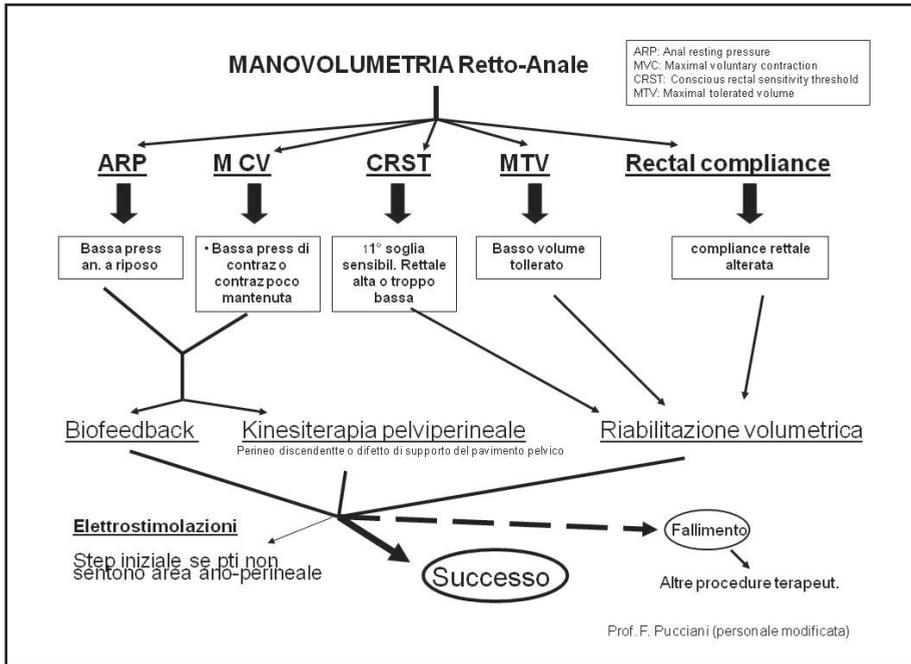


Figura 7. Diagramma di flusso per riabilitazione perineale basato su dati manometrici.

Altrettanto difficile è quantizzare i disturbi del paziente al fine di avere un confronto pre e post terapia soprattutto per le terapie conservative dove spesso il difetto anatomico, quando c'è, può anche permanere. Un esempio è il rettocele che già ha una percentuale di frequenza compatibile con la normalità e che, molto spesso è la punta dell'iceberg di gravi dissinergie perineali. Il rettocele può, dopo essere stato trattato conservativamente, portare ad un rifiuto da parte della paziente verso una terapia chirurgica poiché spesso i disturbi diminuiscono nettamente.

In tutti i casi sono fondamentali i test e i questionari legati alla patologia specifica (stipsi, incontinenza, dolore) e alla qualità di vita, che vanno somministrati all'inizio e al termine delle terapie, qualunque esse siano. È proprio questo l'unico modo di avere il riscontro numerico, attraverso uno score, ripetibile nel tempo.

Alcune terapie non convenzionali sono arrivate all'onore dei riconoscimento scientifico poiché sono state testate su moltissimi pazienti anche se non si conosce ancora bene il meccanismo d'azione della terapia stessa. La neuromodulazione sacrale, per esempio, che nasce molti anni fa per la terapia

empirica dell'incontinenza urinaria<sup>(7)</sup> funziona con percentuali di successo molto elevate sull'incontinenza fecale, sulla stipsi e sul dolore pelvico cronico.

Lo stesso principio di modulazione periferica probabilmente funziona per l'elettrostimolazione del nervo tibiale posteriore<sup>(2,4,5,6)</sup> e forse anche per l'agopuntura. Sono però necessari studi su campioni molto più vasti, più omogenei per patologie e con follow up più lunghi per poter definire l'efficacia dei risultati.

Nel nostro ambulatorio dell'AOU S. Luigi Gonzaga di Orbassano, nato nel 1990 come semplice ambulatorio di Proctologia, le prestazioni relative alle patologie ano rettali di tipo funzionale sono aumentate in modo esponenziale negli ultimi anni pur in concomitanza con una riduzione del personale dedicato (Figura 8).

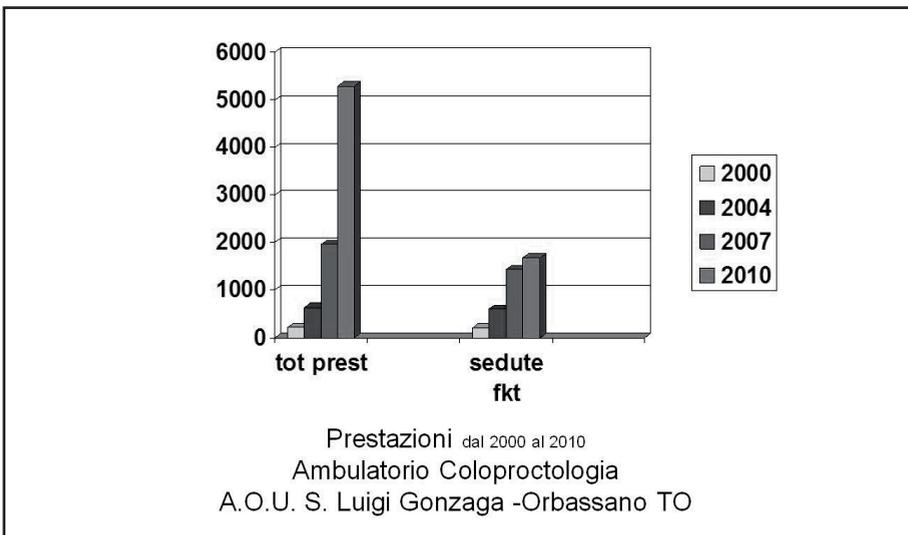


Figura 8. Bilancio attività Ambulatorio di Proctologia A.O.U. S. Luigi Gonzaga di Orbassano (TO).

La co-presenza di un'Enterostomista riabilitatrice, di un'Ostetrica, di una Chinesiologa, di un'Analgesista-Osteopata, di un Medico Agopuntore ci ha permesso di fornire prestazioni molto personalizzate e molto alternative in un ambiente dedicato e coordinato da Specialisti Proctologi.

Sono in corso studi controllati sulle efficacia delle varie terapie non convenzionali in uso. Questi studi permetteranno di inserire in un ambito

controllato, multidisciplinare, figure che utilizzano terapie non convenzionali e che, al momento, lavorano in modo isolato e non controllato dalla comunità scientifica.

Il grosso rischio è che tali figure (osteopata, ostetrica, agopuntore) agiscano e banalizzino tecniche che possono essere molto utili al paziente se gestite correttamente. Uno studio fatto su pazienti con sclerosi multipla affetti da stipsi e trattati con metodiche viscerali di tipo osteopatico ha dato risultati preliminari molto interessanti che saranno pubblicati quando si sarà raggiunto un adeguato follow up.

La collaborazione con Urologi, e Ginecologi è avvenuta a livello diagnostico in modo altrettanto coordinato. Dal punto di vista terapeutico si è privilegiato l'approccio sequenziale che, anche in letteratura, pare dare risultati migliori.

La presenza di tutti i possibili specialisti connessi ai problemi del pavimento pelvico (radiologi, psicologi, gastroenterologi, ecc.) ha permesso di gestire in modo veloce la diagnostica sul paziente con problemi funzionali perineali. Questo ha diminuito i disagi che i pazienti hanno nel cercare da soli gli specialisti che restano, la maggior parte delle volte, scollegati e non coordinati.

La percentuale di interventi chirurgici effettuati nel nostro Centro su pazienti con problemi perineali è oscillata tra il 6% (rettocele) e il 70% (fistole).

•studio prospettico su 100 casi di ostruita defecazione: si operano solo il 14% degli stitici.  
(M. Pescatori in pubblicazione su Colorectal Diseases)

•il 5% secondo i chirurghi della Mayo Clinic.

?

Migliore diagnosi                      Conoscenza di più tipi di terapie



Figura 9. Considerazioni su variabili di terapia per patologie perineali.

Tale percentuale rientra nella media di interventi chirurgici eseguiti in grossi Centri che approcciano i problemi perineali in modo multidisciplinare/olistico (5% Mayo Clinic prof Wexner, 14% UCP Roma prof. Pescatori)<sup>(1)</sup>. In molti Centri che si occupano di patologie perineali le percentuali di intervento è risultata invece molto alta e poco differenziata. È possibile che questi Centri abbiano un ventaglio di possibilità alternative o non convenzionali poco ampio da offrire a questi pazienti estremamente complessi? (Figura 9). Il miglior chirurgo è colui che offre al paziente l'intervento che sa fare meglio ma anche quello che, rispetto alla moderna medicina basata sull'evidenza (EBM), offre l'intervento più differenziato, più personalizzato e ne controlla l'efficacia nel tempo.

#### BIBLIOGRAFIA:

1. Boccasanta P, Venturi M, Calabrò G, Trompetto M, Ganio E, Tessera G, Bottini C, Pulvirenti D'urso A, Ayabaca S, Pescatori M: *Which surgical approach for rectocele? A multicentric report from Italian coloproctologists*. Tech Coloproctol 2001; 5: 149-156.
2. Boyle DJ, Prosser K, Allison ME, Williams NS, Chan CL: *Percutaneous tibial nerve stimulation for the treatment of urge fecal incontinence*. Dis. Colon Rectum 2010; 53: 432-437.
3. De Lancey JO: *Structural support of the urethra as it relates to stress urinary incontinence: the hammock hypothesis*. Am. J. Obstet. Gynaecol. 1994; 170: 1713-1720.
4. Dodi G: *Perineologia: Un neologismo?* Riv. It. Coloproct. 1990; 9: 113.
5. Papa Petros P: *Il pavimento pelvico femminile*. 2° CIC Ed. Internaz, 2007, Roma.
6. Shafik A, Ahmed I, El-Sibai O, Mostafa RM: *Percutaneous peripheral neuromodulation in the treatment of fecal incontinence*. Eur. Surg. Res. 2003; 35: 103-107.
7. Tanagho EA, Schmidt RA: *Electrical stimulation in the management of the neurogenic bladder*. J. Urol. 1998; 140: 1331-1335.
8. Wexner SD, Bartolo D: *Constipation: etiology, evaluation and management*. Butterworth-Heinemann Publishing, 1995, Oxford.
9. Wexner SD, Davila GW, Ghoniem GM: *Pelvic Floor Dysfunction. A Multidisciplinary Approach*. Springer, 2006, London.

## **CELLULE STAMINALI IN ORTOPEDIA: REALTÀ, MITO O OPPORTUNITÀ?**

*Paolo Rossi<sup>1</sup>, Antonio Marmotti<sup>1</sup>, Filippo Castoldi<sup>1</sup>, Roberto Rossi<sup>1</sup>,  
Davide Edoardo Bonasia<sup>1</sup>, Matteo Bruzzone<sup>1</sup>, Federico Dettoni<sup>1</sup>,  
Davide Blonna<sup>1</sup>, Lorenzo Silengo<sup>3</sup>, Corrado Tarella<sup>2,3</sup>*

<sup>1</sup> Dipartimento di Ortopedia e Traumatologia - Università degli Studi di Torino

<sup>2</sup> Dipartimento di Ematologia e Terapie Cellulari

Ospedale Mauriziano "Umberto I" - Università degli Studi di Torino

<sup>3</sup> Molecular Biotechnology Center - Università degli Studi di Torino

Key words:     *Orthopaedics / Ortopedia*  
                  *MSC (mesenchymal stem cell) / Cellule mesenchimali*  
                  *Bone / Osso*  
                  *Cartilage / Cartilagine*  
                  *Meniscus / Menisco*

### **Abstract:**

Stem cells have huge applications in the field of tissue engineering and regenerative medicine. Indeed, a particularly popular line of research has been the regeneration of bone and cartilage tissues to treat various orthopaedic disorders. Most of these pioneering research lines that aim to create new treatments for diseases that currently have limited therapies, are still in the bench of the researchers. However, in the last years, several clinical trials have been started with satisfactory and encouraging results.

Three main modalities could be employed for the use of stem cells in orthopaedic field:

- 1) cells selected by withdrawal from bone marrow, subsequent culture in the laboratory, and ultimately transplant at the site of injury;
- 2) bone marrow aspirate, concentrated and directly implanted into the injury site;
- 3) systemic mobilization of stem cells and other bone marrow precursors by the use of growth factors.

### **Riassunto:**

Le cellule staminali hanno vasta applicazione nell'ambito della medicina rigenerativa e dell'ingegneria tissutale. Un campo particolarmente fertile è lo studio della rigenerazione del tessuto osseo e cartilagineo allo scopo di

trattare differenti patologie ortopediche. La maggior parte di queste ricerche sono ancora confinate in ambito di laboratorio, tra studio in vitro o modelli preclinici su animale; tuttavia, recentemente alcuni trials clinici hanno condotto a risultati incoraggianti.

Esistono tre modalità principali di impiego delle cellule staminali:

- 1) impianto di cellule staminali precedentemente selezionate ed espanse da midollo osseo (o altre sedi) mediante coltura in laboratorio (procedura a 2 fasi; manipolazione maggiore);
- 2) impianto di concentrato di midollo osseo, aspirato e direttamente impiantato nel sito di lesione mediante un'unica procedura (manipolazione minore);
- 3) mobilizzazione sistemica di cellule staminali ed altri precursori midollari mediante uso di fattori di crescita (assenza di manipolazione cellulare).

## INTRODUZIONE

Nell'ambito delle malattie delle ossa e delle articolazioni, gli elementi tradizionalmente associati ai principi riparativi sono le cellule staminali mesenchimali CD34- (Figura 1). Sono anche denominate “mesenchymal stem cells” (MSCs) o “marrow stromal cells” o “multipotential stromal cells”. La loro potenzialità di differenziazione verso linee cellulari multiple quali la linea condrogenica e osteogenica rende idealmente immediata l'applicazione nei confronti di differenti quadri patologici in cui l'aumento della cellularità possa portare ad un miglioramento del processo di guarigione (Figura 2).

La rigenerazione tissutale nell'ambito delle malattie di competenza ortopedica, tuttavia, coinvolge anche altre popolazioni cellulari, come le cellule CD34+. Precursori osteoblastici sono stati osservati in cellule CD34+ derivate da aspirato di midollo osseo<sup>(5)</sup>, la somministrazione di Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) è in grado di promuovere l'osteogenesi e l'osteointegrazione all'interfaccia osso-tendine in modelli animali<sup>(19,36)</sup>, l'applicazione in situ di cellule CD34+ ha dimostrato in vivo la capacità di accelerare la guarigione di fratture su modello animale<sup>(33)</sup> e di pseudoartrosi di tibia in modelli clinici<sup>(24)</sup> nonché di migliorare la riparazione di lesioni cartilaginee dopo trattamento con microperforazioni<sup>(37)</sup>.

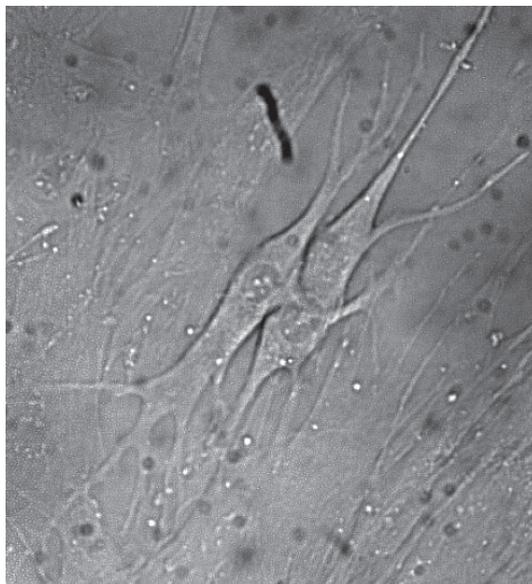


Figura 1. Cellule mesenchimali CD34- in coltura in monolayer su supporto in plastica.

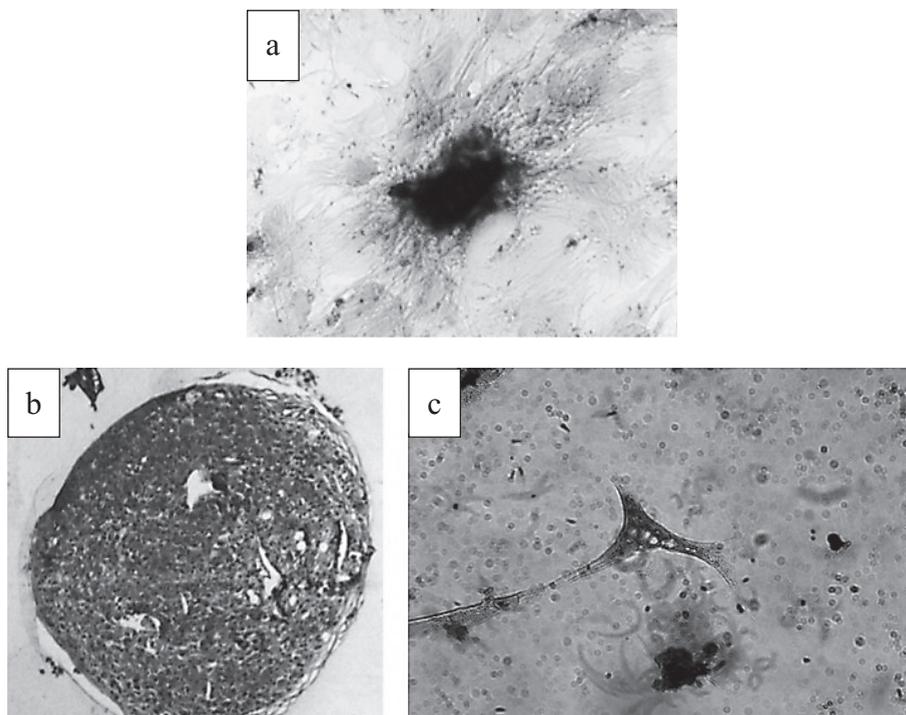


Figura 2. Differenziamento in senso osteogenico (a), condrogenico (b) e adipogenico (c) di cellule staminali mesenchimali provenienti da aspirato midollare; a): depositi di calcio evidenziati con colorazione Alizarin Red; b): pellet cellulare con produzione di matrice extracellulare evidenziata con colorazione Safranin O; c): vacuoli adiposi intracellulari evidenziati con colorazione Oil Red O.

In queste evidenze sperimentali si potrebbero intuire i fondamenti dell'azione trofica dell'aspirato di midollo concentrato, che è largamente usato in ortopedia, sia a livello sperimentale preclinico, sia a livello clinico, come sorgente cellulare “a pronta disponibilità”. L'aspirato midollare concentrato rappresenta infatti una fonte di cellule a minima manipolazione e, pertanto, facilmente impiegabile per uso clinico, tale a essere categorizzato come “instant cell therapy”. Tuttavia, è evidente che la concentrazione di precursori midollari, sia CD34- sia CD34+, è molto bassa poiché nel “pellet” cellulare che si ottiene dalla centrifugazione si ritrovano anche cellule della linea ematopoietica in fase di differenziazione terminale, cellule terminali di tipo leucocitario monocitico e linfocitico, piastrine. Si stima che, con i sistemi più moderni, si possa giungere ad una concentrazione di MSCs pari a  $14.8 \times 10^2$  / ml di concentrato di midollo osseo<sup>(22)</sup>.

Tali basi teoriche consentono quindi di schematizzare tre modalità principali per l'uso delle MSCs in ortopedia:

- 1) Cellule mesenchimali selezionate mediante prelievo da midollo osseo o altro tessuto (es. tessuto adiposo), successiva coltura in laboratorio ed impianto, in ultimo, nel sito di lesione (manipolazione maggiore)
- 2) Aspirato di midollo osseo, concentrato e direttamente impiantato nel sito di lesione (manipolazione minore)
- 3) Mobilizzazione sistemica di cellule mesenchimali ed altri precursori midollari (ematopoietici CD34+) mediante uso di “fattori di crescita” quali il G-CSF (assenza di manipolazione cellulare)

L'applicazione nel sito di lesione può avvenire mediante iniezione diretta della sospensione cellulare o tramite scaffold tridimensionale intriso (per imbibizione diretta o attraverso coltura in laboratorio) delle cellule candidate a promuovere la riparazione della lesione (Figura 3).



*Figura 3. Osso equino deantigenato utilizzato come scaffold per il concentrato di aspirato midollare; lo scaffold è imbibito del concentrato midollare direttamente in sala operatoria prima del suo utilizzo in uomo, in corrispondenza del “gap” osseo creato durante osteotomia tibiale valgizzante a cuneo di apertura (courtesy of Dott. Rainero Del Din).*

## **PATOLOGIE OSSEE**

A parte l'utilizzo storico, con modalità di trapianto allogenico, nella malattia sistemica nota come “osteogenesis imperfecta”<sup>(17)</sup>, una delle prime applicazioni delle MSCs per aumentare il processo di guarigione ossea è stata

studiata per la terapia dell'osteonecrosi idiopatica in fase iniziale. Questa malattia si presta bene alla verifica dell'efficacia della terapia cellulare poiché è possibile monitorare clinicamente il miglioramento del processo riparativo mediante RMN in modo molto affidabile. I gruppi di Gangji e Hernigou hanno sperimentato l'associazione del "forage" lesionale con l'iniezione locale di concentrato di aspirato midollare ottenendo, anche a lungo termine, risultati promettenti<sup>(8,16)</sup>. La ricerca, contemporaneamente, ha suggerito alternative che, meno immediate, potrebbero tuttavia migliorare ulteriormente la riparazione lesionale. L'applicazione locale di MSCs transgeniche per l'HGF (Hepatocyte Growth Factor) durante forage<sup>(44)</sup> e la mobilitazione sistemica di MSC con G-CSF e Stem Cell Factor<sup>(45)</sup> hanno ottenuto in modello animale di piccole dimensioni (coniglio) risultati promettenti.

Anche per il trattamento delle fratture delle ossa lunghe, ricerche di base supportano questo concetto terapeutico. In un modello murino<sup>(12)</sup>, si è ottenuto infatti un considerevole miglioramento della formazione di callo osseo mediante iniezione sistemica di MSCs autologhe attraverso la vena della coda.

Un altro campo di applicazione è rappresentato dalle pseudoartrosi atrofiche, ove la mancanza di guarigione è dettata non tanto da un'insufficienza meccanica del costrutto di osteosintesi, ma prevalentemente dalla mancanza di cellularità nel sito di lesione. L'applicazione locale di midollo osseo concentrato è stata suggerita dal gruppo di Hernigou, che ha rilevato come l'efficacia della terapia sia dipendente dal numero di precursori midollari veicolati nel sito di lesione<sup>(15)</sup>.

In senso più ampio, i deficit ossei stessi, sia secondari a lesioni traumatiche, sia associati a procedure chirurgiche quali l'osteotomia a cuneo di apertura, sia derivati dalla presenza di neoformazioni benigne, sono un modello di studio ottimale per verificare l'azione delle MSCs nei confronti della rigenerazione ossea. In uno studio clinico, è stato applicato il concentrato di midollo veicolato in scaffold di collagene I per favorire la guarigione di cisti ossee ed encondromi con ripristino della continuità corticale al sito di lesione<sup>(21)</sup>. In contemporanea, la ricerca di base ha dimostrato come sia possibile, sia *in vitro*<sup>(39)</sup>, sia su modello animale di piccole (coniglio)<sup>(34)</sup> e di grandi dimensioni (capra)<sup>(27)</sup>, ottenere un efficace ripopolamento degli allograft spongiosi e corticali da parte di MSCs isolate ed espanse da midollo ed ottenere, di conseguenza, un miglioramento della guarigione di lesioni ossee critiche. Questo concetto terapeutico di "cellularizzazione" degli allograft potrebbe rivelarsi fondamentale anche nell'uomo per migliorare la guarigione di difetti ossei critici e un recente studio clinico

di Marcacci lo ha dimostrato. MSCs isolate e espanse sono state utilizzate, in associazione a scaffold macroporosi in bioceramica, per il trattamento di deficit ossei critici, ottenendo risultati promettenti<sup>(30)</sup>, anche se attraverso manipolazione maggiore delle cellule. Più facilmente applicabile a livello clinico è la mobilizzazione sistemica di precursori midollari mediante somministrazione sottocutanea di G-CSF. Tale procedura è stata associata, in un nostro recente studio clinico, ad un aumento dei processi di osteogenesi e di osteointegrazione nel sito di osteotomia, dopo osteotomia valgizzante tibiale di apertura<sup>(31)</sup>. Questa osservazione potrebbe essere il presupposto per l'utilizzo della mobilizzazione sistemica mediante G-CSF dei precursori midollari per favorire la guarigione di lesioni ossee post-chirurgiche o secondarie ad altra patologia.

## **PATOLOGIA CARTILAGINEA**

Nell'ambito della riparazione delle lesioni condrali e osteocondrali, l'ingegneria tissutale sta proponendo da vari anni l'utilizzo di MSC come sorgenti cellulari per la riparazione. Evidenze su modelli animali preclinici hanno infatti confermato l'efficacia di questo approccio, anche se tali studi hanno rilevato come il meccanismo con cui le MSCs promuovono la rigenerazione cartilaginea non sia solo diretto, attraverso differenziazione in condrociti, ma anche indiretto attraverso l'"homing" nel sito di lesione e il reclutamento di cellule precursori dal microambiente articolare<sup>(1,26,35)</sup>. Nel microambiente articolare esistono infatti popolazioni di precursori non solo nel midollo osseo, ma anche negli strati più superficiali della cartilagine (superficial zone)<sup>(7,46)</sup> e nel tessuto sinoviale<sup>(25)</sup>. Il processo riparativo potrebbe quindi essere condotto in modo sinergico dalla compresenza di varie popolazioni cellulari, nei confronti delle quali le MSCs fungerebbero da "registri" oltre che da "attori comprimari".

In ambito sperimentale, inoltre, è stato verificato anche l'elevato potenziale condrogenico di MSCs transfettate con fattori di crescita anabolici quali il TGF- $\beta$  Transforming Growth Factor beta)<sup>(13)</sup>, l'FGF-2 (Fibroblast Growth Factor 2)<sup>(6)</sup> e la CDMP-1 (Cartilage-Derived Morphogenetic Protein-1)<sup>(23)</sup>. Il gruppo di Madry e Cucchiaini rappresentano in Europa un riferimento in questo campo<sup>(28)</sup>. I risultati ottenuti in vitro e in vivo in modelli di piccole dimensioni (coniglio) sono stati convincenti per una riparazione condrale più veloce e con caratteristiche più simili a quelle della cartilagine ialina articolare, anche se tali procedure comportano una manipolazione maggiore delle cellule e sono attualmente destinate ad esclusivo uso preclinico.

Il primo studio clinico che ha dimostrato l'efficacia delle MSCs nella riparazione di lesioni cartilaginee è stato eseguito dal gruppo di Wakitani. I primi casi furono operati agli inizi degli anni '90 e, successivamente, fu costituito un trial che ha seguito i pazienti per più di 11 anni<sup>(41,42,43)</sup>. Le lesioni cartilaginee furono ricoperte da periostio al di sotto del quale veniva posto un gel di collagene contenente la popolazione di MSCs espanse in coltura da aspirato midollare, ottenendo dopo 42 settimane una riparazione con tessuto metacromatico con caratteristiche simili alla cartilagine ialina. Tale studio è stato sicuramente molto coraggioso ed innovativo. Ha, infatti, anticipato il concetto di riparazione cellulare "one stage" in un'epoca in cui il trapianto in due tempi di condrociti autologhi rappresentava la prospettiva più sofisticata per ottenere un tessuto riparativo simile alla cartilagine articolare. Nonostante i suoi limiti, quali la presenza del periostio e la manipolazione maggiore necessaria per ottenere le MSCs, lo studio di Wakitani rimane ancora oggi un riferimento scientifico nella storia della riparazione cartilaginea.

Attualmente tuttavia, come per le lesioni ossee, l'utilizzo clinico più diffuso delle MSCs per la riparazione delle lesioni cartilaginee è relativo all'uso di concentrato di midollo osseo. La minore manipolazione necessaria per ottenerlo in quantità consistente e la possibilità di applicarlo in procedura "one stage" lo rendono una sorgente cellulare ideale e a basso costo. Il concentrato di midollo osseo sembra fornire una sorgente cellulare valida per migliorare la guarigione dei difetti cartilaginei sia quando è associato a membrane per la copertura di microfratture, secondo la tecnica AMIC modificata da Gigante<sup>(11)</sup>, sia quando veicolato da scaffold all'interno di lesioni cartilaginee del ginocchio o della caviglia preparate attraverso débridement come recentemente proposto da Giannini<sup>(3,9,10)</sup>. Il razionale di tale approccio "one-step" risiede nella possibilità di veicolare, attraverso la concentrazione di aspirato midollare, un patrimonio cellulare indifferenziato contenente sia precursori CD34- sia precursori ematopoietici CD34+, trasferendo così all'interno del difetto condrale tutti gli elementi costitutivi della "stem cell niche" midollare per mantenerne la sinergia reciproca nei confronti dei processi riparativi tissutali.

Un'ultima differente modalità di utilizzare le potenzialità delle cellule MSCs è il reclutamento in situ tramite scaffold nanostrutturato. Con la nanostrutturazione si apre quindi un "mondo" nuovo in cui non solo le cellule, ma anche gli scaffold possono condizionare i principi della riparazione tissutale interagendo a livello dimensionale con l'ordine di grandezza delle stesse molecole di superficie delle cellule<sup>(14)</sup>. A questo proposito, uno studio in vitro ha dimostrato come le MSCs a contatto con nanofibre di poli-L-lattide (PLLA) rivestite di nanoparticelle di idrossiapatite riescano spontaneamente

ad esprimere geni tipici della linea condrocitaria (quali aggrecan e SOX-9) senza essere stimulate da terreno di crescita condrogenico<sup>(38)</sup>. In clinica, questi concetti cominciano ad essere applicati solo recentemente, attraverso l'uso di scaffold "biomimetici" nanostrutturati quali il Maioregen (Finceramica) dotato di un reticolo di collagene I e di nanoparticelle di idrossiapatite a concentrazione crescente verso gli strati più interni della membrana.

### SVILUPPI FUTURI

La terapia con cellule staminali mesenchimali è inevitabilmente una prospettiva ancora sperimentale, anche se associata a risultati affascinanti. In questo ambito, la ricerca di base e preclinica avrà ancora un ruolo fondamentale

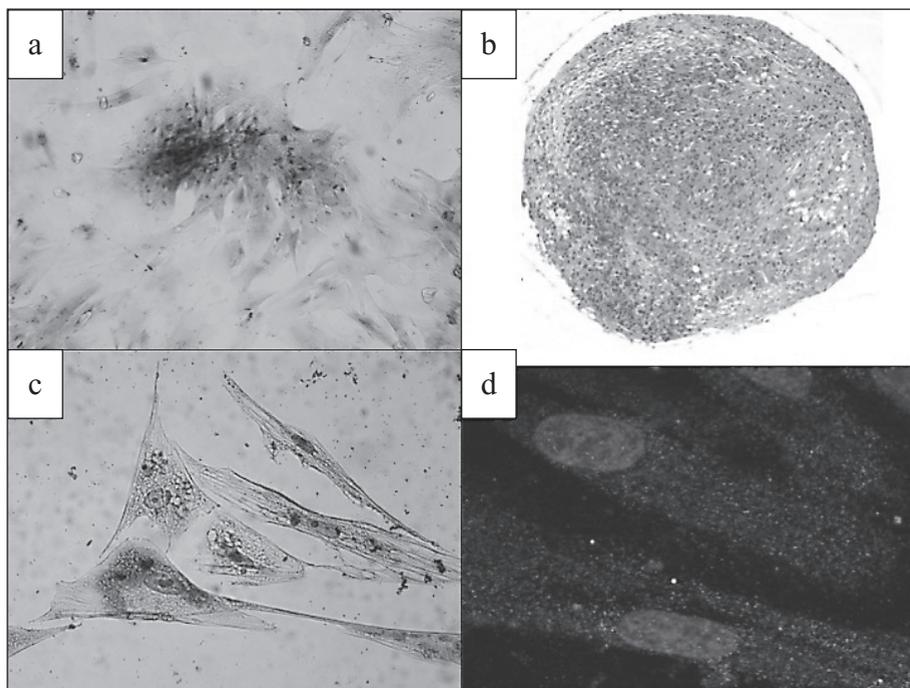


Figura 4. Differenziamento in senso osteogenico (a), condrogenico (b), adipogenico (c), miogenico (d) di cellule staminali mesenchimali provenienti da cordone ombelicale; a): depositi di calcio evidenziati con colorazione Alizarin Red; b): pellet cellulare con produzione di matrice extracellulare evidenziata con colorazione Safranin O; c): vacuoli adiposi intracellulari evidenziati con colorazione Oil Red O; d) immunofluorescenza positiva per la miogenina (nuclei colorati con DAPI).

nell'individuare i meccanismi e le modalità migliori per utilizzare tali cellule nella riparazione di lesioni articolari, per evitare i rischi connessi con applicazioni cliniche tanto "entusiastiche" quanto affrettate. Nonostante i numerosi trials presenti nel mondo, infatti, una applicazione clinica di routine rappresenta ancora una prospettiva lontana<sup>(29)</sup>.

In questo orizzonte l'uso di cellule da cordone ombelicale sembra promettente. In analogia con numerosi studi presenti in letteratura, un nostro recente lavoro ha, infatti, dimostrato come da ogni componente del cordone ombelicale si possano trarre cellule con potenzialità mesenchimale<sup>(2,20,32)</sup>. Il vantaggio dell'uso del cordone ombelicale come fonte di MSCs è potenzialmente notevole: è possibile ottenere, con semplici metodiche di coltura cellulare, un rilevante quantitativo di cellule utilizzabili per processi riparativi muscoloscheletrici<sup>(4,32)</sup> (Figura 4). Inoltre, teoricamente, l'uso del cordone come sorgente di MSCs è eticamente accettabile ed economico poiché tale materiale sarebbe altrimenti scartato durante le procedure del parto. Infine, le potenzialità immunosoppressive delle MSCs da cordone<sup>(40)</sup> rendono tali cellule immunoprivilegiate nei confronti di un uso allogenico, come già sperimentato in vivo in ambito neurologico nei confronti di lesioni del midollo spinale<sup>(18)</sup>. Per tutti questi motivi, le cellule da cordone ombelicale potrebbero rappresentare un elemento chiave del prossimo futuro per la cura delle malattie delle ossa e delle articolazioni.

## BIBLIOGRAFIA

1. Agung M, Ochi M, Yanada S, Adachi N, Izuta Y, Yamasaki T, Toda K: *Mobilization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the injured tissues after intraarticular injection and their contribution to tissue regeneration*. Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. 14: 1307-1314, 2006.
2. Arufe MC, De la Fuente A, Mateos J, Fuentes I, De Toro FJ, Blanco FJ: *Analysis of the chondrogenic potential and secretome of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord stroma*. Stem Cells Dev. 20: 1199-1212, 2011.
3. Buda R, Vannini F, Cavallo M, Grigolo B, Cenacchi A, Giannini S: *Osteochondral lesions of the knee: a new one-step repair technique with bone-marrow-derived cells*. J. Bone Joint Surg. Am. 92 Suppl 2: 2-11, 2010.
4. Capelli C, Gotti E, Morigi M, Rota C, Weng L, Dazzi F, Spinelli O, Cazzaniga G, Trezzi R, Gianatti A, Rambaldi A, Golay J, Introna M: *Minimally manipulated whole human umbilical cord is a rich source of clinical-grade human mesenchymal stromal cells expanded in human platelet lysate*. Cytotherapy 13: 786-801, 2011.
5. Chen JL, Hunt P, McElvain M, Black T, Kaufman S, Choi ES: *Osteoblast precursor cells are found in CD34+ cells from human bone marrow*. Stem Cells 15: 368-377, 1997.
6. Cucchiari M, Ekici M, Schetting S, Kohn D, Madry H: *Metabolic activities and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells following recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer and overexpression of fibroblast growth factor 2*. Tissue Eng. Part A 17: 1921-1933, 2011.
7. Dowthwaite GP, Bishop JC, Redman SN, Khan IM, Rooney P, Evans DJR, Haughton L, Bayram Z, Boyer S, Thomson B, Wolfe MS, Archer CW: *The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population*. J. Cell. Sci. 117: 889-897, 2004.
8. Gangji V, De Maertelaer V, Hauzeur JP: *Autologous bone marrow cell implantation in the treatment of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head: Five year follow-up of a prospective controlled study*. Bone 49: 1005-1009, 2011.
9. Giannini S, Buda R, Cavallo M, Ruffilli A, Cenacchi A, Cavallo C, Vannini F: *Cartilage repair evolution in post-traumatic osteochondral lesions of the talus: from open field autologous chondrocyte to bone-marrow-derived cells transplantation*. Injury 41: 1196-1203, 2010.
10. Giannini S, Buda R, Vannini F, Cavallo M, Grigolo B: *One-step bone marrow-derived cell transplantation in talar osteochondral lesions*. Clin. Orthop. Relat. Res. 467: 3307-3320, 2009.
11. Gigante A, Calcagno S, Cecconi S, Ramazzotti D, Manzotti S, Enea D: *Use of collagen scaffold and autologous bone marrow concentrate as a one-step cartilage repair in the knee: histological results of second-look biopsies at 1 year follow-up*. Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 24: 69-72, 2011.
12. Granero-Moltó F, Weis JA, Miga MI, Landis B, Myers TJ, O'Rear L, Longobardi L, Jansen ED, Mortlock DP, Spagnoli A: *Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing*. Stem Cells 27: 1887-1898, 2009.
13. Guo X, Zheng Q, Yang S, Shao Z, Yuan Q, Pan Z, Tang S, Liu K, Quan D: *Repair of full-thickness articular cartilage defects by cultured mesenchymal stem cells transfected with the transforming growth factor beta1 gene*. Biomed. Mater. 1: 206-215, 2006.

14. Gupte M J, Ma PX: *Nanofibrous Scaffolds for Dental and Craniofacial Applications*. J. Dent. Res. 91: 227-34, 2012.
15. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H: *Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells*. J. Bone Joint Surg. Am. 87: 1430-1437, 2005.
16. Hernigou P, Poignard A, Zilber S, Rouard H: *Cell therapy of hip osteonecrosis with autologous bone marrow grafting*. Indian J. Orthop. 43: 40-45, 2009.
17. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK: *Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta*. Nat. Med. 5: 309-313, 1999.
18. Ichim TE, Solano F, Lara F, Paris E, Ugalde F, Rodriguez JP, Minev B, Bogin V, Ramos F, Woods EJ, Murphy MP, Patel AN, Harman RJ, Riordan NH: *Feasibility of combination allogeneic stem cell therapy for spinal cord injury: a case report*. Int. Arch. Med. 3: 30: 1-10, 2010.
19. Ishida K, Matsumoto T, Sasaki K, Mifune Y, Tei K, Kubo S, Matsushita T, Takayama K, Akisue T, Tabata Y, Kurosaka M, Kuroda R: *Bone regeneration properties of granulocyte colony-stimulating factor via neovascularization and osteogenesis*. Tissue Eng. Part A 16: 3271-3284, 2010.
20. Ishige I, Nagamura-Inoue T, Honda MJ, Harnprasopwat R., Kido M, Sugimoto M, Nakauchi H, Tojo A: *Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord*. Int. J. Hematol. 90: 261-269, 2009.
21. Jäger M., Jelinek EM, Wess KM, Scharfstädt A, Jacobson M, Kevy SV, Krauspe R: *Bone marrow concentrate: a novel strategy for bone defect treatment*. Curr. Stem Cell Res. Ther. 4: 34-43, 2009.
22. Kasten P, Beyen I, Egermann M, Suda AJ, Moghaddam AA, Zimmermann G, Luginbühl R: *Instant stem cell therapy: characterization and concentration of human mesenchymal stem cells in vitro*. Eur. Cell Mater. 16: 47-55, 2008.
23. Katayama R, Wakitani S, Tsumaki N, Morita Y, Matsushita I, Gejo R, Kimura T: *Repair of articular cartilage defects in rabbits using CDMP1 gene-transfected autologous mesenchymal cells derived from bone marrow*. Rheumatology (Oxford) 43: 980-985, 2004.
24. Kuroda R, Matsumoto T, Miwa M, Kawamoto A, Mifune Y, Fukui T, Kawakami Y, Niikura T, Lee SY, Oe K, Shoji T, Kuroda T, Horii M, Yokoyama A, Ono T, Koibuchi, S. Kawamata S, Fukushima M, Kurosaka M, Asahara T: *Local Transplantation of G-CSF-Mobilized CD34(+) Cells in a Patient With Tibial Nonunion: A Case Report*. Cell Transplant. 20: 1491-1496, 2011.
25. Kurth TB, Dell'acchio F, Crouch V, Augello A, Sharpe PT, De Bari C: *Functional mesenchymal stem cell niches in adult mouse knee joint synovium in vivo*. Arthritis Rheum. 63: 1289-1300, 2011.
26. Lee KBL, Hui JHP, Song IC, Ardany L, Lee EH: *Injectable mesenchymal stem cell therapy for large cartilage defects--a porcine model*. Stem Cells 25: 2964-2971, 2007.
27. Liu, X, Li X, Fan Y, Zhang G, Li D, Dong W, Sha Z, Yu X, Feng Q, Cui F, Watari F: *Repairing goat tibia segmental bone defect using scaffold cultured with mesenchymal stem cells*. J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. 94: 44-52, 2010.

28. Madry H, Cucchiari M: *Clinical potential and challenges of using genetically modified cells for articular cartilage repair*. Croat. Med. J. 52: 245-261, 2011.
29. Malgieri A, Kantzari E, Patrizi MP, Gambardella S: *Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art*. Int. J. Clin. Exp. Med. 3: 248-269, 2010.
30. Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kutepov S, Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R: *Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study*. Tissue Eng. 13: 947-955, 2007.
31. Marmotti A, Castoldi F, Rossi R, Marengo S, Risso A, Ruella M, Tron A, Borrè A, Blonna D, Tarella C: *Bone marrow-derived cell mobilization by G-CSF to enhance osseointegration of bone substitute in high tibial osteotomy*. Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc., 2012 Aug 8. [Epub ahead of print].
32. Marmotti A, Mattia S, Bruzzone M, Buttiglieri S, Risso A, Bonasia DE, Blonna D, Castoldi F, Rossi R, Zanini C, Ercole E, Defabiani E, Tarella C, Peretti GM: *Mixed umbilical cord fragments as a source of cells for orthopaedic tissue engineering: an in vitro study*. Stem Cells Int. vol. 2012: 1-13, 2012.
33. Mifune Y, Matsumoto T, Kawamoto A, Kuroda R, Shoji T, Iwasaki H, Kwon SM, Miwa M, Kurosaka M, Asahara T: *Local delivery of granulocyte colony stimulating factor-mobilized CD34-positive progenitor cells using bioscaffold for modality of unhealing bone fracture*. Stem Cells 26: 1395-1405, 2008.
34. Nather A, David V, Teng JWH, Lee CW, Pereira BP: *Effect of autologous mesenchymal stem cells on biological healing of allografts in critical-sized tibial defects simulated in adult rabbits*. Ann. Acad. Med. Singap. 39: 599-606, 2010.
35. Quintavalla J, Uziel-Fusi S, Yin J, Boehnlein E, Pastor G, Blancuzzi V, Singh HN, Kraus KH, O'Byrne E, Pellas TC: *Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (MSCs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects*. Biomaterials 23: 109-119, 2002.
36. Sasaki K, Kuroda R, Ishida K, Kubo S, Matsumoto T, Mifune Y, Kinoshita K, Tei K, Akisue T, Tabata Y, Kurosaka M: *Enhancement of tendon-bone osteointegration of anterior cruciate ligament graft using granulocyte colony-stimulating factor*. Am. J. Sports Med. 36: 1519-1527, 2008.
37. Saw KY, Anz A, Merican S, Tay YG, Ragavanaidu K, Jee CSY, McGuire DA: *Articular cartilage regeneration with autologous peripheral blood progenitor cells and hyaluronic acid after arthroscopic subchondral drilling: a report of 5 cases with histology*. Arthroscopy 27: 493-506, 2011.
38. Spadaccio C, Rainer A, Trombetta M, Vadalá G, Chello M, Covino E, Denaro V, Toyoda Y, Genovese JA: *Poly-L-lactic acid/hydroxyapatite electrospun nanocomposites induce chondrogenic differentiation of human MSC*. Ann. Biomed. Eng. 37: 1376-1389, 2009.
39. Stiehler M, Seib FP, Rauh J, Goedecke A, Werner C, Bornhäuser M, Günther KP, Bernstein P: *Cancellous bone allograft seeded with human mesenchymal stromal cells: a potential good manufacturing practice-grade tool for the regeneration of bone defects*. Cytotherapy 12: 658-668, 2010.
40. Tipnis S, Viswanathan C, Majumdar AS: *Immunosuppressive properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: role of B7-H1 and IDO*. Immunol. Cell Biol. 88: 795-806, 2010.

41. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M: *Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees*. *Osteoarthr. Cartil.* 10: 199-206, 2002.
42. Wakitani S, Nawata M, Tensho K, Okabe T, Machida H, Ohgushi H: *Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees*. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 1: 74-79, 2007.
43. Wakitani S, Okabe T, Horibe S, Mitsuoka T, Saito M, Koyama T, Nawata M, Tensho K, Kato H, Uematsu K, Kuroda R, Kurosaka M, Yoshiya S, Hattori K, Ohgushi H: *Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months*. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 5: 146-150, 2011.
44. Wen Q, Ma L, Chen YP, Yang L, Luo W, Wang XN: *Treatment of avascular necrosis of the femoral head by hepatocyte growth factor-transgenic bone marrow stromal stem cells*. *Gene Ther.* 15: 1523-1535, 2008.
45. Wu X, Yang S, Duan D, Liu X, Zhang Y, Wang J, Yang C, Jiang S: *A combination of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor ameliorates steroid-associated osteonecrosis in rabbits*. *J. Rheumatol.* 35: 2241-2248, 2008.
46. Yasuhara R, Ohta Y, Yuasa T, Kondo N, Hoang T, Addya S, Fortina P, Pacifici M, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M: *Roles of  $\beta$ -catenin signaling in phenotypic expression and proliferation of articular cartilage superficial zone cells*. *Lab. Invest.* 91: 1739-1752, 2011.

## STRATEGIE TERAPEUTICHE PER L'EPATOCARCINOMA: LA CHIRURGIA RESETTIVA

*Lorenzo Capussotti, Fabio Forchino, Dario Ribero*

Divisione di Chirurgia Generale ed Oncologica  
Ospedale Mauriziano Umberto I - Torino

Parole chiave: *Hepatocellular carcinoma / Epatocarcinoma*  
*Hepatectomy / Epatectomia*  
*Liver resection / Resezione epatica*  
*Surgery / Chirurgia*

### **Abstract:**

Hepatocellular carcinoma (HCC) is an emerging disease because several reasons. Its incidence is steadily rising in most countries and its lethality remains high, making HCC the second leading cause of cancer-related mortality worldwide. A general consensus on the optimal treatment approach to patients with HCC has not been reached. In particular, despite the Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) guidelines, recently adopted by the European (EASL) and American (AASLD) societies for the study of liver diseases, liver resection remains the mainstay of curative therapy for HCC in patients with preserved liver function. The present study aims at critically evaluating the role of liver resection for HCC by analyzing available evidences from the literature.

Data indicate that in selected patients (i.e. those Child-Pugh A, without or with a mild or moderate portal hypertension and a future liver remnant of > 40% of the total liver volume with an ICG test at 15 minutes < 10) hepatic resection yields excellent long-term survival rates. In patient with transplantable HCC such results are similar to those obtained after liver transplantation (~ 60% a 5 years). In addition, evidences indicate that also “intermediate” or “advanced” HCCs can be successfully treated with liver resection. In such patients, 5 years survival estimates range from 29% to 58% which are far superior to those reported after palliative treatments. In conclusion, the role of liver resection should be re-considered since it represents the main treatment modality for most patients with preserved liver function.

### **Riassunto:**

L'epatocarcinoma (HCC) è una delle patologie neoplastiche emergenti a livello mondiale a causa della crescente incidenza osservata negli ultimi 20 anni e della alta letalità che ne fa, oggi, la seconda causa di morte per tumore.

Ciononostante, non è stata ancora raggiunta una unanimità di consenso su quale sia il migliore trattamento in numerose situazioni cliniche. Indipendentemente dalle linee guida proposte dalla Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) ed adottate dalle società epatologiche europea (EASL) ed americana (AASLD), la resezione epatica è in molti centri il cardine della strategia terapeutica nei pazienti con HCC e funzionalità epatica conservata. Il presente lavoro si propone di valutare criticamente il ruolo della resezione epatica nel trattamento dell'HCC analizzando i risultati a breve e lungo termine riportati nelle pubblicazioni più recenti della letteratura. I dati disponibili indicano che la resezione epatica permette di ottenere, in pazienti selezionati (Child-Pugh A, senza o con lieve o moderata ipertensione portale, e, in caso di epatectomia maggiore, con un volume di fegato residuo alla resezione prevista  $> 40\%$  del volume totale del fegato o con un ICG test a  $15' < 10$ ) risultati soddisfacenti, sovrapponibili, nei pazienti candidabili ad un trapianto, a quelli del trapianto stesso (circa  $60\%$  a 5 anni). Tuttavia, anche i cosiddetti "intermediate HCC" o "advanced HCC" sono candidabili ad un intervento resettivo in quanto i tassi di sopravvivenza a 5 anni, riportati essere tra il  $29\%$  e il  $58\%$ , sono incoraggianti e nettamente superiori a quelli ottenibili con i trattamenti palliativi. In conclusione, alla luce delle più recenti evidenze scientifiche la chirurgia deve essere considerata come il cardine nel trattamento dell'HCC se preceduta da una precisa e rigorosa selezione dei pazienti.

L'epatocarcinoma (HCC) è la più comune neoplasia maligna epatobiliare, al quinto posto per diffusione nel mondo con un'incidenza stimata di oltre 670.000 nuovi casi all'anno<sup>(19)</sup>. Nonostante i progressi terapeutici esso rappresenta, nella popolazione mondiale, la seconda causa di morte per tumore. Dati epidemiologici indicano inoltre che l'incidenza dell'HCC è in costante crescita. Stime attendibili prevedono che nel 2020 il numero di nuovi casi diagnosticati raggiungerà i 78.000 in Europa ed i 27.000 negli USA a fronte di tassi grezzi registrati nel 2008 di 65.000 e 21.000, rispettivamente<sup>(13)</sup>. Tale incremento è stato in gran parte attribuito alla diffusione epidemica del virus dell'epatite C e, in anni recenti, alla costante crescita del numero di casi di *nonalcoholic fatty liver disease* (NAFLD), la manifestazione epatica della sindrome metabolica, una condizione morbosa caratterizzata dalla presenza simultanea di alterazioni del metabolismo glucidico (diabete mellito tipo 2, intolleranza glucidica o iperglicemia a digiuno), di insulino-resistenza, di obesità centrale, di dislipidemia e di ipertensione arteriosa. Numerosi studi indicano oggi la NAFLD come la principale causa di epatopatia cronica in molti paesi occidentali. Non stupisce pertanto l'osservazione riportata in anni recenti che la sindrome metabolica rappresenta la principale causa di HCC in pazienti con cirrosi ad eziologia in passato considerata "non definita"<sup>(4,25,31)</sup>. La differente prevalenza dei vari fattori di rischio (virus dell'epatite B e C, abuso cronico di alcool, NAFLD, aflatossina B) determina però significative variazioni geografiche di incidenza. In Italia, nelle ultime decadi, si è assistito ad una progressiva diminuzione del numero di nuove diagnosi e dei tassi di mortalità correlata<sup>(1)</sup>. Secondo l'ultimo rapporto dell'AIRTUM, basato sui dati relativi al periodo 2003-2005<sup>(39)</sup>, nel nostro paese, il rischio cumulativo di avere una diagnosi di HCC nel corso della vita (fra 0 e 84 anni) è di 29,4‰ fra i maschi (1 caso ogni 34 uomini) e di 10,6‰ fra le femmine (1 caso ogni 94 donne).

Tra i trattamenti potenzialmente curativi per l'HCC la resezione epatica rappresenta a tutt'oggi quello di scelta nei pazienti con funzionalità epatica conservata in quanto la scarsa disponibilità di organi limita le indicazioni al trapianto ed i risultati delle tecniche di termoablazione appaiono comparabili a quelli della chirurgia solo nei pazienti con piccoli HCC ( $\leq 2$  cm). Pertanto, nonostante il ruolo affatto marginale attribuito alla chirurgia resettiva dall'algoritmo di trattamento concepito dagli epatologi della Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) ed adottato dall'European Association for the Study of the Liver (EASL)<sup>(2)</sup> e dall'American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)<sup>(3)</sup>, la resezione epatica continua ad essere in molti centri il cardine della strategia terapeutica nei pazienti con HCC<sup>(6,37)</sup>. Tale scelta è

stata, e continua ad essere determinata dal costante miglioramento dei risultati sia a breve sia a lungo termine delle epatectomie per HCC, miglioramento che è attribuibile a molteplici fattori. L'accuratezza diagnostica delle attuali metodiche di *imaging* ha reso più precisa la stadiazione preoperatoria e più attendibile il giudizio di operabilità. I progressi delle tecniche chirurgiche ed anestesologiche, la migliore gestione perioperatoria del paziente e l'uso sistematico dell'ecografia intraoperatoria hanno reso la resezione epatica un trattamento sicuro ed efficace. Nei paragrafi successivi verranno illustrati i criteri di selezione dei pazienti, analizzati i risultati a breve e lungo termine e puntualizzati alcuni aspetti tecnici delle resezioni epatiche per HCC.

### **SELEZIONE DEI PAZIENTI E RISULTATI A BREVE TERMINE**

Negli ultimi 20 anni, le complicanze post-resezione sono costantemente diminuite (30-40% nella maggior parte delle serie recenti) con una conseguente riduzione dei tassi di mortalità che in alcuni centri sono prossimi allo 0%<sup>(14)</sup>. Ciò è stato ottenuto grazie ad una meticolosa selezione dei pazienti candidati al trattamento chirurgico, selezione basata su criteri volti alla precisa determinazione della riserva funzionale epatica e delle patologie associate. Oggigiorno, devono essere considerati eleggibili ad un intervento resettivo esclusivamente i pazienti con una funzionalità epatica conservata, ossia Child-Pugh A. L'epatectomia in pazienti con una cirrosi severa (classi B o C di Child-Pugh) si associa infatti a tassi di morbilità e mortalità proibitivi. Nella nostra serie di 408 epatectomie per HCC su fegato cirrotico, eseguite tra il Gennaio 1990 ed il Giugno 2012, l'incidenza di complicanze e di decessi postoperatori nei 50 pazienti Child-Pugh B o C è stata significativamente superiore a quella osservata nei 358 pazienti Child-Pugh A (morbilità 64% versus 25.9%; mortalità: 20% versus 3.0%, rispettivamente;  $P < 0.001$ ) (dati non pubblicati). Tuttavia, la classificazione di Child-Pugh ha dei limiti di accuratezza nella previsione della riserva funzionale epatica ed altri parametri, quali il MELD score associato al valore del sodio sierico, possono essere considerati per una selezione più accurata<sup>(7)</sup>. Questa selezione risulta fondamentale nei pazienti candidati ad un'epatectomia maggiore, in cui un risultato del test di ritenzione al verde di indocianina a 15'  $\leq 10\%$  ed un volume di fegato residuo ("*future liver remnant*" - FLR) pari al 40% del volume totale del fegato risultano parametri imprescindibili per la sicurezza della resezione. Un FLR inadeguato espone infatti il paziente ad un elevato rischio di insufficienza epatica postoperatoria ed impone l'esecuzione di un'embolizzazione portale (PVE), procedura che attraverso l'occlusione dei rami portalari afferenti al fegato da resecare determina,

in un periodo di 3-6 settimane, un'ipertrofia dell'FLR stesso. Alcuni autori hanno ipotizzato che nei pazienti cirrotici l'ipertrofia indotta dalla PVE possa essere aumentata dall'esecuzione di una embolizzazione arteriosa selettiva che diminuendo l'iperafflusso arterioso al fegato embolizzato, occludendo possibili shunt arteroportalici ed aumentando l'insulto ischemico, potenzia lo stimolo rigenerativo dell'FLR. Tale ipotesi ha trovato conferma in studi clinici che hanno dimostrato come la chemoembolizzazione (TACE) eseguita mediamente 1-1.5 mesi prima della PVE determini un significativo incremento preoperatorio del volume dell'FLR rispetto alla sola PVE e, attraverso una maggiore necrosi tumorale, una più lunga sopravvivenza sia globale sia libera da malattia<sup>(29,41)</sup>.

Criterio di selezione ancora oggi controverso è la presenza di ipertensione portale che può essere valutata sia direttamente mediante la misurazione del gradiente pressorio sovraepatico sia indirettamente sulla base di segni clinico-radiologici quali la presenza di varici esofagee o di splenomegalia con piastrinopenia  $< 100.000/\text{mm}^3$ . L'algoritmo per il trattamento dell'HCC proposto dalla BCLC considera la presenza di ipertensione portale una controindicazione assoluta alla chirurgia in quanto l'ipertensione portale sembra aumentare in misura significativa il rischio di insufficienza epatica postoperatoria. Tuttavia, l'evidenza scientifica su cui si basa tale raccomandazione è bassa. Viceversa, studi recenti hanno dimostrato come la presenza di un'ipertensione portale lieve o moderata non debba essere considerata una controindicazione assoluta alla resezione epatica<sup>(5,10,18)</sup>. Nella nostra esperienza la presenza di ipertensione portale lieve-moderata, in pazienti con una funzionalità epatica conservata (Child-Pugh A), non determina un aumento della morbilità né del tasso di trasfusioni o della mortalità postoperatoria<sup>(5)</sup>.

Anche l'età avanzata non può essere considerata di per sé un criterio di esclusione dalla chirurgia resettiva. Nella casistica maturata nel nostro centro, infatti, l'*outcome* a breve termine dei pazienti operati con età superiore ai 70 anni è sovrapponibile a quello dei pazienti più giovani (tasso di morbilità: 23.4% versus 42.4% nei pazienti di età  $\leq 70$  anni; tasso di mortalità: 1.9% versus 5.1% nei pazienti di età  $\leq 70$  anni)<sup>(15)</sup>.

## **RISULTATI A LUNGO TERMINE**

Se un consenso unanime esiste oggi sui criteri di selezione dei pazienti per la chirurgia, le indicazioni oncologiche rimangono ancora vivacemente dibattute. Complessivamente, la sopravvivenza riportata dalle principali casistiche è del 47-70% a 3 anni e del 37-50% a 5 anni dalla resezione. Tuttavia, i risultati

a lungo termine variano in relazione alla presenza od assenza di alcune caratteristiche tumorali quali il diametro (> 5 o > 10 cm), il numero (singolo versus multiplo) e la presenza di invasione vascolare. Sulla base di questa osservazione le linee guida dell'EASL e dell'AASLD limitano il ruolo della resezione epatica al trattamento di nodi singoli di HCC di diametro  $\leq 5$ cm in assenza di invasione vascolare macroscopica. Ciononostante, nella maggior parte dei centri di chirurgia epatica avanzata, pazienti con HCC di grosse dimensioni, multinodulari o con invasione vascolare, i cosiddetti “*intermediate HCC*” (BCLB B) o “*advanced HCC*” (BCLC C), vengono regolarmente sottoposti ad intervento resettivo<sup>(6,37)</sup>. Tale atteggiamento è supportato da numerosi dati che dimostrano un miglioramento della sopravvivenza dopo chirurgia radicale rispetto ai soli trattamenti palliativi proposti dalle linee guida epatologiche (Tabella 1). In particolare, in un recente studio condotto su 2049 pazienti trattati in 9 centri, incluso il nostro, in Europa, America ed Asia, centri afferenti al gruppo di studio “HCC East-West Study Group”, la sopravvivenza a 1, 3, e 5 anni dei 737 pazienti BCLC B, ossia quelli con nodo

Autore	Anno	Classe BCLC	n° pazienti	sopravvivenza 3-aa (%)	sopravvivenza 5-aa (%)	Mortalità postop (%)
Minagawa <sup>(27)</sup>	2001	C	18	42	42	5
Ng <sup>(28)</sup>	2005	B	380	50	39	2.4
Chirica <sup>(9)</sup>	2008	B + C	20	56	45	5
Ishizawa <sup>(18)</sup>	2008	B <sup>§</sup>	105	72	58	0
Wang <sup>(38)</sup>	2008	B	243	64	50	–
		C	14	29	29	–
Inoue <sup>(17)</sup>	2009	C	49	44	40	0
Torzilli <sup>(37)</sup>	2012	B	737	71	57	3.1
		C	297	49	38	2.5

<sup>§</sup>inclusi solo pazienti con tumori multipli.

Tabella 1. Risultati della chirurgia nei pazienti al di fuori delle linee guida EASL/AASLD.

singolo di diametro > 5 cm o nodi multipli, è risultata dell'88%, 71% e 57%, rispettivamente<sup>(37)</sup>. In tali pazienti, nonostante che la chirurgia sia considerata più complessa<sup>(28)</sup>, la mortalità a 90 giorni è stata del 3%, sovrapponibile a quella (2%) ottenuta nei pazienti con HCC iniziale (nodo singolo < 5 cm o 2-3 nodi di diametro < 3 cm).

Una cenno particolare meritano 2 aspetti clinici importanti, ossia la presenza di un cospicuo volume tumorale o di invasione vascolare. Nonostante la diffusione di programmi di screening in pazienti affetti da cirrosi epatica, frequente è ancora il riscontro di HCC di voluminose dimensioni (10 cm è il *cut-off* più frequentemente utilizzato). I dati della letteratura riportano, dopo chirurgia in pazienti con HCC > 10 cm, tassi di mortalità compresi tra il 2% e il 5% e tassi di morbidità del 28-40%. Tali risultati, in studi di confronto diretto, si sono dimostrati sovrapponibili a quelli ottenuti dopo resezione per HCC più piccoli<sup>(16,33,40)</sup>. Anche la sopravvivenza a lungo termine, sebbene inferiore a quella osservata in HCC di dimensioni inferiori, è largamente superiore a quella ottenibile con terapie palliative quali la TACE od il sorafenib. In uno studio multicentrico giapponese su 26012 pazienti resecati per HCC, la sopravvivenza a 5 anni nei gruppi di pazienti con HCC ≤ 2 cm (n = 5.017), tra 2 e 5 cm (n = 13.896), tra 5 e 10 cm (n = 4.972), e ≥ 10 cm (n = 2.127) è stata del 68%, 55%, 42% e 32% rispettivamente<sup>(16)</sup>.

L'HCC ha una spiccata propensione alla invasione vascolare venosa e frequente ne è il riscontro a livello microscopico, con una incidenza che aumenta progressivamente con l'aumentare delle dimensioni del tumore, passando dal 25% negli HCC ≤ 3 cm al 63% in quelli > 6.5 cm<sup>(32)</sup>. Meno frequente è invece l'invasione vascolare macroscopica con trombosi dei rami portali o sovraepatici di I-III ordine. Nelle serie chirurgiche pubblicate in letteratura l'incidenza di trombosi macroscopica varia dal 5 al 15%. Per lungo tempo considerata una controindicazione assoluta alla chirurgia resettiva, la presenza di invasione vascolare macroscopica ha perso oggi molta della sua importanza come criterio di selezione. Infatti, il tasso di sopravvivenza a 5 anni dei pazienti sottoposti a chirurgia nonostante la presenza di trombosi macroscopicamente evidente varia dal 10 al 40%. Nella serie multicentrica dell'"HCC East-West Study Group"<sup>(37)</sup> la sopravvivenza a 1, 3, e 5 anni dei 297 pazienti BCLC C, ossia quelli con invasione vascolare macroscopica, è stata del 76%, 49% e 38% rispettivamente. Tassi di sopravvivenza differenti sono tuttavia riportati in funzione della localizzazione della trombosi all'interno delle diverse diramazioni dell'albero vascolare epatico. Nello studio Giapponese prima citato<sup>(16)</sup>, la sopravvivenza a lungo termine decresce progressivamente con l'estensione centrale del trombo neoplastico: 38% a 5

anni nei 1987 pazienti con trombosi localizzata nelle ramificazioni portali di III ordine; 23.8% nei 822 pazienti con estensione ai rami portali di II ordine; e 18.4% nei 976 pazienti con interessamento dei rami di I ordine o del tronco portale. Il coinvolgimento del tronco portale principale rimane ad oggi l'aspetto più controverso essendovi in letteratura dati contrastanti variabili dallo 0% a poco più di un anno dall'intervento<sup>(20)</sup> al 40% a 5 anni in quelli sottoposti a resezione dopo TACE<sup>(27)</sup>.

## CHIRURGIA RESETTIVA E TRAPIANTO

Al di là dei risultati sopra riportati, il ruolo della chirurgia resettiva nel trattamento dell'HCC viene definito anche dal confronto con i risultati del trapianto. Infatti, il trapianto di fegato rappresenta teoricamente il miglior trattamento possibile essendo in grado di curare, in un unico tempo, tanto l'epatopatia cronica quanto l'HCC. Numerosi studi hanno dimostrato come i migliori risultati oncologici vengano ottenuti trapiantando pazienti con HCC iniziali (nodo singolo < 5 cm o 2-3 nodi ciascuno dei quali non superiore ai 3 cm in assenza di invasione vascolare o metastasi a distanza – i cosiddetti criteri di Milano)<sup>(26)</sup>. Tuttavia, la carenza di donatori d'organo ed i lunghi tempi di attesa in lista limitano spesso la tempestiva attuazione del trapianto che comporta per i pazienti un rischio progressivamente maggiore di crescita del tumore e, quindi, di esclusione dalla lista di attesa, o *drop-out*, che raggiunge il 25% dei pazienti inizialmente inclusi quando il tempo d'attesa arriva ai 12 mesi. Conseguentemente, gli eccellenti risultati riportati nelle esperienze iniziali di trapianto (70% a 5 anni)<sup>(26)</sup> sono stati ridimensionati con l'inclusione dei dati di sopravvivenza dei pazienti usciti dalla lista. Nelle analisi *intention-to-treat* la sopravvivenza dopo trapianto è di circa il 60% a 5 anni<sup>(22)</sup>, sostanzialmente sovrapponibile a quella delle resezioni negli stessi pazienti (60-70%)<sup>(11,24,34)</sup>. Una recente metanalisi ha confermato questi dati e sottolineato come la sopravvivenza a 1 anno sia significativamente più alta nei pazienti sottoposti a resezione epatica, quella a 5 anni risulti sovrapponibile nei due gruppi, mentre quella a 10 anni sia significativamente più alta nei soggetti trapiantati<sup>(36)</sup>. Pertanto, nei pazienti con funzionalità epatica preservata candidabili sia alla resezione che al trapianto l'integrazione sequenziale delle due metodiche può risultare la strategia più appropriata per ottimizzare i risultati e le risorse. In questi pazienti infatti la resezione epatica può essere il trattamento iniziale di scelta, seguito dal trapianto nel caso di recidiva; questa sequenza terapeutica è stato dimostrato essere fattibile in quanto fino all'80% dei pazienti con recidiva risultano essere ancora candidabili al trapianto<sup>(35)</sup>,

ed estremamente efficace in termini di sopravvivenza (87% a 5 anni dalla resezione epatica)<sup>(8)</sup>.

## TECNICA CHIRURGICA

In considerazione della frequenza con cui l'HCC invade il sistema venoso portale determinando una disseminazione neoplastica retrograda, alcuni autori giapponesi hanno teorizzato che le resezioni anatomiche, le cosiddette "subsegmentectomie sistematiche", potessero essere interventi oncologicamente più appropriati garantendo l'asportazione di tutto il parenchima epatico vascolarizzato dal ramo portale tributario al tumore<sup>(23)</sup>. Numerosi studi clinici hanno confermato un beneficio in termini di sopravvivenza globale e *disease-free* dopo resezione anatomica rispetto a quella non anatomica mentre altri non hanno osservato differenze significative. Il più importante studio fino ad oggi pubblicato in letteratura riporta i risultati dell'analisi retrospettiva di una serie multicentrica giapponese di 5781 pazienti con HCC singolo. In questo studio gli autori dimostrano un beneficio di sopravvivenza per le resezioni anatomiche esclusivamente nei pazienti con HCC di diametro compreso tra i 2 e i 5 cm<sup>(12)</sup>. Ciononostante, la maggior parte dei chirurghi consiglia di eseguire, ogniqualvolta possibile e per qualsivoglia tumore, una resezione anatomica.

Problematiche tecniche del tutto peculiari sono poste dai grossi HCC. Nel caso di voluminose neoplasie localizzate nel lobo epatico destro, la resezione con tecnica tradizionale espone il paziente ad un rischio di sanguinamento per la frequente presenza di aderenze vascolarizzate, di rottura del tumore che è di consistenza ridotta rispetto al parenchima non tumorale, di disseminazione di cellule neoplastiche per via venosa e di instabilità emodinamica nel corso delle manovre di mobilizzazione del fegato. Al fine di minimizzare questi rischi, alcuni anni fa è stata introdotta la tecnica dell'approccio anteriore che consiste nell'esecuzione precoce della sezione parenchimale subito dopo il controllo vascolare all'ilo. La mobilizzazione del lobo destro avviene solo al termine dell'intervento dopo aver ottenuto il controllo delle vene sovraepatiche. Un recente studio randomizzato ha confermato questi vantaggi e dimostrato che i pazienti trattati con l'approccio anteriore hanno una sopravvivenza mediana più lunga rispetto a quelli sottoposti ad epatectomia con tecnica convenzionale (> 68.1 mesi versus 22.6 mesi,  $P = 0.006$ )<sup>(21)</sup>. Per rendere più agevole la fase parenchimale e per facilitare il controllo di un eventuale sanguinamento dalla parte più profonda della trancia di sezione, può essere eseguita la *liver hanging maneuver*, una manovra di sospensione del fegato ottenuta

trazionando una fettuccia passato tra la superficie anteriore della vena cava inferiore ed il fegato. Il passaggio “alla cieca” della fettuccia lungo lo spazio avascolare localizzato in corrispondenza della faccia anterolaterale destra della cava retroepatica, rappresenta l’aspetto tecnico più impegnativo. Belghiti e colleghi<sup>(30)</sup> hanno da poco riportano la loro esperienza di 201 *liver hanging maneuver* dimostrando che tale procedura è fattibile in oltre il 90% dei casi e sempre sicura associandosi ad un rischio minimo di sanguinamento (2% dei casi), che, nell’esperienza degli autori, è sempre autolimitantesi.

## CONCLUSIONI

Una meticolosa selezione dei pazienti candidati ad una epatectomia per HCC permette di ottenere ottimi risultati postoperatori in termini di mortalità, morbidità e sopravvivenza a lungo termine, riaffermando il ruolo centrale della resezione epatica nel trattamento di questa patologia.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bosetti C, Boffetta P, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C: *Trends in mortality from hepatocellular carcinoma in Europe, 1980-2004*. Hepatology 2008; 48: 137-145.
2. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, Christensen E, Pagliaro L, Colombo M, Rodes J, for the EASL panel of expert on HCC: *Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference*. J. Hepatol. 2001; 35: 421-430.
3. Bruix J, Sherman M: *American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma: an update*. Hepatology 2011; 53: 1020-1022.
4. Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Crucci P, Musso A, De Polis P, Capussotti L, Salizzoni M, Rizzetto M: *Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology 2002; 123: 134-140.
5. Capussotti L, Ferrero A, Vigano L, Muratore A, Polastri R, Bouzari H: *Portal hypertension: contraindication to liver surgery?* W. J. Surg. 2006; 30: 992-999.

6. Capussotti L, Ferrero A, Viganò L, Polastri R, Tabone M: *Liver resection for HCC with cirrhosis: surgical perspectives out of EASL/AASLD guidelines*. Eur. J. Surg. Oncol. 2009; 35: 11-15.
7. Cescon M, Cucchetti A, Grazi GL, Ferrero A, Viganò L, Ercolani G, Zanello M, Ravaioli M, Capussotti L, Pinna AD: *Indication of the extent of hepatectomy for hepatocellular carcinoma on cirrhosis by a simple algorithm based on preoperative variables*. Arch. Surg. 2009; 144: 57-63.
8. Cherqui D, Laurent A, Mocellin N, Tayar C, Luciani A, Van Nhieu JT, Decaens T, Hurtova M, Memeo R, Mallat A, Duvoux C: *Liver resection for transplantable hepatocellular carcinoma: long-term survival and role of secondary liver transplantation*. Ann. Surg. 2009; 250: 738-746.
9. Chirica M, Scatton O, Massault PP, Aloia T, Randone B, Dousset B, et al: *Treatment of Stage IVA hepatocellular carcinoma. Should we reappraise the role of surgery?* Arch. Surg. 2008; 143: 538-543.
10. Cucchetti A, Ercolani G, Vivarelli M, Cescon M, Ravaioli M, Ramacciato G, Grazi GL, Pinna AD: *Is portal hypertension a contraindication to hepatic resection?* Ann. Surg. 2008; 250: 922-928.
11. Del Gaudio M, Ercolani G, Ravaioli M, Cescon M, Lauro A, Vivarelli M, Zanello M, Cucchetti A, Vetrone G, Tuci F, Ramacciato G, Grazi GL, Pinna AD: *Liver transplantation for recurrent hepatocellular carcinoma on cirrhosis after liver resection: University of Bologna experience*. Am. J. Transplant. 2008; 8: 1177-1185.
12. Eguchi S, Kanematsu T, Arii S, Okazaki M, Okita K, Omata M, Ikai I, Kudo M, Kojiro M, Makuuchi M, Monden M, Matsuyama Y, Nakanuma Y, Takayasu K; Liver Cancer Study Group of Japan: *Comparison of the outcomes between an anatomical subsegmentectomy and a non-anatomical minor hepatectomy for single hepatocellular carcinomas based on a Japanese nationwide survey*. Surgery 2008; 143: 469-475.
13. European Association for Study of Liver; European Organisation for Research and Treatment of Cancer: *EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma*. Eur. J. Cancer 2012; 48: 599-641.
14. Fan ST, Lo CM, Liu CL, Lam CM, Yuen WK, Yeung C, Wong J: *Hepatectomy for hepatocellular carcinoma: toward zero hospital deaths*. Ann. Surg. 1999; 229: 322-330.
15. Ferrero A, Viganò L, Polastri R, Ribero D, Lo Tesoriere R, Muratore A, Capussotti L: *Hepatectomy as treatment of choice for hepatocellular carcinoma in elderly cirrhotic patients*. World J. Surg. 2005; 29: 1101-1105.
16. Ikai I, Arii S, Okazaki M, Okita K, Omata M, Kojiro M, Takayasu K, Nakanuma Y, Makuuchi M, Matsuyama Y, Monden M, Kudo M: *Report of the 17th Nationwide Follow-up Survey of Primary Liver Cancer in Japan*. Hepatol. Res. 2007; 37: 676-691.
17. Inoue Y, Hasegawa K, Ishizawa T, Aoki T, Sano K, Beck Y, Imamura H, Sugawara Y, Kokudo N, Makuuchi M: *Is there any difference in survival according to the portal tumor thrombectomy method in patients with hepatocellular carcinoma?* Surgery 2009; 145: 9-19.
18. Ishizawa T, Hasegawa K, Aoki T, Takahashi M, Inoue Y, Sano K, Imamura H, Sugawara Y, Kokudo N, Makuuchi M: *Neither multiple tumors nor portal hypertension are surgical contraindications for hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology 2008; 134 (7): 1908-1916.

19. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: *Global cancer statistics*. *Ca. Cancer J. Clin.* 2011; 61: 69-90.
20. Kondo K, Chijiwa K, Kai M, Otani K, Nagaïke K, Ohuchida J, Hiyoshi M, Nagano M: *Surgical strategy for hepatocellular carcinoma patients with portal vein tumor thrombus based on prognostic factors*. *J. Gastrointest. Surg.* 2009; 13: 1078-1083.
21. Liu CL, Fan ST, Lo CM, Tung-Ping Poon R, Wong J: *Anterior approach for major right hepatic resection for large hepatocellular carcinoma*. *Ann. Surg.* 2000; 232: 25-31.
22. Llovet JM, Fuster J, Bruix J: *Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation*. *Hepatology* 1999; 30: 1434-1440.
23. Makuuchi M, Hasegawa H, Yamazaki S: *Ultrasonically guided subsegmentectomy*. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1986; 161: 346-350.
24. Margarit C, Escartin A, Castells L, Vargas V, Allende E, Bilbao I: *Resection for hepatocellular carcinoma is a good option in Child-Turcotte-Pugh class A patients with cirrhosis who are eligible for liver transplantation*. *Liver Transpl.* 2005; 11: 1242-1251.
25. Marrero JA, Fontana RJ, Su GL, Conjeevaram HS, Emick DM, Lok AS: *NAFLD may be a common underlying liver disease in patients with hepatocellular carcinoma in the United States*. *Hepatology* 2002; 36: 1349-1354.
26. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, Montalto F, Ammatuna M, Morabito A, Gennari L: *Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis*. *N. Eng. J. Med.* 1996; 334: 693-699.
27. Minagawa M, Makuuchi M: *Treatment of hepatocellular carcinoma accompanied by portal vein tumor thrombus*. *World J. Gastroenterol.* 2006; 12: 7561-7567.
28. Ng KK, Vauthey JN, Pawlik TM, Lauwers GY, Regimbeau JM, Belghiti J, Ikai I, Yamaoka Y, Curley SA, Nagorney DM, Ng IO, Fan ST, Poon RT; International Cooperative Study Group on Hepatocellular Carcinoma. *Is hepatic resection for large or multinodular hepatocellular carcinoma justified? Results from a multi-institutional database*. *Ann. Surg. Oncol.* 2005; 12: 364-373.
29. Ogata S, Belghiti J, Farges O, Varma D, Sibert A, Vilgrain V: *Sequential arterial and portal vein embolizations before right hepatectomy in patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma*. *Br. J Surg.* 2006; 93: 1091-1098.
30. Ogata S, Belghiti J, Varma D, Sommacale D, Maeda A, Dondero F et al: *Two hundred liver hanging maneuvers for major hepatectomy-A Single-Center Experience*. *Ann. Surg.* 2007; 245: 31-35.
31. Paradis V, Zelinski S, Chelbi E, Guedj N, Degos F, Vigrain V, Bedossa P, Belghiti J: *Hepatocellular carcinoma in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis: a pathological analysis*. *Hepatology* 2009; 49: 851-859.
32. Pawlik TM, Delman KA, Vauthey JN, Nagorney DM, Ng IO, Ikai I, Yamaoka Y, Belghiti J, Lauwers GY, Poon RT, Abdalla EK: *Tumor size predicts vascular invasion and histologic grade: Implications for selection of surgical treatment for hepatocellular carcinoma*. *Liver Transpl.* 2005; 11: 1086-1092.
33. Pawlik TM, Poon RT, Abdalla EK, Zorzi D, Ikai I, Curley SA, Nagorney DM, Belghiti J, Ng IO, Yamaoka Y, Lauwers GY, Vauthey JN; International Cooperative Study Group on

- Hepatocellular Carcinoma: *Critical appraisal of the clinical and pathologic predictors of survival after resection of large hepatocellular carcinoma*. Arch. Surg. 2005; 140: 450-457.
34. Poon RTP, Fan ST, Lo CM, Liu CL, Wong J: *Difference in tumor invasiveness in cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma fulfilling the Milan criteria treated by resection and transplantation. Impact on long-term survival*. Ann. Surg. 2007; 245: 51-58.
  35. Poon RTP, Fan ST, Lo CM, Liu CL, Wong J: *Long term survival and pattern of recurrence after resection of small hepatocellular carcinoma in patients with preserved liver function. Implications for a strategy of salvage transplantation*. Ann. Surg. 2002; 235: 373-382.
  36. Rahman A, Assifi MM, Pedroso FE, Maley WR, Sola JE, Lavu H, Winter JM, Yeo CJ, Konaris LG: *Is resection equivalent to transplantation for early cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma? A meta-analysis*. J. Gastrointest. 2012 (Epub ahead of print).
  37. Torzilli G, Belghiti J, Kokudo N, Takayama T, Capussotti L, Nuzzo J, Vauthey JN, Choti MA, De Santibanes E, Donadon M, Morengi E, Makuuchi M: *A snapshot of the effective indications and results of surgery for hepatocellular carcinoma in tertiary referral centres: is it adherent to the Barcelona Clinic Liver Cancer recommendations? An observational study of the HCC east-west study group*. Ann. Surg. in press
  38. Wang JH, Changchien CS, Hu TH, Lee CM, Kee KM, Lin CY, et al: *The efficacy of treatment schedules according to Barcelona Clinic Liver Cancer staging for hepatocellular carcinoma - Survival analysis of 3892 patients*. Eur. J. Cancer 2008; 44: 1000-1006.
  39. Web site: <http://www.registri-tumori.it/PDF/AIRTUM2009Incidenza> ultimo accesso 3/8/2012.
  40. Yamashita Y, Taketomi A, Shirabe K, Aishima S, Tsujita E, Morita K, Kayashima H, Maehara Y: *Outcomes of hepatic resection for huge hepatocellular carcinoma ( $\geq 10$  cm in diameter)*. J. Surg. Oncol. 2011; 104: 292-298.
  41. Yoo H, Kim JH, Ko GY, Kim KW, Gwon DI, Lee SG, Hwang S: *Sequential transcatheter arterial chemoembolization and portal vein embolization versus portal vein embolization only before major hepatectomy for patients with hepatocellular carcinoma*. Ann. Surg. Oncol. 2011; 18: 1251-1257.

## EPATOCARCINOMA: STRATEGIE TERAPEUTICHE

*Mauro Salizzoni, Gianluca Paraluppi, Paolo Strignano*

Centro Trapianto di Fegato - Chirurgia Generale 8  
Azienda Ospedaliera Città della Salute e della Scienza di Torino

Key words: *Hepatocellular carcinoma / Epatocarcinoma*  
*Liver transplantation / Trapianto di fegato*

### **Abstract:**

Hepatocellular carcinoma is the most frequent liver cancer; in most cases it is secondary to cirrhosis. Many therapeutic options are now available and they depend essentially on tumor size and staging. Liver transplantation is the only treatment both of cirrhosis and tumor. It is a curative approach for patients with advanced hepatocellular carcinoma without extrahepatic metastases (Milan criteria). If liver transplantation contraindicated, surgical liver resection or percutaneous tumor necrosis should be investigated.

### **Riassunto:**

L'epatocarcinoma è la più frequente neoplasia primitiva epatica ed insorge nella maggior parte dei casi su fegato cirrotico. Le opzioni terapeutiche sono molteplici e vengono scelte in base allo stadio della malattia (numero e dimensione e dei nodi) ed alla gravità della cirrosi. Fra queste il trapianto di fegato risulta l'unico trattamento in grado di risolvere, oltre alla neoplasia, anche la cirrosi sottostante; tale procedura viene attualmente indicata nei casi di epatocarcinoma con stadiazione relativamente limitata (criteri di Milano). Nei casi in cui il trapianto non sia proponibile (per stadiazione di malattia o per controindicazioni generali del paziente) si può effettuare la resezione chirurgica del tumore o ottenere la sua necrosi mediante trattamenti ablativi loco-regionali.

L'epatocarcinoma (HCC) rappresenta la sesta neoplasia in ordine di frequenza nel mondo e la terza causa di morte per tumore. Insorge nel 90% dei casi su fegato cirrotico e solo in una minima quota su fegato sano. L'incidenza annuale di HCC nei pazienti cirrotici è del 3-5%. I trattamenti ad "intento curativo", possibili solo nel 30% dei casi, sono rappresentati dalla resezione epatica, dalle procedure loco-regionali (radiofrequenza, micro-onde, alcolizzazione, chemioembolizzazione) e dal trapianto di fegato (LT). Bisogna sottolineare come il trapianto di fegato sia l'unica procedura in grado di trattare sia la cirrosi che l'epatocarcinoma: tutte le altre strategie terapeutiche hanno come obiettivo l'asportazione e/o la necrosi del tumore senza, ovviamente, poter migliorare l'evoluzione naturale della cirrosi. Nel corso degli ultimi decenni si è assistito ad un progressivo cambiamento delle indicazioni al LT per HCC: negli anni '80 venivano sottoposti a trapianto pazienti con grossi tumori (incluse forme infiltranti) non resecabili chirurgicamente, con scarsi risultati in termini di sopravvivenza per l'elevata frequenza di recidiva neoplastica (sopravvivenza a 5 anni 18%). Eccellenti risultati si ottennero poi negli anni '90 con il trapianto di fegato in caso di HCC incidentale (quindi con bassa stadiazione). I criteri di Milano, pubblicati nel 1996, ancora oggi costituiscono il riferimento per quanto riguarda l'indicazione al LT in caso di HCC: 1 nodo con diametro < 5 cm o fino a 3 nodi ciascuno di diametro massimo < 3 cm. Rispettando tali criteri gli autori hanno riportato una sopravvivenza a 4 aa post-LT dell'85% con un tasso di recidiva pari all'8% a 26 mesi<sup>(1)</sup>. Successivamente, a inizio millennio, si sono affermati due concetti fondamentali nell'evoluzione clinica dell'HCC:

- 1) la recidiva dopo trapianto avviene nella maggior parte dei casi per diffusione ematogena<sup>(4)</sup>
- 2) il grado di invasione vascolare è il fattore che maggiormente influenza la recidiva post-trapianto<sup>(3)</sup>.

La maggior specificità diagnostica, l'esperienza chirurgica ed il miglioramento dei risultati ottenuti hanno condotto a vari tentativi per poter "allargare" i criteri di Milano, allo scopo di offrire il trapianto ad un numero sempre maggiore di pazienti garantendo gli stessi risultati in termini di recidiva e sopravvivenza. Tra questi ricordiamo i criteri di San Francisco (UCSF criteria) che prevedono il trapianto in caso di nodo unico con diametro < 6.5 cm oppure 2-3 lesioni con diametro < 4.5 e con volume totale del tumore < 8.5 cm<sup>(2)</sup>. Il centro di Torino continua a tutt'oggi a seguire i criteri di Milano (con attuale sopravvivenza post-LT a 5 aa del 75%) pur tenendo in considerazione che l'allargamento dei criteri di inclusione sia auspicabile

anche grazie al “downstaging” radiologico (procedure loco-regionali di trattamento dell’HCC) che, verosimilmente, permette di selezionare tumori oncologicamente meno aggressivi. La resezione epatica viene riservata per i casi in cui il trapianto risulta controindicato (per stadiazione, età, invasione vascolare macroscopica), per il trattamento di tumori non altrimenti curabili (nodi di grosse dimensioni, pedunculati, esofitici) oppure, in casi molto selezionati, come metodica “ponte” verso il trapianto.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, Montalto F, Ammatuna M, Morabito A, Gennari L: *Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis*. N. Engl. J. Med. 1996; 334: 693-699.
2. Pons F, Varela M, Llovet JM: *Staging systems in hepatocellular carcinoma*. HPB (Oxford) 2005; 7: 35-41.
3. Salizzoni M, Romagnoli R, Lupo F, David E, Mirabella S, Cerutti E, Ottobrelli A: *Microscopic vascular invasion detected by anti-CD34 immunohistochemistry as a predictor of recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation*. Transplantation 2003; 76: 844-848.
4. Schlitt HJ, Neipp M, Weimann A, Oldhafer KJ, Schmoll E, Boeker K, Nashan B, Kubicka S, Maschek H, Tusch G, Raab R, Ringe B, Manns MP, Pichlmayr R: *Recurrence patterns of hepatocellular and fibrolamellar carcinoma after liver transplantation*. J. Clin. Oncol. 1999; 17: 324-331.

## FATTORI DI RISCHIO PER LA RECIDIVA LOCALE DOPO TRANSANAL ENDOSCOPIC MICROSURGERY PER NEOPLASIE DEL RETTO EXTRAPERITONEALE

*Mario Morino, Marco Ettore Allaix  
Federico Famiglietti, Simone Arolfo*

Digestive Surgery and Centre for Minimal Invasive Surgery  
University of Torino - Italy

Key words: *Transanal endoscopic / Microchirurgia endoscopica  
microsurgery transanale  
Adenoma / Adenoma  
Adenocarcinoma / Adenocarcinoma  
Recurrence / Recidiva  
Risk factors / Fattori di rischio*

### **Abstract:**

*Background.* Indications and results of local excision of rectal lesions are currently under debate. TEM, allowing to perform a precise full thickness excision, could improve oncologic results in early rectal tumors.

*Methods.* A prospective database was analysed with the intent to identify risk factors for recurrence after TEM.

*Results.* Between January 1993 and July 2010, 293 patients with a rectal adenoma  $\geq 3$  cm underwent TEM. Postoperative morbidity rate was 7.2% (21/293), no 30-day mortality was observed. Over a median follow-up period of 110 (range, 12-216) months, 13 patients (5.6%) were diagnosed a local recurrence: 76.9% of recurrences were detected within 12 months after TEM. At univariate analysis, tumor diameter ( $p = 0.007$ ), and positive margins ( $p < 0.001$ ) demonstrated to be significant risk factors, while the multivariate analysis indicated as only independent predictor of recurrence the presence of positive margins ( $p = 0.003$ ).

During the same period 107 patients underwent TEM for adenocarcinoma: 48 pT1, 43 pT2 and 16 pT3. Mortality was nil, morbidity was 5.6%. Media follow-up was 54.2 months (range 12-164), follow-up rate was 100%. The 5-year disease-free survival rate was 85.9%, 78.4% and 49.4% for pT1, pT2 and pT3 respectively ( $p=0.006$ ). Recurrence rate was 0% (0/26) in pT1 sm1 cancers and 22.7% (5/22) in sm2-3 ( $p < 0.05$ ). At univariate analysis, diameter, sm stage, pT stage, tumour grading, margin infiltration, and lympho-vascular invasion demonstrated a statistically significance.

The multivariate analysis indicated as independent predictors of recurrence sm stage, pT stage and tumour grading.

*Conclusions.* TEM represents an effective curative treatment for large rectal adenomas and pT1 sm1 rectal malignancies.

### **Riassunto:**

*Introduzione.* Le indicazioni e i risultati dell'escissione locale delle neoplasie rettali sono tuttora oggetto di valutazione. La transanal endoscopic microsurgery (TEM), consentendo una precisa escissione a tutto spessore, sembrerebbe migliorare i risultati oncologici delle neoplasie del retto in fase iniziale.

*Metodi.* Un database prospettico è stato analizzato con l'obiettivo di identificare i fattori di rischio per la recidiva dopo TEM.

*Risultati.* Tra Gennaio 1993 e Luglio 2010, 293 pazienti affetti da adenoma del retto  $\geq 3$  cm sono stati sottoposti a TEM. Il tasso di morbilità postoperatoria è stato 7.2%; la mortalità nulla. Durante un periodo mediano di follow-up di 110 (range, 12-216) mesi, una recidiva locale è stata diagnosticata in 13 pazienti (5.6%): il 76.9% delle recidive si è verificato entro 12 mesi dalla TEM. L'analisi univariata ha evidenziato come fattori di rischio il diametro della neoplasia ( $p = 0.007$ ) e la presenza di margini di exeresi positivi ( $p < 0.001$ ), quest'ultima confermata all'analisi multivariata come unico fattore predittivo indipendente per la recidiva ( $p = 0.003$ ). Durante lo stesso periodo di tempo, 107 pazienti sono stati sottoposti a TEM per adenocarcinoma: 48 pT1, 43 pT2 e 16 pT3. La mortalità è stata nulla, il tasso di morbilità 5.6%. Durante un periodo mediano di follow-up di 39.5 mesi (range, 12-164), il tasso di sopravvivenza libera da malattia a 5 anni è stato 85.9%, 78.4% e 49.4% per pT1, pT2 e pT3 rispettivamente ( $p = 0.006$ ). Il tasso di recidiva è stato 0% (0/26) nei pT1sm1 e 22.7% (5/22) nei sm2-3 ( $p < 0.05$ ). All'analisi univariata, il diametro, la classificazione sm, il parametro T, il grado di differenziazione tumorale, l'infiltrazione dei margini di exeresi e l'invasione linfo-vascolare erano fattori di rischio per la recidiva locale. L'analisi multivariata ha indicato come predittori indipendenti di recidiva la classificazione sm, il parametro T e il grado di differenziazione tumorale.

*Conclusioni.* La TEM rappresenta una modalità di trattamento sicura ed efficace per i voluminosi adenomi e gli adenocarcinomi pT1 sm1.

## INTRODUZIONE

L'obiettivo della chirurgia oncologica è di ottenere il massimo controllo della malattia tumorale in associazione alla preservazione della funzionalità dell'organo e della qualità di vita. Nell'ambito delle neoplasie del retto, la chirurgia addominale con Total Mesorectal Excision (TME) rappresenta il trattamento di scelta. Tuttavia, essa è associata ad elevati tassi di morbilità, incluse disfunzioni genito-urinarie (30-40%)<sup>(11,19,22,32)</sup>, deiscenze anastomotiche (5-17%)<sup>(23)</sup> e alterazioni dell'alvo<sup>(13)</sup>, oltre a complicanze correlate alla presenza di una stomia fino nel 66% dei casi<sup>(33)</sup>.

Un approccio transanale alle neoplasie del retto, quando indicato, riduce questi rischi e migliora i risultati funzionali. Tuttavia, l'escissione transanale tradizionale è caratterizzata da elevati tassi di malattia residua o di recidiva precoce<sup>(9,18)</sup>. Da circa 30 anni, la transanal endoscopic microsurgery (TEM) ha rivoluzionato la tecnica e i risultati della chirurgia transanale, diventando dapprima il trattamento di scelta per i voluminosi adenomi del retto<sup>(4,6,27)</sup>, quindi offrendo un trattamento potenzialmente curativo delle neoplasie maligne in fase iniziale<sup>(5,8)</sup>, ed infine generando una vivace discussione come potenziale opzione di trattamento delle forme di cancro più avanzato in associazione con terapie neoadiuvanti<sup>(3,7,16,17)</sup>.

L'obiettivo di questo studio è di identificare i fattori di rischio associati alla recidiva locale dopo TEM per adenoma o adenocarcinoma in fase iniziale.

## MATERIALI E METODI

Questo studio è un'analisi retrospettiva di un database creato nel Gennaio 1993. Le indicazioni alla TEM erano lesioni del retto valutate preoperatoriamente come benigne e ritenute non asportabili endoscopicamente, adenocarcinomi stadiali uT1N0 e neoplasie in stadio più avanzato trattate con intento palliativo. Le lesioni erano considerate asportabili in TEM se localizzate entro 12 cm dal margine anale sulla parete anteriore, ed entro 15 cm sulle pareti laterale e posteriore, essendo questi i limiti della riflessione del peritoneo sulla parete del retto. La distanza e la sede sulla parete rettale della lesione sono state valutate mediante rettoscopia rigida.

La valutazione preoperatoria ha previsto la visita clinica, una colonscopia completa, un'ecografia dell'addome, un'ecografia trans rettale (EUS), il dosaggio di CEA e CA19.9, e una tomografia computerizzata della pelvi fino al 2003, quindi una risonanza magnetica della pelvi.

L'intervento chirurgico è stato condotto in anestesia generale in tutti i casi utilizzando lo strumentario originale Richard Wolf (Knittlingen, Germany) fino

al 2008, quindi la strumentazione prodotta da Karl Storz GmbH (Tuttlingen, Germany).

Secondo la tecnica standard descritta da Buess<sup>(4)</sup>, un'escissione a tutto spessore della parete del retto fino al grasso perirettale è stata effettuata in tutti i casi, e la breccia è stata chiusa con sutura assicurata con clips in argento.

Al fine di avere una standardizzazione della valutazione anatomo-patologica, un singolo anatomo-patologo esperto di patologia coloretale ha analizzato tutti i pezzi operatori.

La profondità di invasione neoplastica è stata riportata secondo il sistema del TNM<sup>(29)</sup>. I tumori pT1 sono stati classificati secondo la classificazione di Parigi delle lesioni neoplastiche superficiali<sup>(14,30)</sup>.

Soltanto pazienti con un follow-up minimo di 12 mesi sono stati inclusi. I seguenti dati sono stati inseriti nel database: caratteristiche del paziente (età, sesso e indicazione a TEM), valutazione preoperatoria della lesione (localizzazione, stadiazione e diagnosi istologica), dati operatori (durata dell'intervento chirurgico, complicanze intraoperatorie, conversione a chirurgia addominale), decorso postoperatorio (complicanze perioperatorie, durata della degenza), diagnosi e stadiazione istopatologica postoperatoria e follow-up.

Nel caso di adenoma, il follow-up è consistito nella visita clinica a 1 mese, e in rettoscopia rigida ogni 3 mesi per il primo anno, quindi in base alle linee guida post-polipectomia.

Nel caso di adenocarcinoma, il follow-up è consistito in visita clinica ad un mese, rettoscopia rigida e dosaggio dei marcatori tumorali ogni 3 mesi per i primi 2 anni, quindi ogni 6 mesi. Una colonscopia completa è stata effettuata a 12 mesi, quindi ogni 3 anni. Una TC addomino-pelvica è stata effettuata a 6, 12, 24 mesi.

### **Analisi statistica**

I valori dei diversi parametri sono forniti come mediane e range. Il test del chi-quadrato è stato impiegato per confrontare le proporzioni. I pazienti con follow-up minimo di 12 mesi sono stati inclusi nell'analisi dei risultati a lungo termine. È stata condotta una analisi di regressione logistica multinomiale per identificare i fattori predittivi di recidiva dopo TEM per adenoma ed adenocarcinoma. Le variabili con  $P \leq 0.200$  all'analisi univariata sono state incluse nell'analisi multivariata. Tutte le variabili sono state analizzate: età; sesso; distanza della lesione dal margine anale; sede sulla parete del retto; diametro della lesione; apertura del peritoneo (solo per adenocarcinomi), tipo

di displasia ed architettura (solo per adenomi); complicanze postoperatorie, stadiazione pT e sm, grado di differenziazione, invasione linfovascolare (solo per adenocarcinomi); infiltrazione dei margini di exeresi.

Un valore di 5% è stato considerato criterio di significatività statistica.

I dati sono stati raccolti su foglio di Excel. L'analisi statistica è stata condotta con Systat Software (Copyright © SPSS Inc., 2000).

## **RISULTATI**

Tra Gennaio 1993 e Luglio 2010, 420 pazienti affetti da neoformazione del retto medio-inferiore sono stati trattati mediante TEM: di questi, 293 (69.8%) erano affetti da voluminoso adenoma, stadiato uT0 all'EUS preoperatoria - 176 maschi e 117 femmine, con un età mediana di 68 (range, 30-88) anni.

La distanza tra margine inferiore della neoplasia e margine anale era compresa tra 3 e 15 (mediana, 7) cm. La neoplasia era localizzata sulla parete anteriore del retto in 95 (32.4%) casi, sulla parete posteriore in 102 (34.8%), e su quelle laterali in 84 (28.7%). Essa era semicirconfrenziale o circonfrenziale in 8 (2.7%) e 4 (1.4%) casi, rispettivamente.

Il tempo operatorio mediano è stato di 60 (range, 15-240) minuti. L'apertura accidentale del peritoneo si è verificata in 15 (5.1%) casi: 13 (86.7%) sono stati trattati con sutura diretta in TEM, due (13.3%) hanno richiesto la conversione a resezione anteriore laparoscopica (1 caso) o laparotomica (1 caso) all'inizio dell'esperienza. Non sono mai state necessarie emotrasfusioni intraoperatorie.

Il tasso di morbilità è stato pari a 7.2 % (21/293): 11 casi di rettorragia, 5 casi di deiscenza della sutura, 3 fistole rettovaginali, 1 fistola rettovescicale e 1 ritenzione urinaria acuta.

Il sanguinamento rettale è stato trattato con emotrasfusioni in 9 casi, emostasi endoscopica in 1 caso, e tamponamento transrettale in 1 caso. Le deiscenze di sutura sono state trattate conservativamente con terapia antibiotica e nutrizione parenterale totale in tutti i casi. Una sutura chirurgica transvaginale ha risolto i 3 casi di fistola rettovaginale, mentre il paziente con fistola rettovescicale è stato sottoposto a resezione addominoperineale. Infine, un catetere urinario è stato temporaneamente posizionato per risolvere il caso di ritenzione urinaria. La mortalità a 30 giorni è stata nulla. La durata mediana della degenza ospedaliera è stata di 3.5 (range, 2-14) giorni.

Il diametro mediano della lesione rettale è stato di 5 (range, 3-12) cm. L'esame istologico del pezzo chirurgico ha confermato la diagnosi di adenoma in 233 (79.5%) pazienti: 108 casi con displasia a basso grado (LGD) e 125

con displasia ad alto grado (HGD). In 48 casi, l'architettura era tubulare, in 54 villosa e in 131 tubulo-villosa.

L'invasione dei margini si è verificata in 26 (11.1%) casi: 20.9% (9/43) degli adenomi di diametro  $\geq 5$  cm versus 8.9% (17/190) degli adenomi  $< 5$  cm ( $p = 0.047$ ).

In tutti i casi la resezione è avvenuta a tutto spessore e senza frammentazione del pezzo operatorio.

Durante un periodo di follow-up mediano di 110 (range, 12-216) mesi, soltanto un paziente è stato perso al follow-up dopo 12 mesi dalla TEM. Una recidiva è stata diagnosticata in 13 pazienti (5.6%): 6 (23.1%) dei 26 pazienti con margini positivi e 7 (3.4%) dei 207 pazienti con margini negativi ( $p < 0.001$ ). Il tempo mediano di recidiva è stato di 10 (range, 4-33) mesi. La recidiva si è verificata in 4 casi entro 6 mesi dopo TEM, e in altri 6 casi nei successivi 6 mesi. Pertanto, il 76.9% delle recidive è stato diagnosticato entro i 12 mesi dalla TEM.

Il trattamento chirurgico della recidiva locale è stata una TEM in 10 casi, una resezione anteriore bassa in 2 casi, un'amputazione addominoperineale in 1 paziente incontinente.

Nessun paziente ha sviluppato ulteriori recidive durante il successivo follow-up.

La Tabella I riporta l'analisi univariata per il rischio di recidiva. Tra tutte le variabili prese in considerazione, soltanto il diametro dell'adenoma ( $p = 0.007$ ), e i margini positivi ( $p < 0.001$ ) hanno dimostrato un ruolo statisticamente significativo.

L'analisi multivariata del rischio di recidiva indica come unico predittore indipendente il coinvolgimento dei margini di resezione all'esame istologico.

Un trend verso un maggior rischio di recidiva è stato osservato per HGD rispetto ad LGD sia nell'analisi univariata che multivariata ( $p = 0.070$ , e  $p = 0.100$ , rispettivamente).

Durante lo stesso periodo di tempo, 110 pazienti sottoposti a TEM sono risultati affetti da neoplasia maligna; in 3 casi si trattava di tumore carcinoide.

L'età dei 107 pazienti con adenocarcinoma era compresa tra 34 e 94 (mediana, 71) anni. La distanza mediana della neoplasia dal margine anale era 7 (range, 3 - 12) cm. Il diametro del tumore era compreso tra 1 e 7 (mediana, 3) cm.

Il tempo operatorio mediano è stato di 60 minuti (range 15-240). In 10 casi (9%) si è verificata l'apertura accidentale del peritoneo, suturata in tutti i casi mediante TEM. Nessun paziente ha richiesto trasfusioni intraoperatorie. Il tasso di complicanze postoperatorio è stato del 5.6%, essendosi verificati 6

Variabile	Analisi univariata		Analisi multivariata	
	Hazard ratio	P	Hazard ratio	P
<b>Età</b>				
> 68 anni	1	0.143	1	0.232
≤ 68 anni	2.698 (0.714 - 10.195)		2.415 (0.568 - 10.268)	
<b>Sesso</b>				
Femmina	1	0.455		
Maschio	1.450 (0.470 - 5.401)			
<b>Diametro del tumore</b>				
< 5 cm	1	0.007	1	0.062
≥ 5 cm	5.065 (1.556 - 16.489)		3.491 (0.941 - 12.960)	
<b>Distanza dal margine anale</b>				
> 7 cm	1	0.315		
≤ 7 cm	1.870 (0.552 - 6.338)			
<b>Displasia</b>				
LGD	1	0.070	1	0.100
HGD	3.425 (0.906 - 12.947)		3.350 (0.792 - 14.172)	
<b>Architettura</b>				
Tubulare	1	0.592		
Tubulo-villosovillosa	1.530 (0.323 - 7.259)			
<b>Margini di exeresi</b>				
Negativi	1	< 0.001	1	0.003
Positivi	10.909 (3.122 - 38.125)		7.739 (1.985 - 30.166)	
Valori in parentesi sono gli intervalli di confidenza al 95% LGD, low grade dysplasia HGD, high grade dysplasia				

Tabella I. Fattori di rischio per la recidiva locale dopo Transanal Endoscopic Microsurgery per adenoma.

casi di rettorragia, tutti trattati conservativamente. La mortalità è stata nulla. La degenza ospedaliera mediana è stata di 5 giorni (range, 2-15).

### Risultati istopatologici

La stadiazione istologica è la seguente: 48 pT1, 43 pT2 e 16 pT3. Ventisei carcinomi pT1 erano sm1, 12 sm2 e 10 sm3.

I risultati della stadiazione preoperatoria con EUS sono riportati nella Tabella II, e vengono confrontati con la stadiazione istologica definitiva. Una precisa valutazione del parametro T è stata possibile nel 60% dei pT1 e nel 50% dei pT2. Un significativo miglioramento dei risultati dell'EUS è stato osservato durante il periodo dello studio: all'inizio della nostra esperienza vi è stata una sottostadiazione in 13/26 (50%) casi ed una sovrastadiazione in 5/26 (19.2%) casi, ridotte rispettivamente a 34.6% (9/26) e 11.5% (3/26) nel periodo intermedio, fino a raggiungere il 19.2% (5/26) e il 3.8% (1/269) in tempi più recenti. Venti lesioni stadiate uT2 e 5 uT3 sono state trattate mediante TEM per diverse ragioni: in 6 casi la diagnosi istologica della biopsia era benigna, 16 pazienti non erano candidabili alla chirurgia addominale a causa delle condizioni generali, o avevano rifiutato il rischio di una stomia temporanea/definitiva (5 di questi erano stati sottoposti a radioterapia neoadiuvante), e 3 avevano metastasi epatiche sincrone e sono stati trattati con intento palliativo.

L'invasione dei margini di exeresi si è verificata nel 2.1%, 18.6% e 50% dei pazienti con carcinoma pT1, pT2 e pT3 rispettivamente ( $p < 0.05$ ), mentre margini sani  $< 1\text{mm}$  sono stati riscontrati nel 6.3%, 20.9% e 75% dei casi, rispettivamente ( $p < 0.05$ ).

Stadio T	pT1	pT2	pT3	Totale
uT0-1	32 (60.4%)	17	4	53
uT2	5	10 (50%)	6	21
uT3	1	3	1	5
No EUS	10	13	5	28
<b>Totale</b>	<b>48</b>	<b>43</b>	<b>16</b>	<b>107</b>

Tabella II. Ecoendoscopia transrettale preoperatoria vs stadiazione istologica in 107 adenocarcinomi.

## Risultati oncologici

Tra i pazienti pT1, durante un follow-up mediano di 39.5 mesi (range, 12-164), il tasso di recidiva globale è stato del 10.4% (5/48). La recidiva locale è stata osservata a 6, 12, 18, 36 e 48 mesi, rispettivamente. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a TME laparoscopica e sono attualmente vivi, 3 liberi da malattia e 2 con metastasi epatiche. Secondo la classificazione sm, è stato osservato un trend verso un maggior tasso di recidiva all'aumentare dell'infiltrazione della sottomucosa (sm1 = 0%, sm2 = 16.7%, sm3 = 30%,  $p = 0.12$ ). Confrontando le lesioni sm1 con le lesioni sm2 e sm3, non sono state osservate recidive tra i 26 pazienti sm1 versus 5 (22.7%) recidive tra i 22 pazienti sm2-3 ( $p = 0.036$ ).

Tra i pazienti pT2, il tasso di recidiva globale è stato del 23.2% (10/43). Tutti i 5 pazienti sottoposti a radioterapia neoadiuvante erano liberi da malattia a 13, 27, 57, 74 e 138 mesi dopo TEM, rispettivamente. Degli altri 38 pazienti pT2, 5 (13.1%) sono stati sottoposti a TME laparoscopica, a 4, 6, 8, 9 e 16 settimane dopo TEM, rispettivamente. In tutti i casi, non è stato riscontrato residuo tumorale o metastasi linfonodali nei pezzi operatori. Nonostante ciò, è stata osservata una recidiva (20%) a 15 mesi, trattata con APR e chemioterapia adiuvante; tuttavia il paziente è deceduto con malattia diffusa. Diciannove (44%) pazienti pT2 hanno rifiutato l'intervento chirurgico e sono stati sottoposti a chemio-radioterapia adiuvante: 4 (21%) di questi hanno avuto una recidiva locale a 10, 12, 12 e 70 mesi, rispettivamente. Un paziente è stato sottoposto ad intervento chirurgico addominale ed è libero da malattia, mentre gli altri tre non sono stati sottoposti ad ulteriore trattamento e sono deceduti per diffusione di malattia. I restanti 14 pazienti hanno rifiutato qualsiasi trattamento: 5 (35.7%) hanno avuto una recidiva locale a 6, 10, 12, 12 e 13 mesi rispettivamente, trattata con resezione anteriore in 2 casi (un paziente è vivo libero da malattia a 62 mesi, mentre l'altro è deceduto per la malattia), APR in 1 caso (vivo libero da malattia a 46 mesi) e radioterapia in 2 casi (uno deceduto per malattia).

Le differenze osservate in termini di recidiva locale tra questi tre gruppi di pazienti (sottoposti a chirurgia, trattamento adiuvante, osservazione) non sono risultate statisticamente significative ( $p = 0.518$ ).

Tra i 16 pazienti pT3, tre che avevano metastasi epatiche sincrone, sono stati trattati con intento palliativo e sono stati esclusi dall'analisi dei risultati oncologici. Dei rimanenti 13 pazienti pT3, quattro sono stati sottoposti a TME. Nonostante ciò, 2 (50%) hanno avuto una recidiva locale a 6 e 20 mesi rispettivamente, sono stati trattati con chemio-radioterapia e sono deceduti per malattia. Sei pazienti con lesione pT3 hanno accettato di sottoporsi soltanto a

Variabile		Hazard Ratio	CI 95%	p
<b>Sesso</b>	M	1		
	F	1.13	± 0.8366	0.386
<b>Distanza dal margine anale</b>	< 5 cm	1		0.301
	5-10 cm	0.67	± 0.3845	0.207
	> 10 cm	0.89	± 0.5221	0.301
<b>Sede</b>	Anteriore	1		0.225
	Posteriore	0.68	± 0.5612	0.483
	Laterale	0.36	± 0.3284	0.101
<b>Complicanze intra-operatorie</b>	Presenti	1		
	Assenti	1.05	± 1.2950	0.467
<b>Diametro</b>	≤ 3 cm	1		
	>3 cm	1.35	± 0.6930	0.031
<b>sm</b>	sm1	unavailable		
	sm2	1		
	sm3	2.05	± 0.3428	0.035
<b>pT</b>	pT1	1		
	pT2	2.73	± 0.8677	0.041
	pT3	4.47	± 1.7071	0.034
<b>Grado di differenziazione</b>	G1-2	1		
	G3	2.68	± 1.1481	0.033
<b>Infiltrazione dei margini</b>	Presente	1		
	Assente	2.54	± 1.1653	0.008
<b>Margini sani</b>	≥1 mm	1		
	<1 mm	2.07	± 1.5411	0.093
<b>Invasione linfo-vascolare</b>	Presente	1		
	Assente	1.20	± 1.1544	0.048
<b>Complicanze postoperatorie</b>	Presenti	1		
	Assenti	1.05	± 0.7847	0.467

Tabella III. Analisi univariata dei predittori di recidiva locale dopo Transanal Endoscopic Microsurgery per adenocarcinoma.

radioterapia adiuvante, sviluppando in 2 (33%) casi una recidiva locale a 13 e 14 mesi rispettivamente, trattate con ulteriore radioterapia in un caso e APR nell'altro; il primo paziente è morto per la malattia, il secondo è ancora vivo libero da malattia. Tre pazienti non erano candidabili ad ulteriori trattamenti a causa delle co-morbilità e 2 sono deceduti dopo aver avuto una recidiva a 4 e 12 mesi. Pertanto, il tasso di recidiva globale è stato del 46.1% (6/13).

Il tasso di sopravvivenza globale a 60 mesi è stato del 100%, 80.2% e 62.9% per pT1, pT2 e pT3, rispettivamente ( $p < 0.001$ ). Il tasso di sopravvivenza libera-da-malattia a 60 mesi è stato del 85.9%, 78.4% e 49.4% per pT1, pT2 e pT3, rispettivamente ( $p = 0.006$ ). Le lesioni sm1 hanno riportato un tasso di sopravvivenza libera-da-malattia a 60 mesi del 100%, mentre le lesioni sm2 e sm3 66.7% e 63.0% rispettivamente ( $p = 0.122$ ).

L'analisi univariata per il rischio di recidiva (Tabella III) ha evidenziato un ruolo statisticamente significativo per il diametro, lo stadio sm, lo stadio pT, il grado di differenziazione tumorale, l'infiltrazione dei margini di resezione, e l'invasione linfovaskolare. All'analisi multivariata (Tabella IV), i fattori predittivi di recidiva indipendenti sono risultati lo stadio sm, lo stadio pT e il grado di differenziazione tumorale.

Variabile		Hazard Ratio	CI 95%	p
<b>sm</b>	sm1	1		
	sm2	1.33	± 0.7397	0.041
	sm3	1.67	± 0.7448	0.035
<b>pT</b>	pT1	1		
	pT2	1.62	± 0.7728	0.047
	pT3	2.23	± 0.7484	0.031
<b>Grado di differenziazione</b>	G1-2	1		
	G3	3.33	± 0.7977	0.029
<b>Infiltrazione dei margini</b>	Presente	1		
	Assente	2.46	± 0.8580	0.024
<b>Invasione linfo-vascolare</b>	Presente	1		
	Assente	1.77	± 0.7617	0.048

Tabella IV. Analisi multivariata dei predittori di recidiva locale dopo Transanal Endoscopic Microsurgery per adenocarcinoma.

Nessuno dei tre pazienti affetti da tumore carcinoide ha avuto una recidiva durante il follow-up.

## DISCUSSIONE

La chirurgia addominale è attualmente il trattamento di scelta delle neoplasie del retto. Tuttavia, la TME è gravata da elevati tassi di morbilità e mortalità<sup>(23)</sup>. La chirurgia transanale tradizionale, sebbene meno invasiva, è associata ad una consistente incidenza di recidiva, soprattutto nel caso di tumori del retto medio-superiore<sup>(20,24,25,28)</sup>.

Circa 30 anni fa, l'introduzione della TEM ha permesso di combinare un approccio transanale meno invasivo con ridotti tassi di recidiva locale, grazie ad una miglior visualizzazione del campo chirurgico che consente una più precisa dissezione. Inizialmente proposta come tecnica per l'escissione di neoplasie rettali benigne, le indicazioni delle TEM sono state progressivamente estese agli adenocarcinomi del retto pT1 "a basso rischio"<sup>(12)</sup> con intento curativo<sup>(21)</sup> e a quelli più avanzati con intento palliativo.

Nella nostra serie di adenomi sottoposti a TEM, tessuto adenomatoso residuo sul margine di exeresi è stato riscontrato nell'11.1% dei casi, in linea con i dati della letteratura, che riporta una percentuale di margini con adenoma residuo in 0-37% dei casi, tuttavia con tassi di recidiva significativamente inferiori, compresi tra 0% e 16%. Nella nostra esperienza, solo il 23% dei pazienti con margini positivi ha avuto una recidiva, e tutti entro i 12 mesi. Questo fatto potrebbe essere spiegato dal danno diatermico del tessuto adenomatoso residuo durante la dissezione, che causerebbe la "sterilizzazione" dei margini.

Tra i diversi fattori di rischio associati con la recidiva locale di adenoma, vi sono le dimensioni del polipo. Nella nostra pratica clinica, l'escissione a tutto spessore della parete del retto inizia sempre a circa 5 mm di distanza dal tumore. Nonostante ciò, il 21% degli adenomi  $\geq 5$  cm sono stati rimossi con margini positivi rispetto al 9% di adenomi  $< 5$  cm ( $P = 0.047$ ). Inoltre, il diametro del tumore  $\geq 5$  cm è risultato essere un fattore predittivo di recidiva ( $p = 0.007$ ) all'analisi univariata.

La TEM è attualmente un'importante opzione terapeutica anche nel trattamento dell'adenoma recidivo. Nella nostra serie, la TEM ha rappresentato il trattamento chirurgico di 10 recidive, senza incremento delle complicanze perioperatorie. Inoltre, nessun paziente ha presentato un'ulteriore recidiva durante il follow-up.

Poiché più del 75% delle recidive si è verificato entro i 12 mesi, noi suggeriamo un protocollo più intensivo di follow-up basato su endoscopia

rigida ogni 3 mesi per il primo anno, quindi ogni 6 mesi in caso di margini positivi all'esame istologico definitivo e in caso di adenomi  $\geq 5$  cm.

Infine, circa il 20% degli adenomi è risultato essere un adenocarcinoma all'esame istologico definitivo. Ciò rafforza l'idea che un'adeguata escissione a tutto spessore debba essere effettuata in tutti i casi, anche quando la diagnosi istologica e la stadiazione preoperatoria propendono per una lesione benigna, piuttosto che una resezione endoscopica "piecemeal".

Con l'obiettivo di chiarire le indicazioni alla TEM per lesioni maligne, abbiamo quindi analizzato la nostra serie, identificando potenziali fattori di rischio per la recidiva. Il diametro della lesione  $>3$  cm, la stadiazione pT, la profondità di invasione sottomucosa nei pT1, il grado di differenziazione tumorale, i margini di exeresi positivi e la presenza di invasione linfovaskolare sono stati identificati come fattori prognostici negativi all'analisi univariata. Valutando l'indipendenza di questi parametri, la stadiazione pT, l'invasione sottomucosa nei pT1 e il grado tumorale sono risultati gli unici fattori statisticamente associati al rischio di recidiva.

Pertanto, un'adeguata valutazione preoperatoria di questi parametri certamente consentirebbe di definire le corrette indicazioni per la TEM. In particolare, una precisa valutazione della profondità di invasione tumorale e di eventuali metastasi linfonodali è cruciale per un'appropriata selezione del paziente. Sebbene l'EUS rappresenti lo strumento diagnostico più accurato per la valutazione dell'invasione della parete rettale da parte del tumore, abbiamo potuto constatare, come già indicato da altri Autori<sup>(1,2,10,15,26)</sup>, una consistente discrepanza tra stadiazione EUS preoperatoria e stadiazione istologica definitiva, con 27/78 (34.6%) lesioni sottostadiate e 9/78 (11.5%) sovrastadiate. Pertanto, è obiettivamente difficile attualmente definire preoperatoriamente quale lesione possa essere rimossa adeguatamente con TEM, eventualmente in associazione a trattamento citostatico neoadiuvante in caso di lesione uT2<sup>(3,7,16,17)</sup>, piuttosto che mediante chirurgia addominale.

Tuttavia, si deve considerare che la nostra serie si riferisce a oltre 15 anni di esperienza, caratterizzati da un'evidente evoluzione della tecnologia, come ad esempio l'introduzione di ecoendoscopi a 360° e di minisonde a 20-Mhz ad alta definizione<sup>(34)</sup>. Queste innovazioni tecnologiche sono andate in parallelo alla crescente esperienza nella tecnica della EUS. Infatti, se suddividiamo la popolazione di pazienti in 3 gruppi omogenei consecutivi, vi è stato un consistente miglioramento dei risultati di stadiazione preoperatoria, partendo dal 50% di sottostadiazione e dal 19% di sovrastadiazione nel primo periodo, per arrivare al 19% e al 3%, rispettivamente, nel gruppo più recente di pazienti.

Una miglior selezione del paziente che potrebbe essere trattato con intento curativo mediante TEM eviterebbe, inoltre, la necessità di ricorrere successivamente ad intervento chirurgico addominale, in caso di diagnosi istologica definitiva sfavorevole. Nella nostra serie, dei 9 pazienti sottoposti a chirurgia addominale dopo TEM, 3 (33%) sono deceduti per malattia diffusa, in linea con quanto riportato in letteratura<sup>(6,8,18,31)</sup>. Al contrario, in un recente studio multicentrico che ha analizzato l'outcome di pazienti sottoposti a TME dopo TEM, il rischio di recidiva era ridotto di 15 volte<sup>(26)</sup>. Il dubbio teorico principale relativamente a effettuare una TME dopo TEM è rappresentato dal fatto che il grasso perirettale potrebbe essere sede di impianto di cellule tumorali o in ogni caso essere in parte sostituito da tessuto fibrotico che rende la dissezione corretta dei piani più complessa.

Uno dei fattori chiave per ridurre al minimo la recidiva locale di un adenocarcinoma è rappresentato dall'escissione completa con sufficienti margini sani. Sebbene la TEM consenta una miglior esposizione, mantenendo una visione costante del margine di exeresi e riducendo il rischio di escissione "piecemeal", il rischio di margini invasi aumenta con l'aumentare del parametro T, come dimostrato nella nostra serie. Pertanto, una stadiazione preoperatoria precisa del parametro T è cruciale anche dal punto di vista tecnico, essendo occasionale la presenza di margini invasi nel caso di carcinoma pT1 (2%). Inoltre, uno sforzo per aumentare il tasso di margini sani deve essere fatto per ottenere una escissione locale adeguata in caso di neoplasie più avanzate. Lezoche et al.<sup>(17)</sup> hanno recentemente proposto il tatuaggio dei margini della lesione al momento della diagnosi, seguito da chemio-radioterapia neoadiuvante nel caso di neoplasie T2. Noi non abbiamo riportato alcun caso di recidiva nei pazienti T2 trattati con terapia neoadiuvante, confermando l'efficacia di questa strategia terapeutica. Inoltre, sulla base dei nostri risultati riteniamo che il protocollo proposto da Lezoche et al.<sup>(17)</sup> potrebbe essere esteso in futuro anche ai T1 sm2 e sm3. Al momento, purtroppo, non siamo ancora in grado di identificare correttamente questo gruppo di pazienti.

Nonostante ciò, la recente introduzione di minisonde a 20-Mhz ad alta definizione sembrerebbe un passo verso la possibilità di identificare non soltanto il parametro T, ma anche il grado di infiltrazione sottomucosa<sup>(34)</sup>. La nostra serie riporta una differenza significativa in termini di recidiva tra i pT1 sm1 (0%) e sm2-3 (22.7%).

Infine, la TEM riveste un ruolo importante anche nel trattamento palliativo. Nella nostra esperienza, la TEM è stata utilizzata con intento palliativo nei pazienti con tumori T3 e con importanti comorbidità. In questi casi, sebbene i risultati oncologici siano scarsi, spesso in relazione ad un'elevata

incidenza di margini di resezione infiltrati, il controllo locale della malattia è adeguato<sup>(26)</sup>.

In conclusione, questo studio dimostra come la TEM fornisca eccellenti risultati clinici ed oncologici nel trattamento dei voluminosi adenomi del retto e dei carcinomi pT1sm1, mentre i pT1 sm2 e sm3 dovrebbero essere considerati ad alto rischio se trattati solo mediante TEM. Una precisa definizione preoperatoria dei fattori di rischio come lo stadio T, la classificazione sm e il grado di differenziazione tumorale rappresenta il punto cruciale per un approccio terapeutico “personalizzato” al cancro del retto. Nuovi sviluppi nelle tecniche di stadiazione preoperatoria saranno fondamentali per migliorare la selezione del paziente e quindi i risultati clinici.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Allaix ME, Arezzo A, Caldart M, Festa F, Morino M: *Transanal endoscopic microsurgery for rectal neoplasms: experience of 300 consecutive cases*. Dis. Colon Rectum 2009; 52: 1831-1836.
2. Bach SP, Hill J, Monson JR, Simson JN, Lane L, Merrie A, Warren B, Mortensen NJ; Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland Transanal Endoscopic Microsurgery (TEM) Collaboration: *A predictive model for local recurrence after transanal endoscopic microsurgery for rectal cancer*. Br. J. Surg. 2009; 96: 280-290.
3. Borschitz T, Heintz A, Junginger T: *Transanal endoscopic microsurgical excision of pT2 rectal cancer: results and possible indications*. Dis. Colon Rectum 2007; 50: 292-301.
4. Buess G, Hutterer F, Theiss J, Böbel M, Isselhard W, Pichlmaier H: *A system for a transanal endoscopic rectum operation*. Chirurg. 1984; 55: 677-680.
5. Cook TA, Mortensen NJ: *Local methods of treatment of rectal cancer*. Colorectal Dis. 2000; 2: 252-263.
6. Dias AR, Nahas CS, Marques CF, Nahas SC, Cecconello I: *Transanal endoscopic microsurgery: indications, results and controversies*. Tech. Coloproctol. 2009; 13: 105-111.
7. Duek SD, Issa N, Hershko DD, Krausz MM: *Outcome of transanal endoscopic microsurgery and adjuvant radiotherapy in patients with T2 rectal cancer*. Dis. Colon Rectum 2008; 51: 379-384; discussion 384.

8. Endreseth BH, Myrvold HE, Romundstad P, Hestvik UE, Bjerkeset T, Wibe A; Norwegian Rectal Cancer Group: *Transanal excision vs. major surgery for T1 rectal cancer*. Dis. Colon Rectum 2005; 48: 1380-1388.
9. Garcia- Aguilar J, Mellgren A, Sirivongs P, Buie D, Madoff RD, Rothenberger DA: *Local excision of Rectal Cancer without Adjuvant therapy. A word of caution*. Ann. Surg. 2000; 3: 345-351.
10. Guerrieri M, Baldarelli M, de Sanctis A, Campagnacci R, Rimini M, Lezoche E: *Treatment of rectal adenomas by transanal endoscopic microsurgery: 15 years' experience*. Surg. Endosc. 2009; 24: 445-449.
11. Hendren SK, O'Connor BI, Liu M, Asano T, Cohen Z, Swallow CJ, Macrae HM, Gryfe R, McLeod RS: *Prevalence of male and female sexual dysfunction is high following surgery for rectal cancer*. Ann. Surg. 2005; 242: 212-223.
12. Hermanek P, Gall FP: *Early (microinvasive) colorectal carcinoma. Pathology, diagnosis, surgical treatment*. Int. J. Colorectal Dis. 1986; 1: 79-84.
13. Ho P, Law WL, Chan SC, Lam CK, Chu KW: *Functional outcome following low anterior resection with total mesorectal excision in the elderly*. Int. J. Colorectal Dis. 2003; 18: 230-233.
14. Kudo S, Lambert R, Allen JI, Fujii H, Fujii T, Kashida H, Matsuda T, Mori M, Saito H, Shimoda T, Tanaka S, Watanabe H, Sung JJ, Feld AD, Inadomi JM, O'Brien MJ, Lieberman DA, Ransohoff DF, Soetikno RM, Triadafilopoulos G, Zauber A, Teixeira CR, Rey JF, Jaramillo E, Rubio CA, Van Gossum A, Jung M, Vieth M, Jass JR, Hurlstone PD: *Nonpolypoid neoplastic lesions of the colorectal mucosa*. Gastrointest. Endosc. 2008; 68: S3-47.
15. Lebedyev A, Tulchinsky H, Rabau M, Klausner JM, Krausz M, Duek SD: *Long term results of local excision for T1 rectal carcinoma: The experience of two colorectal units*. Tech. Coloproctol. 2009; 13: 231-236.
16. Lezoche E, Guerrieri M, Paganini AM, Feliciotti F: *Long-term results of patients with pT2 rectal cancer treated with radiotherapy and transanal endoscopic microsurgical excision*. World J. Surg. 2002; 26: 1170-1174.
17. Lezoche E, Guerrieri M, Paganini AM, Baldarelli M, De Sanctis A, Lezoche G: *Long-term results in patients with T2-3 N0 distal rectal cancer undergoing radiotherapy before transanal endoscopic microsurgery*. Br. J. Surg. 2005; 92: 1546-1552.
18. Madbouly KM, Remzi FH, Erkek BA, Senagore AJ, Baeslach CM, Khandwala F, Fazio VW, Lavery IC: *Recurrence After Transanal Excision of T1 Rectal Cancer: Should We Be Concerned?* Dis. Colon Rectum 2005; 48: 711-721.
19. Marijnen CA, Kapiteijn E, van de Velde CJH, Martijn H, Steup WH, Wiggers T, Kranenbarg EK, Leer JW; Cooperative Investigators of the Dutch Colorectal Cancer Group: *Acute side effects and complications after short-term preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision in primary rectal cancer: report of a multicenter randomized trial*. J. Clin. Oncol. 2002; 20: 817-825.
20. Mellgren A, Sirivongs P, Rothenberger DA, Madoff RD, Garcia-Aguilar J: *Is local excision adequate therapy for early rectal cancer?* Dis. Colon Rectum 2000; 43: 1064-1074.
21. Mentges B, Buess G, Raestrup H, Manncke K, Becker HD: *TEM results of the Tuebingen group*. Endosc. Surg. Allied Technol. 1994; 2: 247-250.

22. Morino M, Parini U, Allaix ME, Monasterolo G, Brachet Contul R, Garrone C: *Male sexual and urinary function after laparoscopic total mesorectal excision*. Surg. Endosc. 2009; 23: 233-240.
23. Morino M, Parini U, Giraudo G, Salval M, Brachet Contul R, Garrone C: *Laparoscopic total mesorectal excision: a consecutive series of 100 patients*. Ann. Surg. 2003; 237: 335-342.
24. Nivatvongs S, Balcos EG, Schottler JL, Goldberg SM: *Surgical management of large villous tumors of the rectum*. Dis. Colon Rectum 1973; 16: 508-514.
25. Parks AG, Stuart AE: *The management of villous tumours of the large bowel*. Br. J. Surg. 1973; 60: 688-695.
26. Puli SR, Reddy JB, Bechtold ML, Choudhary A, Antillon MR, Brugge WR: *Accuracy of endoscopic ultrasound to diagnose nodal invasion by rectal cancers: a meta-analysis and systematic review*. Ann. Surg. Oncol. 2009; 16: 1255-1265.
27. Røkke O, Iversen KB, Øvrebø K, Maartmann-Moe H, Skarstein A, Halvorsen JF: *Local resection of rectal tumors by transanal endoscopic microsurgery: Experience with the first 70 cases*. Dig. Surg. 2005; 22: 182-190.
28. Sakamoto GD, MacKeigan JM, Senagore AJ: *Transanal excision of large, rectal villous adenomas*. Dis. Colon Rectum 1991; 34: 880-885.
29. Sobin LH, Wittekind C (eds): *TNM classification of Malignant Tumours (6<sup>th</sup> edn)*. Wiley-Liss 2002: New York.
30. *The Paris endoscopic classification of superficial neoplastic lesions: esophagus, stomach, and colon: November 30 to December 1, 2002*. Gastrointest. Endosc. 2003; 58: S3-43.
31. Vyslouzil K, Cwiertka K, Zboril P, Kucerova L, Starý L, Klementa I, Skalický P, Duda M: *Endorectal sonography in rectal cancer staging and indication for local surgery*. Hepatogastroenterology 2007; 54: 1102-1106.
32. Wallner C, Lange MM, Bonsing BA, Maas CP, Wallace CN, Dabhoiwala NF, Rutten HJ, Lamers WH, Deruiter MC, van de Velde CJ; Cooperative Clinical Investigators of the Dutch Total Mesorectal Excision Trial: *Causes of fecal and urinary incontinence after total mesorectal excision for rectal cancer based on cadaveric surgery: a study from the Cooperative Clinical Investigators of the Dutch total mesorectal excision trial*. J. Clin. Oncol. 2008; 26: 4466-4472.
33. Williams NS, Johnston D: *The quality of life after rectal excision for low rectal cancer*. Br. J. Surg. 1983; 70: 460-462.
34. Zhou PH, Yao LQ, Zhong YS, He GJ, Xu MD, Qin XY: *Role of endoscopic miniprobe ultrasonography in diagnosis of submucosal tumor of large intestine*. World J. Gastroenterol. 2004; 10: 2444-2446.

## **LA CELIACHIA OGGI: PATOGENESI E SINTOMI IN ETÀ PEDIATRICA**

*Cristiana Barbera, Monica Surace, Laura Garassino, Maria Kuvidi*

Dipartimento di Scienze Pediatriche e dell'Adolescenza  
Università degli Studi di Torino

**Keywords:**      *Coeliac disease / Malattia celiaca*  
                          *Pathogenesis / Patogenesi*  
                          *Autoimmunity / Autoimmunità*

### **Abstract:**

Coeliac disease (CD) is a widespread (prevalence of 1%), world wide, lifelong disorder that affects people of all age for which dietary control represents the actual only form of treatment.

It is actually defined “an immunomediated disorder elicited by gluten and related prolamines in genetically susceptible individuals and characterized by the presence of a variable combination of gluten-dependent clinical manifestations, CD specific antibodies, HLA-DQ2 or HLA-DQ8 haplotypes and enteropathy”. Environmental factors such as breast feeding, gluten introduction in the first months of life, infections, contribute to its development.

Celiac disease is mainly a T-Cell mediated disorder in which CD4+ T cells play a central role, triggering Th1 chemokine release, especially  $\gamma$ -IFN. Cytokine cascade induces metalloproteinases intermediates causing tissue damage marked by intraepithelial lymphocytosis, crypt hyperplasia and villous atrophy. Different immunogenic gluten peptides stimulate IL15 production that leads to NK mediated epithelial cell killing demonstrating the involvement of innate immunity too.

The clinical spectrum in children is wide and includes classical symptoms presenting early in life and atypical cases presenting later showing milder and often extraintestinal clinical signs.

Moreover an increasing number of patients are identified in specific high risk group like first degree relatives, autoimmune and some genetic disease.

### **Riassunto:**

La celiachia (MC) è un'intolleranza permanente al glutine, diffusa in tutto il mondo (prevalenza del 1%), che colpisce individui di tutte le età per la quale la dieta di astensione rappresenta l'attuale unica forma di trattamento.

È infatti definita “malattia sistemica immunomediata, indotta dal glutine e da prolamine glutine-correlate in soggetti geneticamente predisposti, caratterizzata dalla presenza di una combinazione variabile di manifestazioni cliniche glutine-dipendenti, anticorpi specifici, aplotipi HLADQ2 o HLA DQ8 ed enteropatia”. I fattori ambientali, quali l’allattamento al seno, l’introduzione del glutine nei primi mesi di vita e le infezioni contribuiscono al suo sviluppo.

La celiachia è una malattia mediata dai linfociti T, in cui le cellule T CD4 + svolgono un ruolo centrale attivando il rilascio di chemochine Th1, in particolare IFN- $\gamma$ . La cascata di questi mediatori provoca l’attivazione delle metalloproteinasi, che causano il danno tissutale caratterizzato dalla linfocitosi intraepiteliale, iperplasia delle cripte e atrofia dei villi. Altri peptidi immunogenici del glutine stimolano la produzione di IL 15, che causa l’apoptosi NK-mediata delle cellule epiteliali, dimostrando anche il coinvolgimento dell’immunità innata.

Il quadro clinico nei bambini è vasto e comprende sintomi classici, presenti nei primi anni di vita, e casi atipici, che si rendono manifesti più tardi con segni clinici lievi e spesso extraintestinali.

Inoltre un numero crescente di pazienti viene classificato come appartenente a uno specifico gruppo ad alto rischio; questi sono i parenti di primo grado, i pazienti affetti da malattie autoimmuni e da alcune malattie genetiche.

## **DEFINIZIONE**

Nota dall'antichità, la malattia celiaca (MC) nell'ultimo ventennio ha rivelato una connotazione nosografica ben più complessa dell'atteso che può essere sintetizzata nella definizione contenuta nelle linee guida della Società Europea di Gastroenterologia, Epatologia, Nutrizione pediatrica (ESPGHAN): "Malattia sistemica, immuno mediata, scatenata dal glutine in individui geneticamente suscettibili e caratterizzata dalla presenza di una variabile combinazione di aplotipi HLA DQ2 DQ8, manifestazioni cliniche, anticorpi specifici ed enteropatia di vario grado"<sup>(12)</sup>.

Superato il vecchio concetto di patologia rara, malassorbitiva, esclusivamente intestinale, la MC viene oggi ritenuta una patologia sistemica nella quale la componente patogenetica autoimmune è testimoniata dalla presenza di autoanticorpi contro la transglutaminasi intestinale e l'endomisio.

## **EPIDEMIOLOGIA**

L'incidenza mondiale della malattia è in progressivo aumento, la prevalenza è compresa tra lo 0,5% e il 5%, con tendenza all'incremento negli ultimi decenni e a uno spostamento verso l'età adulta<sup>(2,3,17)</sup>. Smentito che la malattia sia caratteristica delle popolazioni nordeuropee e della prima infanzia attualmente è ritenuta una patologia ubiquitaria nel mondo, laddove si consumi una dose sufficiente di cereali tossici e siano presenti gli antigeni HLA DQ2 e DQ8 con esordio in tutte le età<sup>(26)</sup>.

## **PATOGENESI**

La celiachia è una malattia multifattoriale con una componente eziologica genetica e una ambientale.

### **Ruolo della barriera intestinale e di alcune componenti patogenetiche ambientali**

Il principale fattore ambientale, indispensabile per lo sviluppo della malattia, è il glutine, presente nei grani di frumento, orzo e segale.

Con il termine "glutine" si denomina un gruppo di prolamine (gliadine e glutenine) solubili in alcool e insolubili in acqua. Proprio la viscosità e l'elasticità che la sua presenza imprime alle farine che lo contengono quando sono impastate con acqua, le rende particolarmente adatte alla confezione di pasta e pane; tuttavia per il suo elevato contenuto in prolina e glutamina è poco

soggetto all'azione delle peptidasi intestinali in quanto nell'intestino umano, anche in assenza di malattia, le proli-peptidasi sono poco espresse<sup>(16,30)</sup>

Nei soggetti geneticamente predisposti alla MC alcune sequenze peptidiche di maggior volume, quindi con proprietà antigeniche, passano, intatte, nella mucosa intestinale e qui sollecitano componenti dell'immunità innata e adattativa.

La via paracellulare è facilitata dall'apertura delle giunzioni serrate indotta dalla zonulina, proteina i cui livelli aumentano in corso di celiachia. L'importanza dell'integrità della barriera intestinale è testimoniata anche dalla maggior prevalenza di celiachia (5%) nel deficit di IgA.

Anche altri fattori ambientali, che modellano il contesto immunologico nel quale il glutine è presentato concorrono alla comparsa e al fenotipo della MC. Uno di questi è il tipo di alimentazione infantile nei primi mesi di vita: è stato ampiamente dimostrato che l'allattamento al seno esercita un effetto protettivo nei confronti dell'azione antigenica del glutine e che una sua lunga durata protegge dallo sviluppo di MC o, almeno, ne ritarda la comparsa e ne riduce la gravità dei sintomi<sup>(2)</sup>.

Il meccanismo con cui il latte materno agisce è probabilmente collegato all'effetto difensivo che esso esercita nei confronti delle infezioni gastrointestinali tipiche dell'età, come quella da rotavirus. Il virus, alterando la permeabilità intestinale, favorisce sia il passaggio dell'antigene attraverso la mucosa sia l'espressione locale intestinale dell'enzima transglutaminasi 2 che nella MC ha un ruolo patogenetico cruciale<sup>(24)</sup>. Anche il momento dell'introduzione del glutine e la sua quantità nella dieta del lattante hanno un ruolo importante sull'esordio precoce di celiachia e sulla entità dei sintomi ad essa associati.

### **Ruolo della componente genetica**

La forte componente ereditaria nella MC è stata attestata inizialmente dagli studi familiari in cui si è dimostrato che nei parenti di I° grado degli affetti il rischio di ammalare è 10 volte maggiore rispetto a quello della popolazione generale.

La concordanza di malattia tra gemelli monozigoti è pari al 75%, più elevata che in tutte le altre patologie autoimmuni note, mentre tra i dizigoti è pure elevata, ma solo pari all'11%.

La MC è una malattia poligenica. Il 90-95% dei celiaci è portatore dei geni HLA DQ2 o HLA DQ8<sup>(7,28)</sup>. Anche se questi geni sono fondamentali per lo sviluppo della malattia, essi sono tuttavia presenti anche nel 30% dei soggetti normali<sup>(9,11)</sup>.

L'“eterodimero celiaco” è responsabile solo di circa il 40 % dell'ereditarietà della malattia, essendo il rimanente 60% sotto il controllo di una serie di altri geni HLA e non HLA. Recenti studi di associazione-ampio genoma (GWAS) hanno dimostrato che tali loci sono collegati alle risposte immuni e autoimmuni<sup>(27,29)</sup>.

La suscettibilità alla malattia dipende dalla dose genica, vale a dire che allo stato DQ2 in omozigosi è associato un rischio cinque volte maggiore di ammalare rispetto all'eterozigosi.

I peptidi del glutine dimostrano una preferenza a legarsi a molecole DQ 2,5 rispetto ad altre molecole HLA di classe II con legami più forti e duraturi<sup>(20)</sup>.

### **Ruolo dell'immunità innata**

Esperimenti in vitro hanno documentato come l'azione della gliadina sulla mucosa duodenale si esplica entro poche ore, insufficienti all'attivazione dei linfociti T protagonisti dell'immunità adattativa. Alcuni peptidi della gliadina (p31-p43) attivano non solo cellule preposte all'immunità innata (monociti, dendriti, macrofagi) ma anche le stesse cellule epiteliali intestinali attraverso i toll like receptors 4. Mediante iperproduzione di IL 15 e il rilascio di IFN- $\gamma$  e granzime viene stimolata prevalentemente la proliferazione dei linfociti intraepiteliali citotossici (IEL CD8+) e questi a loro volta, causano l'incremento della permeabilità intestinale<sup>(20)</sup>.

Inoltre la IL 15 induce l'espressione delle molecole HLA di classe I MICA sull'epitelio intestinale e di alcune molecole di stress come il recettore NKG-2D sugli stessi IEL che, acquisite le caratteristiche di natural Killer (NK), causano la morte degli enterociti per apoptosi<sup>(10,23,25)</sup>. Un'attivazione isolata di questa branca dell'immunità ha un equivalente clinico nella “**gluten sensitivity**” in cui a sintomi di vario genere intestinali ed extraintestinali, coincidenti al consumo di glutine, non corrisponde la presenza nè di anticorpi specifici nè di lesioni intestinali.

### **Ruolo dell'immunità adattativa**

Il principale meccanismo patogenetico alla base della malattia celiaca è però attribuito all'immunità adattativa.

Nell'intestino il sistema immune adattativo ha un ruolo cruciale nel distinguere come innocui o pericolosi gli antigeni derivanti dalla flora intestinale o dai cibi. Nei soggetti predisposti il contatto del glutine con la mucosa intestinale, anziché indurre la proliferazione di cellule T regolatorie (favorenti la tolleranza mediante la liberazione di IL-10), provoca l'attivazione dei linfociti T CD4+. La risposta inizia dalle cellule presentanti l'antigene

(APC: monociti, cellule dendritiche e macrofagi), che presentano epitopi antigenici specifici (33mer) complessati con cellule del sistema HLA di classe II DQ2-DQ8 i quali esercitano una potente azione immunostimolatoria sui linfociti TCD4<sup>+</sup>(13).

La desamidazione dei residui di glutamina a glutammato con carica negativa incrementa notevolmente il legame con l'HLA e di conseguenza l'immunogenicità dei peptidi della gliadina. Questa reazione è catalizzata dalla transglutaminasi, enzima presente abitualmente nel piccolo intestino in forma inattiva ma la cui presenza aumenta notevolmente in corso di flogosi e stress di vario tipo.

L'antigene che innesca la risposta immunitaria non è quindi il glutine nativo ma il suo derivato post-traslazionale.

I linfociti TCD4<sup>+</sup> attivati a loro volta tramite citochine T-helper 1, soprattutto IFN gamma, stimolano la produzione di metalloproteasi da parte dei miofibroblasti, causando un rimodellamento della sottomucosa fino all'atrofia dei villi<sup>(6,20,25)</sup>.

### **Ruolo della transglutaminasi**

La transglutaminasi è un enzima multifunzionale, Ca<sup>2+</sup> dipendente, presente nel comparto intra ed extracellulare umano. Nella celiachia e in altre patologie le attività di transamidazione e di deamidazione che essa svolge e di cui si è accennato sono implicate in molteplici eventi fondamentali.

Per analogie strutturali di alcune sequenze antigeniche, la produzione anticorpale nel celiaco infatti oltre che contro la gliadina desamidata dalla transglutaminasi, si esercita anche nei confronti dell'enzima medesimo, che acquisisce le caratteristiche di un vero autoantigene. Secondo lavori recenti gli anticorpi anti transglutaminasi, interagendo con la tTG legata a membrane extracellulari, concorrono anch'essi attivamente al mantenimento e alla progressione del danno intestinale inducendo rilevanti alterazioni del citoscheletro dei villi. L'ubiquitarietà dell'enzima spiega in parte anche le manifestazioni extraintestinali della MC<sup>(14,18,28,31)</sup>: infatti depositi di autoAb anti tTG sono stati dimostrati in organi distanti dall'intestino: fegato, cute e cervello anche se, almeno per cute e cervello, si tratta di transglutaminasi analoghe ma non identiche alla tTG2: rispettivamente tTG3 e tTG6.

Nella celiachia la risposta immune ha pertanto due aspetti: quello di una risposta di ipersensibilità al glutine e in quest'ottica si può considerare una "patologia da intolleranza alimentare"; dall'altro quello di una patologia autoimmune con anticorpi diretti verso antigeni "self" che sono la transglutaminasi 2 e l'endomisio. In quanto tale ha, rispetto ad altre patologie

autoimmuni, una caratteristica unica: quella di essere innescata da un antigene ben noto, il glutine, e di accompagnarsi a sintomi che regrediscono completamente quando esso è eliminato dalla dieta.

## SINTOMATOLOGIA NEL BAMBINO

La malattia può presentarsi con un quadro che è la diretta conseguenza del malassorbimento o con un più imprevedibile spettro di sintomi che possono interessare vari organi e apparati, consecutivi al danno prodotto dagli autoanticorpi in varie sedi del corpo<sup>(8)</sup>.

In età pediatrica la sintomatologia clinica differisce da quella dell'adulto soprattutto per la sua possibile grave interferenza sia sulla crescita staturponderale che sulla maturazione sessuale del bambino<sup>(4)</sup>.

Le presentazioni sono varie: la maggior parte dei bambini nel primo biennio di vita e solo una minoranza di adolescenti presenta la forma **classica** o **tipica** caratterizzata da diarrea, distensione addominale e arresto della crescita.

Invece in età scolare e negli adolescenti i sintomi sono più aspecifici: il dolore addominale ricorrente, l'anemia ferripriva, la stipsi oppure la bassa statura isolata sono le principali indicazioni alla visita specialistica che precede la diagnosi. Sintomi più vaghi come cefalea, artralgie, fibromialgie ed alterazioni dell'umore possono rendere particolarmente difficile l'inquadramento diagnostico<sup>(19,21,22)</sup>. Un'altra manifestazione è la dermatite erpetiforme, dermatosi bollosa considerata l'espressione cutanea tipica della celiachia, che risponde anch'essa alla sospensione del glutine dalla dieta.

Casi di celiachia possono manifestarsi isolati o in raggruppamenti familiari: lo screening familiare o dei gruppi a rischio (pazienti affetti da altre patologie autoimmuni o sindromi genetiche) è un'altra fonte di casi clinici per lo più **silenti**, privi cioè di sintomi ma con predisposizione genetica, anticorpi positivi e lesioni intestinali anche severe, o **potenziali** (predisposizione genetica, anticorpi positivi in assenza di lesioni gastrointestinali palesi)<sup>(1,5,15)</sup>.

Il rapporto tra forme sintomatiche e asintomatiche in età pediatrica come nell'adulto è 1:5 - 1:7.

Le diversità nella gravità dei sintomi e della loro variabilità interpersonale non sono ancora completamente spiegate, così come non è accertato il destino a lungo termine dei pazienti con lesioni intestinali lievi sul quale si divide il parere scientifico.

La celiachia non solo ha molteplici e proteiformi presentazioni ma si associa ad altre patologie autoimmuni, tra le quali le più importanti sono il diabete mellito insulino dipendente (15%) e la tiroidite (5%), ma anche l'epatite e

<b>Malattie Immunitarie</b>	<b>Malattie Neurologiche e Psichiatriche 10%</b>	<b>Sindromi Genetiche</b>	<b>Altre</b>
Diabete di tipo I 5 - 10%	Cefalea	Sindrome di Down 4 - 14%	Ipertransaminasemia isolata 60%
Tiroidite autoimmune 8%	Epilessia	Sindrome di Turner 4.6%	
Nefropatia da IgA 4%	Depressione		Osteoporosi 1% - 7%
Epatite autoimmune 3 - 6%	Sindromi cerebellari	Sindrome di Williams	Psoriasi Alopecia 1.5%
Artrite idiopatica 0.4% - 2%	Demenza con atrofia cerebrale		Cardiomiopatia dilatativa 0.54% - 0.86%
Deficit IgA 5%	Leucoencefalopatia		
	Polineuropatia		Tumori maligni
Malattie infiammatorie croniche intestinali (CU)	Autismo		Malattia di Hartnup
Anemia emolitica Autoimmune			Cistinuria

*Tabella I. Patologie associate alla celiachia in età pediatrica.*

l'artrite reumatoide infantile (vedi Tabella I). Va tenuto presente, tuttavia, che nei pazienti autoimmuni è più frequente il reperto di autoanticorpi celiaci "falsi positivi" che nella popolazione normale.

Inoltre una diagnosi tipica dell'età pediatrica è quella dell'associazione con alcune sindromi genetiche come la sindrome di Down, nella quale la prevalenza di CD varia dal 4 al 18%, la sindrome di Turner e di Williams.

I progressi nella conoscenza della malattia sono andati di pari passo con la messa a punto di nuovi marcatori anticorpali sierici. Negli ultimi vent'anni l'accuratezza diagnostica di questi è notevolmente aumentata grazie allo sviluppo di test sempre più sensibili e specifici, anche se la biopsia intestinale rimane per la maggior parte dei casi irrinunciabile ai fini diagnostici e forse anche prognostici.

La diagnosi è quindi attualmente molto più complessa di quanto non fosse negli anni '70.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Biagi F, Corazza GR: *First-degree relatives of celiac patients: are they at an increased risk of developing celiac disease?* J. Clin. Gastroenterol. 2009; 43: 3-4.
2. Carlsson A, Agardh D, Borulf S, Grodzinsky E, Axelsson I, Ivarsson SA: *Prevalence of celiac disease: before and after a national change in feeding recommendations.* Scand. J. Gastroenterol. 2006; 45: 553-558.
3. Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, Elitsur Y, Green PH, Guandalini S, Hill ID, Pietzak M, Ventura A, Thorpe M, Kryszak D, Fornaroli F, Wasserman SS, Murray JA, Horvath K: *Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study.* Arch. Intern. Med. 2003; 163: 286-292.
4. Fasano A, Catassi C: *Coeliac disease in children.* Best Pract Res Clin Gastroenterol 2005; 19: 467-478.
5. Freeman HJ: *Risk factors in familial forms of celiac disease.* World J. Gastroenterol. 2010; 16: 1828-1831.
6. Granzotto M, dal Bo S, Quaglia S, Tommasini A, Piscianz E, Valencic E, Ferrara F, Martellosi S, Ventura A, Not T: *Regulatory T-cell function is impaired in celiac disease.* Dig. Dis. Sci. 2009; 54: 1513-1519.
7. Green PH, Cellier C: *Celiac disease.* N. Engl. J. Med. 2007; 357: 1731-1743.
8. Hadjivassiliou M, Mäki M, Sanders DS, Williamson CA, Grünewald RA, Woodroffe NM, Korponay-Szabó IR: *Autoantibody targeting of brain and intestinal transglutaminase in gluten ataxia.* Neurology 2006; 66: 373-377.

9. Heap GA, van Heel DA: *Genetics and pathogenesis of coeliac disease*. Semin Immunol 2009; 26: 346-354.
10. Hüe S, Mention JJ, Monteiro RC, Zhang S, Cellier C, Schmitz J, Verkarre V, Fodil N, Bahram S, Cerf-Bensussan N, Caillat-Zucman S: *A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease*. Immunity 2004; 21: 367-377.
11. Hunt KA, van Heel DA: *Recent advances in coeliac disease genetics*. Gut 2009; 58: 473-476.
12. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, Troncone R, Giersiepen K, Branski D, Catassi C, Lelgeman M, Mäki M, Ribes-Koninckx C, Ventura A, Zimmer KP; ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis; ESPGHAN Gastroenterology Committee; European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition: *European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease*. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2012; 54: 136-160.
13. Koning F, Gilissen L, Wijmenga C: *Gluten: a two-edged sword. Immunopathogenesis of celiac disease*. Springer Semin. Immunopathol. 2005; 27: 217-232.
14. Korponay-Szabó IR, Halttunen T, Szalai Z, Laurila K, Király R, Kovács JB, Fésüs L, Mäki M: *In vivo targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by coeliac autoantibodies*. Gut 2004; 53: 641-648.
15. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Kelly CP, Leonard JN, Lundin KE, Murray JA, Sanders DS, Walker MM, Zingone F, Ciacci C: *The Oslo definitions for coeliac disease and related terms*. Gut 2012 [Epub ahead of print].
16. Mamone G, Ferranti P, Rossi M, Roepstorff P, Fierro O, Malorni A, Addeo F: *Identification of a peptide from alpha-gliadin resistant to digestive enzymes: implications for celiac disease*. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2007; 855: 236-241.
17. Mustalahti K, Catassi C, Reunanen A, Fabiani E, Heier M, McMillan S, Murray L, Metzger MH, Gasparin M, Bravi E, Mäki M; Coeliac EU Cluster, Project Epidemiology: *The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project*. Ann. Med. 2010; 42: 587-595.
18. Myrsky E, Kaukinen K, Syrjänen M, Korponay-Szabó IR, Mäki M, Lindfors K: *Coeliac disease-specific autoantibodies targeted against transglutaminase 2 disturb angiogenesis*. Clin. Exp. Immunol. 2008; 152: 111-119.
19. Newton KP, Singer SA: *Celiac disease in children and adolescents: special considerations*. Semin Immunopathol, 2012; [Epub ahead of print]
20. Qiao SW, Iversen R, Ráki M, Sollid LM: *The adaptive immune response in celiac disease*. Semin Immunopathol 2012 [Epub ahead of print].
21. Rizkalla Reilly N, Dixit R, Simpson S, Green PH: *Celiac disease in children: an old disease with new features*. Minerva Pediatr 2012; 64: 71-81.
22. Roma E, Panayiotou J, Karantana H, Constantinidou C, Siakavellas SI, Krini M, Syriopoulou VP, Bamias G: *Changing pattern in the clinical presentation of pediatric celiac disease: a 30-year study*. Digestion 2009; 80: 185-191.
23. Schuppan D, Junker Y, Barisani D: *Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies*. Gastroenterology 2009; 137: 1912-1933.

24. Stene LC, Honeyman MC, Hoffenberg EJ, Haas JE, Sokol RJ, Emery L, Taki I, Norris JM, Erlich HA, Eisenbarth GS, Rewers M: *Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study*. Am. J. Gastroenterol. 2006; 101: 2333-2340.
25. Stepniak D, Koning F: *Celiac disease--sandwiched between innate and adaptive immunity*. Hum. Immunol. 2006; 67: 460-468.
26. Teresi S, Crapisi M, Vallejo MD, Castellaneta SP, Francavilla R, Iacono G, Ravelli A, Menegazzi P, Louali M, Catassi C: *Celiac disease seropositivity in Saharawi children: a follow-up and family study*. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2010; 50: 506-509.
27. Trynka G, Wijmenga C, van Heel DA: *A genetic perspective on coeliac disease*. Trends Mol. Med. 2010; 16: 537-550.
28. Tye-Din J, Anderson R: *Immunopathogenesis of celiac disease*. Curr. Gastroenterol. Rep. 2008; 10: 458-465.
29. van Heel DA, Franke L, Hunt KA, Gwilliam R, Zhernakova A, Inouye M, Wapenaar MC, Barnardo MC, Bethel G, Holmes GK, Feighery C, Jewell D, Kelleher D, Kumar P, Travis S, Walters JR, Sanders DS, Howdle P, Swift J, Playford RJ, McLaren WM, Mearin ML, Mulder CJ, McManus R, McGinnis R, Cardon LR, Deloukas P, Wijmenga C: *A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21*. Nat. Genet. 2007; 39: 827-829.
30. Wieser H: *Chemistry of gluten proteins*. Food Microbiol. 2007; 24: 115-119.
31. Zanoni G, Navone R, Lunardi C, Tridente G, Bason C, Sivori S, Beri R, Dolcino M, Valletta E, Corrocher R, Puccetti A: *In celiac disease, a subset of autoantibodies against transglutaminase binds toll-like receptor 4 and induces activation of monocytes*. PLoS Med 2006; 3: 358.



duodenale rimane il gold standard per la diagnosi, tuttavia le alterazioni istologiche osservate nella celiachia possono essere condivise da molte altre condizioni patologiche. Sebbene la ricerca sia attivamente impegnata a trovare trattamenti alternativi, la dieta priva di glutine è al momento l'unica terapia efficace per la celiachia. La dieta determina normalizzazione dell'istologia duodenale e corregge il malassorbimento, essa deve essere condotta in modo scrupoloso e per tutta la vita.

## IL QUADRO CLINICO NELL'ADULTO

A lungo, la celiachia è stata ritenuta una patologia tipica dell'età pediatrica, caratterizzata da grave compromissione dello stato nutrizionale e diarrea<sup>(11,15,16)</sup>.

Negli anni '80, con l'avvento di anticorpi celiaco-correlati di nuova generazione<sup>(6,12)</sup>, si sono resi disponibili test diagnostici assai meno invasivi della biopsia duodenale; si è quindi iniziato a ricercare la malattia celiaca anche in pazienti adulti con quadro clinico sfumato (anemia microcitica, astenia, discomfort intestinale tipo sindrome dell'intestino irritabile), osservando tassi di prevalenza inaspettatamente alti. Attualmente le diagnosi in età adulta

<b>Sintomi gastroenterici importanti</b>	Sintomi suggestivi di malassorbimento e malnutrizione (diarrea cronica, steatorrea, calo ponderale)
<b>Sintomi gastroenterici sfumati</b>	Dolori addominali, dispepsia, colon irritabile, stipsi, meteorismo, inappetenza
<b>Alterazioni di laboratorio</b>	Alterazioni altrimenti non spiegate (anemia sideropenica, aumento transaminasi, ipocalcemia, riduzione folati, allungamento del tempo di protrombina)
<b>Alterazioni di cute e annessi</b>	Eruzione cutanea pruriginosa in sedi tipiche per dermatite erpetiforme (glutei, ginocchia, gomiti), alopecia areata, fragilità ungueale, orticaria cronica, vitiligine, ippocratismo digitale
<b>Alterazioni riproduttive</b>	Infertilità inspiegata, aborti ripetuti
<b>Alterazioni odontoiatriche</b>	Aftosi orale ricorrente
<b>Alterazioni ossee</b>	Osteoporosi nel maschio o nella donna prima del climaterio, osteomalacia
<b>Alterazioni neurologiche</b>	Atassia cerebellare, epilessia con calcificazioni occipitali, polineuropatia non spiegata

Tabella I. Presentazione clinica nell'adulto (modificato dal Percorso Diagnostico Terapeutico Assistenziale, ARESS).

superano di gran lunga quelle in età pediatrica<sup>(10)</sup> ed è un'evenienza tutt'altro che rara che la diagnosi venga posta dopo i 60 anni di età: in alcuni casi si tratta di malattia ad esordio tardivo, in altri di ritardo diagnostico determinato da una sintomatologia sfumata ed atipica<sup>(18,28)</sup>.

Il paziente celiaco si può dunque presentare con una vasta gamma di sintomi e segni, dai più tipici ed eclatanti ai più rari e sfumati (Tabella I).

Tra i soggetti con sintomi che in apparenza non presentano correlazione con l'apparato gastroenterico (anemia, osteoporosi/osteopenia) la diagnosi è più difficile ed i ritardi diagnostici più probabili; tuttavia anche in questi casi un malassorbimento selettivo (ferro, acido folico, calcio, vit. D) è alla base del quadro clinico. In alcuni casi, ciò che conduce al corretto inquadramento diagnostico, non è tanto la presenza di sintomi carenziali, quanto il riscontro di patologie che si associano, con una probabilità significativamente superiore alla popolazione generale, alla celiachia (Tabella II) come il diabete mellito di tipo I, la sindrome di Down, la tiroidite autoimmune, etc.

<b>Familiari di soggetti celiaci</b>	Genitori, figli, fratelli
<b>Deficit di IgA</b>	Immunoglobuline IgA < 5 mg/dl
<b>Alterazioni cromosomiche</b>	Sindrome di Down, sindrome di Turner, sindrome di Williams
<b>Patologie autoimmuni</b>	Collagenopatie (AR, sindrome di Sjogren, ecc.), endocrinopatie (diabete mellito di tipo I, morbo di Addison, tireopatia autoimmune), cardiomiopatia dilatativa, psoriasi
<b>Alterazioni nefrologiche</b>	Nefropatia a IgA

*Tabella II. Condizioni cliniche associate a malattia celiaca nell'adulto (modificato dal Percorso Diagnostico Terapeutico Assistenziale, ARESS).*

## LA DIAGNOSI

Vari test sierologici sono stati proposti nell'inquadramento diagnostico della sospetta celiachia ma nella pratica clinica sono attualmente utilizzati solo:

- gli anticorpi anti-gliadina (AGA) (o meglio i più recenti anti-gliadina deamidata) da utilizzarsi solo al di sotto dei 2-5 anni di età perché dotati di sensibilità e specificità assolutamente inadeguate nei soggetti adulti<sup>(19,23)</sup>.
- gli anti-endomisio (EMA), che utilizzano esofago di scimmia come substrato e la cui lettura richiede esperienza e l'uso di microscopio a fluorescenza<sup>(6)</sup>.
- gli anti-transglutaminasi tissutale (tTG), meno costosi rispetto agli EMA e di più facile lettura poiché si utilizza la tecnica ELISA<sup>(12)</sup>.

Poiché non vi è alcun vantaggio nel richiedere più di un anticorpo, è attualmente buona pratica clinica limitarsi a richiedere i tTG<sup>(25)</sup>.

Tuttavia, poiché gli anticorpi celiaco-correlati sono di classe IgA e fino al 3% dei celiaci può presentare un deficit di IgA<sup>(4)</sup>, è consigliabile richiedere, congiuntamente alla ricerca di tTG, anche il dosaggio delle IgA sieriche.

Gli EMA ed i tTG, che negli studi clinici dimostrano sensibilità superiore al 90-95%<sup>(22)</sup>, hanno una resa diagnostica inferiore (tra 62 e 85%) nella pratica clinica quotidiana<sup>(2,17,29)</sup>. Ne deriva che, in presenza di un elevato sospetto clinico di celiachia, non ci si può accontentare della negatività degli anticorpi celiaco correlati ma occorre procedere alla biopsia duodenale<sup>(1,13)</sup> che tuttora rimane il gold standard per la diagnosi di celiachia<sup>(25)</sup>. Le alterazioni osservate vengono descritte utilizzando la classificazione di Marsh-Oberhuber<sup>(24,26)</sup> o la più recente classificazione di Corazza-Villanacci<sup>(8)</sup>; per un corretto

Marsh-Oberhuber	Corazza-Villanacci
<p><b>Tipo 1:</b> IEL &gt; 25/100 enterociti, cripte normali, villi normali</p> <p><b>Tipo 2:</b> IEL &gt; 25/100 enterociti, cripte ipertrofiche, villi normali</p>	<b>Grado A</b>
<p><b>Tipo 3a:</b> IEL &gt; 25/100 enterociti, cripte ipertrofiche, villi lievemente atrofici</p> <p><b>Tipo 3b:</b> IEL &gt; 25/100 enterociti, cripte ipertrofiche, villi marcatamente atrofici</p>	<b>Grado B1</b>
<p><b>Tipo 3c:</b> IEL &gt; 25/100 enterociti, cripte ipertrofiche, villi assenti</p>	<b>Grado B2</b>
IEL = Intraepitelial lymphocytes	

Tabella III. Confronto tra la classificazione di Marsh-Oberhuber e quella di Corazza-Villanacci.

inquadramento è indispensabile che il patologo valuti non solo la presenza e l'entità dell'atrofia dei villi ma anche il numero di linfociti intraepiteliali e l'ipertrofia delle cripte (Tabella III). Le alterazioni istologiche osservate nella celiachia non sono tuttavia specifiche ma sono condivise da molte altre condizioni patologiche (Tabella IV): la diagnosi di celiachia non si basa quindi su un singolo parametro ma richiede spesso un inquadramento generale che prenda in considerazione contemporaneamente parametri clinici, anticorpi celiaco-correlati e biopsia duodenale. Nella Figura 1 è esemplificato l'iter diagnostico per giungere alla diagnosi di celiachia.

<p><b>Cause infiammatorie, infettive e tossiche</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Sprue tropicale</li> <li>– Gastroenterite eosinofila</li> <li>– Morbo di Whipple</li> <li>– Morbo di Crohn</li> <li>– Polluzione batterica</li> <li>– Parassitosi / Virosi</li> <li>– Tubercolosi</li> <li>– Enteropatia ischemica</li> <li>– Radioterapia</li> <li>– Farmaci (anti-infiammatori non steroidei, etc)</li> </ul> <p><b>Abetalipoproteinemia</b></p>	<p><b>Cause disimmunitarie</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Enteropatie autoimmuni</li> <li>– Malattie autoimmuni (lupus eritematoso sistemico, etc)</li> <li>– Allergie a proteine diverse dal glutine</li> <li>– Graft versus host disease</li> <li>– Deficit immunitari: deficit di IgA, ipogammaglobulinemia, HIV</li> </ul> <p><b>Sindrome di Zollinger-Ellison</b></p>
---	--

*Tabella IV. Cause di atrofia dei villi.*

È molto discusso se la biopsia duodenale sia sempre indispensabile per poter porre la diagnosi di celiachia, recentemente l'ESPGHAN (European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) si è espressa ammettendo la possibilità di omettere, in un sottogruppo di pazienti pediatrici, con sintomi tipici e sierologia positiva, la biopsia duodenale<sup>(21)</sup>.

Un altro importante strumento diagnostico è il test genetico per la ricerca degli alleli HLA-DQ2 e DQ8; tale predisposizione genetica è presente nella

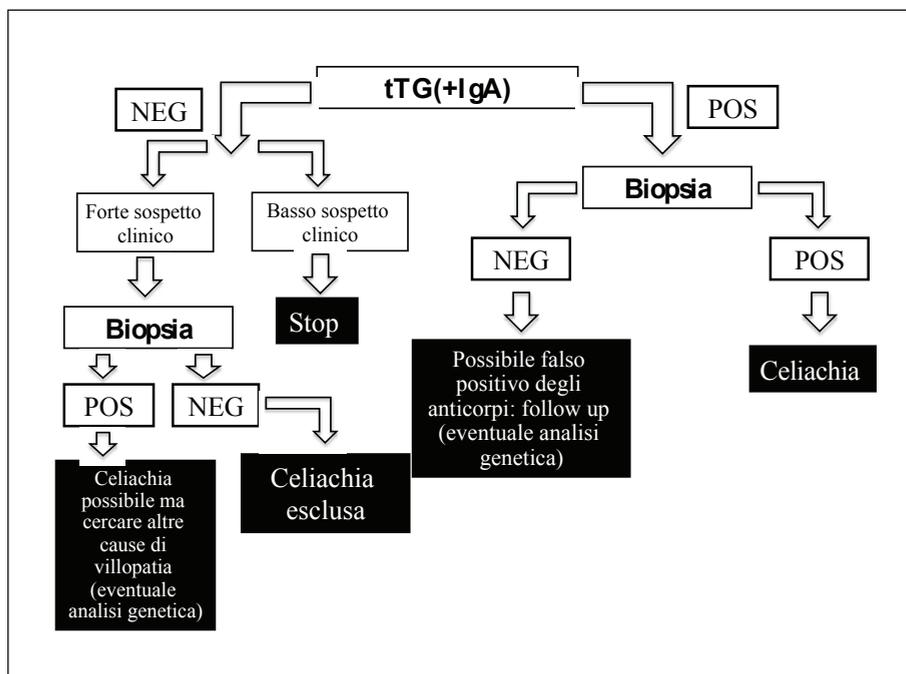


Figura 1. Iter diagnostico della malattia celiaca.

quasi totalità dei soggetti celiaci (95% e 5% rispettivamente) ma anche nel 30% circa della popolazione generale<sup>(3)</sup>. Questo test può quindi essere utilizzato per il suo elevato valore predittivo negativo, ma va eseguito in ambito specialistico e solo per casi selezionati, in cui non vi sia concordanza tra sierologia e biopsia duodenale, come evidenziato nella Figura 1<sup>(25)</sup>.

Non sarà mai sottolineata abbastanza l'importanza di arrivare ad una diagnosi corretta di celiachia poiché la dieta senza glutine (DSG) è onerosa sia per il Sistema Sanitario Nazionale, in termini economici, sia per il paziente che deve certamente sottostare a rinunce alimentari.

Assolutamente da proscrivere l'inizio della DSG "ex-iuvantibus" prima di aver completato un corretto iter diagnostico<sup>(25)</sup>.

## LA TERAPIA

La terapia della celiachia consiste nell'eliminazione di tutti gli alimenti contenenti glutine dalla dieta, in questo modo si ottiene la restitutio ad integrum della mucosa intestinale, la correzione del malassorbimento e si possono

prevenire complicanze correlate alla celiachia. I cereali che contengono il glutine sono il grano e i suoi derivati (come il kamut, il farro, la spelta e il triticale), la segale e l'orzo. I cereali invece naturalmente "gluten-free" sono il grano saraceno, il mais, il riso, la manioca, il miglio, l'amaranto, la quinoa e il sorgo. Un discorso a parte merita l'avena, in quanto le opinioni sulla sua tossicità sono discordanti; in attesa di ulteriori approfondimenti si consiglia ai pazienti di evitarla<sup>(14)</sup>. Seguire correttamente la DSG è però molto di più che prestare attenzione ai prodotti da forno, il glutine infatti può essere contenuto, spesso come addensante, in molti cibi come marmellate, carni in scatola, insaccati, formaggi spalmabili, gelati, chewing-gum, etc. Mentre per i prodotti da forno i celiaci si possono rifornire in farmacie e negozi specializzati verificando che sui prodotti sia presente il marchio che indica l'assenza di glutine, per tutte le altre categorie di alimenti esiste un prontuario prodotto dall'Associazione Italiana Celiachia (AIC) che indica quali prodotti, acquistabili in tutta la filiera distributiva, siano sicuri per il celiaco. La DSG deve essere rigorosa, gli errori saltuari non sono consentiti poiché anche minime quantità di glutine (50 mg al di', poco più di quanto contenuto in una briciola di pane) sono in grado di determinare uno stato di cronica infiammazione intestinale<sup>(5)</sup>.

Le indubbe difficoltà che il soggetto a DSG deve affrontare, dovendosi confrontare quotidianamente con pasti fuori casa, mense scolastiche, rinunce talora difficili da sopportare, rendono conto del fatto che la dieta è seguita in modo scrupoloso da non più del 40-85% dei soggetti<sup>(7,20)</sup>.

La prolungata esposizione al glutine, per ritardo diagnostico o per scarsa aderenza alla DSG, predispone a complicanze pre-neoplastiche (sprue collagena, digiuno-ileite ulcerativa e celiachia refrattaria) e neoplastiche (linfomi e adenocarcinomi intestinali), molte delle quali accomunate dalla perdita di risposta alla DSG e spesso da un andamento infausto<sup>(9)</sup>. Una percentuale di celiaci che va dal 7 al 30% continua ad avere sintomi nonostante la DSG; le spiegazioni sono moltissime e solo in una minima percentuale la causa è una delle complicanze sopra descritte. Nella maggior parte dei casi la persistenza dei sintomi è determinata da scarsa aderenza alla DSG, dalla concomitante presenza di deficit di lattasi, di polluzione batterica intestinale o da insufficienza pancreatica e molte di queste condizioni sono transitorie<sup>(27)</sup>.

## **NUOVE PROSPETTIVE**

Le difficoltà a seguire correttamente la DSG sono alla base di notevoli sforzi della comunità scientifica per trovare alternative alla dieta, le soluzioni

fino ad ora proposte sono tuttavia sperimentali ed attualmente non disponibili sul mercato<sup>(30)</sup>.

Gli attuali orientamenti della ricerca sono riassunti nella Tabella V.

Target della terapia	Potenziale trattamento
Il glutine	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Cereali geneticamente modificati contenenti gliadina con sequenze non tossiche</li> <li>– Polimeri chelanti il glutine</li> <li>– Digestione enzimatica in vivo o in vitro del glutine</li> <li>– Anticorpi neutralizzanti il glutine</li> </ul>
La permeabilità intestinale	– Inibitori della zonulina (AT 1001)
La transglutaminasi tissutale	– Molecole che inibiscano l'enzima e quindi riducano la creazione di antigeni
La presentazione dell'antigene	– Molecole che si leghino alla tasca dell'HLA sulle Antigen Presenting Cells
La risposta immunitaria	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Inibitori delle citochine infiammatorie (farmaci biologici)</li> <li>– Inibitori della risposta linfocitaria (anti CD3/anti CD20)</li> <li>– Vaccino</li> </ul>

*Tabella V. Potenziali nuovi trattamenti proposti per il trattamento della celiachia, alternativi alla dieta aglutinata.*

## BIBLIOGRAFIA

1. Aress Regione Piemonte: *Percorso diagnostico terapeutico assistenziale della malattia celiaca*. 2008. [www2.aress.piemonte.it](http://www2.aress.piemonte.it)
2. Boger CP, Thomas PW, Nicholas DS, Surgenor SL, Snook JA: *Determinants of endomysial antibody status in untreated coeliac disease*. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 2007; 19: 890-895.
3. Bourgey M, Calcagno G, Tinto N, Gennarelli D, Margaritte-Jeannin P, Greco L, Limongelli MG, Esposito O, Marano C, Troncone R, Spanpanato A, Clerget-Darpoux F, Sacchetti L: *HLA related genetic risk for coeliac disease*. Gut. 2007; 56: 1054-1059.
4. Cataldo F, Lio D, Marino V, Picarelli A, Ventura A, Corazza GR: *IgG(1) antiendomysium and IgG antitissue transglutaminase (anti-tTG) antibodies in coeliac patients with selective IgA deficiency*. Working Groups on Celiac Disease of SIGEP and Clud del Tenue. Gut. 2000; 47: 366-369.
5. Catassi C, Fabiani E, Iacono G, D'Agate C, Francavilla R, Biagi F, Volta U, Accomando S, Picarelli A, De Vitis I, Pianelli G, Gesuita R, Carle F, Mandolesi A, Bearzi I, Fasano A: *A prospective, double-blind, placebo controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease*. Am. J. Clin. Nutr. 2007; 85: 160-166.
6. Chorzelski TP, Sulej J, Tchorzewska H, Jablonska S, Beutner EH, Kumar V: *IgA class endomysium antibodies in dermatitis herpetiformis and coeliac disease*. Ann. NY Acad. Sci. 1983; 420: 325-334.
7. Ciacci C, Cirillo M, Cavallaro R, Mazzacca G: *Long-term follow-up of coeliac adults on gluten-free diet: prevalence and correlates of intestinal damage*. Digestion 2002; 66 (3): 178-185.
8. Corazza GR, Villanacci V, Zambelli C, Milione M, Luinetti O, Vindigni C, Chioda C, Albarello L, Bartolini D, Donato F: *Comparison of the interobserver reproducibility with different histologic criteria used in celiac disease*. Clin. Gastroenterol. Hepatol. 2007; 5: 838-843.
9. Ryan BM, Kelleher D: *Refractory celiac disease*. Gastroenterology 2000; 119: 243-251.
10. Cranney A, Zarkadas M, Graham ID, Butzner JD, Rashid M, Warren R, Molloy M, Cases S, Burrows V, Switzer C: *The Canadian celiac health survey*. Dig. Dis. Sci. 2007; 52: 1087-1095.
11. Dicke WK: *Celiaca*. Dtsch. Med. J. 1958; 9: 494-496.
12. Dieterich W, Laag E, Schöpper H, Volta U, Ferguson A, Gillett H, Riecken EO, Schuppan D: *Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease*. Gastroenterology 1998; 115: 1317-1321.
13. Freeman HJ, Chopra A, Clandinin MT, Thomson AB: *Recent advances in celiac disease*. World J. Gastroenterol. 2011; 17: 2259-2272.
14. Fric P, Gabrovská D, Nevorál J: *Celiac disease, gluten-free diet, and oats*. Nutr. Rev. 2001; 69: 107-115.
15. Glaser J: *Gastrointestinal allergy in infancy and childhood*. Med. Assoc. Ga. 1956; 45: 514-518.
16. Granditsch G: *Celiac disease (gluten sensitive enteropathy)*. Pediatr. Padol. 1990; 25: 67-84.
17. Hadithi M, von Blomberg BM, Crusius JB, Bloemena E, Kostense PJ, Meijer JW, Mulder CJ, Stehouwer CD, Pena AS: *Accuracy of serologic tests and HLA-DQ typing for diagnosing celiac disease*. Ann Intern Med. 2007; 147: 294-302.

18. Hankey GL, Holmes GK: *Coeliac disease in the elderly*. Gut. 1994; 35: 65-67.
19. Hill ID: *What are the sensitivity and specificity of serologic tests for celiac disease? Do sensitivity and specificity vary in different population?* Gastroenterology 2005; 128: s25-32.
20. Hogberg L, Grodzinsky E, Stenhammar L: *Better dietary compliance in patients with coeliac disease diagnosed in early childhood*. Scand. J. Gastroenterol. 2003; 38: 751-754.
21. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, Troncone R, Giersiepen K, Branski D, Catassi C, Lelgeman M, Maki M, Ribes-Koninckx C, Ventura A, Zimmerx KP: *European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease*. JPGN. 2012; 54: 136-160.
22. Lewis NR, Scott BB: *Systematic review: the use of serology to exclude or diagnose coeliac disease (a comparison of the endomysial and tissue transglutaminase antibody tests)*. Aliment. Pharmacol. Ther. 2006; 24: 47-54.
23. Kaukinen K, Collin P, Laurila K, Kaartinen T, Partanen J, Maki M: *Resurrection of gliadin antibodies in coeliac disease. Deamidated gliadin peptide antibody provides additional diagnostic benefit*. Scand. J. Gastroenterol. 2007; 42: 1428-1433.
24. Marsh MN, Crowe PT: *Morphology of mucosal lesion in gluten sensitivity*. Bailliere's Clin. Gastroenterol. 1995; 9: 273-293.
25. National Institute for Health and Clinical Excellence: *Coeliac disease: recognition and assessment of coeliac disease*. 2009. [www.nice.org.uk/CG86](http://www.nice.org.uk/CG86).
26. Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H: *The histopathology of celiac disease: time for standardized report scheme for pathologists*. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 1999; 11: 1185-1194.
27. O'Mahony S, Howdle PD, Losowsky MS: *Review article: management of patients with non-responsive coeliac disease*. Aliment. Pharmacol. Ther. 1996; 10: 671-680.
28. Rashtak S, Murray JA: *Celiac disease in the elderly*. Gastroenterol. Clin. North Am. 2009; 38: 433-446.
29. Reeves GE, Squance ML, Duggan AE, Murugasu RR, Wilson RJ, Wong RC, Gibson RA, Steele RH, Pollock WK: *Diagnostic accuracy of coeliac serological tests: a prospective study*. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 2006; 18: 493-501.
30. Sollid LM, Khosla C: *Novel therapies for coeliac disease*. J. Intern. Med. 2011; 269: 604-613.

## I TUMORI NEUROENDOCRINI GASTROENTEROPANCREATICI

*Luigi Dogliotti, Anna Ferrero, Alfredo Berruti*

Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche  
Università degli Studi di Torino  
Oncologia Medica - Azienda Ospedaliera San Luigi - Orbassano

**Key words:** *Gastroenteropancreatic / Tumori neuroendocrini  
neuroendocrine tumors gastroenteropancreatici  
Chromogranin A / Cromogranina A  
Target therapies / Terapie target*

### **Abstract:**

Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs) are an heterogeneous group of rare disease which encompasses well differentiated endocrine carcinomas and poorly differentiated highly aggressive small cell tumors.

According to WHO 2010 histological classification, gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms can be divided into two categories, neuroendocrine tumors and neuroendocrine carcinomas, based on histological grading, Ki67 proliferating index and mitotic count.

Patients with well differentiated neuroendocrine carcinoma with locally advanced or metastatic disease, not amenable to surgical resection with radical intent, are usually addressed to biotherapy (somatostatin analogs and/or alpha-interferon), systemic or locoregional chemotherapy, TACE, RF ablation, radioreceptor metabolic therapy.

Recently, the availability of novel drugs such as small molecule tyrosine kinase inhibitors has provided new treatment opportunities in GEP-NETs.

Neuroendocrine cells in fact express a variety of targets including angiogenic factors and their receptors (e.g. VEGF and VEGFR, PDGF and PDGFR), polypeptide receptors (SSTR1-5, EGFR, IGF-1 and IGF-1 R), and small molecules (mTOR).

In this particular setting there is therefore a strong rationale of testing new target therapies as single drug or in combination with traditional therapies, with the aim of obtaining an increasingly individualized clinical approach.

### **Riassunto:**

I tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici (GEP-NETs) sono un gruppo eterogeneo di malattie rare ad insorgenza ubiquitaria, comprendenti neoplasie a piccole cellule, scarsamente differenziate ed altamente aggressive, accanto a carcinomi endocrini ben differenziati.

La classificazione istologica WHO del 2010 suddivide le neoplasie neuroendocrine del tratto gastroenteropancreatico in 2 grandi categorie, tumori neuroendocrini e carcinomi neuroendocrini, sulla base del grading istologico, dell'indice di proliferazione Ki67 e della conta mitotica.

Tradizionalmente il trattamento dei tumori neuroendocrini avanzati, non suscettibili quindi di approccio chirurgico radicale, si avvale di numerose opzioni, quali la bioterapia con analoghi della somatostatina e/o con alfa-interferon, chemioterapia sistemica o locoregionale, TACE, termoablazione con radiofrequenze, terapia metabolica radiorecettoriale con analoghi radiomarcanti.

Negli ultimi anni la disponibilità di nuove molecole (piccole molecole inibitori tirosin-chinasi) ha del tutto rivoluzionato l'armamentario terapeutico a disposizione dei clinici per il trattamento dei GEP-NETs. Le cellule neuroendocrine infatti esprimono una grande varietà di molecole target inclusi fattori di crescita e rispettivi recettori (ad esempio VEGF e VEGFR, PDGF e PDGFR), recettori polipeptidici (SSTR1-5, EGFR, IGF-1 e IGF-1 R) e piccole molecole (mTOR); tale peculiarità rende queste neoplasie particolarmente adatte alla sperimentazione di nuovi farmaci a bersaglio molecolare, in monoterapia o in associazione alle terapie tradizionali, con un approccio terapeutico sempre più individualizzato per ogni singolo paziente.

I tumori neuroendocrini (NETs) rappresentano un gruppo eterogeneo di malattie rare comprendenti neoplasie a piccole cellule, scarsamente differenziate ed altamente aggressive, accanto a carcinomi endocrini ben differenziati. Il sistema neuroendocrino include tutte le cellule nervose ed endocrine che hanno in comune l'espressione di alcune proteine specifiche (markers panendocrini) e secernono prodotti ormonali cellulo-specifici (Tabella I).

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Struttura organoide</li> <li>• Citologia tipica</li> <li>• Attività proliferativa scarsa (Ki67 &lt; 2%)</li> <li>• p53 non espressa</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Struttura solida</li> <li>• Citologia atipica</li> <li>• Attività proliferativi marcata (Ki67 &gt; 2%)</li> <li>• p53 spesso espressa</li> </ul>	
<b>Marcatore endocrini</b>			
Cromogranina A	++ (+/-)	Cromogranina A	-
Sinaptofisina	++	Sinaptofisina	++
NSE	++	NSE	++
↓		↓	
Tumore endocrino ben differenziato		Carcinoma endocrino scarsamente differenziato (alto grado)	
↓			
<ul style="list-style-type: none"> <li>• A comportamento benigno</li> <li>• A prognosi indefinita</li> <li>• Carcinoma endocrino ben differenziato ( basso grado)</li> </ul>			

Tabella 1. Caratteristiche differenziali tra forme bene e scarsamente differenziate.

I tumori neuroendocrini si suddividono in tumori neuroendocrini del tratto gastroenteropancreatico (GEP), carcinoma midollare della tiroide (MTC), carcinoma cutaneo a cellule di Merkel, feocromocitomi/paragangliomi.

I NETs sono annoverati tra i tumori rari, ma si ritiene che la loro frequenza sia in realtà altamente sottostimata. Considerando solo i tumori GEP, che da

soli rappresentano circa il 70% dei tumori neuroendocrini, è stata riportata una frequenza dello 0.007 per 100.000 abitanti, pari al 2% di tutti i tumori gastrointestinali<sup>(3,13)</sup>.

Inoltre, i dati epidemiologici sulla frequenza di questi tumori si basano sul riscontro dei pazienti sintomatici e quindi sull'incidenza delle neoplasie secernenti, le quali rappresentano non più del 30% dei casi di tumori GEP.

Le casistiche autoptiche rivelano infatti che l'incidenza dei tumori NETs è pari a 1.500 casi/100.000/anno<sup>(15)</sup>. Questa discrepanza appare legata ad una serie di fattori, tra cui la mancata standardizzazione delle procedure diagnostiche e terapeutiche, la carenza di dati sul follow-up, la scarsità di informazioni confrontabili sulle risposte obiettive ottenibili con le diverse procedure terapeutiche.

Lo studio di Modlin del 2003, registrato dal National Cancer Institute (NCI), è il più importante studio epidemiologico attuale e comprende 13715 casi di tumori neuroendocrini<sup>(6)</sup>. Da questa analisi si delinea che le sedi più frequenti di malattia sono il tratto gastrointestinale (73,7%) e il sistema broncopolmonare (29,7%). All'interno del tratto gastrointestinale distinguiamo: piccolo intestino (28,7%), appendice (18,9%), retto (12,6%).

La classificazione anatomico-patologica di questi tumori è da oltre 100 anni oggetto di discussione, con revisioni frequenti, rese possibili dalle migliori conoscenze in campo istologico, immunoistochimico, e della biologia cellulare, fino all'analisi genica di queste forme.

È del 1995 la proposta, da parte di Capella et al.<sup>(2)</sup>, di rivedere completamente la classificazione, integrando gli aspetti patologici, la sede e le caratteristiche funzionali in uno schema unificato, applicabile in particolar modo ai tumori neuroendocrini GEP. Tale proposta è stata successivamente approfondita e fatta propria dall'OMS nella riedizione della classificazione dei tumori neuroendocrini pubblicata nel 2000 da Solcia e coll.<sup>(13)</sup>, nella quale viene nuovamente abbandonato il termine di tumori neuroendocrini in favore del termine di tumori endocrini.

I criteri salienti di tale classificazione sono:

- Abbandono del termine “carcinoide” a favore di tumore endocrino o carcinoma endocrino, in funzione della minore o maggiore malignità.
- Suddivisione delle neoplasie per sede: stomaco, pancreas, duodeno, digiuno-ileo, appendice, colon-retto.
- Utilizzo combinato di dati anatomico-clinici (sede, volume, angioinvasione, metastasi locoregionali o a distanza) e funzionali (assenza o presenza di

secrezione ormonale, tipo di secrezione ormonale, presenza o assenza di sindrome clinica associata).

- Utilizzo di uno schema classificativo uniforme per tutte le sedi, con tre categorie di neoplasie:
  - a) tumori endocrini ben differenziati
  - b) carcinomi endocrini ben differenziati (a basso grado di malignità)
  - c) carcinomi endocrini scarsamente differenziati (ad alto grado di malignità)
  - d) neoplasie miste esocrine-endocrine

Evoluzione della classificazione WHO 2000 è la revisione UICC/AJCC/WHO TNM del 2010, che suddivide sostanzialmente le neoplasie neuroendocrine del tratto gastrointestinale in 2 grandi categorie, tumori neuroendocrini e carcinomi neuroendocrini, prendendo in considerazione grading istologico, indice di proliferazione Ki67 e conta mitotica.

Una delle caratteristiche peculiari dei tumori neuroendocrini (NET) è l'attitudine a secernere e rilasciare in circolo sostanze quasi sempre dotate di attività ormonale. Lo sviluppo delle tecniche di dosaggio immunometrico ha reso possibile la valutazione routinaria della maggior parte dei prodotti di secrezione di queste neoplasie. La diagnostica di laboratorio attualmente mette a disposizione della clinica il dosaggio di svariati prodotti a origine neuroendocrina, in condizioni basali o, meno frequentemente, in condizioni dinamiche attraverso l'esecuzione di specifici test di stimolo o di inibizione.

La possibilità di identificare marcatori ad alto grado di sensibilità e specificità nei tumori neuroendocrini è fondamentale sia per orientare l'iter diagnostico sia per quanto riguarda il follow-up dei pazienti dopo chirurgia o il monitoraggio durante terapia medica, in una patologia in cui le modificazioni di malattia sono difficilmente quantificabili mediante i tradizionali esami strumentali<sup>(12)</sup>.

La cromogranina A (CgA) è la molecola più studiata tra i marcatori neuroendocrini, e pare coinvolta nei meccanismi di accumulo delle catecolamine nei granuli secretori, di inibizione del clivaggio proteolitico di pro-ormoni da parte della tripsina e nei meccanismi di regolazione che portano alla formazione dei granuli secretori.

La molecola matura della Cg A (439 aa. PM 48 KDa) è caratterizzata da una elevata omologia interspecie, specialmente a livello delle estremità N- e C- terminali. È una glicoproteina acida per l'alto contenuto di residui di acido aspartico, glutammico e di prolina; si caratterizza inoltre per la presenza di

doppiette di amminoacidi basici in sequenza, sede privilegiata di clivaggio proteolitico ad opera di specifiche proteasi e di numerosi siti leganti il calcio.

L'espressione della cromogranina A, ubiquitaria nei tessuti neuroendocrini, è caratterizzata dalla co-espressione di ormoni polipeptidici o neurotrasmettitori di tipo cellulo-specifico: pertanto il gene della cromogranina A deve essere in grado di rispondere ad un'ampia varietà di segnali modulatori che portano all'espressione della molecola in molteplici famiglie cellulari<sup>(9)</sup>.

Oggi disponiamo, nella pratica clinica, di due approcci metodologici distinti per la quantificazione immunometrica della CgA. La CgA è dosabile nel plasma con metodica ELISA mediante un anticorpo policlonale o nel siero con metodica RIA attraverso un anticorpo monoclonale. Entrambe le metodiche sono valide ed i valori vengono espressi in U/l, se ottenuti con il metodo ELISA, e in ng/ml se ottenuti con il metodo RIA. I valori ottenuti in ELISA o in RIA, in condizioni di normalità o di patologia, non sono però confrontabili, e questo può spiegare la frequente discrepanza dei dati ottenuti in studi precedenti. Entrambe le metodiche hanno meriti e limiti<sup>(14)</sup>.

La specificità e la sensibilità del dosaggio della CgA circolante sono molto elevate, esistono però alcune situazioni in cui si possono riscontrare dei falsi positivi quali l'insufficienza renale, l'ipertensione arteriosa essenziale, la gastrite atrofica, il morbo di Parkinson, l'uso di farmaci inibitori della pompa protonica, la gravidanza<sup>(11)</sup>.

Com'è regola per i marcatori tumorali, anche per la CgA circolante il valore risiede soprattutto nelle variazioni nel tempo del marcatore piuttosto che nel rilievo del singolo dato.

Dati i quesiti tuttora aperti sul significato clinico e prognostico della Cromogranina A, a partire da aprile 2003 fino ad ottobre 2004, grazie alla collaborazione di oltre 40 centri di oncologia, gastroenterologia ed endocrinologia italiani, sono stati inseriti 273 pazienti affetti da tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici all'interno di uno Studio Osservazionale per la valutazione della Cromogranina A circolante come marker per la diagnosi ed il follow-up dei tumori neuroendocrini (NET), denominato CROMaNET.

Obiettivo primario dello studio era quello di validare il significato clinico del dosaggio della Cromogranina A circolante nella diagnosi (FASE I) e nel follow-up (FASE II) dei pazienti affetti da NETs<sup>(4)</sup>.

La terapia chirurgica rappresenta il trattamento di prima scelta per i tumori neuroendocrini e deve sempre essere perseguita nei casi in cui sia fattibile<sup>(7)</sup>. La scelta del trattamento chirurgico si basa su un'attenta valutazione della

specifica situazione di ogni singolo paziente e sulla conoscenza dei risultati legati alle diverse procedure.

Meno del 50% dei pazienti affetti da carcinoma neuroendocrino è suscettibile di resezione radicale del tumore primitivo, o candidabile ad una chirurgia di debulking come primo approccio. A questi pazienti è pertanto riservato un trattamento medico. La terapia medica si avvale di numerose opzioni, quali la bioterapia con analoghi della somatostatina e/o con alfa-interferon, chemioterapia sistemica o locoregionale, TACE, termoablazione con radiofrequenze, terapia metabolica radiorecettoriale, terapie a bersaglio molecolare o “target therapies”. Per quanto riguarda la gestione clinica dei tumori neuroendocrini inoltre, la multidisciplinarietà ha un ruolo cruciale, vedendo affiancati nel trattamento di queste patologie diversi specialisti: oncologo, endocrinologo, chirurgo, anatomo-patologo, radiologo interventista, medico nucleare, gastroenterologo.

La scelta del trattamento più appropriato per le neoplasie neuroendocrine gastroentero-pancreatiche (GEP-NETs) si basa in primo luogo sulle caratteristiche istologiche e sulla attività proliferativa delle diverse forme tumorali; il coinvolgimento multidisciplinare di diversi specialisti mira ad ottenere un approccio terapeutico personalizzato per ogni singolo paziente. Attualmente i dati a supporto delle scelte terapeutiche dei clinici provengono da studi randomizzati controllati e da linee guida redatte da panel di esperti.

Fino a pochi anni fa l'unica categoria di farmaci approvata per il trattamento dei GEP-NETs era rappresentata dagli analoghi della somatostatina (SSAa), octreotide e lanreotide. La principale indicazione per l'utilizzo dei SSAa era la sindrome da carcinoide associata alla neoplasia; tradizionalmente le forme ben differenziate caratterizzate da basso indice proliferativo (G1-G2 GEP-NETs) vengono indirizzate up-front a trattamento biologico con analogo della somatostatina, mentre la chemioterapia sistemica è da riservare in prima battuta alle forme scarsamente differenziate e rapidamente proliferanti, microcitomali-like. L'uso degli analoghi della somatostatina in I linea si basa da evidenze che derivano da uno studio di fase IIb randomizzato, doppio-cieco versus placebo, su 85 pazienti trattati in 18 centri tedeschi dal 2001 al 2008 (PROMID Study) e da un trial controllato (octreotide versus placebo) su pazienti naive affetti da midgut NETs<sup>(10)</sup>. L'effetto antiproliferativo degli analoghi è tuttavia limitato, le risposte obiettive di remissione tumorale evidenziate nelle diverse casistiche non superano il 6-8%. L'associazione di svariati schemi di chemioterapia citotossica all'analogo della somatostatina in forme ben differenziate di GEP-NETs ha dimostrato in alcune esperienze di poter incrementare il tasso di risposte obiettive<sup>(1)</sup>, ciò nonostante una percentuale consistente di GEP-

NETs data la lenta attività proliferativa non risponde alla chemioterapia convenzionale.

Negli ultimi anni la disponibilità di nuove molecole (ad esempio piccole molecole inibitori delle tirosin-kinasi) ha del tutto rivoluzionato l'armamentario terapeutico a disposizione dei clinici per il trattamento dei GEP-NETs. Come già detto infatti, le cellule neuroendocrine esprimono una grande varietà di molecole target inclusi fattori di crescita e rispettivi recettori (ad esempio VEGF e VEGFR, PDGF e PDGFR), recettori polipeptidici (SSTR1-5, EGFR, IGF-1 e IGF-1 R) e piccole molecole (ad esempio mTOR); tale peculiarità rende queste neoplasie particolarmente adatte alla sperimentazione di nuovi farmaci a bersaglio molecolare.

Una grande varietà di farmaci target sono stati indagati nel trattamento dei GEP-NETs, inclusi inibitori dell'angiogenesi (e.g. Bevacizumab, Thalidomide, Endostatina), inibitori tirosin-kinasi (Imatinib, Gefitinib, Sorafenib, Sunitinib), inibitori di mTOR (Temsirrolimus, Everolimus), nuovi analoghi della somatostatina (Pasireotide, molecole chimeriche come la Dopastatina).

La via molecolare di mTOR in particolare è specialmente attivata nelle neoplasie neuroendocrine pancreatiche, e mutazioni somatiche sono state evidenziate nel 14% di questo sottogruppo di neoplasie<sup>(5)</sup>. L'Everolimus (inibitore di mTOR) è stato valutato in uno studio di fase III denominato RADIANT-3 su 410 pazienti affetti da carcinoma neuroendocrino avanzato, dimostrando di prolungare di 6.4 mesi la sopravvivenza libera da progressione e mantenendo tale risultato per 18 mesi nel 35% dei pazienti. Everolimus è stato inoltre confrontato con placebo in associazione ad Octreotide LAR in uno studio denominato RADIANT-2 in pazienti affetti da carcinoma neuroendocrino pancreatico con sindrome, ed è stato evidenziato ad una revisione centralizzata un incremento della sopravvivenza libera da progressione. Effetti collaterale più comuni da Everolimus includono: stomatite, rash cutaneo, diarrea, astenia, polmonite non infettiva, iperglicemia, ipercolesterolemia, ipertrigliceridemia.

Sulla base di questi dati Everolimus è stato approvato nel 2011 dalla US FDA per il trattamento dei tumori neuroendocrini pancreatici in progressione dopo analogo della somatostatina. Sunitinib è stato valutato al dosaggio di 37.5 mg al giorno in 171 pazienti affetti da carcinoma neuroendocrino pancreatico in progressione non resecabile. È stato raggiunto un prolungamento significativo della sopravvivenza libera da progressione (5.9 mesi) rispetto al placebo ed una percentuale di risposte obiettive in termini di regressione tumorale di poco inferiore al 10%<sup>(8)</sup>. Effetti collaterali più comuni includono: diarrea, astenia, rash, ipertensione arteriosa, ipoglicemia, stomatite, nausea, alterazione della

colorazione della cute e degli annessi cutanei. Sunitinib è stato approvato nel 2011 per il trattamento di NET pancreatici in progressione dalla US FDA.

Concludendo, il biennio 2009-2011 ha rappresentato una vera e propria svolta nella gestione delle neoplasie neuroendocrine, sia per lo sviluppo di nuovi farmaci che per la possibilità attuale di effettuare studi randomizzati su un numero congruo di pazienti grazie alla realizzazione di centri di esperienza sulla patologia.

Rimangono tuttavia ancora da chiarire ed investigare alcuni punti chiave: quale la sequenza più opportuna e quali le possibilità di associazione fra nuovi farmaci (ad esempio Everolimus più Sunitinib nei carcinomi neuroendocrini pancreatici) o fra terapie standard e nuove terapie target.

## BIBLIOGRAFIA

1. Brizzi MP, Berruti A, Ferrero A, Milanesi E, Volante M, Castiglione F, Birocco N, Bombaci S, Perroni D, Ferretti B, Alabiso O, Ciuffreda L, Bertetto O, Papotti M, Dogliotti L: *Continuous 5-Fluorouracil infusion plus long acting octreotide in advanced well-differentiated neuroendocrine carcinomas. A phase II trial of the Piemonte Oncology network*. BMC Cancer 2009; 9: 388.
2. Capella C, Heitz PU, Hofler H, Solcia E, Kloppel G: *Revised classification of Neuroendocrine tumours of the lung, pancreas and gut*. Virchows Arch 1995; 425: 547-560.
3. Hammond EH, Yowell RL and Flinner RL: *Neuroendocrine Carcinomas: Role of Immunocytochemistry and Electron Microscopy*. Hum. Pathol. 1992; 29: 1367-1371.
4. Leon A, Torta M, Dittadi R, Degli Uberti E, Ambrosio MR, Delle Fave G, De Braud F, Tomassetti P, Gion M, Dogliotti L: *Comparison between two methods in the determination of circulating chromogranin A in neuroendocrine tumors (NETs): results of a prospective multicenter observational study*. Int. J. Biol. Markers 2005; 20: 156-168.
5. Missiaglia E, Dalai I, Barbi S, Beghelli S, Falconi M, Della Peruta M, Piemonti L, Capurso G, Di Florio A, Delle Fave G: *Pancreatic endocrine tumors: expression profiling evidences a role for AKT m-TOR pathway*. J. Clin. Oncol. 2010; 28: 245-255.
6. Modlin IM, Lye KD, Kidd M: *A 5-decade analysis of 13.715 carcinoid tumors*. Cancer 2003; 97: 934-959.

7. Oberg K, Kvols L, Caplin M, Delle Fave G, de Herder W, Rindi G, Ruzsniwski P, Woltering EA, Wiedenmann B: *Consensus report on the use of somatostatin analogs for the management of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system*. Ann. Oncol. 2004; 15: 966-973.
8. Raymond E, Dahan L, Raoul JL, Bang YJ, Borbath I, Lombard-Bohas C, Valle J, Metrakos P, Smith D, Vinik A: *Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors*. New Engl. J. Med. 2011; 364: 501-513.
9. Rindi G, Buffa R, Sessa F, Tortora O, Solcia E: *Chromogranin A, B and C immunoreactivities of mammalian endocrine cells. Distribution, distinction from costored hormones/prohormones and relationship with the argyrophil component of secretory granules*. Histochem 1986; 85:19-28.
10. Rinke A, Muller HH, Schade-Brittinger C, Klose KJ, Barth P, Wied M, Mayer C, Aminossadati B, Pape UF, Bläker M, Harder J, Arnold C, Gress T, Arnold R; PROMID Study Group: *Placebo-controlled, double blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patient with metastatic neuroendocrine midgut tumors: a report from the PROMID Study Group*. J. Clin. Oncol. 2009; 27: 4656-4663.
11. Seregni E, Ferrari L, Bajetta E, Martinetti A, Bombardieri E: *Clinical significance of blood of chromogranin A measurement in neuroendocrine tumours*. Ann. Oncol. 2001; 12: 69-72.
12. Seregni E, Ferrari L, Stivanello M, Dogliotti L: *Laboratory tests for neuroendocrine tumours*. Q. J. Nucl. Med. 2000; 44: 22-31.
13. Solcia E, Kloppel G, Sobin LH: *Histological Typing of Endocrine Tumors*. Springer-Verlag, 2000, 2<sup>nd</sup> edn, Berlin/Heidelberg/New York.
14. Stivanello M, Berruti A, Torta M, Termine A, Tampellini M, Gorzegno G, Angeli A, Dogliotti L: *Circulating chromogranin A in the assessment of patients with neuroendocrine tumours. A single institution experience*. Ann. Oncol. 2001; 12: 73-77.
15. Vinik AI, McLeod MK, Fig LM, Shapiro B, Lloyd MV, Cho K: *Clinical features, diagnosis, and localization of carcinoid tumors and their management*. Gastroenterol. Clin. North Am. 1989; 18: 865-896.

## LE SPONDILOARTRITI: RECENTI ACQUISIZIONI

*Vittorio Modena*

Primario emerito di Reumatologia  
AUO San Giovanni Battista - Torino

Key words: Spondyloarthritis / Spondiloartriti  
Classification criteria / Criteri classificativi  
Magnetic resonance imaging / Risonanza magnetica  
Blockers of tumour necrosis factor / Farmaci anti TNF

### **Abstract:**

The spondyloarthritis (SpA) are a group of common inflammatory rheumatic disorders with overlapping features as well as genetic and familial associations. In addition to HLA-B27 further genes are associated with the diseases. New classification criteria of the SpA have recently been set. Magnetic resonance imaging changes have now been included in the new classification criteria of early axial SpA and are now considered as a major tool in the diagnosis. Clinical and biological manifestations suggests an autoinflammatory rather than autoimmune origin of inflammation in SpA. Until now there is not a clear explanation of the pathophysiological mechanisms of osteoproliferation and ankylosing. Blockers of tumour necrosis factor are a major therapeutic advance.

### **Riassunto:**

Le spondiloartriti (SpA) sono un gruppo di patologie reumatiche che hanno in comune manifestazioni cliniche, aggregazione familiare ed una predisposizione genetica. In aggiunta all'HLA-B27 altri geni si sono rilevati associati a queste patologie. Recentemente sono stati proposti nuovi criteri classificativi per le SpA e i reperti della risonanza magnetica (RM) sono stati inclusi nei criteri classificativi per le SpA ad impegno assiale, essendo la RM considerata il più efficace mezzo diagnostico. Manifestazioni cliniche e biologiche suggeriscono la natura autoinfiammatoria piuttosto che autoimmune dell'infiammazione alla base di queste patologie. Fino ad ora non è stata chiaramente spiegata la patogenesi della osteoproliferazione e dell'anchilosi. I farmaci anti TNF rappresentano il maggior progresso nella terapia di queste patologie.

Sotto il termine di spondiloartriti (SpA) vengono raggruppate alcune patologie reumatiche, definite sieronegative da Moll e Coll<sup>(33)</sup> per l'assenza del fattore reumatoide: la spondilite anchilosante (SA), le artriti associate alla psoriasi, le artriti associate alle malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI), le artriti reattive, le SpA indifferenziate e un sottogruppo della artrite idiopatica giovanile. Il razionale che ha condotto a questo raggruppamento è sostenuto dal fatto che queste patologie possono essere osservate contemporaneamente o in modo sequenziale nello stesso paziente e/o nei membri della sua famiglia, che alcune manifestazioni quali l'interessamento oculare e l'entesopatia sono simili qualunque sia la diagnosi e che i ratti, resi transgenici per l'HLA-B27, sviluppano varie manifestazioni cliniche delle SPA<sup>(19)</sup>. In questa relazione verranno brevemente ricordate alcune nuove acquisizioni su tali patologie.

Fin dagli anni settanta sono stati proposti numerosi criteri classificativi per le singole patologie, quali i criteri modificati di New York per la SA<sup>(51)</sup>, ma questi erano focalizzati esclusivamente sulle manifestazioni assiali di tali patologie. I primi criteri classificativi per l'intero gruppo delle SpA sono stati proposti da Amor e Coll. nel 1990<sup>(4)</sup>, rivisitati l'anno successivo dall'European Spondyloarthritis Study Group<sup>(21)</sup>. L'avvento della Risonanza Magnetica (RM), che permette di evidenziare una sacroileite (SI)<sup>(8)</sup> molto prima che compaiono le classiche alterazioni rilevabili con la radiologia convenzionale<sup>(37)</sup>, ha condotto alla stesura di nuovi criteri classificativi per le SpA a preminente impegno assiale<sup>(39)</sup> e per quelle a preminente impegno periferico<sup>(40)</sup>. I primi si focalizzano su tre elementi: le varie espressioni cliniche delle SpA, la presenza dell'antigene HLA-B 27 e di una SI rilevata con la radiologia o con la RM. La diagnosi di SpA è possibile in presenza di SI (braccio radiologico) e la presenza di almeno una delle classiche manifestazioni delle SpA. La diagnosi è ancora possibile in presenza dell'HLA-B27 e di almeno due delle manifestazioni delle SpA anche in assenza di manifestazioni di SI alla RM e alla radiologia (braccio clinico) (Tabella I). I criteri per le SpA a preminente impegno periferico<sup>(40)</sup> contemplano la presenza di un criterio maggiore (artrite periferica o dattilite o entesite) e di uno o due criteri minori di due definite serie di manifestazioni (Tabella II). Questi nuovi criteri classificativi sono risultati più sensibili e specifici rispetto a quelli di Amor<sup>(4)</sup> e dell'ASAS<sup>(1)</sup>.

Gli studi familiari<sup>(11,17,31)</sup> e sulla concordanza della malattia nei gemelli monozigoti (50-70%) e dizigoti (15%)<sup>(12,13,19)</sup> hanno rimarcato che l'aggregazione familiare della SA è più legata ai fattori genetici (l'80-90% del rischio alla suscettibilità alla malattia) che ai fattori ambientali. Da 40 anni è noto che HLA-B27 è presente nel 90% dei pazienti con SA, mentre è

<b>Sacroileite<sup>#</sup> + 1 manifestazione SpA*</b>	<b>0</b>	<b>HLA-B27 + ≥ 2 manifestazioni SpA*</b>
<i>*Manifestazioni SpA</i>		
dattilite		entesite
psoriasi		artrite
familiarità per SpA		morbo di Crohn/Rettocolite
lombalgia infiammatoria		uveite
buona risposta ai FANS		PCR elevata
HLA-B27		
<sup>#</sup> Sacroileite rilevabile con radiologia convenzionale o con RM		

Tabella I. Criteri classificativi delle SpA a prevalente impegno assiale [da Akgul O e Ozgocmen S.<sup>(1)</sup>].

<b>Paziente con solo manifestazioni articolari periferiche</b> (se presente lombalgia infiammatoria devono essere utilizzati i criteri per le SpA a prevalente impegno assiale)	
<b>Artrite o entesite o dattilite</b>	
<b>+</b>	
<b>1 di</b>	<b>≥ 2 di</b>
psoriasi	artrite
malattia infiammatoria cronica intestinale	entesite
pregressa infezione	dattilite
HLA-B27	pregressa malattia infiammatoria cronica intestinale
uveite	familiarità per SpA
sacroileite (radiologica o RM)	

Tabella II. Criteri classificativi delle SpA a prevalente impegno periferico. [da Akgul O e Ozgocmen S.<sup>(1)</sup>].

presente in meno del 6 % dei controlli<sup>(22)</sup>. Tale associazione è stata osservata anche nel 60-70% dei pazienti con spondilite psoriasica, nel 21-60% con spondilite associata alle MICI, nel 70% con artrite reattiva e nel 50% con uveite; per contro nelle forme periferiche delle SpA si è osservata una più lieve associazione come nella artrite psoriasica (25%) o nessuna come nelle enteroartriti<sup>(16,24,32,36)</sup>. Attualmente si conoscono circa 70 sottotipi di HLA-B27 che rappresentano l'evoluzione dal parentale HLA- B\*27:05<sup>(36)</sup>. I sottotipi maggiormente presenti nelle popolazioni caucasiche europee (HLA-B\*27:05 e HLA-B\*27:02) sono associati alla malattia come lo sono l'HLA-B\*27:04 e l'HLA-B\*27:05 nelle popolazioni dell'Est asiatico e l'HLA-B\*27:07 nell'Asia del Sud. Due sottotipi, l'HLA-B\*27:06 (presente nelle popolazioni del Sudest asiatico) e l'HLA-B\*27:09 (presente nella popolazione della Sardegna), per ancora non chiariti motivi, non risultano associati alla malattia. Altri sottotipi HLA-B27 sono molto rari, alcuni ritrovati in singole famiglie, per cui per molti ancora non è possibile avere informazioni sulla loro eventuale associazione con la malattia<sup>(36)</sup>. Numerose teorie sono state avanzate per spiegare l'associazione HLA-B27 e le SPA<sup>(11,48)</sup>. L'ipotesi del peptide artritogeno prevede che la malattia sia correlata alla capacità della molecola HLA-B27 di legare un unico peptide o un gruppo di peptidi antigenici. Fino ad ora tuttavia questo ipotetico "peptide artritogeno" non è stato ancora identificato, anche se gli attuali modelli genetici sembrano essere a favore di questa teoria<sup>(36)</sup>. Un'altra teoria è legata al misfolding della catena pesante HLA-B27 nel reticolo endoplasmatico, prima del suo legame alla  $\beta 2$  microglobulina e al peptide, con una conseguente "unfolded-protein response" nel reticolo endoplasmatico stesso, responsabile di una produzione di citochine proinfiammatorie. Un'altra ipotesi propone che le catene pesanti HLA-B27 libere dalla catena  $\beta 2$  microglobulina si possano assemblare sulla membrana cellulare come omodimeri, i quali possono essere riconosciuti direttamente dai killer immunoglobulin-like receptors e dai leucocyte immunoglobulin-like receptors sui natural killers e sulle cellule T, portando alla attivazione cellulare e alla produzione di mediatori pro-infiammazione, oppure che possono presentare in modo anomalo il peptide. Una ulteriore teoria è stata proposta sull'osservazione che gli individui HLA-B27 sono meno capaci di eliminare alcuni microorganismi intracellulari quali la Salmonella la Sighella e la Chlamydia. Questa incapacità potrebbe contribuire alla suscettibilità alle SpA considerando anche che DNA batterici sono stati ritrovati nella sinovia di pazienti affetti da artrite reattiva<sup>(42,43)</sup>. La presenza dell' HLA-B27 nel 90% circa dei pazienti con SA e la comparsa nei ratti resi transgenici per HLA-B27 di manifestazioni analoghe a quelle delle SpA suggerirebbero un ruolo diretto e dominante di questo gene e

della molecola da lui codificata. Tuttavia solo il 5% dei soggetti HLA B27 positivi sviluppa SA ed è stato calcolato che tale gene spiega solo il 20-40% della suscettibilità genetica alla SA<sup>(11,19)</sup>. Studi epidemiologici genetici e i nuovi approcci di analisi del genoma hanno permesso di evidenziare a livello del Sistema Maggiore di Istocompatibilità un'ulteriore piccola quota genetica predisponente alla malattia legata all'HLA-B60 e DRB1 per la SA e l'HLA-Cw\*0602, B38 e B39 per la SpA psoriasica<sup>(22)</sup>. Al di fuori del Sistema Maggiore di Istocompatibilità sono stati riscontrati associati alla SA il gene ERAP1 e geni coinvolti nella IL17-IL 23 pathway, alla psoriasi e all'artrite psoriasica i geni codificanti per IL-12B, IL-23A, IL-23R, TNFAIP3 e TNIP1 e alle MICI geni codificanti per NOD2, ATG6L1 e IL-23R. Il ruolo di questi geni nella patogenesi della malattia è ancora molto discusso anche se viene sempre più enfatizzato un possibile ruolo dell'asse IL-17/IL23, dell'azione sulle citochina da parte della ERAP1 e della sua interazione con l'HLA B27, intervenendo anche nella processazione dell'antigene<sup>(11,19)</sup>.

Numerose osservazione fanno ipotizzare un ruolo importante della immunità innata nella patogenesi delle SPA. Le patologie autoimmuni accomunano alcune caratteristiche: prevalenza nel sesso femminile, incontrollata reattività delle cellule T e/o delle cellule B verso autoantigeni, fattori genetici predisponenti, presenza di anticorpi malattia-specifici e risposta a farmaci diretti contro le cellule T o le cellule B, come si osserva nella artrite reumatoide con l'abatacept e il rituximab<sup>(3)</sup>. Le malattie auto-infiammatorie sono provocate da risposte della immunità innata a specifici fattori scatenanti quali microorganismi o traumatismi con una aberrante produzione di IL-1 $\beta$  e TNF. Le SpA hanno una prevalenza del sesso maschile, sono associate a polimorfismi in geni coinvolti nella immunità innata (CARD9/NOD2, ATG6L1) e nella attività citochinica (IL-12B, IL-23 $^{\circ}$ , IL-23R, TNFAIP3 e TNIP1), non presentano autoanticorpi malattia-specifici e non mostrano una significativa risposta alla terapia con abatacept e con rituximab. Il ruolo di un fattore batterico scatenante è sostenuto dalla presenza di DNA batterico nelle artriti reattive<sup>(42,43)</sup>, dal dato sperimentale dei ratti resi transgenici per l'HLA B27 i quali non si ammalano in ambienti sterili<sup>(41)</sup> e dall'associazione tra MICI, infezioni intestinali e abnorme espressione e funzione di Toll-like receptor<sup>(19)</sup>. Il ruolo dello stress meccanico è sottolineato dal fatto che il processo infiammatorio colpisce per lo più il complesso sinovio-entesale come è documentato dai dati istopatologici e da quelli rilevabili con la RM<sup>(29)</sup>. Anche le ipotesi proposte sul ruolo patogenetico del misfolding della molecola HLA-B27, delle molecole pesanti dell'HLA-B27 assemblate sulla superficie cellulare come omodimeri, come pure dell'interazione tra agenti batterici e

HLA-B27, ben si attagliano all'ipotesi della natura autoinfiammatoria della malattia. Questi dati sembrano indicare che nel gruppo intermedio che si estende in un continuum tra le patologie auto-infiammatorie e le autoimmuni, come proposto da McGonagle<sup>(28)</sup>, le SpA siano più vicine alla prime.

Il processo infiammatorio articolare conduce alle erosioni ossee sia nella AR e che nelle SpA, ma solo nelle SpA si osserva una successiva formazione di nuovo tessuto osseo<sup>(45)</sup> che non è inibita dai farmaci anti TNF- $\alpha$ , anche se questi sono capaci di contrastare il processo infiammatorio, le erosioni e la sintomatologia dolorosa<sup>(45,50)</sup>. Per contro i FANS prevengono o ritardano la formazione delle lesioni sindesmofitarie<sup>(6,52)</sup>. Anche se non sono stati ancora chiariti i meccanismi di questo singolare processo, sappiamo che la comparsa di nuovo di tessuto osseo è preceduta dal processo infiammatorio<sup>(26)</sup>, comparando nelle sedi ove questo è soppresso dai farmaci anti TNF<sup>(35)</sup>, che nei pazienti con SA bassi livelli sierologici di dickkopf-1 (Dkk1) sono correlati alla presenza di sindesmofitosi<sup>(23,25)</sup>, livelli non modificati dalla terapia con anti TNF<sup>(25)</sup>, e che alti livelli di Dkk1 sembrano prevenire la formazione di sindesmofitosi<sup>(23)</sup>. Questo suggerirebbe che nelle SpA una soppressione del signalling delle proteine Wnt da parte di Dkk1 può inibire la formazione di nuovo tessuto osseo<sup>(23)</sup>, essendo noto che Dkk1 è il più importante rimodellatore a livello articolare attraverso la soppressione del signalling delle proteine Wnt, mediatrici chiave della osteoblastogenesi<sup>(18)</sup>. Si è anche ipotizzata una possibile attivazione stromale da parte di stress meccanici o altri fattori, che indurrebbe una via infiammatoria - indipendente di formazione di nuovo osso, ove le "bone morphogenetic proteins" (BMP) avrebbero un ruolo chiave<sup>(19)</sup>. Sarebbe supporto a questa ipotesi il riscontro di livelli sierici di BMP-2, BMP-4 e BMP-7 significativamente più elevati nei pazienti con fusione vertebrale che in quelli senza segni di fusione<sup>(14)</sup>.

La diagnosi delle SpA ad impegno assiale si basa sulle manifestazioni cliniche, sulla presenza dell'antigene HLA-B27 e sulla diagnostica per immagine. La lombalgia a carattere infiammatorio, espressione di flogosi alle strutture legamentose ed articolari della colonna e delle articolazioni sacroiliache, è l'elemento semeiologico più importante per la diagnosi in quanto permette di identificarne i possibili affetti tra i molti che hanno una lombalgia cronica. Tale sintomatologia è caratterizzata da un dolore notturno ad inizio insidioso che recede con il movimento ma non con il riposo<sup>(47)</sup>. La sua presenza in soggetto di età inferiore a 40 anni ha una sensibilità per la diagnosi del 71% ed una specificità del 91%<sup>(1)</sup>. Al medico di medicina generale, primo referente, è demandato il più precoce riscontro del paziente con lombalgia infiammatoria<sup>(34,39)</sup>, avendo questi una probabilità del 14% di avere una SpA<sup>(38)</sup>.

L'eventuale presenza dell'HLA-B27 fa aumentare la possibilità al 59%<sup>(38)</sup>. La radiologia convenzionale è considerata esame screening, ma permette di rilevare solo alterazioni tardive. La tomografia assiale computerizzata è più sensibile, ma non si deve scordare il rischio radiologico insito in questo esame in soggetti normalmente in giovane età. Una più precoce definizione di impegno infiammatorio a livello delle articolazioni sacroiliache e della colonna risulta possibile con la RM<sup>(7,27)</sup>. Tale metodica permette la diagnosi molto tempo prima che compaiano le alterazioni radiologiche e costituisce elemento portante dei nuovi criteri classificativi<sup>(39,40)</sup>. La RM total body, permettendo a differenza della RM convenzionale la rilevazione sistemica dei processi flogistici di tutto l'apparato scheletrico<sup>(2,53)</sup>, velocizzerà i tempi dell'esame facilitando il follow up e permettendo un più aderente approccio terapeutico.

Nel 1976 Boersma JW pubblicava una analisi retrospettiva di una casistica di 40 pazienti affetti da SA rilevando un ritardo nella ossificazione della colonna lombare nei pazienti che erano stati trattati continuativamente con il fenilbutazone<sup>(6)</sup>. L'efficacia dei FANS anche sulle alterazioni anatomiche, dimenticata per più di 40 anni è stata recentemente confermata<sup>(20,52)</sup>. Attualmente i FANS, assieme all'esercizio fisico, rappresentano la terapia di prima scelta nelle SpA ad impegno assiale<sup>(10,15)</sup>, mentre nelle forme periferiche lo sono i DMARDs convenzionali<sup>(49)</sup>. I farmaci anti TNF- $\alpha$  si sono dimostrati una eccezionale opzione terapeutica per le SpA<sup>(5)</sup>. Gli studi controllati randomizzati con etanercept, infliximab, adalimumab<sup>(30)</sup> e con golimumab<sup>(9)</sup> hanno documentato una significativa efficacia clinica sia sulle forme assiali che periferiche. Le linee guida attuali consigliano di ricorrere a questi farmaci allorché i farmaci di prima linea siano risultati inefficaci, non tollerati o controindicati<sup>(10,15)</sup>. Negli ultimi anni si è ipotizzato un loro utilizzo anche molto precocemente in stadi pre-radiologici nella speranza di poter prevenire la comparsa delle ossificazioni responsabili delle limitazioni funzionali definitive; tuttavia ulteriori studi sono necessari<sup>(44)</sup>.

## BIBLIOGRAFIA

1. Akgul O, Ozgocmen S: *Classification criteria for spondyloarthropathies*. World J. Orthop. 2011; 2: 107-115.
2. Althoff C E, Sieper J, Song I-H, Haibel H, Weiß A, Diekhoff T, Rudwaleit M, Freundlich B, Hamm B, Hermann KG: *Active inflammation and structural change in early active axial spondyloarthritis as detected by whole-body MRI*. Ann. Rheum. Dis. 2012; 0: 1-7.
3. Ambarus C, Yeremenko N, Tak PP, and Baeten D: *Pathogenesis of spondyloarthritis: autoimmune or autoinflammatory?* Curr. Opin. Rheumatol. 201; 24: 351-358.
4. Amor B, Dougados M, Mijiyawa M: *Criteria of the classification of spondylarthropathies*. Rev. Rhum. Mal. Osteoart. 1990; 57: 85-89.
5. Baraliakos X, van den Berg R, Braun J, van der Heijde D: *Update of the literature review on treatment with biologics as a basis for the first update of the ASAS/EULAR management recommendations of ankylosing spondylitis*. Rheumatology (Oxford) 2012; 51: 1378-1387.
6. Boersma JW: *Retardation of ossification of the lumbar vertebra column in ankylosing spondylitis by means of phenylbutazone*. Scand. J. Rheumatol. 1976; 5: 60-64.
7. Bollow M, Braun J, Hamm B, Eggens U, Schilling A, König H, Wolf KJ: *Early sacroiliitis in patients with spondyloarthropathy: evaluation with dynamic Gadolinium-enhanced MR imaging*. Radiology 1995; 194: 529-536.
8. Bollow M, Fischer T, Reissbauer H, Backhaus M, Sieper J, Hamm B, Braun J: *Quantitative analyses of sacroiliac biopsies in spondylarthropathies: T cells and macrophages predominate in early and active sacroiliitis cellularity correlates with the degree of enhancement detected by magnetic resonance imaging*. Ann. Rheum. Dis. 2000; 59: 135-140.
9. Braun J, Baraliakos X, Hermann KG, van der Heijde D, Inman RD, Deodhar AA, Baratlle A, Xu S, Xu W, Hsu B: *Golimumab reduces spinal inflammation in ankylosing spondylitis: MRI results of the randomised, placebo- controlled GO-RAISE study*. Ann. Rheum. Dis. 2012; 71: 878-884.
10. Braun J, van den Berg R, Baraliakos X, Boehm H, Burgos-Vargas R, Collantes-Estevez E, Dagfinrud H, Dijkmans B, Dougados M, Emery P, Geher P, Hammoudeh M, Inman RD, Jongkees M, Khan MA, Kiltz U, Kvien T, Leirisalo-Repo M, Maksymowych WP, Olivieri I, Pavelka K, Sieper J, Stanislawska-Biernat E, Wendling D, Ozgocmen S, van Drogen C, van Royen B, van der Heijde D: *2010 update of the ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis*. Ann. Rheum. Dis. 2011; 70: 896-904.
11. Brown MA: *Genetics of ankylosing spondylitis*. Curr. Opin. Rheumatol. 2010; 22: 126-132.
12. Brown MA, Kennedy LG, MacGregor AJ, Darke C, Duncan E, Shatford JL, Taylor A, Calin A, Wordsworth: *Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment*. Arthritis Rheum. 1997; 40: 1823-1828.
13. Brown MA, Laval SH, Brophy S, Calin A: *Recurrence risk modelling of the genetic susceptibility to ankylosing spondylitis*. Ann. Rheum. Dis. 2000; 59: 883-886.
14. Chen HA, Chen CH, Lin YJ, Chen PC, Chen WS, Lu CL, Chou CT: *Association of bone morphogenetic proteins with spinal fusion in ankylosing spondylitis*. J. Rheumatol. 2010; 37: 2126-2132.

15. D' Angelo S, Padula A, Nigro A, Cantini F, Matucci-Cerinic M, Modena V, Punzi L, Salvarani C, Scarpa R, Olivieri I: *Italian evidence-based recommendations for the management of ankylosing spondylitis: the 3E Initiative in Rheumatology*. Clin. Exp. Rheumatol. 2008; 26: 1005-1011.
16. Daneo V, Costantini P, Modena V, Amoroso A, Di Vittorio S, Viara M, Mecozzi B, Bianchi SD, Carbonara AO: *Clinique et immunogenetique de la Spondylarthrite Ankylosante et autres pathologies associees*. Actualites en Rhumatologie. Masson, Paris 1984; 76-85.
17. Daneo V, Migone N, Modena V, Bianchi SD, Alfieri G, Diotallevi P, Carbonara AO, Piazza A: *Family Studies And HLA Typing In Ankylosing Spondylitiis And Sacroiliitis*. J. Rheumatol. 1977; (S 3): 5-9.
18. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, Korb A, Smolen J, Hoffmann M, Scheinecker C, van der Heide D, Landewe R, Lacey D, Richards WG, Schett: *Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling*. Nat. Med. 2007; 13: 156-163.
19. Dougados M, Baeten D: *Spondyloarthritis*. Lancet 2011; 377: 2127-2137.
20. Dougados M, Béhier JM, Jolchine I, Calin A, van der Heijde D, Olivieri I, Zeidler H, Herman H: *Efficacy of celecoxib, a cyclooxygenase 2-specific inhibitor, in the treatment of ankylosing spondylitis: a six-week controlled study with comparison against placebo and against a conventional nonsteroidal antiinflammatory drug*. Arthritis Rheum 2001; 44: 180-185.
21. Dougados M, van der Linden A, Juhlin R, Huitfeldt B, Amor B, Calin A, Cats A, Dijkmans B, Olivieri I, Pasero G et al: *The European Spondylarthropathy Study Group preliminary criteria for the classification of spondylarthropathy*. Arthritis Rheum. 1991; 34: 1218-1227.
22. Ehrenfeld M: *Spondyloarthropathies*. Best Practice & Research Clinical Rheumatology 2012; 26: 135-145.
23. Heiland GR, Appel H, Poddubnyy D, Zwerina J, Hueber A, Haibel H, Baraliakos X, Listing J, Rudwaleit M, Schett G, Sieper J: *High level of functional dickkopf-1 predicts protection from syndesmophyte formation in patients with ankylosing spondylitis*. Ann. Rheum. Dis. 2012; 71: 572-574.
24. Kataria RK, Brent LH: *Spondyloarthropathies*. Am. Fam. Physician 2004; 69: 2853-2860.
25. Kwon SR, Lim MJ, Suh CH, Park SG, Hong YS, Yoon BY, Kim HA, Choi HJ, Park W: *Dickkopf-1 level is lower in patients with ankylosing spondylitis than in healthy people and is not influenced by anti-tumor necrosis factor therapy*. Rheumatol. Int. 2012; 32: 2523-2527.
26. Maksymowych WP, Chiowchanwisawakit P, Clare T, Pedersen SJ, Østergaard M, Lambert RG: *Inflammatory lesions of the spine on magnetic resonance imaging predict the development of new syndesmophytes in ankylosing spondylitis: evidence of a relationship between inflammation and new bone formation*. Arthritis Rheum. 2009; 60: 93-102.
27. Maksymowych WP, Inman RD, Salonen D, Dhillon SS, Krishnananthan R, Stone M, Conner-Spady B, Palsat J, Lambert RG: *Spondyloarthritis Research Consortium of Canada magnetic resonance imaging index for assessment of spinal inflammation in ankylosing spondylitis*. Arthritis Rheum. 2005; 53: 502-509.
28. McGonagle D, Aziz A, Dickie LJ, McDermott MF: *An integrated classification of pediatric inflammatory diseases, based on the concepts of autoinflammation and the immunological disease continuum*. Pediatr. Res. 2009; 65 (5 Pt 2): 38R-45R.

29. McGonagle D, Lories RJ, Tan AL, Benjamin M: *The concept of a 'synovioentheseal complex' and its implications for understanding joint inflammation and damage in psoriatic arthritis and beyond*. *Arthritis Rheum*. 2007; 56: 2482-2491.
30. McLeod C, Bagust A, Boland A, Dagenais P, Dickson R, Dundar Y, Hill RA, Jones A, Mujica Mota R, Walley T: *Adalimumab, etanercept and infliximab for the treatment of ankylosing spondylitis: a systematic review and economic evaluation*. *Health Technol. Assess*. 2007; 11: 1-158, iii-iv.
31. Migone N, Modena V, Daneo V, Carbonara AO, and Ceppellini R: *Sacroiliitis and HLA. A clinical and genetical study*. *Ann. Rheum. Dis*. 1978, 37: 513-517.
32. Modena V, Amoroso A, Frattasio C, Pera A, Costantini P, Maiocco I, Ponti V, Centenaro Di Vittorio C, Verme G, Curtoni ES: *HLA Antigens and clinical manifestations in Crohn's Disease*. *Clin. Exp. Rheum*. 1988; 6: 221-225.
33. Moll IM, Haslock I, Macrae IF, Wright V: *Associations between ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, Reiter's disease, the intestinal arthropathies, and Behcet's syndrome*. *Medicine (Baltimore)* 1974; 53: 343-364.
34. Negrini S, Giovannoni S, Minozzi S, Barneschi G, Bonaiuti D, Bussotti A, D'Arienzo M, Di Lorenzo N, Mannoni A, Mattioli S, Modena V, Padua L, Serafini F, Violante FS: *Diagnostic therapeutic flow-charts for low back pain patients: the Italian clinical guidelines*. *Eura Medicophys* 2006; 42: 151-170.
35. Pedersen SJ, Chiowchanwisawakit P, Lambert RG, Østergaard M, Maksymowych WP: *Resolution of inflammation following treatment of ankylosing spondylitis is associated with new bone formation*. *J. Rheumatol*. 2011; 38: 1349-1354.
36. Reveille ID: *The genetic basis of spondyloarthritis*. *Ann. Rheum. Dis*. 2011; 70 (S1): i44-i50.
37. Rudwaleit M, Jurik AG, Hermann KG, Landewé R, van der Heijde D, Baraliakos X, Marzo-Ortega H, Ostergaard M, Braun J, Sieper J: *Defining active sacroiliitis on Magnetic Resonance Imaging (MRI) for classification of axial spondyloarthritis: a consensual approach by the ASAS/OMERACT MRI Group*. *Ann. Rheum. Dis*. 2009; 68: 1520-1527.
38. Rudwaleit M, van der Heijde D, Khan MA, Braun J, Sieper J: *How to diagnose axial spondyloarthritis early*. *Ann. Rheum. Dis*. 2004; 63: 535-543.
39. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, Listing J, Akkoc N, Brandt J, Braun J, Chou CT, Collantes-Estevez E, Dougados M, Huang F, Gu J, Khan MA, Kirazli Y, Maksymowych WP, Mielants H, Sørensen IJ, Ozgocmen S, Roussou E, Valle-Oñate R, Weber U, Wei J, Sieper J: *The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection*. *Ann. Rheum. Dis*. 2009; 68: 777-783.
40. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, Akkoc N, Brandt J, Chou CT, Dougados M, Huang F, Gu J, Kirazli Y, Van den Bosch F, Olivieri I, Roussou E, Scarpato S, Sørensen IJ, Valle-Oñate R, Weber U, Wei J, Sieper J: *The Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general*. *Ann. Rheum. Dis*. 2011; 70: 25-31.
41. Sartor RB: *Colitis in HLA-B27/beta 2 microglobulin transgenic rats*. *Int. Rev. Immunol*. 2000; 19: 39-50.

42. Schnarr S, Putschky N, Jendro MC, Zeidler H, Hammer M, Kuipers JG, Wollenhaupt J: *Chlamydia and Borrelia DNA in synovial fluid of patients with early undifferentiated oligoarthritis: results of a prospective study*. Arthritis Rheum. 2001; 44: 2679-2685.
43. Siala M, Gdoura R, Younes M, Fourati H, Cheour I, Meddeb N, Bargaoui N, Baklouti S, Sellami S, Rihl M, Hammami A: *Detection and frequency of Chlamydia trachomatis DNA in synovial samples from Tunisian patients with reactive arthritis and undifferentiated oligoarthritis*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2009; 55: 178-186.
44. Sieper J: *Can structural damage be prevented in ankylosing spondylitis?* Curr. Opin. Rheumatol. 2009 Jul; 21: 335-339.
45. Sieper J, Appel H, Braun J, Rudwaleit M: *Critical Appraisal of Assessment of Structural - Damage in Ankylosing Spondylitis. Implications for Treatment Outcomes*. Arthritis Rheum. 2008; 58: 649-656.
46. Sieper J, Baraliakos X, Listing J, Brandt J, Haibel H, Rudwaleit M, Braun J: *Persistent reduction of spinal inflammation as assessed by magnetic resonance imaging in patients with ankylosing spondylitis after 2 yrs of treatment with the anti-tumour necrosis factor agent infliximab*. Rheumatology (Oxford) 2005; 44: 1525-1530.
47. Sieper J, van der Heijde D, Landewé R, Brandt J, Brandt J, Burgos-Vagas R, Collantes-Estevez E, Dijkmans B, Dougados M, Khan MA, Leirisalo-Repo M, van der Linden S, Maksymowych WP, Mielants H, Olivieri I, Rudwaleit M: *New criteria for inflammatory back pain in patients with chronic back pain: a real patient exercise by experts from the Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS)*. Ann. Rheum. Dis. 2009; 68: 784-788.
48. Taurog JD: *The role of HLA-B27 in spondyloarthritis*. J. Rheumatol. 2010; 12: 2606-2616.
49. Toussiroit É: *Current therapeutics for spondyloarthritis*. Expert Opin. Pharmacother 2011; 16: 2469-2477.
50. Van der Heijde D, Landewé R, Einstein S, Ory P, Vosse D, Ni L, Lin SL, Tsuji W, Davis JC Jr. *Radiographic progression of ankylosing spondylitis after up to two years of treatment with etanercept*. Arthritis Rheum. 2008 May; 58: 1324-1331.
51. Van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A: *Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria*. Arthritis Rheum. 1984; 27: 361-368.
52. Wanders AJ, van der Heijde D, Landewé R, Béhier JM, Calin A, Olivieri I, Zeidler H, Dougados M: *Nonsteroidal antiinflammatory drugs reduce radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis: a randomized clinical trial*. Arthritis Rheum. 2005; 52: 1756-1765.
53. Weber U, Maksymowych WP, Jurik AG, Pfirrmann CW, Rufibach K, Kissling RO, Khan MA, Lambert RG, Hodler J: *Validation of whole-body against conventional magnetic resonance imaging for scoring acute inflammatory lesions in the sacroiliac joints of patients with spondylarthritis*. Arthritis Rheum. 2009; 61: 893-899.

## L'ARTERITE GIGANTOCELLULARE DI HORTON

*Raffaele Pellerito*

Unità di Reumatologia  
Ospedale Mauriziano - Torino

Key words:     *GCA / GCA*  
                  *Antigen-presenting-cells / Cellule dendritiche*  
                  *Th1 / Th1*  
                  *IFN- $\gamma$  / IFN- $\gamma$*   
                  *Th17 / Th17*

### **Abstract:**

Giant-cell arteritis (GCA) affects people of middle age and older. The cause is unknown but genetic and environmental factors may have a role in their pathogenesis. GCA affects the aorta and its extracranial branches. The clinical findings are broad but headache is the most common. Granuloma formation emphasizes the role of antigen-specific T cells. Two separate lineage of T cells participate in vascular inflammation. In early disease antigen presenting cells (APC) promote differentiation in Th17 and Th1. After corticosteroid-therapy Th17 cells were lost while Th1 cells persist almost unaffected (because corticosteroid selectively suppress IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-23 releasing APCs disrupting induction of Th17 cells). The two T-cells lineages correlate with two distinct patterns of vascular and systemic disease. Chronic disease is characterized by persistent Th-1 inducing signals.

### **Riassunto:**

L'arterite gigantocellulare o arterite di Horton (GCA) è una vasculite granulomatosa sistemica che colpisce, con un rapporto 2 a 1 femmine-maschi, pazienti di età superiore ai 50 anni. La polimialgia reumatica, e i sintomi ad essa correlati, spesso si associa alla GCA. Il sintomo più caratteristico è la cefalea di nuova insorgenza accompagnata da sintomi sistemici (astenia, febbre, calo ponderale, deflessione dell'umore...). Le cellule dendritiche situate nell'avventizia determinano il reclutamento delle CD4 T cells. Si formano due linee cellulari distinte i Th17 (steroido-sensibili) e i Th1 (steroido-resistenti e responsabili delle forme ad andamento

cronico). Inoltre la presenza di alte quantità di IFN- $\gamma$  nelle arterie temporali (espressione del pattern Th1) identifica il fenotipo ischemico delle GCA suggerendo che l'IFN- $\gamma$  è coinvolto nel processo che determina occlusione vasale.

L'infiammazione delle grandi arterie, quali l'aorta e le sue principali branche si può realizzare in numerose malattie quali la sindrome di Kawasaki, la malattia di Beçhet, l'artrite reumatoide, la sifilide e la tubercolosi.

L'arterite gigantocellulare o arterite di Horton (GCA) è una malattia granulomatosa<sup>(15)</sup> sistemica che interessa prevalentemente, ma non esclusivamente, le arterie temporali ed è spesso associata alla polimialgia reumatica (PMR)<sup>(12)</sup>.

L'incidenza della GCA e della PMR aumenta dopo i 50 anni con un 'incidence rate' più alto nel nord Europa e minore nei paesi del mediterraneo; negli Stati Uniti l'incidenza è di 20 casi ogni 100.000 abitanti con più di 50 anni<sup>(13,5)</sup>.

In Italia la GCA rientra tra le malattie rare. Il rapporto femmine : maschi è di 2 a 1.

I Criteri dell'American College of Rheumatology del 1990<sup>(8)</sup> richiedono la presenza di almeno 3 dei seguenti items per porre diagnosi di arterite di Horton:

1. Età maggiore di 50 anni
2. Cefalea di recente esordio
3. Tensione o ridotta pulsatilità delle arterie temporali
4. VES maggiore di 50
5. Presenza di infiltrazione mononucleare o di granulomi alla biopsia dell'arteria temporale.

Questi criteri vennero disegnati per differenziare la GCA dalle altre vasculiti, ma non sono particolarmente utili per la diagnosi<sup>(11)</sup> rimanendo la biopsia dell'arteria temporale il gold standard.

Clinicamente essendo una malattia infiammatoria sistemica prevalgono sintomi quali l'astenia, la febbre serale, il calo ponderale, la depressione del tono dell'umore a cui possono associarsi i sintomi tipici della PMR ovvero il dolore infiammatorio con rigidità mattutina ai cingoli scapolare e pelvico. Più raramente l'arterite di Horton può esordire come febbre di origine sconosciuta, una claudicatio agli arti inferiori o con una amaurosi improvvisa.

L'interessamento della branca esterna della carotide esterna determina cefalea che spesso è la prima manifestazione, descritta a sede temporale nelle forme classiche. Il coinvolgimento dell'arteria occipitale si estrinseca in cefalea occipitale: dolore quando il paziente si pettina o si corica nel letto posando l'occipite. Il coinvolgimento dell'arteria auricolare posteriore può determinare dolore auricolare o a sede parotideale. La claudicatio masseterina è un sintomo altamente specifico determinato dall'interessamento dell'arteria mascellare; quello dell'arteria linguale determina dolore all'eloquio<sup>(2)</sup>.

Si è detto che la GCA è una malattia granulomatosa: macrofagi attivati e T cellule formano sofisticate strutture linfoidi nella parete delle arterie di medio e grande calibro spesso insieme a cellule giganti multinucleate.

Il granuloma è la tipica risposta immunologica a patogeni indolenti che tendono a persistere per lungo tempo nel nostro organismo come nel caso della tubercolosi, delle lebbra o della sifilide, da cui la spesso ipotizzata genesi infettiva della malattia<sup>(15)</sup>.

Le cellule che orchestrano la formazione del granuloma sono i CD4 T helper cells che danneggiando la parete cellulare possono determinare la stenosi del vaso o la distruzione della sua parete con conseguente formazione di aneurismi.

La stenosi arteriosa è determinata dall'ipertrofia concentrica dell'intima. La media è il sito critico del danno vascolare, infatti i macrofagi ivi residenti producono enzimi che distruggono i tessuti contigui (tissue-destroying enzymes) e rimediano al danno producendo fattori di riparazione (per es. PDGF e VEGF) che determinano iperplasia dell'intima fino all'occlusione.

Le cellule dendritiche (APC cells) sono situate nell'avventizia delle arterie di medio calibro esternamente alla lamina elastica esterna fungendo da cellule sentinella contro i patogeni esterni. Le APC verrebbero attivate dai 'toll-like receptor ligand' iniziando a produrre chemochine che determinano il reclutamento di CD4Tcells e di macrofagi nella parete vascolare via vasa vasorum<sup>(14)</sup>.

Nella GCA quindi sarebbero proprio le APC ad avere un ruolo cruciale nell'innescare il processo infiammatorio. Deng et al. hanno dimostrato come nella parete vascolare siano presenti due linee cellulari, le Th1 e le Th17<sup>(4)</sup>. Queste due diverse linee cellulari sono il risultato di due tipi indipendenti di segnali derivanti da due tipi diversi di APC: quelle che producono IL-12-IL-18 e quelle che producono IL-6-IL-23. Vi sarebbero quindi due profili autoimmuni: l'asse IL-12-IFN- $\gamma$  e l'asse IL-1-IL-13-Th17. Le Th1 cells sono resistenti alla terapia steroidea mentre le Th-17 scompaiono dopo tale terapia<sup>(17)</sup>.

Inoltre la presenza di alte quantità di IFN- $\gamma$ <sup>(18,19)</sup> nelle arterie temporali (espressione del pattern Th1) identifica il fenotipo ischemico delle GCA suggerendo che l'IFN- $\gamma$  è coinvolto nel processo che determina occlusione vasale. L'IL-2 non è presente in quantità rilevante nelle arterie temporali, ma la sua presenza in circolo si associa con la febbre e con i sintomi della polimialgia reumatica. Una risposta antigene specifica del sistema immune comporta l'espressione di subset T cellulari specifici e distinti che caratterizzano poi l'espressione clinica della vasculite e la sua sensibilità alla terapia steroidea<sup>(4)</sup>.

La presenza di due linee distinte nella GCA supportano l'ipotesi che i triggers iniziali potrebbero essere diversi tra loro; quindi non un unico agente infettivo ma multiple vie patogenetiche che genererebbero il quadro clinico della malattia.

In sintesi quindi nella GCA sono presenti due linee distinte di T cells che hanno una diversa sensibilità alla terapia steroidea. Le APC cellule svolgono ruoli diversi producendo citochine diverse che inducono l'attivazione della via Th1 mediata o di quella Th17 mediata.

La via Th-17 è molto sensibile agli steroidi e rappresenta un minore 'challenge' clinico. Viceversa la risposta Th1 identifica le long-term GCA resistenti agli steroidi e legata alla produzione di IFN- $\gamma$  che esita nelle stenosi vasali<sup>(17)</sup>.

Gli steroidi sono sempre stati l'arma principale nel trattamento delle GCA sia a dosaggi medio alti sia a dosaggi 'supra high'<sup>(10)</sup> soprattutto nelle forme ad esordio brutale (amaurosi improvvisa). Le forme Th17 mediate, con sintomi a tipo polimialgia reumatica, ben rispondono alla terapia steroidea e non rappresentano un 'challenge' clinico.

Il problema si pone invece per le forme steroide-resistenti (Th1- IFN- $\gamma$  mediate) che portano con il persistere delle Th1 cellule a un decorso cronico e alle complicanze stenotiche oppure alla distruzione della parete arteriosa e alla conseguente formazione di aneurismi.

Il methotrexate (MTX), studiato in 3 RCT ha portato a risultati non definitivi; tuttavia il trattamento combinato GC-MTX ha determinato un miglioramento del quadro clinico e dei parametri di laboratorio dimostrandosi efficace steroide-sparing agent<sup>(7,9)</sup>.

L'avvento dei farmaci biologici ha aperto nuove vie terapeutiche. Trials, open e RCT, hanno studiato l'efficacia di due anti-TNF-alfa: l'infliximab e l'etanercept. I dati portano a ritenere che questi agenti possano essere utili nel prevenire le recidive delle forme 'relapsing' ma non sembra possano avere un ruolo nelle forme di nuova diagnosi<sup>(3,6)</sup>.

Dato il ruolo chiave giocato dalla IL-6 nella GCA la commercializzazione del tocilizumab (inibitore monoclonale del recettore della IL-6) ha aperto nuove prospettive terapeutiche. IL-6 è particolarmente elevata nelle GCA in fase attiva ed è responsabile dell'elevazione dei reattanti di fase acuta (PCR) e delle manifestazioni sistemiche della malattia. In quest'ultimo anno numerose segnalazioni hanno confermato l'efficacia del tocilizumab nella GCA e nel Takayasu<sup>(1)</sup>.

Ma il 'challenge' ultimo rimane il ruolo patogenetico delle forme Th-1 mediate per cui solo nel tempo vedremo se questo farmaco è efficace in queste forme.

## BIBLIOGRAFIA

1. Beyer C, Axmann R, Sahinbegovic E, Distler JH, Manger B, Schett G, Zwerina J: *Anti-interleukin 6 receptor therapy as rescue treatment for giant cell arteritis*. Ann. Rheum. Dis. 2011; 70: 1874-5.
2. Brack A, Martinez-Taboada V, Stanson A, Goronzy JJ, Weyand CM: *Disease pattern in cranial and large-vessel giant cell arteritis*. Arthritis Rheum. 1999; 42: 311-317.
3. Cantini F, Niccoli L, Salvarani C, Padula A, Olivieri I: *Treatment of longstanding active giant cell arteritis with infliximab: report of four cases*. Arthritis Rheum. 2001; 44: 2933-2935.
4. Deng J, Younge BR, Olshen RA, et al: *Th17 and Th1 T-cell responses in giant cell arteritis*. Circulation 2010; 121: 906-915.
5. Gran JT, Myklebust G: *The incidence of polymyalgia rheumatic and temporal arteritis in the county of Aust Agder, south Norway: a prospective study 1987-1994*. J. Rheumatol. 1997; 24: 1739-1743.
6. Hernandez-Rodriguez J, Segarra M, Vilardell C, Garcia-Martinez A, Pablo-Campo M, Grau JM, Kleiman HK: *Tissue production of pro-inflammatory cytokines (IL-1beta, TNFalpha and IL-6) correlates with the intensity of the systemic inflammatory response and with corticosteroid requirements in giant-cell arteritis*. Rheumatology (Oxford) 2004; 43: 294-301.
7. Hellmann DB, Uhlfelder ML, Stone JH, Jenckes MW, Cid MC, Guillevin L, Moreland L, Dellaripa PF, Hoffman GS, Merkel PA, Spiera R, Brown L, Hernández-Rodríguez J, Rubin HR: *A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of adjuvant methotrexate treatment for giant cell arteritis*. Arthritis Rheum 2002; 46: 1309-1318.
8. Lightfoot RW Jr, Michel BA, Bloch DA, Hunder GG, Zvaifler NJ, McShane DJ, Arend WP, Calabrese LH, Leavitt RY, Lie JT.: *The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of giant cell (temporal) arteritis*. Arthritis Rheum. 1990; 33: 1122-1128.
9. Jover JA, Hernandez-Garcia C, Morado IC, Vargas E, Banares A, Fernandez-Gutierrez B: *Combined treatment of giant-cell arteritis with methotrexate and prednisone: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Ann. Intern. Med. 2001; 134: 106-114.
10. Mazlumzadeh M, Hunder GG, Easley KA, Calamia KT, Mattenson EL, Griffith WL, Younge BR, Weyand CM, Goronzy JJ: *Treatment of giant cell arteritis using induction therapy with high-dose glucocorticoids: a double-blind, placebo-controlled, randomized prospective clinical trial*. Arthritis Rheum. 2006; 54: 3310-3318.
11. Rao K, Allen NB, Pincus T. *Limitations of the 1990 American College of Rheumatology classification criteria in the diagnosis of vasculitis*. Ann. Intern. Med. 1998; 129: 345-352.
12. Salvarani C, Cantini F, Boiardi L, Hunder GG: *Polymyalgia rheumatica and giant-cell arteritis*. N. Engl. J. Med. 2002; 347: 261-271.
13. Salvarani C, Crowson CS, O'Fallon WM, Hunder GG, Gabriel SE: *Reappraisal of the epidemiology of giant cell arteritis in Olmsted County, Minnesota, over a fifty-year period*. Arthritis Rheum. 2004; 51: 264-268.
14. Salvarani C, Cantini F, Hunder GG: *Polymyalgia reumatica and giant-cell arteritis*. Lancet 2008; 372: 234-245.
15. Saunders BM, Cooper AM: *Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections*. Immunol. Cell Biol. 2000; 78: 334-341.

16. Weyand CM, Goronzy JJ: *Medium- and large-vessel vasculitis*. N. Engl. J. Med. 2003; 349: 160-169.
17. Weyand CM, Younge BR, and Goronzy JJ: *IFN- $\gamma$  and IL-17: the two faces of T-cell pathology in giant cell arteritis*. Curr. Opin. Rheumatol. 2011; 23: 43-49.
18. Weyand CM, Hicok KC, Hunder GG, Goronzy JJ: *Tissue cytokine patterns in patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis*. Ann. Intern. Med. 1994; 121: 484-491.
19. Weyand CM, Tetzlaff N, Bjornsson J, Jounge B, Goronzy JJ: *Disease patterns and tissue cytokine profiles in giant cell arteritis*. Arthritis Rheum. 1997; 40: 19-26.
20. Weyand CM, Wei M-A, Pryshchep O, Groschel S, Bernardino R, Goronzy JJ: *Vascular dendritic cells in giant cell arteritis*. Ann. NY Acad. Sci. 2005; 1062: 195-208.

## LA SALUTE DELLA DONNA NELL'ERA DELLA GLOBALIZZAZIONE

*Chiara Benedetto, Roberta De Fazio, Gabriele Lanzo*

Dipartimento di Discipline Ginecologiche e Ostetriche  
S.C.D.U. Ginecologia e Ostetricia I - Università degli Studi di Torino  
Ospedale Sant'Anna

Key words: *Women's Health / Salute della donna  
Globalization / Globalizzazione*

### **Abstract:**

Women's health in the age of globalisation can be considered an important indicator of the wellbeing of a society.

In particular, reproductive health can be measured with a series of standard indicators, such as: fertility, perinatal and maternal mortality rates; contraceptive prevalence rate; antenatal care coverage (at least 1 visit by skilled health personnel or at least 4 visits by any provider during a pregnancy), proportion of births attended by skilled health personnel, prevalence of hospital admissions due to abortion complications, prevalence of women with genital mutilations and/or HIV infection during pregnancy.

Data regarding these standard indicators are not homogenous either at World or European level. For example, the risk of dying for causes related to pregnancy varies significantly according to the geographical area and the data is such that in Niger it is 1:16 and in Italy 1:15.200. This discrepancy is unacceptable and as such the challenge we face in eradicating these differences is great.

To this regard, the United Nations has included the improvement of maternal health as its 5<sup>th</sup> objective for the Millennium (Millennium Development Goal 5, MDG5).

In Europe, the European Board and College of Obstetrics and Gynaecology (EBCOG), which represents the Obstetrics and Gynaecology National Societies of 36 European countries, and whose aim is to improve the health of women and their babies by attaining the highest possible standards of care and training in the field of Obstetrics and Gynaecology in all European countries, is presently carrying out different strategies in order to obtain these objectives.

In Torino, which has now become a multiethnic and multicultural city, discrepancies still exist in the field of reproductive health between Italian and immigrant women. Measures have been set up to reduce the cultural-linguistic barriers and to create dedicated care centers.

As Medical doctors, we must stimulate socio-economic and cultural changes and make politicians aware of the need to make the health of women a priority at a national, European and global level.

**Riassunto:**

La Salute della Donna nell'era della Globalizzazione può essere considerata un indicatore del benessere della società nel suo insieme. In particolare, la Salute Riproduttiva può essere misurata attraverso una serie di indicatori, fra cui: il tasso di fertilità, mortalità perinatale e mortalità materna; la prevalenza dell'uso di contraccettivi, di donne sottoposte ad almeno una visita in gravidanza da parte di personale qualificato, di nascite assistite da personale sanitario qualificato, di neonati di basso peso, di ricoveri ostetrici e ginecologici dovuti a complicazioni conseguenti ad aborto, di donne portatrici di mutilazioni genitali e/o di infezioni HIV in gravidanza.

I dati relativi a tali indicatori non sono omogenei né a livello mondiale né a livello europeo. Ad esempio, il rischio di morire per cause legate alla gravidanza varia in modo significativo in base all'area geografica, basti pensare che è di 1:16 in Niger e di 1:15.200 in Italia. Una tale discrepanza è inaccettabile e pertanto la sfida che ci si trova ad affrontare è quella di superare le disuguaglianze.

A tale scopo, le Nazioni Unite hanno incluso il miglioramento della salute materna come quinto obiettivo per il Millennio (Millennium Development Goal 5, MDG5).

In Europa, lo European Board and College of Obstetrics and Gynaecology (EBCOG), che rappresenta le Società Nazionali di Ginecologia e Ostetricia di 36 Paesi Europei e ha lo scopo di migliorare la salute delle donne e dei loro figli cercando di raggiungere i massimi livelli possibili di cura e formazione in campo ostetrico e ginecologico, ha messo in atto diverse strategie volte al raggiungimento di tali obiettivi.

Anche a Torino, diventata una città sempre più multietnica e multiculturale, sono dimostrabili differenze in termini di Salute Riproduttiva fra le donne straniere e quelle italiane. Per ridurre tali discrepanze, sono state adottate misure volte a superare le barriere linguistico-culturali e sono stati istituiti centri di accoglienza dedicati.

Noi medici dobbiamo stimolare il cambiamento socio-economico-culturale e sensibilizzare il mondo politico per rendere la salute delle donne un obiettivo prioritario per tutti.

La globalizzazione è quell'insieme di processi che favorisce i contatti, le relazioni, gli scambi e i rapporti di dipendenza e interdipendenza tra le varie aree del mondo.

La salute, d'altra parte, nell'atto costitutivo dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (Ginevra, 7 luglio 1948) viene definita come "...stato di completo benessere fisico, mentale e sociale e non solo assenza di malattia".

E secondo il *United Nations Population Fund* (UNFPA) la salute riproduttiva, che si riferisce specificamente alle donne, "implica che le persone abbiano una vita sessuale soddisfacente e sicura, che abbiano la possibilità di procreare e di decidere se, quando e quanto spesso farlo. (...) Implicito in questa condizione è il diritto di accesso a servizi sanitari appropriati che permettano alle donne di affrontare la gravidanza e il parto con sicurezza e offrano le migliori opportunità di avere un bambino sano"<sup>(5)</sup>.

Ma i diritti sanciti da questa dichiarazione che considera la salute riproduttiva come il risultato dello stato di salute specifico delle donne e dello sviluppo della società, non sono purtroppo a tutt'oggi garantiti in tutte le regioni del mondo.

<b>Elenco di alcuni dei principali indicatori della salute riproduttiva secondo l'OMS</b>
Tasso di fertilità
Prevalenza dell'uso di contraccettivi
Tasso di mortalità materna
Prevalenza di donne sottoposte ad almeno una visita in gravidanza da parte di personale qualificato.
Prevalenza di nascite assistite da personale sanitario qualificato
Tasso di mortalità perinatale
Prevalenza di neonati di basso peso
Percentuale di ricoveri ostetrici e ginecologici dovuti a complicazioni conseguenti ad aborto (spontaneo o indotto)
Prevalenza dichiarata di donne portatrici di mutilazioni genitali
Prevalenza di infezioni HIV nelle donne gravide

Tabella I.

Infatti, gli indicatori che vengono utilizzati per misurare la salute riproduttiva (Tabella I) dimostrano chiaramente l'esistenza di importanti criticità (Tabella II)<sup>(8,6)</sup>.

<b>Dati relativi ad alcuni indicatori della salute riproduttiva nel mondo riferiti al 2011</b>	
<b>Donne/anno* (N o %)</b>	
287.000	Muiono per cause legate alla gravidanza
30.8%	Partoriscono senza assistenza da parte di personale qualificato
37.1%	Non utilizzano metodi contraccettivi adeguati
49.408	Muiono in seguito ad aborto
130 milioni	Sono portatrici di Mutilazioni Genitali
* Un anno = 525.600 minuti	

Tabella II.

Basti pensare che ogni 2 minuti, nel mondo, una donna muore per motivi legati alla gravidanza. Tuttavia, il rischio di morire per cause legate alla gravidanza varia in base all'area geografica (Tabella III)<sup>(7)</sup>.

Ciò significa ad esempio che, in Niger, tale rischio è di 1 su 16 e, in Italia, di 1 su 15.200.

Pertanto, in questo mondo globalizzato, la sfida che ci si trova ad affrontare è quella di superare le disuguaglianze che diventano sempre più inaccettabili.

## **STRATEGIE PER SUPERARE LE DISUGUAGLIANZE**

### **Nel Mondo**

La presa di coscienza di una realtà globale caratterizzata da disuguaglianze così gravi in termini di salute della donna ha indotto le Nazioni Unite a includere, nel settembre del 2000, il miglioramento della salute materna come quinto obiettivo per il Millennio (*Millennium Development Goal 5, MDG5*) (Tabella IV)<sup>(3)</sup>.

<b>Stima del tasso di mortalità materna e rischio di morte nell'arco della vita per cause legate alla gravidanza calcolati nel 2010 in varie aree geografiche</b>		
<b>Aree geografiche</b>	<b>Tasso di mortalità materna (morti materne per 100000 nati vivi)</b>	<b>Rischio di morte materna per cause legate alla gravidanza nell'arco della vita</b>
Mondo	210	1:180
Paesi sviluppati <sup>a</sup>	16	1:3800
Paesi in via di sviluppo	240	1:150
Nord Africa <sup>b</sup>	78	1:470
Africa Sub-Sahariana <sup>c</sup>	500	1:39
Asia dell'Est <sup>d</sup>	37	1:1700
Asia dell'Est esclusa la Cina	45	1:1500
Asia del Sud <sup>e</sup>	220	1:160
Asia del Sud esclusa l'India	240	1:140
Sud-est Asiatico <sup>f</sup>	150	1:290
Asia dell'Ovest <sup>g</sup>	71	1:430
Caucaso eAsia centrale <sup>h</sup>	46	1:850
America Latina e Caraibi	80	1:520
America Latina <sup>i</sup>	72	1:580
Caraibi <sup>j</sup>	190	1:220
Oceania <sup>k</sup>	200	1:130

a. Albania, Australia, Austria, Bielorussia, Belgio, Bosnia-Erzegovina, Bulgaria, Canada, Croazia, Cipro, Repubblica Ceca, Danimarca, Estonia, Finlandia, Francia, Germania, Grecia, Ungheria, Islanda, Irlanda, Israele, Italia, Giappone, Lettonia, Lituania, Lussemburgo, Malta, Montenegro, Olanda, Nuova Zelanda, Norvegia, Polonia, Portogallo, Repubblica Moldova, Romania, Russia, Serbia, Slovacchia, Slovenia, Spagna, Svezia, Svizzera, Repubblica di Macedonia, Ucraina, Gran Bretagna e Irlanda del Nord, Stati Uniti.

b. Algeria, Egitto, Libia, Marocco, Tunisia.

c. Angola, Benin, Botswana, Burkina Faso, Burundi, Camerun, Capo Verde, Repubblica Centrafricana, Ciad, Unione delle Comore, Congo, Costa d'Avorio, Repubblica Democratica del Congo, Gibuti, Guinea Equatoriale, Eritrea, Etiopia, Gabon, Gambia, Ghana, Guinea, Guinea-Bissau, Kenya, Lesotho, Liberia, Madagascar, Malawi, Mali, Mauritania, Mauritius, Mozambico, Namibia, Niger, Nigeria, Ruanda, Sao Tome e Principe, Senegal, Seychelles, Sierra Leone, Somalia, Sudafrica, Sudan, Swaziland, Togo, Uganda, Repubblica Unita di Tanzania, Zambia, Zimbabwe.

d. Cina, Repubblica Democratica Popolare di Corea, Mongolia, Repubblica di Corea.

e. Afghanistan, Bangladesh, Bhutan, India, Iran (Repubblica Islamica dell'), Maldive, Nepal, Pakistan, Sri-Lanka.

f. Cambogia, Indonesia, Repubblica Popolare Democratica del Laos, Malesia, Myanmar, Filippine, Singapore, Thailandia, Timor Est, Vietnam.

g. Bahrain, Iraq, Giordania, Kuwait, Libano, Oman, Qatar, Arabia Saudita, Repubblica Araba di Siria, Turchia, Emirati Arabi Uniti, Cisgiordania e Striscia di Gaza, Yemen.

h. Armenia, Azerbaigian, Georgia, Kazakistan, Kirgizstan, Tajikistan, Turkmenistan, Uzbekistan.

i. Argentina, Belize, Bolivia (Stato Plurinazionale della), Brasile, Cile, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Guyana, Honduras, Messico, Nicaragua, Panama, Paraguay, Perù, Suriname, Uruguay, Venezuela (Repubblica Bolivariana del).

j. Bahamas, Barbados, Cuba, Repubblica Dominicana, Grenada, Haiti, Giamaica, Puerto Rico, Santa Lucia, Saint Vincent e Grenadine, Trinidad e Tobago.

k. Fiji, Micronesia (Stati Federati di), Papua Nuova Guinea, Isole Salomone, Tonga, Vanuatu.

Tabella III.

<b>Millennium Development Goal 5: Migliorare la salute materna</b>	
Obiettivo 5a	Ridurre di tre quarti, fra il 1990 e il 2015, il tasso di mortalità materna.
	<b>Indicatori</b> – Tasso di mortalità materna – Percentuale di parti assistiti da personale sanitario qualificato
Obiettivo 5b*	Rendere possibile, entro il 2015, l'accesso universale ai sistemi di salute riproduttiva
	<b>Indicatori</b> – Tasso di utilizzo di contraccettivi <i>(% donne di età compresa tra 15-49 anni che utilizzano, o i cui partner sessuali utilizzano, un metodo anticoncezionale)</i> – Mancanza di pianificazione familiare <i>(% donne che non desiderano una gravidanza che non utilizzano contraccettivi)</i> – Tasso di gravidanze tra le adolescenti <i>(nascite/1000 donne di 15-19 anni)</i> – Sorveglianza prenatale <i>(almeno 1 visita in gravidanza eseguita da personale sanitario qualificato o almeno 4 visite eseguite da personale non chiaramente specificato)</i>
*Introdotta nel 2007	

Tabella IV.

Il monitoraggio degli indicatori del MDG 5, nel corso degli anni, ha evidenziato che per quanto riguarda il tasso di mortalità materna la riduzione annuale è stata in media dell'1,3% (358 morti materne/100.000 nati vivi nel 2008 vs 430 morti materne/100.000 nati vivi nel 1990) e cioè ben inferiore al 5.5% necessario per raggiungere l'obiettivo nel 2015<sup>(2)</sup>. I progressi sono stati scarsi soprattutto nell'Africa Sub-Sahariana dove avvengono la metà di tutte le morti materne.

La percentuale di parti assistiti da personale sanitario qualificato, secondo il rapporto del 2011, risulta aumentata in tutte le regioni geografiche. Tuttavia, nei paesi in via di sviluppo, permane ancora inferiore rispetto al valore soglia dell'85% che ci si auspicava di raggiungere entro il 2010 (Figura 1).

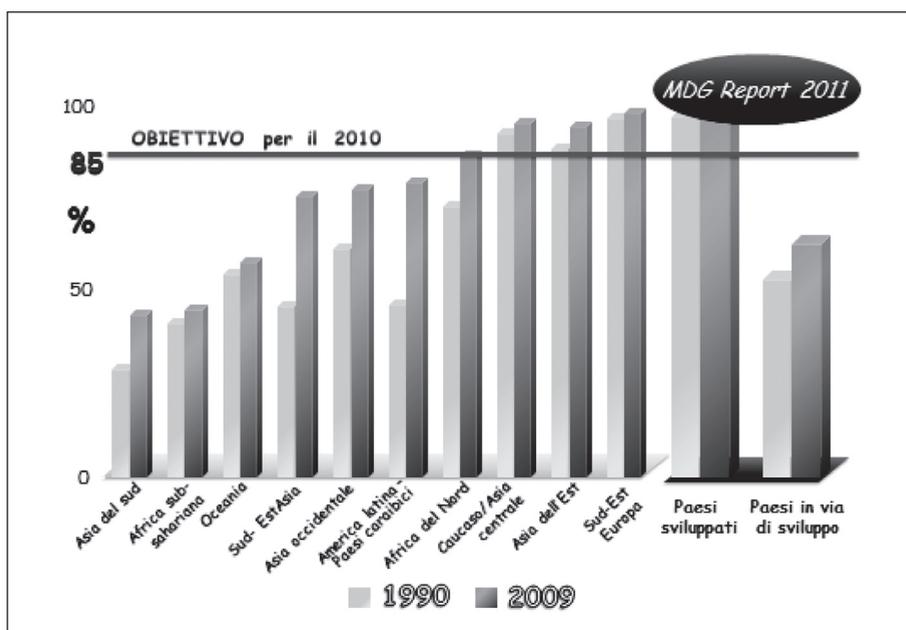


Figura 1. Percentuale di parti assistiti da personale sanitario qualificato suddivisi per aree geografiche.

Anche l'uso dei metodi contraccettivi è aumentato esponenzialmente negli ultimi 20 anni in molte regioni del mondo. Tuttavia, la mancanza di pianificazione familiare è ancora molto alta nei paesi a medio e basso reddito. Ad esempio nell'Africa Sub-Sahariana il 24% delle donne nel 2005 non aveva accesso alla pianificazione familiare.

Il tasso di gravidanze tra adolescenti, nei paesi in via di sviluppo o sottosviluppati, si è ridotto tra il 1990 e il 2000, ma è poi rimasto costante o è addirittura lievemente aumentato tra il 2000 e il 2007.

Sempre nei paesi in via di sviluppo o sottosviluppati, nel 1990 meno del 55% delle donne aveva effettuato almeno una visita da parte di personale qualificato in gravidanza, mentre nel 2005 tale percentuale era salita al 75%. Il miglioramento c'è stato, ma le 4 visite raccomandate in gravidanza continuano a non essere accessibili per molte donne<sup>(4)</sup>.

Questi dati in itinere hanno indotto a ritenere che gli obiettivi prefissati non sarebbero stati raggiunti, soprattutto a causa della carenza cronica di operatori sanitari: è stato infatti calcolato che per colmare il deficit ne sarebbero necessari 4.2 milioni.

Per risolvere tale crisi, nel maggio del 2006, è stata istituita a Ginevra la *Global Health Workforce Alliance*<sup>(9)</sup> che, allo scopo di ottenere un rapido aumento di professionisti sanitari qualificati nei paesi con esperienza limitata, ha introdotto la *Fast Track Training Initiative* che consiste nelle cinque principali strategie schematizzate nella Figura 2.



Figura 2. Strategie individuate dalla Fast Track Training Initiative allo scopo di ottenere un rapido aumento di professionisti sanitari qualificati nei paesi con esperienza limitata.

### In Europa

Anche tra i Paesi Europei esistono delle disparità in vari ambiti: assistenza ostetrico-ginecologica, formazione specialistica in ginecologia e ostetricia, formazione superspecialistica (medicina della riproduzione, medicina perinatale, uroginecologia, oncologia ginecologica), Educazione Medica Continua (ECM) e sviluppo professionale continuo (CPD).

Per ridurre le disuguaglianze e armonizzare il più possibile l'assistenza e la formazione ostetrico-ginecologica, è stato fondato lo European Board and College of Obstetrics and Gynaecology (EBCOG) (Tabella V). Il principale obiettivo dell'EBCOG consiste nel migliorare la salute delle donne e dei loro figli cercando di raggiungere i massimi livelli possibili di cura e formazione nel campo della ginecologia e dell'ostetricia in tutti i Paesi Europei.

<p style="text-align: center;"><b>Dati relativi all'EBCOG fondato nel 1996</b></p> 
<p>È il Consiglio della Sezione di Ginecologia e Ostetricia della “Union Européenne des Médecins Spécialistes” (UEMS)</p>
<p>Attualmente rappresenta le Società Nazionali di Ginecologia e Ostetricia di 36 Paesi appartenenti (n. 27) o non appartenenti (n. 9) all’Unione Europea.</p>
<p>Riunisce eminenti professionisti dei Paesi membri e lavora in stretta collaborazione con le 4 società europee che rappresentano le superspecializzazioni: la <i>European Association of Perinatal Medicine (EAPM)</i>, la <i>European Society of Gynecological Oncology (ESGO)</i>, la <i>European Society for Human Reproduction and Embriology (ESHRE)</i>, la <i>European Urogynaecology Association (EUGA)</i>, e con lo <i>European Network of Trainees in Obstetrics and Gynaecology (ENTOG)</i>.</p>
<p>Inoltre, collabora con altre Società specialistiche europee attraverso il suo <i>Standing Committee on Training and Assessment (SCTA)</i>.</p>

Tabella V.

Le principali strategie utilizzate dall'EBCOG comprendono: lo sviluppo di standard di cura europei per la salute della donna; il miglioramento e l'armonizzazione della formazione e dell'aggiornamento (ECM, CPD) in ginecologia e ostetricia attraverso lo SCTA; la creazione di un Consorzio Europeo di Ospedali e Istituzioni sulla Simulazione allo scopo di testare, confrontare e sviluppare programmi di simulazione da validare e utilizzare in tutta Europa; l'accREDITamento di centri di formazione in ginecologia e ostetricia e nelle superspecializzazioni attraverso lo *Standing Committee on Hospital Recognition (SCHR)*; la sensibilizzazione delle istituzioni politiche europee a sostenere iniziative volte a migliorare la salute della donna.

In particolare, l'idea di stilare un documento sugli standard di cura per la salute della donna è nata dalla constatazione che gli esiti e le procedure ostetrico-ginecologiche hanno tutt'ora un'ampia variabilità in ambito europeo (Tabella VI).

L'EBCOG si adopererà a far adottare ai vari Paesi Europei il documento che, grazie a specifici indicatori, potrà essere utilizzato come importante strumento di controllo di qualità dei centri di cura.

 <b>EUROPEAN PERINATAL HEALTH REPORT</b> <small>by the EURO-PERISTAT project  in collaboration with  SCPE, EUROCAT &amp; EURONEOSTAT</small>  <small>EURO-PERISTAT Project, with SCPE,  EUROCAT, EURONEOSTAT. European  Perinatal Health Report, 2008.  Available: www.europeristat.com</small>	<b>Dati esemplificativi sulla variabilità di esiti  e procedure ostetriche in Europa, tratti dallo  <i>European Perinatal Health Report 2008</i></b>	
	Tasso di mortalità materna	2 - 10/100.000 nati vivi
	Tagli cesarei	14 - 38 %
	Partivaginali operativi	< 3 - 12%
	Induzioni del travaglio	< 9 - > 30%
	Episiotomie	10 - 82%
	Allattamento al seno	42 - 95%

Tabella VI.

Per quanto riguarda la formazione, l'EBCOG ha redatto, in collaborazione con l'ENTOG che rappresenta gli specializzandi europei in ostetricia e ginecologia, un programma di *training* e un *logbook* che ci si auspica vengano



Dipartimento di Discipline Ginecologiche e Ostetriche  
Università degli Studi di Torino

**Training chirurgico endoscopico sui simulatori**  
LAST (Laparoscopic Skills Testing and Training)

Valutazione obiettiva delle  
capacità di orientamento spaziale e  
coordinazione psicomotoria  
(score finale validato dalla ESGE Academy)

European  
theAcademy of  
Gynaecological  
Surgery

1° Corso Italiano  
**TRAINING  
the  
TRAINERS**  
Torino, 9-10 Novembre 2007

2° Corso Italiano  
**TRAINING  
the  
TRAINERS**  
Torino, 22-23 maggio 2009

1° Corso avanzato Italiano  
**ASSESSMENT TRAINING FOR  
EDUCATIONAL SUPERVISORS**  
PER DOCENTI IN OSTETRICIA  
E GINECOLOGIA  
Torino, 25 maggio 2009

EBCOG  
Training the Trainers  
Course  
for Educational Supervisors  
in Obstetrics  
and Gynaecology

Torino (Italy)  
20-22 October 2011  
San'Anna Hospital

Figura 3. Esempi di corsi volti al miglioramento della formazione in ginecologia e ostetricia organizzati dal Dipartimento di Discipline Ginecologiche ed Ostetriche dell'Università di Torino in collaborazione con l'EBCOG e con la European Academy of Gynaecological Surgery.

adottati in tutte le scuola di specialità europee. Inoltre, ha organizzato corsi di istruzione dei docenti alla formazione (*Training the Trainers Courses*), la maggior parte dei quali si sono svolti a Torino (Figura 3).

Oltre a ciò, sempre per migliorare la formazione degli operatori e la valutazione dell'apprendimento, l'EBCOG sta mettendo a punto strumenti nuovi, efficaci e più vicini alle necessità attuali come ad esempio esercitazioni pratiche su manichini e simulatori, corsi permanenti sulla gestione delle emergenze, materiali didattici fruibili tramite e-learning.

### **A Torino**

Negli ultimi anni Torino, è diventata una città sempre più multi-etnica e multiculturale. Basti pensare che nel 2010 le donne straniere residenti a Torino rappresentavano il 9% della popolazione femminile e il 26% del totale dei ricoveri ostetrico-ginecologici all'Ospedale Sant'Anna.

In particolare, fra il 2000 e il 2010, la percentuale delle donne straniere ricoverate in ostetricia è salita dal 14 al 44%, mentre in ginecologia è passata dal 7 al 14%.

Degno di nota è il fatto che nel 2010, al Sant'Anna, le puerpere originarie dei paesi africani in cui si praticano le mutilazioni genitali femminili (MGF) rappresentavano il 3% di tutte le puerpere.

È stato rilevato che le donne straniere residenti a Torino hanno un tasso di abortività 3-4 volte maggiore delle italiane, effettuano il 33% del totale delle Interruzioni Volontarie di Gravidanza (IVG), nel 2.1% dei casi non effettuano controlli in gravidanza e hanno un maggior rischio di parto pretermine, mortalità perinatale e malformazioni congenite. Inoltre, aderiscono il 5-7% in meno rispetto alle italiane al programma di screening per il cervicocarcinoma.

Allo scopo di ridurre il più possibile tali differenze sono state adottate misure volte a superare le barriere linguistiche e culturali e sono stati istituiti centri di accoglienza dedicati (Tabella VII).

In particolare, per quanto riguarda il grave problema delle mutilazioni genitali femminili, che sono fonte di complicanze fisiche, sessuali e ostetriche, sono stati organizzati corsi di formazione allo scopo di: accrescere la conoscenza del problema da parte degli operatori che si occupano della salute, svolgere attività di prevenzione costruendo un dialogo con le comunità di immigrati, assistere e curare adeguatamente le donne e le bambine già sottoposte a mutilazioni.

<b>Tabella riassuntiva delle iniziative intraprese all’Ospedale Sant’Anna e a livello regionale allo scopo di superare le barriere linguistiche e culturali e di istituire centri di accoglienza dedicati</b>	
OBIETTIVO	Superare le barriere linguistiche
Iniziative	<p>Il Sant’Anna si è dotato di:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– mediatrici culturali permanenti, per 6 lingue (<i>Albanese, Arabo, Cinese, Francese, Inglese, Rumeno</i>), e reperibili su richiesta entro 24h, per altre 23 lingue</li> <li>– informative e consensi, nelle 6 lingue di cui sopra, sulla donazione del sangue cordonale, sul parto e l’allattamento, su interventi ginecologici, IVG e diete.</li> </ul> <p>La Regione ha redatto in diverse lingue opuscoli informativi su:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– malattie sessualmente trasmesse, contraccezione e gravidanza (<i>in collaborazione con il Dipartimento di Discipline Ginecologiche e Ostetriche dell’Università di Torino e il Soroptimist Intenational Club di Torino</i>)</li> <li>– cura dei figli a partire dalla gravidanza (<i>in collaborazione con Città di Torino, Biblioteche Civiche Torinesi, ASL TO1-TO2</i>)</li> <li>– Screenig per il cervicocarcinoma</li> </ul>
OBIETTIVO	Superare le barriere culturali
Iniziative	<p>Al Sant’Anna sono stati organizzati:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– corsi sulle mutilazioni genitali femminili (<i>in collaborazione con il Dipartimento di Discipline Ginecologiche e Ostetriche dell’Università di Torino</i>)</li> </ul>
OBIETTIVO	Istituire centri di accoglienza dedicati
Iniziative	<p>Al Sant’Anna è stato istituito:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Il CENTRO DI SOCCORSO per donne che hanno subito violenze sessuali la cui attività comprende anche l’accoglienza alle donne che intendono sottrarre se stesse o le proprie figlie alle mutilazioni genitali femminili.</li> </ul>

Tabella VII.

## CONCLUSIONI

Tanto è stato fatto e si sta facendo per migliorare la salute della donna.

In questo contesto la medicina ha un ruolo di primaria importanza, ma la scienza da sola purtroppo non è sufficiente.

Noi, come medici, abbiamo la grande responsabilità di stimolare il cambiamento a livello sociale, economico e culturale e di sensibilizzare il mondo politico al fine di rendere la salute un obiettivo prioritario per tutti.

## BIBLIOGRAFIA

1. Euro-Peristat project in collaboration with SCPE, EUROCAT & EURONEOSTAT: *European Perinatal Health Report*. 2008.
2. Hogan MC, Foreman KJ, Naghavi M, Ahn SY, Wang M, Makela SM, Lopez AD, Lozano R, Murray CJ: *Maternal mortality for 181 countries, 1980-2008: a systematic analysis of progress towards Millennium Development Goal 5*. Lancet 2010; 375: 1609-1623.
3. <http://mdgs.un.org/unsd/mdg/Default.aspx>.
4. Islam M, Yoshida S: *MDG 5: how close are we to success?* BJOG 2009; 116 Suppl 1: 2-5.
5. United Nations Population Fund (UNFPA): *International Conference on Population and Development*. Il Cairo, 1994; par. 7.2.
6. United Nations: *The Millennium Development Goals Report*. 2011.
7. WHO, UNICEF, UNFPA and The World Bank: *Trends in maternal mortality: 1990 to 2010*. 2012.
8. World Health Organization (WHO): *Reproductive Health Indicator. Guidelines for their generation, interpretation and analysis for global monitoring*. 2011.
9. [www.who.int/workforcealliance/about/en](http://www.who.int/workforcealliance/about/en).

## LE CELLULE NATURAL KILLER DAL LABORATORIO ALLA CURA DI LEUCEMIE AD ALTO RISCHIO

*Lorenzo Moretta<sup>1,3</sup>, Franco Locatelli<sup>2</sup>, Alessandro Moretta<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> Istituto Giannina Gaslini - Genova

<sup>2</sup> Ospedale Pediatrico Bambino Gesù - Roma e Università di Pavia

<sup>3</sup> Dipartimento di Medicina Sperimentale - Università degli Studi di Genova

Key words: *Natural Killer cell / Cellula citotossica naturale*  
*Inhibitory and activating / Recettori inibitori e attivatori*  
*NK receptors delle cellule NK*  
*High risk leukemias / Leucemie ad alto rischio*  
*Hemopoietic stem cell / Trapianto di cellule staminali*  
*transplantation emopoietiche*

### **Abstract:**

Natural Killer (NK) cells are involved in innate immune responses and play an important role in tumor surveillance and in defenses against viral infections. Human NK cells recognize HLA-class I molecules through surface receptors (KIR and NKG2A) delivering signals that inhibit NK cell function and kill target cells that have lost (or underexpress) HLA-class I molecules as it may occur in tumors or virus-infected cells. NK cell triggering is mediated by various activating receptors and coreceptors that recognize ligands expressed primarily in tumors or virus-infected cells. HSC-derived NK cells have been exploited in the cure of high risk leukemias in the haploidentical HSC transplantation setting. A major role for donor-derived "alloreactive" NK cells (i.e. donor-derived NK cells that are not inhibited by the HLA-class I alleles of the patient) has been demonstrated both in adult AML and in pediatric ALL patients undergoing haploidentical HSC grafting. In these patients, alloreactive NK cells mediated killing of patient's leukemia cells (thus preventing leukemic relapses) and dendritic cells, thus preventing graft-versus-host responses. FACS analysis of KIRs expressed by NK cells allows to define the size of the alloreactive NK subset and to select the best potential donor.

We could also establish a correlation between the size of the alloreactive NK cell population and the clinical outcome. In this context, we showed that alloreactive NK cells derived from donor's HSC are generated and persist in patients for long time intervals. These studies and the high survival rates of patients undergoing haploidentical HSC transplantation highlight an important new reality in bone marrow transplantation to cure of otherwise fatal leukemias.

**Riassunto:**

Le cellule natural killer (NK) sono coinvolte nelle risposte immuni innate ed hanno un ruolo importante nella immunosorveglianza contro i tumori nonché nelle difese dalle infezioni virali. Le cellule NK umane riconoscono le molecole HLA di classe I grazie a recettori di superficie (KIR e NKG2A) di tipo inibitorio ed uccidono cellule bersaglio che hanno perduto (o che esprimono bassi livelli) di molecole HLA di classe I. Questo può verificarsi nei tumori o nelle cellule infettate da virus. L'attivazione delle cellule NK è mediata da vari recettori e co-recettori attivatori che riconoscono ligandi espressi principalmente dai tumori o dalle cellule infettate da virus. Le cellule NK, derivate dalle cellule staminali ematopoietiche (CSE) sono utilizzate nella cura delle leucemie ad alto rischio nell'ambito del trapianto aploidentico di CSE. In questo trapianto, giocano un ruolo fondamentale le cellule NK "alloreattive" da donatore (i.e. cellule NK del donatore dotate di KIR che non riconoscono alleli HLA di classe I del paziente). Questo è stato dimostrato sia in pazienti adulti con leucemia mieloide acuta (LMA) che in pazienti pediatrici con leucemia linfoblastica acuta (LLA) che hanno ricevuto un trapianto di CSE aploidentico. In questi pazienti, le cellule NK alloreattive mediano l'uccisione sia delle cellule leucemiche che delle cellule dendritiche (DC), prevenendo recidive leucemiche e reazioni da trapianto verso l'ospite (GvH). L'analisi al FACS dei recettori KIR espressi dalle cellule NK permette di definire la popolazione NK alloreattiva e di selezionare il miglior donatore potenziale. Abbiamo infatti stabilito una correlazione tra la percentuale di cellule NK alloreattive presenti nel donatore e l'esito clinico. Abbiamo inoltre dimostrato che le cellule NK alloreattive derivate da CSE del donatore sono generate e permangono nei pazienti per lunghi periodi (fino a 5 anni). Questi studi e l'ottimo risultato clinico in pazienti sottoposti a trapianto di CSE aploidentico hanno messo in luce una nuova importante realtà nel trapianto di midollo osseo per la cura di leucemie altrimenti fatali.

Le cellule “natural killer” (NK) sono uno dei principali attori della cosiddetta immunità innata, vale a dire l’insieme di quelle componenti delle nostre difese comparse precocemente nell’evoluzione e che costituiscono vere e proprie fondamenta di tutto il sistema immunitario<sup>(19)</sup>. Le cellule NK furono originariamente identificate su base puramente funzionale, in relazione alla loro capacità di uccidere varie linee tumorali senza una previa attivazione (strettamente necessaria nel caso dei linfociti T). Proprio questa caratteristica funzionale ne ha determinato la denominazione di “killer naturale”. Si tratta di una popolazione linfoide che, a differenza dei linfociti T e B, non esprime recettori distribuiti clonalmente specifici per i vari antigeni<sup>(13,14)</sup>. In condizioni normali, le cellule NK sono presenti pressochè esclusivamente nel sangue periferico, nel midollo osseo o nella milza. Possono tuttavia migrare nei tessuti sede di infiammazione in risposta a mediatori chemiotattici prodotti da varie cellule infiammatorie. Le cellule NK giocano un ruolo centrale nelle difese dell’immunità innata essendo in grado di prevenire la rapida disseminazione di tumori metastatici (per lo meno in modelli sperimentali del topo) e la loro attività è cruciale per le difese contro i virus, soprattutto virus citopatici, quali gli Herpes virus. In seguito ad attivazione, le cellule NK rilasciano citochine e chemiochine che inducono risposte infiammatorie, controllano l’emopoiesi e la generazione di cellule dendritiche (DC)<sup>(8)</sup>, attivano la funzione dei macrofagi e dei granulociti. Sono infine in grado di influenzare le risposte mediate dai linfociti T, inducendo una risposta polarizzata di tipo TH1 particolarmente efficace contro vari agenti patogeni<sup>(8)</sup>. Pertanto, in condizioni patologiche nelle quali si verifichi una attivazione precoce delle cellule NK, si potranno avere importanti effetti (sia qualitativi che quantitativi) sulla seguente risposta adattativa<sup>(15)</sup>. Nonostante la loro rilevanza nei meccanismi di difesa, per molti anni dopo la loro scoperta le cellule NK sono rimaste “un mistero” per quanto riguarda la comprensione dei meccanismi molecolari che ne regolano la funzione e la loro capacità di discriminare tra cellule normali e cellule tumorali. Tuttavia, in anni recenti si è assistito ad una rapida evoluzione delle nostre conoscenze sulle cellule NK. Abbiamo ora un’idea precisa sui meccanismi che regolano l’attivazione e la funzione delle cellule NK. In particolare è stato chiarito il meccanismo che permette alle cellule NK di uccidere le cellule tumorali o le cellule infettate da virus, risparmiando quelle normali.

**Le cellule NK vengono inibite quando entrano in contatto con gli antigeni maggiori di istocompatibilità (MHC) di classe I presenti sulla membrana delle cellule.**

Era stata originariamente osservata una correlazione inversa tra l’espressione di molecole MHC di Classe I da parte di cellule tumorali e la loro suscettibilità

alla lisi NK-mediata. Questo aveva suggerito che le molecole MHC potessero esercitare un ruolo “protettivo” impedendo che le NK uccidessero cellule normali o comunque cellule che esprimono livelli sufficienti di molecole MHC. Proprio il deficit di espressione di MHC, tipico di molte cellule tumorali e di cellule infettate da alcuni virus era stata suggerita quale causa della suscettibilità alla lisi NK-mediata (tale ipotesi formulata da Klas Karre, è conosciuta come “missing self hypothesis”)<sup>(5)</sup>. Lo studio delle NK umane e la messa a punto di una tecnica che ha portato alla loro clonazione *in vitro* ha permesso al nostro laboratorio di giungere alla scoperta che le cellule NK sono in grado di discriminare tra diversi gruppi di alleli di molecole HLA di classe I (vale a dire gli antigeni di istocompatibilità MHC dell’uomo)<sup>(3,11)</sup>. Questo dato presupponeva però la presenza, sulle cellule NK, di recettori specifici per antigeni HLA. Un altro presupposto importante era che tali recettori dovessero avere una funzione inibitoria, poichè il riconoscimento di antigeni HLA risultava nel blocco della funzione NK. I prototipi di tali recettori inibitori furono identificati e caratterizzati nel nostro laboratorio. Denominati originariamente p 58.1 e p 58.2 (ora KIR2DL1 e KIR2DL2/3)<sup>(3,12)</sup>, riconoscono in maniera precisa due differenti gruppi di alleli dell’HLA-C (gruppo 1 e gruppo 2). Altri recettori, strutturalmente simili a p58.1 e p58.2, ma con specificità per gruppi di alleli dell’HLA-B ed HLA-A, furono identificati nel nostro ed in altri laboratori. Collettivamente, i recettori delle cellule NK in grado di riconoscere specificità alleliche, sono denominati “Killer Ig-like Receptors” (KIR)<sup>(9)</sup>. Esistono altri recettori inibitori coinvolti nel riconoscimento di HLA, denominati CD94-NKG2A e ILT2. Tuttavia si tratta di recettori più “promiscui” che non sono in grado di riconoscere specificità alleliche<sup>(7,9)</sup>. È importante notare che ciascun tipo di KIR non è espresso da tutte le cellule NK di un determinato individuo, ma solamente da una frazione di queste. Inoltre, tutte le cellule NK mature esprimono almeno un recettore specifico per molecole HLA-classe I proprie (self). La distribuzione clonale dei recettori e la capacità da parte dei KIR di riconoscere gruppi di alleli HLA permette alla popolazione cellulare NK, nel suo insieme, di identificare cellule che abbiano perduto anche un singolo allele HLA-Cl I e di eliminarle<sup>(9)</sup>. È opportuno sottolineare che tali cellule sono potenzialmente pericolose trattandosi di cellule tumorali o di cellule infettate da virus particolarmente aggressivi.

## **MODALITÀ DI ATTIVAZIONE DELLE CELLULE NK**

L’inattivazione delle cellule NK mediata dai recettori inibitori specifici per antigeni HLA-classe I rappresenta un importante meccanismo di sicurezza

per evitare danni non voluti alle cellule normali, (che esprimono antigeni HLA-Cl I). questo significa che le cellule NK, in seguito ad interazione con potenziali cellule bersaglio, ricevono un segnale di attivazione. Questo presuppone l'esistenza di recettori NK di tipo attivatorio che trasmettono un segnale in seguito al contatto con strutture (ligandi) espresse sulle cellule bersaglio. Questi recettori attivatori sono stati scoperti solo pochi anni fa dal nostro gruppo che ne ha anche clonato i geni. Denominati collettivamente "recettori della citotossicità naturale" ("natural cytotoxicity receptors", NCR), sono costituiti da NKp46, NKp30 ed NKp44<sup>(10)</sup>. Gli NCR giocano un ruolo predominante nell'uccisione della maggior parte delle linee di cellule tumorali umane. L'NKp44 è un recettore particolarmente interessante, in quanto espresso dalle cellule NK solo dopo la loro attivazione. Un altro recettore attivatorio espresso dalle cellule NK e da cellule T citolitiche è l'NKG2D che riconosce MICA e MICB e ULBP, molecole assenti su cellule normali ma espresse, ad esempio, in seguito a stress cellulare o a trasformazione tumorale. Sebbene dei ligandi cellulari degli NCR siano stati identificati solo quelli dell'NKp30<sup>(2)</sup>, le informazioni disponibili sono compatibili con una loro espressione prevalente (se non esclusiva) in cellule in rapida proliferazione, attivate da citochine o in cellule "stressate" da temperatura elevata, da un'infezione virale o da trasformazione tumorale. Se davvero i vari ligandi per i recettori attivatori delle cellule NK sono espressi solamente da cellule "stressate", la possibilità di attivare le cellule NK sarebbe in realtà limitata solo a cellule potenzialmente pericolose. Questo significa che le cellule NK sono attivate solo quando necessario, cioè quando incontrano cellule che è opportuno eliminare. La "decisione" se eliminarle o meno è dettata poi dal monitoraggio, da parte dei recettori inibitori, di una eventuale diminuzione di espressione di antigeni HLA-classe I (che si verifica su cellule tumorali o infettate da virus, ma non su cellule normali).

### **ADATTAMENTO DELLE CELLULE NK ALL'IMMUNITÀ SPECIFICA**

Le cellule NK sono state a lungo considerate come cellule effettrici non specifiche e "primitive". In realtà questo concetto è ampiamente superato. Infatti si sono notevolmente evolute per integrare la loro azione con l'immunità adattativa (o specifica) mediata dai linfociti T e B. Si pensi ad es. all'espressione di recettori in grado di riconoscere la porzione Fc degli anticorpi IgG (gli anticorpi sono prodotti tipici dell'immunità specifica) e alla produzione di varie citochine in grado di regolare la funzione dei linfociti T e B. Inoltre hanno acquisito un importante meccanismo di sicurezza mediato

dai recettori inibitori specifici per HLA-CI I, particolarmente dai KIR, (in grado di riconoscere forme alleliche di tali molecole). Tale meccanismo sofisticato è di recente evoluzione. Infatti, nei roditori non esistono KIR, che sono peraltro sostituiti da recettori strutturalmente molto diversi anche se con funzione analoga. Importanti differenze nell'espressione e nella specificità dei KIR sono state anche osservate nello scimpanzé (la dicotomia tra uomo e scimpanzé risale a "solo" 5 milioni di anni fa). Questo significa che i KIR si sono evoluti in tempi relativamente recenti, proprio come gli antigeni di istocompatibilità HLA.

### **INTERAZIONI TRA CELLULE NK E CELLULE DENDRITICHE (DC), DUE IMPORTANTI ATTORI DELL'IMMUNITÀ INNATA**

Le DC, come le NK, sono cellule molto importanti dell'immunità innata. Giocano entrambe un ruolo fondamentale nell'immunità innata e all'interfaccia tra questa e l'immunità specifica. Quest'ultima infatti, per poter essere indotta, dipende strettamente dalla funzione delle DC, le principali cellule in grado di presentare l'antigene ai linfociti T helper. I linfociti T helper sono responsabili dell'innescò di tutte le risposte dell'immunità specifica. Le DC possono derivare direttamente dalle cellule staminali emopoietiche CD34+ oppure dai monociti presenti nel sangue, sotto l'effetto di citochine quali il GM-CSF, l'IL-4 e gli interferoni di tipo I ( $\alpha$  e  $\beta$ ). Queste citochine sono in grado di promuoverne la maturazione fino allo stadio di DC immatura (iDC). Le iDC esprimono poche molecole HLA sulla loro superficie cellulare, mentre ne hanno in abbondanza nel citoplasma. Sono poi caratterizzate da una notevole capacità di catturare gli antigeni (ad es. batteri e virus) grazie ad una fagocitosi ed una macropinocitosi molto efficiente. Sono inoltre in grado di produrre grandi quantità di citochine proinfiammatorie primarie (es. IL-1 e TNF- $\alpha$ ), vale a dire i principali mediatori dell'infiammazione. Le iDC sono localizzate in vari tessuti dove catturano gli agenti patogeni e interagiscono con i loro prodotti (ad esempio con il lipopolisaccaride, LPS, dei batteri gram-negative o con acidi nucleici virali). Queste interazioni e/o le stesse citochine proinfiammatorie TNF- $\alpha$  e IL-1 inducono la maturazione delle iDC a DC mature (mDC). Queste ultime sono caratterizzate da una elevata espressione di HLA, dall'espressione di molecole co-stimolatorie quali il CD80 ed il CD86 (anche noti come B7.1 e B7.2), fondamentali per indurre l'attivazione dei linfociti T naive (vale a dire linfociti T che non hanno mai incontrato l'antigene). La migrazione delle DC nei linfonodi, dove avverrà l'incontro con i linfociti T helper, è reso possibile dall'espressione del

recettore CCR7 sulle DC in fase di maturazione. Questo recettore riconosce specificamente, due chemochine denominate CCL19 e CCL21 prodotte a livello dei linfonodi e che quindi attraggono le DC. Dati ottenuti dal nostro gruppo hanno dimostrato come l'interazione tra cellule NK e DC risulti in una serie di fenomeni di particolare rilievo<sup>(15)</sup>. Innanzi tutto le cellule NK, a contatto con le DC iniziano a proliferare grazie a citochine prodotte dalle DC. Inoltre, una volta attivate, le cellule NK sono in grado di uccidere le iDC stesse. Queste ultime esprimono bassi livelli di HLA e non sono quindi "protette" dalle cellule NK. È molto probabile che l'interazione tra cellule NK e DC possa giocare un ruolo molto importante nella modulazione della risposta immunitaria. Le cellule NK infatti potrebbero esercitare un controllo di qualità sulla DC, eliminando iDC in eccesso. Ad esempio, se queste ultime non sono indotte a maturare per mancanza di prodotti microbici (ad es. l'infezione è stata controllata ed è terminata), viene ad esaurirsi il loro ruolo principale. Le cellule NK avrebbero quindi il ruolo di eliminare iDC non più utili e potenzialmente dannose (data la loro capacità di produrre grandi quantità di citochine proinfiammatorie)<sup>(8,15)</sup>.

### **RILEVANZA TERAPEUTICA DELLE CELLULE NK: L'ESEMPIO DELLE LEUCEMIE MIELOIDI ACUTE**

La potente attività killer delle cellule NK ha suggerito un loro possibile impiego nella terapia dei tumori. Tentativi di immunoterapia adottiva con cellule NK per curare tumori metastatici avanzati (soprattutto melanomi) hanno dato in passato qualche risultato di interesse. Cellule NK autologhe, dopo averne indotto l'attivazione e la proliferazione in vitro e averle reinfuse nel paziente, erano in grado di eliminare masse tumorali rilevanti, per lo meno in certi distretti, soprattutto nei polmoni. Non avevano però alcun effetto significativo in altre localizzazioni del tumore. Il fatto però che le cellule NK fossero in grado di esercitare un effetto antitumorale anche in vivo ha fornito una base razionale per un loro sfruttamento terapeutico. Un approccio più recente ha portato ad importanti risultati nella terapia delle leucemie mieloidi acute grazie all'intervento di cellule NK derivate da cellule staminali emopoietiche nel corso di trapianto di midollo allogenico. Per comprendere questo approccio è opportuno spiegare il concetto di "alloreattività" delle cellule NK. In genere, l'uccisione NK-mediata di cellule self avviene solo quando queste hanno perso l'espressione di molecole HLA-Cl I. Per contro, se le cellule NK interagiscono con cellule allogeniche (di un altro individuo della stessa specie) è possibile che uno o più recettori KIR (specifici per determinanti

allelici dell'HLA-Cl I) non riconoscano gli alleli HLA espressi dalle cellule allogene (3,11,12). Pertanto le cellule NK, non essendo inibite dall'interazione KIR/HLA, potranno esercitare attività citotossica contro le cellule allogene e produrre citochine in grado di esercitare vari effetti biologici. Queste cellule NK "alloreattive" furono identificate nel nostro laboratorio alla fine degli anni '80<sup>(11)</sup>. Va ricordato che il trapianto di midollo allogenico (vale a dire quando il donatore è un individuo non identico appartenente alla stessa specie) può curare una leucemia mieloide grazie a due meccanismi. Innanzi tutto, il regime di "condizionamento", basato sull'uso di chemioterapia e radioterapia ad alte dosi, ha lo scopo di eliminare il numero più elevato possibile di cellule leucemiche (idealmente tutte). Poi l'effetto citotossico dei linfociti T presenti nel midollo trapiantato, in grado di riconoscere alloantigeni espressi sulle cellule leucemiche residue dopo il regime di condizionamento<sup>(20)</sup>. Queste cellule, se non eliminate, sono responsabili delle ricadute leucemiche. Il rovescio della medaglia è che gli alloantigeni riconosciuti dai linfociti T sono espressi anche su tessuti normali del paziente e questo causa la reazione di rigetto contro l'ospite (GvHD) che può avere conseguenze gravi, talvolta anche mortali. Un midollo allogenico compatibile è mediamente disponibile in circa il 60% dei casi (da familiare o da donatore HLA identico non correlato). Per il restante 40% non è possibile ottenere un midollo compatibile in tempo utile. Per questi pazienti (con prognosi estremamente sfavorevole) è stato sviluppato il trapianto di midollo "aploidentico", vale a dire da un donatore che ha la metà degli antigeni HLA identici al paziente e l'altra metà differenti: tipico è l'esempio del trapianto in cui il donatore è un genitore. In questo tipo di trapianto il paziente avrà metà del corredo genetico di origine materna e metà di origine paterna. Dato il notevole grado di incompatibilità, è strettamente necessario eliminare tutte le cellule T dal midollo da trapiantare per evitare GvHD mortali. Il trapianto di midollo aploidentico è diventato una realtà clinica di notevole successo, anche se limitato a pochi centri, dato la sua complessità<sup>(1,17,18)</sup>. Nel trapianto aploidentico potranno verificarsi una delle seguenti condizioni:

- 1) Le cellule NK originate dalle cellule staminali del donatore esprimono KIR che non riconoscono le molecole HLA-classe I espresse del paziente. In questo caso le cellule NK del trapianto saranno "alloreattive".
- 2) Le cellule NK esprimono KIR che riconoscono gli alleli HLA del ricevente in quanto gli alleli del paziente, anche se diversi da quelli del donatore, appartengono agli stessi gruppi di specificità alleliche riconosciute dai KIR del donatore. Quindi non saranno alloreattive.

I risultati clinici in pazienti trapiantati appartenenti alle due categorie hanno dimostrato differenze drammatiche. Infatti, nel primo caso, quando erano presenti cellule NK alloreattive, la sopravvivenza a 5 anni è risultata di circa il 60%. Nel secondo caso, inferiore al 5%<sup>(18)</sup>. Nel primo caso, la sopravvivenza elevata è dovuta principalmente all'eliminazione delle cellule leucemiche residue da parte delle cellule NK alloreattive e, di conseguenza, alla prevenzione delle ricadute leucemiche, frequente causa di morte.

Come mai le cellule NK dei pazienti non sono in grado di sconfiggere la leucemia? Innanzi tutto, le leucemie possono esprimere livelli di molecole HLA-classe I sufficienti a proteggerle da cellule NK autologhe. In secondo luogo, molto frequentemente (~ 90% dei casi) le cellule NK di pazienti con leucemia mieloide acuta non esprimono a sufficienza recettori attivatori (vedi sopra). Questo inevitabilmente causa una inefficiente capacità killer.

Come riportato dal nostro gruppo, in collaborazione con Franco Locatelli (Roma), risultati di notevole rilievo sono stati ottenuti anche in leucemie pediatriche ad alto rischio con una sopravvivenza superiore al 70%<sup>(6,16)</sup>.

I nostri studi hanno anche permesso di identificare con precisione le popolazioni NK alloreattive grazie all'analisi al FACS dei recettori KIR espressi dalle cellule NK di potenziali donatori. La valutazione delle percentuali di cellule NK alloreattive si è dimostrata fondamentale per la selezione del donatore potenzialmente più idoneo. Abbiamo infatti potuto dimostrare che

- 1) popolazioni NK alloreattive originate dalle HSC del donatore si sviluppano nel ricevente e sono perfettamente funzionali e in grado di uccidere cellule leucemiche *in vitro*;
- 2) popolazione NK alloreattive del donatore sono riscontrabili nel ricevente anche a distanza di anni dal trapianto;
- 3) L'espressione di KIR attivatori in particolare KIR2DS1 (specifici per la specificità C2) può esercitare un effetto positivo e contribuire all'alloreattività delle cellule NK del donatore, a condizione che le cellule del paziente esprimano alleli HLA-C appartenenti alla specificità C2;
- 4) la percentuale di NK alloreattive correla direttamente con un risultato clinico favorevole.

Il trapianto aploidentico di HSC è oggi una opzione importante nella terapia delle leucemie acute ad alto rischio, soprattutto in pediatria. L'affinamento attuale dei nostri protocolli clinici ha come obiettivi principali:

- 1) l'annullamento del periodo "finestra" tra il trapianto di HSC e lo sviluppo di cellule NK alloreattive (6-8 settimane) mediante l'infusione simultanea di HSC e di cellule NK mature del donatore;

- 2) la protezione da gravi infezioni virali mediante l'infusione di cloni T virus-specifici. Grazie a questi approcci, i risultati clinici preliminari sono estremamente incoraggianti dovrebbero portare ad un ulteriore significativo miglioramento dei dati di sopravvivenza.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Aversa F, Tabilio A, Velardi A, Cunningham I, Terenzi A, Falzetti F, Ruggeri L, Barbabietola G, Aristei C, Latini P, Reisner Y, Martelli MF: *Treatment of high risk acute leukaemia with T-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype*. N. Eng. J. Med. 1998; 339: 1186-1193.
2. Brandt CS, Baratin M, Yi EC, Kennedy J, Gao Z, Fox B, Haldeman B, Ostrander CD, Kaifu T, Chabannon C, Moretta A, West R, Xu W, Vivier E, Levin SD: *The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans*. J. Exp. Med. 2009; 20: 1495-1503.
3. Ciccone E, Pende D, Viale O, Di Donato C, Tripodi G, Orengo AM, Guardiola J, Moretta A, Moretta L: *Evidence of a Natural Killer (NK) cell repertoire for (allo)antigen recognition: definition of five distinct NK-determined allospecificities in humans*. J. Exp. Med. 1992; 175: 709-718.
4. Ciccone E, Viale O, Pende D, Malnati M, Biassoni R, Melioli G, Moretta A, Long EO, Moretta L: *Specific lysis of allogeneic cells after activation of CD3- lymphocytes in mixed lymphocyte culture*. J. Exp. Med. 1988; 168: 2403-2408.
5. Ljunggren HG, Kärre K: *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition*. Immunol Today 1990; 11: 237-244.
6. Locatelli F, Pende D, Maccario R, Mingari MC, Moretta A, and Moretta L: *Haploidentical hemopoietic stem cell transplantation to treat high-risk leukemias: where NK cells can make the difference*. Clin. Immunol. 2009; 133: 171-178.
7. Long EO: *Regulation of immune responses through inhibitory receptors*. Annu. Rev. Immunol. 1999; 17: 875-904.
8. (4) Moretta A, Bottino C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L: *What is a Natural Killer cell?* Nat. Immunol. vol. 3: 6-8, 2002.

9. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari MC, and Moretta L: *Receptors for HLA-class I-molecules in human Natural Killer cells*. Annu. Rev. Immunol. 1996; 14: 619-648.
10. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Biassoni R, Mingari MC, and Moretta L: *Activating receptors and coreceptors involved in the Natural cytotoxicity*. Annu. Rev. Immunol. 2001; 19: 197-223.
11. Moretta A, Bottino C, Pende D, Tripodi G, Tambussi G, Viale O, Orengo A, Barbaresi M, Merli A, Ciccone E, Moretta L: *Identification of four subsets of human CD3-CD16+ NK cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules. Correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition*. J. Exp. Med. 1990; 172: 1589-1598.
12. Moretta A, Vitale M, Bottino C, Orengo AM, Morelli L, Augugliaro R, Barbaresi M, Ciccone E, Moretta L: *p58 molecules as putative receptors for MHC class I molecules in human Natural Killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities*. J. Exp. Med. 1993; 178: 597-604.
13. Moretta L, Ciccone E, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A: *Human NK cells: origin, clonality, specificity and receptors*. Adv. Immunol. 1994; (55): 341-380.
14. Moretta L, Ciccone E, Moretta A, Hoglund P, Ohlen C., Karre K: *Allorecognition by NK cells: nonself or no self?* Immunol. Today 1992; 13: 300-306.
15. Moretta L, Ferlazzo G, Bottino C, Vitale M, Pende D, Mingari MC, Moretta A: *Effector and regulatory events during Natural Killer-dendritic cells interactions*. Immunol. Rev. 2006; 214: 219-228.
16. Moretta L, Locatelli L, Pende D, Marcenaro E, Mingari MC, Moretta A: *Killer ig-like receptor-mediated control of natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation*. Blood 2011; 117: 764-771.
17. Pende D, Marcenaro S, Falco M, Martini S, Bernardo ME, Montagna D, Romeo E, Cognet C, Martinetti M, Maccario R, Mingari MC, Vivier E, Moretta L, Locatelli F, Moretta A: *Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and re-definition of inhibitory KIR specificity*. Blood 2009; 113: 3119-3129.
18. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassonni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A: *Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants*. Science 2002; 295: 2097-2100.
19. Trinchieri G: *Biology of natural killer cells*. Adv. Immunol. 1989; (47): 187-376.
20. Velardi A, Ruggeri L, Moretta A, Moretta L: *NK cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation*. Trends Immunol. 2002; 9: 438-444.

**PROGRESSO SCIENTIFICO E COSCIENZA NAZIONALE:  
LE RIUNIONI DEGLI SCIENZIATI ITALIANI IN ETÀ  
RISORGIMENTALE. LA LUNGA ATTESA DELLA MEDICINA**

*Alessandro Bargoni*

Dipartimento di Fisiopatologia Clinica  
Storia della Medicina  
Facoltà di Medicina e Chirurgia di Torino e di Novara  
Università degli Studi di Torino

Key words: *History of medicine / Storia della medicina*  
*Italian Risorgimento / Risorgimento italiano*  
*Science and National Development / Scienza e sviluppo sociale*

**Abstract:**

Initially the Restoration affected very modestly, through the purging of the technocratic elites' role that had been growing in number and importance in civil and military administrations of the State in previous periods. After the repressions of 1821-23, especially in Piedmont and in the kingdom of Naples, police measures got soured quite heavily, such as imprisonment, purges and exile, primarily affecting the roles of the most promising young officers and "élites savantes". Furthermore spending contraction and underfinanced research structures led to their removal and to the degradation of scientific and technological university education. This combination progressively led to a stagnation in science and the consequent absolute lack of initiative and cultural originality. Censorship and police state did not allow scientists to report the exact condition in which many areas of the country were. Anyway these testimonies became accurate and indicative immediately in the post unification period, covering retrospectively the most difficult years of the Restoration. This work focuses on these critical issues and allows, through the writings of distinguished scientists like Giovanni Battista Grassi, Corrado Tommasi Crudeli, Paolo Mantegazza, to pinpoint the causes of the enormous scientific delay in which Italy sank in the '60's. This scientific and technological delay made investment policies even harder, in order to allow to the new national Italian state to be able to confront itself with the other European powers.

**Riassunto:**

La Restaurazione inizialmente incise molto modestamente attraverso l'epurazione di ruoli delle élites tecnocratiche che erano andate crescendo di

numero e di importanza nelle amministrazioni civili e militari dello Stato nei periodi precedenti. Dopo le repressioni del 1821-23, specialmente in Piemonte e nel regno di Napoli, si inasprirono pesantemente le misure di polizia, con carcere, epurazioni ed esilio, colpendo principalmente i ruoli dei giovani ufficiali più promettenti e le *élites savantes*.

Inoltre contrazioni di spesa e sottofinanziamenti delle strutture dedicate alla ricerca, fino alla loro cancellazione, e l'avvilimento dell'insegnamento universitario tecnico-scientifico, condussero in breve tempo ad una stagnazione scientifica e all'assoluta mancanza di iniziativa e di originalità culturale.

La censura e lo stato di polizia non consentì agli scienziati del tempo di riferire con esattezza la condizione che si respirava in molte aree del Paese, tuttavia queste testimonianze divennero puntuali e indicative nel periodo immediatamente post-unitario, percorrendo retrospettivamente gli anni più difficili della Restaurazione.

Il presente lavoro mette a fuoco queste criticità e consente, attraverso gli scritti di insigni scienziati come Giovanni Battista Grassi, Corrado Tommasi, Crudeli, Paolo Mantegazza, di indicare nel dettaglio le cause del ritardo scientifico fortissimo in cui si trovò l'Italia negli anni '60. Il ritardo scientifico e tecnologico rese ancor più difficile la politica di investimenti e di crescita, per consentire al nuovo stato nazionale italiano di potersi confrontare con le altre potenze europee.

Secondo una storiografia un po' datata, risalente agli anni '80, viene assegnato alla prima metà dell'ottocento il primato di periodo meno fecondo della scienza italiana. Così lo storico Felice Mondella<sup>(23)</sup> sintetizzava il conformismo culturale e l'improduttività della ricerca scientifica nei vari campi del sapere nella prima metà dell'Ottocento.

Visioni più moderne colgono invece una continuità operativa tra *scientifiques*, e *savantes* addetti ai lavori delle scienze positive, che costituivano le fila del giacobinismo scientifico del primo periodo napoleonico con gli scienziati della Restaurazione. Si era determinata una spinta tecnocratica che aveva condotto un certo numero di medici, ingegneri, geologi e naturalisti all'assunzione di compiti nelle amministrazioni civili e militari dello Stato che crebbe progressivamente fino a raggiungere il momento di "maggior influenza" a ridosso della Restaurazione<sup>(12,16)</sup>.

La successiva epurazione di ruoli accademici e tecnici nell'amministrazioni statali durante le prime fasi della Restaurazione, sebbene con notevoli differenze nelle varie realtà italiane, non fu così marcata nei loro confronti tanto da consentire a questo costituito "nuovo potere" la conservazione di quell'affermazione borghese nel corpo delle monarchie restaurate.

Di ben diversa entità fu il prezzo pagato da queste *élites savantes* nella repressione del 1821-23, specialmente in Piemonte e nel regno di Napoli. Le politiche repressive, talvolta durissime, messe in atto dai governi, da un lato inasprirono le misure di polizia con carcere, epurazioni ed esilio, dall'altro rafforzarono il controllo sulle istituzioni culturali imponendo contrazioni di spesa, ridimensionamento delle strutture dedicate alla ricerca, fino alla loro cancellazione, avvilitamento dell'insegnamento universitario<sup>(11)</sup>.

Il livello scadente dell'insegnamento era condizione diffusa nelle Università del tempo tanto da far dire a Paolo Mantegazza, medico, antropologo risorgimentale formatosi alla grande scuola di Pavia, che "quanti erano gli stati d'Italia, altrettanti i centri di una confusa e oscura attività". Sebbene Mantegazza, tra i primi divulgatori del Darwinismo in Italia e giovanissimo protagonista delle cinque giornate di Milano, appartenesse già ad una generazione successiva a quella attiva negli anni '30, comunque visse ancora come studente a Pavia il periodo dell'amministrazione austriaca. In quegli anni nelle scuole di medicina i laboratori erano inesistenti, gli strumenti obsoleti e rari, il lavoro scientifico era condotto in sospettoso isolamento, senza scambi proficui di idee tra addetti ai lavori, per cui, ricorda Mantegazza, "a Milano si ignoravano affatto i libri scientifici che si pubblicavano a Napoli, e il poter avere un libro pubblicato a Palermo era cosa assai più difficile che averlo da Pietroburgo o da Londra".

Paolo Mantegazza ricordò il clima greve in cui aleggiava “una diffidenza dei Governi che ... calpestavano con lo zoccolo brutale del dispotismo ogni primo organizzarsi del pensiero o di scuole”<sup>(21,20)</sup>.

Italia, paese dalle antiche e radicate tradizioni scientifiche in cui, ancora per usare la metafora di Mantegazza: “Dalle radici robuste ... sorgevano qua e là getti vigorosi, che facevano pianta e fiore e frutto, ma non foresta”. Dunque grandi individualità in campo scientifico, ma l’assenza di lungimiranza politica, l’inesistenza di un disegno unitario di un paese diviso, non solo politicamente, ma anche antropologicamente, in cui si contavano, per continuare ad utilizzare le parole del grande fisiologo e antropologo milanese, “parecchi scienziati e di primo ordine, ... ma nessuna luce di scienza, che fosse ambiente della nazione, che rischiarasse le turbe e i piccoli sentieri della vita”<sup>(20)</sup>.

L’impossibilità, negli Stati preunitari, della creazione di un sistema organizzato di ricerca e di studi o in altre parole della nascita di scuole, fu tra le cause principali del progressivo ritardo accumulato dalla medicina in Italia rispetto alle scuole europee francesi, tedesche, inglesi e financo svizzere. Solo la Spagna stava peggio di noi<sup>(2)</sup>.

Nel corso degli anni ‘30 il rinnovato, seppur timido, interesse dei monarchi italiani per la scienza, mosso da considerazioni utilitaristiche per i vantaggi che scienza e tecnologia potevano fornire alle iniziali industrializzazioni delle deboli economie dei loro Stati, determinò politiche di maggior aperture verso il sapere e una rivalutazione delle posizioni tecnocratiche. Leopoldo II di Toscana, che aveva sempre manifestato un certo grado di mecenatismo e sostegno alle iniziative scientifiche, seppur nei limiti di intervento concessi dall’Austria, determinò di promuovere l’incontro degli scienziati italiani nei suoi territori.

La recente opera sui Congressi degli scienziati italiani di Maria Pia Casalena ha delineato le caratteristiche scientifiche e sociali dei partecipanti a questi congressi che si susseguirono a scadenza annuale e che accompagnarono l’Italia fino agli esordi delle campagne risorgimentali. Ne ha anche individuato i caratteri delle novità scientifiche e gli elementi di spinta al progresso conoscitivo e tecnologico in alcune discipline ma ha anche sottolineato, a grandi linee, l’immobilismo della medicina ancora legata alla ricerca dei principi primi delle patologie ancora estranea alla ventata di rinnovamento positivo che aveva investito altre discipline scientifiche<sup>(13)</sup>.

All’appuntamento dei Congressi degli Scienziati italiani la medicina si presentò ricoprendo un ruolo di primo piano per numero di partecipanti e importanza di figure chiamate a rappresentarla, tuttavia essa non poteva nascondere la debolezza intrinseca della sua impalcatura scientifica<sup>(18)</sup>.

Nei vent'anni precedenti, la medicina italiana era andata incontro ad una sorta di cortocircuitazione tra i vari sistemi dogmatici caratterizzati dal braunismo e dal rasorismo. Protagonista di questo periodo fu Giacomo Tommasini, che dagli inizi dell'ottocento intraprese la riorganizzazione di questi dottrine attraverso un gioco complesso di ricomposizione delle questioni discordanti tra sistemi contrapposti e dell'assimilazione dell'infinite congerie di diatesi, di flogosi e di infiammazioni, in una nuova dottrina: la Nuova Dottrina Medica Italiana. Il riferimento alla tradizione culturale nazionale rappresentò un forte richiamo – e un implicito inganno – per una classe medica, che nel corso del ventennio precedente aveva accusato una perdita di ruolo sociale, e che ora avvertiva un distacco progressivo dalla cultura scientifica europea<sup>(15)</sup>.

Dal I al IX congresso, l'ultimo prima dell'unità d'Italia, nell'ambito delle sezioni di Medicina si manifestò palese quel grado di ambiguità proprio della medicina italiana, che fu presente fino alla sua evoluzione nella medicina sperimentale, da un lato trattenuta dall'adesione dottrinale prudente alla medicina dei sistemi e dall'altro già sospinta verso tentazioni sperimentalistiche e interpretazioni positive fisico-chimiche.

Se la storiografia generale solo in tempi relativamente recenti si è interessata sistematicamente di queste forme collegiali della circolazione scientifica, mettendone in luce soprattutto gli aspetti politici risorgimentali, tuttavia quella storico-medica non ne ha ancora approfondito a fondo l'aspetto epistemologico e le dinamiche scientifiche proprie di queste riunioni. I temi che furono dibattuti nel corso delle nove edizioni dei Congressi, furono numerosi, comunque non innumerevoli. Infatti molte volte si ritornò sul medesimo argomento nel corso di svariate edizioni congressuali successive<sup>(3,6,9,4,5,7,6,2,1)</sup>.

Uno dei temi più longevi fu il dibattito, limitatamente agli aspetti medici, del sistema carcerario ideale, da individuare tra il sistema filadelfiano dell'isolamento continuo, diurno e notturno, causa di un elevato numero di patologie psichiatriche e di mortalità, e quello oburniano che imponeva l'isolamento notturno, ma consentiva il lavoro diurno in comune, sempre con l'obbligo rigoroso del silenzio. Il carcere poi come luogo di diffusione di patologie fu ripetutamente oggetto di studi.

Ad esempio al VI congresso di Milano nel 1844 il medico piemontese Carlo Novellis indagò l'elevata incidenza nel carcere di Alessandria di casi di "scorbuto di terra". Il dibattito che prese corpo nell'aula del congresso può essere preso come esempio in chiave ermeneutica di una medicina dei sistemi dotata di una sua competenza, corredata da architettura logica, e dunque non una semplice pratica cialtronesca di mistificatori come forse l'eredità di una lettura storica positivista ci ha talvolta abituati sbrigativamente a considerare.

Per mezzo di uno dei pochi strumenti d'indagine scientifica concesso dalla medicina dei sistemi, cioè l'analisi statistica, il Novellis dimostrò, contro l'opinione consolidata della dottrina, che la malattia non era contagiosa ed essa si giovava più che di farmaci, dell'assunzione di vegetali crudi e di insalate. Acquisizioni peraltro già fatte dal medico della marina inglese James Lind per lo "scorbuto marino" a metà settecento, che tuttavia furono prese in considerazione dell'Amministrazione, solo nei primi anni dell'Ottocento. La nosografia della medicina dei sistemi poi inquadrava questa malattia tra le irritative e quindi da trattare con salasso. La comparazione statistica effettuata dal Novellis tra la mortalità del gruppo trattato con salasso e il gruppo senza salasso, mostrò una sopravvivenza dieci volte maggiore nel secondo.

Con l'allargarsi del dibattito all'intervento ad altri medici, vennero rappresentate altre aree di disagio sociale in cui regnava la denutrizione e imperversava lo scorbuto, quali i ricoveri di mendicanti e gli ospizi di trovatelli di altre città italiane, e venne messo a fuoco come fosse utile associare alla dieta variata con vegetali, una terapia con il ferro.

Sicché alla fine della discussione si ricompose il quadro eziologico e terapeutico della malattia e ciò che ne emerse fu una visione approssimata con un certo grado di verosimiglianza rispetto alla realtà della prassi moderna. Malattia carenziale, accompagnata da anemia per deficit di assorbimento del ferro, ancor oggi diffusa nelle sacche di povertà e di emarginazione delle società occidentali<sup>(19)</sup>.

Altro tema costantemente trattato in tutti i nove Congressi fu quello delle malattie infettive i cui confini nosografici risultano quanto mai labili e assai spesso confusi. Dalla peste, alla tisi, alla scabbia, al tifo petecchiale, alla scrofola, al vaiolo con la sua profilassi, alla sifilide, e così via. Su queste malattie in particolare gravava un blocco epistemologico che limitò drammaticamente le capacità operative della medicina prima della scoperta dei batteri e la nascita della batteriologia.

Regnava per queste malattie una grande farragine eziologica che conduceva frequentemente a gravi confusioni; ad esempio scrofola e sifilide spesso erano scambiate tra loro in virtù di alcuni aspetti clinici simili tanto da considerare la scrofola, o adenite tubercolare, come vera e propria variante clinica della sifilide.

Così per la lebbra che anch'essa era considerata talvolta come una forma clinica di sifilide non a trasmissione sessuale, o la miliare tubercolare considerata una malattia esantematica affine al tifo petecchiale, assai grave, tuttavia ritenuta non collegata alla tubercolosi benché se ne osservassero le

lesioni anatomopatologiche degli organi interni caratterizzate da tubercoli identici a quelli della tisi.

In questa visione confusa di cause, concause ed effetti entra anche la pellagra la cui eziologia per lungo tempo rimase in bilico tra malattia contagiosa o ereditaria o da intossicazione.

Esperienza, osservazione, e da qualche tempo, l'introduzione della statistica furono i determinanti che guidarono la ricerca nel campo della clinica pre-sperimentale, regno dei "pratici".

Separate dalla clinica, seppur sempre nell'ambito vasto della medicina, la chimica, la fisica e la fisiologia sperimentale, invece in Francia e in Germania avevano già incominciato a dissodare il terreno su cui costruire le basi scientifiche di quella medicina che di lì a poco sarebbe diventata sperimentale e finalmente si sarebbe fatta scienza.

In questo campo come abbiamo detto l'Italia procedette a rilento. Tuttavia a partire già dal III congresso di Firenze del 1841 si incominciò a sentir parlare di sperimentalismo e di metodo causale. Per primo ne parlò il napoletano Giovanni Semmola con un discorso complesso, sostanzialmente abbastanza confuso, in cui abbracciò patologia, terapia e farmacologia, e in cui si udirono forse più intenzioni di metodo che descrizioni di fatti concreti. Semmola dichiarò di rigettare la fisiopatologia dello stimolo e del controstimolo per abbracciare una visione anatomo-clinica, in cui i sintomi dovevano essere collegati alle patologie in modo inequivocabile e diretto. Altrettanto il farmaco doveva essere individuato in base ad una azione misurabile negli effetti fisiologici e terapeutici.

Può sorprendere che il presidente della sezione di Medicina di quel Congresso, Maurizio Bufalini figura di primo piano degli albori medicina italiana ad indirizzo scientifico, non intervenisse in occasione del discorso di Semmola o anche in altre occasioni in cui si agitavano le novità della fisiopatologia o delle scienze positive applicate alla clinica. Egli fu molto attento a non esprimere mai un suo giudizio personale.

Bufalini, ricordiamolo, fu un vero antesignano del metodo sperimentale nello studio della patologia perseguendo una visione meccanicistica e materialista della vita che illustrò giovanissimo nel "Saggio sulla dottrina della vita" concepito durante i suoi studi a Pavia e pubblicato nel 1813, che appena uscito prudentemente egli ritirò dal commercio. In questa opera, in cui è possibile scorgere una prima intuizione del naturalismo e del monismo in medicina, spicca il rigore logico presente in tutte le sue parti. Si trattò di un'opera importante in se e per i riflessi che produrrà sull'indirizzo scientifico della scuola clinica di Firenze. Il metodo sperimentale introdotto da Bufalini

si pose in aperta rottura con la concezione omologata e diffusa, vitalista e dualista, dei clinici suoi contemporanei. Egli fu guardato allora con molto sospetto per le sue posizioni ideologiche.

Come ricorda ancora il Mantegazza “contro di lui si schierarono non soltanto i medici ma anche i preti che dichiaravano le sue dottrine aprire la strada all’ateismo ed al materialismo”. Non deve quindi stupire la prudenza di Bufalini, e di altri come lui nel manifestare idee pericolose, che ben sapevano come i Congressi fossero frequentati da numerose spie ed emissari delle cancellerie di molti stati<sup>(17)</sup>.

A partire dal VI Congresso di Milano del 1844 fu possibile osservare un timido progressivo spostamento di interesse verso tematiche più positive come dimostrò la memoria di Pietro Lazzati, primario ostetrico a Milano, già assistente della clinica ostetrica di Pavia, che trattò dell’uso dello stetoscopio nelle diagnosi di multiparità nelle gravide. Una proposta di allargamento all’impiego diagnostico-semeiotico del tubo di Laennec. In realtà questo lavoro non era altro che la riproposizione di un vecchio tema già pubblicato 15 anni prima dalla scuola ostetrica ticinese da lui frequentata negli anni ‘30.

Più apertamente la parola positivismo, come programma d’azione, venne pronunciata per la prima volta nei congressi italiani, nel discorso inaugurale della sezione di medicina del Congresso di Napoli nel ‘45 da Vincenzo Lanza, che tuttavia l’agitò più come proposito di modernità che come strumento quotidiano di indagine scientifica.

Tuttavia in quel congresso incominciarono ad essere trattati nella sezione di medicina temi più moderni, come quelli relativi alla struttura istologica delle membrane mucose, dal giovanissimo Giustiniano Nicolucci, o della struttura istologica dei denti dall’anatomico e chirurgo palermitano Giovanni Gorgone, o ancora dell’uso dello stetoscopio nella diagnosi precoce della tubercolosi miliare polmonare da Dario Battaglia allievo di Bufalini nell’ospedale Santa Maria Novella. Timidi passi verso un affrancamento dalla medicina dogmatica dei sistemi<sup>(10)</sup>.

Tra i temi trattati nella sezione di medicina dei due ultimi congressi, prima dell’Unità d’Italia, si incominciò a verificare una certa ricorrenza di temi omogenei legati principalmente all’indagine istologica, preludio a successive trattazioni più sistematiche, a comunicazioni di indagini di chimica organica su argomenti settoriali, come ad esempio le caratteristiche dei pigmenti ematici, la loro affinità chimica con quelli biliari, o qualche studio sulla trasformazione dei glicidi nel diabete.

Si avvertirono poi a partire dal congresso di Genova del 1846 i fortissimi echi prodotti dalla pubblicazione del testo di Justus Liebig intitolato «La Chimica

degli animali o la Chimica Organica nella sua applicazione alla fisiologia e la patologia» pubblicato nel 1842. La prima traduzione italiana ad opera di Dorotea e La Cava uscì l'anno dopo. Questa opera che segnò profondamente la cultura scientifica del tempo mise in evidenza definitivamente il distacco notevolissimo tra la fisiologia e la chimica tedesche applicate alla medicina e la scienza medica italiana<sup>(24)</sup>.

All'approssimarsi della metà del secolo la medicina italiana tra ristrettezze di vedute, esiguità di finanziamenti, impacci per le limitazioni della libertà non riuscì ad esprimere originalità scientifiche. Le sue immiserite condizioni istituzionali e didattiche interagirono circolarmente con quelle pratiche e scientifiche determinando un decadimento progressivo.

Realtà ben diversa per altre nazioni europee, come la Prussia che fin dagli anni '20 incominciò ad utilizzare scienza, tecnologia e industria come elementi cardine delle sue politiche espansionistiche e di predominio.

A questo quadro italiano si aggiunse un altro fattore di perturbazione delle attività istituzionali e didattiche – di cui dicevo prima – a partire dall'ultimo decennio che precedette l'Unità italiana. I ceti borghesi, giovani intellettuali, uomini di cultura e di scienza, furono fortemente toccati sul piano ideale e personale dal processo politico e militare del Risorgimento.

Si venne a creare, soprattutto nelle generazioni dei più giovani, un *déplacement* degli interessi primari verso temi idealistici e politici.

Questo clima fu perfettamente reso dalle parole pronunciate da Matteucci, il più quotato fisiologo italiano del tempo, accreditato negli ambienti scientifici internazionali, nella sua prolusione ai corsi di Medicina nell'università di Pisa nell'ottobre del '47.

Fu un accalorato appello all'azione rivolto ai giovani a favore degli ideali di unità politica a cui Matteucci ricordò che “in mezzo agli urti delle varie parti di una nazione che risorge, dobbiamo prendere il posto che ci conviene”. Sebbene Matteucci vivesse la consapevolezza che la politica e la mobilitazione distraevano dal compito scientifico ed erano causa di ulteriore ritardo dell'Italia in questo campo, vi fu però nelle sue parole, la consapevolezza che questo era il prezzo necessario da pagare in quel momento, per creare le condizioni per ottenere una futura “*revanche*” “non ci sgomenti questa necessità temporaria, certi che verrà il giorno in cui sapremo riguadagnar per la scienza il tempo che consacriamo ora alle cose pubbliche”<sup>(22)</sup>.

Con la medesima consapevolezza di Matteucci e forse con maggior amarezza, causata dal difficile ricomponimento del quadro sociale, politico ed economico dell'Italia nel primo decennio post-unitario, nel 1871, Corrado Tommasi-Crudeli, patologo, istologo, igienista toscano, ma anche volontario

garibaldino, combattente, medaglia d'argento al Valor Militare, ferito durante l'azione in battaglia, asserì che il prezzo pagato fu assai alto: “La miglior parte della nostra vita si è spesa nelle lotte militari e politiche, che hanno condotto al rinnovamento italiano ... e quasi nessuno di noi ha fatto per la scienza quello che forse in un tempo e in condizioni diverse avrebbe potuto fare”<sup>(14)</sup>.

In un quadro di stagnazione provocato da una medicina dogmatica in balia di dottrine e antidottrine più vicina idealmente al XVIII secolo che alla scienza del XIX, sembrano inutili i traguardi individuali conquistati da alcuni grandi nel corso della prima metà dell'Ottocento, e non sufficienti a determinare una spinta per la crescita.

Questo concetto fu espresso da Giovanbattista Grassi nelle conclusioni della sua opera retrospettiva dei “Progressi della biologia e della medicina negli ultimi cinquanta anni”, in cui scrisse “... evidentemente, tanto slancio, tanta energia, tanta opera sono cresciuti sopra un terreno che, negli anni precedenti il nostro Risorgimento era stato insterilito dai malgoverni, e in una atmosfera sfavorevole, cioè in mezzo a gravi perturbazioni politiche e a penosissime angustie finanziarie”<sup>(20)</sup>.

Queste parole riprendono i concetti che Tommasi Crudeli, ex deputato al Parlamento italiano, espresse con chiarezza e con forza, nell'epistolario con il torinese Giacomo Dina nel 1876, influente Direttore del giornale liberale l'Opinione e anch'egli con una ragguardevole carriera di deputato alle spalle, quale sintesi del travaglio risorgimentale e delle condizioni dell'insegnamento universitario e della scienza nell'Italia unita. Tommasi Crudeli, da uomo di scienza aveva chiara la consapevolezza dell'enorme debito di conoscenza in campo biologico e medico, ereditato dall'Italia che graverà sulla politica della cultura scientifica dei futuri governi italiani, chiamati a trovare le risorse e a mettere in opera, senza indugi, le misure idonee ad estinguerlo<sup>(25)</sup>.

## BIBLIOGRAFIA

1. *Atti del decimo Congresso degli scienziati italiani: tenuto in Siena nel settembre del 1862*. Stab. tip. di A. Mucci, 1864, Siena.
2. *Atti della ottava Riunione degli scienziati italiani: tenuta in Genova dal XIV al XXIX settembre MDCCCXLVI*. Tip. Ferrando, 1847, Genova.
3. *Atti della prima Riunione degli scienziati italiani: tenuta in Pisa nell'ottobre del 1839*. Tip. Nistri, 1840, Pisa.
4. *Atti della quarta Riunione degli scienziati italiani tenuta in Padova nel settembre del MDCCCXLII*. Tip. del Seminario, 1843, Padova.
5. *Atti della quinta Unione degli scienziati italiani tenuta in Lucca nel settembre del MDCCCXLIII*. Tip. Giusti, 1844, Lucca.
6. *Atti della seconda Riunione degli scienziati italiani tenuta in Torino nel settembre del 1840*. Tip. Cassone e Marzorati, 1841, Torino.
7. *Atti della Sesta Riunione degli scienziati italiani tenuta in Milano nel settembre del 1844*. Luigi di Giacomo Pirola, 1845, Milano.
8. *Atti della settima Adunanza degli scienziati italiani : tenuta in Napoli dal 20 di settembre a' 5 di ottobre del MDCCCXLV*. Stamp. del Fibreno, 1846, Napoli.
9. *Atti della terza Riunione degli scienziati italiani tenuta in Firenze nel settembre del 1841*. Tip. Galileiana, 1841, Firenze.
10. Battaglia D: *Memoria relativa alle aggiunte e modificazioni fatte allo stetoscopio dal Dott. Dario Battaglia, letta nell'Accademia Fisico-Medica di Firenze nella tornata del 20 febbraio 1842*. T. Angiolo Soliani, 1842, Firenze.
11. Bonghi R: *L'Università italiana*. In: Studi di R. Bonghi, 1866: 86-144, Tip. Cavour, 1866, Firenze.
12. Cappelletti V: *La scienza italiana tra 1830 e 1850: persone, istituzioni, problemi*. In: L'Italia tra rivoluzioni e riforme: 1831-1846. Atti del 56° Congresso di storia del Risorgimento italiano: Piacenza: 15-18 ottobre 1992, 1994: 113-127, Istituto per la storia del Risorgimento italiano, Roma.
13. Casalena MP: *Per lo Stato, per la Nazione: i congressi degli scienziati in Francia e in Italia, 1830-1914*. Carocci, 2007, Roma.
14. Celli A: *In morte di Corrado Tommaso Crudeli*. Tip. Nazionale, 1900, Roma.
15. Cosmacini G: *Dalla preunitaria medicina degli scienziati alla scienza medica dell'Italia unita*. In: Storia della medicina e della sanità in Italia. 1994: 311-330, Editori La Terza, Bari.
16. Della Peruta F: *Aspetti della società italiana nell'Italia della Restaurazione*. In: Studi Storici". 1976: 27-68, Ed. Fondazione Istituto Gramsci, Roma.
17. Grassi B: *I progressi della biologia e delle sue applicazioni pratiche conseguiti in Italia nell'ultimo cinquantennio*. Tipografia della R. Accademia dei Lincei, 1911, Roma.
18. Hortis A: *Le riunioni degli scienziati italiani prima delle guerre dell'indipendenza: 1839-1847*. Ed. Leonardo Da Vinci, 1922, Città di Castello.

19. Liebig J: *Miscellanea, contenente la chimica organica applicata alla fisiologia animale ed alla patologia, traduzione di Lionardo Dorotea e Pasquale La Cava con note*. Tipografia di Nunzio Pasca, 1843, Napoli.
20. Mantegazza P: *Dell'ordine nella scienza. Discorso inaugurale letto il 15 novembre 1862 nella solenne apertura dell'Università di Pavia dal professore Paolo Mantegazza*. Ed. Fratelli Fusi, 1862, Pavia.
21. Mantegazza P: *Ricordi politici di un fantaccino del parlamento italiano*. Ed. Bemporad, 1897, Firenze.
22. Matteucci C: *Prolusione di Carlo Matteucci professore di fisica nella I. e R. Università di Siena*. Tipografia Nistri, 1847, Pisa.
23. Mondella F: *Scienza e tecnica in Italia nella prima metà dell'Ottocento*. In: Nuove questioni di storia del Risorgimento e dell'Unità d'Italia. 1969: 649-674, Tip. Marzorati, Milano.
24. Novellis C: *Osservazioni sugli scorbutici*. In: Atti della Sesta Riunione degli scienziati italiani tenuta in Milano nel settembre del 1844, 1845: 964-701. Ed. Luigi di Giacomo Pirola, Milano.
25. Tommasi-Crudeli C: *Le Università in Italia: lettere del deputato Corrado Tommasi-Crudeli all'onorevole deputato Dina*. Tip. dell'Opinione, 1876, Roma.

## GLI SCIENZIATI ITALIANI A CONGRESSO PRIMA DELL'UNITÀ

*Sandro Potecchi*

Istituto per le Macchine Agricole e Movimento Terra  
Consiglio Nazionale delle Ricerche

Key words: *Italian Scientist in Congress / Scienziati Italiani a Congresso  
Congresses before the Unity / Congressi prima dell'Unità  
Congresses structure / Struttura dei Congressi*

**Abstract:**

Nine Congresses for Italian Scientists, based on the example of other European countries, were organised in Italy between 1839 and 1847, in the same number of cities on the peninsula (Pisa, Turin, Florence, Padua, Lucca, Milan, Naples, Genoa and Venice). They involved more than six thousand people – approximately one thousand of whom were foreigners – including academics, university professors, specialists and representatives of public institutions and technical, administrative and military organisations of the eight Italian states.

During the course of two weeks of meetings, the participants – who reached a peak of 1613 in Naples – discussed various topics related to the Natural Sciences, in the strictest sense of the phrase, including medicine and agriculture.

These meetings offer a comprehensive and precise panorama of the development of science in Italy in the 19<sup>th</sup> century, chronicling the scientific evolution of the age, the result also of the exchanges and debates which they made possible. In said Congresses, the specific demands of scientific research were combined with those of economic development and intertwined with the still rather confused feelings of national unity, as decalred by the growing ranks of “scholars” bound by a fervent love for the Italian motherland.

In 1847 in Venice, on the occasion of the ninth Congress, the references to “*nostra Italia*” were so explicit they led to the early closing of proceedings due to the forceful intervention of the Austrian police.

In 1861, with the first stage of the Unity of Italy underway, a vain attempt was made to resurrect the aforementioned travelling Congresses, revitalising them with the addition of humanistic themes. The one in Siena, in 1862, was a clear failure. This was somewhat predictable, given that the Unity had removed the obstacles that prevented such meetings and which – at the same time – provided a powerful and uncontrollable stimulus to hold them.

**Riassunto:**

Nove sono stati i Congressi degli Scienziati Italiani che, sull'esempio di altri Paesi europei, furono organizzati in Italia dal 1839 al 1847, in altrettante città della penisola (Pisa, Torino, Firenze, Padova, Lucca, Milano, Napoli, Genova e Venezia). Essi coinvolsero più di seimila persone – di cui circa mille straniere – tra accademici, docenti universitari, professionisti, esponenti di istituzioni pubbliche e di apparati tecnici, amministrativi e militari degli otto Stati italiani.

Nel corso delle due settimane di incontri, i partecipanti – che raggiunsero la punta massima di 1613 a Napoli – discussero su vari argomenti relativi alle Scienze Naturali, intese nel loro più stretto significato, medicina e agricoltura incluse.

Tali Riunioni offrono un panorama ampio e preciso dello sviluppo della scienza nell'Italia dell'800, storicizzando l'evoluzione scientifica dell'epoca, frutto anche degli scambi e dei dibattiti che esse resero possibili. In detti Congressi, le esigenze proprie della ricerca scientifica si uniscono con quelle dello sviluppo economico e si intrecciano con i sentimenti, ancorché confusi, di unità nazionale, declinati da schiere crescenti di "dotti" legati da un fervente amore per la Patria italiana.

A Venezia, nel 1847, in occasione del nono Congresso, i riferimenti alla "*nostra Italia*" furono talmente espliciti da determinare la chiusura anticipata dei lavori per il brusco intervento della polizia austriaca.

Nel 1861, attuata la prima fase dell'Unità d'Italia, si tentò invano di riesumare i Congressi itineranti anzidetti, rivitalizzandoli con l'aggiunta delle tematiche umanistiche. Quello di Siena, del 1862, ebbe un chiaro insuccesso. Fatto alquanto prevedibile, essendosi dissolti con l'Unità, quegli impedimenti ad incontrarsi, che – nel contempo – ne avevano costituito stimolo potente ed irrefrenabile a farlo.

## INTRODUZIONE

Si ritiene, più che opportuno, doveroso ravvivare le ultime luci delle celebrazioni dei 150 anni dell'Unità d'Italia, con quelle palpitanti delle Riunioni degli Scienziati Italiani (1839-1847), che ne costituirono prodromo indiscusso e stupefacente. L'insieme di detti Congressi risultarono l'evento culturale più significativo del secolo, non soltanto per l'ampio ventaglio delle discipline trattate, ma per gli aneliti di libertà ed i fremiti di progresso, di cui – come si avrà modo di fare rilevare – furono costantemente permeati.

\* \* \*

Percorrendo la traiettoria del progresso, ci si imbatte inevitabilmente con le Accademie, a cui si deve lo sviluppo scientifico e tecnologico esploso al principio del XIX secolo. Il loro carattere elitario, però, le distaccava dal progresso della società contemporanea dovuto, non più ad un manipolo di scienziati, ma ad altri soggetti quali: professionisti, tecnici ed esperti provenienti da amministrazioni civili e militari. A queste Accademie stanziali, se ne aggiunsero di altro genere come la Società Italiana delle Scienze, detta dei XL, fondata nel 1782, dal matematico Lorgna, costituita da 40 membri, stabilmente residenti in differenti città d'Italia, che facevano confluire i loro lavori a Modena, ove era la segreteria.

Lo sviluppo tecnologico seguito alla prima rivoluzione industriale ed il rinnovato interesse per la scienza, manifestato negli ultimi anni dell'impero napoleonico, era proseguito anche durante la Restaurazione. Allo scopo di dibattere e confrontare i risultati scientifici, gli studiosi avevano dato vita a società scientifiche, quali: la *Chemische Gesellschaft* (Germania), la *Physical Society* (Gran Bretagna) e la *Société Chimique* (Francia).

La Confederazione Elvetica si dotò di una associazione per il progresso delle scienze, nettamente distinta dalle Accademie “tradizionali”, finalizzata ad aggregare specialisti di differenti discipline. La formula peripatetica, per l'effettuazione dei suoi congressi, venne inaugurata, nel 1815, con la nascita della *Société helvétique des Sciences Naturelles* (SHSN).

L'iniziativa fu imitata dal naturalista tedesco Lorenz Oken, che convocò a Lipsia, nel 1822, la prima riunione della *Gesellschaft deutscher Naturforscher und Ärzte* (GDNÄ). Seguì la Gran Bretagna dove, la *British Association for the Advancement of Science* (BAAS), organizzò a York, nel 1831, la prima adunanza avente come promotore il fisico David Brewster. Infine, nel 1833, venne istituita l'*Association française pour l'Avancement des Sciences*<sup>(13)</sup>.

Nella Penisola, si iniziò a parlare di tali congressi, allorché il primo fascicolo dell'*Antologia* (gennaio 1821) riportò il resoconto della sesta

adunanza ginevrina della SHSN. I legami del fondatore del periodico, Giovanni Pietro Vieusseux, con Ginevra da dove proveniva la sua famiglia, furono decisivi in questa scelta e quelle riunioni divennero oggetto di costante interesse per il gruppo di patrizi e di intellettuali toscani raccolti nel Gabinetto scientifico-letterario da lui istituito.

L'Associazione svizzera esaltava tutte le dimensioni e tutti gli attori del lavoro scientifico. E suscettibile, pertanto, di accogliere le nuove istanze del mondo accademico toscano, del patriziato fiorentino, nonché della borghesia livornese – in buona parte ebraica o protestante – ai quali essa avrebbe potuto meglio assicurare lo svincolarsi definitivamente da *élites* e Stato. L'*Antologia* parlò ancora delle riunioni svizzere nel 1823 e nel 1825.

Nel 1828, l'ingegnere e matematico inglese Charles Babbage, viaggiando in Italia, ebbe occasione di incontrare diversi uomini di scienza e di esporre al granduca Leopoldo II d'Asburgo-Lorena, il piano di una accademia europea.

Negli ultimi anni di vita, l'*Antologia* diede risalto a quanto avveniva nella Confederazione germanica (*Deutscher Bund*), auspicando un'analogia istituzione anche in Italia.

A darvi compiutezza sarà Carlo Luciano Bonaparte, principe di Musignano (1823) e poi di Canino (1840), figlio di Luciano fratello di Napoleone e marito della cugina Zenaide figlia di Giuseppe. Questi, nell'autunno del 1838, di ritorno dal congresso degli scienziati tedeschi a Friburgo, riuscì a convincere Leopoldo II sull'opportunità di indire, anche in Italia, dei congressi scientifici itineranti. Il Bonaparte aveva 35 anni e fama di eccellente botanico e zoologo. I viaggi lo avevano posto in relazione con i grandi nomi italiani ed europei, estraneo ai moti liberali godeva buoni rapporti con Gregorio XVI e non solo.

Nelle proposte avanzate a suo tempo dal Babbage e nell'attivismo del Bonaparte non si può non avvertire una remota ispirazione baconiana, enciclopedistica, paneuropea e forse un'eco massonica.

I promotori dell'impresa furono, oltre al Bonaparte, il marchese Vincenzo Antinori direttore del museo di Fisica e Scienze naturali di Firenze, il prof. Giovanni Battista Amici fisico e astronomo, il prof. Gaetano Giorgini provveditore generale dell'Università di Pisa, il prof. Paolo Savi naturalista all'Università di Pisa ed il prof. Maurizio Bufalini clinico e medico nell'Arcispedale di Firenze. Con l'apporto defilato del Vieusseux, i promotori provvidero ad inviare gli inviti – in due tempi, 28 marzo (I circ.) e 18 agosto (II circ.) – per il primo congresso, che si sarebbe svolto a Pisa nell'ottobre 1839<sup>(16)</sup>.

Con somma sorpresa e trepidazione della diplomazia reazionaria europea, alla metà di marzo del 1839 si spargeva la notizia che nel prossimo ottobre, per

concessione del Granduca di Toscana, si sarebbe riunito a Pisa un congresso di scienziati, prima assise scientifica italiana.

Ne dava notizia l'*Allgemeine Zeitung* del 17 marzo, in una corrispondenza da Roma del 2 marzo, prima ancora – quindi – che il primo invito ufficiale fosse diramato. L'indiscrezione, che mise a rumore i circoli diplomatici, fu ispirata con spregiudicata tempistica dal Bonaparte allo scopo di superare eventuali ripensamenti del Granduca sulla ortodossia della progettata riunione, alla quale davano serie garanzie i migliori scienziati dello studio pisano, anche se non tutti in odore di santità politica. Ritenendo impossibile convincere il governo di Toscana a ritornare sui suoi passi, la diplomazia predispose un sottile lavoro affinché i governi stranieri non permettessero o ostacolassero in tutti i modi di aderire e partecipare al convegno.

Il conte di S. Marzano, rappresentante sabauda a Firenze, nonché fedele interprete del pensiero notoriamente reazionario di Solaro della Margherita, primo ministro del re di Sardegna, facendo proprio il suggerimento del ministro austriaco conte Reviczky, si affrettò a denunciare al proprio governo il convegno come un'oscura macchinazione dei liberali. Il nuovo ministro sabauda, il Carrega, meno intransigente del S. Marzano ma sempre allineato alla politica austriaca, ispirata dal Metternich, inviava a Torino il 1° settembre 1839 il seguente dispaccio.

*“Le Docteur Buffalini, professeur de médecine à l’hôpital de Florence (dont ses principes libéraux sont généralement connus), est un des six signataires de l’appel adressé aux naturalistes italiens pour les engager à se rendre à la reunion de Pise, annex à una dépêche du 15 mars, en entretenant ses auditeurs des **maladies du coeur humain, fit tomber le discours sur celles causées par l’amour de la patrie** et... il deploya dans son allocution le libéralisme le plus effronté. Sa dissertation produisit un vif enthousiasme sur l’esprit de ses jeunes écoliers...”<sup>(14)</sup>.*

Gli Asburgo d'altra parte avevano ospitato, nel 1832, a Vienna il Congresso della (GDNÄ) ed autorizzato, nel 1837, quello di Praga. Quindi l'Austria poteva permettersi di patrocinarne uno analogo nella Penisola. Placatasi l'ostilità di Vienna, per l'intermediazione granducale, rimase l'opposizione del re delle Due Sicilie Ferdinando II di Borbone e quella ancor più becera del duca di Modena Francesco IV d'Austria-Este (ritorsioni su eventuali partecipanti). Resisteva il clima di diffidenza da parte del Vaticano, avendo il Granduca rifiutato di reintegrare i beni ecclesiastici alienati nel periodo napoleonico.

## I CONGRESSO – Pisa, 1-15 ottobre 1839

*Li uomini poi che 'ntorno erano sparti  
s'accolsero a quel luogo, ch'era forte* (Inf. XX, 98,99)

a Pisa, città illustre per storia e cultura (*sufficit* riandare a Fibonacci e Galilei) e splendida per monumenti.

Ad accogliere i convenuti provvide una Giunta di Professori che li muniva di un lasciapassare – costituito da un biglietto rosso -, se ammessi a pieno titolo quali “membri del congresso” oppure un biglietto celeste se “amatori”.

Presidente generale fu il prof. Ranieri Gerbi, decano dell'Università di Pisa ed il prof. Filippo Corridi Segretario generale.

I congressisti furono 421 (Figura 1); le Deputazioni 17 di cui 2 straniere.

Tra i convenuti spiccavano: lo storico della scienza Vincenzo Antinori, l'abate Pietro Configliacchi e, tra gli stranieri, il naturalista svizzero Lorenz Oken.

Il primo giorno fu dedicato ad un solenne ufficio religioso nella primaziale della città, anche se l'iniziativa era stata avversata da alcuni scienziati (Gerbi e Paolo Savi, in particolare) e dalla Curia locale allineata con le autorità centrali.

Il 2 ottobre, gli scienziati risolsero la *vexata quaestio* della classificazione delle scienze naturali, adottando sostanzialmente le sezioni stabilite dai tedeschi, per i loro congressi. I lavori - e così pure quelli delle altre 5 successive riunioni - si articolano in 6 sezioni. Il settimo congresso (Napoli 1845) vide poi l'introduzione di anatomia e archeologia con l'incremento delle sezioni a 9, come qui riportato: Agronomia e Tecnologia; Medicina; Chirurgia e **Anatomia**; Fisica e Matematica; Chimica; Mineralogia e Geologia; Geografia e **Archeologia**; Botanica e Fisiologia vegetale; Zoologia, Anatomia comparata e Fisiologia<sup>(1)</sup>.

Venne distribuita ai convenuti la guida storico-artistica della città, nonché la medaglia di bronzo, coniata per l'occasione, avente nel dritto il busto di Galileo.

Prassi che verranno seguite anche nelle riunioni successive.

Infatti, in ogni sede si andò a gara per accogliere i congressisti nel modo più cordiale e festoso. Si provvide all'apertura – anche serale – di palazzi aristocratici e di biblioteche, all'organizzazione di armoniosi concerti musicali, di balli, di regate storiche (a Pisa e Venezia) e di escursioni, nonché al ricorso ad eleganti ornamenti floreali e ad omaggi poetici.

La città che, nel Palazzo dell'Università detto la Sapienza, aveva eretto per sovrana munificenza e volontarie oblazioni una statua di Galileo, provvide

ad inaugurarla con un applaudito discorso alquanto diplomatico del prof. Giovanni Rosini. Infine, sempre alla Sapienza, venne posta, una lapide a perenne ricordo dell'avvenimento.

Il terzo giorno vide la prima Adunanza generale, alla presenza di varie Autorità governative, ecclesiastiche e municipali, con l'allocuzione del Presidente che, evocate le glorie del Granducato ed i meriti dei suoi scienziati, passò ad illustrare quanto Galileo, Torricelli, Viviani, Redi, Bagalotti e molti altri diffusero luce in Europa. Aggiunse, che anche l'agricoltura non ebbe sorte dissimile non avendo deviato dall'insegnamento del Crescenzo e potuto contare su insigni cultori quali: il Dandolo, il Re, il Targioni, l'Acerbi ed il Lambruschini.

Il Bonaparte, prospettò: *“che la riunione avesse luogo da qui a 2 anni a Firenze e l'anno prossimo a Torino”*. Proposta subito sanzionata dal Presidente.

Il principe di Musignano ignorando quanto da lui sottoscritto agì da padrone, sicuro di poter guidare il consesso a proprio piacimento. Ciò destò una diffusa reazione negativa tra gli scienziati – che, in buona fede, lavoravano per i loro ideali scientifici, facendo tacere i sentimenti più intimi e palpitanti – e fece emergere l'innato sentire italiano insofferente alle illegittime introduzioni ed avverso allo spadroneggiamento dei napoleonidi che, con l'intrigo, cercavano di legare la sorte dei futuri congressi alla loro persona. Invero ci riuscirono, ma accrebbero soltanto antipatia verso di loro.

Alla sera del 4 ottobre giunse a Pisa il Granduca per seguire più da vicino il congresso. Il giorno successivo onorò del suo intervento le Sezioni di zoologia e di medicina e si degnò di chiamare alla regale mensa gli “Ufficiali” ossia, il Presidente ed il Segretario generali, nonché i Presidenti ed i Segretari di Sezione.

Da ogni parte pervennero lettere, libri e manoscritti; cosa che diede nuovo impulso ai lavori che, in più di una occasione, andarono oltre le due ore previste. Le donazioni andarono via via crescendo nei congressi successivi.

Si provvide alla stampa di un “Manifesto della I riunione degli Scienziati italiani” dove vi campeggia il Granduca Leopoldo, in alta uniforme ed a cavallo, contornato da figure allegoriche di circostanza e dall'elenco degli intervenuti.

Il 15 ottobre si tenne l'ultima Assemblea generale, alla presenza del Granduca, in cui il prof. Filippo Corridi, facendo un rapido consuntivo dei lavori, così esordì: *“Quanto io narrerò... stimo che sarà insieme argomento dilettevole per gli Italiani tutti a' quali ogni cosa che torni a onore della Patria, che ci è comune, deve e per sentimento e per debito riuscire carissima”*<sup>(1)</sup>.

Alla chiusura dei lavori del Congresso, si procedette alla accurata redazione degli Atti – e così pure per le riunioni successive - che furono puntualmente recapitati a tutti i convenuti nell'estate successiva.

## II CONGRESSO – Torino, 15-30 settembre 1840

La proposta avanzata dal Bonaparte, a Pisa, in palese violazione del regolamento suscitò, vivaci proteste, ma il pronto invio a Torino di un corriere per chiedere al re di Sardegna il permesso, portò alla ratifica della decisione.

Re Carlo Alberto – intimamente *obtorso collo* – acconsentì, allettato dalla opportunità di accreditarsi l'immagine di mecenate scientifico, che la riunione si tenesse a Torino – e così pure l'ottava del 1846 a Genova –, ma ordinò alla polizia di schedare tutti i partecipanti e pose la condizione che le discussioni fossero prive di qualsiasi tendenza politica, cosa del tutto intollerabile nel suo Stato<sup>(17)</sup>.

Presidente generale fu il conte Alessandro di Saluzzo, ministro del Regno e presidente della R. Accademia delle Scienze, coadiuvato dal prof. Giuseppe Gené, zoologo e direttore del Museo di Scienze Naturali di Torino, in qualità di Segretario generale.

I convenuti furono 573 (Figura 1); le Deputazioni 19 di cui 4 straniere.

Tra i congressisti: il matematico ed astronomo Giovanni Plana, il botanico Giuseppe Giacinto Moris, il geologo Lorenzo Pareto, il fisico chimico Amedeo Avogadro di Quaregna, l'agricoltore Emilio Bertone di Sambuy ed il chirurgo Alessandro Riberi. Tra gli stranieri, il matematico ed ingegnere Charles Babbage, il cui progetto di macchina di calcolo suscitò gli entusiasmi del fisico Fabrizio Ottaviano Mossotti e del giovane Luigi Menabrea.

Integrando l'elenco dei congressisti, riportato negli Atti, relativamente ai 148 accademici italiani presenti, si è pervenuti a stabilire che la R. Accademia delle Scienze di Torino era rappresentata da ben 66 soci, l'I. e R. Accademia dei Georgofili di Firenze da 44, la R. Società Agraria di Torino da 40 (di cui 9 anche georgofili) e la Società Medico Chirurgica di Torino da 43 (il cui statuto verrà approvato nel 1842 e che, nel 1846, diverrà R. Società Medico-Chirurgica di Torino<sup>(18)</sup>).

Il primo giorno, i membri del congresso, si riunirono nel Tempio di San Filippo – al tempo ancora sprovvisto di pronao – per invocare da Dio i suoi lumi e le sue benedizioni. Analogamente, per l'apertura di tutte le altre 7 Riunioni. Il che ha fatto dischiudere le porte di alcune delle chiese italiane più celebri. Ossia: Santa Croce (Firenze), Basilica del Santo (Padova), San

Frediano (Lucca), Duomo (Milano), Duomo (Napoli), San Lorenzo (Genova) e Basilica di San Marco (Venezia).

Il 16 settembre, nell’Aula magna della R. Università, il Presidente, tenne un dotto discorso sul contributo dato dagli italiani al progresso della scienza, invero incrinato da un passaggio in cui, ribaltando la realtà geostorica affermava che la mente dell’augusto monarca era *“costantemente rivolta a quanto può conferire alla gloria d’Italia, di quell’Italia sopra tanta parte della quale la generosa sua schiatta da tanti secoli gloriosamente impera”*. Era proprio una Italicetta, la sua!<sup>(2)</sup>

Alla seduta di chiusura il Saluzzo si presenterà con le insegne del collare del Supremo Ordine della S.S. Annunziata, conferitogli, dal re Carlo Alberto.

Ai congressisti fu consegnata la guida di Torino e la medaglia commemorativa, con Minerva sul dritto.

Il Gené informò che *“nei 15 dì che la Riunione durò, tutto era vita e letizia nelle vie di Torino, tutto fu ordine e dignità nei palazzi”* della R. Università e della R. Accademia delle Scienze (che ospitò le Sezioni di geologia e zoologia).

Il Sovrano non partecipò ad alcuna seduta, ma accolse alla sua regia mensa gli Ufficiali della riunione e molti illustri personaggi, ai quali diede in dono la Descrizione della R. Armeria, fatta stampare in elegantissimo volume.

Per gli scienziati si organizzarono gite a Superga, Stupinigi, Moncalieri e alla Crocetta, per visitare l’Orto sperimentale della R. Società Agraria<sup>(2)</sup>.

### III CONGRESSO – Firenze, 15-30 settembre 1841

In concomitanza con il Congresso, si inaugurò la prima Esposizione nazionale agraria, industriale e artistica.

Furono Presidente generale il marchese Cosimo Ridolfi e Segretario generale l’ing. Ferdinando Tartini. Fra i responsabili delle Sezioni: il pedagogista ab. Raffaello Lambruschini ed il geologo Lodovico Pasini, ed alcuni notabili granducali, quali: Gino Capponi, Bettino Ricasoli, Giuseppe Montanelli, Vincenzo Salvagnoli e Carlo Matteucci.

I partecipanti furono 888 (Figura 1); le Deputazioni 39 di cui 12 straniere.

Il Ridolfi nell’Adunanza generale di apertura, a Palazzo Vecchio nel salone dei Cinquecento, ricordò agli scienziati che le loro riunioni presero auspicio ed abbrivo in Pisa *“a la vista di quella lampada e di quella torre che furono della nuova Fisica le prime e insigni macchine sperimentali”*.

E proseguendo con il suo dire alato soggiunse: *“Onore e prosperità a Voi che fate così gran parte del decoro e della gloria d’Italia; di questa Terra*

*la quale, come non v'è sciagura che non provasse, non v'è parimenti fama che conquistar non sapesse; di questo Popolo che più volte infelice fu sempre grande, e sarà sempre serbato a eccelsi destini nel progresso della civiltà e del sapere*"<sup>(3)</sup>.

Il granduca Leopoldo II fece erigere per l'occasione, nel Museo di Fisica e Storia Naturale di Firenze, una Tribuna interamente dedicata a Galileo (soggetto ripreso anche nella medaglia commemorativa), destinata a contenere strumenti e carte del:

*“Divo intelletto, al cui veder profondo  
Poca la terra e non fu troppo il cielo”,*

come scrisse con felice immaginazione Massimima Fantastici Rosellini.

Come era prevedibile, i lavori scientifici dei Congressi e le varie attività di contorno destarono la legittima curiosità di quelli che erano costretti a seguirli indirettamente. Il che aveva prodotto qualche riga di cronaca sui giornali locali, nonché la pubblicazione di libretti ufficiosi con notizie e commenti vari, per iniziativa di alcuni solerti editori.

A Firenze gli organizzatori, forse sollecitati da questo stato di cose, provvidero alla tempestiva pubblicazione dei Diari, a cura degli Ufficiali. Ogni sera – tranne la domenica – furono fatti uscire, per tutta la durata del congresso, questi fogli contenenti l'elenco dei nuovi arrivati ed il transunto dei lavori delle Sezioni. Distribuiti, ogni mattina, ai membri del Congresso andarono a formarne in succinto la storia oltre ad affiancarsi agli Atti ufficiali tradizionali<sup>(20)</sup>.

Tra i diversi temi trattati, non si può ignorare il gravissimo problema dell'istruzione. A tale proposito si riporta quanto auspicato dal conte Luigi Serristori di Firenze. Ossia: *“che quanto prima possa essere in tutta Italia sistemata e generalizzata l'istruzione dei due sessi, ad imitazione di quanto operò da già venticinque anni la sapienza governativa del Regno Lombardo-Veneto”*.

Nella seduta conclusiva del 29 settembre, il presidente Ridolfi riservò toni foscoliani alle urne dei Grandi venerati in Santa Croce, esclamando: *“Sì, fra le tombe dell'Alighieri, del Buonarroti, del Macchiavelli, Voi cercaste più che altro quella del Vostro Maestro, e quei marmi dissero agli occhi Vostri ciò che la mia voce non saprebbe ridire. Né il tenterò; ma come Voi commosso da così care memorie al sorgere di così belle speranze, – o Italia – griderò invece esultante, – o Italia, madre feconda d'ingegni sì misurati, nò che la fama tua non verrà meno giammai. Pullulerà perenne da questa classica Terra un'illustre progenie, che all'età più remote tramanderà per opere eccelse un nome ognor più venerato”*<sup>(3)</sup>.

#### **IV CONGRESSO – Padova, 15-29 settembre 1842**

Il quarto Congresso si tenne a Padova, con il consenso di Sua Maestà Imperiale Reale ed Apostolica l'Imperatore d'Austria Francesco I d'Asburgo-Lorena.

Alla frontiera furono bloccati più di un aspirante congressista. Il fatto fu così commentato con irridente sarcasmo dal Giusti *“ma chi se ne meraviglia... con quarantamila caiserlicchi sul Ticino, aver paura di due o trecento dotti in cravatta bianca andati là a litigare sul volvulus batatas o sopra un ranocchio!”*.

Presidente generale fu il conte Andrea Cittadella Vigodarzere, segretario dell'Accademia di Padova, coadiuvato dal botanico dalmata Roberto De Visiani, in qualità di Segretario generale.

Si presentarono in 514 (Figura 1); le Deputazioni 36 di cui 6 straniere.

Tra i convenuti: il medico Giacomo Andrea Giacomini, il fisico Francesco Orioli, il chimico-fisico Bartolomeo Bizio, il geografo Jakob Gräberg.

Tra i vari argomenti dibattuti, va indubbiamente evidenziato, quello affrontato nella Sezione di Agronomia e Tecnologia. Ossia l'effettuazione a livello nazionale di *“Statistiche sopra i fanciulli impiegati nelle Manifatture”*, avvalendosi di una tavola sinottica predisposta dal torinese conte Carlo Ilarione Petitti di Loreto. Nel successivo congresso di Milano (1844) verrà riferito che fanciulli di 10, 8 e persino 5 anni erano chiusi per 13 e talora 15 ore in mefitiche officine, legati ad un lavoro incessante, unito a promiscuità incontrollata, sonno faticoso ed interrotto, membra doloranti ed infiacchite, vecchiezza precoce; il tutto pagato con l'abbruttimento e la corruzione. Tema di forte impatto socio-economico e medico, che si riallaccia alle tematiche della medicina del lavoro le quali, nell'opera di *De morbis artificum diatriba* (1700) di Bernardino Ramazzini (1633-1714), ebbero in assoluto la loro prima enunciazione.

Nel discorso conclusivo, il Presidente, ebbe a dire che: *“...sia lode perenne a quelli che promossero in Italia un'istituzione, la quale ravvicina i divisi fratelli. Guardano qui quella immancabile mercede bastante, anche nel segreto di se stesso, all'uomo che sa di aver giovata la Patria. Specialmente fortunati ... gli intelletti cultori di moltissime parti dell'umano sapere che, con una concordia di cui niun secolo anteriore ha mai dato l'esempio, si avviano in tutte regioni d'Europa verso una grande unità”*<sup>(4)</sup>.

#### **V CONGRESSO – Lucca, 15-30 settembre 1843**

Il quinto Congresso si tenne a Lucca, piccolo ducato retto dal duca Carlo Lodovico di Borbone, che acconsentì nonostante il parere contrario dei suoi

ministri. E questo dopo che la scelta, nelle sedute fiorentine, era caduta – in prima battuta – su Modena e poi su Parma e questo per i rifiuti diversamente motivati dal duca Francesco IV d’Austria-Este – quello che aveva mandato alla forca Ciro Menotti – e dalla duchessa Maria Luisa d’Asburgo-Lorena, nota come “vedova non inconsolabile”.

Presidente generale fu il marchese Antonio Mazzarosa, letterato ed erudito locale e Segretario generale l’anatomista Luigi Pacini.

Presenziarono 496 scienziati (Figura 1); le Deputazioni 50 di cui 10 straniere.

Tra i congressisti: il giurista Giovanni Carminiani, l’abate Ferrante Aporti, lo storico Giuseppe La Farina e Karl Gustav Jacobi, accompagnato da altri matematici tedeschi. Incontro che ebbe grande influenza sugli ambienti italiani, specie romani e napoletani, dove fu più lungo il loro soggiorno.

È doveroso segnalare che il medico torinese Michele Griffa, dopo un intervento sul sistema carcerario con cui aveva denunciato il maltrattamento dei prigionieri, evocò – tra gli applausi – gli orrendi patimenti dello Spielberg, citando coraggiosamente Silvio Pellico e Federico Confalonieri, venne bruscamente invitato a lasciare il Ducato. Negli Atti, però, non se ne fece menzione<sup>(5)</sup>.

## **VI CONGRESSO – Milano, 12-27 settembre 1844**

Il sesto Congresso venne preceduto, il giorno 11 settembre, dalla inaugurazione nel cortile dell’I.R. Palazzo di Brera, della statua eretta al grande matematico Bonaventura Cavalieri, con l’elogio di Gabrio Piola.

Presidente generale fu eletto il conte Vitaliano Borromeo e Segretario generale l’entomologo nob. Carlo Bassi.

I Convenuti 1159 (Figura 1); le Deputazioni 69 di cui 16 straniere.

Tra gli Ufficiali delle Sezioni: il marchese Emilio Bertone di Sambuy, il conte Gherardo Freschi, il conte Faustino Sanseverino e Leopoldo Pilla. Tra i congressisti: il medico pavese Carlo Cairoli, padre dei famosi fratelli, il conte Gabrio Casati, il matematico conte Carlo Montanari, l’astronomo Francesco Carlini e Alessandro Manzoni (nella veste insolita di agricoltore e studioso di economia, che esercitava brillantemente nella sua tenuta di Brusuglio, alle porte di Milano). Tra gli stranieri: il naturalista Eduard Rüppel, Spencer Joshna Compton, geologo e presidente della *Royal Society*, il medico Pietro Ippolito Boutigny d’Evreux e le baronesse Ernestina e Luigia Kotz di Praga.

Lo storico Cesare Cantù predispose la guida della città, mentre il fratello Ignazio preparò un ponderoso volume (500 pagine) con le biografie degli italiani ascritti ai cinque primi Congressi.

Il Presidente, nel discorso di apertura tenuto alla presenza dell'Arciduca vicerè, parlò – *et pour cause* – del cardinale Federico Borromeo che riuni nella magnifica sede dell'Ambrosiana i libri ed i preziosi manoscritti da lui raccolti, aggiungendovi pure una stamperia, forse la prima in Italia. Successivamente, con evidente e giustificata preoccupazione, invitò i convenuti a “*non trascendere nelle discussioni in questioni estranee all'indole strettamente scientifica delle adunanze; a non farsi allettare dal pensiero di entrare nello spinoso campo delle metafisiche disquisizioni e a non dar retta a chi vorrebbe spingere alla trattazione di argomenti sulle scienze politico-morali, pur non disconoscendone l'importanza*”<sup>(6)</sup>.

L'Arciduca vicerè presenziò anche alle altre Assemblee generali e accolse alla regia mensa tutti gli Ufficiali ed i Congressisti più noti.

Il Segretario della Sezione Zoologia Oronzio Costa, annunciò – tra gli applausi – che l'Accademia degli Aspiranti Naturalisti di Napoli, tenendo al miglior esito del Congresso programmato per il 1845 proprio nella loro città, si era proposta di pubblicare raccolti in volumi, ordinati per materia, scevri da inutili e formali diciture ed arricchiti di note e commenti, gli Atti di tutti i precedenti Congressi. Questo allo scopo di mettere tutti coloro, ai quali sarebbe riuscito difficile procacciarseli, di conoscere quanto trattato, le questioni *in itinere*, i lavori proposti e cose simili<sup>(10)</sup>.

## VII CONGRESSO – Napoli, 20 settembre – 5 ottobre 1845

Presidente generale fu eletto Niccola Santangelo, ministro degli Interni del Regno e Segretario generale Giacomo Filioli, dell'Accademia Pontaniana.

Dei 1613 intervenuti, circa la metà erano regnicoli presenti per la prima volta e provenienti da tutte le province, al di qua e al di là del Faro (Figura 1). Taluni non mancarono di far rilevare che le ammissioni fossero state fatte “*con generosa benevolenza*”. Negli Atti, le 100 Deputazioni vennero accuratamente suddivise tra quelle “*non del Regno*” (66 di cui 14 straniere) e “*del Regno*” (34 distinte tra quelle delle Società economiche 20 e delle Accademie nazionali 14)<sup>(7)</sup>.

Tra gli Ufficiali delle 9 Sezioni alcuni già noti, come il chimico Raffaele Piria, il fisico-matematico Macedonio Melloni (fondatore dell'Osservatorio vesuviano), ed altri no, come il botanico Michele Tenore ed il giovanissimo chimico Stanislao Cannizzaro. Francesco de Sanctis, da buon testimone, in qualità di “amatore”, osservò che “*il settimo Congresso, tenuto a Napoli, fu precursore della rivoluzione*”, e infatti, tra gli intervenuti figuravano: il Brofferio, il Montanelli, il Salvagnoli, il Pasini, il Matteucci ed il Tazzoli,

che avrebbero occupato posti di rilievo nei moti per l'unità d'Italia. Non mancarono personalità straniere quali: Wolfgang Maximilian Goethe, giurista e nipote del grande Johann ed il celeberrimo Theodor Mommsen filologo, storico ed epigrafista.

La cerimonia di apertura, venne tenuta nella grande Sala del Museo Mineralogico, con la partecipazione del re Ferdinando II, che vi prese la parola in risposta al Presidente Santangelo.

La cordialità e lo sfarzo dell'accoglienza finirono per enfatizzare – oltre misura – gli aspetti mondani connessi al Congresso, suscitando anche ironiche critiche sulla stampa locale e non solo. Tutto questo, però, non riuscì a mascherare lo stato reale della città, le condizioni fatiscenti e malsane di carceri ed ospedali. Una Commissione medica effettuò vari sopralluoghi, riscontrando trattamenti allucinanti sui pazienti ed una elevata mortalità. Nessuna menzione sugli Atti.

La pronta visibilità del Congresso di Napoli venne offuscata dalla mancanza di comunicazioni con il nord. A Milano, il conte Alessandro Porro, redattore del Bollettino di statistica, dovette ricorrere alle pagine dell'*Allgemeine Zeitung*.

Il Segretario generale, in chiusura, così si espresse *“un solo voto mi resta: è che duri a lungo e senza interruzione la magnanima e l'utile istituzione che qui vi ha radunati. La sua durata darà alla nostra Italia il più sicuro progresso di gloria e di pace; pace alla cui ombra soltanto le scienze, le arti e tutte le discipline possano degnamente fruttificare, ché indegnate esse si arretrano appena, stridendo sui loro cardini, si disserrano le porte del temuto tempio di Giano”*<sup>(7)</sup>.

Per eternare la memoria del Congresso fu battuta – *more solito* – una medaglia, avente nel dritto la figura dell'Italia, e nel rovescio l'immagine di Giambattista Vico. Gli Atti furono pubblicati puntualmente nel 1846 presso la stamperia del Fibreno, e per la prima volta in due volumi, per complessive 1600 pagine.

## **VIII CONGRESSO – Genova, 14-29 settembre 1846**

Presidente genrale fu il marchese Antonio Brignole Sale e Segretario generale il marchese Francesco Pallavicino.

I congressisti furono 1062 (Figura 1); le Deputazioni 129 di cui 39 straniere.

Ai lavori parteciparono personalità come: Massimo d'Azeglio, Giovanni Berchet, Angelo Brofferio, Cesare Correnti, i botanici Antonio Bertoloni e Giuseppe De Notaris e l'entomologo Massimiliano Spinola.

L'Adunanza generale di apertura dei lavori fu tenuta nel Salone del Palazzo Ducale alla presenza del Cardinale, del Governatore e di una folla di scienziati e di altre personalità.

Il Presidente asserì, nell'occasione, che Genova era degnissima di essere sede dell'ottavo Congresso *“perché madre di valorosi che or con la sapienza, or coll'armi, or colle lettere, or colle arti illustrarono la Patria”* ed accennò alla effettiva utilità dei Congressi e alla valida protezione che loro accordarono i Principi italiani ed in ispecie il re Carlo Alberto: *“che regge con sì profondo senno i popoli della parte superiore ed occidentale d'Italia e che tanti saggi ha dato dell'ardente amore suo per le scienze”*<sup>(8)</sup>.

Indubbiamente, il pensare ad un nuovo assetto della Penisola, derivato dal riconoscimento di una nazione italiana, aveva ancora basi incredibilmente fragili, soprattutto se si considera che *“le proposte di rinnovamento nazionale della Penisola avevano incontrato una determinatissima resistenza degli establishment di tutti gli Stati preunitari compreso, almeno sino al 1846, anche il Regno di Sardegna”*. Bisognerà attendere, sino al 1851-52, la scelta risolutamente italiana dei Savoia<sup>(11)</sup>.

È indubbiamente rilevante quanto ebbe ad affermare l'abate Raffaele Lambruschini, Presidente della Sezione Agronomia, ovvero che: *“i frutti dei Congressi italiani non sono tutti contenuti nelle disputazioni scientifiche e nel volume degli Atti; i migliori frutti sono invisibili, sono nascosti nei cuori; scintille di amor fraterno, di carità di desiderio del bene che si propagano e fanno sì che i mali e le gioie di una parte d'Italia siano quelli dell'Italia tutta”*<sup>(8)</sup>.

Il principe Bonaparte, alquanto sdegnato, fece presente che nel Diario (18 settembre) non erano state riferite le splendide parole del Presidente allorquando aveva affermato che *“mercè l'azione benefica dei Congressi si fa delle anime italiane un'anima sola”*. Quindi fece l'annuncio della protezione accordata all'istituzione dei Congressi da Papa Pio IX, da poco eletto. Il che suscitò vivi applausi in tutta l'Assemblea. Si fecero voti affinché, nel 1848, Bologna divenisse sede del decimo Congresso. Il permesso non venne accordato e si dovette ripiegare su Siena.

Furono donate ai Congressisti la guida di Genova e la medaglia commemorativa avente nel dritto il busto di Cristoforo Colombo.

Al teatro Carlo Felice si diede un concerto di beneficenza per soccorrere le vittime del terremoto – *tremendo segreto della natura* – e dell'alluvione in Toscana, che destarono simpatie generose in altre parti d'Italia.

Fatto eccezionale fu il rito religioso officiato, sempre in San Lorenzo, alla chiusura del Congresso.

## IX CONGRESSO – Venezia, 13-26 settembre 1847

A Venezia il clima fu assai diverso da quello di sicuro ottimismo registrato a Milano ed a Genova. La situazione politica era ormai incandescente.

Il governo della città concesse a tutti il visto d'ingresso, ma tradì la propria insicurezza dislocando in ogni dove un nugolo di spie, funzionari e militari, che fornivano rapporti quotidiani su quanto ascoltavano nelle sedute del Congresso, così come ai tavolini dei caffè. Congresso questo, anomalo. Per la prima volta alla Società Italiana delle Scienze, detta dei XL, non fu spedito l'invito formale. Ciò nonostante furono designati a rappresentarla l'astronomo Giovanni Santini ed il chimico-fisico Bartolomeo Bizio. Della Riunione, caratterizzata da un'atmosfera percorsa da fremiti rivoluzionari ed unitari del Risorgimento, è data così notizia sugli Annali: “...*forse l'ultimo per sovversive cagioni, estranee allo scopo scientifico, ma fatalmente soffiate nella istituzione dei Congressi*”<sup>(16)</sup>.

Presidente generale fu il conte Andrea Giovannelli, socio onorario dell'Ateneo veneto, coadiuvato dal geologo Lodovico Pasini, quale Segretario generale.

Gli iscritti furono 1478, con una massiccia presenza austriaca 128 (Figura 1); le Delegazioni 63, di cui 15 straniere.

Tra i congressisti: i poeti Aleardo Aleardi e Giovanni Prati, Enrico Tazzoli (per la quinta volta). Fra i partecipanti stranieri: il botanico Robert Brown, il geografo Karl Ritter, il poeta Heinrich Stieglitz, che combattè contro l'Austria, all'arsenale, a fianco degli insorti veneziani, nonché il barone Karl Alexander Jügel, diplomatico, botanico ed esploratore che avrebbe favorito la fuga in Inghilterra del Metternich, e il colonnello Giovanni Marinovic, comandante dell'Arsenale che sarebbe stato linciato l'anno successivo dalla folla inferocita.

Nella Sala del Gran Consiglio, in palazzo Ducale, onorato dalla presenza di S.A. l'Arciduca vicerè, dai suoi familiari e dalle autorità, fu aperta l'Adunanza generale da parte del Presidente, con il tradizionale discorso di prammatica.

La Sezione Agronomia si trasferì, il 21 settembre a Padova per assistere alla festa dei fiori, preparata con sobrietà per sfatare le “*spesso biasimate allegrezze de' Congressi*” (Diario n. 8 del 22 settembre), ed il giorno appresso assegnò al prof. Amilcare Mazzarella di Milano, il premio istituito da Matteo Bonafous di Torino (costituito da una medaglia d'oro da mille franchi) per la migliore traduzione delle Georgiche di Virgilio, corredata da note agronomiche<sup>(15)</sup>.

Gli scienziati convenuti a Venezia si attivarono per far erigere una statua, a Padova, a Galileo Galilei per ricordare le scoperte da lui fatte in quelle contrade e del lustro dato alla Università Patavina e ricevettero una guida, in 4 volumi, e l'immane medaglia commemorativa, avente nel dritto il busto di Marco Polo.

I fermenti di indipendenza ed unità non venivano più nascosti dagli studiosi accorsi da ogni parte d'Italia. Il Congresso vide la sospensione dei lavori della Sezione Zoologia, a causa dell'intemperanze di Carlo L. Bonaparte, che arringava la folla su temi scottanti, in divisa da guardia civica romana con tanto di elmetto e fascia tricolore. Fu espulso da Venezia dalla polizia austriaca ed a Roma sottoposto a processo.

L'avvocato Daniele Manin partecipò a numerose sedute trattando temi giuridici, letterari, sociali ed economici con toni esplicitamente antiasburgici. Cesare Cantù nel discorso di chiusura della Sezione Geografia ed Archeologia maledisse coloro che *“mettono il coltello tra i cuori dei fratelli, che non cercano se non avvicinarsi e battere all'unisono”*.

La nuova politica culturale di Pio IX, aveva suggerito ai congressisti di Genova di designare la *dotta* Bologna – Stato della Chiesa – come sede della successiva riunione. Ma il rapido evolversi delle vicende politiche nazionali, nella primavera del 1847, sconsigliò di dar seguito alla proposta. La designazione sostitutiva di Siena, fu accettata quasi unanimemente e venne eletto a Presidente generale il conte Giovanni Pieri Pecci, già gonfaloniere della città.

Domenica 26 settembre si tenne l'ultima generale Adunanza del Congresso *“che Venezia lieta ed altera, registrerà tra le memorie gloriose della nuova sua storia”*, con grande concorso di popolo (3.000 persone secondo la polizia). Ciò costrinse a traslocare nella Sala del Gran Consiglio. All'ingresso del Vicerè si *“serbò silenzio di morte”*.

Era appena chiusa l'adunanza, e stava sotto il torchio il Diario n. 13 del 27 settembre, quando si ebbe la comunicazione ufficiale di un dispaccio, in data 21 settembre, di S. E. il Cardinale Segretario di Stato di Sua Santità, col quale *“venne partecipato che l'ottimo e sapientissimo Sommo Pontefice aveva concesso benignamente che la Riunione degli Scienziati Italiani si tenesse nell'anno 1849 in Roma”*. La presidenza generale fu contenta di promulgare sì bella notizia, prima che la maggior parte degli scienziati lasciasse Venezia<sup>(15)</sup>.

Per ricostruire i dibattiti delle tornate delle Riunioni, si dovette ricorrere alle scarse cronache pubblicate sui Diari, perché il sequestro effettuato dalla polizia austriaca, di tutta la documentazione, impedì la pubblicazione degli Atti.

Dell'epilogo della riunione di Venezia, della sua importanza scientifica, ma soprattutto del suo significato politico, Lorenzo Pareto, genovese, presidente della Sezione Geologia, così ebbe a scrivere nel 1853:

*“degli otto primi di questi Congressi furono pubblicati gli Atti; del solo ultimo radunatosi in Venezia nel 1847 e di cui si agitarono questioni importantissime, non fu possibile per le gloriose ma infelici vicende che afflissero quella eroica città di dare alle stampe il verbale... io estimo che tutto quanto fa parte degli Atti dei Congressi possa essere documento prezioso per la storia d'Italia, sì scientifica che sociale, negli anni che precedettero il glorioso ma sfortunato insorgere del 1848”<sup>(16)</sup>.*

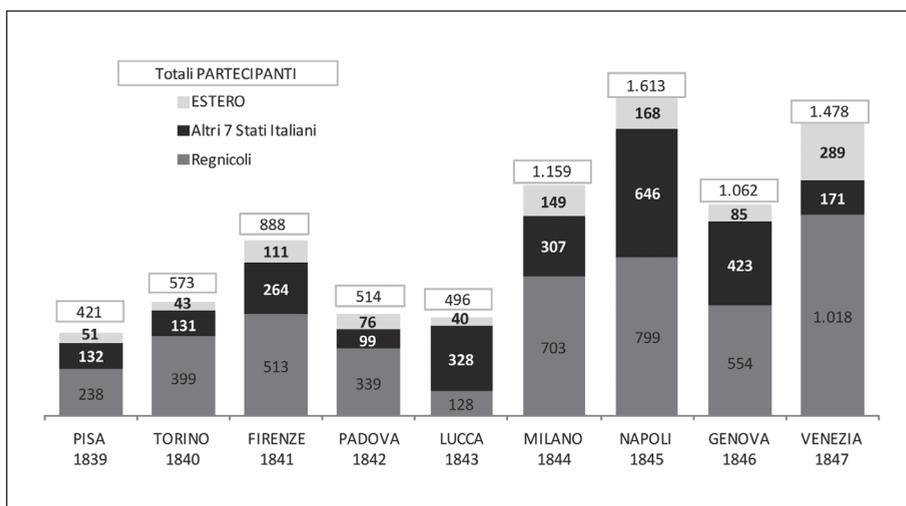


Figura 1. Partecipanti ai Congressi degli Scienziati Italiani (1839-1847): **8.204**. Scienziati coinvolti: più di **6.000**, di cui circa **1.000** stranieri<sup>(12,19)</sup>.

## VERSO L'UNITÀ

Non è mestieri, per la necessaria concisione imposta a questo lavoro, indugiare su i moti, le battaglie, le guerre ed i discutibili plebisciti che animarono tutta l'Italia, sino alla proclamazione del regno, il 17 marzo 1861.

Vanno ricordati, comunque, i seguenti accadimenti che ebbero come protagonisti alcuni noti congressisti.

- L’insurrezione di Venezia (22 marzo 1848 – 24 agosto 1849), con la partecipazione di Daniele Manin e Lodovico Pasini.
- La gloriosa e sfortunata giornata di Curtatone e Montanara (29 maggio 1848). Il Battaglione dei volontari pisani, al comando del Mossotti – affiancato da Leopoldo Pilla (che vi trovò eroica morte ed il cui corpo andò disperso), da Giuseppe Montanelli (che fu gravemente ferito), da Carlo Matteucci e da Raffaele Piria – lasciò sul campo una ottantina di giovani, a molti dei quali – stando alle cronache – la morte strozzò in gola il grido di “*Viva l’Italia*”.
- Il Golgota di Belfiore (Mantova) che vide, Enrico Tazzoli (7 dicembre 1852) e Carlo Montanari (3 marzo 1853) salire il patibolo con stoica serenità.

Anche dopo la Restaurazione del 1849, alle assisi scientifiche – stante la loro italianità – si impedì di proseguire, perché ritenute troppo pericolose per i governi dei vari Stati della Penisola. Si dovrà attendere la proclamazione del regno d’Italia per vedere riuniti nuovamente a Firenze, gli scienziati italiani.

### **CONGRESSO STRAORDINARIO – Firenze, 30 settembre – 8 ottobre 1861**

L’Italia era unita, pur senza Roma ed il Veneto e dal 17 marzo 1861, Vittorio Emanuele II di Savoia-Carignano ne era il primo re.

Il marchese Cosimo Ridolfi, presidente dell’Accademia dei Georgofili pienamente convinto che “*l’Italia quando era un aggregato di otto Stati aveva conseguito, grazie ai Congressi scientifici, la propria unità nell’ordine intellettuale*”, prese l’iniziativa di convocare a Firenze, un Congresso straordinario allo scopo di riprendere, rinnovandole, le riunioni degli Scienziati. Nella lettera di convocazione auspicava che “*un sacro debito di gratitudine imponesse (all’Italia) di rendere ai Congressi scientifici quel contraccambio di valido aiuto che già questi gli porsero*”.

La Riunione vide 255 partecipanti che, *in primis*, si proposero la revisione del Regolamento generale, che venne approvato nelle sedute del 5, 7 ed 8 ottobre. Come emerge dalla relazione del prof. Carlo Matteucci si mirava, tra l’altro, a: “*dare al Paese l’esempio di un istituto che sa conservarsi e crescere indipendentemente dall’ingerenza e dal soccorso governativo*”.

Tra le modifiche organizzative: periodicità biennale delle riunioni; promozione di dimostrazioni sperimentali e di lezioni pubbliche; tassa di iscrizione (20 lire per congressista); edizione in veste economica di Atti e Diari<sup>(16)</sup>.

Delle due Sezioni considerate, una venne dedicata alle Scienze morali e sociali, finalmente ammesse, dopo la revoca del veto imposto nel 1839 da Leopoldo II, anche quale segno dei tempi in cui fiorivano le discussioni sull'applicazione del metodo positivo alle discipline storiche e filosofiche.

L'Italia, poi, briga al sud e:

*“... ficca li occhi a valle, ché s’approccia  
la riviera del sangue in la qual bolle* (Inf. XII, 46,47)

il “cosiddetto” brigantaggio.

### **X CONGRESSO – Siena, 14-28 settembre 1862**

Siena, dopo quattordici anni ebbe il suo agognato Congresso.

Il senatore Francesco Puccinotti di Urbino, ne fu il Presidente generale e il conte senatore Augusto De Gori primo Assessore.

Il 14 settembre si tenne la solenne apertura del Congresso nell’aula del Palazzo Pubblico, con il celebre affresco della Maestà di Simone Martini, con il discorso del Presidente. Tra gli Ufficiali: il prof. Gilberto Govi, il marchese senatore Cosimo Ridolfi, il conte Giovanni Pieri Pecci, il senatore Giovan Battista Giorgini e il prof. Benedetto Trompeo. Tra gli stranieri: Luisa Mesnier di Parigi.

Tra i 225 partecipanti, moltissimi da Siena e dintorni, pochi i forestieri. Praticamente assenti gli stranieri (4) [Regno d’Italia (meno Savoia e Nizza) 202; Mantova e Veneto 16 e Lazio 3]. Delegazioni 39 di cui 3 straniere.

Dunque, questo Congresso ebbe un chiaro insuccesso. Fatto alquanto prevedibile, essendosi dissolti con l’Unità, quegli impedimenti ad incontrarsi che – nel contempo – ne avevano costituito stimolo potente ed il irrefrenabile a farlo.

I lavori della decima Riunione, stante il nuovo Regolamento, si tennero su due Sezioni (Scienze fisiche, matematiche e naturali e Scienze morali e sociali) ordinate in Classi. La prima su sette: (Fisica e Matematica; Chimica e Farmaceutica; Botanica; Zoologia, Anatomia comparata e Fisiologia; Medicina; Chirurgia; Agronomia e Veterinaria). La seconda su cinque: (Archeologia e Storia; Filologia e Linguistica; Economia politica e Statistica; Filosofia e Legislazione; Pedagogia).

Ligi all’indirizzo dato dalle nuove regole, non ci si perse in svaghi ed in trastulli salottieri. Immane comunque una nuova guida di Siena e l’inaugurazione di un monumento al sac. Sallustio Bandini, agricoltore e letterato, gloria senese, nell’aula dell’Accademia dei Fisiocritici<sup>(9)</sup>.

Inutile dire che tutto era cambiato e la delusione serpeggiò evidente.

Si fecero voti affinché lo Stato unitario si impegnasse per cambiare le sorti della scienza italiana, che soffriva da lungo tempo per la carenza cronica di strutture ed investimenti, sistematicamente denunciata dagli addetti ai lavori durante tutti i Congressi.

*“...nell'affrontare il problema, però, la nuova Italia non aveva più dalla sua né gli entusiasmi risorgimentali, né la forza di quell'idea illuministica di una scienza educatrice e civilizzatrice dell'umanità, che con la Rivoluzione francese si era intrisa di stimoli politici e sociali e che, mirando alla creazione di una comunità scientifica internazionale, era stata la linfa vitale delle Riunioni naturalistiche”.*

Al termine dei lavori del Congresso, Roma venne designata per acclamazione a sede dell'XI Riunione del 1864, con Presidente generale lo scrittore Terenzio Mamiani della Rovere.

Il prof. Giovanni Campani, Segretario generale della Sezione delle Scienze fisiche, matematiche e naturali, nel rapporto di chiusura dei lavori (28 settembre) ebbe a dire:

*“non è mestieri dire le cagioni di sì lungo indugio, rileverò che se il lungo attendere è stato penoso per la città che ardente anelava fruire quell'onore già concesso, e per gli scienziati che forte sentivano il bisogno di quel commercio intellettuale a cui da qualche tempo erano abituati, ne è derivato però largo un compenso nell'acquisto di quella libertà, che è pur tanto confacente alla piena estrinsecazione dell'umano pensiero”.*

Il Presidente Puccinotti, concludendo i lavori, asserì che: *“la Politica avrebbe sempre mantenuto la sua importanza nei Congressi, potendosi negli attuali trattare palesemente, il che non fu nei passati, avvisando però che fosse trattata generalmente e scientificamente, ne giammai perdendo di mira di ottemperare a quell'ordinamento che la Nazione ha di già prescelto”<sup>(9)</sup>.*

## NOTE CONCLUSIVE

La dilatazione delle varie problematiche indusse crescenti difficoltà e squilibri, contribuendo a far precipitare in una crisi irreversibile, la formula “itinerante”. Questa coincise con gli eventi del 1848-49 e collocò, in taluni casi, su fronti opposti i partecipanti ai congressi precedenti. Degli anni

pre-quarantotteschi ne restò soltanto la nostalgia, che prese corpo negli altri tre Congressi post-unitari, divenuti ormai eventi “nazionali” di natura profondamente diversa: a Siena nel 1862, ma ancora più a Roma nel 1873 ed a Palermo nel 1875.

Evidente, in queste nuove iniziative, la ricerca – ancora prematura – di un centro culturale, politico e scientifico coincidente con la capitale del nuovo regno unitario. Furono le istituzioni stesse che, pur con molte contraddizioni, all’indomani dell’Unità regolarono la vita scientifica italiana, fino alla nascita nel 1907, a Parma, della Società Italiana per il Progresso delle Scienze (SIPS).

Riguardando nel loro insieme i Congressi scientifici, si può affermare che la scienza ne ha tratto, indubbio vantaggio, anche se talvolta la politica vi ebbe il sopravvento nelle discussioni; gli Atti di ognuno di essi stanno a dimostrare con quanto acume si promossero preziose indagini in tutti i campi della scienza, e quanto fu l’opera di educazione e d’innalzamento morale e materiale degli italiani.

La storiografia ha forse attribuito ai Congressi un peso eccessivo nella formazione della coscienza nazionale, anche se è innegabile che l’insieme dei contatti avrebbero avuto un seguito negli aneliti di libertà e nelle tensioni che si sarebbero aperte di lì a poco, ed ancor oggi ne intravede un valore più storico che politico.

\* \* \*

Da ultimo, con in mano un ipotetico “filo d’Arianna”, per meglio sortire dalle labirintiche vicende, in cui si intrecciano cronaca dei Congressi e storia degli Stati italiani pre-unitari, si volga uno sguardo a tutti quelli che le hanno animate: scienziati, amatori, curiosi ed altri. E sono, in vero, molti.

Orbene, facendo un volo un poco poetico, si vorrebbe vederli qui, tutti intorno, come fossero piccole luci. E sono tante, tante

*Quante il villan ch’al poggio si riposa,*

[...]

*come la mosca cede a la zanzara,*

*vede lucciole giù per la vallea,*

*forse colà dov’è vendemmia ed ara.*

(Inf. XXVI, 25, 28-30)

## BIBLIOGRAFIA

1. *Atti della prima Riunione degli Scienziati Italiani, tenuta in Pisa nell'ottobre del 1839*. Tip. Nistri, 1840, Pisa.
2. *Atti della seconda Riunione degli Scienziati Italiani, tenuta in Torino nel settembre 1840*. Tip. Cassone e Marzorati, 1841, Torino.
3. *Atti della terza Riunione degli Scienziati Italiani, tenuta in Firenze nel settembre 1841*. Coi tipi della Galileiana, 1841, Firenze.
4. *Atti della quarta Riunione degli Scienziati Italiani, tenuta in Padova nel settembre 1842*. Coi tipi del Seminario, 1843, Padova.
5. *Atti della quinta Riunione degli Scienziati Italiani, tenuta in Lucca nel settembre 1843*. Tip. Giusti, 1844, Lucca.
6. *Atti della sesta Riunione degli Scienziati Italiani, tenuta in Milano nel settembre 1844*. Coi tipi di Luigi e Giacomo Pirola, 1845, Milano.
7. *Atti della settima Adunanza degli Scienziati Italiani, tenuta in Napoli dal 20 di settembre al 5 di ottobre 1845*. Parte I e II, Stamperia del Fibreno, 1846, Napoli.
8. *Atti della ottava Riunione degli Scienziati Italiani, tenuta in Genova dal 14 al 29 settembre 1846*. Tip. Ferrando, 1847, Genova.
9. *Atti del decimo Congresso degli Scienziati Italiani, tenuto in Siena nel settembre 1862*. Tip. Mucci, 1864, Siena.
10. *Atti dei Congressi degli Scienziati Italiani, raccolti ed ordinati dall'Accademia degli Aspiranti Naturalisti, con note e commenti*. L. Dorotea (ed.). Tip. Nunzio Pasca, vol. I, 1844; vol. II-VI, 1845, Napoli.
11. Banti AM: *Miti e simboli della rivoluzione nazionale*. In: *L'Unificazione italiana*. Istituto della Enciclopedia Italiana 2001, Roma, 3-22.
12. Cantù I: *L'Italia scientifica contemporanea. Notizie sugli Italiani ascritti ai cinque primi Congressi, attinte alle fonti più autentiche*. Vedova di AF Stella e Giacomo figlio, 1844, Milano.
13. Casalena MP: *Per lo Stato, per la Nazione. I Congressi degli Scienziati in Francia e in Italia (1830-1914)*. Carocci Editore, 2007, Roma.
14. Cessi R: *Retrosceca politici del primo Congresso degli Scienziati Italiani (1839). Dai carteggi piemontesi ed austriaci*. Rassegna storica del Risorgimento, 1923; 10: 445-507.
15. *Diario del nono Congresso degli Scienziati Italiani, convocati in Venezia nel settembre 1847*. Coi tipi di Giovanni Cecchini, 1847, Venezia.
16. *Gli Scienziati Italiani e le loro Riunioni 1839-1847, attraverso i documenti degli archivi dell'Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL e della Società Italiana per il Progresso delle Scienze*. GB Marini Bettolo, R Capasso (eds.). Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL, 1991, Roma.
17. Mark Smith D. (a cura di): *Il Risorgimento italiano: storia e testi*. Laterza, 1999, Roma-Bari.
18. Minuz F, Tagliarini A: *"Identikit" degli Scienziati a congresso*. In: G Pancaldi (ed.). *I Congressi degli Scienziati Italiani nell'età del positivismo*. Editrice CLUEB, 1983, Bologna, 153-170.

19. Potecchi S, Sudiro L: *I partecipanti ai Congressi degli Scienziati Italiani (1839-1847) e (1862), suddivisi per Stati italiani ed esteri di provenienza*. CNR-IMAMOTER, 2011, Torino.
20. *Relazioni intorno alla terza riunione degli Scienziati tenuta in Firenze nel 1841 e di quanto fu trattato nelle varie Sezioni e Tornate coll'elenco alfabetico dei componenti la riunione medesima*. Tip. Migliaresi, 1841, Livorno.

## CELLULE STAMINALI TUMORALI E FENOTIPO NEI GLIOMI MALIGNI

*Davide Schiffer, Marta Mellai, Valentina Caldera, Laura Annovazzi*

Centro Ricerche di Neuro-Bio-Oncologia - Fondazione Policlinico di Monza  
Università degli Studi di Torino (Vercelli)

Key words:     *Glioblastomas / Glioblastoma*  
                  *Stem cells / Cellule staminali*  
                  *Origin / Origine*

### **Abstract:**

To know the location of tumor stem cells in glioblastomas *in vivo* would be important for the therapeutic strategy. In 21 operated glioblastomas, selected tumor areas were studied by immunohistochemistry and immunofluorescence for a series of differentiation and stemness antigens and by molecular genetics for EGFR amplification, 1p/19q co-deletion, PTEN and TP53 mutations, MGMT methylation and IDH1-2 mutations. Neurospheres developed in culture mostly when derived from the most malignant tumor phenotype (high cell density, high proliferation rate and high vessel density). In neurospheres prevailed the expression of stemness antigens which were expressed also in the malignant areas of the primary tumors. Adherent cells, produced by adding FBS to the culture, prevalingly showed differentiation antigens. There was a similar response pattern of molecular genetics from the malignant phenotype of primary tumors and neurospheres and not from adherent cells.

The conclusion is that brain tumor stem cells not necessarily represent a special cell type. They may be simply a functional status which can be reached or lost from tumor cells in the same way as it happens during normal cytogenesis of central nervous system.

### **Riassunto:**

Conoscere nel glioblastoma la localizzazione *in vivo* delle cellule staminali tumorali sarebbe di grande vantaggio per la strategia terapeutica. In 21 glioblastomi operati sono state selezionate aree studiate con immunohistochimica ed immunofluorescenza per una serie di antigeni di staminalità e di differenziazione e con tecniche di genetica molecolare per l'amplificazione di EGFR, co-delezione di 1p/19q, mutazioni di PTEN e di TP53, metilazione di MGMT e mutazioni di IDH1-2. Neurosfere si formano

in coltura quasi solo dalle aree più maligne del tumore primario (alta densità cellulare, alto grado di proliferazione, alta densità vasale). In esse prevale l'espressione di antigeni di staminalità così come nelle aree maligne del tumore primario. Nelle cellule aderenti, che si formano con l'aggiunta di FBS alla coltura, prevalgono gli antigeni di differenziazione. Vi è la stessa risposta di genetica molecolare dalle neurosfere e dal tumore primario, ma non dalle cellule aderenti.

La conclusione è che le cellule staminali tumorali non necessariamente rappresentano un tipo cellulare. Possono essere semplicemente l'espressione di uno stato funzionale che può essere raggiunto dalle cellule tumorali, come succede nella normale citogenesi del sistema nervoso.

Brain Tumor Stem Cells (BTSCs) represent a minor population of Tumor-Initiating Cells<sup>(19)</sup> characterized by proliferation capacity, renewal potential, clono- and tumorigenicity and responsibility for recurrence and resistance to therapies<sup>(4,7,33)</sup>. They are also called glioma initiating cells<sup>(10,25)</sup> and represent a base for discussing the phenotypic heterogeneity of glioblastoma multiforme (GBM). BTSCs represent an hypothesis on the origin of gliomas, today still under discussion. They are believed to derive from the transformation of embryonic or adult neural stem cells (NSCs) and correspond to uni- or multipotent progenitors<sup>(11,21,26)</sup>. As a matter of fact, they share stemness antigenic properties with NSCs and genetic alterations with primary tumors<sup>(2,6,10)</sup>. An alternative hypothesis is their coincidence with dedifferentiated tumor cells<sup>(4, 22,29)</sup> which, following an inverse route in comparison with differentiation in normal cytogenesis, reach a stem cell-like status<sup>(2)</sup>. Therefore, BTSCs could be better defined on the basis of their functional competence<sup>(31)</sup>. Hypotheses exist which do not contemplate the origin of gliomas from stem cells, but from progenitors located in the white matter and not in the subventricular zone<sup>(16,27,32)</sup>.

BTSCs, independently of their origin, are resistant to radio- and chemotherapy and should be the real target of therapies, being the tumor mass composed of differentiated cells insensitive to therapies. However, they cannot be demonstrated *in vivo* because adequate markers are lacking and the only way to identify them is to develop neurospheres (NS) in culture.

Our study aims at the clarification of the relationship among phenotypes of primary tumors, NS and adherent cells (AC) in culture using immunohistochemistry, immunofluorescence and molecular genetics of a series of genes/proteins of cell resistance and differentiation/dedifferentiation and of epigenetic events.

In 21 primary GBMs surgical samples were divided in three parts: paraffin embedding, *in vitro* cultures and freezing for molecular genetics. In paraffin sections, histology and immunohistochemistry methods were performed for characterizing the tumor phenotypes.

For culture, tumor tissue was processed as previously described<sup>(4)</sup> with the following conditions: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F-12 with 10 ng/ml bFGF (basic fibroblast growth factor) and 20 ng/ml EGF (epidermal growth factor) for NS and DMEM with 10% fetal bovine serum (FBS) for AC. Both cultures were maintained at 5% O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>. GBM reference cell lines were U87-MG and 010627 (Galli R, DIBIT San Raffaele, Milan) for both AC and NS. Differentiation assays were performed by mitogen withdrawal and the addition of 3% FBS to the culture. The described culture

modalities have been chosen according to the experience of Galli et al (2004), but we know that the methodology of culture influences the expression of BTSCs<sup>(13)</sup>. The diatribe among authors on the “going round or going flat” is highly significant in this regard<sup>(18,20)</sup>; it is not only a semantic question, but it concerns the origin of the cells.

Immunohistochemistry was performed on 4  $\mu$ m paraffin sections using a Ventana Full Benchmark automatic immunostainer (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA).

Immunofluorescence was performed on NS and AC with goat anti-rabbit FITC-conjugated IgG and rabbit anti-mouse TRITC-conjugated IgG antibodies. Cell nuclei were stained with DAPI. Observations were made on a Zeiss Axioskop fluorescence microscope (Karl Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with an AxioCam5MR5c and coupled to an Imaging system (AxioVision Release 4.5, Zeiss).

DNA extraction was performed on tumor frozen samples and on NS and AC. The following procedures for genetic analysis were performed: Loss of Heterozygosity (LOH) analysis (1p, 9p, 10q, 17p, 19q), EGFR amplification status (by fragment analysis and capillary electrophoresis), MGMT promoter hypermethylation status (by MS-PCR), mutation analysis (TP53, PTEN, EGFR, IDH1 and IDH2). Western blot analysis (chemiluminescence detection) was carried out on both tissues and cultures.

The most important finding was that the phenotype prevailing in samples from which NS developed was characterized by frank anaplasia with high cell density and small vessel density, high proliferation rate and atypia (Figure 1). NS developed in 6 cases and AC in 9 cases. In two cases, both cell types were present and in one a transition between them was found. Stemness antigens (CD133, Musashi-1, Nestin, SOX2 and REST) were expressed in NS and differentiation antigens (GFAP,  $\beta$ III-Tubulin, GalC) in AC (Figure 2, 3, Table I). SOX2 and REST were expressed in both the malignant phenotype of GBMs and NS (Figure 1). Genetic alterations (LOH of 1p, 9p, 10q, 17p and 19q regions, EGFR amplification, PTEN and TP53 mutations) and epigenetic events (MGMT promoter hypermethylation) showed a similar frequency in primary tumors, consistently with their primary nature, and NS, whereas they were not detected in AC (Table II). The allelic imbalance was partial in all primary tumors and complete in NS. Western blot analysis was consistent with these findings.

One important question is whether GBMs are heterogeneous with respect to their BTSC content. Different subsets of BTSCs have been demonstrated in GBM with different proliferative, clonogenic, and tumorigenic properties<sup>(4)</sup>.

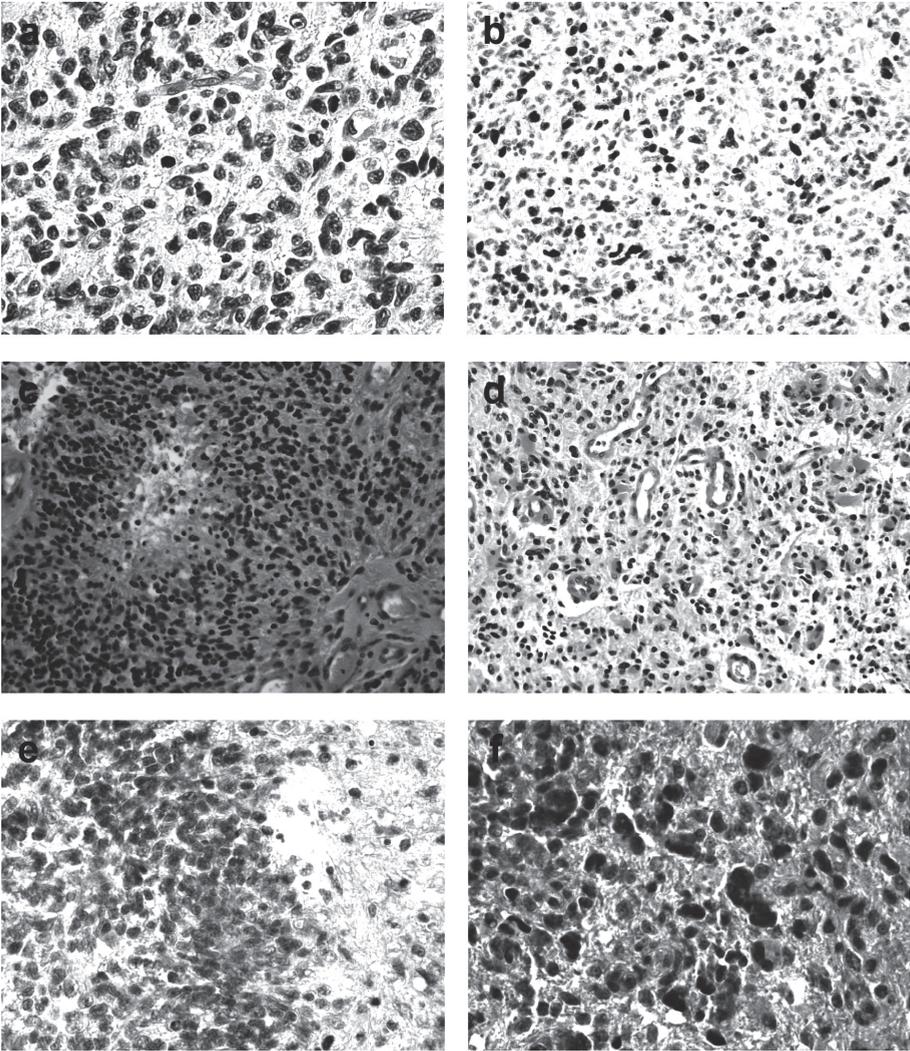


Figure 1. Histological and immunohistochemical aspects of phenotypic areas from which NS and AC generated. (a) High cell density, nuclear pleomorphism, scanty cytoplasm and visible mitoses, H&E, 40x. (b) High Ki-67/MIB.1 LI, DAB, 40x. (c) The external slope of a circumscribed necrosis, H&E, 20x. (d) High vessel density, H&E, 20x. (e) High expression of SOX2, DAB, 40x. (f) High expression of REST, DAB, 40x.

The question is rather controversial, because beside demonstrations that no difference exists for the BTSC content in different areas of the same tumor<sup>(14)</sup>, others show that different areas contain different BTSCs with different

tumorigenic potentials<sup>(17)</sup>. The latter is in line with the observation that different tumor clones show different proliferation rate and differentiation; for example, infiltrating cells have been demonstrated to be positive for Nestin<sup>(9)</sup>.

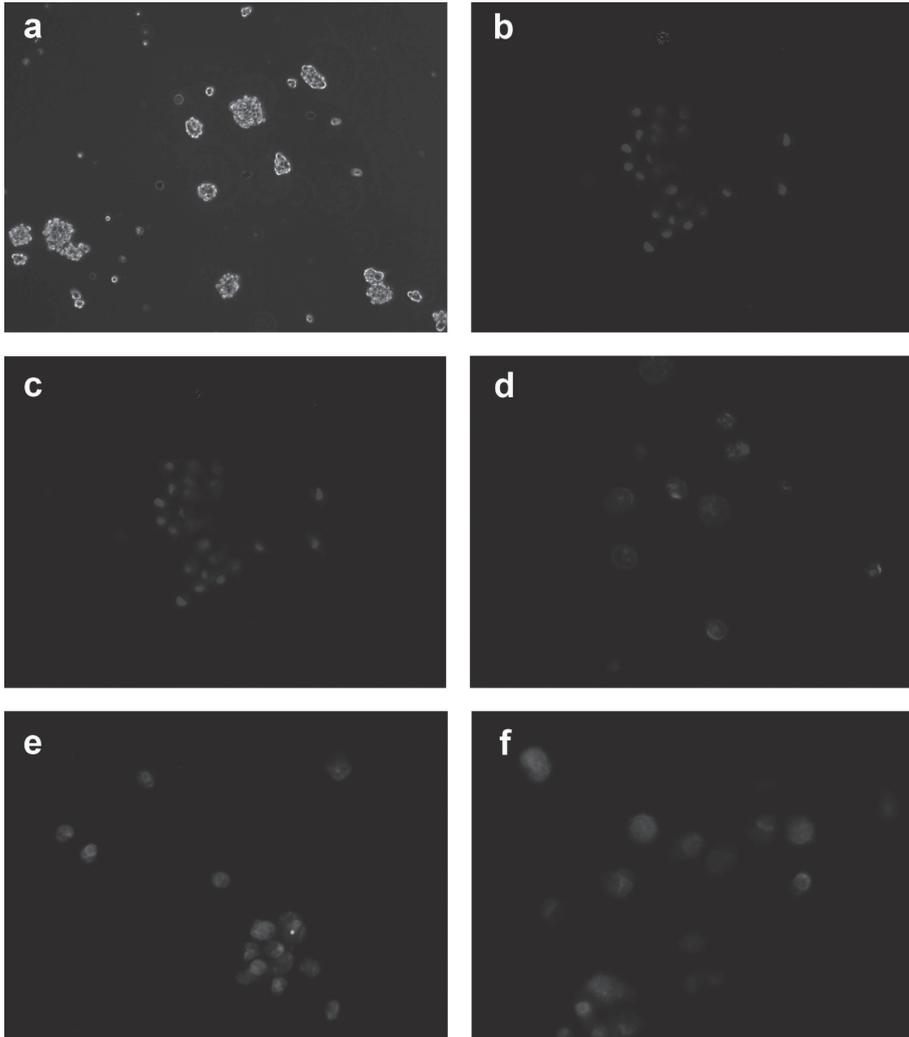


Figure 2. Immunofluorescence of NS cultured in serum-free medium, 40x. (a) NS. (b) Cytoplasmic expression of CD133, 20x. (c) Musashi-1 expression in the cytoplasm, 20x. (d) Nestin expression in the cytoplasm, 40x. Nuclei are counterstained with DAPI (blue). (e) SOX2 expression in nuclei, 40x. (f) REST expression in nuclei, 40x.

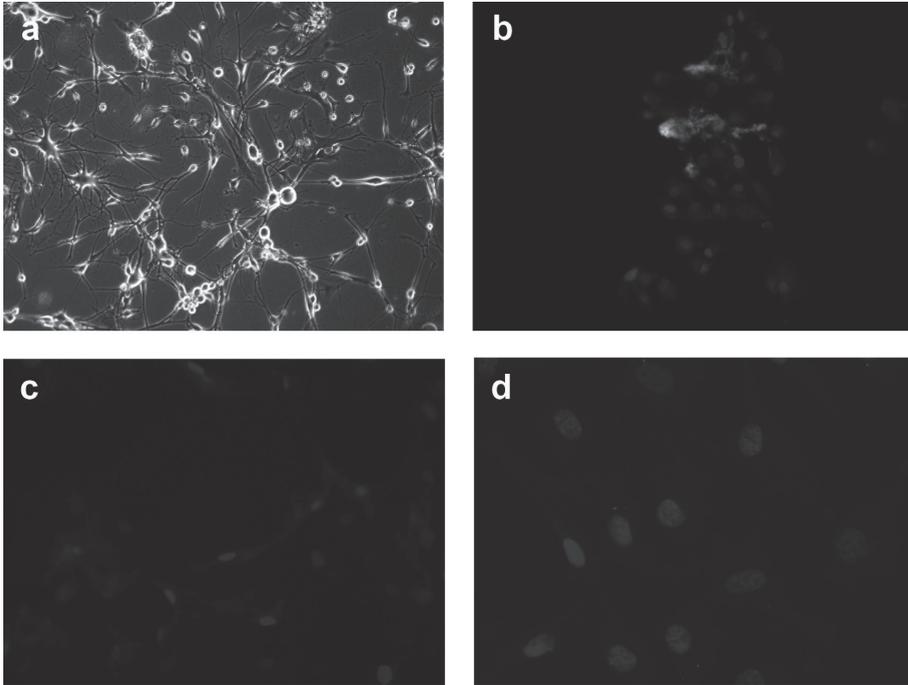


Figure 3. Immunofluorescence of AC cultured in serum-containing medium. (a) Monolayer of adherent cells. (b) GFAP expression in the cytoplasm. (c) Cytoplasmic expression of GalC. (d) Cytoplasmic expression of  $\beta$ III-Tubulin. Nuclei are counterstained with DAPI (blue). All 40x.

Other controversies concern the possibility to obtain NS from all gliomas or from selected GBMs<sup>(3,14)</sup>. Our results are in favour of the existence of hierarchy of cells respect to stemness and that only those at the apex can produce NS. In the present study, the most important observation is that the frequency of the genetic and epigenetic alterations is very similar between primary tumors and NS, showing a strong genotypic concordance. In AC, no detectable genetic or epigenetic alteration occurs.

The prevalence of Nestin upon GFAP and the expression of stemness antigens in perivascular cuffs and in areas with vessel hyperdensity of primary tumors is in line with the preference of BTSCs for perivascular niches<sup>(1,24)</sup>. The latter recapitulate normal NSCs and the vasculature of developing nervous system<sup>(12,28)</sup>; on the other hand, BTSCs in gliomas mediate vascular proliferation *via* VEGF<sup>(5,30)</sup>.

The different behavior of NS and AC may be related with showing the former full stemness properties and with appearing the latter as the product

Antibodies	FFPE sections								
	CV1	CV7	CV10	CV13	CV17	CV20			
GFAP	+	+	+	+	+	±			
βIII-Tubulin	-	-	+	-	-	-			
GalC	-	-	-	-	-	-			
Nestin	++	++	+	++	++	++			
CD133	- *	- *	±*	±*	±*	+			
Musashi-1	- *	- *	±*	±*	- *	+			
SOX2	++	++	++	++	++	++			
REST	++	++	++	++	++	++			
Antibodies	NS								
	CV1	CV7	CV10	CV13	CV17	CV20			
GFAP	±	+	±	-	-	-			
βIII-Tubulin	-	+	+	-	-	±			
GalC	-	+	±	-	-	±			
Nestin	+	+	+	+	+	±			
CD133	+	+	+	±	-	-			
Musashi-1	+	+	±	±	-	-			
SOX2	+	+	+	+	+	+			
REST	+	+	+	+	+	+			
Antibodies	FFPE sections								
	CV1	CV2	CV3	CV4	CV6	CV8	CV9	CV10	CV17
GFAP	++	+	++	+	+	+	+	+	+
βIII-Tubulin	±	-	+	-	-	-	-	-	-
GalC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nestin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD133	- *	- *	±*	±*	±*	- *	-	-	-
Musashi-1	- *	- *	±*	±*	- *	- *	-	-	-
SOX2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REST	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Antibodies	AC								
	CV1	CV2	CV3	CV4	CV6	CV8	CV9	CV10	CV17
GFAP	+	+	+	+	+	+	+	+	+
βIII-Tubulin	+	+	+	-	±	±	-	-	+
GalC	-	+	+	-	+	±	-	-	+
Nestin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD133	-	-	+	-	±	-	-	-	+
Musashi-1	±	-	+	-	±	±	-	-	+
SOX2	-	-	-	-	+ <sup>o</sup>	±	+ <sup>o</sup>	+	+ <sup>o</sup>
REST	-	-	-	+	+ <sup>o</sup>	+	+ <sup>o</sup>	-	+ <sup>o</sup>
* Tested by immunofluorescence on primary tumor frozen sections. <sup>o</sup> Cytoplasmic staining.									

Table I. Primary tumors, NS and AC. Immunohistochemistry and immunofluorescence.

<b>Molecular marker</b>	<b>Primary GBM (%)</b>	<b>NS (%)</b>	<b>AC (%)</b>
LOH 1p, 9p, 10q, 17p, 19q	16 (100)	6 (100)	0 (0)
EGFR amplification	8 (50)	3 (50)	0 (0)
MGMT hypermethylation	9 (56.2)	4 (66.7)	0 (0)
TP53 mutations	5 (31.2)	3 (50)	0 (0)
PTEN mutations	9 (56.2)	4 (66.7)	2 (22.2)
EGFR mutations	1 (< 1)	0 (0)	0 (0)
p.R132 IDH1	0 (0)	0 (0)	0 (0)
p.R172 IDH2	0 (0)	0 (0)	0 (0)
* An exception is CV10 in which NS generated from AC. AC showed the same molecular profile of NS. ** Genetic data refer to the 16 cases originating cell lines in culture.			

Table 2. Frequency of genetic and epigenetic alterations in primary tumors, NS and AC.

of cell differentiation. NS could be transformed NSCs from germinal zones, subventricular zone (SVZ), or subgranular zone (SGZ), or from dedifferentiated elements of the astrocytic lineage<sup>(8)</sup>, whereas AC could represent a differentiating cell type. Intermediated behaviors, however, can be observed<sup>(6)</sup>, also in our material.

The generation of NS from a tumor sample showing the most malignant phenotype suggests that they are contained in this areas or they arise from new proliferating and dedifferentiated clones developing after mutation accumulation or epigenetic events during malignant transformation. These clones could substitute the predecessors via competitive selection<sup>(22)</sup>. This hypothesis, previously considered<sup>(4,22,23,29)</sup>, suggests that BTSCs are either dedifferentiated cells regressed to an embryonic state and re-acquiring a stem cell-like status, or primitive transformed cells from NSCs.

Still an important question is whether NS are the real initiating tumor cells or they are the product of culture conditions and, in this regard, the transition from NS to AC may have a paramount importance in the general interpretation.

Stemness, might not be a property of a specific cell type, but a status which encompasses the early steps of the cyto-genesis and the corresponding tumor cells. It is conceivable that in the process of differentiation during cyto-genesis there is a point, represented by progenitors, beyond which stemness ceases. In the same way, considering the process of tumor cell dedifferentiation from more differentiated stages through the development of new clones, there should be a point beyond which stemness reappears. From the different stages of differentiation and dedifferentiation, different stemness potentials could be recognized, explaining intermediate properties (Figure 4). A similar problem has been presented and exhaustively discussed in relation to leukemias<sup>(15)</sup>.

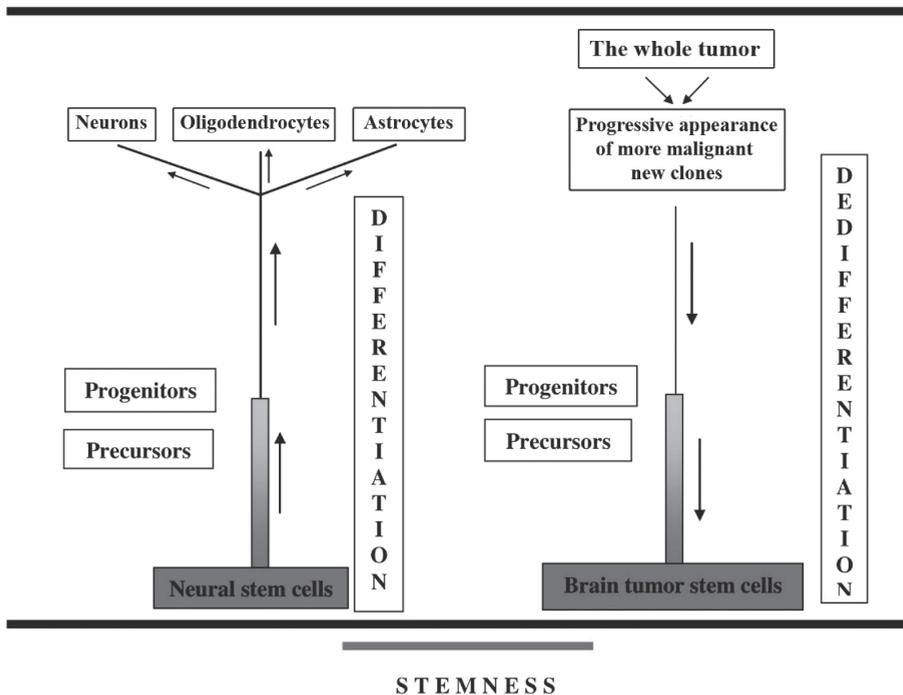


Figure 4. Scheme of a hypothetical distribution of stemness during differentiation and dedifferentiation. Stemness decreases from the stage of neural stem cells toward progenitors and adult cells. Conversely, in tumors it increases to a maximum in the stage of brain tumor stem cells.

## REFERENCES

1. Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, Hao Y, Li Z, Hjelmeland AB, Shi Q, McLendon RE, Bigner DD, Rich JN: *Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor*. Cancer Res. 2006; 66: 7843-7848.
2. Caldera V, Mellai M, Annovazzi L, Piazzini A, Lanotte M, Cassoni P, Schiffer D: *Antigenic and Genotypic Similarity between Primary Glioblastomas and Their Derived Neurospheres*. J. Oncol. 2011; 2011: 314962.
3. Clément V, Marino D, Cudalbu C, Hamou MF, Mlynarik V, de Tribolet N, Dietrich PY, Gruetter R, Hegi ME, Radovanovic I: *Marker-independent identification of glioma-initiating cells*. Nat. Methods. 2010; 7: 224-228.
4. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A: *Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma*. Cancer Res. 2004; 64: 7011-7021.
5. Gilbertson RJ, Rich JN: *Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche*. Nat. Rev. Cancer 2007; 7: 733-736.
6. Günther HS, Schmidt NO, Phillips HS, Kemming D, Kharbanda S, Soriano R, Modrusan Z, Meissner H, Westphal M, Lamszus K: *Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria*. Oncogene 2008; 27: 2897-2909.
7. Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA: *Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro*. Glia. 2002; 39: 193-206.
8. Jackson EL, Alvarez-Buylla A: *Characterization of adult neural stem cells and their relation to brain tumors*. Cells Tissues Organs. 2008; 188: 212-224.
9. Johannessen TC, Wang J, Skaftnesmo KO, Sakariassen PØ, Enger PØ, Petersen K, Øyan AM, Kalland KH, Bjerkvig R, Tysnes BB: *Highly infiltrative brain tumours show reduced chemosensitivity associated with a stem cell-like phenotype*. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 2009; 35: 380-393.
10. Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, Pastorino S, Purow BW, Christopher N, Zhang W, Park JK, Fine HA: *Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines*. Cancer Cell 2006; 9: 391-403.
11. Liu Z, Hu X, Cai J, Liu B, Peng X, Wegner M, Qiu M: *Induction of oligodendrocyte differentiation by Olig2 and Sox10: evidence for reciprocal interactions and dosage-dependent mechanisms*. Dev. Biol. 2007; 302: 683-693.
12. McCarty JH: *Cell adhesion and signaling networks in brain neurovascular units*. Curr. Opin. Hematol. 2009; 16: 209-214.
13. Natsume A, Kinjo S, Yuki K, Kato T, Ohno M, Motomura K, Iwami K, Wakabayashi T: *Glioma-initiating cells and molecular pathology: implications for therapy*. Brain Tumor Pathol. 2011; 28: 1-12.
14. Pallini R, Ricci-Vitiani L, Banna GL, Signore M, Lombardi D, Todaro M, Stassi G, Martini M, Maira G, Larocca LM, De Maria R: *Cancer stem cell analysis and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme*. Clin. Cancer Res. 2008; 14: 8205-8212.

15. Passegué E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL: *Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003; 100: 11842-11849.
16. Persson AI, Petritsch C, Swartling FJ, Itsara M, Sim FJ, Auvergne R, Goldenberg DD, Vandenberg SR, Nguyen KN, Yakovenko S, Ayers-Ringler J, Nishiyama A, Stallcup WB, Berger MS, Bergers G, McKnight TR, Goldman SA, Weiss WA: *Non-stem cell origin for oligodendroglioma.* Cancer Cell 2010; 18: 669-682.
17. Piccirillo SG, Combi R, Cajola L, Patrizi A, Redaelli S, Bentivegna A, Baronchelli S, Maira G, Pollo B, Mangiola A, DiMeco F, Dalprà L, Vescovi AL: *Distinct pools of cancer stem-like cells coexist within human glioblastomas and display different tumorigenicity and independent genomic evolution.* Oncogene 2009; 28: 1807-1811.
18. Pollard SM, Yoshikawa K, Clarke ID, Danovi D, Stricker S, Russell R, Bayani J, Head R, Lee M, Bernstein M, Squire JA, Smith A, Dirks P: *Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens.* Cell Stem Cell 2009; 4: 568-580.
19. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL: *Stem cells, cancer, and cancer stem cells.* Nature 2011; 414: 105-111.
20. Reynolds BA, Vescovi AL: *Brain cancer stem cells: think twice before going flat.* Cell Stem Cell 2009; 5: 466-467.
21. Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS: *Neural stem cells and the origin of gliomas.* N. Engl. J. Med. 2005; 353: 811-822.
22. Schiffer D, Manazza A, Tamagno I: *Nestin expression in neuroepithelial tumors.* Neurosci. Lett. 2006; 400: 80-85.
23. Schiffer D, Annovazzi L, Caldera V, Mellai: *On the origin and growth of gliomas.* Anticancer Res. 2010; 30: 1977-1998.
24. Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang SM, Goderie SK, Roysam B, Temple S: *Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions.* Cell Stem Cell. 2008; 3: 289-300.
25. Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB: *Cancer stem cells in nervous system tumors.* Oncogene 2004; 23: 7267-7273.
26. Stiles CD, Rowitch DH: *Glioma stem cells: a midterm exam.* Neuron 2008; 58: 832-846.
27. Sugiarto S, Persson AI, Munoz EG, Waldhuber M, Lamagna C, Andor N, Hanecker P, Ayers-Ringler J, Phillips J, Siu J, Lim DA, Vandenberg S, Stallcup W, Berger MS, Bergers G, Weiss WA, Petritsch C: *Asymmetry-defective oligodendrocyte progenitors are glioma precursors.* Cancer Cell 2011; 20: 328-340.
28. Tavazoie M, Van der Veken L, Silva-Vargas V, Louissaint M, Colonna L, Zaidi B, Garcia-Verdugo JM, Doetsch F: *A specialized vascular niche for adult neural stem cells.* Cell Stem Cell 2008; 3: 279-288.
29. Uchida K, Mukai M, Okano H, Kawase T: *Possible oncogenicity of subventricular zone neural stem cells: case report.* Neurosurgery 2004; 55: 977-978.
30. Veeravagu A, Bababeygy SR, Kalani MY, Hou LC, Tse V: *The cancer stem cell-vascular niche complex in brain tumor formation.* Stem Cells Dev. 2008; 17: 859-867.

31. Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA: *Brain tumour stem cells*. Nat. Rev. Cancer. 2006; 6: 425-436.
32. Weiss WA, Burns MJ, Hackett C, Aldape K, Hill JR, Kuriyama H, Kuriyama N, Milshteyn N, Roberts T, Wendland MF, DePinho R, Israel MA: *Genetic determinants of malignancy in a mouse model for oligodendroglioma*. Cancer Res. 2003; 63: 1589-1595.
33. Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschmann-Hogiu S, Farkas DL, Black KL, Yu JS: *Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme*. Oncogene 2004; 23: 9392-9400.

**RICORDO DEL PROF. FRANCESCO MONACO  
(1946 - 2011)**

*Roberto Mutani<sup>1</sup>, Riccardo Torta<sup>2</sup>, Marco Mula<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> Professore Emerito di Neurologia - Università degli Studi di Torino

<sup>2</sup> Professore Associato di Psicologia Clinica - Università degli Studi di Torino

<sup>3</sup> Ricercatore di Neurologia - Università del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”

**Abstract:**

This short article is meant to be in memory of Prof. Francesco Monaco, tragically and prematurely passed away. It has been written by three colleagues and friends who have shared with him years of life, patients' cure and research. Professor Francesco Monaco will be remembered, through the history of his shining career, particularly for his profound scientific and humanistic culture, his clinical and teaching talent, his scientific strictness and intellectual honesty. All these elements contribute to the sense of great void that his loss has produced in the national and international academic environment, as well as in all the people that have held him in high esteem.

**Riassunto:**

Questo breve articolo vuole essere un ricordo del Prof. Francesco Monaco, tragicamente e prematuramente scomparso, scritto da tre colleghi ed amici che hanno con lui percorso anni di vita, assistenza e ricerca. Del Prof. Francesco Monaco, attraverso la citazione della fulgida carriera e delle opere, scientifiche ed umane, viene ricordata la profonda cultura scientifica ed umanistica, la capacità clinica e didattica, il rigore scientifico e l'onestà intellettuale, fattori tutti che contribuiscono al grande vuoto che la sua perdita ha lasciato nel contesto accademico, nazionale ed internazionale, ed in tutti coloro che, conoscendolo, lo hanno profondamente stimato.

Un tragico incidente, avvenuto in Torino lo scorso autunno, ha improvvisamente tolto Francesco Monaco alla famiglia, agli affetti ed anche all'attività accademica che, nelle sue articolate espressioni cliniche, didattiche e di ricerca, era all'apice dello sviluppo e dei riconoscimenti. Tale evento lo ha anche privato della meritata soddisfazione di svolgere le funzioni di Presidente durante il Congresso Nazionale delle Società Italiana di Neurologia a Torino, per l'organizzazione del quale si era da un anno quotidianamente impegnato con entusiasmo ed efficacia. La sua figura è stata ricordata con intensa partecipazione affettiva in quel Congresso e in altre sedi. Chi ha oggi il doloroso compito di ricordare Francesco, ha variamente e in tempi diversi condiviso il suo percorso di vita e ne rende accorata testimonianza in queste poche pagine che si rifanno, in modo incompleto, agli interventi svolti durante la specifica seduta dell'Accademia.

Francesco Monaco si è brillantemente laureato in Medicina e specializzato in Neurologia all'Università di Torino. È in qualità di neospécialista che, agli inizi degli anni '70, venne avviato dal Maestro della Scuola torinese di Neurologia, Prof. Lodovico Bergamini, alla ricerca nei laboratori della Clinica. Grazie alla sua intelligenza, impegno e capacità relazionali si inserì rapidamente nel gruppo che si occupava del ruolo degli aminoacidi eccitatori e inibitori nei fluidi biologici, sia in modelli di epilessia sperimentale che nei pazienti con epilessia, dimostrando la congruità della loro specifica concentrazione con l'inizio e la fine delle singole crisi epilettiche. Tali ricerche vennero pubblicate sulle principali riviste internazionali dedicate agli aspetti clinici e biologici di base dell'epilettologia<sup>(5,8,9)</sup>.

Nel 1975 si trasferì, insieme a uno di noi, alla Clinica Neurologica dell'Università di Sassari, dapprima come Assistente e poi come Aiuto. In quegli anni sviluppò le tecniche di dosaggio plasmatico dei farmaci antiepilettici creando, fra i primi in Italia, un laboratorio specifico nel quale venne dimostrata l'utilità, nei bambini con epilessia, del dosaggio di tali farmaci nelle lacrime. Tali dati originali vennero pubblicati su *Annals of Neurology*<sup>(11)</sup>. È grazie a Francesco Monaco che il monitoraggio dei farmaci antiepilettici è divenuto, nella pratica clinica, una tecnica di routine nella terapia dei pazienti con epilessia, avendo egli dimostrato il preciso e costante rapporto fra efficacia clinica e concentrazione plasmatica dei farmaci. A questi aspetti egli dedicò un'efficace e nota monografia<sup>(1)</sup>.

Presso la Clinica di Sassari Francesco assunse progressivamente responsabilità cliniche sempre maggiori, diventando Capo Reparto, apprezzato dai colleghi e dai pazienti per le sue solide capacità professionali e le sue doti di grande umanità. L'associazione delle abilità cliniche con l'originalità e la

qualità delle ricerche gli valse, a soli 39 anni, la vittoria al concorso nazionale per Professore di Prima Fascia di Neurologia e le successive chiamate da parte della Facoltà di Sassari prima e di quella di Novara (Università del Piemonte Orientale) poi. Per uno degli autori del presente ricordo tali chiamate, delle quali fu attivo sostenitore, rappresentarono motivo di profonda soddisfazione e di legittimo orgoglio, nell'ambito del pieno appoggio derivante dalla scuola di appartenenza e dalla stima e dall'amicizia personali.

Nella seconda metà degli anni '90 Francesco Monaco assunse la direzione della Clinica Neurologica di Novara, della Scuola di Specializzazione in Neurologia e della laurea breve in Fisioterapia presso l'Università del Piemonte Orientale A. Avogadro. Sul piano culturale, la sua caratteristica peculiare fu il contemporaneo interesse per i più svariati rami dello scibile, dalla neurologia alla filosofia ed all'etica, in campo medico. Questa larghezza di vedute si riflette nelle sue pubblicazioni, fra le quali troviamo, accanto a lavori di carattere squisitamente neurologico (epilettologico in particolare), anche lavori di impronta neurofilosofica ed etica, sempre con altissimo livello di pubblicazione<sup>(2,3,4)</sup>. Per questo motivo la direzione della Clinica Neurologica di Novara venne indirizzata allo sviluppo di numerose tematiche anche distanti fra loro, quali la creazione del centro integrato per la sclerosi laterale amiotrofica, il perfezionamento dell'unità semintensiva per il trattamento delle patologie cerebro-vascolari e, non ultimo, il laboratorio di neuropsicologia.

In Francesco Monaco l'entusiasmo per la didattica ha sempre proceduto insieme con la forte e costante attenzione all'innovazione ed alla modernità. Il suo testo "Manuale di Apprendimento" di Neurologia è stato progettato proprio pensando agli attuali sviluppi dell'*e-learning*, diventando così uno dei primi testi in lingua italiana con applicazioni telematiche. In linea con la sua attenzione per la didattica è certamente l'interesse per la divulgazione scientifica, dimostrato dalla frequente collaborazione con vari quotidiani nazionali (la Stampa, Repubblica, Corriere della Sera).

Il continuo desiderio di confrontarsi in ambito scientifico internazionale portò Francesco Monaco ad instaurare fra la Clinica di Novara e varie strutture accademiche, quali l'Institute of Neurology di Londra ed alcune università americane, un'intensa e proficua collaborazione che permise a molti suoi allievi periodi di ulteriore perfezionamento. È stata, così, creata una scuola novarese di neurologia, capace di unire gli aspetti tradizionali della neurologia ai più attuali avanzamenti delle conoscenze di ordine neurobiologico. Tutti i suoi allievi lo ricordano con commozione e rimpianto, continuando a portare avanti i suoi insegnamenti.

Francesco Monaco amava citare i classici e presentare immagini, antiche ma sempre attuali, dalla storia della Medicina, a supporto della unicità fra mente e corpo, facendo riferimento alle frasi della medicina ippocratica, ad esempio *“i melanconici possono diventare epilettici e gli epilettici melanconici: se la malattia investe il corpo si avrà l’epilessia, se l’intelligenza si avrà la melanconia”*; o alla descrizione dei neuroni fatta da Ramon y Cajal *“cellule eleganti, misteriose farfalle dell’anima per spiegare i segreti della mente”*; oppure ancora alla lezione dei grandi uomini del passato, citando ad esempio le autobiografiche frasi di Dostoyevsky sull’epilessia. Della sua profonda convinzione a riguardo della inscindibilità fra neurologia e psichiatria rimangono importanti iniziative ed opere sia in ambito scientifico che didattico. Nel 1998 fonda, nel contesto della Società Italiana di Neurologia, il Gruppo di Studio per le Patologie di Confine in Neuropsichiatria *“... con l’intento di promuovere attività scientifiche e culturali nel vasto campo delle patologie del sistema nervoso di confine fra la neurologia e psichiatria ...”*. Per promuovere tali intenti realizza nel 1999, come Guest Editor con Mary Robertson, un numero monografico della rivista *Epilepsia* dal titolo *“Mood Disturbances, Psychoses and Epilepsy”* nel quale vengono discusse le correlazioni patogenetiche, cliniche e terapeutiche fra epilessia e patologie psichiatriche<sup>(10)</sup>. Con la stessa finalità fonda la Rivista italiana in lingua inglese *“Confinia Neurologica”* di cui è Editor in Chief. Dello stesso periodo è la collaborazione nella collana *“La depressione nelle malattie neurologiche”* per la monografia *“Depressione e Stroke”*<sup>(12)</sup> la cui prefazione, firmata da Cesare Fieschi, ben esprime il senso di tale lavoro: *“... oggi non è più possibile operare una dicotomia arbitraria tra “malattia del cervello” e “malattia della mente”. La neurobiologia è inscindibile dalla psicobiologia ...”*. Importante è anche lo sforzo formativo e didattico che ha sempre contraddistinto lo stile accademico di Francesco Monaco e che costantemente ha riportato i discenti alla univocità fra cervello e psiche: ne sono esempio il capitolo sulle *“Sindromi neuro-comportamentali associate ad epilessia e lesioni cerebrali focali”* edito sul volume *“Psicopatologia e clinica psichiatrica”*<sup>(6)</sup>. Summa concettuale di tale visione integrata è rappresentata dal dizionario integrato di neurologia, neuroscienze, psichiatria e psicologia, intitolato *“Neurolexicon”*<sup>(7)</sup> nella cui prefazione viene scritto: *“il Neurolexicon è stato concepito come una sfida rischiosa: ritrovare accostati, nell’asettica casualità alfabetica, termini (apparentemente) lontani come Aprassia, Archetipo, Istamina, Isteria può apparire per alcuni ambiguo, per altri assurdo, irriverente o persino provocatorio... Noi abbiamo voluto accettare a priori questa sfida e correre il rischio..”*. Un altro aspetto identificativo della personalità e professionalità

di Francesco Monaco sono le battaglie combattute a difesa della dignità del paziente e della onestà della medicina. Basti ricordare l'impegno profuso contro lo stigma attribuito, purtroppo ancora in anni recenti, al paziente con epilessia rispetto al comportamento sociale. Francesco Monaco, in comunione con le associazioni dei pazienti, tenne riunioni riguardanti i rapporti fra epilessia e pregiudizio, prendendo lo spunto dai concetti, criticati, di Cesare Lombroso riguardanti la psicosi degenerativa e "il delinquente epilettico". Recente testimonianza di tale impegno è stata la rivisitazione storica delle teorie lombrosiane pubblicata su *Epilepsia* nel 2001. Tuttavia, proprio da tale articolo, emerge l'onestà intellettuale e scientifica di Francesco Monaco, sempre alla ricerca della verità e della comprensione del pensiero altrui: si legge in tale articolo "*... nonostante noi crediamo che la professione medica debba essere consapevole delle distorsioni "diaboliche" generate dalle teorie di Lombroso, ... ogni commento viene volutamente evitato in quanto, nella nostra opinione, le persone e le loro idee devono essere giudicate in accordo con il periodo storico a cui appartengono*". Un altro esempio di tale onestà intellettuale è rappresentata dall'impegno dedicato da Francesco Monaco alla ridenominazione della malattia di Hallervorden-Spatz. Nel 35° congresso della Società italiana di Neurologia, il 27 settembre del 2004, Francesco Monaco ricordò come, a seguito del razzismo eugenetico della Germania nazista e del conseguente programma di eutanasia attiva (Aktion T4), vennero uccisi 5.000 bambini e molti dei loro cervelli vennero esaminati dal professor Julius Hallervorden, neuropatologo berlinese e che proprio da tale detestabile studio derivò l'eponimico di tale malattia degenerativa. Scrive Francesco Monaco a tale proposito: "*... Dobbiamo ricordare che la legge morale è sì dentro di noi, ma è legge dell'altro dentro di noi ... Oggi come sempre è necessaria un'etica della responsabilità: ognuno, per la propria parte, si assuma in toto le proprie responsabilità e non deleghi ad altri frammenti o parti intere di essa, favorendo così la parcellizzazione di un atto responsabile unico in tanti frammenti, tali da non poter più essere identificati o riassembleati in un'attribuzione di senso comprensivo e quindi, alla fine, non moralmente e legalmente perseguibili*". Nel manuale di Neurologia del professor Monaco (Centro Scientifico Editore, Torino, 2004) la malattia di Hallervorden Spatz è stata ridenominata "malattia di Martha ed Alma", dal nome delle due sorelline sui cui cervelli venne eseguito il primo studio autoptico.

Vorremmo terminare questo ricordo dell'amico e collega Prof. Francesco Monaco usando le sue stesse parole, pronunciate, quasi come testamento e presagio, in una delle sue ultime conferenze, con il linguaggio forte e

perentorio che lo distingueva e non lasciava spazio a compromessi: “... *Io sono un neurologo clinico ma non lontano dal mondo del pensiero. Mi sono laureato con una tesi in Psichiatria quando, fortunatamente, le due scuole erano unite, prima che la iattura della scissione abbia fatto sì che da una parte esista una neurologia biecamente biologista e dall'altra parte una psichiatria non sempre accompagnata da una adeguata cultura medica. Io vengo ancora dal mondo della Neuropsichiatria. Poi, nella parte finale della mia esistenza, sono giunto ad interessarmi delle alterazioni della coscienza, paradossalmente un po' come tutti gli uomini di scienza che ad un certo punto della loro vita entrano nel campo della filosofia. Si vede che quando invecchiano le cellule portano a pensare sul senso delle cose...*”.

Vogliamo ricordarlo così come grande uomo, scienziato, maestro ed amico.

## BIBLIOGRAFIA

1. Monaco F: *Il Monitoraggio dei Farmaci Antiepilettici*. Ed. Libreria Cortina, 1983, Torino.
2. Monaco F, Cavanna A, Magli E, Barbagli D, Collimedaglia L, Cantello R, Mula M: *Obsessionality, obsessive-compulsive disorder, and temporal lobe epilepsy*. *Epilepsy Behav.* 2005; 7: 491-496.
3. Monaco F, Mula M, Cavanna AE: *Consciousness, epilepsy and emotional qualia*. *Epilepsy Behav.* 2005; 7: 150-160.
4. Monaco F, Mula M: *Cesare Lombroso and epilepsy 100 years later: an unabridged report of his original transactions*. *Epilepsia* 2011; 52: 679-688.
5. Mutani R, Monaco F, Durelli L, Delsedime L: *Free amino acids in the cerebrospinal fluid of epileptic subjects*. *Epilepsia* 1974; 15: 593-597.
6. Monaco F, Torta R: *Sindromi neurocomportamentali associate ad epilessia e lesioni cerebrali focali*. In: *Psicopatologia e Clinica Psichiatrica*, 2004: 231-240. Utet Periodici Ed, Torino.
7. Monaco F, Torta R: *Neurolexicon. Dizionario Integrato di Neuroscienze, Neurologia, Psichiatria e Psicologia*. Ed. Centro Scientifico, 2007, Torino.
8. Monaco F, Mutani R, Durelli L, Delsedime M: *Free Amino acids in serum of patients with epilepsy: significant increase in taurine*. *Epilepsia* 1975; 16: 245-249.
9. Mutani R, Durelli L, Mazzarino M, Valentini C, Monaco F, Fumero S, Mondino A: *Longitudinal changes of brain amino acid content before, during and after epileptic activity*. *Brain Research* 1977; 122: 513-521.
10. Robertson MM, Monaco F (Eds): *Psychoses and Epilepsy*. *Epilepsia* 1999; 40 (suppl 10).
11. Tondi M, Mutani R, Mastropaolo C, Monaco F: *Greater reliability of tear versus saliva anticonvulsant levels*. *Annals of Neurology* 1978; 4: 467-471.
12. Torta R, Monaco F: *La Depressione nelle Malattie Neurologiche: depressione e Stroke*. Ed. Utet, 2001, Milano.

## EPATOCARCINOMA: STRATEGIE TERAPEUTICHE

*Franco Brunello, Patrizia Carucci, Silvia Gaia,  
Alessandro Cantamessa, Mario Rizzetto*

Gastro-Epatologia - Ospedale S. Giovanni Battista - Torino

Key words: *Hepatocellular carcinoma / Carcinoma epatocellulare*  
*Hepatic surgery / Chirurgia epatica*  
*Ethanol injection / Alcolizzazione*  
*Radiofrequency / Radiofrequenza*  
*Sorafenib / Sorafenib*

### **Abstract:**

During the last decades an increase of incidence of hepatocellular carcinoma associated with liver cirrhosis has been observed in the western world. The treatment of this neoplasia, once limited to the surgical resection for the patients with good liver function, is nowadays articulated in several options: liver transplantation, chemoembolization, percutaneous ablation, medical therapy. Each one, or more than one, may be appropriated to the single patient in a definite stage of the disease. A multidisciplinary approach (including surgical, radiological, hepatological, oncological and family physician specialists) has to be preferred in order to define the best strategy for each patient. The extension of the tumor, the liver function and the performance status are the main clinical factors involved in the decisional program. An “evidence based” decisional algorithm has been proposed from the Barcelona Clinic of Liver cancer (BCLC) and has been endorsed by the European and American Scientific Hepatological and Oncological Societies. The BCLC staging system considers three clinic features differently associated and identifies five stages of the disease: very early (0), early (A), intermediate (B), advanced (C), terminal (D). For each stage the treatment (that theoretically ensures the best results of overall survival) is suggested. Due to the wide clinical variability in the real life, exceptions to the suggested rules are often to be discussed in order to define the best treatment for each patient.

### **Riassunto:**

L'incidenza del carcinoma epatocellulare associato a cirrosi è aumentata nel mondo occidentale. Il trattamento di questa neoplasia, un tempo limitato alla resezione chirurgica per i pazienti in buon compenso funzionale, è oggi arricchita da nuove opzioni chirurgiche e non quali il trapianto epatico, la

chemioembolizzazione, l'alcolizzazione, la radiofrequenza, il trattamento medico orale con sorafenib. La scelta del trattamento da utilizzare deve essere fatta da un team multidisciplinare che comprenda l'epatologo, il chirurgo epatico/trapianto, il radiologo e il radiologo interventista, l'oncologo e il medico di base. L'estensione della neoplasia, la funzione epatica residua e lo stato generale del paziente sono le principali caratteristiche cliniche che indirizzano alla scelta del trattamento più appropriato. Un algoritmo di trattamento "evidence – based" è stato proposto anni fa dalla Scuola di Epatologia di Barcellona (BCLC) e adottato da società scientifiche epatologiche ed oncologiche del mondo occidentale. Il sistema BCLC prende in considerazione 3 principali caratteristiche cliniche diversamente combinate e identifica 5 stadi dell'HCC: molto precoce (0), precoce (A), Intermedio (B), Avanzato (C), Terminale (D). Per ogni stadio viene suggerito l'approccio che teoricamente assicura la migliore sopravvivenza. La variabilità clinica per ogni paziente comporta che, al di là delle linee generali suggerite dall'algoritmo, si decida comunque caso per caso il trattamento da considerare razionalmente come il migliore.

## INTRODUZIONE

Il carcinoma epatocellulare (HCC) rappresenta la terza e la sesta causa più frequente di morte per neoplasia nel sesso maschile e femminile, rispettivamente<sup>(12)</sup>. La sua incidenza è aumentata nei paesi occidentali nel corso degli ultimi decenni. L'HCC è un tumore maligno a partenza dalla cellula epatocitaria ed è associato nella grande maggioranza dei casi alla cirrosi e alla fibrosi epatica. L'etiologia, finora dominata dai virus delle epatiti croniche B e C e dall'abuso di bevande alcoliche, appare essere frequentemente associata anche a disordini dismetabolici (obesità, diabete, non-alcoholic steato-hepatitis) che affliggono i paesi più industrializzati<sup>(8,42,52,53)</sup>.

Fino agli anni '80 il trattamento dell'HCC significava resezione chirurgica ma la sua reale fattibilità ed utilità era poi limitata a pochi pazienti e gravata da un elevato tasso di mortalità e morbilità operatorie. L'HCC era pertanto considerato in genere una neoplasia a prognosi infausta a breve termine.

La situazione è cambiata negli ultimi decenni con l'introduzione del trapianto epatico, dell'affinamento delle tecniche chirurgiche e anestesilogiche e con l'introduzione di nuovi approcci non chirurgici di Radiologia ed Ecografia Interventistica (Chemio-embolizzazione trans-arteriosa, Alcolizzazione, Radiofrequenza). Tali approcci hanno esteso le possibilità di trattamento anche a pazienti che non potevano affrontare interventi di resezione o trapianto.

In aggiunta, occorre sottolineare che, in seguito al miglioramento tecnico e alla diffusione della ecografia, è oggi possibile arrivare ad una diagnosi precoce di HCC in fase iniziale sui quali è possibile ottenere una risposta locale completa.

La scelta del "miglior" trattamento deve essere valutata per ogni singolo paziente in base alle sue caratteristiche cliniche. Estensione della neoplasia, funzionalità epatica e performance status sono i principali fattori da valutare ma anche età, etiologia della epatopatia sottostante, malattie pregresse e concomitanti, trattamenti in corso, pregressi interventi, sede e visibilità della lesione, modificazioni della circolazione portale possono tutti indurre variazioni della scelta del trattamento. Un approccio interdisciplinare coinvolgente diverse figure specialistiche e non (epatologo, radiologo, chirurgo, oncologo e medico di famiglia) è auspicabile per un ottenere i migliori risultati per una diagnosi precoce, un trattamento razionale ed una buona gestione di questi pazienti.

Nel mondo occidentale il sistema di stadiazione/algoritmo decisionale più seguito ed approvato dalle società internazionali europea (EASL) e americana (AASLD) per lo studio delle malattie del fegato è costituito dal sistema BCLC (Barcelona Clinic of Liver cancer)<sup>(4,5,6)</sup>. Il sistema BCLC prende in

considerazione 3 principali caratteristiche cliniche diversamente combinate e identifica 5 stadi dell'HCC: Molto Precoce (0), Precoce (A), Intermedio (B), Avanzato (C), Terminale (D). Per ognuno di questi stadi viene suggerito il trattamento "migliore" in base a dati "evidence-based" pubblicati nella letteratura internazionale. Occorre sottolineare che le indicazioni di questi algoritmi sono necessariamente delle semplificazioni della realtà e che la complessità clinica del paziente reale porta spesso a divergere da queste "regole" nel singolo caso.

Una recentissima revisione del sistema BCLC è stata pubblicata nel 2012 a cura delle 2 società europee per lo studio delle malattie del fegato e di ricerca in oncologia (EASL e EORTC)<sup>(11)</sup>. La Figura 1 illustra questo recente, ma sostanzialmente invariato rispetto alle precedenti edizioni, sistema di stadiazione.

Verranno ora illustrati, per sommi capi, i diversi approcci di uso corrente per il trattamento dell'HCC associato a cirrosi epatica.

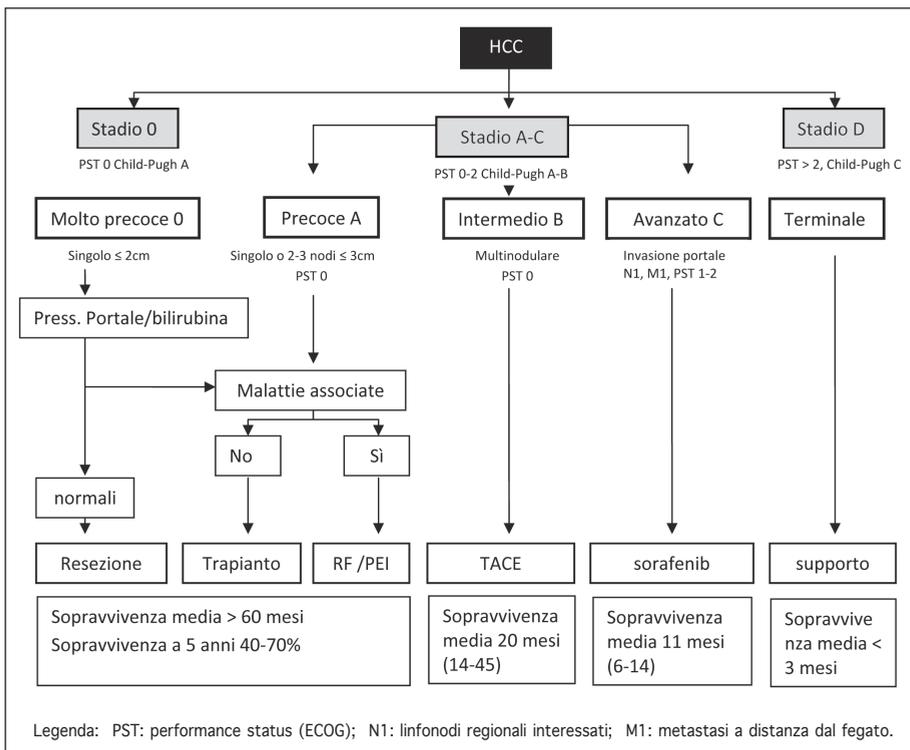


Figura 1. Sistema di stadiazione HCC (EASL-EORTC) (da J. Hepatol. 2012, modificata).

## RESEZIONE CHIRURGICA

La resezione chirurgica, che costituisce il trattamento di prima scelta nei pazienti in cui questa neoplasia insorge su un fegato non cirrotico, è utilizzata con limitazioni nel caso dei pazienti con cirrosi epatica, specie se complicata da ipertensione portale. Allo scopo di evitare un suo peggioramento e di ridurre ulteriormente la funzione epatica vengono preferite resezioni settoriali, segmentarie o sub segmentarie. Presenza di varici esofagee, necessità di trattamento diuretico, piastrinopenia  $< 100.00$  mmc e splenomegalia sono tutti dati che identificano i pazienti a maggiore rischio di complicanze da chirurgia resettiva.

La morbilità e la mortalità peri-operatorie sono un problema importante ma sono state ridotte a limiti del tutto accettabili nei centri più qualificati<sup>(2,31,56)</sup>.

Circa i criteri di eleggibilità chirurgica, non esiste un consenso universalmente condiviso e scuole diverse di chirurgia e di epatologia adottano criteri differenti, talora non supportati da solidi studi “evidence-based”. Le associazioni scientifiche epatologiche<sup>(2,4,5,6,11)</sup> sono più restrittive rispetto a quelle chirurgiche: la resezione dovrebbe essere limitata a pazienti con HCC in fase “early” senza invasione portale e associato a funzione epatica ottimale (bilirubina totale  $\leq 1.0$ mg/dl), assenza di ipertensione portale (HPVG  $\leq 10$ mmHg o assenza dei dati clinici succitati) e ottimo performance status (ECOG 0-1). Per contro le scuole chirurgiche attribuiscono minore importanza alla ipertensione portale. Le scuole chirurgiche e mediche giapponesi<sup>(18,57)</sup> suggeriscono di utilizzare il test al verde di indocianina per selezionare i pazienti eleggibili alla resezione e forniscono indicazioni più ampie alla resezione: lesioni multiple, invasione portale se limitata a branche periferiche, funzione epatica di classe Child-Pugh A e B<sup>(19)</sup>.

I risultati clinici, in termini di sopravvivenza generale (OS) e sopravvivenza senza-malattia (DFS) a 5 anni, sono in generale leggermente migliori per i pazienti sottoposti a resezione rispetto a quelli trattati con altri approcci non chirurgici ma spesso gli studi non sono comparabili.

Come regola generale l'ipotesi resettiva dovrebbe sempre essere discussa con il team chirurgico a meno che i dati clinici siano inequivocabilmente indicatori di una cattiva prognosi per la insufficienza epatica (classe Child-Pugh B8 o classi C), un cattivo performance status, una diffusione extraepatica della malattia o un rifiuto netto e motivato del paziente che sia stato correttamente informato dei benefici/rischi delle opzioni terapeutiche possibili e dei risultati ragionevolmente ottenibili con l'una o con l'altra.

L'approccio chirurgico dovrebbe essere pertanto riservato a pazienti in buone condizioni generali, con funzione epatica ottimale o sub-ottimale e con tumore singolo.

Il trattamento chirurgico di HCC in stadio intermedio (multifocale) o avanzato, sebbene tecnicamente possibile, deve essere attentamente discusso tra i teams di epatologia, oncologia, radiologia interventistica e chirurgia e, in generale, riservato a casi molto selezionati a causa della elevata probabilità di progressione a breve e di ridotta sopravvivenza a lungo termine.

## TRAPIANTO EPATICO

Il trapianto rappresenta il più completo approccio terapeutico per i pazienti con cirrosi epatica e HCC: la neoplasia viene asportata insieme all'organo che svilupperà nel tempo nuovi foci neoplastici e la funzionalità epatica è reintegrata dal nuovo organo. Nella situazione migliore il trapianto di fegato ottiene un risultato di OS a 5 e 10 anni del 70 e 50% rispettivamente; un risultato analogo a quello ottenibile in pazienti trapiantati senza neoplasia<sup>(58)</sup>. I vantaggi del trapianto sono superiori ad ogni altro tipo di trattamento quando alla neoplasia si associa uno stato di scompenso epatico, tali vantaggi sono però associati ad una serie di difficoltà che rendono realistici la fattibilità ed il successo clinico del trapianto ad un limitato numero di pazienti super selezionati: il numero degli organi da trapiantare disponibili; il tasso di mortalità/morbilità del trapianto stesso; l'estensione della neoplasia che impone dei limiti ai pazienti trapiantabili; l'etiologia della cirrosi (HCV) che può reindurre rapidamente lo stato cirrotico nell'organo trapiantato; le complicanze biliari o vascolari sull'organo trapiantato; la qualità della vita del ricevente.

La carenza di fegati da donazione cadaverica ha fatto sì che venga talora effettuata la donazione di parte di fegato da donatore vivente. Il rischio di mortalità per il donatore è intorno allo 0.3-0.5%<sup>(55)</sup>.

L'estensione della neoplasia al momento del trapianto è un punto cruciale nel processo di inclusione/esclusione al trapianto: i cosiddetti criteri di Milano (tumore singolo  $\leq 5$ cm; numero massimo di tumori multipli 3, ognuno di questi  $\leq 3$  cm; non invasione vascolare macroscopica; non localizzazioni extraepatiche) rimangono delle regole tuttora valide allo scopo di ottenere risultati di sopravvivenza a lunga scadenza simili a quelle dei trapiantati non neoplastici<sup>(40)</sup>. L'estensione dei criteri di Milano, indagata da alcune scuole di chirurgia<sup>(38,39,66)</sup>, comporta una riduzione della OS e il problema etico di utilizzare il numero ridotto di fegati cadaverici donati che avrebbero potuto essere trapiantati in pazienti senza neoplasia ma destinati all'exitus per insufficienza d'organo.

Il trapianto di fegato è necessariamente limitato ad una ridotta serie di pazienti con caratteristiche cliniche definite dal Centro Trapiantologico e ogni sforzo deve essere fatto per gestire il loro problema neoplastico con altri approcci, compresa la resezione, prima di arrivare al trapianto<sup>(48)</sup>.

## TRATTAMENTI ABLATIVI

All'inizio degli anni '80 sono stati pubblicati i primi lavori di ricerca clinica che riferivano dei risultati ottenuti nelle neoplasie epatiche con l'iniezione di etanolo sterile a 98% sotto guida ecografica<sup>(26,54)</sup>. Da allora la tecnica universalmente conosciuta come PEI (Percutaneous Ethanol Injection), è rimasta per molti anni l'approccio più usato per il trattamento di piccole lesioni epatiche non trattabili chirurgicamente. La PEI è una tecnica sicura con bassa incidenza di morbilità e mortalità e bassissimo costo<sup>(27,47)</sup>; per contro, la sua efficacia si esercita sostanzialmente su lesioni focali  $\leq 3$  cm. La necrosi coagulativa indotta dall'etanolo è limitata infatti alla lesione in sé stessa e non va a coinvolgere il tessuto epatico a stretto contatto con la sua periferia dove possono essere presenti micro focolai di malattia. I migliori risultati possono essere ottenuti con lesioni fino a 2 cm di diametro con 1-3 sedute. L'impiego di alti dosaggi di etanolo (20-100 ml) in una singola sessione per estendere il volume ablatato e trattare lesioni di maggiori dimensioni ( $> 4$  cm) è stato abbandonato in seguito alla elevata incidenza di complicanze/mortalità<sup>(25)</sup>.

Variazioni tecniche della PEI mediante uso di acido acetico al 50% o soluzione fisiologica bollente non hanno ottenuto risultati migliori e non hanno avuto seguito<sup>(16,43)</sup>.

La PEI è stata invece progressivamente sostituita da una nuova tecnica ablativa proposta negli anni '90 da ricercatori italiani<sup>(46)</sup>: la radiofrequenza (RF). La RF utilizza onde elettromagnetiche (460-480 kHz) alternate con incremento della temperatura intralesionale fino a circa 100 gradi centigradi. Vantaggi della RF, rispetto alla PEI, sono la possibilità di indurre un danno tissutale maggiore in un numero minore di sedute, di ottenere, se pur in modo limitato, una necrosi del tessuto epatico circostante ottenendo un "margine di sicurezza", e di non dipendere da un fluido che può diffondere nel fegato in modo a volte imprevedibile.

La PEI è stata progressivamente sostituita dalla RF in seguito alla dimostrazione da parte di alcuni trials randomizzati, e successive metanalisi, che la RF permette un controllo locale migliore della PEI in modo particolare per le lesioni  $> 2$ cm<sup>(7,22,23,24,44,51)</sup>. Oggi la PEI è limitata a casi molto selezionati.

Diverse altre tecniche basate su principi fisici sono state proposte per la distruzione locale delle lesioni da HCC: laser, microonde, crioterapia, raggio protonico, radioterapia conformazionale, ultrasuoni focalizzati ad alta potenza, elettroporazione. Finora nessuna di queste si è dimostrata sicuramente superiore in senso clinico alla RF<sup>(21)</sup>.

La RF è attualmente l'approccio standard per l'ablazione dell'HCC negli stadi very early (0) e early (A) in pazienti non chirurgici. La sicurezza della RF è stata dimostrata in ampi studi clinici multicentrici con una mortalità dello 0.3% e una morbilità del 2.2% come complicanze maggiori e del 5% come complicanze minori<sup>(29)</sup>. I suoi costi (correlati all'ago monouso, al ricovero ospedaliero di 1-2 giorni) sono superiori a quelli della PEI ma notevolmente inferiori a quelli della chirurgia resettiva.

I risultati clinici in termini di OS (non di DFS) a 5 anni sono abbastanza simili a quelli della chirurgia resettiva ponendo la RF come un valido concorrente alla resezione, tenuto conto anche delle differenze come costi, morbilità e mortalità<sup>(9,15,17,36,37,41,59,62)</sup>. La scelta di effettuare l'una o l'altra rimane ancora oggi motivo di discussione che deve essere affrontato caso per caso.

Limitando il campo alle lesioni singole e inferiori a 2 cm, uno studio retrospettivo Italiano ha riportato che su 100 pazienti aventi caratteristiche cliniche che rendevano possibile una resezione chirurgica ma che erano stati trattati con RF, avevano avuto una risposta completa e duratura nel 98% dei casi, mortalità dello 0.0%, morbilità del 2% e un OS a 5 anni del 65.5%<sup>(28)</sup>. Nuovi studi comparativi tra RF e chirurgia che estendono il limite da 2 a 3 cm sono in corso di pubblicazione.

## **TRATTAMENTI TRANS ARTERIOSI**

Embolizzazione e chemioembolizzazione sono tecniche angiologiche utilizzate per il trattamento non-chirurgico dell'HCC<sup>(3,65)</sup>. Con questi approcci si determina una brusca riduzione dell'apporto ematico arterioso alla neoplasia in modo da determinarne un danno ischemico e necrosi.

L'embolizzazione (TAE) è eseguita iniettando nelle arterie epatiche (diramazioni segmentarie o sub segmentarie) particelle solide sintetiche (Gelfoam, Ivalon, altre) o naturali (aggregati di fibrina) che embolizzano le arterie quando il calibro di queste diventa inferiore a quello delle particelle iniettate. Questa procedura può essere preceduta dalla iniezione intrarteriosa (TACE) di una emulsione di olio ultrafluido (Lipiodol) miscelato con agenti antineoplastici (doxorubicina, epidoxorubicina, cis-platino, 5- fluoro uracile) allo scopo di aggiungere un danno chemotossico a quello ischemico. Una

recente variazione (DC-beads TACE) di questa tecnica comporta l'uso di microsfere di plastica o vetro di 300-500  $\mu$  veicolanti l'agente chemioterapico. Le microsfere embolizzano in modo permanente le neoarteriole della neoplasia e rilasciano lentamente il chemioterapico<sup>(45,60)</sup>.

La chemioterapia intrarteriosa con pompa o la iniezione di lipiodol + agente chemioterapico (senza embolizzazione) non sono più utilizzate.

In passato la TACE è stata impiegata per trattamenti bilobari o lobari del fegato<sup>(14)</sup>; attualmente si preferisce avere un approccio quanto più possibile selettivo (segmentale) per ridurre il danno al parenchima non neoplastico.

La dimostrazione "evidence-based" della utilità clinica della TACE è stata raggiunta dopo la realizzazione di due studi randomizzati controllati che hanno evidenziato un incremento di OS in pazienti con HCC multifocale con buona funzione epatica trattati con tecnica segmentaria<sup>(32,34)</sup>.

La TACE rimane l'unico approccio trans arterioso standard per HCC e viene consigliato in primo luogo per HCC multifocale senza trombosi portale, ovvero in stadio intermedio (B)<sup>(30)</sup>.

Sia l'approccio tradizionale sia quello con DC-beads determinano una risposta locale buona ma molto variabile (16-60%)<sup>(32,65)</sup>. La tecnica DC-beads presenta una minore incidenza di effetti collaterali per il lento rilascio di chemioterapico<sup>(20)</sup> ed è meglio tollerata dai pazienti con funzione epatica non ottimale. Non sono stati dimostrati vantaggi in termini di sopravvivenza per una delle due tecniche.

Una variante interessante della TACE è la radioembolizzazione (TARE). Questa tecnica comporta la iniezione intrarteriosa epatica di particelle embolizzanti solide veicolanti un radionuclide  $\beta$ -emittente (<sup>90</sup>Yttrio)<sup>(49)</sup>. La necrosi del tessuto tumorale che si sviluppa nei mesi successivi riduce le masse neoplastiche e può disostruire e rivascularizzare anche l'albero portale già invaso dalla neoplasia. Si tratta di una tecnica molto costosa, realizzabile solo in centri specialistici forniti di angiologia interventistica e medicina nucleare e che finora non si è dimostrata capace di indurre risultati migliori della TACE in termini di sopravvivenza<sup>(50)</sup>.

## TERAPIA MEDICA

Fino a pochi anni fa nessun agente chemioterapico, usato singolarmente o in associazione, iniettato per via venosa generale o per via intra-arteriosa epatica, offriva alcuna efficacia nei confronti di questa neoplasia<sup>(35)</sup>.

I progressi della ricerca medica nel campo dei farmaci "targeted" ha portato alla scoperta di diversi agenti terapeutici tra i quali il sorafenib, un inibitore multichinasico con effetti antiproliferativi e anti-angiogenetici.

Il sorafenib agisce mediante il blocco delle vie correlate a Raf/MEK/ERK e del recettore del fattore di crescita endoteliale (VEGFR 2) e infine sul recettore del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFR- $\beta$ )<sup>(63,64)</sup>. Il sorafenib viene somministrato per via orale e si è dimostrato clinicamente utile per il carcinoma renale. L'HCC è una neoplasia con elevata neovascolarizzazione arteriosa che può essere contrastata dal blocco dei recettori specifici.

L'utilità del sorafenib nei confronti dell'HCC fu suggerita inizialmente da uno studio di fase II<sup>(1)</sup>. Successivamente, due ampi studi a doppio cieco randomizzati di fase III (SHARP e Asia-Pacific) dimostrarono in popolazioni differenti e con etiologie differenti l'efficacia clinica del sorafenib per il trattamento di HCC in fase avanzata (stadio C) con un prolungamento mediano di sopravvivenza di circa 3 mesi e con una risposta obiettiva sulle lesioni nel 3-4% dei casi<sup>(10,33)</sup>. Nello studio eseguito su pazienti occidentali gli effetti collaterali più frequenti furono la sindrome mano-piede, diarrea e astenia intensa; la sopravvivenza mediana dei pazienti trattati fu di 10.7 mesi mentre nei pazienti trattati con placebo fu di 7.9 mesi (HR 0.69; 95% CI 0.55-0.87;  $p < 0.001$ ); il tempo mediano alla progressione fu di 5.5 mesi versus 2.8 mesi (HR 0.58; 95% CI 0.45-0.74;  $p < 0.001$ )<sup>(33)</sup>. I risultati dello studio orientale confermarono le significatività statistiche. Il sorafenib rappresenta oggi il trattamento standard per il paziente con HCC in fase avanzata. Non sono stati finora dimostrati fattori clinici/biumorali predittivi per la risposta al sorafenib. Una review completa sul sorafenib è stata pubblicata nel 2011<sup>(13)</sup>.

Molti trials sperimentali sono in corso per definire se altri agenti (epidermal growth factor, insulin-like growth factor, fibroblast growth factor, c-MET, mTOR inhibitors e altri VEGFR e Raf inibitori) sono in grado di indurre un effetto antitumorale simile o superiore al sorafenib mantenendo un profilo di sicurezza simile o migliore. Finora nessun altro farmaco ha dimostrato di ottenere tali risultati<sup>(61)</sup>.

Studi di fase III (STORM e SPACE) su pazienti con HCC in fase precoce o intermedia (stadi A e B) trattati con TACE o con resezione/ablazione sono terminati di recente e si è in attesa dei risultati per definire se il sorafenib sia utile anche in stadi più precoci dell'avanzato.

## TERAPIA DI SUPPORTO

Come terapia di supporto si intendono tutte quelle misure volte a migliorare i sintomi del paziente e a compensare situazioni cliniche patologiche coesistenti con il problema neoplastico. Parlando di HCC associato a cirrosi epatica, è ovvio che in tutti i casi in cui il paziente presenti complicanze

della insufficienza epatica (ascite, varici esofagee sanguinanti o in fase preemorragica, encefalopatia) il medico applicherà quelle misure terapeutiche adatte a migliorare la situazione in parallelo ai trattamenti specifici per la neoplasia. Nello stadio D (terminale) la terapia di supporto rimane l'unica da praticare, essendo non indicate o controindicate le terapie specifiche per HCC.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, Amadori D, Santoro A, Figer A, De Greve J, Douillard JY, Lathia C, Schwartz B, Taylor I, Moscovici M, Saltz LB: *Phase II Study of Sorafenib in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma*. J. Clin. Oncol. 2006; 24: 4293-4300.
2. Bruix J, Castells A, Bosch J, Feu F, Fuster J, Garcia-Pagan JC, Visa J, Brù C, Rodes J: *Surgical resection of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: prognostic value of preoperative portal pressure*. Gastroenterology 1996; 111: 1018-1022.
3. Bruix J, Sala M, Llovet JM: *Chemoembolization for hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology 2004; 127: S179-188.
4. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, Christensen E, Pagliaro L, Colombo M, Rodés J: *Clinical Management of Hepatocellular Carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL Conference*. J. Hepatol. 2001; 35: 421-430.
5. Bruix J, Sherman M: *Management of Hepatocellular Carcinoma. An update*. Hepatology 2011; 53: 1020-1022.
6. Bruix J, Sherman M: *Management of Hepatocellular Carcinoma*. Hepatology 2005; 42: 1208-1236.
7. Brunello F, Veltri A, Carucci P, Pagano E, Ciccone G, Moretto P, Sacchetto P, Gandini G, Rizzetto M: *Radiofrequency ablation versus ethanol injection for early hepatocellular carcinoma: A randomized controlled trial*. Scand. J. Gastroenterol. 2008; 43: 727-35.
8. Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, Musso A, De Paolis P, Capussotti L, Salizzoni M, Rizzetto M: *Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology 2002; 123: 134-140.

9. Chen MS, Li JQ, Zheng Y, Guo RP, Liang HH, Zhang YQ, Lin XJ, Lau WY: *A prospective randomized trial comparing percutaneous local ablative therapy and partial hepatectomy for small hepatocellular carcinoma*. Ann. Surg. 2006; 243: 321-328.
10. Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, Luo R, Feng J, Ye S, Yang TS, Xu J, Sun Y, Liang H, Liu J, Wang J, Tak WY, Pan H, Burock K, Zou J, Voliotis D, Guan Z: *Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase II randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Lancet Oncol. 2009; 10: 25-34.
11. European Association for the study of the Liver – European Organisation for Research and Treatment of Cancer: *EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma*. J. Hepatol. 2012; 56: 908-43.
12. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM: *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int. J. Cancer 2010; 127: 2893-2917.
13. Finn RS: *Drug Therapy: Sorafenib*. Hepatology 2010; 51: 1843-1869.
14. Group d'Etude e de Traitment du Carcinome Hepatocellulaire: *A comparison of lipiodol chemoembolization and conservative treatment for unresectable hepatocellular carcinoma*. N. Engl. J. Med. 1995; 332: 1256-1261.
15. Guglielmi A, Ruzzenente A, Valdegamberi A, Pachera S, Campagnaro T, D'Onofrio M, Martone E, Nicoli P, Iacono C: *Radiofrequency ablation versus surgical resection for the treatment of hepatocellular carcinoma in cirrhosis*. J. Gastrointest. Surg. 2008; 12: 192-198.
16. Honda N, Guo Guo Q, Uchida H, Ohishi H, Hiasa Y: *Percutaneous hot saline injection therapy for hepatic tumors: an alternative to percutaneous ethanol injection therapy*. Radiology 1994; 190: 53-7.
17. Hong SN, Lee SY, Choi MS, Lee JH, Koh KC, Paik SW, Yoo BC, Rhee JC, Choi D, Lim HK, Lee KW, Joh JW: *Comparing the outcomes of radiofrequency ablation and surgery in patients with a single small hepatocellular carcinoma and well-preserved hepatic function*. J. Clin. Gastroenterol. 2005; 39: 247-252.
18. Ishizawa T, Hasegawa K, Aoki T, Takahashi M, Inoue Y, Sano K, Imamura H, Sugawara Y, Kokudo N, Makuuchi M: *Neither Multiple tumors nor portal hypertension are surgical contraindications for hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology 2008; 134: 1908-1916.
19. Kudo M: *The 2008 Okuda Lecture. Management of hepatocellular carcinoma: from surveillance to molecular targeted therapy*. J. Gastroenterol. Hepatol. 2010; 25: 439-452.
20. Lamm J, Malagari K, Vogl T, Pilleul F, Denys A, Watkinson A, Pitton M, Sergent G, Pfammatter T, Terraz S, Benhamou Y, Avajon Y, Gruenberger T, Pomoni M, Langenberger H, Schuchmann M, Dumortier J, Mueller C, Chevallier P, Lencioni R; PRECISION V Investigators: *Prospective randomized study of doxorubicin-eluting bead embolization in the treatment of hepatocellular carcinoma: results of PRECISION V study*. Cardiovasc. Intervent. Radiol. 2010; 33: 41-52.
21. Lencioni R: *Loco-regional treatment of hepatocellular carcinoma*. Hepatology 2010; 52: 762-73.
22. Lencioni RA, Allgaier HP, Cioni D, Olschewski M, Deibert P, Crocetti L, Frings H, Laubenberger J, Zuber I, Blum HE, Bartolozzi C: *Small hepatocellular carcinoma in cirrhosis: randomized comparison of radio-frequency thermal ablation versus percutaneous ethanol injection*. Radiology 2003; 228: 235-40.

23. Lin SM, Lin CJ, Lin CC, Hsu CW, Chen YC: *Radiofrequency ablation improves prognosis compared with ethanol injection for hepatocellular carcinoma < or = 4 cm*. *Gastroenterology* 2004; 127: 1714-1723.
24. Lin SM, Lin CJ, Lin CC, Hsu CW, Chen YC: *Randomised controlled trial comparing percutaneous radiofrequency thermal ablation, percutaneous ethanol injection, and percutaneous acetic acid injection to treat hepatocellular carcinoma of 3 cm or less*. *Gut* 2005; 54: 1151-1156.
25. Livraghi T, Benedini V, Lazzaroni S, Meloni F, Torzilli G, Vettori C: *Long term results of single session percutaneous ethanol injection in patients with large hepatocellular carcinoma*. *Cancer* 1998; 83: 48-57.
26. Livraghi T, Festi D, Monti F, Salmi A, Vettori C: *US-guided percutaneous alcohol injection of small hepatic and abdominal tumors*. *Radiology* 1986; 161: 309-312.
27. Livraghi T, Giorgio A, Marin G, Salmi A, de Sio I, Bolondi L, Pompili M, Brunello F, Lazzaroni S, Torzilli G: *Hepatocellular carcinoma and cirrhosis in 746 patients: long-term results of percutaneous ethanol injection*. *Radiology* 1995; 197: 101-8.
28. Livraghi T, Meloni F, Di Stasi M, Rolle E, Solbiati L, Tinelli C, Rossi S: *Sustained complete response and complications rates after radiofrequency ablation of very early hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Is resection still the treatment of choice?* *Hepatology* 2008; 47: 82-89.
29. Livraghi T, Solbiati L, Meloni MF, Gazelle GS, Halpern EF, Goldberg SN: *Treatment of focal liver tumors with percutaneous radio-frequency ablation: complications encountered in a multicenter study*. *Radiology* 2003; 226: 441-51.
30. Llovet JM, Bruix J: *Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: chemoembolization improves survival*. *Hepatology* 2003; 37: 429-442.
31. Llovet JM, Fuster J, Bruix J: *Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma versus transplantation*. *Hepatology* 1999; 30: 1434-1440.
32. Llovet JM, Real MI, Montaña X, Planas R, Coll S, Aponte J, Ayuso C, Sala M, Muchart J, Solà R, Rodés J, Bruix J: *Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in unresectable hepatocellular carcinoma: a randomized controlled trial*. *Lancet* 2002; 359: 1734-1739.
33. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira A, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J: *Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma*. *N. Engl. J. Med.* 2008; 359: 378-390.
34. Lo CM, Ngan H, Tso WK, Liu CL, Lam CM, Poon RT, Fan ST, Wong J: *Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma*. *Hepatology* 2002; 35: 1164-1171.
35. Lopez PM, Villanueva A, Llovet JM: *Systematic review: evidence-based management of hepatocellular carcinoma - an updated analysis of randomized controlled trials*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2006; 23: 1535-1547.
36. Lu MD, Kuang M, Liang LJ, Xie XY, Peng BG, Liu GJ, Li DM, Lai JM, Li SQ: *Surgical resection versus percutaneous thermal ablation for early-stage hepatocellular carcinoma: a randomized clinical trial*. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2006; 28: 801-805.

37. Lupo L, Panzera P, Giannelli G, Memeo M, Gentile A, Memeo V: *Single hepatocellular carcinoma ranging from 3 to 5 cm: radiofrequency ablation or resection?* HPB. 2007; 9: 429-434.
38. Marsh JW, Dvorchik I: *Liver organ allocation for hepatocellular carcinoma: are we sure?* Liver Transpl. 2003; 9: 693-696.
39. Mazzaferro V, Llovet JM, Miceli R, Bhoori S, Schiavo M, Mariani L, Camerini T, Roayaie S, Schwartz ME, Grazi GL, Adam R, Neuhaus P, Salizzoni M, Bruix J, Forner A, De Carlis L, Cillo U, Burroughs AK, Troisi R, Rossi M, Gerunda GE, Lerut J, Belghiti J, Boin I, Gugenheim J, Rochling F, Van Hoek B, Majno P; Metroticket Investigator Study Group: *Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis.* Lancet Oncol. 2009; 10: 35-43.
40. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, Montalto F, Ammatuna M, Morabito A, Gennari L: *Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis.* N. Engl. J. Med. 1996; 334: 693-699.
41. Montorsi M, Santambrogio R, Bianchi P, Donadon M, Moroni E, Spinelli A, Costa M: *Survival and recurrences after hepatic resection or radiofrequency for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: a multivariate analysis.* J. Gastrointest. Surg. 2005; 9: 62-67.
42. Nordenstedt H, White DL, El-Serag HB: *The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma.* Dig. Liver Dis. 2010; 42: S206-14.
43. Ohnishi K, Ohyama N, Ito S, Fujiwara K: *Small hepatocellular carcinoma: treatment with US-guided intratumoral injection of acetic acid.* Radiology 1994; 193: 747-52.
44. Orlando A, Leandro G, Olivo M, Andriulli A, Cottone M: *Radiofrequency thermal ablation vs. percutaneous ethanol injection for small hepatocellular carcinoma in cirrhosis: meta-analysis of randomized controlled trials.* Am. J. Gastroenterol. 2009; 104: 514-24.
45. Poon RT, Tso WK, Pang RW, Ng KK, Woo R, Tai KS, Fan ST: *A phase I/II trial of chemoembolization for hepatocellular carcinoma using a novel intra-arterial drug-eluting bead.* Clin. Gastroenterol. Hepatol. 2007; 5: 1100-1108.
46. Rossi S, Di Stasi M, Buscarini E, Cavanna L, Quaretti P, Squassante E, Garbagnati F, Buscarini L: *Percutaneous radiofrequency interstitial thermal ablation in the treatment of small hepatocellular carcinoma.* Cancer J. Sci. Am. 1995; 1: 73-81.
47. Ryu M, Shimamura Y, Kinoshita T, Konishi M, Kawano N, Iwasaki M, Furuse J, Yoshino M, Moriyama N, Sugita M: *Therapeutic results of resection, TAE and PEI in 3225 patients with hepatocellular carcinoma: a retrospective multicenter study.* Jpn. J. Clin. Oncol. 1997; 27: 251-257.
48. Sala M, Fuster J, Llovet JM, Navasa M, Solè M, Varela M, Pons F, Rimola A, Garcia-Valdecasas JC, Brù C, Bruix J, Barcelona Liver Cancer (BCLC) Group: *High pathological risk of recurrence after surgical resection for hepatocellular carcinoma: an indication for salvage liver transplantation.* Liver Transplant. 2004; 10: 1294-1300.
49. Salem R, Lewandowski RJ, Atassi B, Gordon SC, Gates VL, Barakat O, Sergie Z, Wong CY, Thurston KG: *Treatment of unresectable hepatocellular carcinoma with use of 90Y microspheres (TheraSphere): safety, tumor response and survival.* J. Vasc. Inter. Radiol. 2005; 16: 1627-1639.

50. Sangro B, Bilbao JI, Boan J, Martinez-Cuesta A, Benito A, Rodriguez J, Panizo A, Gil B, Inarraeraqui M, Herrero I, Quiroga J, Prieto J: *Radioembolization using 90Y-resin microspheres for patients with advanced hepatocellular carcinoma*. Int. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2006; 66: 792-800.
51. Shiina S, Teratani T, Obi S, Sato S, Tateishi R, Fujishima T, Ishikawa T, Koike Y, Yoshida H, Kawabe T, Omata MA: *Randomized controlled trial of radiofrequency ablation with ethanol injection for small hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology 2005; 129: 122-30.
52. Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA: *Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma: A Weight Connection*. Hepatology 2010; 51: 1820-1832.
53. Stroffolini T, Trevisani F, Pinzello G, Brunello F, Tommasini MA, Iavarone M, Di Marco V, Farinati F, Del Poggio P, Borzio F, Borzio M, Caturelli E, Di Nolfo MA, Gaeta GB: *Changing Pattern of Hepatocellular Carcinoma in Italy and implication for surveillance*. Dig. Liver Dis. 2011; 43: 875-880.
54. Sugiura N, Takata K, Ohto M, Okuda K, Hirooka N: *Percutaneous intratumoral injection of ethanol under ultrasound imaging for treatment of small hepatocellular carcinoma*. Acta. Hepatol. Jpn. 1983; 24: 920-923.
55. Todo S, Furukawa H, Japanese Study Group on Organ Transplantation: *Living donor liver transplantation for adult patients with hepatocellular carcinoma: experience in Japan*. Ann. Surg. 2004; 240: 451-459.
56. Torzilli G, Makuuchi M, Inoue K, Takayama T, Sakamoto Y, Sugawara Y, Kubota K, Zucchi A: *No-mortality liver resection for hepatocellular carcinoma in cirrhotic and non cirrhotic patients: is there a way?* Arch. Surg. 1999; 134: 984-992.
57. Torzilli G, Minagawa M, Takayama T, Inoue K, Hui AM, Kubota K, Ohmoto K, Makuuchi M: *Accurate preoperative evaluation of liver mass lesions without fine-needle biopsy*. Hepatology 1999; 30: 889-893.
58. Tremosini S, Reig M, Rodriguez de Lope C, Forner A, Bruix J: *Treatment of early hepatocellular carcinoma: toward personalized therapy*. Dig. Liver Dis. 2010; 42S: S242-S248.
59. Ueno S, Sakoda M, Kubo F, Hiwatashi K, Tateno T, Baba Y, Hasegawa S, Tsubouchi H; Kagoshima Liver Cancer Study Group: *Surgical resection versus radiofrequency ablation for small hepatocellular carcinomas within the Milan criteria*. J. Hepatobiliary Pancreat. Surg. 2009; 16: 359-366.
60. Varela M, Real MI, Burrel M, Forner A, Sala M, Brunet M, Ayuso C, Castells L, Montaña X, Llovet JM, Bruix J: *Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: efficacy and doxorubicin pharmacokinetics*. J. Hepatol. 2007; 46: 474-481.
61. Villanueva A, Llovet JP: *Targeted Therapies for Hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology 2011; 140: 1410-1426.
62. Vivarelli M, Guglielmi A, Ruzzenente A, Cucchetti A, Bellusci R, Cordiano C, Cavallaro A: *Surgical resection versus percutaneous radiofrequency ablation in the treatment of hepatocellular carcinoma in cirrhotic liver*. Ann. Surg. 2004; 240: 102-107.
63. Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, Schwartz B, Simantov R, Kelley S: *Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer*. Nat. Rev. Drug Discov. 2006; 5: 835-844.

64. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G, Trail PA: *BAY 43-9006 Exhibits Broad Spectrum Oral Antitumor Activity and Targets the RAF/MEK/ERK Pathway and Receptor Tyrosine Kinases Involved in Tumor Progression and Angiogenesis*. *Cancer Res.* 2004; 64: 7099-710.
65. Yang CF, Ho YJ: *Transcatheter arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma*. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1992; 31 S86-8.
66. Yao FY, Ferrel L, Bass NM, Watson JJ, Bacchetti P, Venook A, Ascher NL, Roberts JP: *Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of tumor size limits does not adversely impact survival*. *Hepatology* 2001; 33: 1394-1403.

## DANNO MACROVASCOLARE ED OSSEO NELLA SCLEROSI SISTEMICA PROGRESSIVA

Premio “Gianpiero Gaidano” 2007/2008

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

*Gilberto Calzolari<sup>2</sup>, Valeria Data<sup>1</sup>, Renato Carignola<sup>1</sup>,  
Laura Saba<sup>1</sup>, Alberto Angeli<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Clinica Medica Generale, Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche  
Università degli Studi di Torino

<sup>2</sup> Medicina Interna 3 - AOU San Luigi Gonzaga - Orbassano (TO)

**Key words:**     *Osteoprotegerin (OPG) / Osteoprotegerina (OPG)*  
                      *Receptor Activator of Nuclear / Receptor Activator of Nuclear*  
                      *factor Kappa-b (RANK)            factor Kappa-b (RANK)*  
                      *RANK ligand (RANKL) / RANK ligando (RANKL)*  
                      *Systemic Sclerosis (SSc) / Sclerosi Sistemica (SSc)*

### **Abstract:**

*Introduction:* The triad RANKL/RANK/OPG is critical in bone microenvironment, in immune system and in vascular biology. There is increasing evidence of a macrovascular damage in Systemic Sclerosis (SSc). Little is known about bone metabolism.

*Aim of the study:* To evaluate serum OPG and RANKL levels in patients with SSc. To find correlations between OPG and RANKL and bone density parameters, bone metabolism markers of and cardiovascular risk estimates.

*Population and methods:* In 60 patients (M/F 12/48, median age 58, range 31-72 years) and 60 healthy subjects matched for sex, age and menopausal status, were analyzed serum levels of OPG, RANKL, vascular cell adhesion molecule (VCAM) and bone turnover markers; in patients bone densitometry was performed and were estimated global cardiovascular and coronary risks.

*Results:* In patients RANKL and VCAM levels and RANKL/OPG ratio were higher than in controls; no significant differences were found in OPG levels. OPG concentrations, diversely from RANKL, positively correlated with age in patients and controls. No association was found between RANKL levels, disease duration and organ involvement. 14 patients were osteopenic and 13 osteoporotic. RANKL levels and RANKL/OPG ratio (but neither OPG nor bone turnover marker) inversely

correlated with densitometry parameters of lumbar spine and hip. In patients levels of 25-hydroxyvitamin D were significantly reduced in comparison to controls. Global cardiovascular risk in patients negatively correlated with RANKL/OPG ratio; coronary risk positively correlated with OPG. VCAM levels positively correlated with both the overall cardiovascular and coronary risk.

*Discussion:* in patients, increased levels of RANKL appear to be associated to osteopenia/osteoporosis, which can be, at least partially, ascribed to the reduced vitamin D levels. While VCAM, increased in both SSc and in atherosclerotic diseases, may reflect both the macro and microvascular damage, increased OPG levels in atherosclerosis but not in SSc, may be associated with macrovascular disease only.

### **Riassunto:**

*Introduzione:* La triade RANKL/RANK/OPG è cruciale nel microambiente osseo, nel sistema immunitario e nella biologia vascolare. Nella Sclerosi Sistemica (SSc) vi sono crescenti evidenze di un danno macrovascolare. Sono pochi gli studi riguardanti il metabolismo osseo.

*Obiettivi:* Valutare i livelli sierici di OPG e RANKL nei pazienti con SSc. Verificare correlazioni di OPG e RANKL con parametri osteodensitometrici, marcatori di metabolismo osseo e rischio cardiovascolare.

*Popolazione e metodi:* In 60 pazienti (M/F 12/48, età mediana 58, range 31-72 anni) e 60 soggetti sani appaiati per sesso, età e stato menopausale, sono stati determinati i livelli sierici di OPG, RANKL, *vascular cell adhesion molecule* (VCAM) e i marcatori di turnover osso; nei pazienti è stata eseguita densitometria ossea e sono stati stimati il rischio cardiovascolare e coronarico.

*Risultati:* Nei pazienti i livelli di RANKL e di VCAM ed il rapporto RANKL/OPG erano superiori rispetto ai controlli, senza differenze significative nei livelli di OPG. Le concentrazioni di OPG, ma non di RANKL, correlavano positivamente con l'età nei pazienti e nei controlli. Non è stata rilevata associazione tra i livelli di RANKL, durata di malattia e coinvolgimento d'organo. 14 pazienti erano osteoporotici e 13 osteopenici. I livelli di RANKL ed il rapporto RANKL/OPG (non di OPG né dei marcatori di turnover osseo) correlavano inversamente con i parametri densitometrici del rachide lombare e dell'anca. Nei pazienti i livelli di 25-idrossivitamina D sono risultati inferiori. Nei pazienti il rischio cardiovascolare globale correlava negativamente con il rapporto RANKL/OPG; il rischio coronarico correlava positivamente con l'OPG. I livelli di VCAM correlavano sia con il rischio cardiovascolare globale sia con quello coronarico.

*Discussione:* I livelli più alti di RANKL nei pazienti sembrano correlare con la presenza di osteopenia/osteoporosi, cui possono contribuire i ridotti

livelli di vitamina D. Mentre VCAM, aumentato sia nella SSc sia nella patologia aterosclerotica, può riflettere il danno sia macro che microvascolare, OPG aumentata nell'aterosclerosi ma non nella SSc, correlerebbe solo con la patologia macrovascolare.

La sclerosi sistemica (SSc) è una malattia cronica del connettivo caratterizzata da danno vascolare ed evoluzione fibrotica a livello cutaneo e viscerale. La patogenesi della SSc non è tuttora chiarita: è noto che il danno endoteliale e l'attivazione immunitaria giocano un ruolo preminente fin dalle fasi precoci di malattia, portando all'attivazione fibroblastica ed alla deposizione di collagene tissutale.

## DANNO MACROVASCOLARE

Sebbene il coinvolgimento microvascolare sia classicamente considerato preponderante nella SSc, vi sono evidenze non solo di un'umentata prevalenza di danno macrovascolare nei pazienti con SSc, ma anche di una significativa morbilità e mortalità ad esso attribuibili. Alle prime segnalazioni di patologia occlusiva dei grandi vasi in pazienti con SSc, negli anni si sono aggiunti studi epidemiologici che hanno sottolineato la rilevanza clinica del coinvolgimento cardiovascolare<sup>(13)</sup>.

Una revisione sistematica, pubblicata nel 2011, sul coinvolgimento aterosclerotico in corso di SSc (accertato mediante angiografia, ultrasonografia doppler carotidea per la presenza di placche o di incremento dell'*intima media thickness* (IMT), tomografia computerizzata, risonanza magnetica nucleare, vasodilatazione mediata dal flusso, indice caviglia-braccio, autopsia) ha dimostrato una elevata prevalenza nei pazienti con SSc di aterosclerosi coronarica, arteriopatía periferica, calcificazioni cerebrovascolari rispetto alla popolazione generale<sup>(3)</sup>.

Un secondo recente lavoro ha dimostrato come la prevalenza di malattia coronarica nei pazienti con SSc, a parità dei noti fattori di rischio cardiovascolari, sia significativamente superiore rispetto alla popolazione generale<sup>(18)</sup>.

Nonostante l'impatto del danno macrovascolare stia emergendo in tutta la sua rilevanza accanto alle altre più note complicanze della SSc (quali l'interstiziopatía polmonare, l'ipertensione arteriosa polmonare, la crisi renale) attualmente non ne sono stati chiariti appieno la natura, nè le caratteristiche cliniche. I pochi dati istologici disponibili (fibrosi a carico della media, distruzione della lamina elastica interna, senza depositi lipidici ed infiltrati infiammatori) suggeriscono che il danno sia legato ad un primitivo danno endoteliale ed alla successiva fibrosi. La ridotta riserva coronarica e renale evidenziata nei pazienti con SSc e l'alterata vasodilatazione inducibile, possono riflettere il danno endoteliale. L'insieme dei dati finora prodotti non pare supportare l'ipotesi di un'aterosclerosi accelerata, osservata in altre patologie autoimmuni come il lupus eritematoso sistemico e l'artrite reumatoide; in

queste ultime condizioni sembra infatti cruciale il ruolo dell'inflammatione sistemica protratta, un aspetto minore nella fisiopatologia della SSc.

Non è chiaro se esistano relazioni tra interessamento macrovascolare e variabili quali il sesso e le caratteristiche della malattia, il quadro anticorpale ed il coinvolgimento d'organo. Data la variabilità di presentazione della malattia, la ricerca di queste relazioni richiederebbe casistiche più ampie di quelle finora studiate.

Non sono note, infine, le implicazioni prognostiche di segni precoci di aterosclerosi, come l'incremento dell'IMT, sullo sviluppo e la progressione della malattia macrovascolare, nè il ruolo delle terapie, in particolare modo di quelle vasoattive ed anti-aggreganti (prostanoidi, calcio-antagonisti, antagonisti recettoriali dell'endotelina, acido acetilsalicilico).

## DANNO OSSEO

La prevalenza di osteoporosi nei pazienti affetti da SSc oscilla tra 6.7% e 51.1% nei diversi studi, e non è chiaro se essa risulti aumentata rispetto alla popolazione generale<sup>(5,7,8,10,15,16,21)</sup>. Mancano inoltre dati sulla prevalenza ed incidenza di fratture da fragilità, cliniche e vertebrali morfometriche. I fattori di rischio per osteoporosi con prevalenza maggiore nei pazienti affetti da SSc includono un ridotto indice di massa corporea (imputabile al deficit d'assorbimento da interessamento gastrointestinale), la menopausa precoce<sup>(25)</sup> ed il minor esercizio fisico (ostacolato da elevati tassi di disabilità nella SSc). L'osteoporosi sembra essere più frequente nei pazienti con forma diffusa e danno d'organo. L'uso di glicocorticoidi non sembra influenzare la frequenza della diagnosi di osteoporosi nei pazienti<sup>(20)</sup>.

Non sono state evidenziate anomalie specifiche a carico del metabolismo calcio-fosforico. I livelli di 25-idrossivitamina D (25(OH)D), benché invocati come concausa alla ridotta massa ossea, sono stati determinati in una minoranza di lavori<sup>(1)</sup>. Per quanto riguarda i marcatori di neoformazione ossea (fosfatasi alcalina, osteocalcina, propeptidi N- e C-terminali del procollagene di tipo I), i pochi studi disponibili riportano valori sovrapponibili a quelli della popolazione generale<sup>(1,2)</sup>. Sono stati più ampiamente studiati i marcatori di riassorbimento (in particolare, piridinoline orinarie ed alcuni dei telopeptidi del collagene di tipo I (ICTP e CTX sierici), dei quali la maggioranza degli Autori riporta livelli aumentati nei pazienti con SSc. Tuttavia mentre alcuni hanno evidenziato una correlazione di tali marcatori con la BMD<sup>(15)</sup>, altri hanno osservato una correlazione con l'impegno cutaneo e polmonare<sup>(2,12)</sup>. Dal momento che il collagene di tipo I è espresso da tessuto osseo e cutaneo, è

stato proposto che i livelli circolanti dei prodotti di degradazione del collagene possano rappresentare dei marcatori di attività e/o di gravità di malattia<sup>(9)</sup>. Infine, mancano attualmente studi sui più recenti marcatori di attività osteoclastica, quali l'isoforma 5b della fosfatasi acida tartrato-resistente e la catepsina K.

## **IL SISTEMA RANKL/RANK/OPG**

Il ruolo del sistema RANKL, RANK, osteoprotegerina (OPG) nel microambiente osseo è stato oggetto di una intensa attività di ricerca<sup>(4,19,22)</sup>. Nell'osso RANKL espresso dagli osteoblasti attiva i progenitori osteoclastici esprimenti RANK e li induce a differenziare in osteoclasti in grado di degradare la matrice ossea. OPG esercita un'azione antagonista rispetto a quella di RANKL: l'equilibrio tra OPG e RANKL è quindi un determinante cruciale del rimodellamento osseo.

L'aterosclerosi e l'osteoporosi rappresentano due tra le più rilevanti patologie, spesso coesistenti, nella popolazione. Patologie multifattoriali, accompagnano il processo di invecchiamento e condividono alcuni fattori di rischio (ipertensione, diabete mellito, fumo, abuso di alcool, insufficienza renale, ridotta attività fisica). Numerosi Autori hanno osservato la frequente associazione, soprattutto nelle donne, tra osteoporosi ed eventi cardiovascolari. È stato ipotizzato che la relazione dipenda da comuni meccanismi molecolari. Una notevole mole di lavori ha evidenziato le implicazioni del sistema RANKL/RANK/OPG nella patogenesi della malattia aterosclerotica. Inoltre i livelli circolanti di RANKL, e soprattutto di OPG, sono stati proposti come marcatori sierici di vasculopatia<sup>(22)</sup>.

## **STUDIO SPERIMENTALE**

La triade RANKL/RANK/OPG è di primaria importanza nel microambiente osseo, ma anche nel sistema immunitario e nella biologia vascolare. Non è noto il coinvolgimento del sistema RANKL/RANK/OPG nello sviluppo del danno vascolare e osseo in corso di SSc.

## **OBIETTIVI DELLO STUDIO**

Nel presente lavoro sono stati analizzati i risultati di uno studio trasversale finalizzato a:

1. Confrontare i livelli sierici di OPG e sRANKL nei pazienti affetti da SSc e nei rispettivi controlli appaiati per sesso, età e stato menopausale

2. Verificare se OPG e sRANKL correlano con un noto marcatore di attivazione/disfunzione endoteliale (sVCAM) e con il rischio cardiovascolare/coronarico, da un lato, e con i parametri di danno osseo, dall'altro.

## MATERIALI E METODI

### Popolazione

60 pazienti adulti consecutivi affetti da SSc (12 maschi e 48 femmine, età mediana 58 anni, *range* 31-72) sono stati reclutati nell'unità di Immunoreumatologia della S.C.D.U. Medicina Interna I dell'A.O.U. San Luigi di Orbassano, a partire dal 2002 sino al 2008. Il gruppo di controllo è rappresentato da 60 soggetti sani (12 maschi e 48 femmine, età mediana 58 anni, *range* 33-73) appaiati per età, sesso e stato menopausale, reclutati nello stesso periodo tra i donatori di sangue dell'AVIS di Torino, e tra il personale dello staff sanitario. I soggetti sani in terapia con farmaci in grado di interferire con il metabolismo osseo sono stati esclusi.

La SSc è stata definita e classificata in accordo con i criteri dell'*American College of Rheumatology* e quelli proposti da LeRoy<sup>(17)</sup>. I criteri di esclusione applicati comprendono: anamnesi di patologie del metabolismo osseo; insufficienza renale definita come creatinina sierica  $\geq 1.5$  mg/dl, *clearance* creatinica  $\leq 30$  ml/min o anamnesi di crisi renale sclerodermica; pregresso infarto miocardico acuto o *stroke*; malattia neoplastica. La valutazione dei pazienti è stata comprensiva di anamnesi, esame obiettivo, esami bioumorali di *routine*, radiogramma e tomografia computerizzata ad alta risoluzione del torace, prove di funzionalità respiratoria, elettrocardiogramma, ecocardiocolordoppler, capillaroscopia.

Il protocollo di studio è stato preparato in ottemperanza al protocollo di Helsinki ed approvato dal locale Comitato Etico. Per tutti i soggetti è stato ottenuto un consenso informato scritto.

### Analisi bioumorali

I campioni di sangue venoso periferico sono stati prelevati a digiuno, centrifugati per 15' a 1000 g entro 2 ore ed immediatamente congelati a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Gli analiti dosati, le metodiche, i reagenti utilizzati e le variabili analitiche sono riassunti in Tabella I.

Calcemia, fosforemia e albuminemia sono state misurate utilizzando il kit Aeroset System (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). Il calcio

<b>Analita</b>	<b>Metodica</b>	<b>Reagenti</b>	<b>Range</b>	<b>CMR</b>	<b>CV inter- ed intra-assay</b>
<b>OPG</b>	ELISA <sup>1</sup>	OPG DuoSet, R&D Systems, Abingdon, UK	62.5 - 4000 pg/ml	25.7 pg/ml	4.6% e 3.5%
<b>sRANKL</b>	ELISA <sup>2</sup>	Immundiagnostik, Bensheim, Germany	370 - 30000 pg/ml	1.56 pg/ml	2.7% e 3.3%
<b>sVCAM</b>	ELISA	R&D Systems, Abingdon, UK	6.25 - 200 ng/ml	< 2 ng/ml	< 5%
<b>bALP</b>	RIA	Tandem-R Ostase, Beckman Coulter; Fullerton, CA, USA	15 - 120 µg/l	2 µg/l	4.9% e 7.4%
<b>OC</b>	ELISA	N-MID Osteocalcin One Step ELISA, Nordic Bioscience Diagnostics A/S; Herlev, DK	5.9-91.7 ng/ml	0.5 ng/ml	2.6 e 4.7%
<b>sCTX</b>	ELISA	Serum CrossLaps One Step ELISA, Nordic Bioscience Diagnostics A/S; Herlev, DK	126-2505 pg/ml	12 pg/ml	5.2% e 6.7%
<b>25-OH vit. D</b>	RIA	Gamma-B 25-Hydroxy Vitamin D, Immunodiagnostic Systems; Boldon, UK	1.6-160 ng/ml	1.2 ng/ml	5.5% e 7.9%

Tabella I. Analiti, metodiche e variabili analitiche.

Legenda: OPG: osteoprotegerina; sRANKL: RANKL solubile; sVCAM: *soluble vascular-cell adhesion molecule*, frazione solubile di VCAM; bALP: isoforma ossea della fosfatasi alcalina; OC: osteocalcina; sCTX: *carboxy-terminal telopeptide of type I collagen*, telopeptide carbossi terminale del collagene di tipo I; CMR: concentrazione minima rilevabile; CV: coefficiente di variazione.

<sup>1</sup> OPG totale. Metodica sviluppata nel Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche afferente alla S.C.D.U. Medicina Interna I dell'A.O.U. San Luigi, Orbassano (TO)

<sup>2</sup> sRANKL totale.

“corretto” per l’albumina è stato ottenuto dalla seguente formula: calcio “corretto” (mmol/l) = calcio totale (mmol/l) + [40 – (albumina (g/dl) x 10)] x 0,02.

### **Stima del rischio cardiovascolare e coronarico**

Nei soli pazienti sono stati calcolati il rischio cardiovascolare globale ed il rischio coronarico assoluto a 10 anni.

Il rischio cardiovascolare globale (la probabilità di un primo evento cardiovascolare maggiore - infarto del miocardio o ictus) è stato stimato secondo l’algoritmo sviluppato dall’Istituto Superiore di Sanità nell’ambito del Progetto Cuore (<http://www.cuore.iss.it/sopra/calc-rischio.asp>, ultimo accesso: 4 dicembre 2008). Tale algoritmo è applicabile a soggetti senza storia di eventi cardiovascolari, di età compresa tra i 35 ed i 69 anni e contempla i seguenti fattori di rischio: sesso, età, presenza di diabete, abitudine al fumo, pressione arteriosa sistolica, colesterolemia totale, HDL-colesterolemia e trattamento anti-ipertensivo.

Il rischio coronarico assoluto è stato determinato mediante un algoritmo della Società Italiana per lo Studio dell’Arteriosclerosi (<http://www.sisalombardia.it/calcolo.html>, ultimo accesso: 4.12.2008). Esso è applicabile a soggetti senza storia di eventi precedenti di età compresa tra i 30 ed i 74 anni, e considera i seguenti fattori: età, sesso, pressione arteriosa sistolica, colesterolemia totale ed HDL, presenza di diabete, abitudine al fumo, presenza di ipertrofia ventricolare sinistra.

I dati disponibili hanno permesso di effettuare tali stime in un sottogruppo di 38 soggetti sani.

### **Analisi statistica**

L’analisi dei dati è stata eseguita con il programma Statistica 6.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). I dati sono stati espressi come mediana e *range*; sono stati utilizzati i seguenti test statistici: test U di Mann-Whitney per le differenze tra medie; test di Spearman per le correlazioni. Livello di significatività statistica:  $p < 0.05$ .

## **RISULTATI**

I dati demografici, clinici, densitometrici e di laboratorio sono riportati nella Tabella II. Nei pazienti abbiamo osservato livelli sierici di sRANKL ( $p = 0.01$ ) ed un rapporto sRANKL/OPG superiori rispetto ai controlli ( $p = 0.01$ ). Non è stata evidenziata una differenza significativa nei livelli di OPG. I livelli sierici

Età (anni)	58 (31-72)
Maschi/femmine	12/48
Donne in menopausa (%)	37 (77)
Età alla menopausa (anni)	48 (39-54)
Indice di massa corporea (kg/m <sup>2</sup> )	25.0 (15.4-37.1)
Fumatori/Ex fumatori (%)	2 (3)/10 (17)
Durata di malattia dalla diagnosi (anni)	3 (0-39)
Forma cutanea diffusa/limitata	13/47 (22/78)
Anticorpi anti-topoisomerasi I/anti-centromero	24/24 (40/40)
Fenomeno di Raynaud	59 (98)
Ulcere attive	17 (28)
Calcinosi	5 (8)
Coinvolgimento gastrointestinale	42 (70)
Coinvolgimento polmonare	32 (53)
Pressione arteriosa polmonare all'ecocardiogramma > 35 mmHg	34 (57)
Coinvolgimento cardiaco	8 (19)
Coinvolgimento muscolo-scheletrico	8 (13)
Coinvolgimento articolare	14 (23)
Terapia in corso con	
– prednisone (≤ 10 mg/die)	23 (38)
– immunosoppressori	9 (15)
– antiaggregante piastrinico	44 (73)
– iloprost	20 (33)
– calcio e vitamina D	14 (23)
– bisfosfonati	7 (12)
Rischio cardiovascolare globale a 10 anni (%)	2.45 (0.20-16)
Rischio coronarico assoluto a 10 anni (%)	7.61 (0.25-31.7)
BMD lombare (g/cm <sup>2</sup> )	0.920 (0.593-1.140)
T-score colonna L <sub>1</sub> -L <sub>4</sub>	-1.45 (-4.13-0.84)
Z-score colonna L <sub>1</sub> -L <sub>4</sub>	-0.47 (-2.61-2.27)
Densità minerale ossea femore (g/cm <sup>2</sup> )	0.850 (0.543-1.088)
T-score femore totale	-0.82 (-3.27-1.13)
Z-score femore totale	-0.34 (-2.27-3.00)
25-idrossivitamina D (ng/ml)	23 (3-92)
bALP (µg/l)	9.3 (1.0-27.0)
OC (ng/ml)	15.2 (0.3-42.5)
CTX (ng/ml)	0.78 (0.15-2.60)

Tabella II. Caratteristiche cliniche dei pazienti con SSc.

Legenda: i dati sono espressi come numero di pazienti (%) o mediana (*range*). BMD: densità minerale ossea (*bone mineral density*); bALP: isoenzima osseo della fosfatasi alcalina; OC: osteocalcina; CTX: telopeptide C del collagene di tipo I.

di sVCAM si sono dimostrati marcatamente maggiori nei pazienti rispetto ai controlli ( $p < 0.0001$ , Figura 1).

Abbiamo effettuato analisi di sottogruppo e di correlazione alla ricerca di associazioni tra gli analiti e variabili demografiche, cliniche, densitometriche e laboratoristiche (Tabella II). Nei pazienti maschi, i livelli di OPG sono risultati inferiori rispetto a controlli ed alle pazienti donne ( $p = 0.06$  e  $p = 0.01$ , rispettivamente); non era evidenziabile alcuna differenza nei livelli di sRANKL e nel rapporto sRANKL/OPG. Le concentrazioni di OPG, ma non di sRANKL, correlavano positivamente con l'età sia nei pazienti ( $R = 0.50$ ,  $p < 0.001$ ) che nei controlli ( $R = 0.56$ ,  $p < 0.001$ ).

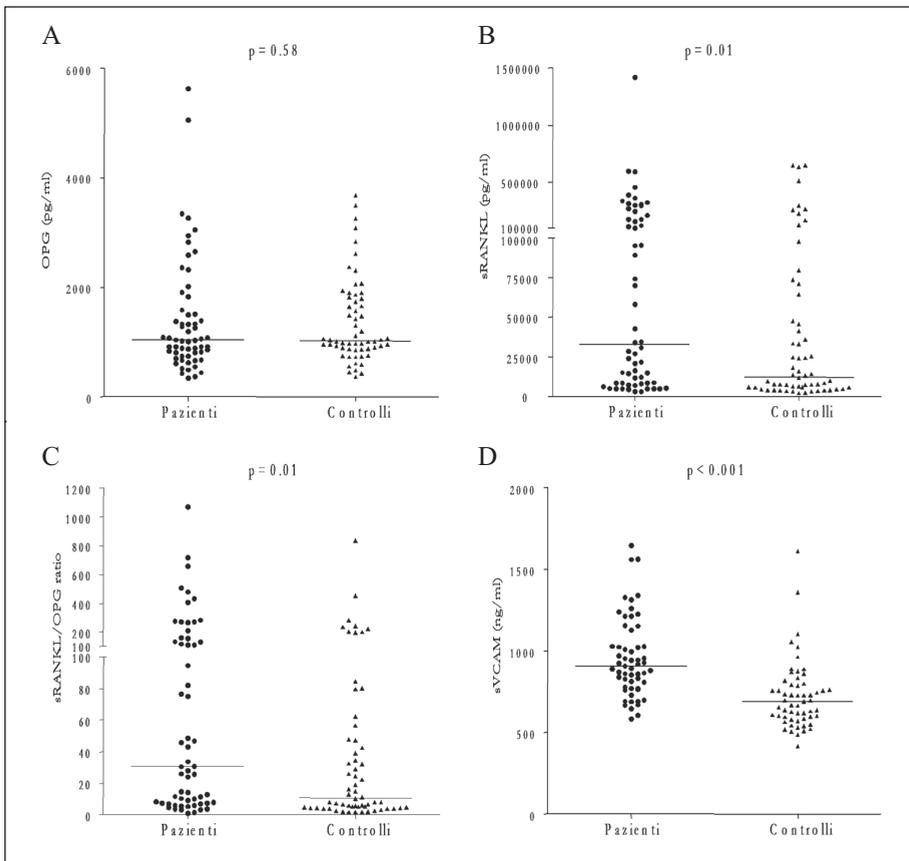


Figura 1. Livelli sierici di OPG (A), sRANKL (B), sRANKL/OPG ratio (C) e livelli sierici di sVCAM (D) nei pazienti con SSc e nei controlli. Sono rappresentati dati individuali e mediana (linea orizzontale).

Nei pazienti, i livelli di OPG sono risultati significativamente superiori in quelli con ulcere attive e in quelli con calcinosi rispetto a quelli indenni da lesioni (Tabella III). Non sono state osservate differenze rispetto ai diversi trattamenti farmacologici. I livelli di sRANKL non hanno mostrato significative associazioni. I livelli di sVCAM, nel gruppo dei pazienti, erano superiori in quelli con interessamento cardiaco (Tabella III).

		Pazienti con	Pazienti senza	p
<b>OPG</b> (pg/ml)	Ulcere attive	1518 (633-3356)	919 (348-5627)	0.04
	Calcinosi	2659 (919-5627)	1032 (348-5063)	0.03
	Iperensione	1308 (752-5627)	922 (348-3356)	0.04
	IVS	2663 (1336-5063)	923 (348-5627)	< 0.001
<b>sRANKL</b> (ng/ml)	Antiaggreganti	39 (5-1421)	15 (3-457)	0.03
<b>sVCAM</b> (ng/ml)	Coinvolgimento cardiaco	1010 (761-1563)	878 (585-1648)	0.03

Tabella III. Livelli sierici di OPG, sRANKL e sVCAM nei pazienti con SSc: analisi per sottogruppi.

Legenda: i dati sono espressi come mediana (range). sRANKL, RANKL solubile; OPG, osteoprotegerina; IVS: ipertrofia ventricolare sinistra.

Il rischio cardiovascolare globale era simile nei pazienti e nei controlli. In entrambi i gruppi, i livelli di OPG correlavano positivamente con il rischio cardiovascolare globale ( $R = 0.28$ ,  $p = 0.05$ , e  $R = 0.40$ ,  $p = 0.01$ , rispettivamente); nei pazienti i livelli di OPG correlavano anche con il rischio coronarico ( $R = 0.34$ ,  $p < 0.01$ ), ed erano più alti in quelli ipertesi e con ipertrofia ventricolare sinistra (Tabella III). I livelli di sVCAM correlavano sia con il rischio cardiovascolare globale che con quello coronarico ( $R = 0.27$ ,  $p = 0.06$  e  $R = 0.38$ ,  $p < 0.01$ , rispettivamente), senza associazioni con i “classici” fattori di rischio cardiovascolare.

Per quanto concerne il metabolismo osseo, secondo la classificazione WHO, 14 pazienti sono stati classificati come osteoporotici, e 16 come osteopenici in base alla DXA. I parametri densitometrici sia della colonna lombare che dell'anca correlavano inversamente con sRANKL ma non con OPG né con i

	Popolazione (n = 52)		Maschi (n = 11)		Femmine (n = 41)	
	Spearman R	P	Spearman R	P	Spearman R	P
<b>BMD lombare</b> (g/cm <sup>2</sup> )	-0.35	0.01	-0.57	0.07	-0.33	0.04
<b>T-score lombare</b>	-0.26	0.06	-0.41	0.20	-0.26	0.10
<b>Z-score lombare</b>	-0.29	0.04	-0.18	0.59	-0.36	0.02
<b>BMD anca</b> (g/cm <sup>2</sup> )	-0.34	0.02	-0.60	0.09	-0.32	0.05
<b>T-score anca totale</b>	-0.32	0.03	-0.68	0.04	-0.27	0.10
<b>Z-score anca totale</b>	-0.28	0.06	-0.70	0.04	-0.23	0.16

Tabella IV. Correlazioni dei livelli sierici di sRANKL con i parametri densitometrici nei pazienti con SSc.

Legenda: BMD: densità minerale ossea (*bone mineral density*).

marcatori di *turnover* osseo (Tabella IV). I livelli di 25(OH)D sono risultati significativamente inferiori nei pazienti rispetto ai controlli (Figura 2); tale differenza restava significativa restringendo l'analisi ai soggetti appaiabili per stagione di prelievo (per controllare la variabilità stagionale dei livelli di 25(OH)D). 4 pazienti presentavano un deficit severo (< 10 ng/ml), 17 erano nel *range* di insufficienza ( $\geq 10$  e  $\leq 20$  ng/ml) e 17 in quello di lieve ipovitaminosi (20-30 ng/ml). I livelli di fosfatasi alcalina ossea (bALP) e osteocalcina (OC) erano simili nei due gruppi, mentre quelli di CTX nei pazienti erano superiori ai limiti della significatività. Nei pazienti, ma non nei controlli, OPG correlava negativamente con il CTX ( $R = -0.32$ ,  $p = 0.01$ ), mentre sRANKL correlava positivamente con OC ( $R = 0.33$ ,  $p = 0.01$ ) (Tabella V).

In un'analisi multivariata in cui sono stati inclusi le ulcere attive, le calcinosi, il rischio coronarico ed il CTX come possibili predittori indipendenti di OPG ( $R^2 = 0.23$ ,  $p < 0.001$ ), le variabili associate in modo significativo all'OPG erano il CTX ( $\beta = -0.33$ ,  $p < 0.01$ ) e le calcinosi ( $\beta = 0.38$ ,  $p < 0.01$ ). Nell'analisi multivariata con antiaggreganti, BMD lombare e femorale e OC come possibili predittori indipendenti di sRANKL ( $R^2 =$

0.19,  $p < 0.01$ ), le variabili significativamente associate erano la terapia antiaggregante ( $\beta = 0.28$ ,  $p = 0.047$ ), la BMD dell'anca ( $\beta = -0.33$ ,  $p = 0.02$ ) e l'OC ( $\beta = 0.33$ ,  $p = 0.02$ ).

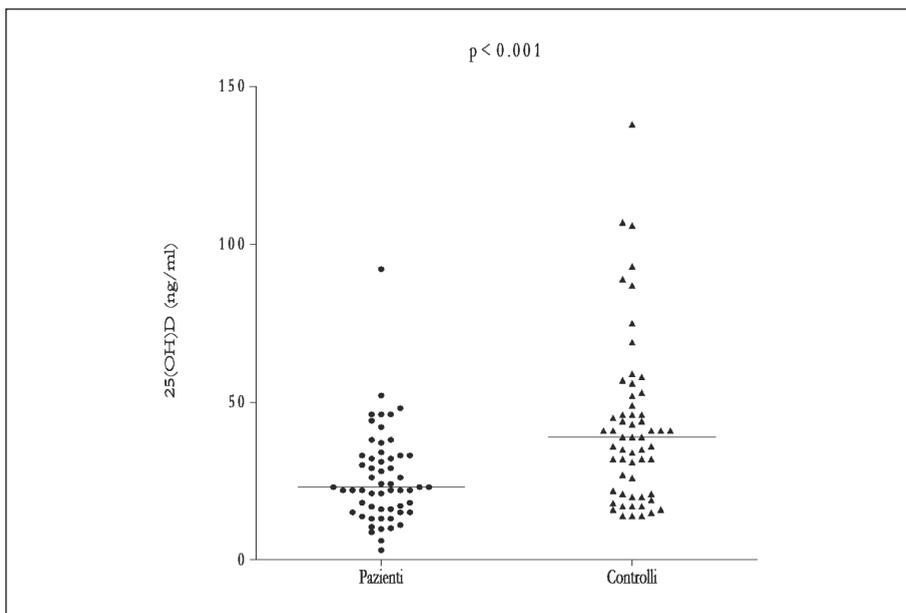


Figura 2. Livelli sierici di 25 idrossivitamina D nei pazienti con SSc e nei controlli. Sono rappresentati dati individuali e mediana (linea orizzontale).

	sRANKL	bALP	OC	sCTX	25(OH)D
OPG	0.12	0.21	-0.11	-0.32*	-0.002
sRANKL		0.13	0.33*	0.14	-0.06
bALP			0.44***	0.14	-0.22
OC				-0.54***	-0.30*
sCTX					-0.30*

Tabella V. Coefficiente R di Spearman di correlazione tra i livelli sierici di sRANKL, OPG, 25 idrossivitamina D e i marcatori di turnover osseo nei pazienti con SSc.

Legenda: sRANKL, RANKL solubile; OPG, osteoprotegerina; bALP, fosfatasi alcalina ossea; OC, osteocalcina; sCTX, telopeptide C del collagene di tipo I; 25(OH)D, 25-idrossivitamina D.

\*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

## DISCUSSIONE

Il risultato più originale del nostro lavoro è il riscontro dell'aumento di sRANKL e sRANKL/OPG nei pazienti con SSc; tuttavia, essi non correlavano né con variabili cliniche di malattia, né con sVCAM. Abbiamo inoltre riscontrato correlazioni negative di sRANKL e sRANKL/OPG con i parametri densitometrici. I pazienti con SSc mostravano livelli di 25(OH)D inferiori rispetto ai controlli, in possibile relazione a malassorbimento e ridotta esposizione solare. L'ipovitaminosi D è un fattore patogeneticamente importante per spiegare l'aumentata prevalenza di osteoporosi osservata da alcuni Autori nella SSc.

La correlazione negativa dei livelli di sRANKL con i parametri densitometrici è coerente con la nota funzione pro-osteoclastica di questa citochina nel microambiente osseo. Tuttavia, i precedenti studi di correlazione tra sRANKL e massa ossea o marcatori di metabolismo osseo hanno condotto a risultati contrastanti. Le ragioni di tale eterogeneità potrebbero essere imputabili a differenze nella popolazione di studio, nei metodi e nelle sedi di valutazione densitometrica, e nelle metodiche analitiche di sRANKL. È probabile che i livelli di sRANKL riflettano un'alterazione del microambiente osseo piuttosto che il danno vascolare.

Analizzando il metabolismo osseo, non emergevano differenze nei marcatori di formazione ossea, mentre il CTX è risultato aumentato nei pazienti. La correlazione di CTX con bALP ed OC è coerente con il suo ruolo di marcatore di *turnover* osseo; la correlazione negativa con la 25(OH)D suggerirebbe una condizione di iperparatiroidismo secondario determinante un aumento di *turnover* osseo. Un'origine extraossea di CTX è stata suggerita da Allanore<sup>(2)</sup>, che ha riportato un'associazione tra incremento del CTX in pazienti con SSc e coinvolgimento polmonare. Più in generale, è stato proposto l'uso dei prodotti di degradazione del collagene di tipo I (quali l'ICTP) come "marcatori di fibrosi", correlati all'attività e/o alla severità di malattia. Nel presente studio non è stata evidenziata un'associazione tra livelli di CTX e coinvolgimento polmonare.

Il presente studio non ha rilevato differenze nei livelli di OPG tra pazienti e controlli sani. La correlazione dei livelli di OPG con l'età è nota<sup>(8)</sup>. Il fatto che tale correlazione sia simile anche nel gruppo dei pazienti conferma come i livelli di OPG non siano significativamente influenzati da variabili connesse alla patologia. I livelli di OPG mostrano invece una correlazione significativa con le stime di rischio cardiovascolare e coronarico. Dalla letteratura emerge come i livelli sierici di OPG siano incrementati nei pazienti con coronaropatia, aumentata IMT, calcificazioni coronariche ed aortiche. Inoltre, sono stati

associati ad una pletera di fattori di rischio cardiovascolare (età, diabete, ipertensione, fumo, flogosi sistemica, infezioni croniche, iperomocisteinemia) ed al rischio coronarico assoluto nei pazienti con sindrome di Cushing<sup>(7)</sup>. I livelli di OPG predicono i tassi di mortalità cardiovascolare in donne anziane e di eventi cardiovascolari nella popolazione generale. Dal momento che gli studi *in vitro* ed i modelli *knockout in vivo* depongono per un ruolo protettivo dell'OPG sulle cellule endoteliali, il riscontro di livelli incrementati nei pazienti con aterosclerosi appare paradossale. Inizialmente, tale incremento è stato attribuito ad una risposta compensatoria, sebbene inadeguata, al danno endoteliale. Successivamente, diversi studi animali hanno dimostrato che il sistema RANKL/RANK/OPG interviene tardivamente nello sviluppo della placca aterosclerotica. Sembra dunque più plausibile ritenere l'OPG circolante un marcatore di danno vascolare consolidato piuttosto che di danno/disfunzione endoteliale precoce. Il confronto tra i dati di OPG e di sVCAM chiarisce il diverso significato dei due analiti in relazione alla patologia macrovascolare. In linea con la letteratura precedente<sup>(14)</sup>, i livelli di sVCAM si sono dimostrati marcatamente maggiori nei nostri pazienti. Inoltre sVCAM correla con il rischio cardiovascolare e coronarico. In letteratura sono riportati elevati livelli circolanti di sVCAM anche in corso di malattia aterosclerotica<sup>(11)</sup>. Dunque, OPG e sVCAM si comportano similmente nei pazienti con aterosclerosi, mentre divergono in quelli con SSc. Una plausibile interpretazione di questa discrepanza è che sVCAM rifletta il danno/disfunzione endoteliale sia micro- che macrovascolare, mentre l'aumento dell'OPG circolante nell'aterosclerosi esprimerebbe altre componenti del danno macrovascolare, quale il coinvolgimento (*in extremis* la calcificazione) della tonaca media. Il fatto che sVCAM non correli con variabili di malattia quali l'interessamento d'organo (a parte quello cardiaco) o il trattamento farmacologico suggerisce che l'aumento dei suoi livelli circolanti rifletta un momento patogenetico precoce (il danno endoteliale), comune alle diverse forme ed indipendente dalla successiva evoluzione.

## CONCLUSIONI

Dallo studio trasversale da noi condotto sono emersi livelli più alti di sRANKL e sRANKL/OPG nei pazienti verosimilmente correlabili alla ridotta massa ossea. I nostri dati mostrano inoltre una discrepanza tra sVCAM, marcatore di disfunzione endoteliale sia nella SSc sia in patologie aterosclerotiche, ed OPG. È possibile che sVCAM rifletta il danno sia macro- sia microvascolare, mentre l'OPG correlerebbe solo con la patologia macrovascolare.

## BIBLIOGRAFIA

1. Alexandersson BT, Geirsson AJ, Olafsson I, Franzson L, Sigurdsson G, Gudbjornsson B: *Bone mineral density and bone turnover in systemic sclerosis*. *Laeknabladid* 2007; 93: 535-541.
2. Allanore Y, Borderie D, Lemaréchal H, Cherruau B, Ekindjian OG, Kahan A: *Correlation of serum collagen I carboxyterminal telopeptide concentrations with cutaneous and pulmonary involvement in systemic sclerosis*. *J. Rheumatol.* 2003; 30: 68-73.
3. Au K, Singh MK, Bodukam V, Bae S, Maranian P, Ogawa R, Spiegel B, McMahon M, Hahn B, Khanna D: *Atherosclerosis in systemic sclerosis: a systematic review and meta-analysis*. *Arthritis Rheum.* 2011; 63: 2078-2090.
4. Baud'huin M, Lamoureux F, Duplomb L, Rédini F, Heymann D: *RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases*. *Cell Mol. Life Sci.* 2007; 64: 2334-2350.
5. Carbone L, Tylavsky F, Wan J, McKown K, Cheng S: *Bone mineral density in scleroderma*. *Rheumatology* 1999; 38: 371-372.
6. D'Amelio P, Isaia G, Isaia GC: *The osteoprotegerin/RANK/RANKL system: a bone key to vascular disease*. *J. Endocrinol. Invest.* 2009; 32: 6-9.
7. Dovio A, Allasino B, Palmas E, Ventura M, Pia A, Saba L, Aroasio E, Terzolo M, Angeli A: *Increased osteoprotegerin levels in Cushing's syndrome are associated with an adverse cardiovascular risk profile*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92: 1803-1808.
8. Dovio A, Data V, Angeli A: *Circulating osteoprotegerin and soluble RANKL: do they have a future in clinical practice?* *J. Endocrinol. Invest.* 2005; 28: 14-22.
9. Dziadzio M, Smith RE, Abraham DJ, Stratton RJ, Gabrielli A, Black CM, Denton CP: *Serological assessment of type I collagen burden in scleroderma spectrum disorders: a systematic review*. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2004; 22: 356-367.
10. Frediani B, Baldi F, Falsetti P, Acciai C, Filippou G, Spreafico A, Siagri C, Chellini F, Capperucci C, Filippini P, Galeazzi M, Marcolongo R: *Clinical determinants of bone mass and bone ultrasonometry in patients with systemic sclerosis*. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2004; 22: 313-318.
11. Hope SA, Meredith IT: *Cellular adhesion molecules and cardiovascular disease. Part II. Their association with conventional and emerging risk factors, acute coronary events and cardiovascular risk prediction*. *Intern. Med. J.* 2003; 33: 450-462.
12. Istok R, Czirjak L, Lukac J, Stancikova M, Rovensky J: *Increased urinary pyridinoline cross-link compounds of collagen in patients with systemic sclerosis and Raynaud's phenomenon*. *Rheumatology* 2001; 40: 140-146.
13. Jacobsen S, Halberg P, Ullman S: *Mortality and causes of death of 344 Danish patients with systemic sclerosis (scleroderma)*. *Br. J. Rheumatol.* 1998; 37: 750-755.
14. Kuryliszyn-Moskal A, Klimiuk PA, Sierakowski S: *Soluble adhesion molecules (sVCAM-1, sE-selectin), vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelin-1 in patients with systemic sclerosis: relationship to organ systemic involvement*. *Clin. Rheumatol.* 2005; 24: 111-116.
15. La Montagna G, Baruffo A, Abbadessa S, Maja L, Tirri R: *Evidence for bone resorption in systemic sclerosis*. *J. Rheumatol.* 1995; 22: 797-799.

16. La Montagna G, Vatti M, Valentini G, Tirri G: *Osteopenia in systemic sclerosis. Evidence of a participating role of earlier menopause.* Clin. Rheumatol. 1991; 10: 18-22.
17. LeRoy EC, Medsger TA Jr: *Criteria for the classification of early systemic sclerosis.* J. Rheumatol. 2001; 28: 1573-1576.
18. Ngian GS, Sahhar J, Proudman SM, Stevens W, Wicks IP, Van Doornum S: *Prevalence of coronary heart disease and cardiovascular risk factors in a national cross-sectional cohort study of systemic sclerosis.* Ann. Rheum. Dis. 2012 [epub ahead of print].
19. Reid P, Holen I.: *Pathophysiological roles of osteoprotegerin (OPG).* Eur. J. Cell Biol. 2009; 88: 1-17.
20. Sampaio-Barros PD, Costa-Paiva L, Filardi S, Sachetto Z, Samara AM, Marques-Neto JF: *Prognostic factors of low bone mineral density in systemic sclerosis.* Clin. Exp. Rheumatol. 2005; 23: 180-184.
21. Souza RB, Borges CT, Takayama L, Aldrighi JM, Pereira RM: *Systemic sclerosis and bone loss: the role of the disease and body composition.* Scand. J. Rheumatol. 2006; 35: 384-387.
22. Van Campenhout A, Golledge J: *Osteoprotegerin, vascular calcification and atherosclerosis.* Atherosclerosis. 2009 Jun; 204: 321-329.
23. Yuen SY, Rochweg B, Ouimet J, Pope JE: *Patients with Scleroderma May Have Increased Risk of Osteoporosis: A Comparison to Rheumatoid Arthritis and Noninflammatory Musculoskeletal Conditions.* J. Rheumatol. 2008; 35: 1073-1078.

## NUOVE OPZIONI TERAPEUTICHE NELLE LEUCEMIE ACUTE MIELOIDI

*Antonia Rotolo<sup>1</sup>, Daniela Cilloni<sup>2</sup>, Giuseppe Saglio<sup>2</sup>*

Premio “Italo Arneodo” 2007/2008  
Tesi di Laurea premiata in collaborazione con  
l'Accademia di Medicina di Torino

<sup>1</sup> Division of Experimental Medicine - Department of Medicine  
Imperial College - London  
Centre for Haematology - Catherine Lewis Centre  
Hammersmith Hospital - London

<sup>2</sup> Divisione di Medicina Interna ed Ematologia  
Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche  
Università degli Studi di Torino  
ASO S. Luigi Gonzaga - Orbassano (TO)

Key words: *Acute Myeloid Leukemia / Leucemia Acuta Mieloide  
Therapy / Terapia  
Leukemia Stem Cell / Cellula Staminal Leucemica*

### **Abstract:**

Acute Myeloid Leukemia (AML) is the most common myeloid disorder in adults. The incidence is 2.96/100.000 in Europe, greater in the United Kingdom and Ireland (3.24) compared to the Eastern European countries (2.07). Males and older people are more often affected, especially those older than 65 (in < 45 years, 65-74 years and ≥ 75 years old patients the incidence is 1-2/100.000, 10/100.000 and 18/100.000 respectively).

Only 30-40% of the patients younger than 60 and 5-10% of the patients older than 60 achieve a durable remission after standard chemotherapy. Bone marrow transplantation can improve the disease free survival, but only in younger patients who are in remission. Treatment limitations together with improvement in knowledge of AML biology have lead to the development of several clinical trials in order to study new molecules as well as new therapeutic strategies. Second generation cytostatic agents, protein-kinase as well as surface antigen and signaling pathway inhibitors, epigenetic modulators, monoclonal antibodies and immunostimulant peptides are the new boundaries to treat and hopefully cure AML. The proper way to manage all these new compounds still is to be defined: maybe combination protocols would be

more active rather than single agent schedules. Moreover, patient selection must be implemented, based on decisional algorithms as well as predictive biological markers that consider the individual biological features of each disease together with patient clinical characteristics.

**Riassunto:**

Le leucemie mieloidi acute (LAM) rappresentano il disordine mieloproliferativo più comune nella popolazione adulta, con un'incidenza di 2.96 nuovi casi/100.000 abitanti in Europa, maggiore nel Regno Unito ed in Irlanda (3.24), minore nell'Est Europa (2.07). Colpisce prevalentemente soggetti di sesso maschile di età superiore a 65 anni (1-2 casi/100000 < 45 anni, circa 10 casi/100.000 tra i 65 e i 74 anni, 18 casi/100.000  $\geq$  75 anni).

Dopo trattamento standard con chemioterapia convenzionale solo il 30-40% dei pazienti di età < 60 anni ed il 5-10% dei pazienti di età > 60 anni raggiunge una remissione persistente, compatibile con la guarigione. Il trapianto di midollo osseo consente di migliorare le percentuali di sopravvivenza libera da malattia, ma rimane una strategia proponibile per i pazienti più giovani ed in remissione. I limiti delle terapie attualmente disponibili ed i progressi della ricerca nella comprensione della biologia delle LAM hanno favorito lo sviluppo di numerosi trial clinici per lo studio di nuove molecole e strategie terapeutiche. Agenti citostatici di nuova generazione, inibitori di protein-chinasi, antigeni di superficie e vie di trasduzione, modulatori epigenetici, anticorpi monoclonali e peptidi immunostimolanti rappresentano la nuova frontiera per la cura delle LAM. Rimane da definire la strategia di impiego più appropriata, come agenti singoli o in protocolli di combinazione con i composti convenzionali, e la modalità di selezione dei pazienti, con algoritmi e marcatori biologici predittivi di risposta alla terapia che considerino l'unicità della malattia dei singoli oltre alle caratteristiche cliniche.

## 1. INTRODUZIONE

La Leucemia Acuta Mieloide è un disordine clonale del tessuto emopoietico definito dalla presenza di una cellula staminale ematopoietica tumorale, il cui processo di differenziazione risulta bloccato in modo completo o parziale. Ne deriva un accumulo di precursori immaturi e la perdita progressiva di cellule mature funzionanti<sup>(47)</sup>.

La biologia della cellula staminale è estremamente complessa e culmina in una rete intricata in cui più vie si intersecano e si confondono, secondo meccanismi in gran parte ancora da chiarire. Il blocco maturativo può essere giustificato da diversi errori genomici e genetici, per cui spesso si parla di *Leucemie Acute Mieloidi* (LAM), a sottolinearne l'eterogeneità, per genesi e prognosi<sup>(32)</sup>.

La sopravvivenza dei soggetti affetti da LAM è sicuramente migliorata negli ultimi 20-25 anni, soprattutto nei pazienti giovani adulti. È da rilevare però che i miglioramenti nella cura delle LAM sono da attribuire prevalentemente all'ottimizzazione delle terapie di supporto piuttosto che all'introduzione di nuovi farmaci. I progressi nella terapia e nella profilassi antimicrobica ed il ricorso più attento e consapevole alla terapia trasfusionale hanno permesso una riduzione significativa della mortalità per infezione e/o emorragie o correlata al trapianto autologo/allogeneico di cellule staminali emopoietiche. Viceversa non ci sono state sostanziali innovazioni nella terapia eziopatogenetica delle LAM. Con l'unica importante eccezione della leucemia promielocitica acuta<sup>(38,36)</sup>, l'approccio iniziale è abbastanza omogeneo indipendentemente dal sottotipo specifico. I limiti più rilevanti sono:

- 1) disordini diversi rispondono in modo diverso allo stesso trattamento;
- 2) parte dei pazienti non è candidabile al trattamento chemioterapico standard per età, comorbidità o performance status;
- 3) parte dei pazienti, con rischio maggiore per i pazienti di età superiore ai 60 anni, recidiva dopo la prima linea.

Si avverte quindi la necessità di nuovi farmaci e nuovi algoritmi terapeutici, congiuntamente allo sviluppo di tecnologie che consentano di migliorare la caratterizzazione biomolecolare della malattia di ogni singolo paziente. L'obiettivo è perfezionare la tipizzazione, stratificare per rischio prognostico ed elaborare algoritmi predittivi di risposta alla terapia per personalizzare i piani di trattamento.

Negli ultimi 20 anni la ricerca traslazionale ha identificato almeno alcuni dei meccanismi leucemogenici<sup>(24)</sup>, favorendo lo sviluppo di nuovi farmaci, disegnati per colpire in modo selettivo la cellula malata, con efficacia massima

e tossicità minima<sup>(45)</sup>. Ciò potrebbe tradursi nella possibilità di trattare una popolazione più ampia, virtualmente tutti i soggetti affetti, compresi gli anziani ed i pazienti defedati.

Le linee guida internazionali raccomandano di considerare un approccio sperimentale, nell'ambito di studi clinici, per i pazienti in cui un approccio convenzionale si associ ad un rischio elevato di mortalità o recidiva. Tali pazienti sono identificati dalla presenza di una delle seguenti caratteristiche:

- 1) condizioni generali scadute (performance status 3 o 4),
- 2) età uguale o superiore a 80 anni,
- 3) citogenetica con cariotipo ad alto rischio di recidiva/refrattarietà,
- 4) citogenetica con cariotipo a rischio prognostico intermedio in paziente con pregresso disordine ematologico o specifiche anomalie genetiche (mutazione FLT3 ITD, espressione di MDR1).

Il prototipo di un approccio mirato contro il difetto molecolare responsabile della malattia è rappresentato dalla Leucemia Acuta Promielocitica (LAP). La LAP è caratterizzata dalla proteina di fusione PML/RAR $\alpha$ , prodotto della traslocazione bilanciata t(15;17)<sup>(14,9)</sup>, dove RAR $\alpha$  è il recettore per l'acido trans-retinoico (ATRA) e PML un fattore trascrizionale. La presenza di PML/RAR $\alpha$  comporta un blocco maturativo allo stato di promielocita. A dosi farmacologiche l'ATRA rimuove PML/RAR $\alpha$  e consente il ripristino della normale emopoiesi. In caso di diagnosi morfologica di LAP è mandatorio somministrare l'ATRA ancor prima di avere la conferma citogenetica e molecolare. L'aggiunta dell'ATRA alla chemioterapia ha infatti cambiato radicalmente la prognosi, consentendo il raggiungimento della remissione completa nel 90-95% dei casi e di remissione a lungo termine nel 70-80% dei casi<sup>(49,58)</sup>.

## **2. NUOVI BERSAGLI E NUOVI APPROCCI**

### **2.1 NPM1**

Osservazioni recenti suggeriscono che i pazienti con mutazione di NPM1 possano trarre beneficio dalla somministrazione di ATRA. NPM1 è una proteina con funzioni pleiotropiche mutata nel 25-35% delle LAM, soprattutto nelle LAM con cariotipo normale (45-62%). Conferisce un valore prognostico positivo quando presente isolata, in particolare in assenza di mutazioni a carico della tirosin-kinasi FLT3 (FLT3-ITD). Nel trial prospettico randomizzato controllato AMLSG 07-04 Schlenk et al<sup>(50)</sup> hanno aggiunto basse dosi ATRA

alla chemioterapia di induzione ed a quella di consolidamento. Dopo una media di 3,3 anni di follow up, i pazienti con mutazione NPM1 trattati con ATRA hanno dimostrato un aumento significativo delle percentuali di remissione completa (RC) ed una riduzione del rischio di recidiva, indipendentemente dalla presenza di FLT3-ITD.

## 2.2 c-kit

c-kit è il recettore del fattore di crescita per la sopravvivenza e proliferazione della cellula staminale (SCF stem cell factor). Ha la funzione di tirosin-kinasi (tyr-k) e risulta mutata nella metà circa delle LAM note come CBF AML (core binding factor acute myeloid leukemia), caratterizzate da cariotipo prognosticamente favorevole t(8;21) e inv<sup>(16)</sup>. La mutazione di c-kit conferisce significato prognostico negativo e potrebbe suggerire la necessità di considerare strategie terapeutiche più aggressive (es. allotrapianto in corso di prima linea)<sup>(39,31)</sup>. c-kit mutata attiva costitutivamente più vie di trasduzione intracellulari, tra cui JAK-STAT, PI3-k/Akt e MAP-k, promuovendo la crescita e la proliferazione cellulare ed inibendo l'apoptosi<sup>(28)</sup>. Studi su modelli murini hanno dimostrato che c-kit mutata coopera con AML1/ETO, proteina di fusione prodotta dalla traslocazione t(8;21), inducendo la LAM nel topo<sup>(62)</sup>. Di qui l'interesse ad esplorare l'impiego di imatinib, inibitore di c-kit, nelle LAM. Due studi tedeschi hanno ottenuto risultati insoddisfacenti somministrando imatinib in monoterapia<sup>(15,20)</sup>. Ciò si può spiegare con la resistenza intrinseca del recettore mutato all'imatinib. Sono stati quindi disegnati studi clinici di combinazione chemioterapia-inibitore di c-kit (imatinib o dasatinib)<sup>(25)</sup>. I dati preliminari sono promettenti, da confermare su campioni più ampi. In particolare uno studio tedesco in pazienti refrattari o in prima recidiva ha riportato una percentuale significativa di remissioni complete (RC), associata alla riduzione di attività di Akt nei blasti leucemici prelevati dai pazienti<sup>(2)</sup>.

## 2.3 Flt3

Flt3 è una tyr-k espressa fisiologicamente sulla superficie delle cellule staminali emopoietiche ed è fondamentale per la normale emopoiesi<sup>(56,16,55)</sup>. I blasti leucemici esprimono Flt3 nel 70-100% dei pazienti<sup>(4)</sup>. In 1 caso su 3 Flt3 riporta una duplicazione abnorme del dominio juxtamembrana, nota come ITD, che conferisce prognosi pessima alla LAM e riduce la sopravvivenza libera da malattia (DFS) e globale (OS) in modo proporzionale alla percentuale di Flt3 mutato<sup>(65,51,59,40)</sup>. Esistono 2 classi di inibitori di Flt3,

di I e II generazione<sup>(64)</sup>. I primi (midaustarin, lestautinib, sorafenib) risultano ben tollerati, ma l'efficacia è transitoria in monoterapia a causa di diversi meccanismi di resistenza (comparsa di nuove mutazioni, dose insufficiente, interferenze farmacodinamiche tra farmaco e ligando, quiescenza della cellule staminali leucemiche)<sup>(11)</sup>. I composti di II generazione (quizartinib) sembrano più efficaci, con tossicità dose-dipendente a livello gastrointestinale, cardiaco e midollare<sup>(21)</sup>. Sono state raggiunte risposte complete durature in quasi la metà dei casi in pazienti refrattari o recidivati dopo una prima linea di terapia standard<sup>(7)</sup>. L'aspetto più interessante è la fattibilità di un approccio integrato, che preveda la somministrazione degli inibitori di ft3 per controllare le malattie più aggressive a breve termine, come misura ponte per arrivare al trapianto di midollo osseo. Anche in questo caso è auspicabile una strategia che combini farmaci sperimentali e chemioterapici convenzionali.

## 2.4 PgP

PgP o Glicoproteina P è una pompa di membrana che sfrutta l'energia fornita dall'ATP per estrarre i chemioterapici dalla cellula leucemica. PgP è espressa soprattutto nei pazienti anziani e correla con una resistenza intrinseca alle antracicline. Ciò giustifica almeno in parte la prognosi peggiore delle LAM nell'anziano<sup>(26)</sup>. Un inibitore specifico consentirebbe di trattare anche i soggetti anziani con basse dosi di chemioterapici, migliorando la percentuale di risposta a fronte di una tossicità tollerabile. Contrariamente alle aspettative, i dati preliminari sono scoraggianti a causa di interferenze farmacodinamiche con i chemioterapici che si traducono paradossalmente in una minore esposizione alla stessa terapia citostatica<sup>(8,22,5)</sup>.

## 2.5 RAS

RAS è una proteina G farnesilata cruciale nella trasduzione dei segnali di proliferazione<sup>(43)</sup>. In diversi tumori la via di Ras è iperattiva. Tipifarnib è un inibitore competitivo e selettivo dell'enzima farnesil-transferasi (FT)<sup>(35)</sup>. In uno studio di fase 3 concluso alla fine del 2007 solo l'8% dei pazienti, soggetti ultrasettantenni con nuova diagnosi di LAM de novo o secondaria, ha ottenuto la RC, una percentuale comparabile a quella osservata con terapia di supporto con idrossiurea<sup>(18)</sup>. Tuttavia, dati recenti suggeriscono che la selezione accurata dei pazienti sulla base di uno screening genico mirato consente di aumentare significativamente la percentuale di risposta. In particolare, Martinelli et al. hanno dimostrato una risposta nel 43% dei pazienti trattati, previa selezione sulla base del profilo di espressione genica RASGRP1/APTX<sup>(34)</sup>.

## 2.6 mTor

Wei AH et al hanno studiato la combinazione azacitidina, ipometilante, con everolimus, inibitore di mTor, in pazienti refrattari ad una prima linea o recidivati, ottenendo una risposta clinica nel 32% dei casi ed una sopravvivenza globale e libera da progressione di 211 e 178 giorni rispettivamente<sup>(63)</sup>.

## 2.7 Epigenetica

Nelle LAM il profilo di metilazione del DNA risulta estensivamente alterato e gli agenti ipometilanti e deacetilanti hanno dimostrato di possedere un'attività antileucemica significativa.

Azacitidina e decitabina sono due agenti ipometilanti in grado di migliorare la sopravvivenza nelle sindromi mielodisplastiche (SMD) ad alto rischio e delle LAM con limitata blastosi midollare (20-30%). Recentemente è stata valutata l'efficacia di regimi non intensivi con agenti ipometilanti anche nelle LAM con > 30% blasti midollari.

Lestang ha valutato retrospettivamente l'outcome in una coorte di pazienti anziani con LAM, suddivisi in due gruppi paragonabili per età e caratteristiche citogenetiche<sup>(27)</sup>, il primo gruppo sottoposto a chemioterapia di induzione convenzionale, il secondo trattato con azacitidina. Nonostante il tasso di remissioni complete fosse significativamente più elevato nel braccio intensivo (63% vs 28%,  $p < 0.0001$ ), la sopravvivenza globale era comparabile tra i due bracci di trattamento (10,4 vs 10,3 mesi,  $p = 0,3$ ) dopo un follow-up mediano di 13,3 mesi. Nel braccio azacitidina è stato inoltre osservato un più alto tasso di remissioni parziali (25% vs 5%;  $p = 0,02$ ). Altri gruppi hanno ottenuto risultati simili<sup>(1,52)</sup>. Complessivamente i dati disponibili sembrano suggerire che azacitidina potrebbe essere una valida alternativa terapeutica per i pazienti anziani, non leucocitosici alla diagnosi, unfit per regimi di chemioterapia standard, ottenendo la remissione/il controllo della malattia per un intervallo di tempo proporzionale al numero di cicli somministrati.

La decitabina o 5-aza-2'-deossicitidina (DAC) inibisce la DNA-metiltransferasi (DNMT), ma a differenza della 5-azacitidina viene incorporata esclusivamente nel DNA. Osservazioni recenti suggeriscono che i pazienti con AML/SMD con cariotipo complesso o monosomico (MK+) sono significativamente sensibili alla decitabina. Il trial multicentrico di fase II *DAC study, trial 00331*<sup>(30)</sup> ha riprodotto e confermato questi risultati.

## 2.8 Angiogenesi ed immunosorveglianza

Garcia-Manero et al<sup>(17)</sup> hanno condotto uno studio di fase I combinando in sequenza un agente ipometilante, l'azacitidina, ed un agente immunomodulante, la lenalidomide. La prima fase di questo studio ha dimostrato che l'associazione è sicura ed ha un profilo di tossicità accettabile in pazienti con LAM e SMD.

Ramsigh et al hanno condotto un trial di fase I<sup>(41)</sup> che prevedeva la somministrazione simultanea di azacitidina e lenalidomide, con un ciclo di induzione ad alte dosi di lenalidomide ed una terapia di mantenimento meno intensiva. Il profilo di tossicità è risultato sovrapponibile a quello osservato da Garcia-Manero. Anche questa esperienza apre la strada a successive sperimentazioni di fase II.

Resta da chiarire il meccanismo d'azione degli agenti immunomodulanti. Probabilmente l'attività antileucemica scaturisce dall'insieme di tre azioni: antiangiogenetica, immunomodulatoria e tumoricida.

## 2.9 Immunoterapia: anticorpi monoclonali e peptidi immunostimolanti

Diversi gruppi stanno valutando la sicurezza e l'efficacia dell'impiego di anticorpi monoclonali in fase attiva di malattia e della vaccinazione nei soggetti ad alto rischio di recidiva dopo remissione clinica.

### 2.9.1 Anti CD33

Gemtuzumab ozogamicina (GO), noto come Mylotarg, è un anticorpo monoclonale coniugato con calicheamicina che riconosce l'antigene CD33 dei blasti. Dopo il legame, GO viene internalizzato e la tossina si libera nel blasto causandone la morte apoptotica<sup>(57)</sup>. GO è fortemente mielotossico e si è rivelato causa frequente di malattia veno-occlusiva epatica<sup>(13)</sup>. Tuttavia, l'aggiunta di mylotarg agli schemi di chemioterapia convenzionale è risultata associata ad un aumento della sopravvivenza globale, con profilo di tossicità accettabile, negli studi di Burnett (AML16) e del gruppo cooperativo francese ALFA<sup>(3)</sup>.

Il Lintuzumab è un antiCD33 non coniugato di seconda generazione. È inefficace in monoterapia<sup>(12)</sup> e uno studio di fase IIb ne sta valutando l'attività in combinazione con basse dosi di citarabina in pazienti anziani.

Altri anticorpi monoclonali sono in fase di sperimentazione meno avanzata e non sono ancora disponibili in clinica<sup>(6,46)</sup>. I dati preliminari ottenuti su modello animale sono incoraggianti. I bersagli sono molteplici: CD44, CD123, CD47, CLL-1, tutti caratterizzati da un'espressione preferenziale sul blasto leucemico rispetto al precursore emopoietico sano. L'impiego di

un anticorpo monoclonale come agente singolo sembra tuttavia insufficiente per il controllo della malattia e occorre considerare la combinazione di più molecole/anticorpi per colpire la cellula leucemica su più livelli.

### 2.9.2 *WT1-peptide*

I pazienti affetti da LAM in remissione clinica con evidenza di malattia minima residua sono i soggetti che potrebbero giovare della strategia vaccinale. Tsuboi et al hanno condotto uno studio di fase I in 3 pazienti non altrimenti candidabili a terapia per condizioni generali scadute, con malattia minima residua positiva dopo il primo ciclo di induzione o classificati come alto rischio di recidiva, o con malattia minima residua (MRD) ancora rilevabile al termine del ciclo di terapia completo. La vaccinazione consisteva nella somministrazione di un peptide di 9 amminoacidi derivato da WT1, marcatore leucemico espresso selettivamente dai blasti. Dopo 8 anni di follow up, i pazienti sono risultati liberi da malattia. L'assenza di copie di RNA di WT1 per un tempo protratto sembrerebbe suggerire uno stato di guarigione. Lo studio di Tsuboi è di grande rilevanza per due aspetti:

- 1) la vaccinazione con WT1-peptide potrebbe rappresentare la strategia di scelta per i pazienti affetti da AML con MRD ad alto rischio di recidiva;
- 2) lo studio della risposta immunologica alla vaccinazione ha contribuito a caratterizzare meglio l'immunodeficienza che caratterizza i pazienti affetti da LAM<sup>(60)</sup>.

### 2.9.3 *Isopentenil pirofosfato*

È noto che le sindromi mielodisplastiche e gli stati precoci dei disordini mieloidi sono caratterizzati da una riduzione significativa dell'immunosorveglianza. In diversi disordini proliferativi solidi ed ematologici la popolazione T Vg9/Vd2 è deficitaria ed è stato dimostrato che la riespressione ed espansione dei T Vg9/Vd2 correla con il controllo e la remissione di malattia. Gli stimoli capaci di indurre la differenziazione e l'espansione dei linfociti nel sottogruppo Vg9/Vd2 sembrano essere di diversa natura. Tra gli altri compaiono prodotti intermedi della via del mevalonato (isopentenil pirofosfato, IPP), via responsabile della sintesi dell'ancora isoprenilica delle proteine G eterotrimeriche. L'accumulo di IPP si associa ad un incremento significativo dei linfociti T Vg9/Vd2<sup>(33)</sup>. L'acido zoledronico inibisce la farnesil-pirofosfato sintasi, enzima che catalizza la sintesi del farnesil pirofosfato dal geranil-pirofosfato. Ciò comporta accumulo del geranil-pirofosfato e dei reagenti a monte, induce la sintesi di

Apppl e la proliferazione/attivazione dei linfociti Vg9/Vd2. Di qui l'interesse ad esplorare gli effetti di una terapia di combinazione con inibitori della fanesilazione/geranilazione e acido zoledronico.

## 2.10 Apoptosi ed autofagia

Sono in fase preclinica di studio agenti che interferiscono con meccanismi che regolano l'apoptosi e l'autofagia, in particolare inibitori di bcl2 (ABT737)<sup>(19)</sup>, eventualmente combinati con molecole in fase più avanzata di sperimentazione, e inibitori di MDM2<sup>(29)</sup> rispettivamente.

## 2.11 La cellula staminale leucemica

È noto ormai da diversi anni che esiste una sottopopolazione di cellule leucemiche resistente alla chemioterapia convenzionale e responsabile della recidiva nella maggior parte dei pazienti. Queste cellule, definite cellule staminali leucemiche (LSC) condividono molte caratteristiche proprie delle cellule staminali ematopoietiche normali, in particolare la capacità di autorigenerarsi, dando origine a una progenie di cellule differenziate e ad una cellula staminale quiescente. La probabilità di guarire è fortemente condizionata dalla possibilità di eradicare definitivamente le LSC. Sono stati identificati numerosi antigeni di superficie espressi selettivamente sulle LSC rispetto alla controparte normale e sono stati disegnati nuovi agenti per colpire selettivamente meccanismi vitali per la sopravvivenza delle LSC, impattando positivamente la prognosi dei pazienti affetti da LAM. Questi composti ostacolano le interazioni con la nicchia midollare, interferiscono con i segnali antiapoptotici dei fattori di crescita nel microambiente midollare (angiotensina-1, Flt3-ligando, trombopoietina, wnt/beta-catenina, CXCL12/SDF-1alpha, osteopontina e citochine come bFGF, IGF, IL-6 e VEGF)<sup>(23,46)</sup> e alterano l'equilibrio tra aree ipossiche ed aree vascolarizzate, importante per la vitalità e l'omeostasi delle LSC. Trial preclinici su modelli murini stanno valutando gli effetti di agenti diretti contro i pathway di Wnt/beta-catenina e PI3K/AKT/mTOR, proteine della famiglia BCL-2 e del complesso proteasomico. Nella Tabella I sono sintetizzati i trial clinici in corso più rilevanti. Recentemente inoltre sono state dimostrate proprietà antileucemiche a carico di ciclopiroxolamina e tigeciclina, mediate da meccanismi rispettivamente di ferro chelazione ed inibizione della traduzione mitocondriale. Sono in fase di studio nuovi composti contro diversi bersagli e nuovi protocolli di combinazione di farmaci attivi sulle LSC<sup>(54,10,61)</sup>.

<b>Cellula staminale leucemica bersaglio</b>	<b>Inibitore</b>	<b>Trial clinico</b>
<i>Antigeni di superficie</i>		
CD 123	DT3881L-3/SL-401, CSL360	Fase I/II
CD 33	Gemtuzumab ozogamicin	Fase III
<i>Mediatori di trasduzione / Fattori trascrizionali</i>		
NF- $\kappa$ B	Bortezomib	Fase I/II/III
PI3K	BKM12Q, CAL-101	Fase I
AKT	GSK21110183, MK-2206, perifosina	Fase I/II
mTOR	Sirolimus, Everolimus, Temsirolium	Fase I/II
BCL-2	Olimersen, Obatoclox	Fase I/II/III
<i>Microambiente</i>		
CXCR4	Plerixafor, G-CSF	Fase I/II
HIF-1 $\alpha$	Inibitori vari (trial in tumori solidi)	N/A
<i>Staminalità, differenziazione</i>		
Wnt	CWP232291	Fase I
Hedgehog	Inibitori vari (trial in tumori solidi)	N/A
<i>Altri meccanismi</i>		
Ferrochelazione	Ciclopiroxolamina	Fase I
Traduzione mitocondriale	Tigeciclina	Fase I

Tabella I. Trial clinici in corso per lo studio di composti attivi contro la cellula staminale leucemica. Modificata da Rico et. al<sup>(44)</sup>.

### 3. CONCLUSIONE

Le leucemie acute mieloidi rappresentano un'entità eterogenea a patogenesi complessa. È auspicabile un approccio integrato che consideri una terapia di combinazione personalizzata, mirata contro bersagli specifici dei blasti

leucemici dei singoli individui. Ciò implica la caratterizzazione dei profili di espressione genica dei soggetti affetti e la disponibilità delle nuove molecole in fase di studio, in aggiunta ai composti citostatici convenzionali. In pratica si traduce nella possibilità di offrire alla maggior parte dei soggetti affetti di essere trattati nell'ambito di trial clinici.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Bories P, Bertoli S, Huguet F, Dobbstein S, Fornecker L, Rauzy OB, Demas V, Berceanu A, Delabesse V, Recher C: *Efficacy of Frontline 5-Azacytidine in Older AML Patient Unfit for Chemotherapy*. Blood 2011; 118: 2614.
2. Brandwein JM, Hedley DW, Chow S, Schimmer AD, Yee KW, Schuh AC, Gupta V, Xu W, Kamel-Reid S, Minden MD: *A phase I/II study of imatinib plus reinduction therapy for c-kit-positive relapsed/refractory acute myeloid leukemia: inhibition of Akt activation correlates with complete response*. Leuk. 2011; 25: 945-952.
3. Burnett AK, Hills RK, Milligan D, Kjeldsen L, Kell J, Russell NH, Yin JA, Hunter A, Goldstone AH, Wheatley K: *Identification of patients with acute myeloblastic leukemia who benefit from the addition of gemtuzumab ozogamicin: results of the MRC AML15 trial*. J. Clin. Oncol. 2011; 29: 369-377.
4. Carow CE, Levenstein M, Kaufmann SH, Chen J, Amin S, Rockwell P, Witte L, Borowitz MJ, Civin CI, Small D: *Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias*. Blood 1996; 87: 1089-1096.
5. Chauncey TR, Gundacker H, Shadman M, List AF, Dakhil SR, Erba HP, Slovak ML, Chen IM, Willman CL, Kopecky KJ, Appelbaum FR: *Sequential phase II Southwest Oncology Group studies (S0112 and S0301) of daunorubicin and cytarabine by continuous infusion, without and with ciclosporin, in older patients with previously untreated acute myeloid leukaemia*. Br. J. Haematol. 2010; 148: 48-58.
6. Clevers H: *The cancer stem cell: premises, promises and challenges*. Nat. Med. 2011; 17: 313-319.
7. Cortes J, Perl A, Smith C, Kovacsics T, Dombret H, Dohner H, Steffen B, Pigneux A, Rousselot P, Krauter J, Martinelli G, Estey E, Burnett A, Ho A, Ifrah N, de Witte T, Corringham R, James J, Lilienfeld D, Leo E, Trikha M, Levis M: *A phase II open-label, AC220 monotherapy efficacy study in patients with refractory/relapse FLT3-ITD positive acute myeloid leukemia: updated interim results*. Blood 2011; 118: 2576.

8. Cripe LD, Uno H, Paietta EM, Litzow MR, Ketterling RP, Bennett JM, Rowe JM, Lazarus HM, Luger S, Tallman MS: *Zosuquidar, a novel modulator of P-glycoprotein, does not improve the outcome of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a randomized, placebo-controlled trial of the Eastern Cooperative Oncology Group 3999*. Blood 2010; 116: 4077-4085.
9. De The H, Chen Z: *Acute promyelocytic leukaemia: novel insights into the mechanisms of cure*. Nat. Rev. Cancer 2010; 10: 775-783.
10. Eberhard Y, McDermott SP, Wang X, Gronda M, Venugopal A, Wood TE, Hurren R, Datti A, Batey RA, Wrana J, Antholine WE, Dick JE, Schimmer AD: *Chelation of intracellular iron with the antifungal agent ciclopirox olamine induces cell death in leukemia and myeloma cells*. Blood 2009; 114: 3064-3073.
11. Fathi AT, Chabner BA: *FLT3 inhibition as therapy in acute myeloid leukemia: a record of trials and tribulations*. Oncologist 2011; 16: 1162-1174.
12. Feldman EJ, Brandwein J, Stone R, Kalaycio M, Moore J, O'Connor J, Wedel N, Roboz GJ, Miller C, Chopra R, Jurcic JC, Brown R, Ehmann WC, Schulman P, Frankel SR, De Angelo D, Scheinberg D: *Phase III randomized multicenter study of a humanized anti-CD33 monoclonal antibody, lintuzumab, in combination with chemotherapy, versus chemotherapy alone in patients with refractory or first-relapsed acute myeloid leukemia*. J. Clin. Oncol. 2005; 23: 4110-4116.
13. Fenton C, Perry CM: *Gemtuzumab ozogamicin: a review of its use in acute myeloid leukaemia*. Drugs 2005; 65: 2405-2427.
14. Ferrara F: *Acute promyelocytic leukemia: what are the treatment options?* Expert Opin. Pharmacother. 2010; 11: 587-596.
15. Kindler T, Breitenbuecher F, Marx A, Beck J, Hess G, Weinkauff B, Duyster J, Peschel C, Kirkpatrick CJ, Theobald M, Gschaidmeier H, Huber C, Fischer T: *Efficacy and safety of imatinib in adult patients with c-kit-positive acute myeloid leukemia*. Blood 2004; 103: 3644-3654.
16. Gabbianelli M, Pelosi E, Montesoro E, Valtieri M, Luchetti L, Samoggia P, Vitelli L, Barberi T, Testa U, Lyman S, Peschle C: *Multilevel effects of flt3 ligand on human hematopoiesis: expansion of putative stem cells and proliferation of granulomonocytic progenitors/monocytic precursors*. Blood 1995; 86: 1661-1670.
17. Garcia-Manero, Daver G, Borthakur G, Konopleav M, Ravandi F, Wierda WG, Estro Z, Faderl S, Kadia T, Rey K, Cheung C, Kantarjan H: *Phase I Study of the Combination of 5-Azacididine Sequentially with High-Dose Lenalidomide in Higher-Risk Myelodysplastic Syndrome (MDS) and Acute Myelogenous Leukemia (AML)*. Blood 2011; 118: 2613.
18. Harousseau JL, Martinelli G, Jedrzejczak WW, Brandwein JM, Bordessoule D, Masszi T, Ossenkopppele GJ, Alexeeva JA, Beutel G, Maertens J, Vidriales MB, Dombret H, Thomas X, Burnett AK, Robak T, Khuageva NK, Golenkov AK, Tothova E, Mollgard L, Park YC, Bessems A, De Porre P, Howes AJ, FIGHT-AML-301 Investigators: *A randomized phase 3 study of tipifarnib compared to best supportive care (including hydrossiurea) in the treatment of newly diagnosed acute myeloid leukaemia (AML) in patients 70 years or older*. Blood 2011; 118: 439.
19. Hu S, Mirshahidi S, Bi CL, Chng WJ, Hsu HW, Wu S, Pan J, Cen J, Chien-Shing Chen: *C3aR1 Contributed to Acute Myeloid Leukemia Acquired Resistance to ABT-737 and Involved In the Process of AML*. Blood 2011; 118: 1435.

20. Kindler T, Breitenbuecher F, Marx A, Beck J, Hess G, Weinkauff B, Duyster J, Peschel C, Kirkpatrick CJ, Theobald M, Gschaidmeier H, Huber C, Fischer T: *Efficacy and safety of imatinib in adult patients with c-kit positive acute myeloid leukemia*. Blood 2004; 103: 3644-3654.
21. Kindler T, Lipka DB, Fischer T: *FLT3 as a therapeutic target in AML: still challenging after all these years*. Blood 2010; 116: 5089-5102.
22. Kolitz JE, George SL, Marcucci G, Vij R, Powell BL, Allen SL, DeAngelo DJ, Shea TC, Stock W, Baer MR, Hars V, Maharry K, Hoke E, Vardiman JW, Bloomfield CD, Larson RA, Cancer and Leukemia Group B: *P-glycoprotein inhibition using valspodar (PSC-833) does not improve outcomes for patients younger than age 60 years with newly diagnosed acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B study 19808*. Blood 2010; 116: 1413-1421.
23. Konopleva MY, Jordan CT: *Leukemia stem cells and microenvironment: biology and therapeutic targeting*. J. Clin. Oncol. 2011; 29: 591-599.
24. Kumar CH: *Genetic abnormalities and challenges in the treatment of acute myeloid leukemia*. Genes Cancer 2011; 2: 95-107.
25. Lainey E, Thepot S, Bouteloup C, Sébert M, Adès L, Tailleur M, Gardin C, de Botton S, Baruchel A, Fenaux P, Kroemer G, Boehler S: *Tyrosine kinase inhibitors for the treatment of acute myeloid leukemia: Delineation of anti-leukemic mechanisms of action*. Biochem. Pharmacol. 2011; 82: 1457-1466.
26. Leith CP, Kopecky KJ, Godwin J, McConnell T, Slovak ML, Chen IM, Head DR, Appelbaum FR, Willman CL: *Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study*. Blood 1997; 89: 3323-3329.
27. Lestang E: *5-Azacytidine (AZA) Compared to Intensive Chemotherapy in Elderly Acute Myeloid Leukemia (AML) Patients: Results of a Retrospective Single Centre Matched Analysis*. Blood 2011; 118: 3620.
28. Linnekin D: *Early signaling pathways activated by c-kit in hematopoietic cells*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 1999; 31: 1053-1074.
29. Long J, Parkin B, Ouillette P, Bixby D, Shedden K, Erba H, Wang S, Malek SN: *Multiple distinct molecular mechanisms influence sensitivity and resistance to MDM2 inhibitors in adult acute myelogenous leukemia*. Blood 2010; 116: 71-80.
30. Lübbert M, Schmoor C, Hagemeijer A, Hackanson B, Claus R, Rüter B, Schmid M, Germing U, Kuendgen A, Rethwisch V, Ganser A, Platzbecker U, Galm O, Brugger W, Heil G, Wijermans P, Döhner K, Döhner H: *Outcome of Older AML Patients with Adverse Cytogenetics, Including Single or Multiple Monosomies, Treated with the DNA Hypomethylating Agent Decitabine*. Blood 2011; 118: 2609.
31. Luck SC, Russ AC, Du J, Gaidzik V, Schlenk RF, Pollack JR, Döhner K, Döhner H, Bullinger L: *KIT mutations confer a distinct gene expression signature in core binding factor leukaemia*. Br. J. Haematol. 2010; 148: 925-937.
32. Marcucci G, Haferlach T, Döhner H: *Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications*. J. Clin. Oncol. 2011; 29: 475-486.

33. Mariani S, Muraro M, Pantaleoni F, Fiore F, Nuschak B, Peola S, Foglietta M, Palumbo A, Coscia M, Castella B, Bruno B, Bertieri R, Boano L, Boccadoro M, Massaia M: *Effector gammadelta T cells and tumor cells as immune targets of zoledronic acid in multiple myeloma*. *Leukemia* 2005; 19: 664-670.
34. Martinelli G, Paolini S, Papayannidis C, Ottaviani E, Parisi S, Iacobucci I, Curti A, Cilloni D, Saglio G, Candoni A, Baccarani M: *Correlation of RASGRP1/APTX ratio with clinical response and survival in AML patients treated with tipifarnib-bortezomib combination*. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28: 6550.
35. Mesa RA: *Tipifarnib: farnesyl transferase inhibition at a crossroads*. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2006; 6: 313-319.
36. Morra E, Barosi G, Bosi A, Ferrara F, Locatelli F, Marchetti M, Martinelli G, Mecucci C, Vignetti M, Tura S: *Clinical management of primary non-acute promyelocytic leukemia acute myeloid leukemia: practice Guidelines by the Italian Society of Hematology, the Italian Society of Experimental Hematology and the Italian Group for Bone Marrow Transplantation*. *Haemat.* 2009; 94: 102-112.
37. Norsworthy K, Luznik L, Gojo I: *New Treatment Approaches in Acute Myeloid Leukemia: Review of Recent Clinical Studies*. *Rev. Recent Clin. Trials* 2012; 7: 224-237.
38. O'Donnell MR, Abboud CN, Altman J, Appelbaum FR, Strickland SA, Tallman MS, Wang Moore ES, Ravandi F, Shami PJ, Smith BD, Stone RM, Maness LJ, Marcucci G, Maslak P, Millenson MM, Appelbaum JO, Coutre SE, Damon LE, Foran JM, Goorha S: *Acute Myeloid Leukemia. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology – v.2.2012*. Available from: [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/aml.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/aml.pdf).
39. Park SH, Chi HS, Min SK, Park BG, Jang S, Park CJ: *Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor acute myeloid leukemia*. *Leuk. Res.* 2011; 35: 1376-1383.
40. Pratz KW, Sato T, Murphy KM, Stine A, Rajkhowa T, Levis M: *FLT3-mutant allelic burden and clinical status are predictive of response to FLT3 inhibitors in AML*. *Blood* 2010; 115: 1425-1432.
41. Ramsingh G, Westervelt P, Cashen AF, Uy GL, Stockerl-Goldstein K, Abboud CN, Bernabe N, Monahan R, Dipersio JF, Vij R: *A Phase I Study of Concomitant High Dose Lenalidomide and 5-Azacytidine Induction in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia*. *Leukemia advance online publication*, 25 July 2012; doi:10.1038/leu.2012.214.
42. Raza A, Jurcic JG, Roboz G, Maris M, Stephenson JJ, Wood BL, Feldman EJ, Galili N, Grove LE, Drachman JG, Sievers EL: *Complete remissions observed in acute myeloid leukemia following prolonged exposure to lintuzumab: a phase I trial*. *Leuk. Lymphoma* 2009; 50: 1336-1344.
43. Reuter CW, Morgan MA, Bergmann L: *Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies?* *Blood* 2000; 96: 1655-1669.
44. Rico JF, Hassane DC, Guzman ML: *Acute myelogenous leukemia stem cells: From Bench to Bedside*. *Cancer Letters* 2012, <http://dx.doi.org.offcampus.dam.unito.it/10.1016/j.canlet.2012.05.034>.
45. Robak T, Szmigielska-Kapłon A, Pluta A, Grzybowska-Izydorczyk O, Wolska A, Czemerska M, Wierzbowska A: *Novel and emerging drugs for acute myeloid leukemia: pharmacology and therapeutic activity*. *Curr. Med. Chem.* 2011; 18: 638-666.

46. Roboz GJ, Guzman M: *Acute myeloid leukemia stem cells: seek and destroy*. Expert Rev. Hematol. 2009; 2: 663-672.
47. Rubnitz JE, Gibson B, Smith FO: *Acute myeloid leukemia*. Hematol. Oncol. Clin. North Am. 2010; 24: 35-63.
48. Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, Marcos-Gragera R, Maynadié M, Simonetti A, Lutz JM, Berrino F, HAEMACARE Working Group: *Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project*. Blood 2010; 116: 3724-3734.
49. Sanz MA, Lo-Coco F: *Modern approaches to treating acute promyelocytic leukemia*. J. Clin. Oncol. 2011; 29: 495-503.
50. Schlenk RF, Dohner K, Kneba M, Götze K, Hartmann F, Del Valle F, Kirchen H, Koller E, Fischer JT, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Groner S, Krebs B, Kayser S, Corbacioglu A, Anhalt A, Benner A, Fröhling S, Döhner H, German-Austrian AML Study Group (AML5SG): *Gene mutations and response to treatment with all-trans retinoic acid in elderly patients with acute myeloid leukemia. Results from the AML5SG Trial AML HD98B*. Haematol. 2009; 94: 54-60.
51. Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, Löffler H, Sauerland CM, Serve H, Büchner T, Haferlach T, Hiddemann W: *Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease*. Blood 2002; 100: 59-66.
52. Serrano J, de la Fuente A, Bergua J, Falantes J, Eusebio MC, López Juan A, Martínez-Losada, Casañó AR, Prieto E, Mendez G, Tabares S, Jose Francisco Tomas, Sánchez-García J, Torres A: *5-Azacytidine Versus Intensive Chemotherapy or BSC in Elderly (>60 years) Acute Myeloid Leukemia Patients. A Retrospective Analysis*. Blood 2011; 118:2612.
53. Shiotsu Y, Kiyoi H, Ishikawa Y, Tanizaki R, Shimizu M, Umehara H, Ishii K, Mori Y, Ozeki K, Minami Y, Abe A, Maeda H, Akiyama T, Kanda Y, Sato Y, Akinaga S, Naoe T: *KW-2449, a novel multikinase inhibitor, suppresses the growth of leukemia cells with FLT3 mutations or T315I-mutated BCR/ABL translocation*. Blood 2009; 114: 1607-1617.
54. Skrtic M, Srisankhadevan S, Jhas B, Gebbia M, Wang X, Wang Z, Hurren R, Jitkova Y, Gronda M, Maclean N, Lai CK, Eberhard Y, Bartoszko J, Spagnuolo P, Rutledge AC, Datti A, Ketela T, Moffat J, Robinson BH, Cameron JH, Wrana J, Eaves CJ, Minden MD, Wang JC, Dick JE, Humphries K, Nislow C, Gjaever G, Schimmer AD: *Inhibition of mitochondrial translation as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia*. Cancer Cell 2011; 20: 674-688.
55. Sitnicka E, Buza-Vidas N, Larsson S, Nygren JM, Liuba K, Jacobsen SE: *Human CD34+ hematopoietic stem cells capable of multilineage engrafting NOD/SCID mice express flt3: distinct flt3 and c-kit expression and response patterns on mouse and candidate human hematopoietic stem cells*. Blood 2003; 102: 881-886.
56. Small D, Levenstein M, Kim E, Carow C, Amin S, Rockwell P, Witte L, Burrow C, Ratajczak MZ, Gewirtz AM: *STK-1, the human homolog of Flk-2/ Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994; 91: 459-463.
57. Stasi R, Evangelista ML, Buccisano F, Venditti A, Amadori S: *Gemtuzumab ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia*. Cancer Treat. Rev. 2008; 34: 49-60.

58. Tallman M, Douer D, Gore S, Powell BL, Ravandi F, Rowe J, Ranganathan A, Sanz MA: *Treatment of patients with acute promyelocytic leukemia: a consensus statement on risk-adapted approaches to therapy*. Clin. Lymphoma Myeloma Leuk 2010; 10: 122-126.
59. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhäuser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G, Illmer T: *Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis*. Blood 2002; 99: 4326-4335.
60. Tsuboi A, Oka Y, Kyo T, Katayama Y, Elisseeva OA, Kawakami M, Nishida S, Morimoto S, Murao A, Nakajima H, Hosen N, Oji Y, Sugiyama H: *Long-term WTI peptide vaccination for patients with acute myeloid leukemia with minimal residual disease*. Leuk. 2012; 26: 1410-1413.
61. US National Institutes of Health: *Clinicaltrials.gov*. Available from: <http://clinicaltrials.gov/search/open/condition=%22Stem+Cells%22>.
62. Wang YY, Zhao LJ, Wu CF, Liu P, Shi L, Liang Y, Xiong SM, Mi JQ, Chen Z, Ren R, Chen SJ: *C-KIT mutation cooperates with full-length AML1-ETO to induce acute myeloid leukemia in mice*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2011; 108: 2450-2455.
63. Wei AH, Tan PT, Catalano J, Walker PA, Schwarzer AP, Avery S, Patil SS, Opat S, Cummings N, Spencer A: *Azacitidine in Combination with the mTOR Inhibitor Everolimus in Relapsed and Refractory*. AML Blood 2011; 118:2599.
64. Weisberg E, Roesel J, Furet P, Bold G, Imbach P, Flörsheimer A, Caravatti G, Jiang J, Manley P, Ray A, Griffin JD: *Antileukemic effects of novel first- and second-generation FLT3 inhibitors: structure-affinity comparison*. Genes Cancer 2010; 1: 1021-1032.
65. Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, Carroll AJ, Mrózek K, Vardiman JW, George SL, Koltitz JE, Larson RA, Bloomfield CD, Caligiuri MA: *Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study*. Cancer Res. 2001; 61: 7233-7239.

**IL RUOLO DEL PROFILO GENETICO DELL'OSPITE  
NEL RISCHIO DI TRASFORMAZIONE DA  
LEUCEMIA LINFATICA CRONICA A SINDROME DI RICHTER**

Premio "Giampiero Gaidano" 2009/2010  
Tesi di Laurea premiata dalla Fondazione Piera, Pietro e Giovanni Ferrero  
in collaborazione con l'Accademia di Medicina di Torino

*Marco Fangazio, Silvia Rasi, Valeria Spina, Alessio Bruscazzin,  
Lorenzo De Paoli, Sara Monti, Carmela Ciardullo, Rosella Famà,  
Stefania Cresta, Davide Rossi, Gianluca Gaidano*

Divisione di Ematologia - Dipartimento di Medicina Traslazionale  
Università del Piemonte Orientale Amedeo Avogadro - Novara

Key Words:     *Richter syndrome / Sindrome di Richter  
Chronic lymphocytic leukemia / Leucemia linfatica cronica  
Single nucleotide / Polimorfismo a singolo  
polymorphism    nucleotide  
LRP4 / LRP4*

**Abstract:**

Transformation of chronic lymphocytic leukemia (CLL) to an aggressive lymphoma, mainly diffuse large B-cell lymphoma, is known as Richter syndrome (RS). To date, molecular mechanisms and risk factors driving CLL transformation to RS are not fully known. The aim of the study is to investigate the role of the host genetic background in CLL to RS transformation. Forty-five single nucleotide polymorphisms (SNP) known to be relevant for CLL prognosis were analyzed in 331 CLL patients (21 of which experienced the RS transformation). After correcting for multiple testing, multivariate analysis identified *LRP4* rs2306029 ( $p = 0.018$ ) as being independently associated with a higher risk of RS transformation. Enrichment of the *LRP4* TT genotype in RS was confirmed in an independent series ( $n = 33$ ) used for validation purposes. The *LRP4* protein was expressed in CLL by western blot, flow cytometry and immunohistochemistry. The bioinformatic tool Polyphen predicted *LRP4* rs2306029 as a possibly deleterious and damaging variant of *LRP4*. Since *LRP4* is involved in Wnt signaling suppression, *LRP4* rs2306029 TT could be relevant in RS pathogenesis.

**Riassunto:**

La sindrome di Richter (RS) rappresenta la trasformazione della leucemia linfatica cronica (CLL) in linfoma aggressivo, più comunemente in linfoma diffuso a grandi cellule B. Ad oggi, i meccanismi e i fattori di rischio della trasformazione da CLL a RS sono conosciuti solo in parte. Scopo dello studio è indagare il ruolo del background genetico dell'ospite nella trasformazione della CLL a RS. Una serie consecutiva di 331 CLL (di cui 21 trasformate in RS) è stata genotipizzata per 45 polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) noti per essere rilevanti a livello prognostico nella CLL. L'analisi multivariata corretta per i confronti multipli ha identificato il genotipo *LRP4* rs2306029 TT come predittore indipendente di trasformazione a RS ( $p = 0.018$ ). La genotipizzazione di *LRP4* rs2306029 in una serie indipendente di RS ( $n = 33$ ) ha confermato l'arricchimento del genotipo *LRP4* rs2306029 TT osservato nella serie originale di RS (39.4% vs. 57.1%;  $p = 0.202$ ). La proteina LRP4 è dimostrata essere espressa dalle cellule di CLL mediante l'analisi in *western blot*, citofluorimetria e immunoistochimica. L'analisi bioinformatica condotta in silico mediante algoritmo PolyPhen ha documentato che lo SNP *LRP4* rs2306029 ha un potenziale effetto deleterio sulla funzione della proteina LRP4. Dato che LRP4 è coinvolto nella soppressione del segnale di Wnt, il genotipo *LRP4* rs2306029 TT potrebbe avere una rilevanza patogenetica per lo sviluppo di RS.

## INTRODUZIONE

La sindrome di Richter (RS) rappresenta la trasformazione clinico-patologica della leucemia linfatica cronica (CLL). Classicamente la RS, dal punto di vista anatomopatologico, è rappresentata da un linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL). La malattia coinvolge più frequentemente i linfonodi, benché anche le localizzazioni extra-nodali non siano rare<sup>(18,23,27,30,34,38)</sup>. La diagnosi di RS richiede obbligatoriamente una prova istologica della presenza di un linfoma aggressivo nella lesione indice in cui si sospetta sia avvenuta la trasformazione. In assenza della documentazione istologica di trasformazione, la RS può essere soltanto sospettata clinicamente ma non diagnosticata<sup>(27)</sup>. Studi immunogenotipici hanno rivelato che la maggior parte dei casi di RS (approssimativamente l'80%) è clonalmente correlata al pre-esistente clone di CLL<sup>(3,18,19,21,27,34,36,38)</sup>. Il restante 20% dei casi di RS non è correlato al clone originale della CLL<sup>(3,18,19,21,27,34,36,38)</sup>.

La RS non è un evento raro nella storia clinica della CLL e ricorre con una incidenza cumulativa rispettivamente del 10 e del 15% a 5 e 10 anni dalla diagnosi<sup>(27)</sup>. Una volta avvenuta la trasformazione, la prognosi dei pazienti affetti da RS è generalmente altamente sfavorevole e la sopravvivenza mediana dopo la diagnosi di RS è di 9-16 mesi. Tuttavia, un ampio studio di pazienti con RS dimostrata istologicamente ha documentato che la sopravvivenza è eterogenea, con un range che può variare da settimane fino a 15 anni<sup>(39)</sup>.

L'estensione della malattia al momento della diagnosi di trasformazione rappresenta ad oggi il parametro prognostico più importante nella RS e ne giustifica in parte l'eterogeneità clinica<sup>(39)</sup>. Questa osservazione suggerisce che il riconoscimento precoce della trasformazione a RS, prima che la malattia abbia raggiunto un elevato *tumor burden*, potrebbe essere utile nel migliorare la prognosi di questi pazienti. Una strategia per riconoscere precocemente la trasformazione da CLL a RS potrebbe essere rappresentata dallo stretto monitoraggio clinico e biotico dei pazienti che, già nella fase CLL, presentino fattori di rischio di trasformazione.

I meccanismi e i fattori di rischio che sottendono la trasformazione da CLL a RS sono noti solo in parte<sup>(23,30,38)</sup>. Ad oggi, i fattori di rischio predittivi di trasformazione a RS identificabili al momento della diagnosi di CLL includono prevalentemente parametri biologici derivati dallo studio del clone tumorale, tra cui:

- i) l'assenza della delezione della banda 13q14;
- ii) l'espressione di CD38;
- iii) l'utilizzo del gene *IGHV4-39*;

- iv) la lunghezza del telomero; e
- v) l'utilizzo di CDR3 stereotipati<sup>(1,7,28,29,31,32)</sup>.

Nonostante il loro significato prognostico, le caratteristiche biologiche del clone tumorale non riflettono appieno l'eterogeneità della RS. Alla luce delle evidenze derivate da altri tipi di tumore, oltre ai fattori legati al clone neoplastico, anche il profilo genetico dell'ospite potrebbe contribuire alla cinetica di malattia della CLL e, in particolare, alla biologia della trasformazione da CLL a RS<sup>(24,28)</sup>. Il genoma umano presenta varianti interindividuali della sequenza di DNA chiamate polimorfismi a singolo nucleotide (single nucleotide polymorphism, SNP), caratterizzati dalla sostituzione di un singolo nucleotide con un altro. Attualmente sono stati identificati oltre 1.8 milioni di SNP. Di questi, circa 60.000 colpiscono regioni geniche codificanti o regolatorie, con potenziali conseguenze sulla funzione o sui livelli di espressione delle proteine.

Ad oggi, l'evidenza del coinvolgimento del profilo genetico dell'ospite nella RS è limitata allo SNP rs6449182 del gene *CD38* che modula l'espressione di CD38, un ectoenzima espresso sulla superficie delle cellule di CLL, modificando l'affinità della regione regolatoria del gene stesso per il fattore trascrizionale E2A<sup>(1,40)</sup>. I pazienti affetti da CLL e portatori dell'allele variante G dello SNP *CD38* rs6449182 presentano un'aumentata affinità di legame della regione regolatoria per E2A e quindi esprimono livelli più elevati di CD38, che è un noto marcatore associato al rischio di trasformazione a RS<sup>(1,40)</sup>.

Questi dati suggeriscono che l'interazione tra il profilo genetico dell'ospite e le caratteristiche biologiche del clone tumorale possano influenzare la storia clinica della CLL così come il rischio di trasformazione a RS.

Questo studio ha come obiettivo l'identificazione delle variabili del profilo genetico dell'ospite che, alla diagnosi di CLL, ne predicano il rischio di trasformazione a RS. In questo studio abbiamo documentato che lo SNP non sinonimo rs2306029 del gene *LRP4* rappresenta un nuovo fattore di rischio di trasformazione da CLL a RS. Il gene *LRP4* è membro della famiglia genica dei recettori delle lipoproteine a bassa densità ed è coinvolto nella modulazione del segnale della via di Wnt, una via di trasduzione del segnale già ben nota per essere coinvolta in diverse neoplasie solide ed ematologiche.

## MATERIALI E METODI

### Pazienti

Lo studio è stato basato su di una serie consecutiva di 331 pazienti affetti da CLL, con un fenotipo tipico sIg low/CD5+/CD23+ e uno score secondo

Matutes > 3<sup>(20)</sup>. Di questi pazienti, 21 sono andati incontro a trasformazione in RS. Allo scopo di validare i risultati, è stata raccolta una coorte indipendente di 33 ulteriori casi di RS.

Nel database sono state registrate le seguenti variabili cliniche presenti al momento della diagnosi di CLL: data della diagnosi, età e sesso, stadio secondo Binet, numero di sedi linfonodali coinvolte dalla malattia, dimensioni del diametro massimo linfonodale, conta linfocitaria assoluta, livelli di emoglobina, conta piastrinica, e LDH (*range* di normalità 200-450 U/L). Tutti i pazienti sono stati gestiti in accordo con le linee guida NCI<sup>(4)</sup>. Durante il *follow up* sono state registrate le seguenti variabili: data di trasformazione a RS, data del decesso.

La diagnosi di RS è stata posta documentando istologicamente la trasformazione a linfoma aggressivo. Tutti i casi di RS sono stati classificati come DLBCL in accordo con la classificazione dei tumori dei tessuti ematopoietici e linfoidi della *World Health Organization*<sup>(35)</sup>.

### Genotipizzazione degli SNP

La genotipizzazione degli SNP è stata eseguita su DNA germinale estratto dai granulociti utilizzando la tecnologia del minisequenziamento di SNP (ABI Prism SNaPshot Multiplex kit, Applied Biosystems, Foster City, CA).

Gli SNP analizzati in questo studio sono stati selezionati secondo i seguenti criteri:

- i) SNP per cui è nota una associazione con la prognosi o la predisposizione alla malattia nei pazienti affetti da CLL;
- ii) SNP con una frequenza dell'allele minore > 5% nell'etnia caucasica.

In accordo con i succitati criteri, sono stati analizzati 45 SNP appartenenti a 45 geni: *APOE* rs7412 (19q13.2), *BARD1* rs2229571 (2q34-q35), *BRCA2* rs4987117 (13q12.3), *CD38* rs6449182 (4p15), *CD5* rs2229177 (11q13), *CPA4* rs2171492 (7q32), *CPT2* rs1799822 (1p32), *CYP2C9* rs1057910 (10q24), *DUSP13* rs3088142 (10q22.2), *ENPP5* rs6926570 (6p21.1-p11.2), *ERBB2IP* rs3213837 (5q12.3), *ERCC5* rs17655 (13q33), *ERCC6* rs2228528 (10q11.23), *ESPL1* rs1318648 (12q), *FHL5* rs9373985 (6q16.1-q16.3), *FOXN1* rs2071587 (17q11-q12), *GALNACT2* rs2435381 (10q11.21), *GTF2E1* rs3732401 (3q21-q24), *HIPK4* rs11670988 (19q13.2), *IL16* rs4072111 (15q26.3), *IL19* rs2243191 (1q32.2), *INHBC* rs2229357 (12q13.1), *IRF4* rs872071 (6p25-p23), *KLRC4* rs1841958 (12p13.2-p12.3), *KRT1* rs17678945 (12q12-q13), *LAMA2* rs2306942 (6q22-q23), *LILRA4* rs2241384 (19q13.4), *LRP2* rs4667591 (2q24-q31), *LRP4* rs2306029 (11p11.2-p12), *MDM2*

rs2279744 (12q14.3-q15), *MGMT* rs12917 (10q26), *MMP10* rs17293607 (11q22.3), *MYBPC3* rs3729986 (11p11.2), *PMS2* rs1805324 (7p22.2), *POLB* rs3136797 (8p11.2), *SEC23B* rs2273526 (20p11.23), *SEMA3C* rs1527482 (7q21-q31), *THBS1* rs2228262 (15q15), *TOPBP1* rs17301766 (3q22.1), *TYR* rs1042602 (11q14-q21), *USP47* rs11022079 (11p15.3), *XRCC2* rs3218536 (7q36.1), *ZNF169* rs12350212 (9q22.32), *ZNF527* rs4452075 (19q13.1), *ZNF573* rs3752365 (19q13.12). La nomenclatura degli SNP e la posizione nucleotidica è stata definita in accordo con i criteri *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>. Ultimo accesso in Maggio 2010).

La deviazione della distribuzione dei genotipi degli SNP dall'equilibrio di Hardy-Weinberg è stata analizzata con il test chi-quadro e il test esatto di Fisher. Sette SNP non erano in equilibrio di Hardy-Weinberg e per questa ragione sono stati esclusi dalle analisi di correlazione clinica. Il *linkage disequilibrium* tra gli SNP è stato stimato utilizzando i valori  $r^2$  calcolati con il software *HAPLOVIEW* (<http://www.broad.mit.edu/haploview/haploview>. Ultimo accesso in Maggio 2010). Questa analisi ha dimostrato che nessuno SNP era in forte *linkage disequilibrium* ( $r^2 \geq 0,8$ ) con un altro SNP.

#### **Analisi dell'espressione di LRP4 in western blot**

È stata eseguita una corsa elettroforetica dei campioni di lisato cellulare di cellule leucemiche (n = 10; 50 x 10<sup>6</sup> cellule ciascuno) e dei campioni di controllo (n = 5; 50 x 10<sup>6</sup> cellule ciascuno) su gel elettroforetico di poliacrilamide. Le proteine, a seguito della corsa elettroforetica, sono state trasferite dal gel di poliacrilamide ad una membrana di nitrato di cellulosa con tecniche standard ed immerse in TTBS (Tween-Tris Buffered Saline: 0.1% Tween-20 in 100 mM Tris-CL [pH 7.5], 0.9% NaCl) per due lavaggi di 15 minuti ciascuno. La membrana è quindi stata fissata con una soluzione al 10% di NFDM (nonfat dried milk) in TTBS, ed è stata posta su un agitatore rotatorio per 15 minuti a temperatura ambiente. Al termine sono stati eseguiti tre lavaggi in TTBS. In seguito, la membrana è stata incubata per un'ora a temperatura ambiente con l'anticorpo policlonale purificato da coniglio con reattività anti-LRP4 c-terminale umano (Abgent, San Diego, CA) diluito in TTBS/1% NFDM alla concentrazione 1 µg/ml. Quindi, sono stati eseguiti tre lavaggi in TTBS. Al termine di questa operazione, la membrana è stata incubata per 30 minuti a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario diluito in TTBS/1% NFDM. Al termine di questo procedimento, l'eccesso di anticorpo secondario è stato rimosso con tre lavaggi di TTBS (20-50 ml) per cinque minuti ciascuno e la membrana è stata analizzata per chemiluminescenza.

### **Analisi dell'espressione di LRP4 in immunoistochimica**

L'espressione di LRP4 nelle cellule di CLL è stata analizzata su 30 biopsie di midollo osseo incluse in paraffina utilizzando come anticorpo primario l'anticorpo policlonale purificato da coniglio con reattività umana anti-LRP4 (Prestige Antibodies®, Sigma Aldrich, St. Luis, MO). L'espressione di LRP4 è stata valutata in cinque campi microscopici ad alto ingrandimento (400x) selezionati casualmente.

### **Analisi in silico**

L'impatto del genotipo del SNP *LRP4* rs2306029 sulla funzione della proteina LRP4 è stato analizzato *in silico* utilizzando gli algoritmi PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>. Ultimo accesso in Maggio 2010), e SIFT (<http://blocks.fhrc.org/sift/SIFT.html>. Ultimo accesso in Maggio 2010). Le sequenze aminoacidiche della proteina LRP4 di *Homo sapiens*, LRP4 di *Pan troglodytes*, LRP4 di *Canis lupus familiaris*, LRP4 di *Bos taurus*, LRP4 di *Mus musculus*, LRP4 di *Rattus norvegicus*, LRP4 di *Gallus gallus*, LOC569450 di *Danio rerio* sono state reperite nel database NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>. Ultimo accesso in Maggio 2010). L'allineamento delle sequenze aminoacidiche di LRP4 è stato elaborato utilizzando i *software* MEGA4, ClustalW e, per la visualizzazione grafica, Weblogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>. Ultimo accesso in Maggio 2010).

### **Analisi Statistica**

Il tempo alla trasformazione a RS è stato definito come l'intervallo compreso tra la data di diagnosi di CLL e la data in cui è stata documentata istologicamente la trasformazione a RS, la data di morte o la data di ultimo *follow-up* (censoring). La probabilità cumulativa di trasformazione a RS è stata calcolata con il metodo di Kaplan-Meier<sup>(14)</sup>. L'associazione tra il genotipo SNP e il rischio di trasformazione a RS è stata valutata mediante analisi univariata di Cox considerando l'allele minore come se agisse sia in modo recessivo sia in modo dominante<sup>(6)</sup>. L'analisi multivariata è stata eseguita mediante regressione di Cox. Nel caso di più covariate altamente predittive, il fenomeno della probabilità monotona è stato gestito applicando alla regressione di Cox la correzione di Firth<sup>(6)</sup>. Il test False Discovery Rate (FDR) è stato applicato al fine di correggere per i confronti multipli le analisi di correlazione<sup>(2)</sup>. Le variabili categoriche sono state confrontate utilizzando il test del chi-quadro o il test di Fisher. Le variabili continue sono state confrontate utilizzando il test di Mann-Whitney. Tutti i test statistici hanno utilizzato una distribuzione a due

code. La significatività statistica è stata definita da un valore di p inferiore a 0.05. Le analisi sono state eseguite utilizzando il software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) v.18.0 (Chicago, IL) e il software *R statistical package* (<http://www.r-project.org/>).

## RISULTATI

### **Il genotipo di *LRP4* rs2306029 è un predittore indipendente di trasformazione a sindrome di Richter**

Per comprendere l'impatto del profilo genetico dell'ospite sul rischio di trasformazione da CLL a RS sono stati genotipizzati 45 SNP noti per essere associati con la predisposizione alla malattia o con la progressione della CLL in una coorte di pazienti affetti da CLL (n = 331) le cui caratteristiche cliniche alla diagnosi sono rappresentative della malattia (Tabella I). Dopo un *follow up* mediano dalla diagnosi di 75 mesi, 21/331 pazienti affetti da CLL sono trasformati a RS, con una probabilità cumulativa di trasformazione a 5 anni pari a 7.1% (95% CI: 3.8-10.4%).

I 45 SNP analizzati erano: *APOE* rs7412 (19q13.2), *BARD1* rs2229571 (2q34-q35), *BRCA2* rs4987117 (13q12.3), *CD38* rs6449182 (4p15), *CD5* rs2229177 (11q13), *CPA4* rs2171492 (7q32), *CPT2* rs1799822 (1p32), *CYP2C9* rs1057910 (10q24), *DUSP13* rs3088142 (10q22.2), *ENPP5* rs6926570 (6p21.1-p11.2), *ERBB2IP* rs3213837 (5q12.3), *ERCC5* rs17655 (13q33), *ERCC6* rs2228528 (10q11.23), *ESPL1* rs1318648 (12q), *FHL5* rs9373985 (6q16.1-q16.3), *FOXN1* rs2071587 (17q11-q12), *GALNACT2* rs2435381 (10q11.21), *GTF2E1* rs3732401 (3q21-q24), *HIPK4* rs11670988 (19q13.2), *IL16* rs4072111 (15q26.3), *IL19* rs2243191 (1q32.2), *INHBC* rs2229357 (12q13.1), *IRF4* rs872071 (6p25-p23), *KLRC4* rs1841958 (12p13.2-p12.3), *KRTI* rs17678945 (12q12-q13), *LAMA2* rs2306942 (6q22-q23), *LILRA4* rs2241384 (19q13.4), *LRP2* rs4667591 (2q24-q31), *LRP4* rs2306029 (11p11.2-p12), *MDM2* rs2279744 (12q14.3-q15), *MGMT* rs12917 (10q26), *MMP10* rs17293607 (11q22.3), *MYBPC3* rs3729986 (11p11.2), *PMS2* rs1805324 (7p22.2), *POLB* rs3136797 (8p11.2), *SEC23B* rs2273526 (20p11.23), *SEMA3C* rs1527482 (7q21-q31), *THBS1* rs2228262 (15q15), *TOPBP1* rs17301766 (3q22.1), *TYR* rs1042602 (11q14-q21), *USP47* rs11022079 (11p15.3), *XRCC2* rs3218536 (7q36.1), *ZNF169* rs12350212 (9q22.32), *ZNF527* rs4452075 (19q13.1), *ZNF573* rs3752365 (19q13.12).

Il genotipo di 7 SNP devia dall'equilibrio di Hardy-Weinberg: *BARD1* rs2229571 (2q34-q35), *DUSP13* rs3088142 (10q22.2), *ERBB2IP* rs3213837

Tabella I. Caratteristiche biologiche e cliniche alla diagnosi della coorte di pazienti affetti da leucemia linfatica cronica<sup>a</sup>.

Caratteristiche alla diagnosi	
<b>Variabili biologiche</b>	
Omologia dei geni <i>IGHV</i> $\geq 98\%$	125/326 (38,3%)
CDR3 stereotipato	77/326 (23,6%)
Utilizzo del gene <i>IGHV4-39</i>	9/326 (2,8%)
<b>Cariotipo FISH</b>	
Normale	89/320 (27,8%)
Delezione 13q14	120/320 (37,5%)
Trisomia 12	55/320 (17,2%)
Delezione 11q22-q23	22/320 (6,9%)
Delezione 17p13	34/320 (10,6%)
Mutazioni di <i>TP53</i>	32/306 (10,5%)
Espressione di CD38 $\geq 30\%$	104/326 (31,9%)
<b>Variabili cliniche</b>	
Età mediana (anni)	68 (60-74)
Sesso maschile	175/331 (52,9%)
<b>Stadio di Binet</b>	
A	256/331 (77,3%)
B	41/331 (12,4%)
C	34/331 (10,3%)
Numero di sedi linfonodali coinvolte dalla malattia $\geq 3$	52/331 (15,7%)
Dimensioni del diametro massimo linfonodale $\geq 3$ cm	34/331 (10,3%)
Conta linfocitaria assoluta mediana ( $\times 10^9/L$ )	11,5 (6,4-20,0)
Livelli mediani di emoglobina (g/dL)	13,6 (12,8-14,8)
Conta piastrinica mediana ( $\times 10^9/L$ )	193 (149-235)
Livelli mediani di LDH (U/L)	360 (305-428)

<sup>a</sup> 25°-75° percentile delle variabili continue sono riportati nelle parentesi; *IGHV*, regione variabile della catena pesante delle immunoglobuline; CDR3, regione determinante la complementarietà 3 dei geni della catena pesante delle immunoglobuline

(5q12.3), *FHL5* rs9373985 (6q16.1-q16.3), *GALNACT2* rs2435381 (10q11.21), *MYBPC3* rs3729986 (11p11.2), *ZNF573* rs3752365 (19q13.12). Pertanto, questi 7 SNP sono stati esclusi dalle analisi di correlazione clinica.

Per ognuno dei 38 rimanenti SNP, il genotipo è stato correlato con la probabilità cumulativa di trasformazione considerando l'allele minore come se agisse sia in modo recessivo sia in modo dominante. L'analisi univariata è stata condotta utilizzando il metodo della regressione di Cox e correggendo per i confronti multipli. Dei 38 SNP analizzati, due sono risultati essere associati in maniera statisticamente significativa con la trasformazione a RS:

*LRP4* rs2306029 ( $p = 0.001$ ;  $q = 0.047$ ) e *CD38* rs6449182 ( $p = 0.005$ ;  $q = 0.117$ ) (Figura 1).

I pazienti portatori del genotipo TT omozigote per l'allele variante di *LRP4* rs2306029 hanno mostrato un maggior rischio di trasformazione a RS (HR: 4.17, 95% CI: 1.75-9.92; trasformati/N: 12/79; rischio di trasformazione a 5 anni: 13.5%; 95% CI: 5.3-21.7%) rispetto ai pazienti portatori dei genotipi CT/CC di *LRP4* rs2306029 che contengono l'allele comune (trasformati/N: 9/252; rischio di trasformazione a 5 anni: 4.4%; 95% CI: 1.5-6.9%) (Figura 2A).

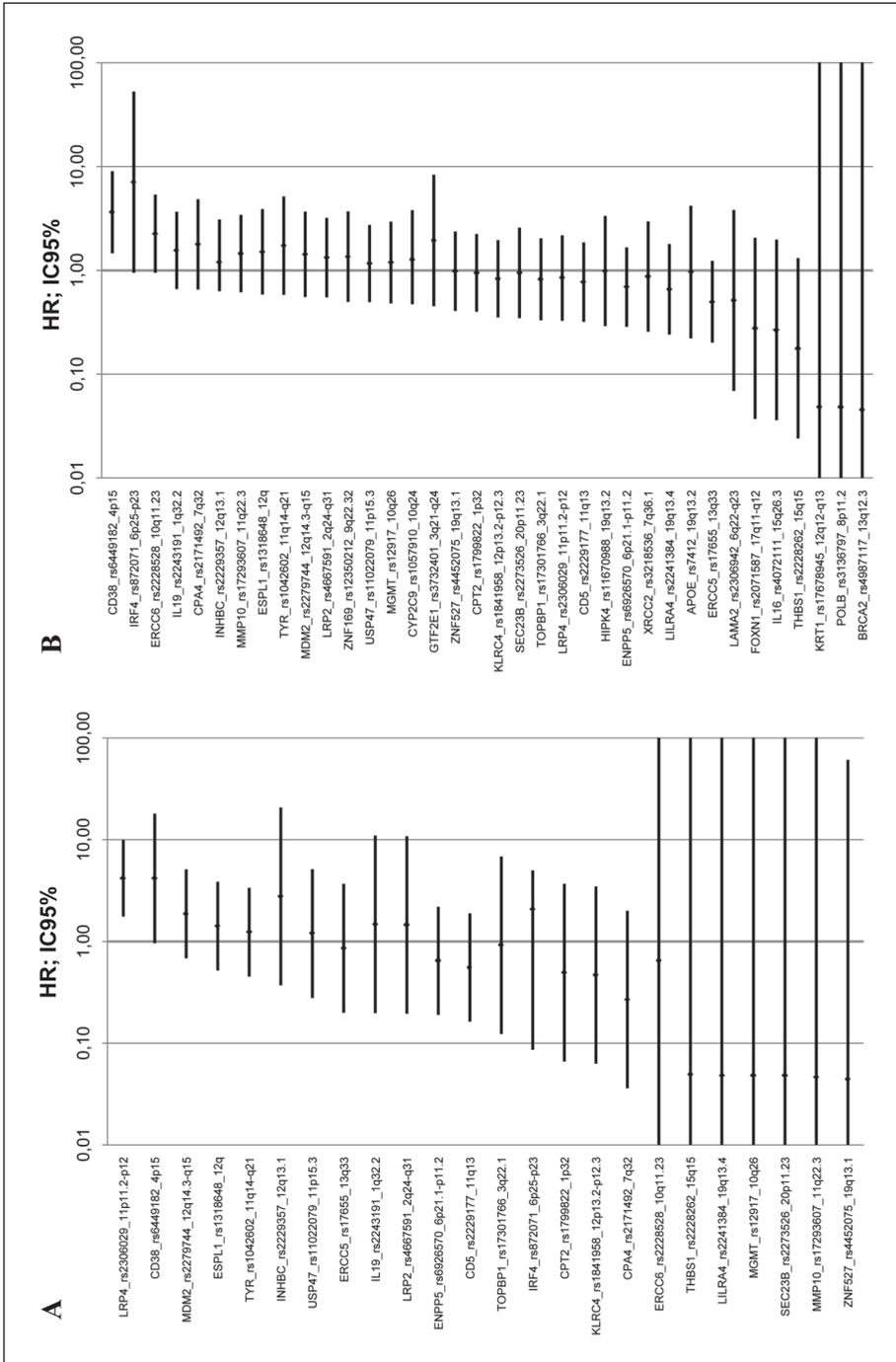
Anche i pazienti portatori dei genotipi CG/GG *CD38* rs6449182, contenti l'allele variante, hanno mostrato un maggior rischio di trasformazione a RS (HR: 3.63, 95% CI: 1.46-9.00; trasformati/N: 14/119; rischio di trasformazione a 5 anni: 10.9%; 95% CI: 4.7-17.1%) rispetto ai pazienti portatori del genotipo CC omozigote per l'allele comune di *CD38* rs6449182 (trasformati/N: 7/212; rischio di trasformazione a 5 anni: 4.2%; 95% CI: 1.1-7.3%) (Figura 2B).

Le altre caratteristiche alla diagnosi di CLL associate in maniera statisticamente significativa con la trasformazione a RS erano: lo stadio di malattia avanzato (stadio Binet B-C, HR: 4.68, 95% CI: 1.98-11.05,  $p < 0.001$ ), le dimensioni dei linfonodi maggiori o uguali a 3 cm (HR: 10.68, 95% CI: 4.43-25.74,  $p < 0.001$ ), il coinvolgimento di tre o più stazioni linfonodali (HR: 5.27, 95% CI: 2.19-12.65,  $p < 0.001$ ), i valori di LDH maggiori al

*Figura 1* (→ pagina seguente). *Analisi univariata del rischio di trasformazione da leucemia linfatica cronica a sindrome di Richter (RS).*

*Pannello A: Hazard ratio (HR) e intervalli di confidenza al 95% (IC 95%) derivati dalla analisi Cox univariata considerando: i) come variabile dipendente la trasformazione a sindrome di Richter; ii) come variabile indipendente il genotipo di ciascuno dei 37 polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) analizzabili; iii) l'allele minore come se agisse in modo dominante. Dei 45 SNP genotipizzati, 8 non sono inclusi nella analisi di correlazione (1 SNP presentava un unico genotipo omozigote per l'allele comune; 7 SNP non erano in equilibrio di Hardy-Weinberg). Dei 37 SNP analizzati, solo lo SNP CD38 rs6449182 è risultato essere associato significativamente con la trasformazione a RS: (HR: 3,63; 95% CI: 1,46 - 9,00).*

*Pannello B: Hazard ratio (HR) e intervalli di confidenza al 95% (IC 95%) derivati dalla analisi Cox univariata considerando: i) come variabile dipendente la trasformazione a sindrome di Richter; ii) come variabile indipendente il genotipo di ciascuno dei 24 polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) analizzabili; iii) l'allele minore come se agisse in modo recessivo. Dei 45 SNP genotipizzati, 21 non sono inclusi nella analisi di correlazione (1 SNP presentava un unico genotipo omozigote per l'allele comune; 13 SNP presentavano un genotipo omozigote dell'allele variante rappresentato in < 5 pazienti; 7 SNP non erano in equilibrio di Hardy-Weinberg). Dei 24 SNP analizzati, solo LRP4 rs2306029 è risultato essere associato significativamente con la trasformazione a RS: (HR: 4,17; 95% CI: 1,75 - 9,92).*



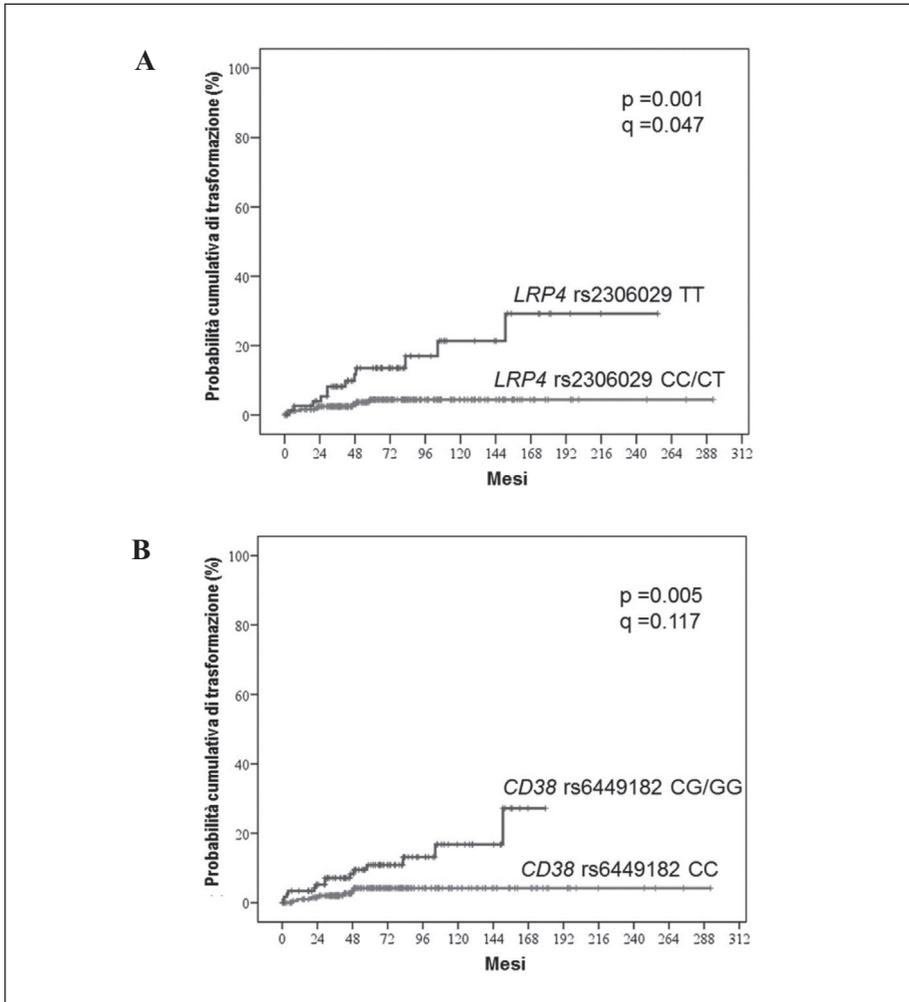


Figura 2. Curve di Kaplan-Meier che mostrano la probabilità cumulativa di trasformazione da leucemia linfatica cronica a sindrome di Richter (RS) stratificata in base al genotipo.

Pannello A: I pazienti portatori del genotipo TT omozigote per l'allele variante di LRP4 rs2306029 mostrano una probabilità cumulativa di trasformazione a RS significativamente maggiore ( $p = 0.001$ ) rispetto ai pazienti portatori dei genotipi CT/CC di LRP4 rs2306029. La differenza è significativa anche dopo correzione per i confronti multipli tramite test False Discovery Rate ( $q = 0.047$ ).

Pannello B: I pazienti portatori dei genotipi CG/GG contenenti l'allele variante di CD38 rs6449182 mostrano una probabilità cumulativa di trasformazione a RS significativamente maggiore ( $p = 0.005$ ) rispetto ai pazienti portatori del genotipo CC di CD38 rs6449182. La differenza è significativa anche dopo correzione per i confronti multipli tramite test False Discovery Rate ( $q = 0.117$ ).

limite superiore di normalità (HR: 6.22, 95% CI: 2.57-15.09,  $p < 0.001$ ), l'espressione di  $CD38 \geq 30\%$  (HR: 3.26, 95% CI: 1.31-8.13,  $p = 0.011$ ), la presenza di delezione o mutazione del gene *TP53* (HR: 3.81, 95% CI: 1.53-9.51,  $p = 0.004$ ), la presenza di geni *IGHV* non mutati (HR: 4.61, 95% CI: 1.77-12.00,  $p = 0.002$ ), la presenza di un CDR3 stereotipato (HR: 7.10, 95% CI: 2.87-17.62,  $p < 0.001$ ) e l'utilizzo del gene *IGHV4-39* (HR: 12.79, 95% CI: 4.66-35.12,  $p < 0.001$ ).

Non sono risultati predittivi di trasformazione a RS l'età superiore a 65 anni (HR: 1.24, 95% CI: 0.52-2.96,  $p = 0.634$ ), il sesso maschile (HR: 1.25, 95% CI: 0.53-2.98,  $p = 0.608$ ) e la conta linfocitaria assoluta  $\times 10^9/L$  (HR: 0.835, 95% CI: 0.305-2.284,  $p = 0.726$ ).

I pazienti che portavano alla diagnosi le caratteristiche cliniche o biologiche associate ad un maggiore rischio di trasformazione non erano arricchiti del genotipo TT di *LRP4* rs2306029 ( $p > 0.05$  in tutti i casi) e, pertanto, il genotipo TT di *LRP4* rs2306029 non rappresenta un marcatore surrogato degli altri fattori di rischio di trasformazione a RS.

L'analisi multivariata ha selezionato il genotipo TT di *LRP4* rs2306029 come un fattore di rischio indipendente di trasformazione a RS (HR: 3.21; 95% CI: 1.22-8.45;  $p = 0.018$ ), insieme alla presenza di CDR3 stereotipato (HR: 4.45; 95% CI: 1.67-11.89;  $p = 0.003$ ) e all'utilizzo del gene *IGHV4-39* (HR: 6.13; 95% CI: 1.95-19.19;  $p = 0.002$ ).

### **La validità del genotipo TT di *LRP4* rs2306029 come predittore indipendente di trasformazione a sindrome di Richter è confermata in una coorte di pazienti indipendente**

Allo scopo di validare l'arricchimento del genotipo TT di *LRP4* rs2306029 nei pazienti trasformati da RS, lo SNP *LRP4* rs2306029 è stato genotipizzato in una serie indipendente di pazienti affetti da RS ( $n = 33$ ). La prevalenza del genotipo TT di *LRP4* rs2306029 documentata nella serie di RS di validazione (13/33, 39.4%) non differiva significativamente rispetto alla prevalenza osservata nella serie di RS originale (12/21, 57.1%) ( $p = 0.202$ ).

### **LRP4 è espresso dalle cellule di leucemia linfatica cronica**

*LRP4* rs2306029 è uno SNP non-sinonimo che mappa sull'esone 31 del gene *LRP4* e porta alla sostituzione aminoacidica Ser1554Gly. La serina in questa posizione è fortemente conservata nella filogenesi ed è localizzata nel contesto del dominio  $\alpha$ -elica dei recettori di classe B delle lipoproteine a bassa densità. Questo dominio è necessario per il corretto ripiegamento e per

la stabilità della proteina LRP4. L'analisi bioinformatica condotta utilizzando l'algoritmo PolyPhen indicava che *LRP4* rs2306029 è uno SNP potenzialmente deleterio e dannoso per la proteina LRP4 (PSIC score = 1.776).

Poiché non è noto se la proteina LRP4 sia espressa dalla CLL, abbiamo analizzato i livelli di espressione di LRP4 nelle cellule leucemiche mediante *western blot*, citofluorimetria ed immunistochemica.

L'analisi di *western blot* del lisato cellulare ottenuto dalle cellule leucemiche del sangue periferico (n = 10) ha documentato che LRP4 è espresso nelle cellule di CLL con la dimensione attesa di 212 kD.

La citofluorimetria ha documentato che LRP4 è espresso in tutti i casi di CLL analizzati (n = 64), con una percentuale mediana di espressione del 72% (il *range* varia dal 30% al 98%) e un valore di fluorescenza medio di 51 (*range* 14-57).

L'analisi immunistochemica eseguita su biopsie osteo-midollari ha mostrato l'espressione di LRP4 in 19/30 (63.3%) casi di CLL analizzati, con *pattern* di espressione nucleare (8/19, 42.1%), nucleare-citoplasmatico (6/19, 31.5%), o citoplasmatico (5/19, 26.3%).

Il genotipo *LRP4* rs2306029 non influiva in modo significativo sulla percentuale di cellule positive per espressione di LRP4, sul valore medio di fluorescenza di LRP4, o sulla localizzazione subcellulare della proteina LRP4 nelle cellule di CLL.

## DISCUSSIONE

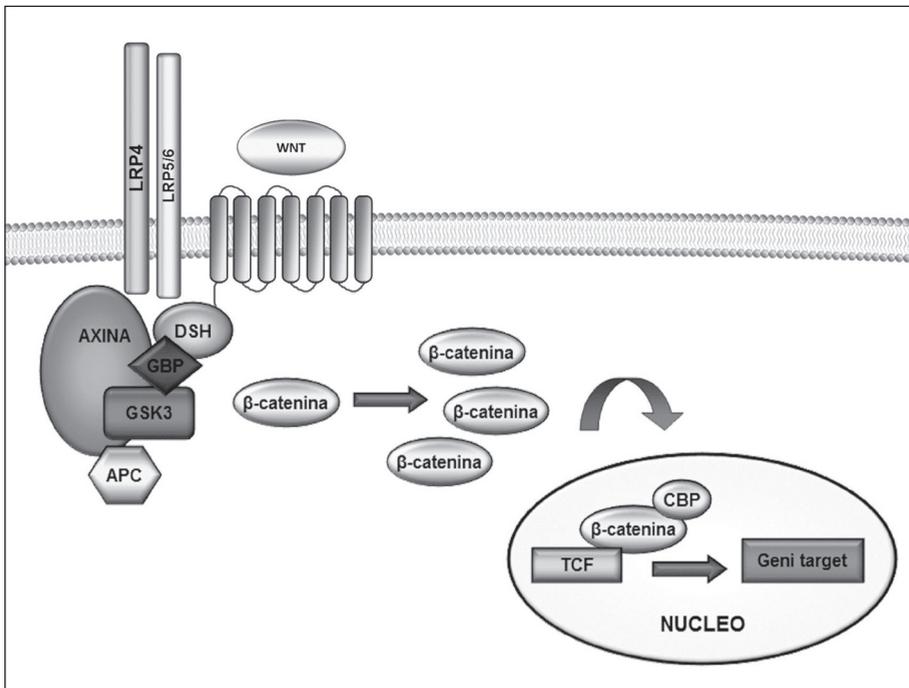
I risultati dimostrano che:

- i) *LRP4* rs2306029 è un fattore di rischio indipendente di trasformazione a RS;
- ii) il genotipo TT di *LRP4* rs2306029, associato a rischio di trasformazione, è frequentemente rappresentato anche in una coorte indipendente di validazione di RS;
- iii) la proteina LRP4 è espressa dalle cellule di CLL;
- iv) il genotipo *LRP4* rs2306029 rappresenta uno SNP potenzialmente deleterio e dannoso per funzionalità della proteina LRP4.

LRP4 appartiene alla famiglia dei recettori multifunzionali delle lipoproteine a bassa densità che, ad oggi, include 12 membri<sup>(25)</sup>. Tra questi, LRP4, LRP5 e LRP6 costituiscono un sottogruppo recettoriale caratterizzato da elevata omologia nella sequenza aminoacidica e dalla capacità di dimerizzare, sia come omodimero che come eterodimero<sup>(25)</sup>. Diversi membri

della famiglia dei recettori multifunzionali delle lipoproteine a bassa densità sono coinvolti nel *signaling* cellulare e, in particolare, sono accoppiati alla via di Wnt/ $\beta$ -catenina (Figura 3)<sup>(25)</sup>.

La via di Wnt/ $\beta$ -catenina è innescata dalla interazione delle proteine solubili Wnt con i recettori Fzd. L'interazione di Wnt con il recettore determina una complessa cascata di reazioni intracellulari che, in ultima analisi, influiscono sulla proliferazione cellulare, sul rinnovamento tissutale e sulla tumorigenesi<sup>(11,13,26)</sup>. L'attivazione della via Wnt/Fzd richiede la cooperazione nel *signaling* dei recettori multifunzionali delle lipoproteine a bassa densità LRP5 e LRP6 (Figura 3). L'attivazione del complesso co-recettoriale Fzd/



*Figura 3. Schema rappresentativo della via di trasduzione del segnale di Wnt. L'attivazione della via Wnt/Fzd richiede la cooperazione nel signaling dei recettori multifunzionali delle lipoproteine a bassa densità LRP5 e LRP6; questa attivazione determina la disgregazione del complesso proteico costituito da GSK3 $\beta$ , da APC e dall'axina, che impedisce la degradazione proteasomica della  $\beta$ -catenina e quindi produce un aumento dei livelli intracellulari di  $\beta$ -catenina. La  $\beta$ -catenina accumulata nel citosol trasloca nel nucleo dove modula l'espressione di geni target che regolano il differenziamento, la proliferazione e la morte cellulare. LRP4 compete con LRP5 e LRP6 per il legame con Wnt e agisce spiazzando e, quindi, antagonizzando, l'attività di LRP5/LRP6 nel complesso recettoriale per Wnt.*

LRP5/LRP6 determina la disgregazione del complesso proteico costituito dalla proteina glicogeno sintasi chinasi 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), dalla proteina APC (*adenomatosus polyposis coli*) e dall'axina (Figura 3)<sup>(12)</sup>. Nella forma complessata, GSK3 $\beta$ /APC/axina fosforila la  $\beta$ -catenina introducendo su questa dei siti di riconoscimento per ubiquitinazione. La  $\beta$ -catenina ubiquitinata è quindi riconosciuta e degradata dal proteasoma. L'attivazione del complesso co-recettoriale Fzd/LRP5/LRP6, determinando la disgregazione del complesso GSK3 $\beta$ /APC/axina, impedisce la degradazione proteosomica della  $\beta$ -catenina e quindi produce un aumento dei livelli intracellulari di  $\beta$ -catenina (Figura 3)<sup>(12)</sup>. La  $\beta$ -catenina accumulata nel citosol trasloca nel nucleo dove, legando i fattori di trascrizione LEF (*limphoid-enhancer binding factor*) e TCF (*T-cell-specific transcription factor*), modula l'espressione di geni che regolano il differenziamento, la proliferazione e la morte cellulare<sup>(12)</sup>.

La via di Wnt/ $\beta$ -catenina è coinvolta nella maturazione dei precursori emopoietici dei linfociti B normali ed è spenta una volta raggiunto lo stadio differenziativo di linfocita B maturo. Diverse evidenze suggeriscono che la via di Wnt/ $\beta$ -catenina e la capacità di *selfrenewal* associata a questa siano attivate in maniera aberrante nella CLL<sup>(17,42)</sup>.

Le funzioni biologiche di LRP4 non sono ancora completamente caratterizzate. È noto che LRP4 è indispensabile per un corretto sviluppo embrionale<sup>(41)</sup>. Dal punto di vista funzionale, numerose evidenze suggeriscono che LRP4 sia coinvolto nella via di Wnt/ $\beta$ -catenina. In questo contesto, LRP4 agirebbe inibendo la via del segnale canonica di Wnt/ $\beta$ -catenina. Infatti, la proteina LRP4 condivide elementi strutturali con LRP5 e LRP6, tra cui i domini di legame dei ligandi della via di Wnt/ $\beta$ -catenina. LRP4 compete con LRP5 e LRP6 per il legame con Wnt e agisce spiazzando e, quindi, antagonizzando, l'attività di LRP5/LRP6 nel complesso recettoriale per Wnt<sup>(5,8,15,16,22,43)</sup>.

Il significato biologico di LRP4 nei linfociti B normali e nei linfociti B neoplastici attualmente non è noto. Il nostro studio documenta una associazione clinica tra LRP4 e acquisizione da parte della CLL di un fenotipo aggressivo. La plausibilità biologica della associazione clinica tra genotipo di *LRP4* rs2306029 e trasformazione a RS è documentata da diverse evidenze sperimentali e dalla letteratura. In primo luogo, i risultati di questo studio dimostrano che LRP4 è espresso virtualmente in tutti i casi di CLL e, pertanto, è verosimilmente coinvolto nella biologia della malattia. In secondo luogo, l'analisi bioinformatica condotta utilizzando l'algoritmo PolyPhen ha indicato che *LRP4* rs2306029 è uno SNP potenzialmente deleterio e dannoso per la proteina LRP4. In terzo luogo, *LRP4* rs2306029 è uno SNP non sinonimo che

mappa sull'esone 31 del gene *LRP4* e determina la sostituzione della serina in posizione 1554 con una glicina. La serina in posizione 1554 è fortemente conservata nella filogenesi della proteina LRP4. Infatti, la posizione 1554 è localizzata nel contesto del dominio a  $\beta$ -elica dei recettori di classe B delle lipoproteine a bassa densità, necessario per il corretto ripiegamento e per la stabilità della proteina LRP4<sup>(37)</sup>. In quarto luogo, è noto che il dominio a  $\beta$ -elica dei recettori di classe B delle lipoproteine a bassa densità è critico per la funzione di LRP4, dal momento che:

- i) delezioni sperimentali di questo dominio eliminano l'effetto inibitorio di LRP4 sulla via di trasmissione del segnale Wnt/ $\beta$ -catenina<sup>(8)</sup>; e
- ii) le mutazioni a carico del dominio a  $\beta$ -elica dei recettori di classe B delle lipoproteine a bassa densità di LRP4 causano nell'uomo la sindrome di Cenani-Lenz, un'anomalia congenita autosomica caratterizzata da difetti nello sviluppo degli arti distali, e sindattilia nei bovini e nel topo<sup>(8,9,10,16,33)</sup>.

Da un punto di vista clinico, il riconoscimento precoce della trasformazione a RS, prima che la malattia abbia raggiunto un elevato *tumor burden*, potrebbe essere utile per migliorare la prognosi di questi pazienti. Una strategia per riconoscere precocemente la trasformazione da CLL a RS potrebbe essere rappresentata dallo stretto monitoraggio clinico e biotico dei pazienti che, già nella fase CLL, presentino fattori di rischio di trasformazione.

L'identificazione di marcatori utili per identificare già nella fase cronica della malattia i casi di CLL che andranno incontro a trasformazione in RS è ancora ad uno stadio iniziale. Recenti studi condotti in serie retrospettive di CLL hanno permesso l'identificazione di alcuni marcatori, sia clinici sia biologici, che potrebbero essere d'aiuto nel predire la trasformazione a RS<sup>(1,7,27,29,31,32)</sup>. I predittori di trasformazione a RS sembrano differire, almeno in parte, dai predittori di progressione di CLL senza trasformazione a RS<sup>(1,7,27,29,31,32)</sup>. Questo dato suggerisce che trasformazione a RS e progressione di CLL senza trasformazione istologica siano eventi clinici distinti, che richiedono un approccio diagnostico differente, se pur complementare, per una valutazione completa della categoria di rischio di un singolo paziente.

L'identificazione di *LRP4* come un fattore di rischio indipendente di RS potrebbe aiutare il riconoscimento, già al momento della diagnosi di CLL, di quei pazienti che presentano un aumentato rischio di trasformazione e che potrebbero pertanto beneficiare di uno stretto monitoraggio finalizzato a riconoscere precocemente lo sviluppo di RS.

## BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. Benjamini Y, Hochberg Y: *Controlling false discovery rate: A practicable and powerful approach to multiple testing.* J. R. Stat. Soc. B. 1995; 57: 289-300.
3. 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.
4. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, Rai KR: *National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment.* Blood 1996; 87: 4990-4997.
5. Choi HY, Dieckmann M, Herz J, Niemeier A: *Lrp4, a novel receptor for Dickkopf 1 and sclerostin, is expressed by osteoblasts and regulates bone growth and turnover in vivo.* PLoS One 2009; 4: e7930.
6. Cox DR: *Regression models and life tables.* J. R. Stat. Assoc. 1972; 34: 187-220.
7. Deambrogi C, Cresta S, Cerri M, Rasi S, De Paoli L, Ramponi A, Gaidano G, Rossi D: *14q32 Translocations and risk of Richter transformation in chronic lymphocytic leukaemia.* Br. J. Haematol. 2009; 144: 131-133.
8. Dietrich MF, van der Weyden L, Prosser HM, Bradley A, Herz J, Adams DJ: *Ectodomains of the LDL receptor-related proteins LRP1b and LRP4 have anchorage independent functions in vivo.* PLoS One 2010; 5: e9960.
9. Drögemüller C, Leeb T, Harlizius B, Tammen I, Distl O, Höltershinken M, Gentile A, Duchesne A, Eggen A: *Congenital syndactyly in cattle: four novel mutations in the low density lipoprotein receptor-related protein 4 gene (LRP4).* BMC Med. Genet. 2007; 8: 5.
10. Duchesne A, Gautier M, Chadi S, Grohs C, Floriot S, Gallard Y, Caste G, Ducos A, Eggen A: *Identification of a doublet missense substitution in the bovine LRP4 gene as a candidate causal mutation for syndactyly in Holstein cattle.* Genomics 2006; 88: 610-621.
11. Giles RH, van Es JH, Clevers H: *Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer.* Biochim. Biophys. Acta. 2003; 1653: 1-24.
12. He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X: *LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way.* Development 2004; 131: 1663-1677.
13. Huelsken J, Vogel R, Brinkmann V, Erdmann B, Birchmeier C, Birchmeier W: *Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice.* J. Cell Biol. 2000; 148: 567-578.
14. Kaplan EL, Meier P: *Nonparametric estimation from incomplete observations.* Am. Stat. Assoc. 1958; 53: 457-481.
15. Kim N, Stiegler AL, Cameron TO, Hallock PT, Gomez AM, Huang JH, Hubbard SR, Dustin ML, Burden SJ: *Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK.* Cell 2008; 135: 334-342.

16. Li Y, Pawlik B, Elcioglu N, Aglan M, Kayserili H, Yigit G, Percin F, Goodman F, Nürnberg G, Cenani A, Urquhart J, Chung BD, Ismail S, Amr K, Aslanger AD, Becker C, Netzer C, Scambler P, Eyaid W, Hamamy H, Clayton-Smith J, Hennekam R, Nürnberg P, Herz J, Temtamy SA, Wollnik B: *LRP4 mutations alter Wnt/beta-catenin signaling and cause limb and kidney malformations in Cenani-Lenz syndrome*. Am. J. Hum. Genet. 2010; 14: 696-706.
17. 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 2004; 101: 3118-3123.
18. 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*. Am. J. Surg. Pathol. 2007; 31: 1605-1614.
19. 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.
20. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, Catovsky D: *The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL*. Leukemia 1994; 8: 1640-1645.
21. 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.
22. Ohazama A, Johnson EB, Ota MS, Choi HY, Pornaveetus T, Oommen S, Itoh N, Eto K, Gritli-Linde A, Herz J, Sharpe PT: *Lrp4 modulates extracellular integration of cell signaling pathways in development*. PLoS One 2008; 3: e4092.
23. Omoti CE, Omoti AE: *Richter syndrome: a review of clinical, ocular, neurological and other manifestations*. Br. J. Haematol. 2008; 142: 709-716.
24. Rasi S, Forconi F, Brusca G, Sozzi E, Gaidano G, Rossi D: *Impact of the host genetic background on prognosis of chronic lymphocytic leukemia*. Blood. 2010; 115: 1106-1107.
25. Rey JP, Ellies DL: *Wnt modulators in the biotech pipeline*. Dev. Dyn. 2010; 239: 102-114.
26. Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissman IL: *A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells*. Nature 2003; 423: 409-414.
27. 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.
28. Rossi D, Rasi S, Capello D, Gaidano G: *Prognostic assessment of BCL2-938C > A polymorphism in chronic lymphocytic leukemia*. Blood 2008; 111: 466-468.
29. 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.

30. Rossi D, Gaidano G: *Richter syndrome: molecular insights and clinical perspectives*. Hematol. Oncol. 2009; 27: 1-10.
31. 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.
32. 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.
33. Simon-Chazottes D, Tutois S, Kuehn M, Evans M, Bourgade F, Cook S, Davisson MT, Guénet JL: *Mutations in the gene encoding the low-density lipoprotein receptor LRP4 cause abnormal limb development in the mouse*. Genomics 2006; 87: 673-677.
34. Smit LA, van Maldegem F, Langerak AW, van der Schoot , 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.
35. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW: *World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 2008; Lyon: IARC.
36. 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.
37. Tomita Y, Kim DH, Magoori K, Fujino T, Yamamoto TT: *A novel low-density lipoprotein receptor-related protein with type II membrane protein-like structure is abundant in heart*. J. Biochem. 1998; 124: 784-789.
38. Tsimberidou AM, Keating MJ: *Richter syndrome. Biology, incidence, and therapeutic strategies*. Cancer. 2005; 103: 216-228.
39. Tsimberidou AM, 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.
40. Vaisitti T, Aydin S, Rossi D, Cottino F, Bergui L, D'Arena G, Bonello L, Horenstein AL, Brennan P, Pepper C, Gaidano G, Malavasi F, Deaglio S: *CD38 increases CXCL12-mediated signals and homing of chronic lymphocytic leukemia cells*. Leukemia 2010; 24: 958-969.
41. Wang Y, Thekdi N, Smallwood PM, Macke JP, Nathans J: *Frizzled-3 is required for the development of major fiber tracts in the rostral CNS*. J. Neurosci. 2002; 22: 8563-8573.
42. Wu QL, Zierold C, Ranheim EA: *Dysregulation of Frizzled 6 is a critical component of B-cell leukemogenesis in a mouse model of chronic lymphocytic leukemia*. Blood 2009; 113: 3031-3039.
43. Zhang B, Luo S, Wang Q, Suzuki T, Xiong WC, Mei L: *LRP4 serves as a coreceptor of agrin*. Neuron. 2008; 60: 285-297.

## MORFOLOGIA MICROPAPILLARE NEL CARCINOMA DELLA MAMMELLA: STUDIO SPERIMENTALE E CLINICO

Premio “Italo Arneodo” 2009/2010  
Tesi di Laurea premiata in collaborazione con  
l’Accademia di Medicina di Torino

*Davide Balmativola*

Dipartimento di Scienze Mediche  
Facoltà di Medicina e Chirurgia - Università degli Studi di Torino  
Istituto di Anatomia Patologica  
Ospedale San Giovanni Battista “Molinette” - Torino

Key words: *Micropapillary Breast / Carcinoma micropapillare  
Carcinoma della mammella  
Mucin-1 (MUC1) / Mucina-1 (MUC1)  
Spheroids / Sferoidi  
Neutrophil Elastase / Elastasi Neutrofila  
HER2 / HER2*

### **Abstract:**

*Objective:* this study was performed with the aim to create an *in vitro* model of invasive micropapillary carcinoma (IMPC), an aggressive subtype of breast cancer.

*Methods:* Estrogen receptor (ER) positive (MCF7, T-47D) and negative (MDA-MB-231, SKBR3) breast cancer cell lines were treated with neutrophil elastase, a serine-protease produced by human breast tumors *in vivo* as well. Immunocytochemical (ICC) and immunofluorescence (IF) reactions were performed on test and control cells using antibodies directed against: Epithelial membrane antigen (EMA or “pan-mucin”) and Mucin 1 (MUC1 or “sialylated mucin”), E-cadherin, ER, progesterone receptor (PR), Ki67, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), epidermal growth factor receptor (EGFR). An analysis of gene expression profiling (GEP) was conducted on RNA extracted from test and control cells.

### *Results:*

- i) Following neutrophil elastase treatment, only ER<sup>+</sup> cells formed spheroids morphologically resembling micropapillae of IMPC.
- ii) Expression of E-cadherin, a cell-to-cell adhesion molecule, was essential for *in vitro* micropapillae formation.

- iii) Spheroids obtained by treating MCF7 cells with elastase showed the typical MUC1 membrane staining of *in vivo* IMPC, basal rather than luminal.
- iv) Elastase-induced spheroids showed enhancement of HER2 expression.
- v) Using double IF we demonstrated that MUC1 and HER2 expression are mutually exclusive.
- vi) A preliminary GEP data analysis suggested that genes involved in chemoresistance and staminal phenotype development were dysregulated in our *in vitro* micropapillae.

*Conclusions:* we created an *in vitro* model that reproduce both morphological and biological features of IMPC of the breast, and could be exploitable to investigate mechanisms of metastatization in the form of “collective cell migration” and chemoresistance. The evidence that HER2 is not present in MUC1 sites of expression may suggest that in IMPC *in vivo* the binding domain of the anti-HER2 humanized antibody (Herceptin) could be masked by mucins. This finding may hold crucial implications in terms of drug resistance and patient management.

**Riassunto:**

*Obiettivo:* creare e caratterizzare un modello *in vitro* di carcinoma micropapillare infiltrante (IMPC), una variante istologica aggressiva del carcinoma mammario.

*Metodi:* linee di carcinoma mammario positive (MCF7, T-47D) e negative (MDA-MB-231 e SKB3R) per il recettore degli estrogeni (ER) sono state trattate con elastasi neutrofila, una serino-proteasi prodotta anche da carcinomi mammari umani. Colorazioni immunocitochimiche (ICC) e di immunofluorescenza (IF) sono state eseguite sui test e sui controlli non trattati con Anticorpi anti: Antigene epiteliale di membrana (EMA o “pan-mucina”) e Mucina 1 (MUC1 o “mucina sialilata”), E-caderina, ER, recettore del progesterone (PR), Ki67, recettore 2 per il fattore di crescita epidermico (HER2), recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR). È stata condotta un’analisi del profilo di espressione genica (GEP) su RNA di cellule controllo e test.

*Risultati:*

- i) Solo in cellule ER+ il trattamento con elastasi neutrofila induceva la formazione di strutture sferoidali morfologicamente sovrapponibili alle micropapille di IMPC.
- ii) L’espressione della proteina di adesione E-caderina era fondamentale per la formazione di sferoidi.
- iii) Gli sferoidi elastasi-indotti ottenuti da cellule MCF-7 riproducevano lo stesso pattern di espressione di MUC1, basale anziché luminale, osservato in IMPC *in vivo*.

- iv) Negli sferoidi elastasi-indotti vi era un'iperespressione di HER2, non evidente nei controlli.
- v) Con doppia colorazione in IF si dimostrava una reciproca esclusione, nei siti di espressione, tra MUC1 ed HER2.
- vi) L'analisi preliminare dei dati GEP suggeriva una alterata espressione di geni coinvolti nello sviluppo di chemioresistenza e di un fenotipo staminale.

*Conclusioni:* il nostro lavoro ha permesso di creare un modello *in vitro* che riproduce le caratteristiche morfologiche e biologiche di IMPC della mammella, e potrebbe essere considerato per lo studio dei meccanismi di metastatizzazione sottoforma di “*collective cell migration*” e di chemioresistenza. La dimostrazione che HER2 non è presente nei siti di espressione di MUC1 potrebbe suggerire che nei IMPC *in vivo* questa mucina mascheri il sito di legame dell'anticorpo umanizzato anti-HER2 (Herceptin). Questo evento è da considerare come un ulteriore meccanismo di resistenza al farmaco e può avere quindi importanti ricadute in ambito clinico.

## INTRODUZIONE

### **Il carcinoma micropapillare infiltrante della mammella**

Dal punto di vista istologico i carcinomi della mammella sono un gruppo eterogeneo di tumori che mostrano un'estrema variabilità rispetto alla modalità di presentazione clinica, al loro comportamento biologico e allo spettro morfologico. Una possibile classificazione è quella che distingue i carcinomi invasivi “non di tipo speciale”, anche detti *Invasive Ductal Carcinoma Not Otherwise Specified* (IDC-NOS), dai carcinomi “a istotipo speciale”<sup>(37,40)</sup>. Il c.d. “carcinoma micropapillare della mammella” (IMPC), incluso nella categoria dei carcinomi “a istotipo speciale”, è caratterizzato da:

- i) un peculiare pattern di crescita in “micropapille” con una tipica inversione della polarità;
- ii) uno spiccato tropismo linfovascolare;
- iii) un comportamento biologico aggressivo, associato a chemioresistenza.

Per “micropapille” si intendono, dal punto di vista morfologico, degli agglomerati di cellule di aspetto morulare strettamente adese tra loro e immerse in una matrice spongiosa (Figura 1). All'interno di questa matrice

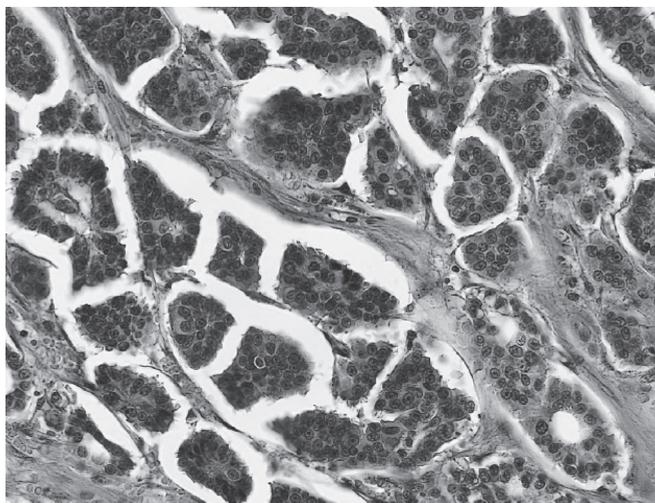


Figura 1. Aspetto istologico microscopico di IMPC. Si osserva il caratteristico aspetto morulare delle micropapille, circondate da spazi otticamente vuoti separati da esili tralci fibrosi. Ingrandimento 40X.

le micropapille sembrano galleggiare in spazi virtuali otticamente vuoti all'esame istologico. Tali spazi sono delimitati da delicati filamenti di tessuto fibroso e da cellule allungate di tipo fibroblastico, negative per i marcatori endoteliali (CD31 e Ag correlato al Fattore VIII-vWF)<sup>(26)</sup> e per D2-40, un marcatore specifico per i vasi linfatici<sup>(10)</sup> in immunohistochimica.

### **Storia naturale e caratteristiche principali**

La maggior parte dei IMPC si presenta in forma “mista”, in combinazione con altre componenti neoplastiche invasive, prevalentemente di istotipo IDC-NOS<sup>(20,28,32,39)</sup>; esistono tuttavia delle forme cosiddette “pure”, nelle quali è presente la sola componente micropapillare. L'incidenza di IMPC si avvicina al 7% quando presente in forma mista, mentre scende allo 0,9% dei casi in forma pura<sup>(12,26,39)</sup>; nelle forme miste i foci di IMPC sono in genere localizzati alla periferia del tumore<sup>(2)</sup>. La presenza di una componente micropapillare invasiva in un tumore misto ne influenza il comportamento biologico facilitando i processi di metastatizzazione linfonodale<sup>(21,30,38)</sup>. Già al momento della diagnosi IMPC della mammella presentano sovente delle metastasi a livello dei linfonodi ascellari. L'incidenza di invasione linfovaskolare (LVI) è elevata e oscilla tra il 15 e l'80% dei casi: diversi studi hanno rilevato che il 45% dei IMPC di un centimetro di diametro contiene già dei foci di LVI<sup>(20,26,32)</sup>. La mortalità delle pazienti portatrici di IMPC non è tuttavia differente da quella delle pazienti con carcinoma duttale infiltrante NOS che abbiano uno stesso stato linfonodale<sup>(28,31)</sup>. Dal punto di vista fenotipico, circa il 90% dei IMPC esprimono recettori per estrogeni (ER) e progesterone (PR), e il 30% circa esprime il recettore 2 per il fattore di crescita epidermico (HER2). È inoltre segnalata l'iperespressione della proteina p53, gene oncosoppressore, e di E-caderina, una proteina fondamentale nella adesione cellula-cellula<sup>(26)</sup>.

### **La polarità invertita**

Una caratteristica peculiare di IMPC è la polarità invertita, resa evidente dalla inconsueta presenza, sul versante stromale delle micropapille, di un bordo acido-mucinoso corrispondente al polo secretivo, evidenziabile dalle colorazioni con Alcian-Blue-PAS e Argento (Silver Methenamine)<sup>(21,35)</sup>. Allo stesso modo, i cluster cellulari presentano esternamente una superficie ricca di microvilli, e all'immunohistochimica vengono inoltre evidenziati dei depositi lineari di una proteina definita Mucina 1 (MUC1) o Antigeno epiteliale di membrana (EMA)<sup>(27)</sup>. MUC1 è una glicoproteina transmembrana di alto peso molecolare, fortemente glicosilata, espressa nei tessuti ghiandolari verso

la superficie apicale/luminale delle cellule<sup>(6,11,42)</sup>. Le grandi dimensioni, la rigidità strutturale e la carica elettrostatica negativa sono le caratteristiche fisiche e chimiche che conferiscono a MUC1 l'abilità di mantenere l'integrità dei lumi nei tessuti ghiandolari, verosimilmente attraverso l'interazione con altre piccole molecole associate nell'adesione cellula-cellula come E-caderina<sup>(19)</sup>, e cellula-stroma come la  $\beta$ -integrina<sup>(41)</sup>. L'antigene viene riconosciuto da anticorpi differenti<sup>(3)</sup>: una forma ipoglicosilata e sialilata di MUC1, la cui espressione è caratteristica di neoplasie più aggressive, è riconosciuta dal clone Ma695 (cosiddetto "Anti-MUC1")<sup>(33)</sup>, mentre il clone E29 (cosiddetto "Anti-EMA") si lega all'epitopo indipendentemente dal

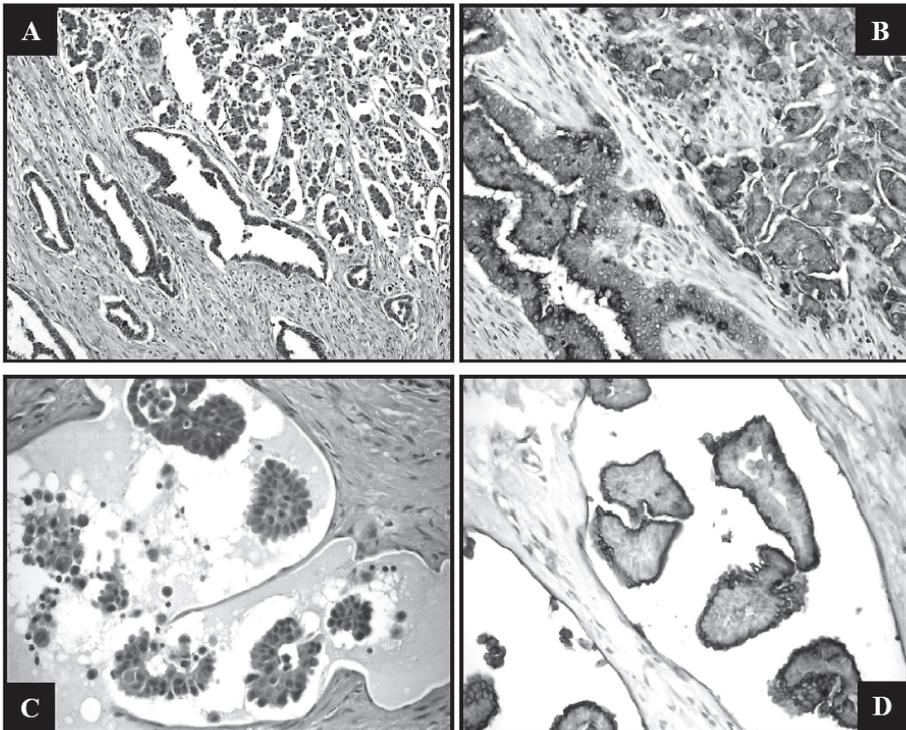


Figura 2.

*Carcinoma misto: (A) colorazione con ematossilina/eosina, fronte di invasione di IMPC (in alto a destra) accanto a un'area di carcinoma duttale-NOS ben differenziato (in basso); (B) colorazione ICC per MUC1, espresso sul versante baso-stromale di IMPC e sul lume del carcinoma duttale-NOS.*

*Diffusione linfatica e metastatizzazione in IMPC: (C) emboli linfatici multipli (ematossilina-eosina); (D) colorazione ICC con Ab-anti-MUC1 su emboli.*

grado di glicosilazione<sup>(4)</sup>. L'espressione di MUC1 sul versante basale dei nidi di cellule di IMPC (Figura 2.A e 2.B) potrebbe essere responsabile, almeno in parte, del distacco delle cellule dallo stroma circostante: l'inversione di polarità e l'iperespressione di MUC1 favorirebbero infatti la secrezione verso lo stroma di enzimi con funzione di lisi stromale, come le metalloproteasi<sup>(27,16)</sup>. L'azione di tali enzimi potrebbe giustificare sia la peculiare morfologia di IMPC sia la sua maggiore propensione alla metastatizzazione linfonodale rispetto a carcinomi convenzionali di pari dimensioni<sup>(5,13)</sup>. In emboli linfatici di IMPC e non-IMPC si osserva spesso lo stesso pattern di espressione di MUC1 (osservazione personale) (Figura 2.C e 2.D).

### **Classificazione molecolare**

La più robusta suddivisione molecolare dei carcinomi della mammella dipende dal pattern di espressione genica di ER<sup>(36)</sup>. IMPC rientra nel gruppo dei c.d. "carcinomi luminali di tipo B", che sono descritti come delle neoplasie il cui profilo d'espressione genica rimanda a quello delle cellule epiteliali luminali normali della mammella; in particolare, essi mostrano un'iperespressione di ER e di geni associati con una attiva *ER-pathway*, insieme ad un elevato indice proliferativo. Il nostro gruppo ha recentemente condotto alcuni studi su una casistica di IMPC puri e misti utilizzando metodiche di ibridazione genomica comparativa (*array-CGH*), immunoistochimica e ibridizzazione *in situ*. Abbiamo dimostrato che IMPC puro è caratterizzato dall'espressione di recettori ormonali, da un elevato indice proliferativo e da un complesso profilo genomico, indipendentemente dal grado istologico<sup>(23)</sup>. In uno studio successivo<sup>(22)</sup> abbiamo dimostrato che IMPC misti sono molto simili a IMPC puri, e sostanzialmente diversi dalle forme miste in cui non vi sia la componente micropapillare. Numerosi dati suggeriscono quindi che IMPC puri siano un'entità distinta non solo dal punto di vista morfologico, ma anche a livello genetico-molecolare. L'insieme di queste osservazioni indica che l'istotipo IMPC della mammella possa corrispondere ad un sottogruppo di carcinomi estrogeno-positivi dalla elevata aggressività, e che possa condizionare il comportamento biologico delle neoplasie anche quando associato ad altri istotipi<sup>(22,34)</sup>.

### **SCOPO DEL LAVORO**

Attualmente non esistono linee cellulari derivanti da carcinoma micropapillare infiltrante (IMPC) della mammella utilizzabili a scopo di ricerca; pertanto, l'obiettivo dello studio è stato quello di creare e caratterizzare un modello *in vitro* di IMPC. Utilizzando linee di carcinoma della mammella

con diverso assetto recettoriale, abbiamo voluto valutare la correlazione tra l'espressione di ER e la formazione delle micropapille. Il razionale di questo obiettivo deriva da diverse osservazioni che rendono IMPC un importante modello di carcinomi mammari ER+ dalla elevata aggressività biologica in termini di precocità di metastatizzazione a livello linfonodale e di sviluppo di chemioresistenza. Inoltre, questo peculiare pattern di crescita è stato ripetutamente descritto in tumori di altri organi oltre alla mammella, come nelle ghiandole salivari<sup>(25)</sup>, nella vescica<sup>(17)</sup>, nel colon<sup>(15)</sup>, nelle ovaie<sup>(24)</sup>, nel polmone<sup>(18)</sup> e nel pancreas<sup>(14)</sup>.

## MATERIALI E METODI

Basandoci sulla similitudine morfologica da noi osservata tra IMPC e le immagini di formazioni sferoidali ottenute *in vitro* da Yui S. e collaboratori<sup>(45)</sup> trattando con elastasi neutrofila (serino-proteasi prodotta anche da carcinomi mammari umani) cellule di carcinoma mammario, abbiamo riprodotto lo stesso esperimento su linee di carcinoma ER+ (MCF-7; T-47D) ed ER- (MDA-MB-231 e SKB3R). Ogni esperimento è stato condotto in triplicato. Le linee cellulari di carcinoma mammario sono state coltivate in terreno base a ridotta concentrazione di FBS (5%) e in assenza di Fungizone, per via della sua nota interferenza con il meccanismo d'azione dell'elastasi<sup>(29)</sup>, aggiungendo 5 ml di terreno senza elastasi nel controllo e 5 ml totali di terreno con l'aggiunta di elastasi neutrofila (Calbiochem Brand, St. Diego, CA) alla concentrazione finale di 20 µg/ml nel test. Le piastre così allestite sono state mantenute per 24 ore a 37°C in un incubatore a CO<sup>2</sup>. Al termine dell'esperimento le cellule sono state utilizzate per l'allestimento di cito-inclusi in blocchetti in paraffina. Abbiamo quindi effettuato colorazioni immunocitochimiche (ICC) con Anticorpi anti-EMA (pan-mucina) e MUC1 (mucina sialilata), E-caderina, ER, PR, Ki67, HER2, fattore di crescita epidermico (EGFR) e di immunofluorescenza (IF) utilizzando Ab-anti-EMA e -HER2 sia singolarmente sia in reazioni doppie. Abbiamo condotto analisi del profilo di espressione genica (GEP) (in collaborazione con il Prof. Enzo Medico; IRCC, Candiolo) su RNA di cellule non trattate (controllo) e trattate con elastasi (test). I dati ricavati dalle indagini di ICC per ER, PR e Ki67 condotte sui nostri campioni sono stati analizzati applicando il test di Fisher<sup>(1)</sup>. L'espressione ICC di HER2 è stata valutata sia al microscopio ottico sia utilizzando il sistema automatizzato di analisi di immagine Aperio-Scanscope®; i dati ricavati sono stati analizzati con il test del Chi-Quadro.

## RISULTATI

### Trattamento con elastasi

Dopo il trattamento con elastasi neutrofila le cellule delle diverse linee e il relativo controllo sono state lasciate in incubazione per 24 ore, al termine delle quali abbiamo osservato le piastre al microscopio ottico. Le cellule della popolazione controllo (non trattate) di tutte le linee cellulari utilizzate risultavano adese alle piastre in monostrato. Le cellule della linea MCF-7 trattate con elastasi, invece, formavano piccoli aggregati cellulari sospesi nel mezzo di coltura, morfologicamente simili a sferoidi in tre dimensioni (Figura 3). Le cellule della linea T-47D trattate con l'enzima formavano solo in parte aggregati irregolari di grosse dimensioni in sospensione, di morfologia non del tutto sovrapponibile agli sferoidi ottenuti da MCF7 con trattamento enzimatico. Le cellule MDA-MB-231 e SKBR3 dopo il trattamento con l'elastasi neutrofila non formavano sferoidi, ma risultavano sospese nel mezzo di coltura in cellule singole o in piccoli aggregati di dimensioni variabili. In seguito al risultato ottenuto, abbiamo allestito un esperimento osservazionale a lungo termine sulle cellule della linea MCF7. Al tempo zero tutte le cellule apparivano sospese nel terreno di coltura; dopo 5 ore, sia le cellule trattate sia quelle non trattate tendevano ad aderire focalmente alle piastre. A 24 ore dall'inizio dell'esperimento le cellule trattate con elastasi erano tutte sospese nel terreno di coltura, raccolte sottoforma di "sferoidi" in tre dimensioni, mentre le cellule del controllo crescevano

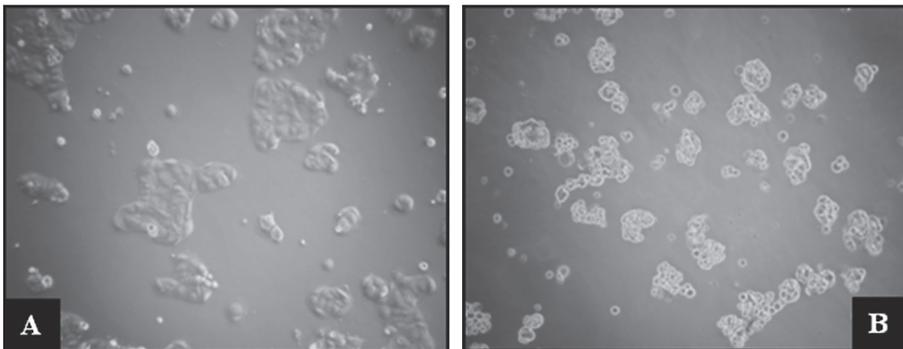
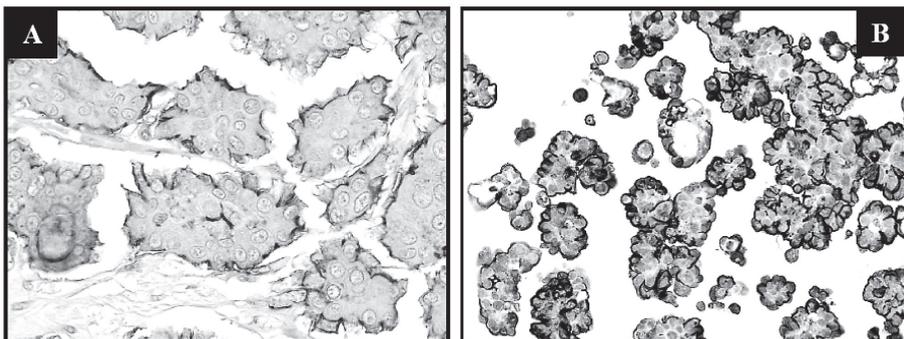


Figura 3. Foto su piastra. (A) MCF-7 controllo, non trattate con l'enzima, adese alla piastra. (B) Campione di cellule MCF-7 sottoposto a trattamento con elastasi neutrofila; si può apprezzare la formazione degli aggregati sferoidali. Ingrandimento 20X.

aderenti alla piastra; lo stesso quadro si è ripresentato dopo 48 ore. Dopo 72 ore iniziava una disaggregazione degli sferoidi, con la comparsa di cellule singole che manifestavano una sofferenza cellulare. Per valutarne la vitalità, metà delle cellule era lasciata in coltura con l'aggiunta di 1.5 ml di terreno di coltura senza elastasi, mentre l'altra metà veniva immediatamente fissata in formalina ed inclusa in paraffina. In decima giornata tutte le cellule del test riaderivano alle piastre.

### **Immunoistochimica (ICC) e Immunofluorescenza (IF)**

Per valutare se gli sferoidi ottenuti da trattamento con elastasi presentassero l'inversione della polarità tipica di IMPC abbiamo effettuato delle reazioni di ICC e immunofluorescenza utilizzando gli anticorpi primari anti-EMA e anti-MUC. Gli sferoidi ottenuti trattando con l'elastasi neutrofila le cellule MCF7 mostravano una positività lineare e continua solo sul versante esterno degli aggregati, molto intensa soprattutto utilizzando il clone anti-MUC1, cioè l'isoforma pesantemente sialilata e correlata ad un comportamento biologico aggressivo. Le superfici di contatto cellula-cellula e il versante luminale, presente in alcuni sferoidi, risultavano non colorati (Figura 4.B). Questo pattern di espressione era sovrapponibile a quello osservato su campioni tissutali di IMPC della mammella (Figura 4.A). Nessuna delle altre linee cellulari ha mostrato una espressione di mucine sovrapponibile a quella evidenziata nelle MCF7. Abbiamo quindi indagato l'espressione di E-caderina, proteina di adesione cellula-cellula: la superficie esterna degli sferoidi MCF-7, che risultava essere MUC1, non esprimeva E-caderina,



*Figura 4. Immunoistochimica. Espressione di MUC1 su sezioni di IMPC della mammella (A) e di sferoidi MCF7 elastasi-indotti (B). Ingrandimento 20X.*

mentre il marcatore rimaneva evidente sulle superfici di contatto cellula-cellula. Le colorazioni ICC per il recettore degli estrogeni (ER) e per il recettore del progesterone (PR) evidenziavano un pattern di espressione corrispondente a quanto riportato dai dati della letteratura per ognuna delle linee cellulari; l'analisi effettuata con il test di Fisher ha confermato minime variazioni non statisticamente significative tra le cellule trattate con elastasi e le cellule del controllo, per tutte le linee cellulari. Per quanto riguarda l'espressione di HER2 abbiamo osservato un'interessante variazione di espressione proprio nelle cellule MCF-7: quelle non trattate con elastasi (controllo) presentavano una colorazione della membrana cellulare debole e focale corrispondente allo score 1+ secondo le linee guida ASCO<sup>(43)</sup>; negli sferoidi elastasi-indotti l'espressione di HER2 raggiungeva lo score 2+. Il significativo aumento di espressione di HER2 è stato confermato dal test del Chi-quadrato, effettuato sulle percentuali di cellule con i due diversi score ottenute dall'analisi di immagine con il sistema Aperio® (X2 = 78.25%, p-value < 0.0001). In conclusione, le cellule di carcinoma utilizzate nei nostri esperimenti mostravano tutte un considerevole indice proliferativo (Ki67, clone MIB1), che rimaneva pressoché invariato dopo trattamento con elastasi. Le reazioni di IF hanno confermato le osservazioni effettuate con l'indagine ICC; l'indagine condotta con fluorescenza "doppia" ha dimostrato l'assenza di co-localizzazione di EMA e di HER2 a livello della membrana cellulare, sia nel controllo sia dopo trattamento con elastasi (Figura 5).

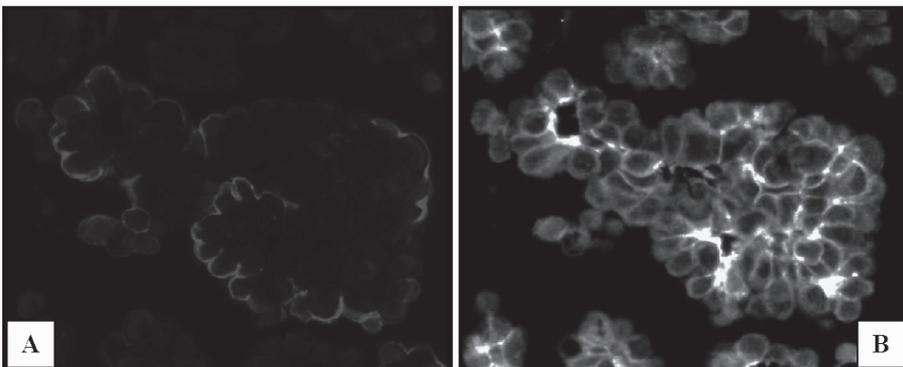


Figura 5. Immunofluorescenza su sferoidi MCF-7. (A) Ab-anti-EMA: l'espressione dell'antigene è evidente sulla superficie basale degli aggregati cellulari (rima grigia di contorno). (B) Ab-anti-HER2: l'espressione dell'antigene è evidente e intensa sulla superficie di contatto tra le singole cellule (rima bianca intercellulare). Ingrandimento 40X.

### Gene expression profiling

Con l'analisi statistica dei pattern di espressione genica delle cellule MCF7 trattate con elastasi e MCF7 controllo abbiamo individuato 58 geni differenzialmente espressi tra le due popolazioni: 25 geni hanno mostrato una diminuzione di espressione nelle cellule trattate con elastasi rispetto a quelle del controllo, 33 geni hanno dimostrato un'aumentata espressione. In particolare, per alcuni geni è descritta una forte implicazione nei processi tumorali. Risultano espressi in minor misura negli sferoidi rispetto alle MCF7 controllo geni quali EGR1 (gene oncosoppressore), MYBBP1A (noto anche come p160, co-attivatore dei recettori ormonali), SLC129A1 (proteina carrier del Metotrexate all'interno delle cellule) e MMP9 (appartenente alla classe delle metalloproteinasi); abbiamo invece evidenziato iperespressione di CD44 (proteina coinvolta nell'adesione cellula-cellula e nella migrazione cellulare e individuata come marcatore di cellule staminali), TP53INP1 (proteina coinvolta nel controllo del ciclo cellulare, in particolare nell'arresto della crescita tramite apoptosi) e di NDRG1 (proteina appartenente alla famiglia dei regolatori negativi di N-MYC e coinvolta nella risposta allo stress, nella risposta ormonale, nella crescita cellulare e nella differenziazione).

### DISCUSSIONE

I risultati del presente lavoro dimostrano come, utilizzando cellule che esprimano ER, l'elastasi neutrofila sia in grado di indurre la formazione di sferoidi morfologicamente e biologicamente analoghi a IMPC di tessuti mammari. I nostri risultati suggeriscono quindi che la genesi di tali tumori *in vivo* possa derivare da un'attivazione o da un'iperespressione di serino-proteasi come l'elastasi. L'espressione di ER sembra essere fondamentale nella genesi degli sferoidi simil-micropapillari, in quanto su cellule MDA-MB-231 e SKBR3, che sono ER-negative, l'elastasi non ne induce alcuna formazione. Il modello che meglio ha soddisfatto il nostro obiettivo è stato la linea cellulare MCF-7. Tale popolazione di cellule, analogamente a IMPC, può essere classificata nella categoria dei carcinomi luminali B, in quanto esprime alti livelli di ER e ha un elevato indice proliferativo (iperespressione di Ki67), come abbiamo dimostrato nel nostro lavoro. Nell'esperimento di Yui e collaboratori<sup>(45)</sup> l'espressione della proteina di adesione E-caderina si è rivelata fondamentale per la formazione degli sferoidi; i risultati del nostro studio confermano questa osservazione. Solo le cellule E-caderina positive (MCF-7 e T-47D) si sono dimostrate attive nella formazione di sferoidi elastasi-indotti, mentre le cellule MDA-MB-231 e SKBR3, che sono E-caderina negative,

non hanno prodotto tali strutture sotto stimolo enzimatico. La correlazione diretta tra l'espressione di ER e di E-caderina è stata recentemente dimostrata in cellule MCF-7 e T-47D, poiché il silenziamento del gene per ER determina una netta riduzione dell'espressione di E-caderina<sup>(44)</sup>. La stretta adesione presente tra le cellule degli sferoidi elastasi-indotti è osservata anche nelle micropapille dei tumori umani e potrebbe giustificare il peculiare pattern di crescita e di invasione stromale e vascolare di IMPC. Le cellule tenacemente adese in micropapille, infatti, potrebbero essere coinvolte nella patogenesi del fenomeno della cosiddetta "collective cell migration"<sup>(9)</sup>, recentemente considerata come un importante meccanismo di metastatizzazione linfatica di cluster cellulari e non di singole cellule, in analogia a quanto avviene nella migrazione embriogenetica. Il secondo obiettivo del nostro studio è stato valutare se alla morfologia simil-micropapillare degli sferoidi corrispondesse anche una espressione in sede anomala della proteina MUC1. Utilizzando metodi di ICC e IF con anticorpi diretti verso diverse isoforme di MUC1, abbiamo dimostrato che gli sferoidi ottenuti da MCF-7 riproducono lo stesso pattern di espressione di IMPC. La mucina MUC1 è espressa sulla superficie luminale della maggior parte delle cellule epiteliali e nei carcinomi, soprattutto in quelli ovarici e della mammella, è iperespressa e glicosilata in modo aberrante. Il clone Ma695 (anti-MUC1) riconosce una forma pesantemente sialilata di MUC1 iperespressa sulla superficie esterna degli sferoidi-MCF-7, analogamente a quanto osservato in IMPC *in vivo*. In uno studio attualmente in corso, abbiamo inoltre evidenziato l'espressione di questa proteina in emboli neoplastici di carcinomi mammari, confermando che durante la progressione tumorale le cellule esprimono forme di MUC1 progressivamente meno glicosilate, e sempre più sialilate<sup>(7)</sup>. Un dato inaspettato da noi osservato all'ICC e IF è stato l'induzione dell'iperespressione di HER2 negli sferoidi elastasi-indotti ottenuti da MCF-7. Particolarmente interessante è il rilievo della reciproca esclusione, nei siti di espressione, tra MUC1 ed HER2, come dimostrato dalle colorazioni doppie in IF. L'espressione di HER2 è infatti completamente assente sulla superficie esterna degli sferoidi, dove MUC1 è invece iperespresso. Tale risultato, da noi confermato anche su casi di IMPC iperesprimenti HER2, potrebbe essere considerato un ulteriore meccanismo di resistenza alla terapia a bersaglio molecolare con l'anticorpo umanizzato anti-HER2 (Herceptin)<sup>(8)</sup> e avere quindi importanti ricadute in ambito clinico. La valutazione del profilo di espressione genica (GEP) sulle colture cellulari è stata l'ultima fase del nostro studio. L'analisi preliminare dei dati suggerisce che alcuni dei geni sottoregolati negli sferoidi MCF-7 potrebbero essere correlati con lo sviluppo di chemioresistenza. Ad esempio, la sottoregolazione

di SLCA19A1, che codifica per una proteina che riduce il trasporto di folati e veicola il Metotrexate all'interno delle cellule, potrebbe giustificare la resistenza ai farmaci chemioterapici in IMPC (studio in corso). Di particolare interesse potrebbe inoltre essere la sovraespressione di CD44, gene che codifica per una proteina considerata marcatore di staminalità. Un recente studio<sup>(7)</sup> ha dimostrato l'esistenza di una popolazione di cellule con fenotipo staminale/CD44+ tra le MCF-7 che esprimono MUC1 in forma ipoglicosilata e altamente sialilata, analogamente a quanto osservato negli sferoidi elastasi-indotti. Lo studio di CD44 sugli sferoidi potrà chiarire se nella cancerogenesi di IMPC intervengano fenomeni di selezione di cellule staminali.

**In conclusione**, il nostro lavoro ha permesso di creare un modello *in vitro* che riproduce le caratteristiche morfologiche e biologiche dei carcinomi micropapillari della mammella, e potrebbe essere considerato per lo studio dei meccanismi di metastatizzazione sottoforma di "collective cell migration" e di chemioresistenza.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Agresti A: *A Survey of Exact Inference for Contingency Tables*. Statistical Sci. 1992; 7: 131-153.
2. Amin M, Tamboli P, Merchant S, Ordóñez N, Ro J, Ayala AG, RO JY: *Micropapillary component in lung adenocarcinoma: a distinctive histologic feature with possible prognostic significance*. Am. J. Surg. Pathol. 2002; 26: 358-364.
3. Burchell J, Gendler S, Taylor-Papadimitriou J, Girling A, Lewis A, Millis R, Lampert D: *Development and characterization of breast cancer reactive monoclonal antibodies directed to the core protein of the human milk mucin*. Cancer Res. 1987; 47: 5476-5482.
4. Cao Y, Karsten U, Hilgers J: *Immunohistochemical characterization of a panel of 56 antibodies with normal human small intestine, colon, and breast tissues*. Tumour Biol. 1998; 19: 88-99.

5. Ciborowski P, Finn O: *Non-glycosylated tandem repeats of MUC1 facilitate attachment of breast tumor cells to normal human lung tissue and immobilized extracellular matrix proteins (ECM) in vitro: potential role in metastasis.* Clin. Exp. Metastasis 2002; 19: 339-345.
6. Demichelis S, Alberdi C, Servi W, Isla-Larrain M, Segal-Eiras A, Croce M: *Comparative immunohistochemical study of MUC1 and carbohydrate antigens in breast benign disease and normal mammary gland.* Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. 2010; 18: 41-50.
7. Engelmann K, Shen H, Finn OJ: *MCF7 side population cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the tumor antigen MUC1.* Cancer Res. 2008; 68: 2419-2426.
8. Fessler S, Wotkowicz M, Mahanta S, Bamdad C: *MUC1\* is a determinant of trastuzumab (Herceptin) resistance in breast cancer cells.* Breast Cancer Res. Treat. 2009; 118: 113-124.
9. Friedl P, Gilmour D: *Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer.* Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2009; 10: 445-457.
10. Fukunaga M: *Expression of D2-40 in lymphatic endothelium of normal tissues and in vascular tumours.* Histopathology 2005; 46: 396-402.
11. Gendler S, Spicer A, Lalani E, Duhig T, Peat N, Burchell J, Pemberton L, Boshell M, Taylor-Papadimitriou J: *Structure and biology of a carcinoma-associated mucin, MUC1.* Am. Rev. Respir. Dis. 1991; 144: 42-47.
12. Günhan-Bilgen I, Zekioglu O, Ustün E, Memis A, Erhan Y: *Invasive micropapillary carcinoma of the breast: clinical, mammographic, and sonographic findings with histopathologic correlation.* AJR Am. J. Roentgenol. 2002; 179: 927-931.
13. Hilkens J, Vos H, Wesseling J, Boer M, Storm J, van der Valk S, Calafat J, Patriarca C: *Is episialin/MUC1 involved in breast cancer progression?* Cancer Lett. 1995; 90: 27-33.
14. Khayyata S, Basturk O, Adsay NV: *Invasive micropapillary carcinomas of the ampullo-pancreatobiliary region and their association with tumor-infiltrating neutrophils.* Mod. Pathol. 2005; 18: 1504-1511.
15. Kim MJ, Hong SM, Jang SJ, Yu E, Kim JS, Kim KR, Gong G, Ro JY: *Invasive colorectal micropapillary carcinoma: an aggressive variant of adenocarcinoma.* Hum. Pathol. 2006; 37: 809-815.
16. Komatsu M, Carraway C, Fregien N, Carraway K: *Reversible disruption of cell-matrix and cell-cell interactions by overexpression of sialomucin complex.* J. Biol. Chem. 1997; 272: 33245-33254.
17. Kuroda N, Tamura M, Ohara M, Hirouchi T, Mizuno K, Miyazaki E: *Invasive micropapillary carcinoma of the urinary bladder: an immunohistochemical study of neoplastic and stromal cells.* Int. J. Urol. 2006; 13: 1015-1018.
18. Kuroda N, Hamaguchi N, Takeuchi E, Ohara M, Hirouchi T, Mizuno K: *Lung adenocarcinoma with a micropapillary pattern: a clinicopathological study of 25 cases.* APMIS. 2006; 114: 381-385.
19. Lan M, Batra S, Qi W, Metzgar R, Hollingsworth M: *Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA.* J. Biol. Chem. 1990; 265: 15294-15299.
20. Luna-Moré S, Casquero S, Pérez-Mellado A, Rius F, Weill B, Gornemann I: *Importance of estrogen receptors for the behavior of invasive micropapillary carcinoma of the breast. Review of 68 cases with follow-up of 54.* Pathol. Res. Pract. 2000; 196: 35-39.

21. Luna-More S, Gonzalez B, Acedo C, Rodrigo I, Luna C: *Invasive micropapillary carcinoma of the breast. A new special type of invasive mammary carcinoma*. Pathol. Res. Pract. 1994; 190: 668-674.
22. Marchiò C, Irvani M, Natrajan R, Lambros M, Geyer F, Savage K, Parry S, Tamber N, Fenwick K, Mackay A, Schmitt FC, Bussolati G, Ellis I, Ashworth A, Sapino A, Reis-Filho JS: *Mixed micropapillary-ductal carcinomas of the breast: a genomic and immunohistochemical analysis of morphologically distinct components*. J. Pathol. 2009; 218: 301-315.
23. Marchiò C, Irvani M, Natrajan R, Lambros M, Savage K, Tamber N, Fenwick K, Mackay A, Senetta R, Di Palma S, Schmitt FC, Bussolati G, Ellis LO, Ashworth A, Sapino A, Reis-Filho JS: *Genomic and immunophenotypical characterization of pure micropapillary carcinomas of the breast*. J. Pathol. 2008; 215: 398-410.
24. McKenney JK, Balzer BL, Longacre TA: *Patterns of stromal invasion in ovarian serous tumors of low malignant potential (borderline tumors): a reevaluation of the concept of stromal microinvasion*. Am. J. Surg. Pathol. 2006; 30: 1209-1221.
25. Nagao T, Gaffey TA, Visscher DW, Kay PA, Minato H, Serizawa H, Lewis JE: *Invasive micropapillary salivary duct carcinoma: a distinct histologic variant with biologic significance*. Am. J. Surg. Pathol. 2004; 28: 319-326.
26. Nassar H: *Carcinomas with micropapillary morphology: clinical significance and current concepts*. Adv. Anat. Pathol. 2004; 11: 297-303.
27. Nassar H, Pansare V, Zhang H, Che M, Sakr W, Ali-Fehmi R, Grignon D, Sarkar F, Cheng J, Adsay V: *Pathogenesis of invasive micropapillary carcinoma: role of MUC1 glycoprotein*. Mod. Pathol. 2004; 17: 1045-1050.
28. Nassar H, Wallis T, Andea A, Dey J, Adsay V, Visscher D: *Clinicopathologic analysis of invasive micropapillary differentiation in breast carcinoma*. Mod. Pathol. 2001; 14: 836-841.
29. Okumura Y, Ogawa K, Uchiya K, Komori Y, Nonogaki T, Nikai T: *Biological properties of elastase inhibitor; AFLEI from Aspergillus flavus*. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi 2008; 49: 87-93.
30. Page D: *Prognosis and breast cancer. Recognition of lethal and favorable prognostic types*. Am. J. Surg. Pathol. 1991; 15: 334-349.
31. Paterakos M, Watkin W, Edgerton S, Moore Dn, Thor A: *Invasive micropapillary carcinoma of the breast: a prognostic study*. Hum. Pathol. 1999; 30: 1459-1463.
32. Pettinato G, Manivel C, Panico L, Sparano L, Petrella G: *Invasive micropapillary carcinoma of the breast: clinicopathologic study of 62 cases of a poorly recognized variant with highly aggressive behavior*. Am. J. Clin. Pathol. 2004; 121: 857-866.
33. Price M, Rye P, Petrakou E, Murray A, Brady K, Imai S: *Summary report on the ISOBM TD-4 Workshop: analysis of 56 monoclonal antibodies against the MUC1 mucin*. San Diego, Calif., November 17-23, 1996. Tumour Biol. 1998; 19: 1-20.
34. Reis-Filho J, Lakhani S: *Breast cancer special types: why bother?* J. Pathol. 2008; 216: 394-398.
35. Sloane J, Ormerod M: *Distribution of epithelial membrane antigen in normal and neoplastic tissues and its value in diagnostic tumor pathology*. Cancer 1981; 47: 1786-1795.

36. Sørlie T, Perou C, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL: *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001; 98: 10869-10874.
37. Tavassoli FA, Devilee P: *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. IARC Press, 2003, Lyon.
38. Toikkanen S, Kujari H: *Pure and mixed mucinous carcinomas of the breast: a clinicopathologic analysis of 61 cases with long-term follow-up*. Hum Pathol. 1989; 20: 758-764.
39. Walsh M, Bleiweiss I: *Invasive micropapillary carcinoma of the breast: eighty cases of an underrecognized entity*. Hum. Pathol. 2001; 32: 583-589.
40. Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, Hayes MM, Hauptmann M, Wessels LF, de Jong D, Van de Vijver MJ, Van't Veer LJ, Peterse JL: *Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types*. J. Pathol. 2008; 216: 141-150.
41. Wesseling J, van der Valk S, Hilkens J: *A mechanism for inhibition of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion by the membrane-associated mucin episialin/MUC1*. Mol. Biol. Cell 1996; 7: 565-577.
42. Winterford C, Walsh M, Leggett B, Jass J: *Ultrastructural localization of epithelial mucin core proteins in colorectal tissues*. J. Histochem. Cytochem. 1999; 47: 1063-1074.
43. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists: *American Society of Clinical Oncology-College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer*. J. Cl. Onc. 2007; 25: 118-145.
44. Ye Y, Xiao Y, Wang W, Yearsley K, Gao J, Shetuni B, Barsky SH: *ERalpha signaling through slug regulates E-cadherin and EMT*. Oncogene 2010; 29: 1451-1462.
45. Yui S, Tomita K, Kudo T, Ando S, Yamazaki M: *Induction of multicellular 3-D spheroids of MCF-7 breast carcinoma cells by neutrophil-derived cathepsin G and elastase*. Cancer Sci. 2005; 96: 560-570.
46. Zekioglu O, Erhan Y, Ciris M, Bayramoglu H, Ozdemir N: *Invasive micropapillary carcinoma of the breast: high incidence of lymph node metastasis with extranodal extension and its immunohistochemical profile compared with invasive ductal carcinoma*. Histopathology 2004; 44: 18-23.

**ALTERAZIONE DEI SEGNALI CELLULARI MEDIATI  
DA TGF $\beta$ 1 NELLA CANCEROGENESI DEL COLON-RETTO:  
RUOLO PROMOVENTE DEI PRODOTTI  
DI OSSIDAZIONE LIPIDICA DI ORIGINE ANIMALE**

Premio “Italo Arneodo” 2009/2010  
Tesi di Laurea premiata in collaborazione con  
l'Accademia di Medicina di Torino

*Alessandro Falcone, Fiorella Biasi, Mario Nano, Tina Guina,  
Marco Maina, Giorgio Maria Saracco, Mauro Papotti, Giuseppe Poli*

Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche - Università degli Studi di Torino  
AOU San Luigi Gonzaga - Orbassano (TO)

Key words:     *Colon cancer / Tumore coloretale  
Inflammation / Infiammazione  
Oxidative stress / Stress ossidativo  
TGF $\beta$ 1 / TGF $\beta$ 1  
HNE / HNE*

**Abstract:**

Colorectal carcinogenesis is determined by the accumulation of sequential changes at the expense of important molecules in the regulation of intestinal homeostasis. Cytokine Transforming Growth Beta 1 (TGF $\beta$ 1) is a repressor of tumor progression as it is able to inhibit the proliferation of enterocytes and regulates the mechanisms of oral tolerance. The risk of developing colorectal cancer is very high in patients with Inflammatory Bowel Disease (IBD). In this context, TGF $\beta$ 1 shows high chemotactic effect for granulocytes and monocytes/macrophages in the inflammatory site and is involved in induction of fibrotic intestinal obstruction. Lipid oxidation products introduced with the diet play a crucial role in promoting chronic inflammation and possible development of cancer. The increase in the product aldehyde 4-hydroxynonenal (HNE) in the course of oxidative stress, concomitant with a high inflammatory state, is correlated with increased cellular damage. We monitored the functional alterations of TGF $\beta$ 1 and its receptor system along all stages of cancer progression. Evaluations in immunohistochemistry showed the alteration of signal-dependent TGF $\beta$ 1 proportional to the degree of malignancy up to the stage III. The aldehyde HNE production decreased in more advanced stages of cancer. We evaluated the serum levels of TGF  $\beta$ 1 and markers of oxidative damage HNE and of inflammation IL-8,

molecules correlated to the activity of TGF $\beta$ 1 itself. Serum levels of both TGF $\beta$ 1, both of HNE decreased in the transition towards more advanced stage (stage II and stage III), and seemed to normalize in the stage IV, presumably because of the need of tumor cells to change their phenotype from epithelial to mesenchymal, exploiting the transdifferentiation properties of the cytokine TGF $\beta$ 1. In contrast, in mirror image, the interleukin 8 (IL-8) increased in the early stages of adenocarcinoma, reaching significant concentrations in stages II and III, to decrease in stage IV. The IL-8 showed a lower dispersion values, suggesting the IL-8 as an indicator more specific than PCR to correlate the inflammatory status to neoplastic progression.

**Riassunto:**

La cancerogenesi coloretale è determinata dall'accumulo di alterazioni sequenziali a carico di molecole importanti nella regolazione della omeostasi intestinale. Le esagerate reazioni infiammatorie che caratterizzano patologie croniche intestinali come le malattie infiammatorie intestinali (Inflammatory Bowel Disease - IBD) possono indurre danno alla mucosa aumentando il rischio di sviluppare il carcinoma coloretale. Tra le molecole regolatrici i processi infiammatori, la citochina Transforming Growth Beta 1 (TGF $\beta$ 1) suscita particolare interesse perché coinvolta nella maturazione degli enterociti. Questa citochina inibisce la proliferazione degli enterociti, ne induce il differenziamento e regola i meccanismi di tolleranza orale. Il TGF $\beta$ 1 è coinvolto nella induzione della fibrosi intestinale ostruttiva, avendo azione chemiotattica e proliferativa su fagociti e fibroblasti. La dieta rappresenta un fattore importante nello sviluppo del carcinoma coloretale. Acidi grassi polinsaturi e colesterolo introducibili con la dieta possono determinare la produzione di composti ossidati che concorrono nel promuovere l'infiammazione cronica, stress ossidativo e sviluppo del tumore. Tra i prodotti di ossidazione lipidica l'aldeide 4-idrossinonenale (Hydroxynonenal - HNE) ha recentemente suscitato grande interesse, sia perché considerata come possibile parametro di valutazione dello stato ossidativo di un tessuto, sia perché capace di modulare funzioni cellulari fondamentali. In questo studio sono state prese in considerazione alcune delle principali molecole prodotte in corso di infiammazione e stress ossidativo, valutandone i livelli sierici e tissutali attraverso tutti gli stadi della progressione tumorale, a partire dall'adenoma fino agli stadi più avanzati del carcinoma coloretale. Questa analisi ha permesso di individuare TGF $\beta$ 1, Interleuchina 8 (IL-8) e HNE, insieme a parametri più comuni come la proteina C reattiva, già utilizzata nella routine diagnostica, come potenziali specifiche molecole candidate nel monitoraggio dello stato infiammatorio e ossidativo durante le diverse fasi della cancerogenesi.

## INTRODUZIONE

Gli adenocarcinomi costituiscono il 98% di tutte le neoplasie coloretali e nei paesi occidentali il cancro del colon-retto (Colo-Rectal Cancer - CRC) rappresenta il terzo tumore maligno per incidenza e mortalità<sup>(1)</sup>. Lo sviluppo di un tumore è un processo multifasico, caratterizzato dall'acquisizione di funzione di protooncogeni o perdita di funzione di geni oncosoppressori. Ciò determina la selezione di un clone cellulare con capacità replicativa autonoma ed incontrollabile.

Il CRC è un classico esempio di tale patogenesi multifasica<sup>(28)</sup>. Le mutazioni genetiche responsabili del cancro sporadico (non legate a mutazioni geneticamente acquisite) del colon-retto sono le stesse che caratterizzano le forme ereditarie.

Le malattie infiammatorie intestinali (Inflammatory Bowel Disease - IBD) sono patologie croniche intestinali immunomediate. In individui geneticamente predisposti, sia fattori esogeni (la normale microflora intestinale) sia fattori individuali (l'integrità funzionale della barriera mucosa, la risposta immunitaria innata e adattativa) possono portare a uno stato cronico di disregolazione dell'immunità della mucosa intestinale: questa è un'ipotesi eziologica ampiamente condivisa a cui si aggiungono fattori ambientali di compromissione (fumo di sigaretta). Il carcinoma associato a coliti (Colitis-Associated Cancer – CAC) è un sottotipo di carcinoma coloretale correlato alla malattia infiammatoria intestinale. Più del 20% dei pazienti con IBD sviluppa CAC entro i 30 anni dall'esordio della malattia e più del 50% di essi muore a causa della neoplasia<sup>(21)</sup>. La cancerogenesi coloretale nelle IBD, similmente ai tumori sporadici, è la conseguenza di episodi sequenziali di mutazioni genetiche somatiche e di espansione clonale. Molti CRC mostrano un'attivazione costitutiva di fattori di trascrizione essenziali nelle vie implicati nei processi infiammatori, come il fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor- $\kappa$ B), e molecole di trasduzione del segnale, come STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3)<sup>(35,40)</sup>. Cellule della risposta immunitaria adattativa reclutate nei CRC e CAC svolgono sia attività pro- sia anti-tumorale: i linfociti T, ad esempio, da una parte favoriscono lo sviluppo del tumore attivando i processi infiammatori, dall'altra lo contrastano mediante l'immunosorveglianza<sup>(13,15,18)</sup>. Nei CRC, spesso le cellule immunitarie accorrono solo negli stadi più avanzati dello sviluppo tumorale determinando un processo infiammatorio tardivo<sup>(26,38)</sup>. Nei CAC invece i processi infiammatori cronici precedono lo sviluppo del tumore. L'infiammazione cronica peculiare delle IBD espone la mucosa intestinale ad un grave stress ossidativo, che riveste un ruolo chiave

nella patogenesi sia della colite, sia della cancerogenesi coloretale. Il microambiente infiammatorio delle IBD può promuovere l'accumulo di mutazioni addizionali e alterazioni epigenetiche, spesso indotte dalla produzione di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (ROS - Reactive Oxygen; RONS - Reactive Nitrogen Species) da parte dei neutrofili e macrofagi<sup>(33)</sup>.

## IL TGFβ1

La famiglia del Transforming Growth Factor Beta (TGFβ) comprende cinque isoforme di cui solo tre sono state identificate nei mammiferi: TGFβ1, β2 e β3. Quella maggiormente espressa è il TGFβ1<sup>(14)</sup>. Il TGFβ1 attivato trasduce il segnale attraverso una famiglia di recettori transmembrana serina/treonina chinasi, presenti in tre sottoclassi. Solo i recettori di tipo I (TGFβ-RI) e di tipo II (TGFβ-R-II) sono indispensabili per la trasduzione del segnale. Il recettore di tipo III (TGFβ-R-III) potrebbe avere funzione di presentazione del ligando al TGFβ-R-II. Il segnale indotto dal TGFβ1 viene trasmesso dai recettori di membrana al nucleo, principalmente mediante le proteine Smad (Small mother against decapentaplegic).

Il TGFβ1 influenza differenti aspetti dell'omeostasi epiteliale intestinale. La citochina preserva l'integrità dell'epitelio e potenzia l'effetto barriera della mucosa, regolando l'espressione di proteine delle giunzioni cellulari, come le claudine e le occludine<sup>(17)</sup>. Negli enterociti differenziati, il TGFβ1 è in grado di controllare la proliferazione bloccando il ciclo cellulare al passaggio dalla fase G1 alla fase S<sup>(14)</sup>. Il TGFβ1 favorisce la conversione delle cellule staminali alla base delle cripte intestinali in cellule amplificanti transitorie (TA) dotate di elevato potenziale replicativo, inducendo la differenziazione delle cellule figlie derivanti dalle TA e la loro migrazione lungo le cripte e i villi intestinali<sup>(27)</sup>. Il TGFβ1 agisce come immunosoppressore inducendo l'espressione degli inibitori del ciclo cellulare p27KIP1 e p21CIP1, inibendo così la proliferazione delle cellule immunitarie B e T. Inoltre, la citochina interviene nei meccanismi di tolleranza orale, controllando la generazione e la funzione dei linfociti T regolatori, e guidando lo scambio isotipico delle immunoglobuline A, necessarie per neutralizzare e rimuovere i batteri patogeni dalla mucosa<sup>(30)</sup>.

Il TGFβ1 è coinvolto nella regolazione dell'anoichia, una particolare forma di morte cellulare programmata. L'anoichia è importante nella fisiopatologia gastrointestinale perché elimina le cellule epiteliali ed endoteliali distaccatesi dalla matrice extracellulare, impedendone la

migrazione in siti diversi dal loro luogo di origine, come può avvenire in processi di metastatizzazione.

Il TGF $\beta$ 1 interviene nei processi infiammatori intestinali mostrando un forte potere chemiotattico per i granulociti ed i monociti/macrofagi nel sito infiammatorio<sup>(24)</sup>; promuove la sintesi di collagene e di fibronectina nei fibroblasti, permettendo la riparazione della mucosa danneggiata<sup>(30)</sup>; induce la deposizione della matrice extracellulare ed aumenta l'espressione degli inibitori delle proteasi, come PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) e TIMP (Tissue Inhibitor of MetalloProteinase). Il TGF $\beta$ 1 induce altresì la transizione epitelio-mesenchimale (EMT), caratterizzata dalla progressiva perdita del fenotipo stazionario polarizzato, caratteristico delle cellule di tipo epiteliale, e l'acquisizione di un fenotipo con motilità simil-mesenchimale. Questa transizione fisiologica è necessaria per guidare la morfogenesi di organi e tessuti, per sostenere l'omeostasi cellulare e per la regolazione del rinnovamento e della riparazione tissutale. Non sempre la citochina svolge un ruolo pro-differenziante: infatti, il TGF $\beta$ 1 impedisce il differenziamento delle cellule T in linfociti helper 1 e 2 (Th1 e Th2)<sup>(30)</sup>. Il TGF $\beta$ 1 può indurre nelle cellule epiteliali e nei fibroblasti l'espressione di fattori angiogenici come VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Nei fibroblasti la citochina è in grado di inibire l'espressione di ANG1 (Angiopoietin-1), implicata nel mantenimento dell'integrità dei vasi. Inoltre il TGF $\beta$ 1 favorisce la migrazione delle cellule endoteliali, stimolando l'espressione di enzimi che digeriscono la matrice extracellulare<sup>(32,14)</sup>. Il TGF $\beta$ 1 induce una minore espressione delle E-caderine e la produzione di integrine in cellule di carcinoma squamoso della cute<sup>(16)</sup>.

Le cellule del CRC mostrano un comportamento particolare nei confronti del TGF $\beta$ 1: nelle prime fasi di malignità esse diventano resistenti all'azione antiproliferativa del TGF $\beta$ 1. Con il progredire della malignità la stessa citochina viene risintetizzata dalle cellule tumorali perché permette loro di acquisire un fenotipo mesenchimale metastatizzante<sup>(34)</sup>. La perdita della risposta alla citochina è correlata a mutazioni o delezioni dei geni che codificano per i componenti della via di segnale del TGF $\beta$ 1. I geni più frequentemente mutati sono quelli per i suoi recettori e le proteine Smad<sup>(12,37)</sup>. Raggiunto un elevato grado di malignità le cellule del CRC esprimono livelli più elevati di m-RNA del TGF $\beta$ 1 rispetto alle cellule normali. Queste cellule altamente dedifferenziate, che presentano alterazioni della via di segnale TGF $\beta$ 1-dipendente, sono preservate dall'azione antiproliferativa della citochina e possono produrne liberamente elevate quantità che attiveranno i processi di neoangiogenesi e metastatizzazione.

## L'INTERLEUCHINA 8

L'interleuchina 8 (IL-8) è un importante regolatore della risposta infiammatoria del tessuto gastrointestinale. L'espressione dei recettori di IL-8 nelle cellule tumorali, nelle cellule endoteliali, nei neutrofili e nei macrofagi associati ai tumori suggerisce che la produzione di IL-8 da parte delle cellule tumorali possa svolgere un'importante influenza sul microambiente tumorale. L'attivazione di questi recettori sulle cellule endoteliali promuove l'angiogenesi, inducendo la proliferazione, sopravvivenza e migrazione delle cellule endoteliali vascolari<sup>(23)</sup>. L'espressione nella massa tumorale di IL-8 sembra rivestire un ruolo chiave nel processo di reclutamento dei neutrofili nel microambiente tumorale, elemento fondamentale per i processi di metastatizzazione<sup>(4,6,9,25,36)</sup>.

## LO STRESS OSSIDATIVO E L'HNE

Una quota rilevante di specie reattive dell'ossigeno (reactive oxygen species - ROS) viene prodotta nelle cellule fagocitarie specializzate con competenza immunitaria aspecifica, cioè i granulociti neutrofili ed i macrofagi. I lipidi di membrana, in particolare gli acidi grassi polinsaturi (polyunsaturated fatty acids - PUFA) presenti nei fosfolipidi ed il colesterolo, sono più suscettibili ad un attacco radicalico. Inoltre, l'apparato gastro-intestinale è esposto continuamente a elevate quantità di acidi grassi e colesterolo, aldeidi citotossiche e fosfolipidi, quotidianamente assunti con la dieta, in particolare i prodotti finali della degradazione degli acidi grassi poliinsaturi, di cui è riconosciuta l'azione citotossica e genotossica<sup>(19)</sup>.

Un radicale iniziatore può agire sui doppi legami dei PUFA di membrana, come l'acido linoleico e l'acido arachidonico, innescando la loro demolizione a catena (perossidazione lipidica). Tra i prodotti di demolizione, le aldeidi sono coinvolte in alcuni degli effetti fisiopatologici associati a condizioni di stress ossidativo. I 4-idrossi-2-alchenali, in particolare il 4-idrossi-2-nonenale (Hydroxynonenal - HNE) rappresentano i più importanti prodotti di perossidazione lipidica perchè in grado di reagire e modificare biomolecole essenziali per la cellula. L'HNE svolge molteplici funzioni: ad alte concentrazioni, questa aldeide è citotossica, mentre a dosi compatibili con quelle misurate fisiologicamente (1-10 µM) è in grado di indurre l'espressione e la sintesi di una serie di geni coinvolti nell'infiammazione e nella fibrogenesi<sup>(20,22,29,31)</sup>. L'HNE è in grado di diminuire l'espressione delle cicline, in particolare della D1 e della D2, che promuovono il passaggio dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare<sup>(2)</sup>.

L'HNE riveste un ruolo importante nella patogenesi di processi infiammatori correlati ad alterazioni del segnale del TGF $\beta$ 1. Tecniche di immunohistochimica hanno evidenziato nella mucosa di CRC un rapporto diretto tra diminuzione di HNE e ridotta espressione dei recettori per il TGF $\beta$ 1<sup>(5,41)</sup>. L'HNE, come TGF $\beta$ 1, assolve funzioni anti-proliferative poiché è in grado di bloccare il ciclo cellulare ed esercita un effetto pro-apoptotico su cellule tumorali intestinali<sup>(3,8,38)</sup>. Ne consegue che le cellule neoplastiche potrebbero difendersi diminuendo la produzione di questa aldeide. La presenza di bassi livelli di HNE nelle cellule tumorali rispetto alle cellule normali potrebbe essere dovuta ad una diminuzione della perossidazione lipidica causata da un minore contenuto relativo in PUFA nelle membrane tumorali e da livelli più elevati di sostanze antiossidanti (es.  $\alpha$ -tocoferolo)<sup>(7,10,11)</sup>.

## MATERIALE E METODI

Obiettivo di questo studio è stato quello di individuare una o più molecole specifiche che possano essere utilizzate come marcatori di infiammazione in corso di cancerogenesi del colon-retto.

Abbiamo verificato il contenuto tissutale di TGF $\beta$ 1, dei suoi recettori e di HNE, sia negli adenomi sia negli adenocarcinomi del colon-retto e se l'espressione di queste molecole potesse essere diversa negli adenomi rispetto agli adenocarcinomi e/o proporzionale al grado di dedifferenziamento del tessuto tumorale.

Abbiamo misurato i livelli sierici di HNE e di TGF $\beta$ 1, riportandone i livelli con quelli di altri marcatori di infiammazione, in modo da poter verificare se queste molecole possano essere utilizzate nel monitoraggio del danno ossidativo e dell'infiammazione come indicatori non invasivi.

I pazienti affetti da CRC e da adenomi colici sono stati reclutati presso la S.C.D.U. Chirurgia Generale e la S.C.D.U. Gastroenterologia del A.O.U. San Luigi Gonzaga – Orbassano (Torino), dal gennaio 2009 al dicembre 2010. Sono stati reclutati pazienti di entrambi i sessi fra i 45 e 85 anni compresi. Dallo studio sono stati esclusi tutti i pazienti con terapia cronica steroidea, patologie infiammatorie croniche, diabete non controllato farmacologicamente, pregressi interventi chirurgici gastrointestinali e sottoposti a terapia neoadiuvante (chemioterapia e/o radioterapia precedente all'intervento chirurgico o alla polipectomia endoscopica). In Tabella I e tabella II sono riportati i dati generali e istopatologici relativi ai pazienti reclutati.

<b>Gastroenterologia</b>	<b>n°</b>	<b>Età (Media + E.S)</b>	<b>Sesso</b>
Adenoma Tubulare	20	67,44 ± 1,92	M11 + F9
Adenoma Tubulo-villoso	17	63,82 ± 2,76	M9 + F8

*Tabella I. Dati generali e istopatologici dei pazienti sottoposti a exeresi endoscopica.*

<b>Chirurgia</b>	<b>n°</b>	<b>Età (Media + E.S)</b>	<b>Sesso</b>	<b>W.B.C ± E.S.</b>	<b>Neutrofil % ± E.S.</b>
AdenoCa stadio I	11	66,54 ± 3,78	M8 + F3	6,77 ± 1,01	64,36 ± 6,25
AdenoCa stadio IIA	28	73,32 ± 1,90	M20 + F8	8,16 ± 0,66	63,00 ± 2,79
AdenoCa stadio IIB	3	73,33 ± 4,80	M2 + F1	8,42 ± 0,49	66,23 ± 6,81
AdenoCa stadio IIIA	2	68,00 ± 2,99	M1 + F1	13,3 ± 0,53	87,40 ± 6,62
AdenoCa stadio IIIB	24	71,16 ± 2,55	M13 + F11	7,27 ± 1,20	66,81 ± 4,77
AdenoCa stadio IIIC	9	71,33 ± 3,89	M5 + F4	7,73 ± 0,85	58,72 ± 3,47
AdenoCa stadio IV	6	73,62 ± 2,82	M0 + F6	7,65 ± 1,08	76,66 ± 1,96

*Tabella II. Dati generali e istopatologici dei pazienti sottoposti ad intervento chirurgico.*

Da ogni paziente inserito nello studio è stata prelevata chirurgicamente o endoscopicamente la porzione di tessuto intestinale destinata alla valutazione anatomo-patologica di routine.

### **Valutazioni in immunoistochimica**

Dal pool di pazienti reclutati sono stati selezionati in maniera randomizzata 8 pazienti con adenoma tubulare, 8 con adenoma tubulo-villoso, 5 con

adenocarcinoma di stadio I, 5 di stadio II, 6 di stadio III e 5 di stadio IV, per un totale di 37 pazienti.

Negli enterociti è stato visualizzato in immunistoichimica il contenuto di TGF $\beta$ 1 e dei suoi principali recettori TGF $\beta$ 1-RI e TGF $\beta$ 1-RII [utilizzando anticorpi di coniglio anti-TGF $\beta$ 1 (2  $\mu$ g/ml), anti-TGF $\beta$ 1-RI (8  $\mu$ g/ml) e anti-TGF $\beta$ 1-RII (4  $\mu$ g/ml)]. Il contenuto tessutale di HNE è stato valutato sfruttando la capacità dell'aldeide di legarsi stabilmente a molecole di istidina. A tale scopo sono stati utilizzati anticorpi primari policlonali di topo anti-addotto HNE-istidina (10  $\mu$ g/ml). La visualizzazione è stata effettuata con anticorpi secondari biotinilati. Per ogni preparato immunistoichimico è stata effettuata una valutazione semiquantitativa di intensità di colorazione nella mucosa intestinale suddividendo in classi di positività all'anticorpo: nulla o bassa fino al 30%, media dal 31% al 70% e massima dal 71% al 100%.

### **Valutazioni nel sangue periferico**

Dal pool di pazienti reclutati sono stati selezionati in maniera randomizzata 11 pazienti con adenoma tubulare, 17 con adenoma tubulo-villoso, 12 con adenocarcinoma di stadio I, 25 di stadio II, 26 di stadio III e 6 di stadio IV, per un totale di 97 pazienti.

Lo stato infiammatorio dei pazienti sottoposti ad intervento chirurgico è stato valutato con tecniche di routine, in termini di contenuto totale di leucociti (W.B.C.;  $1 \times 10^6$  cellule/l di sangue) e percentuale dei neutrofili nel sangue periferico. Nel siero di tutti i pazienti (reclutati sia nella chirurgia che in gastroenterologia) sono stati valutati i livelli di proteina C-Reattiva (PCR; mg/l). Per la PCR sono stati monitorati 17 soggetti sani i cui valori sono stati considerati braccio di controllo.

I livelli di TGF $\beta$ 1 e di IL-8 nel siero dei pazienti reclutati e di 17 soggetti sani sono stati quantificati con metodica ELISA.

La presenza di stress ossidativo è stata valutata in termini di addotti fluorescenti determinati dal legame tra HNE e le proteine del siero dei pazienti reclutati nello studio.

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

Il TGF $\beta$ 1-RI (Figura 1) è espresso in ampia percentuale negli adenomi, mentre diminuisce proporzionalmente negli Stadi I e II; a partire dallo Stadio III, e più marcatamente nello Stadio IV, si osserva un ripristino della funzionalità del TGF $\beta$ 1-RI in termini di aumento della percentuale dei casi con alta positività.

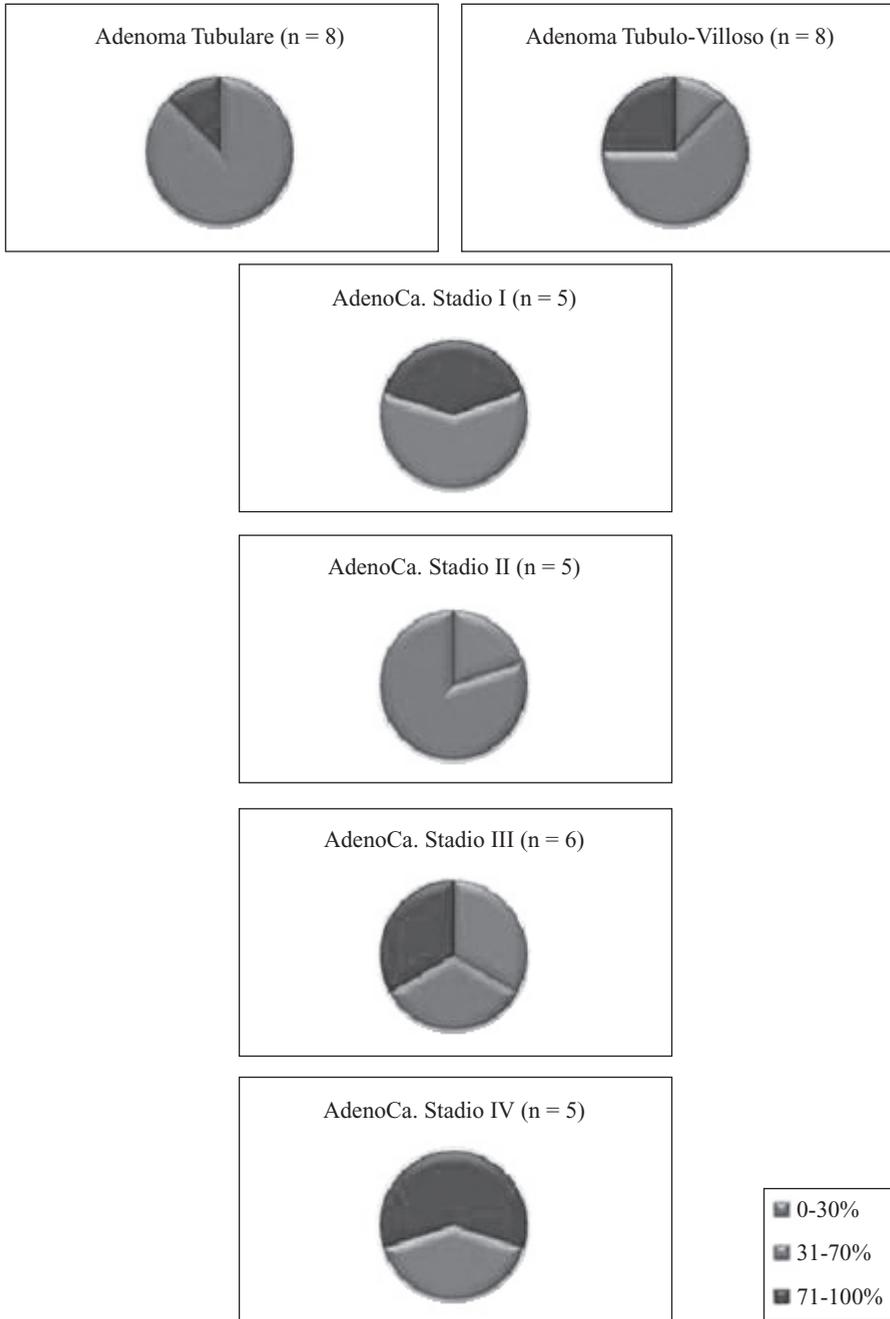


Figura 1. Valutazione semiquantitativa in immunoistochimica del recettore  $TGF\beta$ -RI.

Il recettore TGF $\beta$ 1-RII (Figura 2) presenta una percentuale di positività negli adenomi paragonabile a quella calcolata per il TGF $\beta$ 1-RI; nell'adenocarcinoma si osserva una netta alterazione di questo recettore già a partire dallo stadio I. Infatti tutti i casi osservati presentano una bassa o nulla positività. Anche negli stadi più avanzati questo recettore non è mai espresso in alta percentuale, suggerendo una sua alterazione stabile nel tessuto neoplastico.

I livelli tissutali di HNE (Figura 3) presentano una notevole variabilità negli adenomi tubulari e tubulo-villosi: il 40% dei campioni esaminati presenta ancora un'alta positività per questa aldeide, mentre il 60% mostra una diminuzione di produzione di HNE. Negli adenocarcinomi, invece, la porzione di bassa/media positività è preponderante in tutti gli stadi di malignità. Nello stadio III tutti i pazienti presentano una corrispondenza tra deficit di HNE e deficit di entrambi i recettori per il TGF $\beta$ 1, mentre nello stadio IV questa corrispondenza persiste solo tra HNE e TGF $\beta$ 1-RI.

La Figura 4 mostra il livello del TGF $\beta$ 1 nel siero dei pazienti con adenomi tubulari, tubulo-villosi e adenocarcinoma di stadio I che non differisce significativamente dai controlli. Nei pazienti in stadio II e III, invece, il contenuto ematico di TGF $\beta$ 1 diminuisce significativamente rispetto agli adenomi. Nello stadio IV questo parametro aumenta nuovamente, seppur non raggiungendo mai i valori del controllo.

La Figura 5 mostra i livelli di HNE in termini di addotti formati dalla reazione dell'aldeide con le proteine del siero. L'HNE mostra una diminuzione della concentrazione sierica durante la progressione neoplastica; tuttavia, paragonata al controllo, essa risulta statisticamente significativa solo negli stadi II e III. Nello stadio IV l'HNE raggiunge valori simili o maggiori al controllo, con differenza significativa sia rispetto all'adenoma tubulare, sia all'adenocarcinoma di stadio inferiore.

Il grafico in Figura 6 mostra i valori di PCR di tutti i pazienti inclusi nello studio. I livelli sierici di questa proteina sono nel range di normalità sia negli adenomi tubulare e tubulo-villoso sia nell'adenocarcinoma in stadio I, mentre presentano un innalzamento al di sopra della soglia normale negli stadi più avanzati. La dispersione dei dati non ha consentito di ottenere differenze significative tra i diversi gruppi.

I valori sierici di IL-8 (Figura 7) mostrano un andamento simile a quello riportato per la PCR. A differenza di quest'ultima, però, c'è un aumento di IL-8 con differenze significative dell'adenocarcinoma di stadio II rispetto ai controlli e agli adenomi. Nello stadio III è osservabile una differenza significativa solo rispetto ai controlli e agli adenomi tubulo-villosi.

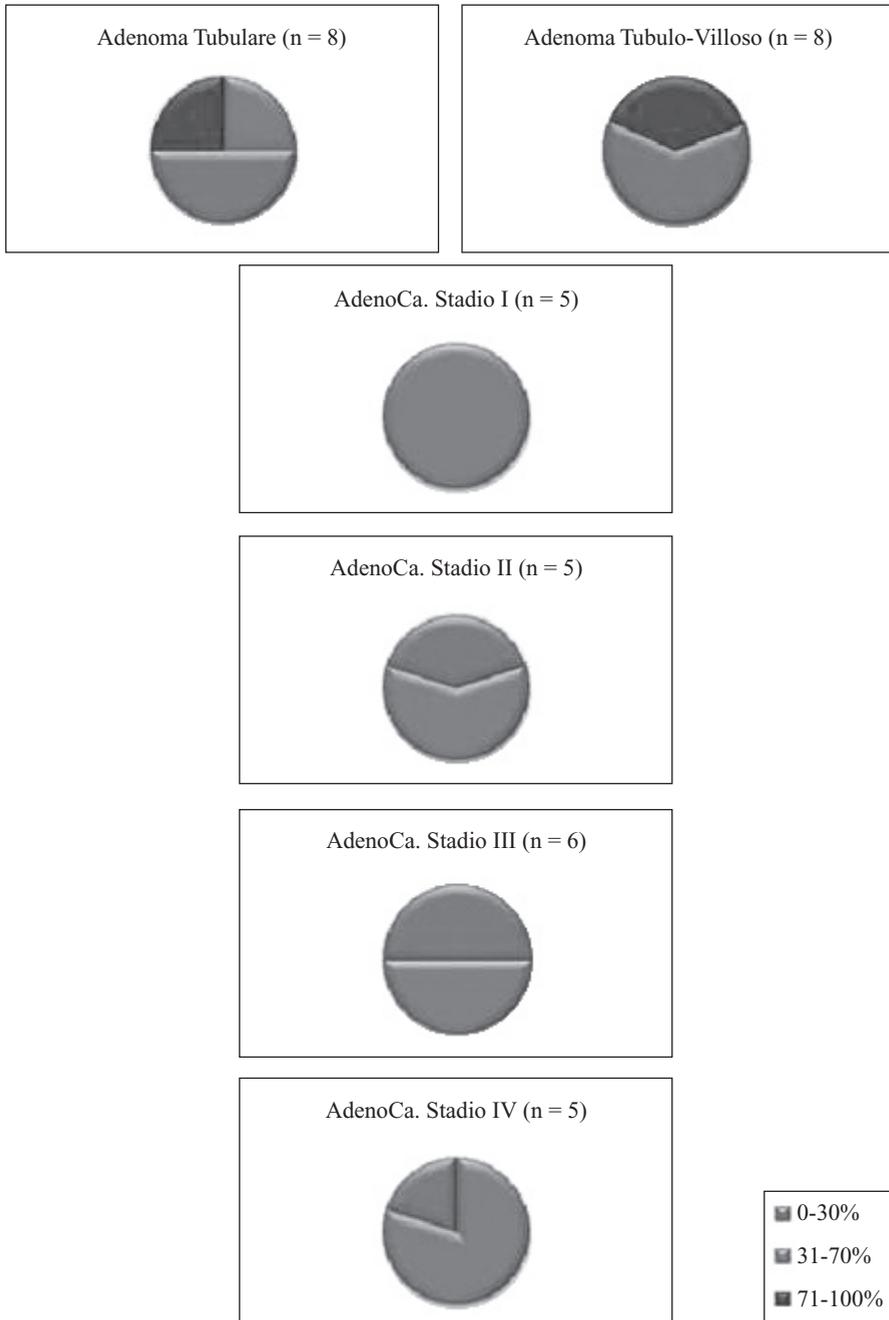


Figura 2. Valutazione semiquantitativa in immunostochimica del recettore TGFβ-RII.

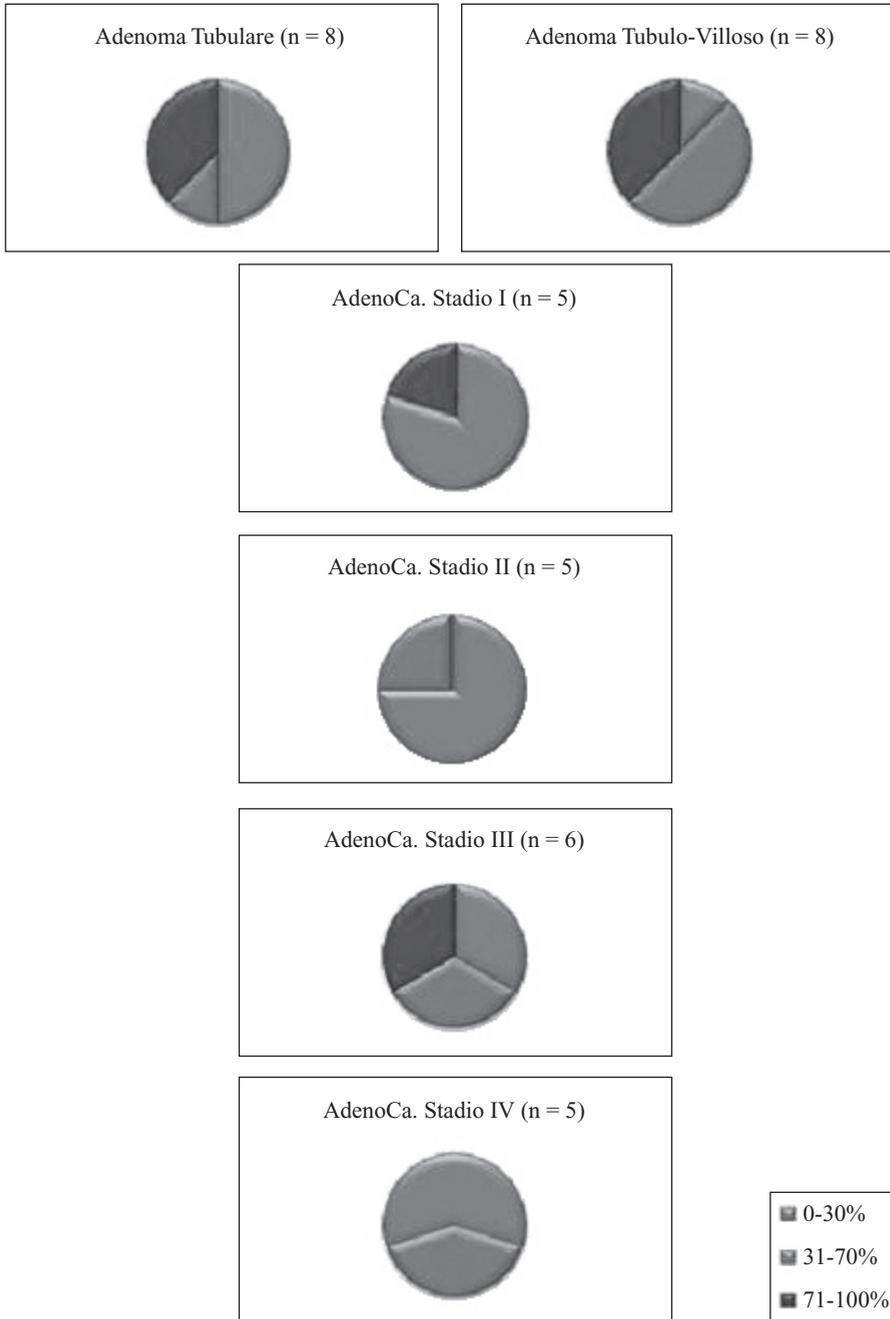


Figura 3. Valutazione semiquantitativa in immunoistochimica di HNE.

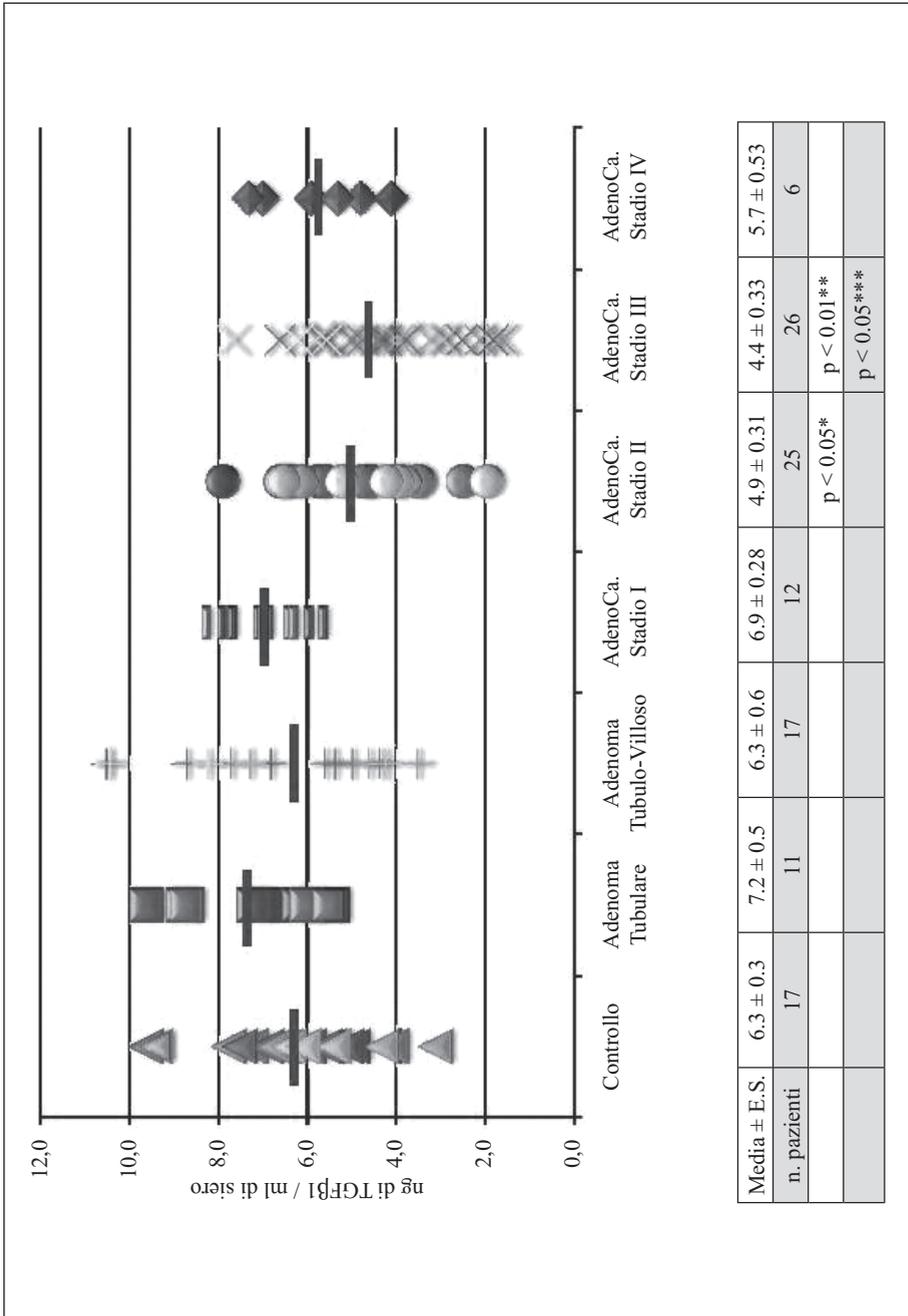


Figura 4. Livelli sierici di TGFβ1.

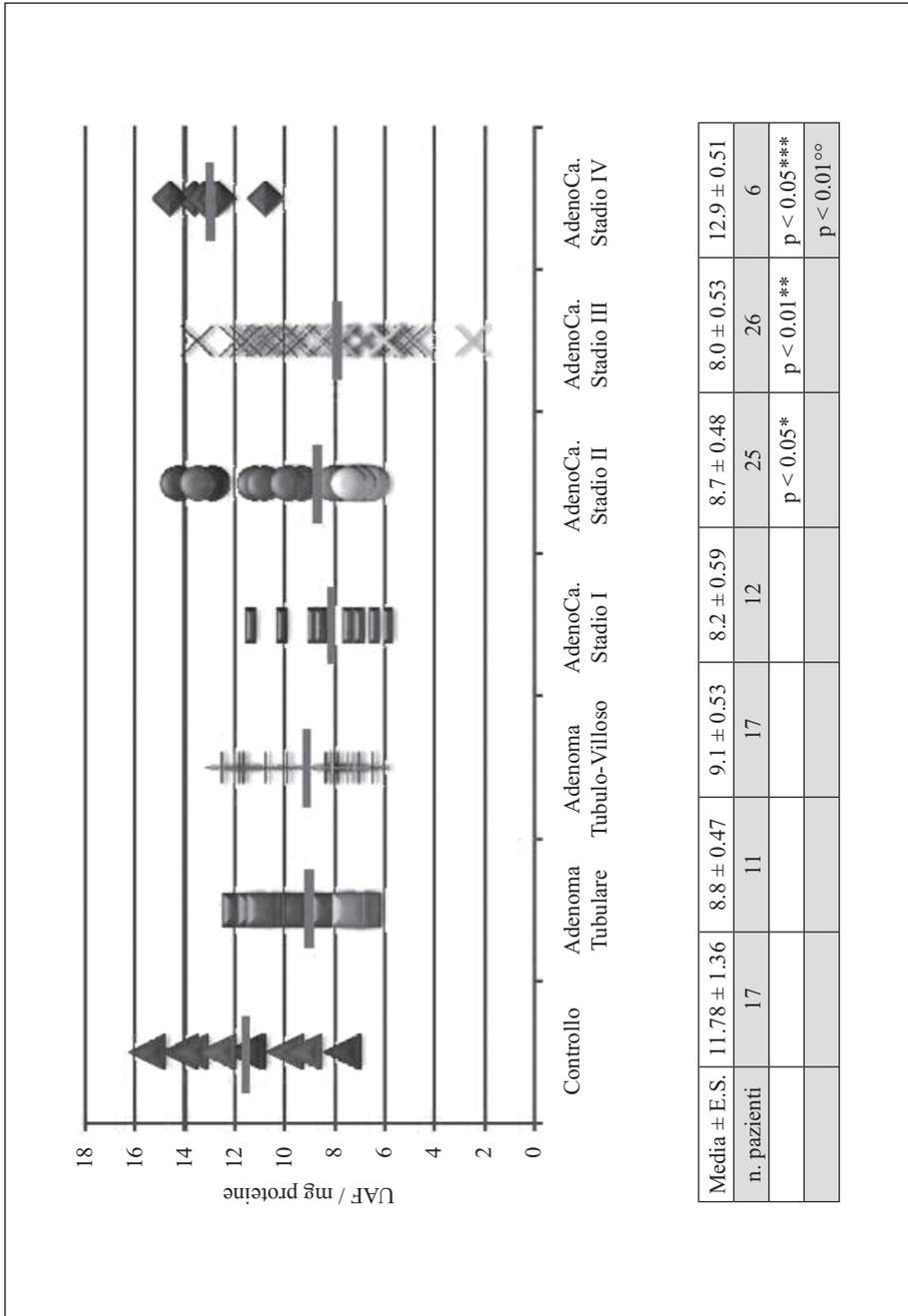


Figura 5. Livelli sierici di HNE.

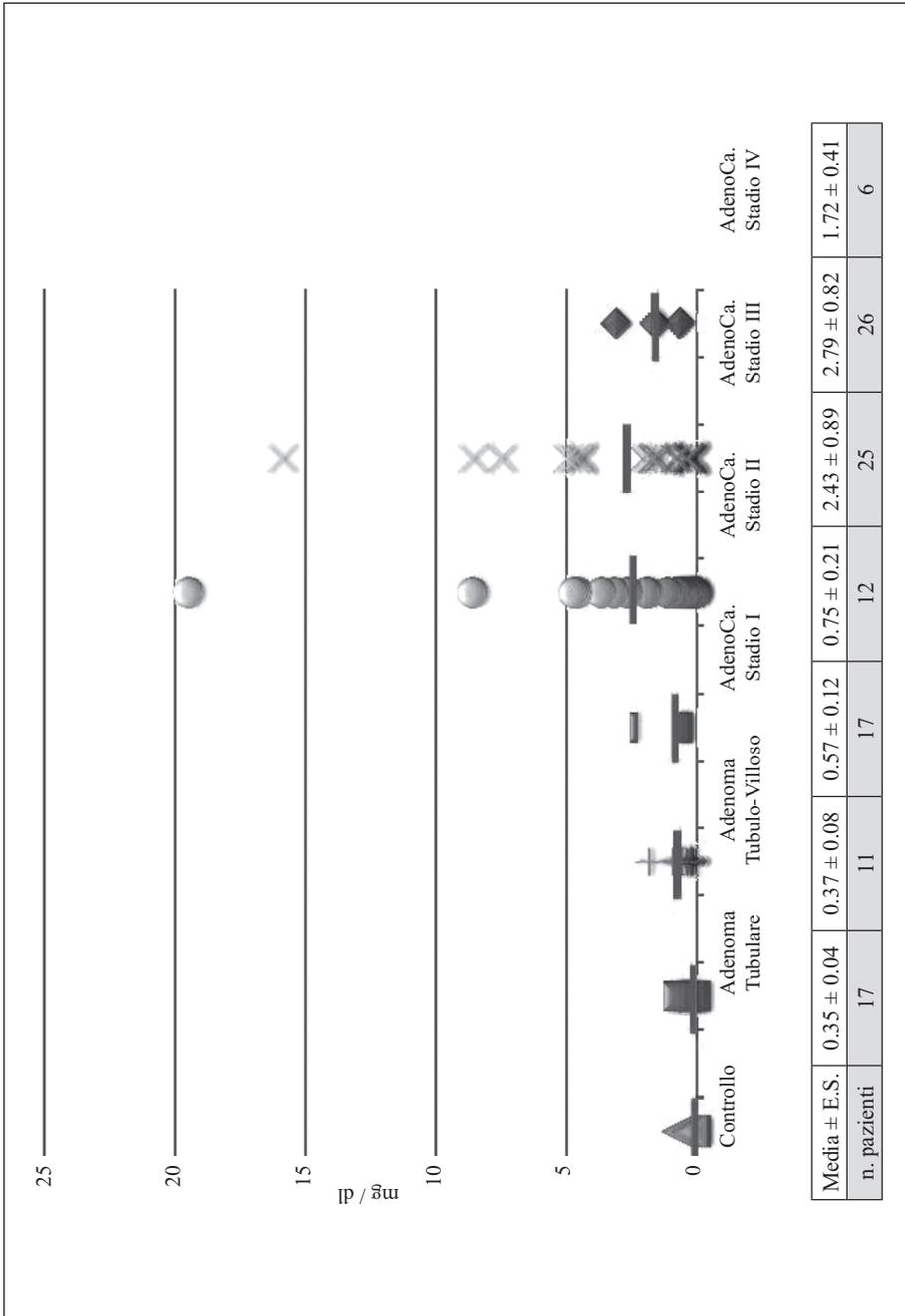


Figura 6. Livelli sierici di PCR.

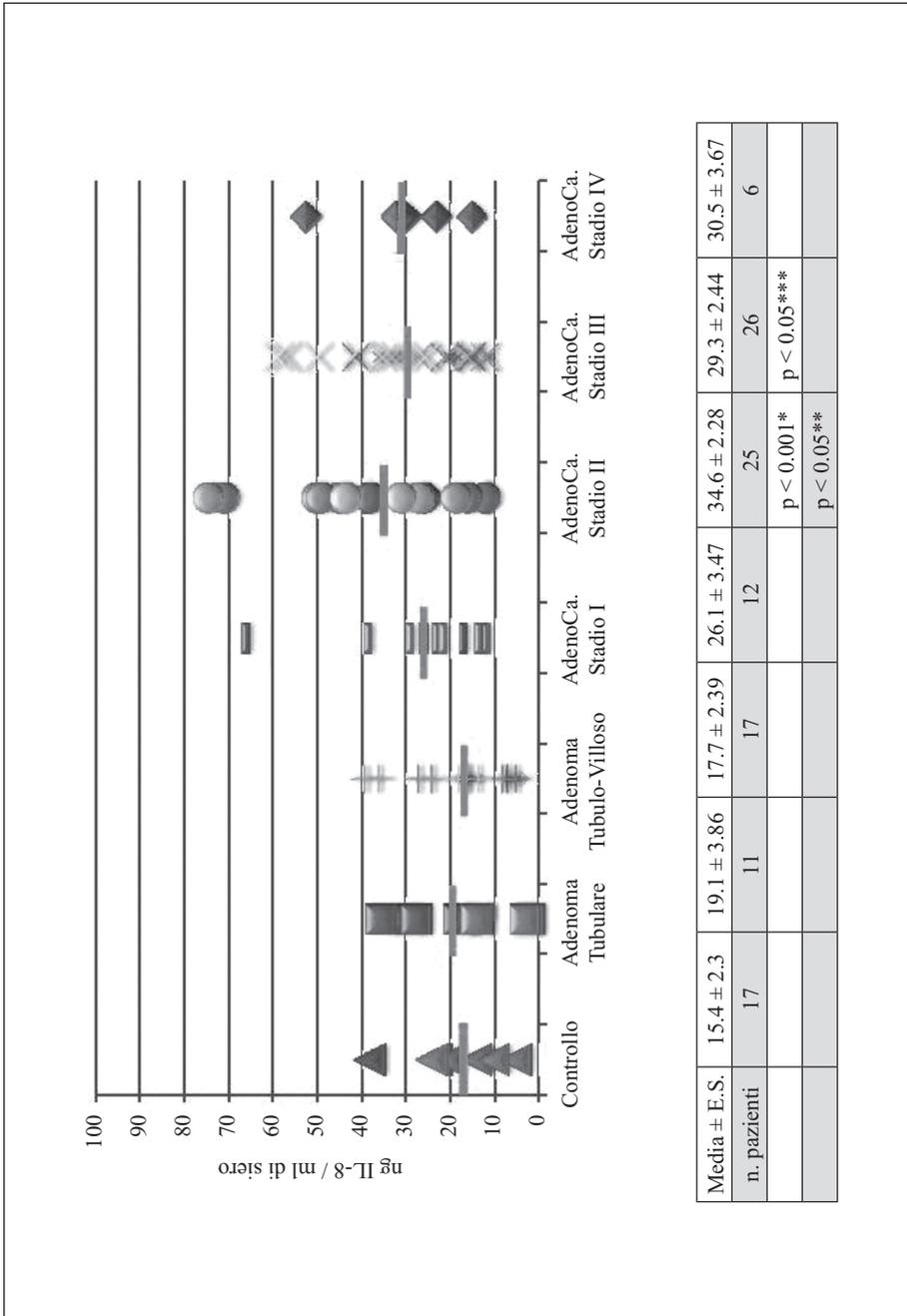


Figura 7. Livelli sierici di IL-8.

## CONCLUSIONI

I dosaggi sul sangue periferico hanno indicato livelli sierici sia di TGF $\beta$ 1, sia di HNE in diminuzione nel passaggio verso gli stadi più avanzati di malignità (stadio II e stadio III), mentre si normalizzano nello stadio IV. Questo andamento dei valori di TGF $\beta$ 1 nell'ultimo stadio potrebbe essere spiegato dalla necessità delle cellule tumorali di cambiare il proprio fenotipo da epiteliale a mesenchimale, sfruttando le proprietà di citochina transdifferenziante del TGF $\beta$ 1. La concentrazione sierica di IL-8 mostra un andamento speculare rispetto a quanto osservato per le precedenti molecole: questa citochina aumenta già nei primi stadi di adenocarcinoma, e raggiunge concentrazioni significativamente diverse dai controlli negli stadi II e III. Anche nello stadio IV i livelli di IL-8 sono in opposizione a quanto registrato per il TGF $\beta$ 1 e l'HNE, con tendenza alla riduzione.

Per quanto riguarda gli adenomi, i diversi parametri presi in considerazione non mostrano differenze significative rispetto al controllo. Pertanto il dosaggio sierico di queste molecole riveste un ruolo nel fornire indicazioni sulla tempistica del passaggio da stadi maligni precoci a stadi più avanzati, mentre non è orientativo nella progressione da adenoma ad adenocarcinoma.

Spesso, la PCR viene utilizzata nell'attività clinica come unico parametro di infiammazione. Nonostante questa proteina mostri un andamento parallelo a quello osservato per l'IL-8, abbiamo constatato una grande dispersione dei suoi valori all'interno di ciascun gruppo sperimentale. Ciò rende la PCR un indicatore meno specifico della IL-8 nel correlare lo stato infiammatorio a quello neoplastico.

Non possiamo individuare un ruolo specifico per le molecole da noi studiate, ma sicuramente possiamo indicare le future linee di ricerca che riguardano un confronto tra questi nuovi marcatori, quelli classici e la diagnostica per immagini.

Da quanto scaturito dalla nostra ricerca, possiamo auspicare un sempre più ampio utilizzo delle molecole pro-infiammatorie da noi studiate in diagnostica, con il vantaggio di un'indagine relativamente semplice e poco costosa, specifica degli stadi evolutivi del tumore. La completa analisi delle differenti citochine implicate nella cancerogenesi potrebbe fornire evidenze precoci dell'eventuale trasformazione maligna degli adenomi e correlare in modo più corretto la risposta del tumore alla terapia adiuvante e neoadiuvante.

## BIBLIOGRAFIA

1. Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro <http://www.airc.it/tumori/tumore-al-colon-retto.asp>.
2. Barrera G, Pizzimenti S, Dianzani MU: *4-hydroxynonenal and regulation of cell cycle: effects on the pRb/E2F pathway*. Free Radic. Biol. Med. 2004; 37: 597-606.
3. Barrera G, Pizzimenti S, Laurora S, Moroni E, Giglioni B, Dianzani MU: *4-Hydroxynonenal affects pRb/E2F pathway in HL-60 human leukemic cells*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002; 295: 267-275.
4. Bendre MS, Marquies AG, Walsler B: *Tumor derived interleukin-8 stimulates osteolysis independent of the receptor activator of nuclear factor-KB ligand pathway*. Cancer Res. 2005; 65: 11001-11009.
5. Biasi F, Tessitore L, Zanetti D, Cutrin JC, Zingaro B, Chiarpotto E, Zarkovic N, Serviddio G, Poli G: *Associated changes of lipid peroxidation and transforming growth factor beta1 levels in human colon cancer during tumour progression*. Gut 2002; 50: 361-367.
6. Brew R, Erikson JS, West DC, Kinsella AR, Slavin J, Christmas SE: *Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro*. Cytokine 2000; 12: 78-85.
7. Canuto RA, Muzio G, Maggiora M, Poli G, Biasi F, Dianzani MU, Ferro M, Bassi AM, Penco S, Marinari UM: *Ability of different hepatoma cells to metabolize 4-hydroxynonenal*. Cell Biochem. Funct. 1983; 11: 79-86.
8. Cerbone A, Toaldo C, Laurora S, Briatore F, Pizzimenti S, Dianzani MU, Ferretti C, Barrera G: *4-Hydroxynonenal and PPARgamma ligands affect proliferation, differentiation, and apoptosis in colon cancer cells*. Free Radic. Biol. Med. 2007; 42: 1661-1670.
9. DeLarco JE, Wuertz BR, Furcht LT: *The potential role of neutrophils in promoting the metastatic phenotype of tumors releasing interleukin-8*. Clin. Cancer Res. 2004; 10: 4895-4900.
10. Dianzani MU, Canuto RA, Rossi MA, Poli G, Garcea R, Biocca ME, Cecchini G, Biasi F, Ferro M, Bassi AM: *Further experiments on lipid peroxidation in transplanted and experimental hepatomas*. Toxicol. Pathol. 1984; 12: 189-199.
11. Dianzani MU, Poli G, Canuto RA, Rossi MA, Biocca ME, Biasi F, Cecchini G, Muzio G, Ferro M, Esterbauer H: *New data on kinetics of lipid peroxidation in experimental hepatomas and preneoplastic nodules*. Toxicol. Pathol. 1986; 14: 404-410.
12. Dumont N, Arteaga CL: *The tumor microenvironment: a potential arbitrator of the tumor suppressive and promoting actions of TGFbeta*. Differentiation 2002; 70: 574-582.
13. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD: *The three Es of cancer immunoediting*. Annu. Rev. Immunol. 2004; 22: 329-360.
14. Elliott RL, Blobe GC: *Role of transforming growth factor Beta in human cancer*. J. Clin. Oncol. 2005; 23: 2078-2093.
15. Erdman SE, Sohn JJ, Rao VP, Nambiar PR, Ge Z, Fox JG, Schauer DB: *CD4+ CD25+ regulatory lymphocytes induce regression of intestinal tumors in ApcMin/ + mice*. Cancer Res. 2005; 65: 3998-4004.
16. Han SU, Kim HT, Seong do H, Kim YS, Park YS, Bang YJ, Yang HK, Kim SJ: *Loss of the Smad3 expression increases susceptibility to tumorigenicity in human gastric cancer*. Oncogene 2004; 23: 1333-1341.

17. Howe KL, Reardon C, Wang A, Nazli A, McKay DM: *Transforming growth factor-beta regulation of epithelial tight junction proteins enhances barrier function and blocks enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7-induced increased permeability*. Am. J. Pathol. 2005; 167: 1587-159.
18. Izcue A, Coombes JL, Powrie F: *Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation*. Annu. Rev. Immunol. 2009; 27: 313-338.
19. Kanner J: *Dietary advanced lipid oxidation endproducts are risk factors to human health*. Mol. Nutr. Food Res. 2007; 51: 1094-1101.
20. Kumagai T, Kawamoto Y, Nakamura Y, Hatayama I, Satoh K, Osawa T, Uchida K: *4-Hydroxy-2-nonenal, the end product of lipid peroxidation, is a specific inducer of cyclooxygenase-2 gene expression*. Biochem. and Biophys. Res. Commun. 2000; 273: 437-441.
21. Lakatos PL, Lakatos L: *Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies*. World J. Gastroenterol. 2008; 14: 3937-3947.
22. Leonarduzzi G, Scavazza A, Biasi F, Chiarotto E, Camandola S, Vogel S, Dargel R, Poli G: *The lipid peroxidation end product 4-hydroxy-2,3-nonenal up-regulates transforming growth factor beta1 expression in the macrophage lineage: a link between oxidative injury and fibrosclerosis*. Faseb. J. 1997; 11: 851-857.
23. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK: *IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis*. J. Immunol. 2003; 170: 3369-3376.
24. Marek A, Brodzicki J, Liberek A, Korzon M: *TGF-beta (transforming growth factor-beta) in chronic inflammatory conditions - a new diagnostic and prognostic marker?* Med. Sci. Monit. 2002; 8: 145-151.
25. Maxwell P, Gallagher R, Seaton A: *HIF-1 and NF- $\kappa$ B-mediated upregulation of CXCR1 and CXCR2 expression promotes cell survival in hypoxic prostate cancer cells*. Oncogene 2007; 26: 7333-7345.
26. Meira LB, Bugni JM, Green SL, Lee CW, Pang B, Borenshtein D, Rickman BH, Rogers AB, Moroski-Erkul CA, McFaline JL, Schauer DB, Dedon PC, Fox JG, Samson LD: *DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mic*. J. Clin. Invest. 2008; 118: 2516-2525.
27. Mishra L, Shetty K, Tang Y, Stuart A, Byers SW: *The role of TGF-beta and Wnt signaling in gastrointestinal stem cells and cancer*. Oncogene 2005; 24: 5775-5789.
28. Muto T, Bussey HJ, Morson BC: *The evolution of cancer of the colon and rectum*. Cancer 1975; 36: 2251-2270.
29. Nitti M, Domenicotti C, d'Abramo C, Assereto S, Cottalasso D, Melloni E, Poli G, Biasi F, Marinari UM, Pronzato MA: *Activation of PKC- $\beta$  isoforms mediates HNE-induced MCP-1 release by macrophages*. Biochem. and Biophys. Res. Commun. 2002; 294: 547-552.
30. Ohtsuka Y, Sanderson IR: *Transforming growth factor-beta: an important cytokine in the mucosal immune response*. Curr. Opin. Gastroenterol. 2000; 16: 541-545.
31. Parola M, Pinzani M, Casini A, Leonarduzzi G, Marra F, Caligiuri A, Ceni E, Biondi P, Poli G, Dianzani MU: *Induction of procollagen type I gene expression and synthesis in human hepatic stellate cells by 4-hydroxy-2,3-nonenal and other 4-hydroxy-2,3-alkenals is related to their molecular structure*. Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1996; 222: 261-264.

32. Platten M, Wick W, Weller M: *Malignant glioma biology: role for TGF-beta in growth, motility, angiogenesis, and immune escape*. Microsc. Res. Tech. 2001; 52: 401-410.
33. Roessner A, Kuester D, Malfertheiner P, Schneider-Stock R: *Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis*. Pathol. Res. Pract. 2008; 204: 511-524.
34. Roman C, Saha D, Beauchamp R: *TGF-beta and colorectal carcinogenesis*. Microsc. Res. Tech. 2001; 52: 450-457.
35. Sakamoto K, Maeda S, Hikiba Y, Nakagawa H, Hayakawa Y, Shibata W, Yanai A, Ogura K, Omata M: *Constitutive NF-kappaB activation in colorectal carcinoma plays a key role in angiogenesis, promoting tumor growth*. Clin. Cancer Res. 2009; 15: 2248-2258.
36. Takamori H, Oades ZG, Hoch OC, Burger M, Schraufstatter IU: *Autocrine growth effect of IL-8 and GROa on a human pancreatic cancer cell line, Capan-1*. Pancreas 2000; 21: 52-56.
37. Takenoshita S, Fukushima T, Kumamoto K, Iwadata M: *The role of TGF-beta in digestive organ disease*. J. Gastroenterol. 2002; 37: 991-999.
38. West JD, Ji C, Duncan ST, Amarnath V, Schneider C, Rizzo CJ, Brash AR, Marnett LJ: *Induction of apoptosis in colorectal carcinoma cells treated with 4-hydroxy-2-nonenal and structurally related aldehydic products of lipid peroxidation*. Chem. Res. Toxicol. 2004; 17: 453-462.
39. Westbrook AM, Wei B, Braun J, Schiestl RH: *Intestinal mucosal inflammation leads to systemic genotoxicity in mice*. Cancer Res. 2009; 69: 4827-4834.
40. Yu H, Pardoll D, Jove R: *STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3*. Nat. Rev. Cancer 2009; 9: 798-809.
41. Zanetti D, Poli G, Vizio B, Zingaro B, Chiarpotto E, Biasi F: *4-hydroxynonenal and transforming growth factor-beta1 expression in colon cancer*. Mol. Aspects Med. 2003; 24: 273-280.

*Tesi di Laurea vincitrice del*  
**PREMIO FONDAZIONE FERRERO ONLUS**  
*in memoria del Prof. Gianpiero GAIDANO*  
*Anno Accademico 2010/2011*

*Candidato:* Annalisa MASTRAPASQUA

*Relatore:* Prof. Giovanni Carlo ISAIA

*Titolo:* **Deterioramento cognitivo e pattern di multimorbilità  
analisi di cluster**

*Tesi di Laurea vincitrici del*  
**PREMIO IN MEMORIA DEL DOTT. ITALO ARNEODO**  
*Anno Accademico 2010/2011*

*Candidato:* Sara MONTI

*Relatore:* Prof. Piero STRATTA

*Titolo:* **Nuovi marcatori di flogosi nelle patologie sistemiche autoimmuni a confronto con le glomerulonefriti primitive: un ruolo per osteopontina e recettore solubile dell'attivatore del plasmogeno?**

*Candidato:* Davide VARENNI

*Relatore:* Prof.ssa Caterina BUCCA

*Titolo:* **Ostruzione delle vie aeree da esercizio fisico e deficit di vitamina D**

*Tesi di Laurea vincitrici della  
MENZIONE D'ONORE  
del Consiglio di Presidenza dell'Accademia di Medicina  
Anno Accademico 2010/2011*

*Candidato:* Alessandra GIAI VIA

*Relatore:* Prof. Luca DURELLI

*Titolo:* **Valutazione dello stato di immunosoppressione  
e del recupero del sistema immunitario  
dopo trattamento con alemtuzumab**

*Candidato:* Silvia MAROLA

*Relatore:* Prof. Mario NANO

*Titolo:* **Approccio alle disfunzioni pelviperineali nel paziente  
affetto da sclerosi multipla**

*Candidato:* Davide Giuseppe RIBALDONE

*Relatore:* Prof. Mario RIZZETTO

*Titolo:* **Il ruolo dell'ecografia intestinale nel predire il rischio  
di recidiva post operatoria nella malattia di Crohn**

*Candidato:* Marinella TRICARICO

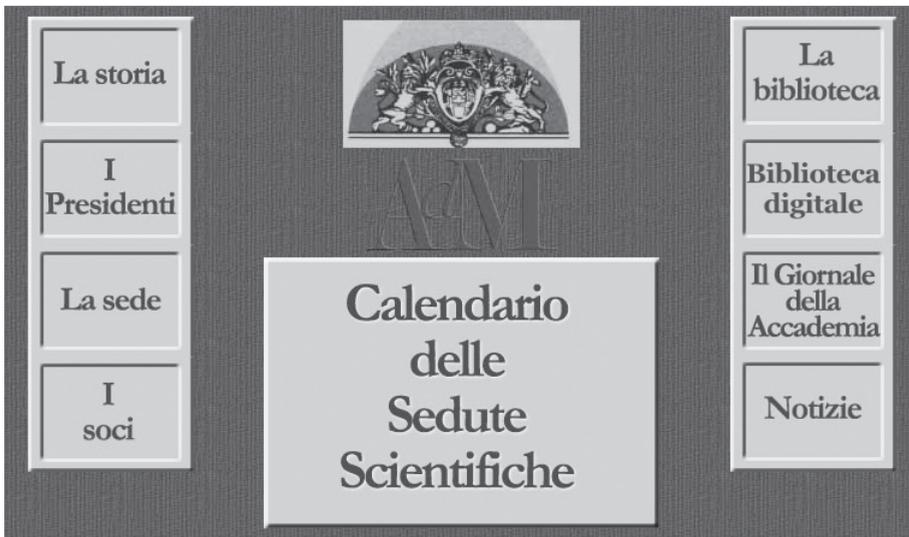
*Relatore:* Prof. Paolo CAVALLO PERIN

*Titolo:* **Esosomi come sorgente di biomarcatori urinari**



*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 2012)

- 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. I lavori, in italiano o in inglese, devono essere trasmessi al Direttore Responsabile 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 Direttore Responsabile. 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 del 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) I riferimenti bibliografici devono essere numerici e riportati nel testo in parentesi tonde: se più di uno, devono essere separati da una virgola.
  
- d) Nella bibliografia le singole voci devono essere indicate in ordine di citazione, numerate progressivamente e redatte secondo le seguenti modalità:

- 1) Citazione di un articolo: Cognome e Iniziale del nome di tutti gli Autori, punto, Titolo dell'articolo in caratteri corsivi, punto, Titolo della rivista, come riportato nel Journal Citation Reports, punto, anno di pubblicazione, punto e virgola, volume, due punti, prima ed ultima pagina, punto.

Esempio:

Bianchi A, Rossi GC, Verdi D. *D-Dimer plasma correlation in an older hospitalized population*. J Am Geriatr Soc. 2011; 59: 2385-2386.

- 2) Citazione di un intero volume: Cognome e Iniziale del nome di tutti gli Autori, punto, Titolo del volume in caratteri corsivi, 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, punto, Titolo del capitolo in caratteri corsivi, punto, Titolo del volume fra virgolette preceduto da "In", virgola, 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.

- 4) Citazione di opere di riviste online o e-book: Cognome e Iniziale del nome di tutti gli Autori, punto, Titolo dell'articolo in caratteri corsivi, punto, Titolo della rivista fra virgolette, preceduto da "In" come riportato nel Journal Citation Reports, virgola, anno di pubblicazione, virgola, volume, due punti fascicolo, punto, senza indicare la pagina, punto, URL della pagina.

Esempio:

Cairns KL, Nandy R, Grais RF. *Challenges in measuring measles case fatality ratios in settings without vital registration*. In "Emerging Themes in Epidemiology", 2010; 7: 4. <http://www.ete-online.com/content/7/1/4>

- e) L'Autore deve specificare se desidera gli estratti ed in quale numero. Il relativo costo è a carico del richiedente.

*INDICE DEGLI AUTORI*

Marco Ettore Allaix	137	Ines Destefano	94
Alida Andrealli	165	Federico Dettoni	107
Alberto Angeli	35, 300	Alessandra Di Pucchio	62
Laura Annovazzi	264	Luigi Dogliotti	176
Simone Arolfo	137	Alessandro Falcone	372
Davide Balmativola	355	Rosella Famà	335
Cristiana Barbera	154	Federico Famiglietti	137
Alessandro Bargoni	228	Marco Fangazio	335
Chiara Benedetto	204	Anna Ferrero	176
Elena Berra	45	Fabio Forchino	121
Alfredo Berruti	176	Chiara Fulcheri	45
Fiorella Biasi	372	Silvia Gaia	284
Davide Blonna	107	Gianluca Gaidano	335
Davide Edoardo Bonasia	107	Laura Garassino	154
Franco Brunello	284	Tina Guina	372
Mauro Bruno	165	Maria Kuvidi	154
Alessio Bruscazzin	335	Gabriele Lanzo	204
Matteo Bruzzone	107	Franco Locatelli	217
Valentina Caldera	264	Marco Maina	372
Gilberto Calzolari	300	Antonio Marmotti	107
Alessandro Cantamessa	284	Marta Mellai	264
Lorenzo Capussotti	121	Vittorio Modena	186
Renato Carignola	300	Sara Monti	335
Patrizia Carucci	284	Alessandro Moretta	217
Filippo Castoldi	107	Lorenzo Moretta	217
Annalisa Chiappella	76	Mario Morino	137
Carmela Ciardullo	335	Rossella Morra	94
Daniela Cilloni	318	Marco Mula	277
Chiara Ciochetto	76	Roberto Mutani	277
Michele Covella	45	Mario Nano	94, 372
Stefania Cresta	335	Roberta Pacifici	62
Valeria Data	300	Mauro Papotti	372
Roberta De Fazio	204	Gianluca Paraluppi	134
Lorenzo De Paoli	335	Raffaele Pellerito	197

Giuseppe Poli	372	Mauro Salizzoni	134
Sandro Potecchi	240	Giorgio Maria Saracco	372
Franco Rabbia	45	Davide Schiffer	264
Silvia Rasi	335	Lorenzo Silengo	107
Cinzia Rastello	94	Valeria Spina	335
Dario Ribero	121	Paolo Strignano	134
Mario Rizzetto	284	Monica Surace	154
Davide Rossi	335	Corrado Tarella	107
Paolo Rossi	107	Riccardo Torta	277
Roberto Rossi	107	Silvia Totaro	45
Antonia Rotolo	318	Franco Veglio	45
Laura Saba	300	Umberto Vitolo	76
Giuseppe Saglio	318		



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,  
Specializzandi della Scuola di Specializzazione in Geriatria  
dell'Università di Torino,  
che hanno contribuito alla revisione degli elaborati:

*Luca Agosta*

*Luisa Balcet*

*Mariantonietta Catania*

*Valentina Chiusano*

*Yolanda Falcone*

*Giorgia Fornelli*

*Roberto Gallina*

*Francesca Greppi*

*Laura Leto*

*Margherita Marchetti*

*Annalisa Mastrapasqua*

*Katia Molinar Roet*

*Simonetta Piano*

*Paola Porrino*

*Elena Spertino*

Autorizzazione del Tribunale di Torino n. 477  
Finito di stampare nel mese di novembre 2011