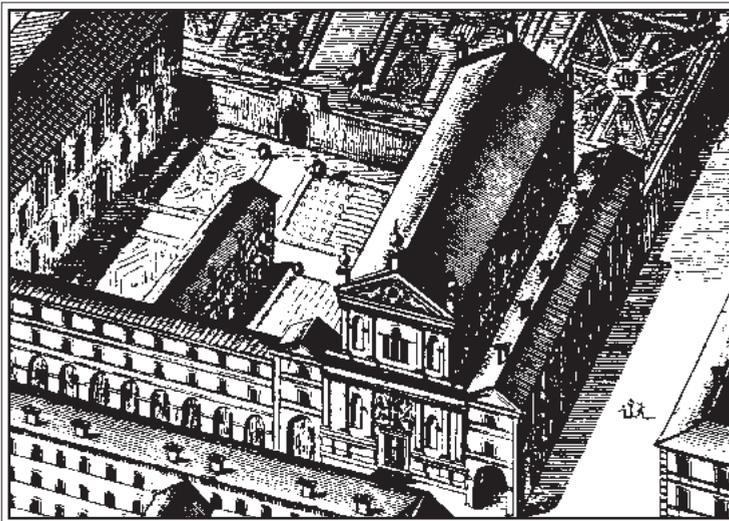




Giornale *della*
Accademia *di* Medicina
di Torino



FONDAZIONE  CRT

Anno CLXXV

2012

GIORNALE
DELLA
ACCADEMIA DI MEDICINA
DI TORINO

Comitato di Redazione

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

Direttore Responsabile

Giancarlo Isaia

ACCADEMIA DI MEDICINA DI TORINO

Ufficio di Presidenza

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

SOMMARIO

PARTE I

**Elenco dei Presidenti della Società Medico-Chirurgica
e dell'Accademia di Medicina di Torino** 13

Elenco dei Soci 15

PARTE II

Sedute dell'Accademia di Medicina, anno 2012 31

PARTE III

Contributi

Alberto Angeli

**Relazione del Presidente alla seduta inaugurale
dell'Accademia Anno 2012/2013** 37

<i>Luca Cordero di Montezemolo</i> Commemorazione del socio Enrico Madon	47
 <i>Carlo De Sanctis</i> Commemorazione del socio Enrico Madon	50
 <i>Alberto Angeli</i> Stress, rischio cardiovascolare e invecchiamento	53
 <i>Giuseppe Poli, Fiorella Biasi, Gabriella Leonarduzzi</i> L'infiammazione nella promozione e nella progressione delle malattie croniche	72
 <i>Alessandra Fabbri</i> Alimentazione e qualità della vita	80
 <i>Maria Grazia Bernengo, Maria Teresa Fierro, Pietro Quaglino, Paola Savoia</i> Il melanoma: una neoplasia in continua crescita	87
 <i>Barbara Pasini, Francesca Vignolo Lutati, Guido Casalis Cavalchini, Anna Allavena, Paola Ogliara, Cecilia Bracco</i> Fattori genetici predisponenti al carcinoma della mammella	103

Sebastiano Marra

**Infarto Miocardico Acuto:
la terapia rigenerativa cellulare** 124

Alberto Angeli

**Il ruolo emergente del sistema RANKL-RANK-OPG
in medicina interna e oncologia** 135

Massimo Porta, Sara Gallo

**Nuovi approcci al trattamento medico
della retinopatia diabetica** 162

*Alessandro Cignetti, Angela Gueli, Riccardo Bruna,
Marco Ruella, Corrado Tarella*

**Le emopatie maligne dell'anziano:
progressi nella terapia e nelle conoscenze biologiche** 180

*Pier Luigi Ingrassia, Luca Ragazzoni, Marco Tengattini,
Alba Ripoll, Francesco Della Corte*

**E-learning e alta formazione in medicina dei disastri:
l'esperienza dello European Master in Disaster Medicine** 190

Giuseppe Armocida, Gaetana Silvia Rigo

**Idee della medicina ottocentesca sulla natura femminile,
prima di Lombroso** 204

*Franco Merletti, Claudia Galassi,
Carlotta Sacerdote, Lorenzo Richiardi*
**L'epidemiologia delle malattie croniche:
prospettive future** 214

*Chiara Riganti, Elisabetta Aldieri, Sophie Doublier, Joanna Kopecka,
Ivana Campia, Martha Leonor Pinzòn-Daza, Giada Gelsomino,
Manuela Polimeni, Carolina Dimas Belisario, Dario Ghigo*
The molecular bases of Multidrug Resistance (MDR) 230

*Pier Paolo Donadio, Raffaele Potenza,
Maria Elena Donadio, Anna Guermani*
**La donazione di organi:
aspetti scientifici, etici e sociali** 247

*Dario Fontana, Luigi Rolle, Carlo Ceruti,
Massimiliano Timpano, Marco Falcone*
**Il disturbo dell'identità di genere
L'attività del CIDIGeM
La chirurgia del transessualismo** 261

Filippo Bogetto, Donato Munno
I disturbi dell'identità di genere: quale terapia? 271

Chiara Manieri, Cataldo Di Bisceglie, Elena Castellano, Ezio Ghigo
**I disturbi d'identità di genere: quale terapia?
Il trattamento ormonale** 280

Vittorio Gallo, Alessandra Venesia, Sebastiano Colombatto
Alcool: patologia e vulnerabilità di genere 292

Vincenzo Gerbi
**Non c'è solo alcol nel vino:
considerazioni sulla composizione dei vini e sulla loro diversità** 308

*Annalisa Mastrapasqua, Giorgia Fornelli, Simona Mondino,
Massimiliano Massaia, Giancarlo Isaia*
Premio "Gianpiero Gaidano" 2010/2011
Tesi di Laurea premiata dalla Fondazione Piera, Pietro e Giovanni Ferrero
in collaborazione con l'Accademia di Medicina di Torino
**Deterioramento cognitivo e pattern di multimorbilità:
analisi di cluster** 315

*Sara Monti, Piero Stratta, Umberto Dianzani,
Marco Quaglia, Caterina Canavese*
Premio "Italo Arneodo" 2010/2011
Tesi di Laurea premiata in collaborazione con l'Accademia di Medicina di Torino
**Nuovi marcatori di flogosi nelle patologie sistemiche autoimmuni
a confronto con le glomerulonefriti primitive:
un ruolo per osteopontina e recettore solubile dell'attivatore
del plasminogeno?** 326

*Davide Varenni, Beatrice Culla, Giuseppe Guida,
Luisa Brussino, Caterina Bucca*
Premio "Italo Arneodo" 2010/2011
Tesi di Laurea premiata in collaborazione con l'Accademia di Medicina di Torino
**Ostruzione delle vie aeree da esercizio fisico
e deficit di vitamina D** 344

*Alessandra Gaii Via, Marinella Clerico, Stefania De Mercanti,
Federico Piazza, Luca Durelli*

Tesi di Laurea premiata con la Menzione d'Onore
del Consiglio di Presidenza dell'Accademia di Medicina di Torino

**Valutazione dello stato di immunosoppressione
e del recupero del sistema immunitario dopo trattamento
con alemtuzumab** 359

*Davide Giuseppe Ribaldone, Teresa Cammarota, Andrea Resegotti,
Marco Astegiano, Mario Rizzetto*

Tesi di Laurea premiata con la Menzione d'Onore
del Consiglio di Presidenza dell'Accademia di Medicina di Torino

**Il ruolo dell'ecografia intestinale nel predire il rischio
di recidiva post-operatoria nella malattia di Crohn** 380

PARTE IV

Tesi di Laurea vincitrice del Premio Fondazione Ferrero Onlus in memoria del Prof. Gianpiero Gaidano Anno Accademico 2011/2012	391
Tesi di Laurea vincitrice del Premio in Memoria del Dott. Italo Arneodo Anno Accademico 2011/2012	392
Tesi di Laurea vincitrice della Menzione d’Onore del Consiglio di Presidenza dell’Accademia di Medicina Anno Accademico 2011/2012	393
Sito web dell’Accademia di Medicina di Torino	395
Norme redazionali per la pubblicazione sul “Giornale dell’Accademia di Medicina di Torino”	397
Indice degli Autori	399

*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	2010-2013	Alberto Angeli

ACCADEMIA DI MEDICINA DI TORINO*Via Po, 18 - 10123 Torino**Telefono 011.670.96.07- Fax 011.817.92.98**www.accademiadimedicina.unito.it***ELENCO SOCI (AL 15 OTTOBRE 2013)****Soci Ordinari** (in ordine di anzianità di nomina)**Alberto Sartoris***Professore di Otorinolaringoiatria
Università di Torino
(30 Giugno 1977)***Paolo Gallinaro***Professore di Ortopedia e Traumatologia
Università di Torino
(3 Luglio 1979)***Giovanni Bussolati***Professore Emerito di Anatomia
e Istologia Patologica
Università di Torino
(14 Dicembre 1977)***Luigi Sena***Professore di Patologia Clinica
Università di Torino
(3 Luglio 1979)***Giuseppe Piccoli***Professore di Nefrologia
Università di Torino
(14 Dicembre 1977)***Giacomo Giacobini***Professore di Anatomia Umana Normale
Università di Torino
(20 Maggio 1983)***Alberto Angeli***Professore di Medicina Interna
Università di Torino
(3 Luglio 1979)***Giorgio Palestro***Professore di Anatomia e Istologia Patologica
Università di Torino
(20 Maggio 1983)***Onofrio Campobasso***Primario Emerito di Anatomia Patologica
A.O. Maria Vittoria di Torino
(3 Luglio 1979)***Benedetto Terracini***Professore di Epidemiologia dei Tumori Umani
Università di Torino
(20 Maggio 1983)***Giorgio Emanuelli***Professore Emerito di Medicina Interna
Università di Torino
(3 Luglio 1979)***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 Emerito di Ostetricia e Ginecologia
Università di Torino
(30 Novembre 1990)*

Francesco Di Carlo

*Professore di Farmacologia
Università di Torino
(20 Dicembre 1991)*

Federico Grignolo

*Professore di Oftalmologia
Università di Torino
(20 Dicembre 1991)*

Alberto Piazza

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

Mario Pippione

*Professore di Dermatologia
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 Odontostomatologia
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)*

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*Medico Cardiologo**Torino*

(13 Dicembre 1996)

Cesare Bumma*Primario Emerito di Oncologia**A.O.U. San Giovanni Battista di Torino*

(13 Dicembre 1996)

Giancarlo Isaia*Professore di Medicina Interna e Geriatria**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)

Mario Nano*Professore di Chirurgia Generale**Università di Torino*

(11 Dicembre 1998)

Luigi Santoro*Primario Emerito di Dermochirurgia**Oncologica**A.O.U. San Giovanni Battista 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. Città della Salute e della Scienza
di Torino - Sede Molinette*

(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 Ortopedia e Traumatologia**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 di Chirurgia Plastica e Ricostruttiva
A.O. Città della Salute e della Scienza
di Torino - Sede CTO
(17 Dicembre 2004)*

Teresa Cammarota

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

Ezio Ghigo

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

Luigi Dogliotti

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

Franco Merletti

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

Mario Morino

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

Roberto Mutani

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

Patrizia Presbitero

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

Mauro Rinaldi

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

Alessandro Comandone

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

Felicino Debernardi

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

Irma Dianzani

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

Alessandro Maria Gaetini

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

Guido Monga

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

Umberto Ricardi

*Professore di Radioterapia
Università di Torino
(14 Dicembre 2007)*

Dario Roccatello

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

Mariella Trovati

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

Maria Consuelo Valentini

Primario di Neuroradiologia
A.O. Città della Salute e della Scienza
di Torino - Sede CTO
 (14 Dicembre 2007)

Antonio Bertolotto

Primario di Neurologia
A.O.U. San Luigi Gonzaga di Orbassano
 (12 Dicembre 2008)

Giovanni Camussi

Professore di Nefrologia
Università di Torino
 (12 Dicembre 2008)

Stefano Carossa

Professore di Odontoiatria e Protesi Dentaria
Università di Torino
 (12 Dicembre 2008)

Claudio Fabris

Professore di Pediatria
Università di Torino
 (12 Dicembre 2008)

Giovanni Succo

Professore di Otorinolaringoiatria
Università di Torino
 (12 Dicembre 2008)

Alessandro Bargoni

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

Giuseppe Boccuzzi

Professore di Endocrinologia
Università di Torino
 (18 Dicembre 2009)

Rossana Cavallo

Professore di Microbiologia
Università di Torino
 (18 Dicembre 2009)

Luca Cordero di Montezemolo

Professore di Pediatria
Università di Torino
 (18 Dicembre 2009)

Martino Marangella

Primario di Nefrologia
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 Oncologia Medica
Università di Torino
 (18 Dicembre 2009)

Francesco Scaroina

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

Umberto Vitolo

Primario di Ematologia
A.O. Città della Salute e della Scienza
di Torino - Sede Molinette
 (18 Dicembre 2009)

Chiara Benedetto

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

Sebastiano Marra

Primario di Cardiologia
A.O. Città della Salute e della Scienza
di Torino - Sede Molinette
 (17 Dicembre 2010)

Massimo Porta

*Professore di Medicina Interna
Università di Torino
(17 Dicembre 2010)*

Claudio Rabbia

*Primario di Radiologia Vascolare e
Interventistica
A.O. Città della Salute e della Scienza
di Torino - Sede Molinette
(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
Università di Torino
(16 Dicembre 2011)*

Pier Paolo Donadio

*Primario di Anestesia e Rianimazione
A.O. Città della Salute e della Scienza
di Torino - Sede Molinette
(16 Dicembre 2011)*

Carlo Faletti

*Primario di Radiologia
A.O. Città della Salute e della Scienza
di Torino - Sede CTO
(16 Dicembre 2011)*

Guido Gasparri

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

Fiorenzo Gaita

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

Franco Nessi

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

Maria Giuseppina Robecchi

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

Antonio Amoroso

*Professore di Genetica Medica
Università di Torino
(14 Dicembre 2012)*

Caterina Casadio

*Professore di Chirurgia Toracica
Università di Novara
(14 Dicembre 2012)*

Stefano Cirillo

*Primario di Radiologia
A.O. Ordine Mauriziano di Torino
(14 Dicembre 2012)*

Santo Landolfo

*Professore di Microbiologia
Università di Torino
(14 Dicembre 2012)*

Franco Veglio

*Professore di Medicina Interna
Università di Torino
(14 Dicembre 2012)*

Soci Onorari Nazionali

Bruno Zanobio

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

Rinaldo Bertolino

Professore Emerito di Diritto Canonico
Università di Torino
 (13 Dicembre 2002)

Ernesto Quagliariello

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

Adelfio Elio Cardinale

Professore di Radiologia
Università di Palermo
 (13 Dicembre 2002)

Elio Guido Rondanelli

Professore di Clinica delle Malattie Infettive
Università di Pavia
 (18 Dicembre 1992)

Mario Umberto Dianzani

Professore Emerito di Patologia Generale
Università di Torino
 (12 Dicembre 2003)

Francesco De Matteis

Professore di Tossicologia
Università di Torino
 (17 Dicembre 1993)

Lorenzo Moretta

Professore di Immunologia
Università di Genova
 (14 Dicembre 2007)

Lucio Di Guglielmo

Professore di Radiologia
Università di Pavia
 (16 Dicembre 1994)

Aldo Fasolo

Professore di Biologia dello Sviluppo
Università di Torino
 (12 Dicembre 2008)

Ludovico Dalla Palma

Professore di Radiologia
Università di Trieste
 (12 Dicembre 1997)

Amedeo Bianco

Presidente Ordine dei Medici, Chirurghi e
Odontoiatri della Provincia di Torino
Presidente Federazione Nazionale Medici,
Chirurghi e Odontoiatri
 (14 Dicembre 2012)

Gian Gastone Neri Serneri

Professore di Medicina Interna
Università di Firenze
 (11 Dicembre 1998)

Pietro Rossi

Professore Emerito Università di Torino
Già Presidente dell'Accademia delle Scienze
 (20 Dicembre 2012)

Umberto Marinari

Professore Emerito di Patologia Generale
Università di Genova
 (15 Dicembre 2000)

Plinio Pinna Pintor

Direttore Casa di Cura Pinna Pintor
 (6 Febbraio 2013)

Soci Onorari Esteri

Gian Franco Bottazzo

Londra

(10 Febbraio 1984)

Alberto Boveris

Buenos Aires

(12 Dicembre 1997)

Ralph John M.C.H. Nicholls

Londra

(18 Marzo 1988)

Salvador Moncada

Londra

(11 Dicembre 1998)

Hans Konrad Müller Hermelink

Wurzburg

(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)

Ezio Giacobini

Springfield, Illinois

(12 Dicembre 2008)

Robert C. Gallo

Bethesda, Washington

(17 Dicembre 1993)

Soci Corrispondenti Nazionali

Giuseppe Maria Pontieri

*Professore Emerito di Medicina
Sperimentale e Patologia Generale
Università La Sapienza di Roma
(14 Giugno 1974)*

Carlo Grassi

*Professore di Malattie Respiratorie
Università di Pavia
(20 Maggio 1983)*

Ferruccio Mandler

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

Marco Galloni

*Professore di Anatomia Veterinaria
Università di Torino
(18 Dicembre 1992)*

Fulvia Vignotto

*Medico Anestesista
Torino
(18 Dicembre 1992)*

Giovanni Ceriotti

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

Roberto Frairia

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

Donatella Gattullo

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

Oskar Schindler

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

Luigi Spandrio

*Professore di Biochimica Clinica
Università di Brescia
(16 Dicembre 1994)*

Andrea Ballabio

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

Marcello Garavoglia

*Professore di Chirurgia Generale
Università del Piemonte Orientale - Novara
(15 Dicembre 1995)*

Ottavio Davini

*Primario di Radiologia
A.O. Città della Salute e della Scienza
di Torino - Sede Molinette
(10 Dicembre 1999)*

Oscar Bertetto

*Primario di Oncologia
A.O. Città della Salute e della Scienza
di Torino - Sede Molinette
(13 Dicembre 2002)*

Alberto Biglino

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

Giancarlo Cortese

*Primario di Radiologia
A.O. Maria Vittoria di Torino
(15 Dicembre 2006)*

Paolo Pera

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

Giuseppe Ottavio Armocida

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

Anna Sapino

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

Sergio Duca

*Direttore di Neuroradiologia
Ospedale Koelliker
(14 Dicembre 2012)*

Gianluca Gaidano

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

Alessandro Levis

*Primario Emerito di Ematologia
Ospedale di Alessandria
(14 Dicembre 2012)*

Paolo Piero Limone

*Primario di Endocrinologia
A.O. Ordine Mauriziano di Torino
(17 Dicembre 2010)*

Soci Corrispondenti Esteri

Jean Pierre Changeux

*Parigi
(14 Giugno 1974)*

Nicolas Westerhof

*Amsterdam
(18 Dicembre 1992)*

Danilo Baggiolini

*Basilea
(20 Maggio 1983)*

Giorgio Maria Innocenti

*Stoccolma
(15 Dicembre 1995)*

Soldano Ferrone

*New York
(20 Maggio 1983)*

Roberto Civitelli

*St. Louis
(17 Dicembre 2010)*

Neville A. Marsh

*Londra
(30 Novembre 1990)*

Soci Emeriti

Guido Filogamo

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

Salvatore Rocca Rossetti

*Professore Emerito di Urologia
Università di Torino
(23 Maggio 2007)*

Giuliano Maggi

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

Gian Luca Sannazzari

*Professore Emerito di Radioterapia
Università di Torino
(23 Maggio 2007)*

Gian Michele Molinatti

*Professore Emerito 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 Emerito 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 Emerito 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 Emerito di Ematologia
Università di Torino
(18 Giugno 2008)*

Napoleone Massaioli

*Professore Emerito 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)*

Mario Portigliatti Barbos

*Professore Emerito di Medicina Legale
Università di Torino
(23 Maggio 2007)*

Pier Giuseppe De Filippi

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

Luigi Ravizza*Professore Onorario di Clinica Psichiatrica**Università di Torino*

(12 Settembre 2011)

Davide Schiffer*Professore Emerito di Neurologia**Università di Torino*

(12 Settembre 2011)

Francesco Morino*Professore di Chirurgia Generale**Università di Torino*

(14 Dicembre 2012)

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

(14 Dicembre 2012)

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

(14 Dicembre 2012)

Soci Benemeriti**Ing. Enzo Brusasco**

(16 Dicembre 2005)

Notaio Alberto Morano

(22 Febbraio 2010)

Ing. Walter Ceresa

(16 Dicembre 2005)

Sig. Alessio Giuseppe Lucca

(4 Ottobre 2010)

Dott. Piero Sola

(16 Dicembre 2005)

Dott. Ugo Riba

(11 Febbraio 2011)

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

(14 Dicembre 2009)

Dott.ssa Severina Arneodo

(6 Febbraio 2013)

Soci già Ordinari

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 Giovannini

*Professore di Clinica delle Malattie Infettive
Università di Torino*

Francesco Gorgerino

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

Giorgio Mangiarotti

*Professore di Biologia Molecolare
Università di Torino*

Mario Maritano

*Primario Emerito di Anestesia e Rianimazione
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino*

Angela Moiraghi Ruggenini

*Professore di Igiene
Università di Torino*

Mario Morea

*Professore di Cardiocirurgia
Università di Torino*

Walter Neri

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

Augusta Palmo

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

Giovanni Pisani

*Primario Emerito di Radiologia
Ospedale Maggiore di Novara*

Ernesto Pozzi

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

Luigi Resegotti

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

Antonio Robecchi

*Professore di Chirurgia Generale
Università di Torino*

Giovanni Sesia

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

Piero Sismondi

*Professore Emerito di Ostetricia
e Ginecologia
Università 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 Emerito 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 2012

- 13 Gennaio* **Melanoma cutaneo:
una neoplasia in continua crescita**
*Relatori: Maria Grazia Bernengo, Maria Teresa Fierro
Pietro Quaglino, Paola Savoia*
- 27 Gennaio* **Fattori genetici predisponenti al carcinoma
della mammella**
Relatore: Barbara Pasini
Presentata dal Socio: Alberto Piazza

PREMIO ARNEODO 2011
**Morfologia micropapillare nel carcinoma della mammella:
studio sperimentale e clinico**
Relatore: Davide Balmativola
- 10 Febbraio* **Infezioni emergenti e riemergenti**
Relatore: Giovanni Di Perri
Presentato dal Socio: Paolo Arese

24 Febbraio **Infarto miocardico acuto:
la terapia rigenerativa cellulare**

Relatore: Sebastiano Marra

PREMIO ARNEODO 2011

**Alterazione dei segnali cellulari mediati da TGF β 1 nella
cancerogenesi del colon-retto: ruolo promovente dei prodotti
di ossidazione lipidica di origine animale**

Relatore: Alessandro Falcone

9 Marzo **Commemorazione del Socio
Enrico MADON**

di Luca Cordero di Montezemolo e Carlo De Sanctis

**Il ruolo emergente del sistema RANKL-RANK-OPG
in Medicina Interna e Oncologia**

Relatore: Alberto Angeli

23 Marzo **Gestione clinica della retinopatia diabetica**

Relatori: Federico Grignolo, Massimo Porta

3 Aprile **Le emopatie maligne nell'anziano:
progressi della terapia e delle conoscenze biologiche**

*Relatori: Corrado Tarella, Alessandro Cignetti,
Marco Ruella*

20 Aprile **Medicina dei disastri: verso una nuova disciplina?**

*Relatori: Francesco Della Corte, Pierluigi Ingrassia
(Novara)*

Presentati dal Socio: Ilario Viano

- 11 Maggio* **La fibrosi polmonare**
Relatore: Carlo Albera
Presentato dal Socio: Giorgio Vittorio Scagliotti
- 25 Maggio* **Discussioni mediche ottocentesche sulle differenze di genere e sulla asserita inferiorità delle donne**
Relatore: Giuseppe Ottavio Armocida
(Varese)
- 8-9 Giugno* **Stili di vita e qualità della vita: scienza e pratica**
Relatori: Alberto Angeli, Simona Bo, Ettore Bologna, Graziella Bruno, Paolo Cavallo Perin, Alessandra Fabbri, Giuseppe Poli
- 22 Giugno* **L'epidemiologia delle malattie croniche: prospettive future**
Relatori: Franco Merletti, Lorenzo Richiardi
- 12 Ottobre* **Meccanismi biochimico-molecolari della Multidrug Resistance (MDR)**
Relatori: Dario Ghigo, Chiara Rigandi
- 26 Ottobre* **Commemorazione del Socio Simone TEICH-ALASIA**
di Maurizio Stella
- La donazione di organi: aspetti scientifici, etici e sociali**
Relatore: Pier Paolo Donadio

9 Novembre **Seduta inaugurale Anno Accademico 2012-2013**
Relazione del Presidente: Alberto ANGELI

Una filosofia per la medicina

Relatore: Ivan Cavicchi

Presentato dal Socio: Alberto Angeli

23 Novembre **I disturbi dell'identità di genere:
quale terapia?**

Relatori: Dario Fontana, Filippo Bogetto, Ezio Ghigo

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

Alcool e alcool dipendenze

Relatori:

Alessandro Cavalli
(Padova)

Giovani, alcool e altre dipendenze

Vittorio Gallo

Alcool: patologia e vulnerabilità di genere

Vincenzo Gerbi

**Non c'è solo alcool nel vino:
considerazioni sulla composizione dei vini
e sulla loro diversità**

Sedute Private

10 Febbraio **Approvazione rendiconto consuntivo 2011
e bilancio di previsione 2012**

14 Dicembre **Elezione di nuovi Soci**

**RELAZIONE DEL PRESIDENTE
ALLA SEDUTA INAUGURALE DELL'ACCADEMIA
ANNO 2012-2013**

*A*utorità, cari Soci, cari colleghi, signore e signori, come negli anni passati, iniziamo questa importante seduta con un cordialissimo benvenuto a voi tutti. Grazie di essere qui, nella nostra storica Aula. Ringrazio anche coloro, Soci e Autorità, che impossibilitati a partecipare, hanno espresso in lettere ed e-mail il loro rammarico di non poter intervenire. Un particolare augurio di recuperare forza e qualità di vita a illustri Soci che non sono oggi presenti per malattie invalidanti. Com'è tradizione, sono al mio fianco a questo tavolo il Presidente Vicario Dott. Alessandro Comandone e il Segretario Generale Dott.ssa Teresa Cammarota.

Nella seduta privata di inizio Anno, la comunità accademica ha voluto testimoniare con voto plebiscitario la propria fiducia all'attuale presidenza e vicepresidenza, rinnovando il mandato per un secondo biennio. Gratitudine, responsabilità, impegno, sono sentimenti, e non parole di circostanza, e vengono, come suol dirsi, dal profondo del cuore. Ringrazio infine, a nome del Consiglio di Presidenza e di tutti i Soci, il Prof. Ivan Cavicchi per aver accettato l'invito a inaugurare l'attività del nuovo Anno Accademico con una lettura magistrale, che ha un titolo particolarmente stimolante, e che è una sorta di manifesto culturale: "Una filosofia per la medicina".

Lo chiameremo al podio e lo ascolteremo subito dopo la relazione del Presidente sull'attività svolta nell'Anno Accademico appena concluso. Non vi tedierò a questo riguardo con l'elencazione analitica delle sedute scientifiche e dei vari eventi (convegni, presentazioni di libri) promossi o partecipati dall'Accademia. Piuttosto cercherò di focalizzare il significato di alcune realizzazioni e proporvi alcune considerazioni personali su chi siamo e dove vogliamo andare.

Al termine della lettura magistrale del Prof. Cavicchi vi sarà una breve pausa. Seguirà poi la parte più istituzionale, e anche più simpatica e ricca

di emozioni, di questa seduta, o se volete, cerimonia inaugurale del nuovo Anno Accademico, e cioè la consegna dei Diplomi ai nuovi Soci, nelle varie Categorie, e la consegna dei Premi di Laurea e delle Menzioni d'Onore ai giovani neo-dottori in Medicina e Chirurgia dell'Università di Torino e dell'Università del Piemonte Orientale. I 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, il Dott. Mario Strola e il Dott. Ettore Bologna, rispettivamente Segretario Generale e Responsabile dei Servizi Medici 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 testimoniarmi, vincendo gli acciacchi fisici e le difficoltà di accesso alla nostra aula, l'apprezzamento per questa iniziativa.

E veniamo adesso ad alcuni aspetti dell'attività svolta, con l'ausilio anche di qualche immagine.

Com'è noto, l'Accademia di Medicina, con i suoi 167 anni d'età è la più giovane delle tre Accademie Sabaude tutt'oggi attive nella nostra città: l'Accademia delle Scienze, l'Accademia di Agricoltura e, appunto, l'Accademia di Medicina. Al Prof. Alberto Conte, Presidente dell'Accademia delle Scienze, e al Prof. Pietro Piccarolo, Presidente dell'Accademia di Agricoltura, un cordiale amichevole saluto. Entrambi mi hanno contattato esprimendo il rammarico di non essere qui per coincidenti impegni da tempo assunti fuori sede. Rinnovo quindi il saluto ai loro rappresentanti, Prof. Giulio Cantini-Cortellezzi per l'Accademia di Agricoltura, e Prof. Alberto Piazza per l'Accademia delle Scienze.

Siamo molto onorati, come Accademia di Medicina, dell'attenzione e della preziosa e stimolante collaborazione delle due Accademie "sorelle", così ricche di storia e cultura. Analoghi sentimenti valgono per la collaborazione con l'Università degli Studi.

Rivolgo un saluto particolarmente amichevole e grato al Magnifico Rettore Prof. Ezio Pelizzetti, che ha voluto essere oggi con noi, e ricordo anche il supporto costante e fattivo di risultati dei precedenti Rettori nostri Soci, Prof. Rinaldo Bertolino e Prof. Mario Umberto Dianzani, anche loro presenti in sala. L'Accademia vive oggi e non sopravvive, grazie all'Università e all'operatività dei suoi dirigenti e tecnici. Mi riferisco all'inserimento nella rete telefonica e informatica, alla gestione della biblioteca e dei relativi programmi di informatizzazione, alla

manutenzione sempre più onerosa dei nostri storici locali, alle spese per i servizi energetici.

*Ho citato, non a caso, la collaborazione con le Accademie Sabaude e con l'Università perché due iniziative, poste rispettivamente all'inizio e nell'ultima parte dell'Anno Accademico testè concluso, ne sono emblematiche. La prima, la cosiddetta seduta congiunta delle tre Accademie, ha assunto un particolare valore aggiunto nell'anno celebrativo dei 150 anni di Unità Nazionale. Nella restaurata, storica Sala dei Mappamondi dell'Accademia delle Scienze, gremita di pubblico, è stata rievocata quella comunità scientifica italiana che nel XIX secolo, coniugando entusiasmo, dedizione e fatica guardava all'Europa e acquisiva, fra mille difficoltà, coscienza nazionale. Merito dei Relatori Proff. Potecchi, Bargoni, Giacobini, Conte aver focalizzato non solo gli aspetti più rilevanti sul piano culturale, ma anche situazioni e particolari meno noti e per questo più stimolanti. Ricordo il tema generale della nostra seduta: *Progresso Scientifico e Coscienza Nazionale: le Riunioni degli Scienziati Italiani in Età Risorgimentale*. Ricordo altresì come la seconda di queste riunioni, iniziate nel 1839, programmate con cadenza annuale e itineranti negli allora diversi Stati italiani, si svolse a Torino nel 1840, sotto gli auspici del re Carlo Alberto di Savoia e la Presidenza del Conte Alessandro di Saluzzo, allora Presidente della Reale Accademia delle Scienze.*

La seconda iniziativa, attuata a fine Settembre 2012, in collaborazione con l'Accademia delle Scienze e l'Università di Torino, è stata il Convegno celebrativo di Salvatore Luria nel centenario della nascita. Luria, nato a Torino e laureato in Medicina e Chirurgia nella nostra Università, formatosi nei laboratori di Giuseppe Levi, fu costretto a lasciare l'Italia a causa delle leggi razziali. Giunto negli Stati Uniti, sviluppò una prestigiosa personalità di scienziato e docente, onorato del Premio Nobel per la Medicina nell'anno 1969. Maestro e mentore di James Watson, gli è riconosciuto un ruolo di pioniere carismatico degli studi sull'espressione genica. Tra i vari apprezzatissimi contributi e le testimonianze di chi conobbe personalmente Luria, vorrei menzionare l'intervento del Prof. David Schlessinger, Direttore del Laboratorio di Genetica dell'NIH a Baltimora, amico dell'Italia e dei nostri Soci Proff. Giorgio Mangiarotti, Lorenzo Silengo e Alberto Piazza, e allievo di seconda generazione di Luria. Il Socio Prof. Alessandro Bargoni ha letto una lettera intensa di sentimenti del figlio Daniel, che ha posto in luce alcuni aspetti della personalità del padre, e soprattutto il suo impegno politico nel combattere dogmatismo, ingiustizie e scelte imperialiste della politica internazionale, e nel riaffermare le valenze etiche della ricerca scientifica.

Le sedute scientifiche pubbliche che si sono succedute con la classica cadenza quindicinale sono state 16 e nelle tre successive schermate che verranno proiettate alle mie spalle vedrete i temi e i relatori del 2012, e potrete non solo valutare l'ampio ventaglio di argomenti trattati ma anche individuare auspicabili proposte per argomenti nuovi e complementari a quelli trattati.

Abbiamo iniziato con una splendida relazione del Prof. Giuseppe Ottavio Armocida, Presidente della Società Italiana di Storia della Medicina sul modo di intendere uomo e donna nella pratica medica e nella società ottocentesche, un ciclo di serate su vari aspetti della cosiddetta Medicina di Genere. Il ciclo proseguirà nel corrente Anno Accademico e si concluderà nella data emblematica dell'8 marzo con la relazione della Prof.ssa Giovannella Baggio, Presidente della Società Italiana di Medicina di Genere.

Com'è tradizione consolidata, distribuiamo oggi, fresco di stampa e pubblicato grazie al contributo della CRT, il 174° volume del Giornale dell'Accademia, che raccoglie i testi delle relazioni scientifiche e delle commemorazioni dei Soci scomparsi, che riguardano le presentazioni in aula nel corso del 2011. È ancora più corposo del precedente volume 173, pubblicato l'anno scorso. Il nostro Giornale è, se non la più longeva, certamente fra le più longeve pubblicazioni periodiche in ambito biomedico del nostro paese, e ha distribuzione internazionale. È quindi un lungo percorso di testimonianza culturale, un impegno che viene di lontano. Il Giornale dell'Accademia, di cui siamo orgogliosi, vuole testimoniare, d'un lato, il progresso scientifico e la ricerca avanzata, con particolare attenzione ai contributi torinesi e piemontesi, e dall'altro, le radici storiche e la continuità dei valori fondanti e tutt'oggi preziosi della comunità accademica. In questo senso, ritengo importante segnalare come il nuovo volume contenga i 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 di successo; anche questo è un segnale che l'Accademia è viva e guarda avanti. Ma ho parlato anche dell'importanza e del significato di guardare indietro, alle nostre radici storico-culturali e, in particolare, alla storia medica piemontese, così ricca e affascinante. 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 appassionato storico 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, continuamente richiesta e di cui abbiamo fatto 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.

E adesso, qualche considerazione sull'iniziativa congiunta con la Fondazione Ferrero di Alba. Una manifestazione dal taglio originale che ha avuto indubbio successo e che ha prodotto un agile volumetto di poco meno di 100 pagine, di cui vedete proiettata la copertina. Una manifestazione bipolare, come s'è detto, con una serie di aggiornamenti di alto livello scientifico presentati in Accademia a Torino, cui è seguita una seconda serie di presentazioni, sugli stessi temi ma con impostazione divulgativa per un ampio pubblico, che si è svolta il giorno successivo nell'Auditorium della Fondazione Ferrero in Alba.

La Fondazione Ferrero ha nella sua recente storia prestigiose realizzazioni culturali. Abbiamo condiviso con lo staff direzionale della Fondazione una semplice gratificante strategia. Scienza e cultura non debbono essere considerate un patrimonio di pochi privilegiati. Debbono essere condivise da un'ampia popolazione, apprezzate come un patrimonio dinamico, aperto alle esigenze di una società in continua evoluzione, interessata a migliorare la propria qualità di vita. Semplici e chiari messaggi informativi e formativi: questo, apparentemente, il motivo di un successo testimoniato dal dibattito in Alba e dalle tante persone che ci hanno cercato per ulteriori informazioni o per problemi personali. Ripeteremo questa esperienza nel prossimo Anno Accademico, e abbiamo già il relativo tema. Parleremo del declino psico-fisico dell'anziano, e di come si possa prevenirlo, e non solo curarlo.

Nella seduta privata del Dicembre scorso, sono stati eletti, insieme al Presidente e Vice Presidente, nuovi Soci Ordinari e un nuovo Socio Corrispondente. È compito e privilegio del Presidente consegnare loro i diplomi che riconoscono l'appartenenza alla nostra comunità, chiamandoli individualmente perché, oltre al diploma ricevano anche le congratulazioni e gli applausi di rito.

I nuovi Soci Ordinari sono:

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.

Il nuovo Socio Corrispondente è il

Prof. Giuseppe Ottavio ARMOCIDA.

Inoltre, in applicazione dello Statuto dell'Accademia, il Consiglio di Presidenza unanime ha nominato nel corso del passato Anno Accademico i seguenti Soci Emeriti:

Prof. Remo MODICA

Prof. Francesco MORINO

Prof. Gian Franco PAGANO.

Il Consiglio di Presidenza unanime ha altresì deliberato la nomina a Soci Onorari della nostra Accademia del

Dott. Amedeo BIANCO, Presidente della Federazione Nazionale degli Ordini dei Medici e degli Odontoiatri, e del

Prof. Pietro ROSSI, già Presidente dell'Accademia delle Scienze di Torino e illustre Maestro di Filosofia della Scienza.

Com'è tradizione, nello scorso Anno Accademico sono stati assegnati i premi di Laurea intitolati alla memoria del Dott. Italo Arneodo e del nostro Socio Prof. Gianpiero Gaidano, in applicazione dei rispettivi bandi pubblicizzati in primavera. Il numero e il livello di eccellenza scientifica delle tesi presentate sono stati tali da aggiungere nell'odierna cerimonia, il riconoscimento della Menzione d'Onore dell'Accademia ad alcune tesi altrettanto meritevoli ma che, per l'ovvia limitazione dei fondi disponibili, non hanno vinto il premio indicato nei bandi. Tutti i giovani neolaureati, chiamati a ricevere premi o menzioni d'onore, saranno invitati a presentare

i risultati delle loro ricerche nelle sedute scientifiche dell'Anno Accademico che oggi inizia.

*Hanno vinto il premio di Laurea intitolato al Dott. Italo Arneodo:
Dott.ssa Sara Monti. Dott. Davide Varenni.*

*Ha vinto il premio di Laurea intitolato a Gianpiero Gaidano:
Dott.ssa Annalisa Mastrapasqua.*

*Hanno meritato la Menzione d'Onore dell'Accademia:
Dott.ssa Alessandra Giai Via, Dott.ssa Silvia Marola,
Dott. Davide Giuseppe Ribaldone, Dott.ssa Marinella Tricarico.*

Desidero, prima di condividere con voi alcune considerazioni personali, ricordare due nostri Soci deceduti per i quali nei mesi scorsi sono state tenute le commemorazioni in aula: Prof. Enrico Madon, commemorato dai Soci Luca Cordero di Montezemolo e Carlo de Sanctis; Prof. Simone Teich-Alasia, commemorato dal Socio Maurizio Stella. Ai familiari rinnovo a nome della nostra comunità i sentimenti di intensa partecipazione al loro lutto.

Ed ecco, adesso, le considerazioni sopra menzionate. Non v'è dubbio che dall'epoca della fondazione ai giorni nostri, l'Accademia abbia onorato la sua missione originaria, valida oggi come allora, di promozione e diffusione della cultura medica e degli incessanti progressi scientifici che hanno caratterizzato i nostri tempi. Si può a buon diritto affermare che la conoscenza medica raggiunta con gli studi degli ultimi 50 anni sopravanza di gran lunga la conoscenza raggiunta con quanto realizzato da tutte le precedenti generazioni.

Ma quando si parla di medicina, il discorso va ampliato al di là delle conoscenze scientifiche e deve coinvolgere una peculiare e nobile componente dell'attività medica. Riguarda, quest'ultima, il rapporto fiduciale medico - paziente, oggi più di ieri in crisi, per molti motivi. Si avverte il disagio di una società sempre più tecnologica, depersonalizzata, spesso frenetica e superficiale, poco attenta ai valori veri e ai sentimenti intensi che sono l'essenza di ciò che definiamo qualità di vita. Nel recupero di quelle valenze culturali ed etiche, che coniugano progresso scientifico e professione medica, l'Accademia di Medicina è chiamata a valorizzare una sua funzione peculiare, di cerniera tra passato e futuro. Il passato è la storia di cui siamo orgogliosi,

testimoniata dalle prestigiose figure dei suoi Soci, scienziati e clinici, e dalle personalità illustri che si sono succedute nella nostra storica Aula Magna, compresi non pochi premi Nobel. Il futuro è, ovviamente, quello delle nuove generazioni alle quali devono giungere messaggi culturali preziosi per le loro scelte professionali, ma è anche, soprattutto, quello della più ampia società civile alla quale, ne siamo convinti, servono, oggi più che mai, esempi di impegno, studio, coerenza etico – comportamentale.

Ma accademia è un termine che potremmo definire astratto. L'Accademia si sostanzia negli Accademici; una coorte di oltre 100 intellettuali, ciascuno con un background scientifico-professionale di alto livello, e un curriculum personale di evidente prestigio. Possiamo allora interrogarci e riflettere su noi stessi: restiamo ancorati ai nostri meriti o abbiamo valori da esportare nella società? Sul ruolo degli intellettuali nel nostro tempo vi è un'enorme letteratura: una intera biblioteca. Sentiremo come ci farà riflettere sulla medicina e la professione medica Ivan Cavicchi. Vi è solo l'imbarazzo della scelta, se si vogliono citare illustri protagonisti del mondo delle scienze e delle arti. Per terminare queste considerazioni e lasciare tempo alla lettura magistrale vorrei rifarmi a un grande protagonista della storia letteraria del Novecento, che fu medico prima che scrittore e che sempre considerò la professione di medico analoga per vari aspetti a quella di scrittore. Michail Bulgakov, l'autore di quello straordinario capolavoro che è "Il Maestro e Margherita", non volle espatriare dalla Russia stalinista, malgrado l'ostracismo ufficiale e i quotidiani pericoli non solo per la sua attività ma per la sua stessa vita¹. La sua vicenda è simile a quella dell'altrettanto grande compositore Dimitrij Šostakovič². Entrambi erano resistenti, con molti rischi personali, all'ottusa burocrazia e all'imperante prevaricazione dell'autorità costituita; entrambi ritenevano che l'impegno intellettuale avesse quale ovvia applicazione pratica scelte di vita al servizio della società, attuale e futura, condensabili in due parole: altruismo e comunicazione. Se hai un patrimonio di sentimenti e di idee, devi farlo conoscere ad altri e fare in modo che lo condividano, o comunque lo discutano, e i modelli di comunicazione possono essere molteplici.

Bulgakov e Šostakovič privilegiarono spesso la loro vena fantastica e corrosiva, con temi grotteschi e buffoneschi di immediata presa, per far

¹ Michail Bulgakov: *Al Governo dell'URSS*, lettera pubblicata in appendice a *Il Maestro e Margherita*, Mondadori, Milano 1991, p. 521.

² Elisabeth Wilson: *Dimitrij Šostakovič – Trascrivere la vita intera – lettere 1923-1975*, Il Saggiatore, Milano 2006.

riflettere sulla chiusura mentale e sulla tragica ipocrisia della dittatura sovietica. Fortunatamente, siamo in tutt'altro tempo, in tutt'altro luogo, in tutt'altra storia. Ma può anche essere un buon modo di iniziare un nuovo Anno Accademico, quello di richiamare l'attenzione su cosa possiamo fare anche noi in termini di altruismo e comunicazione, all'interno della nostra comunità e al di fuori, con umiltà e sagacia, collaborando con altre istituzioni, perseguendo, come amici e come abbiamo fatto, nel Consiglio di Presidenza, un gratificante gioco di squadra.

E vorrei segnalare, come esempio pertinente, un ruolo importante per la nostra Accademia, quello della valutazione critica delle terapie più o meno miracolose, che i mass-media propongono incessantemente all'opinione pubblica sull'onda di una moda che tende a privilegiare tutto ciò che è nuovo e tecnologicamente avanzato, senza peraltro aver stabilito se le novità rappresentano un reale vantaggio per gli ammalati. La comunicazione in ambito biomedico necessita di una sorta di coscienza critica anche per il fatto che i pazienti di oggi non sono quelli di ieri. La società in cui viviamo cambia rapidamente e con essa cambiano le abitudini di vita, e anche la percezione dei progressi scientifici, che dev'essere corretta per essere utile, e non distorta dagli straordinari mezzi di informazione oggi disponibili.

Siamo così giunti ai ringraziamenti finali, che integrano quelli già fatti in precedenza. Sono ringraziamenti non formali, anche perché il supporto ricevuto da istituzioni pubbliche e da privati ha consentito l'attuazione dei programmi istituzionali. Abbiamo tagliato il traguardo di un ulteriore Anno Accademico, dignitosamente. Oltre all'Università di Torino, il ringraziamento va in primo luogo alla Regione Piemonte e alla Divisione Cultura, Turismo e Sport – Settore Biblioteche, Archivi ed Istituti Culturali, alla Fondazione Cassa di Risparmio di Torino, ai Soci Benemeriti così determinanti per la prosecuzione dell'importante progetto di digitalizzazione e immissione in rete dei testi antichi della biblioteca e, per quanto attiene alla Fondazione Cassa di Risparmio di Torino, anche della nostra attività editoriale.

Sul piano personale, debbo esprimere gratitudine tutt'affatto particolare per gli amici del Consiglio di Presidenza per una collaborazione che è risultata una miscela virtuosa di idee, proposte, osservazioni critiche, sempre sorrette dalla partecipazione emotiva alle sorti dell'Accademia. Un grazie analogo, con molto affetto, va alla nostra segretaria Lidia Morea, sempre disponibile, attenta, premurosa ed efficientissima. E non vanno dimenticati Gino Zanchi, mitico custode e prezioso testimone della migliore tradizione dell'Accademia, e il giovane Roberto Ginesci, bibliotecario divenuto esperto

in biblio-informatica e prezioso collaboratore nei relativi progetti. Un grazie, ancora, ai consulenti esterni che anche quest'anno hanno fornito con indiscussa professionalità una preziosa collaborazione in ambito amministrativo e legale. Infine, come nelle sedute inaugurali degli ultimi anni, non può mancare il ringraziamento a mia moglie Annita e alle care amiche "dei fiori" per l'apprezzata decorazione floreale della nostra aula in questa particolare circostanza.

Debbo concludere, e chiedo scusa se inavvertitamente ho tralasciato di ringraziare qualcuno, ma non di certo voi tutti per la presenza odierna, Dichiaro, e ne sono onorato, ufficialmente aperto l'Anno Accademico 2012-2013, centosessantasettesimo della fondazione dell'Accademia di Medicina di Torino, sancita dal Re Carlo Alberto.

Prof. Alberto Angeli

COMMEMORAZIONE DEL SOCIO ENRICO MADON

Il Prof. Enrico Madon era nato a Vicoforte (CN) il 27 settembre 1935.

Iscritto a Medicina e Chirurgia, si dedicò alla Pediatria sin da studente, prima sotto la guida del Professore Guassardo, poi con la Professoressa Sandrucci. Attirato dalla ricerca e dall'insegnamento diventa assistente straordinario nel febbraio 1962 e poi prosegue nella carriera universitaria prima come Professore Aggregato, poi come Professore Associato indi come Professore Ordinario e termina la carriera come Direttore del Dipartimento di Scienze Pediatriche e dell'Adolescenza.

È autore di 216 pubblicazioni censite, più innumerevoli altri lavori.

Questi sono dati che, peraltro, dicono poco riguardo a chi era il Prof. Madon.

Enrico Madon fu un grande medico e fu anche fortunato, perché quando iniziò a lavorare in Clinica Pediatrica, allora situata in via Menabrea, di fronte alle Molinette, vi era un grande fermento e si era creato, nell'attesa dell'apertura del nuovo Regina Margherita (nella sede attuale di Piazza Polonia molto più grande e confortevole) un'atmosfera stimolante. Si trattava di decidere come e quali attività specialistiche pediatriche, intese come attività di ricerca, bisognasse iniziare.

Il Prof. Madon aveva iniziato a lavorare con il Prof. Nigro (suo primo lavoro sulla poliartrite cronica nel 1962) e si era occupato di vari aspetti della pediatria (endocrinologia, ematologia, cardiologia, reumatologia), acquisendo così una solida esperienza come Pediatra. Iniziò nel 1967 ad occuparsi, tra i primi in Italia, di oncologia, pubblicando, tra l'altro, sempre in collaborazione con il Prof. Nigro, uno dei primi lavori sull'uso della Vincristina nelle neoplasie pediatriche (1968) e della L-Asparaginase nella leucemia acuta (1970) con il Prof. Nigro e Piergiorgio Baroncelli.

L'attività di quello che allora si chiamava "Servizio di Oncologia Pediatrica" iniziò nel 1968, al primo piano del nuovo edificio Regina

Margherita, lato corso Polonia, al fondo, con pochi letti e una microscopica sala medica.

I suoi primi collaboratori furono Piergiorgio Baroncelli e Pia Sacerdote, assistenti ospedalieri strutturati, dopodiché giunsero, come specializzandi affidati al Prof. Madon, Pierluigi Roberi nel 1970 ed il sottoscritto nel 1971.

Nello stesso periodo, in Clinica Pediatrica, la Professoressa Ansaldo aveva posto le basi della Gastroenterologia Pediatrica, mentre la Professoressa Gabutti (su stimolo del Prof. Nicola) dava impulso agli studi sulle emoglobinopatie e il Prof. Fabris alla Neonatologia.

“Cresciuto” in questo ambiente il Prof. Madon diventò innanzitutto un grande medico, un medico completo, con competenze approfondite in molteplici campi della Pediatria, che gli consentirono di avvicinarsi all’Oncologia Pediatrica con un approccio innovativo, globale e multidisciplinare.

Madon aveva sviluppato soprattutto una grandissima capacità di ascoltare gli altri, quali che essi fossero, noi giovani collaboratori, ma soprattutto i genitori dei pazienti, cui la comunicazione di una diagnosi, che allora era per lo più infausta, presentava valenze emotive rilevanti.

Enrico fu, come detto, fortunato, perché in Clinica la Prof.ssa Di Cagno aveva iniziato la propria attività nel campo della Neuropsichiatria Infantile e fu sempre sollecita nel rispondere alle richieste di aiuto e consigli. La collaborazione tra l’Oncologia Pediatrica e la Neuropsichiatria Infantile a Torino fu la prima in Italia a partire dal 1972, quando allora in Europa solo J. Bernard a Parigi poteva disporre di un simile servizio.

Nel frattempo anche nel resto dell’Italia aumentava l’interesse della Pediatria per l’Oncologia Pediatrica. Nessuno dei centri italiani attivi agli inizi degli anni ’70 aveva, però, una casistica così ampia da poter competere, in termini di ricerca e risultati, con i grossi centri (Parigi, Memphis, Philadelphia).

Fu ben presto evidente che era necessaria la stesura di protocolli comuni di diagnosi e terapie e il primo protocollo comune italiano per la leucemia acuta, opera di Enrico Madon, Franco Mandelli, Alberto Marmont, Giuseppe Masera e Guido Paolucci è del 1971. Nel 1973, durante il Congresso della Società Italiana di Pediatria a Parma, si costituisce il primo gruppo di Pediatri interessati all’ematologia oncologica pediatrica e tra questi, ovviamente, è presente il Prof. Madon.

Intanto l’Oncologia Pediatrica torinese cresce, viene trasferita al quinto piano, con spazi e strutture adeguate, cresce anche nella considerazione regionale e nazionale, il flusso di pazienti che intraprendono il viaggio della speranza all’estero diminuisce di anno in anno sino ad arrestarsi.

Grazie anche all'opera di Madon cresce l'Oncologia Pediatrica italiana, e nel 1975, il 6 marzo, a Genova viene fondata l'Associazione Italiana di Immunologia e Oncologia pediatrica (AIEIP). Tra i soci fondatori, oltre a Madon, figurano Luisa Massimo, Antonio Cao, Modesto Carli, Bruno De Bernardi, Giuseppe Masera, Roberto Miniero, Guido Paolucci e Luigi ZanESCO.

Nel 1981 diverrà Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica (AIEOP), nome che mantiene tuttora. A partire da quella data uno dei principali obiettivi di largo respiro del Prof. Madon si può dire raggiunto: praticamente tutti i bambini italiani con diagnosi di malattia tumorale ricevono il medesimo trattamento e hanno le stesse probabilità di guarigione (ricordo che nel 1970 poteva considerarsi guarito il 10% dei pazienti, oggi circa l'80%).

Ma Madon è stato anche altre cose: soprattutto un grande intenditore di calcio e grandissimo tifoso della Juventus, che seguiva nelle trasferte più importanti con lunghi viaggi in automobile, l'altra sua grande passione.

Ma è stato anche un grande papà, con una grande e bella famiglia e, come tutti i grandi uomini, ha avuto una grande moglie, Giulia.

Luca Cordero di Montezemolo

COMMEMORAZIONE DEL SOCIO ENRICO MADON

Il Presidente Prof. Angeli, il Consiglio direttivo dell'Accademia di Medicina, conoscendo l'attiva collaborazione che ho sempre avuto con il Prof. Enrico Madon, mi hanno incaricato di ricordarlo, cosa che ho accettato con grande piacere, vista la stima e l'amicizia che ci legava da più di 40 anni di attività clinica-assistenziale presso l'Ospedale Infantile Regina Margherita.

Il Prof. Cordero ha rievocato le affermazioni e le realizzazioni di Enrico Madon come Clinico Pediatra sino alla massima posizione accademica di Prof. Ordinario e di Prof. Emerito di Pediatria; ha rievocato alcuni aspetti della sua vita professionale e dei suoi meriti scientifici.

Ora, brevemente, cercherò di riprendere e dar forza ad un tratto saliente della sua Figura ricordando un periodo vissuto insieme, in cui Enrico è stato il vero artefice, l'autore del cambiamento radicale nell'assistenza pediatrica al Regina Margherita.

Ricordo che negli anni 70 l'idea del Pediatra "tutto fare" non era così completa. In quegli anni la Pediatria assistenziale avveniva in reparti standardizzati per fasce di età: esistevano reparti per neonati, per lattanti, per divezzi ed il Pediatra trattava materie molto diverse e spesso le acquisizioni non erano facili.

Enrico Madon è stato un convinto assertore del fatto che chi ha maturato un'esperienza importante in un determinato settore medico è più organizzato e celere nel rispondere alla domanda di cure e che non si può parlare di efficienza nell'assistenza se non si investe nella specializzazione. Di qui la grande intuizione e l'ambizione di Enrico di creare, indipendentemente dall'età dei pazienti, dei "Centri di specializzazione" in contrapposizione all'unitarietà culturale della Pediatria. È nata così in quegli anni, presso il Regina Margherita, la nuova organizzazione della Pediatria con l'istituzione del "Centro di Oncoematologia Pediatrica" diretta dal Prof. Enrico Madon.

Egli ha sempre operato a difesa della peculiarità specialistica, richiamando l'attenzione degli organi competenti (amministratori, politici) sul problema specialistico ed ha contribuito alla nascita di altri Centri di specializzazione (Pneumologia, Cardiologia, Nefrologia, Endocrinologia, Gastroenterologia, ecc.) presso il Regina Margherita, divenuto pertanto Ospedale di riferimento regionale. Ha sempre cercato di fornire ai piccoli pazienti la migliore assistenza, facendo ricorso a strategie terapeutiche, spesso necessariamente aggressive, che hanno consentito la sopravvivenza in un'alta percentuale di casi comportando, a volte, un pesante onere in termine di complicanze croniche. Proprio per questo Enrico, dal momento della diagnosi e per tutti gli anni di assistenza, si è valso dell'intervento dello Psicologo e di altri Specialisti Pediatri. Mi fa piacere ricordare, come Endocrinologo Pediatra, la nostra attiva e costante collaborazione che ha portato ad un lavoro assistenziale proficuo e apprezzato in Convegni nazionali ed internazionali.

Con il passare degli anni dei suoi pazienti "non più bambini" si è sempre preoccupato anche di affidarli alle cure degli Specialisti dell'adulto nelle migliori condizioni psico-fisiche. Si è occupato, così, personalmente del loro trasferimento con un efficace programma di valutazione comparativa in modo da rivedere gli schemi fino ad allora utilizzati ed adattarli alle nuove esigenze biologiche.

Conoscendolo, posso dire che non è stato solo un formidabile organizzatore, ma ha sempre dimostrato una grande capacità nel creare relazioni interpersonali con i propri Collaboratori – Allievi, nell'istituire legami forti con le Associazioni di pazienti (ricordo la collaborazione con l'UGI), nell'intraprendere iniziative sociali (ricordo l'Istituzione di una Scuola interna al Regina Margherita) con programmi tendenti ad umanizzare l'intervento assistenziale.

Ma Enrico va ricordato anche per l'efficacia della sua comunicazione, per la chiarezza nelle decisioni difficili e non gradevoli, per la capacità di distendere tensioni con il sorriso, per il suo riserbo, la grande umanità e il rigore di far presto con il consenso di tutti.

Cara Signora Giulia e cari figli Francesca, Eugenia, Roberta, Filippo e cari nipoti sono sicuro di interpretare i sentimenti di tutti i Soci dell'Accademia, di cui Enrico si sentiva fortemente far parte ed onorato in qualità di Socio Emerito, affermando che anche in questa Accademia sentiamo e sentiremo la mancanza del caro Enrico.

Carlo de Sanctis

STRESS, RISCHIO CARDIOVASCOLARE E INVECCHIAMENTO

Alberto Angeli

Professore Emerito di Medicina Interna - Università di Torino

Parole chiave: *Stress*
Distress
Asse ipotalamo-ipofisi-surrene
Sistema simpato-adrenergico
Rischio cardiovascolare
Invecchiamento

Key words: *Stress*
Distress
Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis
Sympathetic Nervous System
Cardiovascular Risk
Aging

Conflitto
di interesse: Nessuno

Riassunto

Stress è un termine universalmente usato per definire una reazione stereotipa di risposta a *stressors* potenzialmente lesivi per l'integrità fisica e/o psichica dell'organismo. Mediatori chiave della reazione sono i neuroni ipotalamici che producono il *corticotropin releasing hormone* (CRH) e quelli noradrenergici del *locus coeruleus*, accreditati del ruolo di stazione centrale del sistema simpato-adrenergico. L'attivazione dei neuroni sopracitati aumenta i livelli circolanti di ormoni glicocorticoidi (cortisolo nella specie umana) e l'azione delle catecolamine rilasciate dai terminali simpato-adrenergici. Tutto ciò contrasta l'impatto dello *stressor* sull'equilibrio dell'organismo. Lo stress è fenomeno fisiologico, inevitabile nel corso della vita. Lo stress può risultare benefico (*eustress*) in quanto aumenta nel breve periodo l'efficienza

psico-fisica e allena così l'organismo a superare impreviste difficoltà. Spesso, peraltro, lo stress è percepito come evento negativo (*distress*), in modo specifico quando si mantiene nel tempo non riuscendo ad autolimitarsi con meccanismi di *feed-back*, e si instaura una condizione di stress cronico. Lo stress cronico si accompagna spesso a disturbi del sonno; viene allora meno la capacità di rispondere adeguatamente a nuovi *stressors*. Il *distress* cronico psico-sociale è oggi ritenuto un ulteriore fattore di rischio cardiovascolare e anche di rischio per malattie immuno-mediate. Nell'età avanzata, vi sono evidenze che supportano l'insorgenza di un circolo vizioso, pericoloso per il declino cognitivo e comportamentale, che accentua, d'un lato, l'ipercortisolismo subclinico che è anche prerogativa dello stress cronico e, dall'altro, il deterioramento del sistema limbico. Interventi psico-sociali focalizzati sugli stili di vita possono contrastare efficacemente gli effetti negativi del *distress* nell'invecchiamento.

Abstract

Stress is a universally used term which encompasses a number of responses to "stressors" that threaten the somatic and/or psychic stability of the organism. Key effectors of these responses are the corticotropin releasing hormone (CRH) and locus coeruleus-noradrenaline (LC-NA) autonomic (sympathetic) neurons of the hypothalamus and brain stem, which regulate the peripheral activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and the sympathetic adrenergic system, respectively. The stress responses result in rapid, systemic elevations of glucocorticoid hormones (cortisol in humans) and catecholamine activity at the sympatho-adrenergic terminals; these changes act in concert to counteract the stressors. Stress is a common, unavoidable, physiologic event of life. Stress may be actually beneficial (eustress) since it can sharpen concentration, increase energy and improve performance. Yet stress is often perceived as negative (distress) when it overstays the autoregulatory feed-back mechanisms that limit its duration, and becomes a chronic condition. Chronic stress is often associated with sleep disturbances; under these circumstances the ability to respond properly to subsequent stressors can be impaired. Nowadays, chronic psychosocial stress is regarded as an additional risk factor for the development of cardiovascular and immune-mediated diseases. A vicious circle plausibly occurs while advancing age and declining cognitive abilities; it involves, on the one hand, the subclinical hypercortisolism of both aging and chronic stress, and on the other one, impaired feed-back mechanisms targeting the limbic system. Psychosocial interventions and lifestyle choices may be effective in alleviating the detrimental effects of distress during aging.

Introduzione: complesse vicende in una singola parola

Stress è un termine noto a tutti, internazionale, non tradotto né traducibile in alcuna lingua. Più volte si è detto che è una parola simbolo del XX secolo o, meglio, dei tempi che viviamo. Inizialmente utilizzato in ambito biologico e medico, lo ritroviamo oggi nei più svariati contesti, e si può ben dire che fa parte del linguaggio comune. Addirittura ha generato anche in italiano un nuovo verbo: *stressare*, ormai inflazionato quando si parla di rapporti interpersonali o di impegni di lavoro nella frenetica società in cui siamo inseriti.

Qualche domanda, allora, per consentire un breve inquadramento storico-culturale. Quando venne usato, per la prima volta, il termine *stress*? Siamo negli anni Trenta nel secolo scorso, e *stress* fu proposto da un gigante della storia della medicina, l'ungherese Hans Selye, fuoriuscito dal suo paese e accolto in Canada, per condensare, in una singola parola, una complessa catena di fenomeni che lui aveva osservato sopravvenire in modo stereotipo negli animali di laboratorio sottoposti a manipolazioni fisiche e ambientali pericolose per la loro integrità e addirittura per la loro vita. E in seguito, come si è evoluto il concetto di *stress*? Negli anni successivi alla seconda guerra mondiale, lo *stress* venne sempre meglio identificato con la cosiddetta “*reazione di adattamento*” o “*sindrome di adattamento*”. Lo stesso Selye ne definì le tre fasi fondamentali: *fase di allarme*, il riconoscimento, cioè, di eventi in grado di turbare in modo pericoloso l'equilibrio dell'organismo; *fase di resistenza* (o difesa), nella quale sono messi in atto meccanismi di adattamento e di reazione rapidi ed efficaci; *fase di esaurimento*, la più pericolosa se l'evento stressante si mantiene nel tempo, nella quale vengono progressivamente meno i meccanismi della seconda fase⁽¹⁾. E negli anni più recenti? Gli straordinari progressi delle neuroscienze, dell'endocrinologia, dell'immunologia hanno consentito di comprendere molti meccanismi che danno luogo alle tre fasi “classiche” di Selye e hanno ampliato a dismisura l'area culturale dello *stress*. Oggi abbiamo libri monografici di centinaia di pagine e riviste scientifiche dedicate in esclusiva ai molteplici aspetti dello *stress*. Anzi, degli *stress*, al plurale. Sì, perché è ormai chiaro che vi sono ampie differenze nella risposta agli eventi causali percepiti come potenzialmente dannosi (*stressors*). Tipo di danno attuale o potenziale, modalità temporali e circostanze ambientali, simultaneità o successione di diversi *stressors*, sono tutti elementi da considerare. Altrettante differenze si rilevano da soggetto a soggetto, ed è facile intuire che le variabili sono tante: età, sesso, substrato etnico, storia personale di salute e/o malattia, sensibilità emotiva, stato nutrizionale, farmaci assunti, tanto per citarne alcune.

In breve, lo scenario degli stress è molto ampio e variegato; i loro effetti sullo stato di salute, sulla progressione di malattie quando ve ne sono, sul rischio di malattia, basti citare il rischio cardiovascolare, non sono facilmente prevedibili, potendo variare nel tempo e addirittura risultare di segno opposto.

Lo stress come tale è fenomeno fisiologico, e non patologico. In una visione generale dell'organismo e della sua efficienza vitale, può definirsi una reazione neuroendocrina geneticamente programmata, che causa rapide modificazioni dell'attività metabolica, neurovegetativa, psicocomportamentale per un "salto di qualità" energetico, finalizzato a contrastare efficacemente il pericolo incombente e/o il danno subito. Nel concetto di stress è pertanto implicito quello di offesa/difesa. Non solo, ma anche quello di sistemi di comunicazione e di effettori operativi duttili e articolati, per adeguare la risposta allo specifico *stressor* e per evitare reazioni eccessive, tali da predisporre alla successiva fase di esaurimento.

Questa impostazione concettuale, schematizzabile in due vettori contrapposti, risultanti finali di molteplici fattori complementari, si è rapidamente diffusa in molti settori della fisiopatologia medica e anche della biologia cellulare. Di conseguenza, è stato traslato e stabilmente acquisito il termine stress, a significare il vettore negativo per ogni integrità strutturale o funzionale, il quale, a sua volta, presuppone la messa in atto di antagonismi di difesa. Emblematico, a questo proposito, può definirsi lo stress parietale vascolare, sotteso da meccanismi emodinamici, dismetabolici, infiammatori, e contrastato da un complesso sistema microambientale di protezione della funzione endoteliale.

Altrettanto emblematico è il cosiddetto stress ossidativo, oggi oggetto di molta attenzione per il suo ruolo patogenetico nelle cosiddette malattie croniche degenerative e nei processi di invecchiamento⁽²⁾. Con il procedere dell'età, le molecole intracellulari ossidanti (*reactive oxygen species*, ROS; *reactive nitrogen species*, RNS), prodotte durante il normale metabolismo, si accumulano in quanto non ostacolate a sufficienza dalle difese antiossidanti, e producono un danno continuo a DNA, lipidi e proteine^(2,3). È una teoria dell'invecchiamento molto accreditata, che rientra fra quelle genericamente indicate come "*accumulo del danno*" e che in letteratura ha varie denominazioni: *free radical theory*, *oxidative stress theory*, *mitochondrial theory*. In effetti, i mitocondri sono la sorgente più importante di ROS nelle cellule eucariotiche, derivando queste molecole dal rilascio di elettroni nella catena respiratoria. Vi sono evidenze che la produzione mitocondriale di ROS aumenti con l'età, e in parallelo aumentino le alterazioni ossidative del DNA e delle proteine mitocondriali. In altri termini, i mitocondri sarebbero

sorgente e al tempo stesso bersaglio privilegiato dell'accumulo di ROS nell'invecchiamento. Ciò spiegherebbe anche il fatto che organi ad alto consumo di ossigeno e caratterizzati da alta attività mitocondriale, come cervello, cuore e reni, siano facilmente deteriorabili nell'età avanzata^(4,5).

Di particolare interesse e apparentemente paradossale (ma non tanto) è quanto va emergendo dalle più recenti acquisizioni della ricerca biomedica, e cioè il plausibile collegamento causale fra la reazione generale di stress, che coinvolge l'organismo (tanto per intenderci, lo stress di Selye) e lo stress ossidativo cellulare, che coinvolge le molecole intracellulari critiche per l'applicazione del codice genetico (DNA e proteine trascritte). Nel collegamento in questione, ha un ruolo essenziale il cortisolo, che nella specie umana è il principale ormone glicocorticoide, prodotto e immesso in circolo dalle ghiandole surrenali. In cellule afferenti a diversi tessuti, aumenta la produzione di ROS se il mezzo di coltura viene addizionato di steroidi con attività glicocorticoide, e non è senza significato che recettori specifici (*glucocorticoid receptors*, GR) siano presenti e attivi non solo in sede nucleare, ma anche nei mitocondri⁽⁶⁾.

Va anche sottolineato il fatto che nei roditori di laboratorio (animali a riposo diurno e attività notturna) il corrispettivo glicocorticoide del cortisolo è il corticosterone. Pur condividendo lo stesso significato fisiologico, le due molecole non sono sovrapponibili e sono tutt'altro che trascurabili le differenze di specie nella risposta delle cellule bersaglio. Per questo, i risultati che provengono da molte ricerche sui più diffusi modelli animali vanno presi con le molle se si vogliono estrapolare alla specie umana. Detto ciò, sappiamo oggi che sul palcoscenico della generale reazione di adattamento e difesa, si muovono molti attori. Non è sempre facile dire quali siano i protagonisti e quali i comprimari, anche perché i ruoli si possono scambiare in una sorta di copione mutevole e variabile, in funzione dell'intervento di diversi *stressors*, della loro durata, della sensibilità individuale, di interventi farmacologici. Ma non v'è dubbio che moltissime evidenze valorizzino tre principali categorie di attori: neuropeptidi e ormoni afferenti al cosiddetto asse ipotalamo-ipofisi-surrene (*hypothalamic-pituitary-adrenal*, HPA), neuropeptidi e catecolamine del sistema simpato-adrenergico, e citochine attive sia sulle reazioni infiammatorie e immunitarie sia su molte funzioni nervose ed endocrine.

Dalla fisiologia alla patologia

Già Selye aveva intuito il ruolo fondamentale degli ormoni prodotti dalla corteccia surrenalica⁽¹⁾. Le intuizioni di settant'anni orsono sono

state confermate appieno. Il cortisolo è l'*output* di un sofisticato sistema neuroendocrino di trasduzione-amplificazione di segnali che vanno dal cervello ai tessuti periferici, e che è appunto l'asse HPA. L'*input* del sistema è rappresentato da afferenze nervose che provengono da varie aree encefaliche e da segnali immunologici (citochine), che raggiungono specifici neuroni ipotalamici. L'ipotalamo è la regione cerebrale maggiormente coinvolta nello stress. I nuclei paraventricolari (*paraventricular nuclei*, PVN) producono e liberano nel sangue del circolo portale ipotalamo-ipofisario *corticotropin releasing hormone* (CRH) e vasopressina (*arginin-vasopressin*, AVP), due peptidi essenziali per aumentare il rilascio di ACTH dall'ipofisi e, conseguentemente, la produzione di cortisolo da parte dei surreni. I PVN sono anche strettamente collegati con le stazioni "centrali" del sistema simpato-adrenergico, in primo luogo il *locus coeruleus* ove sono posizionati i terminali di fibre CRH-ergiche. IL CRH, quindi, è in grado di attivare sia il braccio endocrino della reazione di stress (aumentata attività dell'asse HPA), sia il braccio neurovegetativo (aumentata attività del sistema simpato-adrenergico). Siamo di fronte a una molecola-chiave, attiva su molti fronti. A livello dell'ipofisi, oltre che diretto *releasing hormone*, può determinare il cosiddetto *set-point* delle cellule ACTH-secernenti, condizionando la risposta ad altri fattori di stimolo, primo fra tutti l'AVP. Ma vi è tutta una serie di altre azioni. Il CRH può inibire l'attività di neuroni secernenti altri *releasing hormones*, ad esempio il *gonadotrophin releasing hormone* (GnRH); risultano ridotte, ovviamente, la produzione di gonadotropine e quella di ormoni sessuali. Ha complessi effetti comportamentali, secondari all'impatto sul senso di fame e all'accentuazione della reattività egocentrica. Nel complesso, i risultati di molti studi sperimentali indicano che l'aumento critico del CRH ipotalamico che si verifica in seguito al riconoscimento di uno stress "acuto", attiva e coordina simultaneamente funzioni endocrine, psico-comportamentali, neurovegetative, finalizzate all'*arousal* adattativo dell'organismo ma anche intrinsecamente rischiose per l'equilibrio psico-fisico e la personale cenestesi^(7,8,9).

A questo punto, già possono anticiparsi un concetto e un messaggio, tanto essenziali quanto intuitivi, utili per il comportamento pratico di quanti – medici, psicologi, sociologi e altri – hanno quotidianamente a che fare con individui che, a ragione o torto, si dicono vittime dello stress. Si riprenderà più volte il discorso, ma si tratta di questo: se gli stress si succedono in una sequenza ravvicinata e prolungata, se, cioè, dallo stress acuto si passa allo stress cronico, allora i benefici a breve termine della risposta adattativa possono venire man mano oscurati dai rischi "collaterali", emergenti a medio-lungo termine sino a divenire clinicamente palesi.

Ritornando al CRH, va ricordato come sia reperibile non solo nell'ipotalamo, ma anche in altre aree cerebrali. È tuttoggi incerto il contributo del CRH extra-ipotalamico alle reazioni di stress. L'importanza di questo neuropeptide è comunque ribadita dalla messa in atto di un complesso sistema di controllo della sua produzione. I più noti meccanismi regolatori sono negativi, e realizzano un evidente autocontrollo dell'asse HPA, che esige, come s'è accennato prima, attivazioni "fasiche" (limitate nel tempo), e non tollera, per contro, attivazioni "toniche" (prolungate nel tempo). I meccanismi autoregolatori sono definiti di *feed-back*. Sono stati descritti ben tre *feed-back* inibitori della produzione di CRH : quello del cortisolo (*feed-back* lungo), quello dell'ACTH (*feed-back* corto), e quello dello stesso CRH (*feed-back* ultracorto). La produzione di CRH ipotalamico è inoltre inserita in una intricatissima rete neurochimica che comporta effetti sia di segno positivo, sia di segno negativo, da parte di neurotrasmettitori, ormoni estranei all'asse HPA, mediatori vasoattivi, citochine^(7,10).

Le più note citochine attive sulla produzione di CRH, ma anche sulla funzione delle altre stazioni endocrine dell'asse (ipofisi e surreni), sono IL-1, IL-2, IL-6, *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), e *interferon- γ* (IFN- γ). Possono essere liberate in circolo al seguito di stimolazione del sistema immune, ad opera dei più svariati agenti. Non solo, il loro aumento in circolo può conseguire a un danno tissutale, qualsivoglia sia il fattore lesivo, processo infiammatorio oppure evento traumatico oppure ancora operazione chirurgica. Anche in caso di intensa attività fisica si realizza una sorta di flogosi muscolare, con liberazione nel microambiente ma anche nel circolo sistemico di citochine. Le citochine circolanti possono diffondere nell'ipotalamo tramite particolari aree circumventricolari (quali l'*organum vasculosum della lamina terminalis*, OVLT) e l'eminenza mediana, laddove è assente la barriera emato-encefalica. Ma citochine sono anche prodotte all'interno del cervello. IL-1, IL-2 e IL-6 sono sintetizzate da cellule della glia; terminali nervosi che potremmo definire IL-ergici sono numerosi nell'ipotalamo e in particolare nei PVN⁽¹¹⁾.

Un aspetto importante della fisiopatologia dello stress riguarda i rapporti tra asse HPA e sistema simpato-adrenergico. Si è già detto dell'attivazione del *locus coeruleus* encefalico, inteso come stazione centrale del sistema, da parte del CRH liberato localmente da terminali nervosi provenienti dai PVN. Ma si va ben oltre. Da tempo è noto come l'espressione genica dell'enzima feniletanolamina-N-metiltransferasi (PNMT), che catalizza l'ultima tappa della sintesi di adrenalina, sia indotta dal cortisolo che raggiunge la midollare surrenalica tramite il circolo portale cortico-midollare. È altrettanto noto che i glicocorticoidi potenziano l'attività simpato-adrenergica inibendo l'attività

della catecol-O-metiltransferasi (COMT), enzima chiave del catabolismo delle catecolamine, e favorendo l'interazione fra catecolamine e relativi recettori. Regolano direttamente la trascrizione dei geni che codificano per questi recettori. In ragione di una articolata modulazione recettoriale adrenergica, ma non solo (anche di altre molecole vasoattive, come ad esempio l'angiotensina II), i glicocorticoidi sono considerati un fattore tutt'altro che trascurabile per la progressione di condizioni cliniche "ipertrofizzanti" la muscolatura miocardica^(12,13).

Gli effetti di potenziamento dell'attività adrenergica valgono in parallelo anche per il neuropeptide Y (NPY), una molecola attiva sul comportamento alimentare e sulla reattività cardiovascolare. L'NPY può essere liberato da terminali nervosi specifici. Ma in molte sedi encefaliche e nelle pareti vascolari è liberato insieme alla noradrenalina da terminali adrenergici. Non stupisce, quindi, che gli ormoni glicocorticoidi, il cortisolo in primo luogo, aumentino l'espressione genica di NPY, che è un peptide vasocostrittore, favorente la differenziazione e la proliferazione delle cellule muscolari lisce nelle pareti arteriolarie^(14,15).

Quali le conseguenze, se consideriamo lo stress con l'attenzione del clinico? È logico pensare che ipertensione arteriosa, ipertrofia miocardica, ipertono arteriolare siano di casa nelle condizioni di stress prolungato, allorché sia la produzione di cortisolo sia la liberazione di effettori vasoattivi da parte dei terminali simpato-adrenergici siano tonicamente (e consensualmente) posizionate "ai piani alti" (concetto di *up-resetting* o *up-tuning*). Ne deriva che lo stress cronico dev'essere considerato significativo fattore di rischio cardiovascolare in quanto in grado di condizionare negativamente, soprattutto nell'età avanzata, la progressione della malattia aterosclerotica⁽¹⁶⁾.

Ancora un passo avanti nell'approccio culturale allo stress quale rischio (o causa) di patologia. Si è detto: la reazione indotta da uno *stressor* (imprevisto o atteso; fisico-lesivo o psichico-emozionale) è fisiologica e positiva per le performances dell'organismo. Ma non deve proseguire o mantenersi nel tempo (Selye paventava la fase di esaurimento), ma deve autolimitarsi, e per fare ciò vi sono servomeccanismi adeguati. Aggiungiamo: è bene che sopravvenga in un determinato arco temporale. Nella specie umana, geneticamente programmata per l'attività diurna e il riposo notturno, le complesse interazioni neuroendocrine dello stress "riescono" assai meglio di giorno che di notte. È importante che anche loro rispettino l'organizzazione circadiana o, meglio, il programma cronobiologico dell'organismo che, guarda caso, riconosce proprio nel cortisolo un fondamentale "sincronizzatore" endogeno dell'attività

ritmica cellulare, a sua volta componente essenziale dell'equilibrio metabolico e delle capacità adattative (*coping*) con l'ambiente di vita⁽¹⁷⁾.

Una ben calibrata attivazione consensuale dell'asse HPA e del sistema simpato-adrenergico si verifica fisiologicamente tutti i giorni nelle ore mattinali-diurne. Nelle specie animali ad attività notturna, lo stesso fenomeno si palesa sfasato di circa 12 ore, e cioè nelle ore serali-notturne. Il fatto che sia la produzione surrenalica di cortisolo, sia la liberazione di catecolamine e NPY a livello vascolare, abbiano un caratteristico ritmo circadiano, che ha il suo massimo (zenith) dopo il risveglio e il suo minimo (nadir) nella prima parte del sonno, è clinicamente rilevante. Ben lo sanno i cardiologi e i clinici dell'ipertensione, che suggeriscono spesso la rilevazione continua nelle 24 ore di pressione arteriosa e frequenza cardiaca (cosiddetto *Holter* pressorio) e valorizzano per la gestione pratica dei loro pazienti le alterazioni del crono-programma circadiano^(17,18).

L'interpretazione più accreditata di questa organizzazione ritmica è che serva a preparare "al meglio" l'organismo per le ore di veglia e attività dopo il sonno notturno. Si può allora affermare che siamo geneticamente programmati a un quotidiano, inconscio stress endogeno, che non prevede *stressors* esterni ed è finalizzato ad accrescere le potenzialità operative dell'organismo ed ad aumentarne l'efficienza comportamentale nelle ore di attività, che sono anche quelle di ricerca/introduzione del cibo. Lo stress è dentro di noi, anzi nel nostro DNA, e ogni giorno ci alleniamo ad affrontare emergenze potenzialmente o attualmente lesive ponendo in atto risposte neuroendocrine di tipo fasico, con andamento a forma d'onda. Per contro, si allontanano dalla fisiologia le risposte di tipo tonico, con andamento a *plateau*, indipendentemente dal livello di quest'ultimo. Nella fisiopatologia dello stress, la dinamica temporale della reazione conta assai più dell'intensità dello stimolo e del picco di attivazione raggiunto. È più importante spegnere che tenere acceso il fuoco^(17,19,20).

Molte recenti evidenze supportano con autorevolezza il concetto che siano attivati circuiti neurochimici diversi in funzione non solo del tipo di *stressor*, ma anche della persistenza e/o della ripetitività dello stimolo. Ancora, il microambiente "recettivo" all'interno del cervello è diverso di giorno e di notte, soprattutto per quanto attiene al sistema limbico, coinvolto in prima linea nelle reazioni che comportano paura, rabbia, emozioni, frustrazione personale. Un aspetto importante riguarda la riverberazione ad altre aree encefaliche di quanto avviene nell'ipotalamo, regione critica considerata una sorta di cabina di regia che invia segnali alla periferia somatica e contestualmente informa il cervello intorno a sé. Si pensi, tanto per fare un esempio, alla produzione di CRH. Nello stress, l'informazione in questione

non è pre-confezionata ma duttile, in funzione delle tante variabili della reazione. Impatta sul funzionamento di reti neuronali coinvolte nei processi di memoria, attenzione, scelte comportamentali (incluse quelle inserite nei generici termini di *eating, drinking, gambling*), e soprattutto nel sonno e nella sua programmata sequenza di fasi^(21,22).

È anche intuitivo che gli stress che sopravvivono nella tarda serata e nella notte, cioè nell'arco temporale lontano dalla fisiologica attivazione circadiana, debbano “far suonare la sveglia” in ore anomale (*odd hours*) a meccanismi in quiescenza e/o ricarica per la successiva giornata. L'interferenza con il normale programma cronobiologico è evidente, e non stupisce che gli effetti negativi, somatici e psichici, siano di maggiore rilievo. L'organizzazione del tempo lavorativo e di quello libero nella società contemporanea ha aumentato molto le possibilità di stress notturni. Ovviamente, quanto più sono reiterati tanto più sono pericolosi; quanto più improvvisi, tanto più impegnativi; quanto più compositi (diversi *stressors* insieme), tanto più a rischio della fase di esaurimento descritta da Selye, cioè del venir meno di “riserve” capaci di far fronte a nuovi eventi lesivi. Il ventaglio delle possibilità è amplissimo. Si va dal lavoro a turni notturni alle “notti brave” degli adolescenti, dall'insonnia episodica prima di un esame a quella abituale di chi soffre di depressione e ansia. Le conseguenze sul piano individuale (sensibilità diversa da soggetto a soggetto!), quali possono palesarsi nella patogenesi di malattie croniche, autoimmuni, psichiche, degenerative in senso lato, sono oggetto di molta attenzione anche se non disponiamo ancora di evidenze asseverate, che supportino l'esperienza osservazionale^(17,23). Negli anni '2000, peraltro, la ricerca clinica ha evidenziato un gruppo composito di sindromi, nosograficamente inquadrato con il termine di malattie correlate a stress (*stress-related disorders*). Non è questa la sede per descriverle. Comprendono il più noto *post-traumatic stress disorder*, la sindrome da fatica cronica, le manifestazioni psico-fisiche dei veterani di guerra, la sindrome di *overtraining* negli atleti competitivi^(24,25). Ciò che va sottolineato è come in tutti questi stati patologici lo stress abbia evidenze di cronicità e di “stato”, anche se fa riferimento a un evento particolare dal quale “non ci si può liberare”: un'azione di guerra, una violenza sessuale, un trauma.

Eustress e Distress

Sono tutt'oggi di moda i termini *eustress* e *distress*. Il primo si richiama a ben note situazioni (ad es., l'affermazione in una gara combattuta; l'arrivo in vetta dopo un'arrampicata difficile; il superamento di un esame temuto,

e così via), per esprimere il concetto che la reazione adattativa in certi casi può risolversi in un gratificante senso di successo. Seguendo questo concetto, “vincere” uno stress servirebbe a migliorare le performances psico-fisiche e sarebbe utile allenamento, in grado di aumentare flessibilità e prontezza d’intervento nelle successive reazioni. Per contro il *distress*, percepito come fallimento o inadeguatezza delle proprie difese di fronte all’evento stressante, porterebbe non solo alla progressiva perdita delle capacità adattative (fase di esaurimento più volte citata), ma anche all’emergenza di un senso di frustrazione, sino all’intrappolamento in un circolo vizioso, alla depressione, alla frase che spesso si sente, quella “di non farcela più”^(7,26).

I termini *eustress* e *distress*, quindi, vogliono privilegiare il vissuto individuale, il gradiente di efficienza, positivo o negativo, che il soggetto percepisce al termine della reazione. L’attenzione per gli aspetti psicodinamici dello stress viene di lontano. Già Thomas Holmes nel 1956 aveva tracciato il profilo psicologico di chi più facilmente poteva sviluppare la malattia tubercolare nel contesto di una popolazione con pre-determinato grado di esposizione al micobatterio infettante. Soggetti che subivano passivamente, ripiegandosi su se stessi, la rapida evoluzione della società americana di quegli anni (siamo in condizioni di *distress*) non solo si ammalavano più facilmente, ma erano più resistenti alla terapia. I soggetti che affrontavano le difficoltà con spirito più combattivo e assumevano iniziative per l’affermazione personale (sensazioni di successo, condizioni di *eustress*) si ammalavano meno e mostravano un *outcome* più favorevole⁽²⁷⁾. Se rivediamo i dati di Holmes alla luce delle attuali conoscenze, dobbiamo recuperare evidenze che lo stress, allorché si caratterizza per una attivazione neuroendocrina autolimitantesi, ha effetti positivi sull’immunità tissutale, cellulo-mediata, mentre lo stato di stress cronico ha effetti negativi. Naturalmente, una dicotomia siffatta non può corrispondere alla complessità della risposta immune a un agente patogeno quale il micobatterio tubercolare. Le variabili individuali sono tali e tante da impedire qualsiasi generalizzazione. Non vi è dubbio, comunque sia, che negli ultimi anni si sia affermata la tesi che l’immunodepressione da stress sia prerogativa del mantenimento nel tempo, e non già dei livelli raggiunti, di segnali neuroendocrini negativi per l’integrità funzionale di effettori immuni. I segnali in questione sono soprattutto cortisolo e catecolamine. D’altro canto, non mancano dati a supporto di immunomodulazione positiva e attività antinfiammatoria di peptidi ipotalamici e/o ipofisari rilasciati acutamente in corso di stress^(28,29).

In sostanza, nel composito quadro delle reazioni immuni, gli effetti dello stress non sono monocromatici ma variegati. Ciò non stupisce, data

l'eterogeneità dei fenomeni racchiusi nella singola inflazionata parola. Possono quindi risultare positivi o negativi a seconda della prevalenza dei segnali ma anche del particolare microambiente in cui operano. A complicare ancora più le cose e a rendere molto ardua ogni estrapolazione clinica di studi di biologia cellulare e molecolare, va ricordato come CRH, ACTH e altri rilevanti peptidi derivati dal comune megaprecursore dell'ACTH, la pro-opiomelanocortina (POMC), possano essere prodotti dalle stesse cellule immuni, e svolgere localmente azioni paracrine e autocrine, che sfuggono a una valutazione generale^(30,31). Del resto, per lo stesso mediatore per eccellenza dello stress, il cortisolo, i livelli circolanti sono poco informativi dell'azione ormonale a livello delle cellule bersaglio, riconoscendo quest'azione tutta una serie di meccanismi amplificatori pre-recettoriali e recettoriali, soprattutto in sede di infiammazione.

Se si focalizza l'attenzione sul rischio cardiovascolare, le cose non cambiano. Stress cronico e *distress* sono termini ricorrenti nella letteratura dedicata, che negli ultimi anni ha privilegiato non poco, sottolineando il valore della valutazione individuale del rischio (caso per caso, e non categorie predefinite), due aspetti dello stress cronico: il disagio psico-sociale e i disturbi del sonno^(16,18,32). È acquisito, fra l'altro, che la malattia aterosclerotica e la sua progressione pro-trombotica hanno un'importante componente infiammatoria; nelle pareti vascolari ricche di terminali adrenergici sono attive cellule immunitarie disfunzionali, come linfociti e macrofagi ricchi di recettori per i glicocorticoidi. Il discorso sulle conseguenze vascolari del *distress* si ricollega quindi a quanto detto in precedenza sulle componenti immunologiche. Sino a una decina di anni fa, l'opinione più accreditata, peraltro largamente basata sui risultati ottenuti *in vitro* o in modelli animali, era che gli "ormoni dello stress" (*in primis*, cortisolo e catecolamine) alterassero l'equilibrio funzionale delle due sottoclassi di linfociti T helper (Th1 e Th2), e la relativa produzione di citochine⁽²⁸⁾. Oggi prevale l'opinione che nello stress cronico, la popolazione immune mediatrice di effetti deleteri nel microambiente della parete vascolare sia soprattutto quella della terza sottoclasse linfocitaria T helper, i cosiddetti Th regolatori o Th17. I linfociti Th17 producono innanzitutto interleukina-17, ma anche interleukina-21 e interleukina-22, tutte sostanze proinfiammatorie, implicate nella patogenesi di malattie autoimmuni⁽³⁰⁾. Questi linfociti si differenziano e si attivano dialogando con cellule di derivazione emopoietica, ricche di β_2 -recettori adrenergici oltre che di recettori per i glicocorticoidi, quali monociti-macrofagi e, soprattutto, cellule dendritiche^(28,33,34).

Ritornando al danno cardiovascolare e al concetto di rischio "globale", che valuta il prodotto complessivo di più fattori di rischio concomitanti, si

ritiene che il vissuto negativo di una condizione di stress cronico giochi un ruolo significativo, ma di minor peso, rispetto ad altri consolidati fattori. Che faccia “la spalla” come si dice in gergo teatrale. Che sia permissivo, additivo o potenziatore, come si dice in gergo scientifico, in funzione della sensibilità individuale (e quindi del substrato genetico) e del livello, sopra quello di guardia, raggiunto dagli altri fattori. La consapevolezza che *distress* sostenuto da disagio psico-sociale possa amplificare, insieme ai correlati disturbi del sonno, l’azione di altri fattori di rischio cardiovascolare ha contribuito a valorizzare scelte individuali che coniugassero stili di vita e qualità di vita. E si comprende l’inserimento nella letteratura scientifica della cosiddetta cardiologia comportamentale (*behavioural cardiology*) non a caso ritenuta un’area culturale e applicativa clinica “di difesa”, nei confronti di una società sempre più tecnologica e inaridita, che facilita, soprattutto nelle fasce deboli della popolazione e negli anziani, quei sentimenti di malessere, disillusione, frustrazione compendiate nel termine *distress*⁽³⁵⁾.

Stress e invecchiamento

Può dirsi un punto fermo della fisiopatologia endocrina, da tempo acquisito, l’ipertrofia/iperplasia della corteccia surrenalica, che si verifica dopo esposizione prolungata all’ormone ipofisario di stimolo specifico, l’ACTH. E lo stesso Selye aveva descritto l’aumento di peso delle ghiandole surrenali negli animali sottoposti a stress ripetuti. Queste modificazioni anatomiche corrispondono a un riaggiustamento zonale della corteccia, che privilegia in modo vistoso la zona fascicolata, dove si produce il cortisolo, a scapito della zona reticolare, dove si producono gli steroidi androgeni, in primo luogo il deidroepiandrosterone (DHEA). Nello stress cronico, l’*up-resetting* funzionale dell’asse HPA causa, com’è logico attendersi, lo stesso riaggiustamento esponendo l’organismo a una “forbice” endocrina: cortisolo alto e DHEA basso. È quanto anche si verifica in un ventaglio di condizioni cliniche che hanno quale comune denominatore il cosiddetto ipercortisolismo subclinico⁽³²⁾. L’attributo sta a significare l’assenza di sintomi e segni appariscenti dell’eccesso di glicocorticoidi, e insieme le difficoltà di diagnosticare un’alterazione ormonale di confine, e di prevederne/impedirne lo sconfinamento in terreno patologico vero e proprio.

Da quasi mezzo secolo, e con più convincenti evidenze negli ultimi vent’anni, si è affermato il concetto che l’invecchiamento, soprattutto se il progredire dell’età si caratterizza per deterioramento psico-cognitivo e comportamentale, sino alla demenza, si accompagna a ipercortisolismo

subclinico^(38,39). Nell'età avanzata possono rilevarsi e sommarsi sia una aumentata attività dell'asse HPA sia una aumentata sensibilità delle cellule bersaglio all'azione glicocorticoide. Nell'anziano, l'aumento della cortisolemia (è comunque infida la relazione con gli effetti ormonali!) può riconoscere cause diverse dall'immissione in circolo da parte delle ghiandole surrenali. Vi possono essere: riduzione del generale volume di distribuzione; riduzione dei processi catabolici della molecola steroidea; aspetti nutrizionali e interferenze farmacologiche che modificano le complesse interazioni fra quota libera, biologicamente attiva, e quota veicolata dalle proteine circolanti. Ma nella grande maggioranza dei casi è il programma secretorio a spostarsi verso l'alto⁽⁴⁰⁾.

Si inserisce a questo punto il discorso sullo stress cronico quale fattore di rischio di distress psico-comportamentale e di malattie croniche degenerative, ad esempio vascolari e immuno-mediate. Non è senza significato che gli aumenti consensuali dell'attività glicocorticoide e simpato-adrenergica, conseguenza raramente disattesa della produzione tonica di CRH ipotalamico, siano autorevolmente valorizzati nella patogenesi dei danni causati dalla progressione senile della malattia aterosclerotica, dall'osteoporosi e dalla cosiddetta immunosenescenza. Prerogativa dell'età avanzata è un gioco al rimbalzo surreni-cervello, una sorta di circuito di autoamplificazione che vede intensificarsi sempre più la risposta dell'asse HPA a qualsiasi tipo di stimolo, e che non può ricondursi semplicemente all'incremento della zona fascicolata surrenalica. Sono i meccanismi di autocontrollo che perdono efficienza, in particolare il *feed-back* più importante, quello del cortisolo, che limita intensità e soprattutto durata dell'onda di attivazione circadiana nelle ore mattinali^(39,41). Banalizzando, se viene meno il freno, allora la macchina ipotalamo-ipofisaria lavora di più. Ma come sempre in biologia e medicina, le cose sono assai più complesse di quanto inizialmente si era pensato che fossero.

Senza addentrarci nei meccanismi neuroendocrini e molecolari, basti in sintesi dire che il *feed-back* glicocorticoide agisce in modo differenziato (promuovendo o inibendo l'espressione genica di specifici segnali) su diverse strutture encefaliche. Sono anche stati individuati due tipi di *feed-back*, interconnessi e interdipendenti, definiti rispettivamente, rapido (*fast feed-back*) e lento (*delayed feed-back*). La minor efficacia del primo si ripercuote sulla minor efficienza del secondo, mentre l'inverso è meno chiaro. Le strutture bersaglio sono: l'ipofisi anteriore, dove risiedono le cellule che producono ACTH; l'ipotalamo, con i nuclei paraventricolari che ospitano i neuroni CRH- e AVP- secernenti ma anche con altri nuclei come quelli

soprachiasmatici, una sorta di metronomo (*master clock*) dell'organizzazione circadiana legata al ciclo luce/buio e alla funzione dell'epifisi (melatonina!); stazioni del sistema limbico, come amigdala e ippocampo^(42,43). Queste ultime sono molto importanti, anche per i collegamenti, d'un lato, con aree corticali implicate nei processi di apprendimento, memoria, socializzazione e, dall'altro, con aree mesencefaliche implicate nell'induzione e organizzazione del sonno. Le riverberazioni di un alterato *feed-back* glicocorticoide possono quindi ampliarsi molto al di fuori dell'asse HPA, e coinvolgere reazioni emotivo-comportamentali, attività intellettive e l'alternanza sonno-veglia. Nell'età avanzata, si iscrivono in un contesto di deterioramento vascolare, danno ossidativo, riduzione di popolazione neuronale, desincronizzazione di attività ritmiche, minor controllo dell'equilibrio statico e motorio. Supportano un'altra emergente teoria dell'invecchiamento, inserita fra quelle genericamente indicate come "*programma genetico*" e in letteratura riportata come *neuroendocrine theory, chronobiological theory*⁽⁴⁴⁾.

Ritornando al sistema limbico, notoriamente chiamato in causa nelle reazioni emotivo-affettive e nei comportamenti indotti dal *distress* (irritazione, aggressività o, invece, passività, autoisolamento), molti studi sperimentali hanno documentato una particolare suscettibilità ad effetti neurotossici dei glicocorticoidi proprio nei neuroni bersaglio dell'ippocampo e dell'amigdala. Una tesi sempre più accreditata è che queste strutture nell'invecchiamento si riducano di volume e perdano la capacità funzionale di inviare segnali di freno alla centrale ipotalamica (nuclei paraventricolari). Di conseguenza, si sposta in alto (*up-resetting*) l'attività dell'asse HPA e, soprattutto, non si attiva più lo spegnimento dell'onda di attivazione circadiana. La deriva verso una condizione di ipercortisolismo subclinico, con l'attività ormonale aumentata in ore critiche (le *odd hours* serali-notturne), a sua volta reca con sé il pericolo di ulteriore danno neurotossico, chiudendo un circolo vizioso che accelera il deterioramento generale dell'organismo, somatico e psichico. E lo stress? Quello cronico, beninteso, quello del *distress* e della reazione neuroendocrina tonica, che non riesce più ad autolimitarsi, corre sugli stessi binari. Se il ragionamento fila, non può quindi che rientrare a pieno titolo fra i fattori che favoriscono quel circolo vizioso.

Considerazioni conclusive

In un articolo pubblicato alle soglie del nuovo millennio, uno studioso carismatico della neuroendocrinologia, come Bruce S. McEwen scriveva, a proposito delle relazioni fra aumentata attività glicocorticoide e

deterioramento psichico nell'età avanzata, che si trattava di tipica *chicken-and-egg question*⁽⁴⁵⁾. Sosteneva anche, da ricercatore di base, la sostanziale somiglianza fra ippocampo di ratto e ippocampo umano, trattandosi di struttura paleo-encefalica, almeno nella scala evolutiva dei mammiferi. Sappiamo che non è così, e che il vissuto di stress a forte impatto emotivo, con le sequele di frustrazione, depressione e rilevanti disturbi somatici, quali si verificano negli *stress related disorders*, impatta sul sistema limbico umano in modo tutt'affatto particolare.

Ma a distanza di parecchi anni da quell'articolo, restano valide alcune considerazioni. La prima è che non valga la spesa sapere se è venuto prima l'uovo o la gallina. La seconda riguarda la sensibilità individuale ai meccanismi di neurotossicità e alla disorganizzazione ritmica. A ragione, la teoria neuroendocrina dell'invecchiamento si posiziona fra quelle raggruppate come "programma genetico". Una buona "finestra" clinica per avere informazioni sul deterioramento dei servo-meccanismi che attuano la sincronizzazione cronobiologica è la perdita di qualità del sonno notturno, fenomeno avvertito in modo molto variabile da soggetto a soggetto. L'ultima considerazione, già prospettata da Bruce S. McEwen è, a parere di chi scrive, la più importante sul piano pratico. Poiché il sistema limbico, bersaglio del cortisolo e a sua volta controllore dell'asse HPA, è implicato nei processi cognitivo-mnemonici e di socializzazione non meno che in quelli emozionali, una vita attiva intellettualmente e ricca di progetti/iniziative mantiene più a lungo la sua integrità e la plasticità reattiva agli *stressors*. Nel fronteggiare l'insidia subdola e temibile della cronicità (la "cappa di piombo" del *distress*) queste scelte di vita contrastano meglio di tanti farmaci ogni pessimistico declino. Nulla di nuovo, ma chiaramente una sfida positiva per chi non ha paura dell'avanzare dell'età.

BIBLIOGRAFIA

1. Selye H. *The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation*. J Clin Endocrinol. 1946; 6: 117-123.
2. Comporti M. *Radicali liberi. Patologia da stress ossidativo e antiossidanti*. Società Editrice Universo, 2011, Roma.
3. Sohal RS. *Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process*. Free Radic Biol Med. 2002; 33: 37-44.
4. Vendelbo MH, Nair KS. *Mitochondrial longevity pathways*. Biochim Biophys Acta. 2011; 181: 634-644.
5. Judge S, Leeuwenburgh C. *Cardiac mitochondrial bioenergetics, oxidative stress, and aging*. Am J Physiol Cell Physiol. 2007; 292: C1983-1992.
6. Almeida M, Han L, Ambrogini E, Weinstein RS, Manolagas SC. *Glucocorticoids and tumor necrosis factor α increase oxidative stress and suppress Wnt protein signaling in osteoblasts*. J Biol Chem. 2011; 286: 44326-44335.
7. Angeli A, Masera RG, Orlandi F, Terzolo M. *Sindromi da eccesso di glicocorticoidi*. In "Atti del 95° Congresso della Società Italiana di Medicina Interna", 1994: 253-452, Luigi Pozzi Editore, Roma.
8. Herman JP, Cullinan WE. *Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis*. Trends Neurosci. 1997; 20: 78-84.
9. McEwen BS. *Protective and damaging effects of stress mediators*. N Engl J Med. 1998; 338: 171-179.
10. Grossman A, Costa A. *The regulation of hypothalamic CRH: impact of in vitro studies on the central control of the stress response*. Funct Neurol. 1993; 8: 325-334.
11. Turnbull AV, Rivier CL. *Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action*. Physiol Rev. 1999; 79: 1-71.
12. Duprez D, De Buyzere M, Paelinck M, Rubens R, Dhooge W, Clement DL. *Relationship between left ventricular mass index and 24-h urinary free cortisol and cortisone in essential arterial hypertension*. J Hypertens. 1999; 17: 1583-1588.
13. Gianaros PJ, Sheu LK, Remo AM, Christie IC, Critchley HD, Wang J. *Heightened resting neural activity predicts exaggerated stressor-evoked blood pressure reactivity*. Hypertension. 2009; 53: 819-825.
14. Pernow J. *Co-release and functional interactions of neuropeptide Y and noradrenaline in peripheral sympathetic vascular control*. Acta Physiol Scand (Suppl). 1990; 568: 1-56.
15. Zukowska-Grojec Z. *Neuropeptide Y: an adrenergic cotransmitter, vasoconstrictor, and a nerve-derived vascular growth factor*. In "Catecholamines. Bridging Basic Science with Clinical Medicine", 1998: 177-195, Academic Press, San Diego.
16. Figueredo VM. *The time has come for physicians to take notice: the impact of psychosocial stressors on the heart*. Am J Med. 2009; 122: 704-712.
17. Angeli A. *I sistemi funzionali circadiani: fisiopatologia e implicazioni cliniche*. Seminari Medicina Interna. 1998; 17: 167-184.

18. Quan SF. *Sleep disturbances and their relationship to cardiovascular disease*. Am J Lifestyle Med. 2009; 3: 55-59.
19. Lazarus RS, Folkman S. *Stress, appraisal and coping*. Springer Publishing Company Inc, 1984, New York.
20. Friedrich MJ. *Researchers seek new ways to counter the harmful toll of stress on the brain*. JAMA. 2013; 309: 330-332.
21. Pacak K, Palkovits M, Yadid G, Kvetnansky R, Kopin IJ, Goldstein DS. *Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity*. Am J Physiol. 1998; 275: R1247-R1255.
22. Koob GF, Heimichs SC, Menzaghi F, Pich EM, Britton KT. *Corticotropin releasing factor, stress, and behavior*. Sem Neurosci. 1994; 6: 221-229.
23. McEwen BS. *Sleep deprivation as a neurobiologic and physiologic stressor: allostasis and allostatic load*. Metabolism. 2006; 55: 20-23.
24. Yehuda R. *Post-traumatic stress disorder*. N Engl J Med. 2002; 346: 108-114.
25. Angeli A, Minetto M, Dovio A, Paccotti P. *The overtraining syndrome in athletes: a stress-related disorder*. J Endocrinol Invest. 2004; 27: 603-612.
26. Pancheri P. *Stress, emozioni, malattia*. Mondadori, Milano, 1979.
27. Lerner BH. *Can stress cause disease? Revisiting the tuberculosis research of Thomas Holmes, 1949-1961*. Ann Intern Med. 1996; 124: 673-680.
28. Elenkov IJ, Chrousos GP. *Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease*. Trends Endocrinol Metab. 1999; 10: 359-368.
29. Calabrese JR, Kling MA, Gold PW. *Alterations in immunocompetence during stress, bereavement, and depression: focus on neuroendocrine regulation*. Am J Psychiatry. 1987; 144: 1123-1134.
30. Gatti G, Masera RG, Pallavicini L, Sartori ML, Staurengi A, Orlandi F, Angeli A. *Interplay in vitro between ACTH, β -endorphin, and glucocorticoids in the modulation of spontaneous and lymphokine-inducible human natural killer (NK) cell activity*. Brain Behav Immun. 1993; 7: 16-28.
31. Böhm M, Grässel S. *Role of proopiomelanocortin-derived peptides and their receptors in the osteoarticular system: from basic to translational research*. Endocr Rev. 2012; 33: 623-651.
32. Franzen PL, Gianaros PJ, Marsland AL, Hall MH, Siegle GJ, Dahl RE, Buysse DJ. *Cardiovascular reactivity to acute psychological stress following sleep deprivation*. Psychosom Med. 2011; 73: 679-682.
33. Chrousos GP. *The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation*. N Engl J Med. 1995; 332: 1351-1362.
34. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. *IL-17 and Th17 cells*. Annu Rev Immunol. 2009; 27: 485-517.
35. Von Känel R. *Psychosocial stress and cardiovascular risk: current opinion*. Swiss Med Wkly. 2012; 142: w13502.

36. Reincke M. *Subclinical Cushing's syndrome*. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2000; 29: 43-56.
37. Chiodini I. *Clinical review: Diagnosis and treatment of subclinical hypercortisolism*. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96: 1223-1236.
38. Ferrari E, Cravello L, Muzzoni B, Casarotti D, Paltro M, Solerte SB, Fioravanti M, Guzzoni G, Pontiggia B, Magri F. *Age-related changes of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: pathophysiological correlates*. *Eur J Endocrinol*. 2001; 144: 319-329.
39. Veldhuis JD, Keenan DM, Roelfsema F, Iranmanesh A. *Aging-related adaptations in the corticotropin axis: modulation by gender*. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2005; 34: 993-1014.
40. Angeli A, Masera RG, Magri F, Ferrari E. *The adrenal cortex in physiological and pathological aging: issues of clinical relevance*. *J Endocrinol Invest*. 1999; 22: 13-18.
41. Wilkinson CW, Peskind ER, Raskind MA. *Decreased hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitivity to cortisol feedback inhibition in human aging*. *Neuroendocrinology*. 1997; 65: 79-90.
42. Jacobson L, Sapolsky R. *The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis*. *Endocr Rev*. 1991; 12: 118-134.
43. Tsigos C, Chrousos GP. *Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress*. *J Psychosom Res*. 2002; 53: 865-871.
44. Jin K. *Modern biological theories of aging*. *Aging Dis*. 2010; 1: 72-74.
45. McEwen BS, De Leon MJ, Lupien SJ, Meaney MJ. *Corticosteroids, the aging brain and cognition*. *Trends Endocrinol Metab*. 1999; 10: 92-96.

L'INFIAMMAZIONE NELLA PROMOZIONE E NELLA PROGRESSIONE DELLE MALATTIE CRONICHE

Giuseppe Poli, Fiorella Biasi, Gabriella Leonarduzzi

Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche
Università di Torino c/o AOU San Luigi Gonzaga

Parole chiave: *Infiammazione*
Aterosclerosi
Diabete
Alzheimer
Ossidazione lipidica

Key words: *Inflammation*
Atherosclerosis
Diabetes
Alzheimer
Lipid oxidation

Riassunto

Processi infiammatori caratterizzano tutte le principali malattie croniche dell'uomo, rappresentandone la principale forza trainante, influenzandone tipo di evoluzione e complicanze. La flogosi può intervenire precocemente nello sviluppo di un processo patologico, promovendo il consolidamento dei primi eventi di questo. In altri casi o comunque più avanti nella storia naturale di una patologia cronica, l'infiammazione funge piuttosto da vero e proprio fattore di progressione. Molti progressi hanno registrato, negli ultimi anni, gli studi sui meccanismi molecolari alla base dei processi di promozione e progressione di malattia ad opera dell'infiammazione. In base alle attuali conoscenze, un ruolo centrale nei meccanismi di flogosi risulta essere svolto dal Nuclear Factor-kappaB (NF-kB), un fattore di trascrizione che si ritrova in tutti i tipi cellulari e viene attivato da tutti i principali fattori di flogosi. Il fatto che agenti di stress e di infiammazione, i più disparati tra di loro, agiscano tramite l'attivazione di NF-kB, favorisce lo sviluppo di tecniche di medicina molecolare e procedure di prevenzione primaria e secondaria atte a contrastare gli effetti deleteri dell'infiammazione sul

decorso delle malattie croniche dell'uomo, prendendo come bersaglio questo fattore di trascrizione genica.

Summary

Inflammatory processes are constantly associated with all major human chronic diseases, represent their main driving force and influence their evolution and complications. Inflammation may be present in the early expression of a given pathology, acting as a promoter of it and stabilizing it. Later on in the natural history of a disease process, inflammation acts as primary factor of disease progression. Over the last years, significant advances in the investigation of inflammation-mediated disease promotion and/or progression have been made. To the present knowledge, a central role in the molecular mechanisms of inflammation is played by Nuclear Factor-kappaB (NF-kB), a transcription factor present in all eukaryotic cells that is activated by all main agents of inflammation and main stressors. The fact that a large number of inflammatory and stress agents, so different the one from the other, exert their effect through the activation of NF-kB, is actually favoring the development of molecular technologies and primary and secondary prevention strategies against the deleterious aspects of inflammatory reactions in the course of chronic human diseases, specifically targeting this transcription factor.

Nel prendere in esame, pur in modo schematico, il ruolo che i processi infiammatori possono svolgere nell'insorgenza e nello sviluppo delle principali malattie croniche che colpiscono l'uomo, è opportuno sottolineare da subito alcuni aspetti fondamentali e comuni a tutte queste patologie.

L'aterosclerosi, il diabete mellito, la malattia neoplastica, la malattia di Alzheimer e le altre patologie neurodegenerative, le malattie infiammatorie croniche dell'intestino (morbo di Crohn e colite ulcerosa), sono tutte *patologie multifattoriali*. Fattori genetici, epigenetici e strettamente acquisiti si intrecciano in varia percentuale a determinare nei singoli individui forme più o meno gravi, più o meno progressive, più o meno complicate di malattia.

Queste e altre malattie comuni nell'uomo, hanno, inoltre, la caratteristica di svilupparsi e di eventualmente evolvere in più fasi, sono cioè *patologie multifasiche*.

Calata in un contesto di questo tipo, multifattoriale e multifasico, l'infiammazione, essenzialmente, ma non solo, di tipo cronico, può assumere entità e significato differenti, ma sempre un ruolo primario. Processi infiammatori caratterizzano tutte le principali malattie croniche dell'uomo, rappresentandone la principale forza trainante (driving force), influenzandone tipo di evoluzione e complicità.

Come illustrato in Figura 1, la flogosi può intervenire precocemente nello sviluppo di un processo patologico, contribuendo al consolidamento dei primi eventi di questo, come ad esempio nella disfunzione dell'endotelio di arterie di medio e grande calibro nella formazione di un ateroma oppure nella stabilizzazione di un focolaio di cellule con proliferazione di tipo neoplastico. In tal caso, l'infiammazione ha un *ruolo promotore* lo sviluppo di malattia. In altri casi o comunque più avanti nella storia naturale di una patologia cronica, l'infiammazione funge piuttosto da vero e proprio *fattore di progressione*, sostenendo ad esempio una crescita neoplastica o l'insorgenza di uno stato di resistenza all'insulina o l'alterazione della normale funzioni di difesa della parete intestinale.

A proposito di processi infiammatori cronici che stimolano una determinata malattia cronica ad evolvere ulteriormente, ricerche recenti hanno evidenziato l'esistenza di tre tipi di macrofago, basati su tre diverse attività omeostatiche: difesa dell'ospite, riparazione di lesione tissutale, regolazione immunitaria⁽¹⁾. È verosimile, quindi, pensare, che in fasi diverse di un processo patologico cronico, prevalga un tipo piuttosto che un altro di cellula macrofagica. Un evento di questo genere può significativamente influenzare la storia naturale della patologia stessa. Esempio calzante, a questo proposito è la verosimile

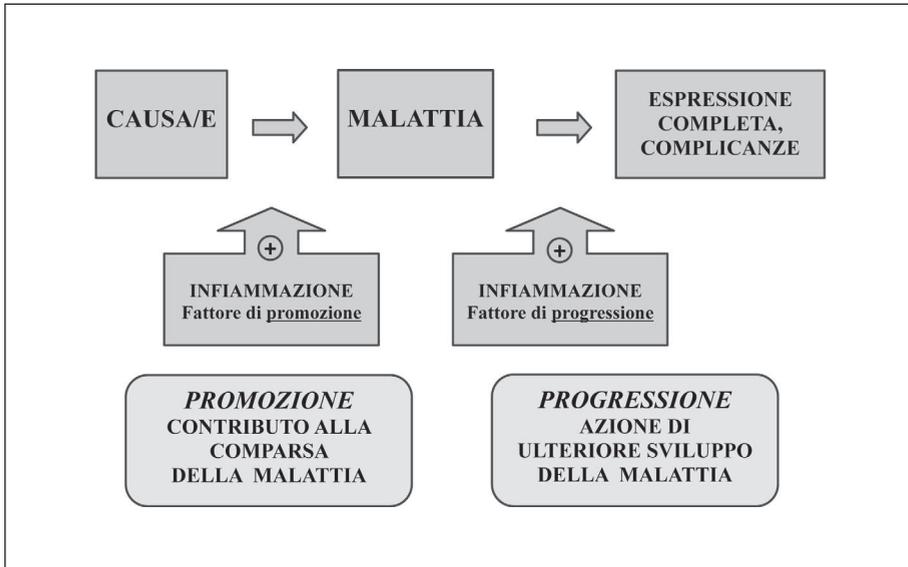


Figura 1. L'infiammazione come fattore di promozione o di progressione di malattia cronica.

prevalenza di macrofagi con funzioni di difesa dell'ospite nelle prime fasi dello sviluppo di un tumore, mentre in un tumore in fase avanzata, quando la neoplasia è riuscita a prevalere sulle difese dell'ospite, prevalgono macrofagi in grado di secernere citochine anti-infiammatorie e addirittura pro-angiogeniche⁽²⁾, oltre a proteasi in grado di digerire la matrice extracellulare e favorire quindi la diffusione del tumore⁽³⁾.

Diversa ma altrettanto importante è, poi, la distinzione tra flogosi con funzione di promozione (fasi precoci di malattia) e flogosi con funzione di progressione (fasi di patologia avanzate). Infatti, ci si contrappone alla prima in corso di prevenzione primaria, mentre si attua una prevenzione secondaria quando si adottano misure anti-infiammatorie a malattia già avanzata, per evitare la comparsa di complicanze gravi.

Si intende, qui di seguito, approfondire alcuni aspetti cellulari e soprattutto molecolari dei processi infiammatori che accompagnano e modulano le maggiori malattie croniche dell'uomo.

Dal punto di vista cellulare, si è detto dei diversi fenotipi dei macrofagi. Le cellule della linea macrofagica sono senza dubbio le più importanti nella flogosi cronica, ma non è da dimenticare il ruolo che soprattutto in determinate patologie croniche ricoprono le diverse classi di linfociti, i granulociti, le cellule endoteliali, le cellule dell'epitelio intestinale, e, non

ultime, componenti cellulari dello stroma dei tessuti, in particolare fibroblasti e miofibroblasti.

È importante, infatti, sottolineare che non sono solo i leucociti a produrre intermedi chimici di infiammazione, basti pensare al monossido di azoto e alle svariate molecole di adesione e chemiotattiche generate dall'endotelio di vasi e capillari sanguigni, alle citochine infiammatorie sintetizzate dai miofibroblasti del connettivo dei vari organi, quali ad esempio fegato, parete dei vasi arteriosi, rene, polmone. Il maggiore o minore coinvolgimento di più tipi cellulari in un determinato processo flogistico ne determinerà una maggiore o minore specificità e, soprattutto, ne permetterà l'eventuale amplificazione.

Molti progressi hanno registrato, negli ultimi anni, gli studi sui meccanismi molecolari alla base dei processi di promozione e progressione di malattia ad opera dell'infiammazione. Ciò grazie alle tecniche di biologia molecolare, che hanno permesso di caratterizzare la sintesi e gli effetti fisiopatologici di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto, di citochine con azione pro- e anti-infiammatoria, di fattori fibrogenici e angiogenici. Particolarmente interessante è il fatto che, pur nella moltitudine di molecole coinvolte o coinvolgibili in un processo infiammatorio, si sia arrivati ad identificarne alcune con un ruolo fondamentale. Senza dubbio, allo stato attuale delle conoscenze, la più importante e studiata di tali molecole chiave è il Nuclear Factor-kappaB (NF-kB). NF-kB è un fattore di trascrizione che si ritrova in tutti i tipi cellulari; lo si ritrova in uno stato inattivo nel citoplasma, dove i due peptidi funzionanti che lo compongono sono legati ad una molecola inibitrice IκB. Praticamente tutti gli agenti chimici, fisici e microbiologici di infiammazione sono in grado di attivare NF-kB favorendo il distacco della componente inibitoria IκB. Ne consegue che il dimero risultante può ora traslocare dal citoplasma al nucleo delle cellule e lì legarsi a sequenze chimiche specifiche presenti nel sito promoter di molti geni coinvolti appunto nella modulazione della flogosi.

In Figura 2 sono riportati i principali fattori di flogosi che attivano NF-kB insieme alle molecole e ai processi la cui sintesi e attivazione è indotta da detto fattore di trascrizione. NF-kB appare proprio svolgere un ruolo centrale nella risposta infiammatoria a fattori di stress e di infiammazione, i più disparati tra di loro. Questa relativa stereotipicità delle reazioni flogistiche correlate all'attivazione di NF-kB, sta ora favorendo lo sviluppo di tecniche di medicina molecolare e procedure di prevenzione primaria e secondaria atte a contrastare gli effetti deleteri dell'infiammazione sul decorso delle malattie croniche dell'uomo prendendo come bersaglio questo fattore di trascrizione genica.

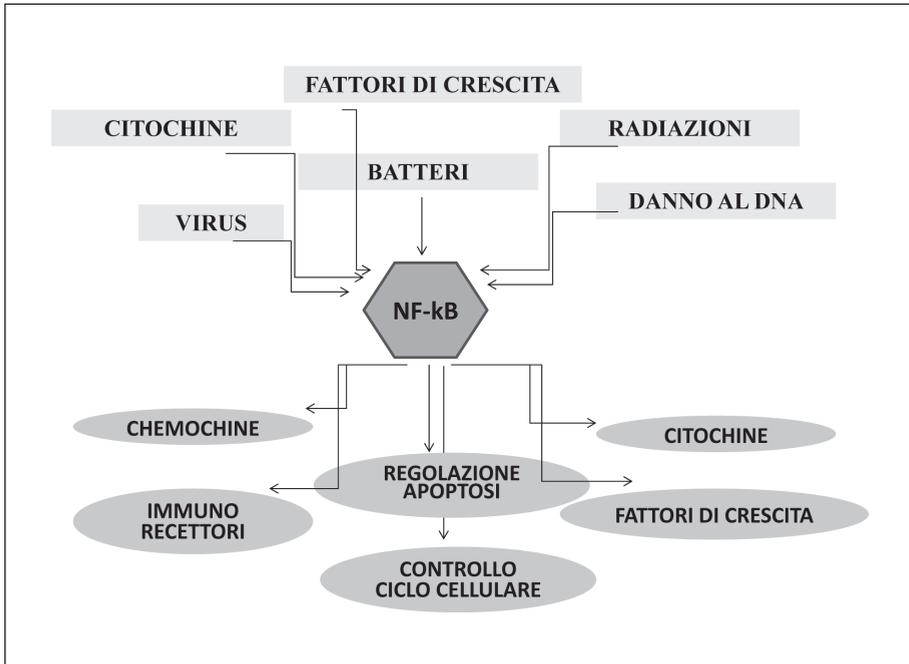


Figura 2. *NF-kB* come molecola centrale nella regolazione della risposta infiammatoria a stimoli diversi di stress.

In effetti, davvero cruciale appare il ruolo di NF-kB e degli eventi infiammatori da esso sostenuti in varie importanti patologie. Ad esempio, una condizione di ipercolesterolemia è riconosciuta da tempo essere coinvolta nella patogenesi della malattia aterosclerotica e delle sue complicanze, ma la molecola del colesterolo di per sé è chimicamente poco reattiva. Recentemente si è unanimemente riconosciuto che il colesterolo acquisisce forte potere pro-infiammatorio e pro-aterogeno, quando subisce un'ossidazione a livello di determinati atomi di carbonio dell'anello steroideo o della catena laterale, dando origine a prodotti di ossidazione del colesterolo definiti ossisteroli⁽⁴⁾.

Gli ossisteroli, al contrario della molecola parentale, sono forti attivatori di NF-kB. Inibendo l'attivazione di questo fattore di trascrizione, gli ossisteroli in effetti non inducono più la sintesi di citochine infiammatorie e chemiotattiche da parte di macrofagi di origine umana⁽⁵⁾.

Più recentemente, gli ossisteroli riscontrabili nell'intestino di individui a dieta carnea, hanno dimostrato di indurre, in cellule epiteliali del colon di origine umana in coltura, una marcata sintesi di citochine infiammatorie

IL-8, IL-6 e MCP-1, tutte molecole per la cui trascrizione risulta essenziale l'attivazione di NF-kB. Questi risultati supportano un ruolo dei prodotti di ossidazione del colesterolo nella patogenesi delle malattie infiammatorie dell'intestino (IBD). Anche in tal caso, l'inibizione della via di segnale che porta a NF-kB ha dimostrato di prevenire, almeno nel modello sperimentale impiegato, l'induzione di citochine infiammatorie ad opera di ossisteroli della dieta⁽⁶⁾.

Fondamentale, poi, la dimostrazione nell'animale sperimentale che inibendo selettivamente l'attivazione di NF-kB nelle sole cellule della serie mielomonocitica o nelle sole cellule epatocitarie, si riesce a prevenire l'induzione di insulino-resistenza ad opera di citochine infiammatorie e dieta ricca in grassi, una situazione che in patologia umana si ritrova in condizioni di obesità addominale o di vera e propria sindrome metabolica⁽⁷⁾. Il modello sperimentale utilizzato era quello del topo transgenico privato del gene IKKbeta, l'enzima che permette il distacco della molecola inibitrice IκB dal resto del fattore NF-kB, permettendo così la sua traslocazione nucleare e la conseguente attività trascrizionale. Mentre il topo con livelli normali di NF-kB negli epatociti o nei macrofagi, rispondeva al trattamento con lipopolisaccaride batterico (LPS) o una dieta prolungata ricca di grassi evidenziando uno stato infiammatorio generale e una marcata resistenza all'insulina, il corrispondente topino KO per IKKbeta non presentava in circolo elevati livelli di citochine infiammatorie e presentava una risposta glicemica praticamente normale al carico orale di glucosio per os⁽⁷⁾.

Infine, essendo dimostrato l'elevato impatto che i processi infiammatori esercitano sulla comparsa e sullo sviluppo delle principali malattie dell'uomo e ben avviata la ricerca di procedure innovative di intervento preventivo e terapeutico contro questa spinta infiammatoria, occorrerebbe avere a disposizione marcatori fini di infiammazione. Quest'ultimo punto è di fatto una nota dolente, perché troppo spesso ancora, anche in ambito ospedaliero, si valuta uno stato infiammatorio rilevando semplicemente i livelli ematici di proteina C reattiva e la velocità di eritrosedimentazione del sangue (come con i nostri nonni tanti anni fa). Il problema, è noto, non dipende dalla mancata disponibilità di quantificare i livelli ematici di citochine infiammatorie, chemochine, molecole di adesione, ma piuttosto dalle ristrettezze finanziarie in cui spesso si dibattono i laboratori di analisi cliniche ospedalieri. Con la concentrazione delle risorse sanitarie in selezionati centri di diagnosi e cura, anche il monitoraggio dell'infiammazione nella promozione e nella progressione delle malattie croniche dell'uomo risulterà verosimilmente fattibile di routine, con ovvie e significative ricadute socio-sanitarie.

BIBLIOGRAFIA

1. Mosser DM, Edwards JP: *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol. 2008; 8: 958-969.
2. Mantovani A, Sica A: *Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance and diversity*. Curr Opin Immunol. 2010; 22: 231-237.
3. Biasi F, Guina T, Maina M, Nano M, Falcone A, Arosio E, Saracco GM, Papotti M, Leonarduzzi G, Poli G: *Progressive increase of matrix metalloproteinase-9 and interleukin-8 serum levels during carcinogenic process in human colorectal tract*. PLoS ONE 2012; 7: e41839.
4. Poli G, Sottero B, Gargiulo S, Leonarduzzi G: *Cholesterol oxidation products in the vascular remodeling due to atherosclerosis*. Mol Aspects Med. 2009; 30: 180-189.
5. Leonarduzzi G, Gamba P, Sottero B, Kadl A, Robbesyn F, Calogero RA, Biasi F, Chiarotto E, Leitinger N, Sevanian A, Poli G: *Oxysterol-induced up-regulation of MCP-1 expression and synthesis in macrophage cells*. Free Radic Biol Med. 2005; 39: 1152-1161.
6. Mascia C, Maina M, Chiarotto E, Leonarduzzi G, Poli G, Biasi F: *Proinflammatory effect of cholesterol and its oxidation products on CaCo-2 human enterocyte-like cells: effective protection by epigallocatechin-3-gallate*. Free Radic Biol Med. 2010; 49: 2049-2057.
7. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M: *IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance*. Nat Med. 2005; 11: 191-198.

ALIMENTAZIONE E QUALITÀ DELLA VITA

Alessandra Fabbri

Servizio Igiene degli Alimenti e Nutrizione - AUSL Reggio Emilia

Parole chiave: *Stile di vita*
Alimentazione
Sovrappeso
Epidemia di obesità

Key words: *Lifestyle*
Diet
Overweight
Globesity

Riassunto

Il peso globale delle malattie croniche non trasmissibili continua a crescere: affrontarle costituisce una delle principali sfide per lo sviluppo del XXI secolo. Le morti per malattie non trasmissibili (si calcolano 35 milioni di morti all'anno) rappresentano il 60% di tutte le morti e si prevede un ulteriore aumento del 17% nei prossimi decenni. Poiché le malattie non trasmissibili sono in gran parte prevenibili, attraverso l'adozione di corretti stili di vita, tra cui una sana alimentazione, il numero di decessi prematuri può essere notevolmente ridotto. Obiettivo di tutte le politiche sanitarie nazionali è quello di promuovere stili di vita in grado di contrastare il peso delle malattie croniche e di far guadagnare anni di vita in salute alla popolazione.

Summary

Noncommunicable diseases (NCDs) represent a leading threat to human health and development. These four diseases are the world's biggest killers, causing an estimated 35 million deaths each year - 60% of all deaths globally. It projects that, globally, NCD deaths will increase by 17% over the next ten years. These diseases are preventable by eliminating shared risk factors, including unhealthy diet. Unless addressed, the mortality and disease burden from these health problems will continue to increase. Proven cost-effective strategies exist to prevent and control this growing burden.

*“Lasciate che il Cibo sia la vostra Medicina
e la Medicina il vostro Cibo”.*

(Ippocrate, 430 a.C.)

Fin dall'antichità, il cibo ha sempre avuto un valore superiore al semplice gesto del mangiare; l'uomo antico, nel cibo, intravedeva la vita e la fecondità della terra che genera e nutre; il cucinare era accompagnato da gesti simbolici e religiosi, ed il mangiare faceva nascere profondi sentimenti di gratitudine che diventavano autentica preghiera (valori che si sono persi nell'era attuale).

È nel 1770 che il modo di mangiare diventa un sistema per precisare la propria appartenenza sociale: Jean-Anthelme Brillat-Savarin, magistrato francese, autore di saggi di diritto, nella sua opera più nota del 1825 “Fisiologia del gusto” conia la sentenza, divenuta poi famosa: “dimmi cosa mangi e ti dirò chi sei”. Ludwig Feuerbach (1804-1878) sosteneva che il centro di tutto il creato era l'uomo nella sua materialità. L'immagine che meglio fotografa il rapporto tra cibo e società era: “l'uomo è ciò che mangia”. Entrambi gli studiosi consideravano il cibo un preciso marcatore capace di mettere in risalto ciò che differenzia un uomo da un altro e di distinguere una cultura da un'altra.

Nel XX secolo, la nostra realtà agricola ed alimentare ha subito notevoli modifiche, si è incentivato l'uso di sementi e specie selezionate, di prodotti chimici nella coltivazione (pesticidi, concimi, etc.), incentivando una lavorazione e raffinazione industriale del cibo, che ha permesso ai consumatori di avere a disposizione una notevole varietà di cibi tutto l'anno e a prezzi contenuti.

Parallelamente alla maggiore disponibilità di cibo compaiono e si diffondono le “patologie del benessere”, correlate alla diffusione di un modello alimentare ad alto tenore calorico e a uno stile di vita sedentario, il cui rischio di insorgenza si manifesta sempre più precocemente.

È innegabile che ogni cultura è legata al proprio cibo, e che il cibo o il modo di mangiare sono elementi fondamentali per capire la cultura di un popolo: il cibo non racchiude solo componenti nutrizionali, ma anche aspetti antropologici come l'arte, la filosofia, l'intera cultura e la storia dell'uomo. L'alimentazione è un tassello integrante della nostra identità.

È l'alimentazione che porta il piccolo neonato alla scoperta del mondo esterno, fatto di nuovi sapori e odori, è l'alimentazione che crea esperienze che rimarranno indelebili nella memoria e nella costruzione dell'identità personale di ogni singolo individuo.

Ma quando si esagera, quando viene perduto il senso della misura, degli abbinamenti, della stagionalità, dell'occasione e della festa, ecco che, come un boomerang, l'alimentazione finisce con l'essere additata come causa della maggior parte dei mali.

Obesità, malattie cardiovascolari, alcuni tumori e tutte quelle malattie che riconoscono in un scorretta alimentazione la causa principale, stanno dilagando e caratterizzando sempre più le fasce "meno abbienti" dei paesi industrializzati e quelle "più ricche" dei paesi in via di sviluppo. Il fenomeno è mondiale, si inizia così a parlare di "globesity"^(1,8) e neppure l'Italia, culla della tanto decantata dieta mediterranea quale esempio di alimentazione sana, riesce a esserne esente...

Si sta perdendo infatti l'abitudine a utilizzare legumi e cereali integrali, è sempre più difficile far mangiare ai nostri bambini frutta e verdura; i cibi raffinati, la carne e i dolci che rappresentavano un tempo l'eccezione dei

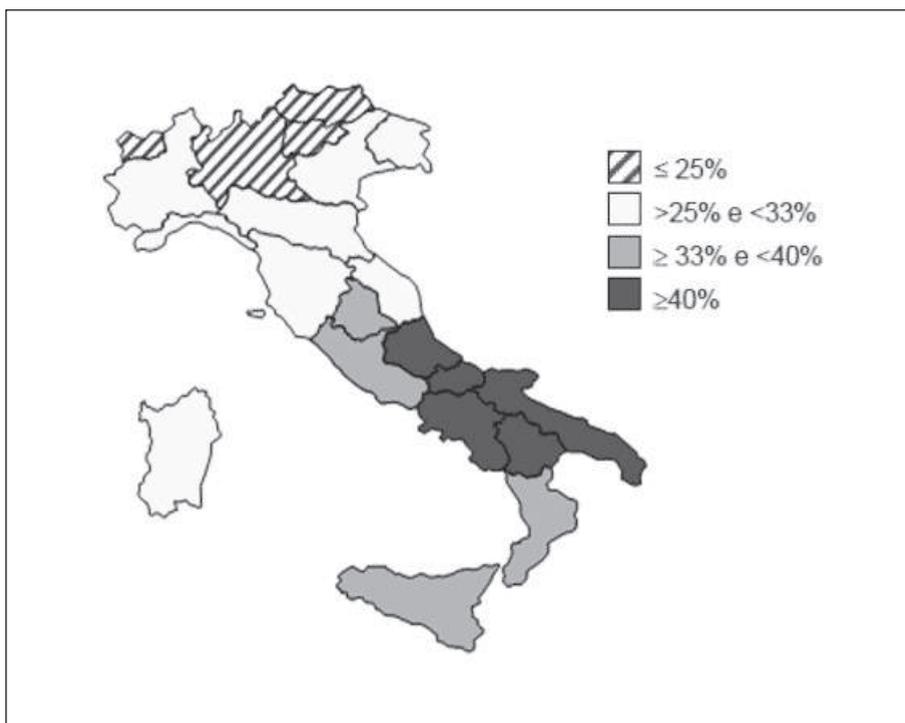


Tabella I. Sovrappeso + obesità per regione, bambini di 8-9 anni della 3^a primaria, OKkio alla SALUTE 2012.

momenti di festa, ora sono divenuti la regola giornaliera. A tutto ciò si aggiunge il fatto che un tempo l'organismo richiedeva molta più energia, perché notevole era il dispendio calorico: fino a non molto tempo fa si andava in città o ai mercati a piedi o in bicicletta, spesso facendo tragitti che superavano i 30 Km giornalieri; gli inverni erano freddi anche in casa, dove la stufa era presente solo in cucina. Adesso abitiamo perennemente a 20°, estate e inverno, esiste il riscaldamento in ogni stanza e almeno un bagno in ogni appartamento; in famiglia abbiamo in media un'auto a testa, un telecomando per aprire il cancello e uno per il televisore; i freezer ci permettono di avere cappelletti, tortellini e lasagne tutto l'anno e i momenti di festa (quotidiani...) sono rappresentati, almeno per i ragazzi, da hamburger, patatine e ketchup^(9,10,11).

Anche in Italia è così scomparsa la dieta mediterranea; l'effetto è l'aumento preoccupante in certe regioni, dell'obesità, soprattutto quella infantile⁽⁶⁾, come le recenti indagini di sorveglianza nutrizionale OKKIO dimostrano (Tabella I).

Cosa fare? È stupido e inutile opporsi ai mutamenti alimentari in corso, non riconoscere i progressi delle tecnologie alimentari o demonizzare i nuovi cibi. Non esistono infatti cibi cattivi o sbagliati, è solo una questione di misura e di frequenza. E di energia consumata⁽⁷⁾.

L'OMS /FAO evidenzia^(2,5) i fattori di rischio e di protezione per patologie croniche a componente nutrizionale, descrivendo la forza dell'evidenza secondo i criteri del convincente, probabile, possibile, insufficiente; vengono inoltre individuati gli obiettivi in grado di modificare il rischio attribuibile legato all'esposizione ad uno specifico fattore (Tabella II).

I punti cardine sono stati ripresi e riassunti dall'INRAN nelle Linee guida per una sana alimentazione italiana⁽³⁾: consumare frutta, verdura e acqua in abbondanza; limitare sale zuccheri e grassi; aumentare la fibra; muoversi di più.

A tutto ciò si collegano anche le più recenti raccomandazioni emesse dal WCRF - Fondo Mondiale per la ricerca sul cancro⁽⁴⁾, frutto delle nuove e più avanzate evidenze scientifiche (Tabella III).

EFFETTI	Livello di evidenza	OBIETTIVI / RACCOMANDAZIONI
Effetto protettivo		
Svolgimento regolare di attività fisica	+++	Attività fisica: 60 minuti al giorno di attività fisica moderata (es. camminare) 5-7 giorni a settimana
Regimi alimentari ad elevato contenuto in fibra	+++	
Promozione di un'alimentazione equilibrata nei bambini sia in ambito scolastico che a casa	++	Disponibilità ed accessibilità ad un'ampia varietà di frutta e verdura
Allattamento al seno	++	
Consumo di alimenti a basso indice glicemico	+	
Aumento del numero giornaliero dei pasti	0	
Incremento del rischio		
Stile di vita sedentario	+++	
Regimi alimentari con alimenti ad elevata densità energetica	+++	Lipidi: < 30% dell'apporto calorico/die Carboidrati semplici: < 10% dell'apporto calorico/die
Basso livello socio-economico specie nei soggetti di sesso femminile	++	
Consumo di bevande zuccherate e succhi di frutta	++	
Frequente consumo di pasti fuori casa	+	
Controllo dell'assunzione calorica, seguita da periodi di disinibizione	+	
Consumo di bevande alcoliche	0	
Nessuna relazione		
Contenuto proteico della dieta	+	
Forza evidenza: Convincente: +++ Probabile: ++ Possibile: + Insufficiente: 0		
Modificato da: WHO (2003). Diet, Nutrition and the prevention of chronic diseases". WHO Technical Report series n. 916.		

Tabella II. Relazione tra comportamenti e/o stili di vita ed insorgenza di obesità, in rapporto allo specifico livello di evidenza scientifica.

1) Mantenersi snelli per tutta la vita. Per conoscere se il proprio peso è in un intervallo accettabile è utile calcolare l'Indice di Massa Corporea (BMI = peso in Kg diviso per l'altezza in metri elevata al quadrato: ad es. una persona che pesa 70 kg ed è alta 1,74 mt ha un BMI = $70 / (1,74 \times 1,74) = 23,1$) che dovrebbe rimanere verso il basso dell'intervallo considerato normale (tra 18,5 e 24,9 secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità).
2) Mantenersi fisicamente attivi tutti i giorni. In pratica è sufficiente un impegno fisico pari a una camminata veloce per almeno mezz'ora al giorno; man mano che ci si sentirà più in forma, però, sarà utile prolungare l'esercizio fisico fino ad un'ora o praticare uno sport o un lavoro più impegnativo. L'uso dell'auto per gli spostamenti e il tempo passato a guardare la televisione sono i principali fattori che favoriscono la sedentarietà nelle popolazioni urbane.
3) Limitare il consumo di alimenti ad alta densità calorica ed evitare il consumo di bevande zuccherate. Sono generalmente ad alta densità calorica i cibi industrialmente raffinati, precotti e preconfezionati, che contengono elevate quantità di zucchero e grassi, quali i cibi comunemente serviti nei fast food. Si noti la differenza fra "limitare" ed "evitare". Se occasionalmente si può mangiare un cibo molto grasso o zuccherato, ma mai quotidianamente, l'uso di bevande gassate e zuccherate è invece da evitare, anche perché forniscono abbondanti calorie senza aumentare il senso di sazietà.
4) Basare la propria alimentazione prevalentemente su cibi di provenienza vegetale, con cereali non industrialmente raffinati e legumi in ogni pasto e un'ampia varietà di verdure non amidacee e di frutta. Sommando verdure e frutta sono raccomandate almeno cinque porzioni al giorno (per circa 600g); si noti fra le verdure non devono essere contate le patate.
5) Limitare il consumo di carni rosse ed evitare il consumo di carni conservate. Le carni rosse comprendono le carni ovine, suine e bovine, compreso il vitello. Non sono raccomandate, ma per chi è abituato a mangiarne si raccomanda di non superare i 500 grammi alla settimana. Si noti la differenza fra il termine di "limitare" (per le carni rosse) e di "evitare" (per le carni conservate, comprendenti ogni forma di carni in scatola, salumi, prosciutti, wurstel), per le quali non si può dire che vi sia un limite al di sotto del quale probabilmente non vi sia rischio.
6) Limitare il consumo di bevande alcoliche. Non sono raccomandate, ma per chi ne consuma si raccomanda di limitarsi ad una quantità pari ad un bicchiere di vino (da 120 ml) al giorno per le donne e due per gli uomini, solamente durante i pasti. La quantità di alcol contenuta in un bicchiere di vino è circa pari a quella contenuta in una lattina di birra e in un bicchierino di un distillato o di un liquore.
7) Limitare il consumo di sale (non più di 5 g al giorno) e di cibi conservati sotto sale. Evitare cibi contaminati da muffe (in particolare cereali e legumi). Assicurarsi quindi del buon stato di conservazione dei cereali e dei legumi che si acquistano, ed evitare di conservarli in ambienti caldi ed umidi.
8) Assicurarsi un apporto sufficiente di tutti i nutrienti essenziali attraverso il cibo. Di qui l'importanza della varietà. L'assunzione di supplementi alimentari (vitamine o minerali) per la prevenzione del cancro è invece sconsigliata.
9) Allattare i bambini al seno per almeno sei mesi.
10) Nei limiti dei pochi studi disponibili sulla prevenzione delle recidive, le raccomandazioni per la prevenzione alimentare del cancro valgono anche per chi si è già ammalato.
COMUNQUE NON FARE USO DI TABACCO

Tabella III. Raccomandazioni WCRF 2007 (da Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori).

BIBLIOGRAFIA

1. WHO. *Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic*. World Health Organization, 2000, Geneva.
2. WHO. *Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases*. World Health Organization, 2003, Geneva.
3. Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione. *Linee guida per una sana alimentazione italiana*. INRAN, 2003.
4. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. *Nutrition, Physical Activity and the prevention of cancer: a global perspective*. WCRF, 2007, Washington.
5. WHO. *Global strategy on diet, physical activity and health*. World Health Organization, 2004, Geneva.
6. Albertini A, Tripodi A, Fabbri A. et al. *Prevalence of obesity in 6- and 9-year old children living in Central North Italy. Analysis of determinants and indicators of risk of overweight*. *Obes Rev*. 2008; 9: 4-10.
7. Branca F, Nikogosian H, Lobstein T. *La sfida dell'obesità nella Regione europea dell'OMS e le strategie di risposta*. WHO, 2007, Geneva.
8. Caballero B. *The global epidemic of obesity: an overview*. *Epidemiol Rev*. 2007; 29: 1-5.
9. Brown T, Summerbell C. *Systematic review of school-based interventions that focus on changing dietary intake and physical activity levels to prevent childhood obesity: an update to the obesity guidance produced by the National Institute for Health and Clinical Excellence*. *Obes Rev* 2009; 10: 110-141.
10. Dobbins M. et al. *School-based physical activity programs for promoting physical activity and fitness in children and adolescents aged 6-18 (Review)*, The Cochrane Library 2009.
11. Condon EM. et al. *School meals: types of foods offered to and consumed by children at lunch and breakfast*. *J Am Diet Assoc* 2009; 109: S67-78.

IL MELANOMA: UNA NEOPLASIA IN CONTINUA CRESCITA

*Maria Grazia Bernengo, Maria Teresa Fierro,
Pietro Quaglino, Paola Savoia*

Clinica Dermatologica - Dipartimento di Scienze Mediche
Università di Torino

Parole chiave: *Melanoma*
Tumori cutanei
Epidemiologia
Metastasi cutanee
Terapia

Key words: *Melanoma*
Skin tumours
Epidemiology
Skin metastases
Treatment

Riassunto

Il melanoma è tra i tumori che hanno presentato il maggior aumento di incidenza ed è caratterizzato da un elevato potenziale metastastico, con comparsa di metastasi nel 15-35% dei pazienti.

Negli ultimi anni, i notevoli progressi in campo biomolecolare hanno portato all'individuazione di specifiche mutazioni a livello della cellula melanocitaria. Il 50-60% dei melanomi presentano mutazioni a carico di BRAF, gene che codifica per una protein-chinasi coinvolta nei processi di regolazione della crescita cellulare. La mutazione di NRAS si osserva nel 15-30% dei melanomi ed è mutuamente esclusiva con quella di BRAF; p16 e p14ARF (CDKN2A) sono spesso inattivati nei melanomi che insorgono su cute cronicamente fotoesposta, mentre mutazioni di cKIT si osservano nei melanomi acrali, mucosi e su cute fotodanneggiata. L'individuazione di tali mutazioni costituisce un target per lo sviluppo di farmaci. Il vemurafenib è un inibitore di Braf che agisce in presenza della mutazione pV600E, e che è da poco commercializzato anche in Italia. Studi di fase III hanno evidenziato la

sua superiorità nei confronti della dacarbazina in termini sia di sopravvivenza globale sia di tassi di risposta. L'ipilimumab è invece un anticorpo umano che si lega a CTLA-4, molecola di superficie sulle cellule T helper, inducendo una risposta immunitaria attiva contro le cellule tumorali. Studi randomizzati hanno dimostrato come l'impiego di ipilimumab consenta un significativo incremento della sopravvivenza rispetto alla chemioterapia standard in pazienti con melanoma metastatico in fase avanzata. L'introduzione della elettrochemioterapia, metodica che associa l'infusione di chemioterapici a basse dosi con la somministrazione di scariche elettriche a livello delle metastasi cutanee, ha determinato una maggiore possibilità di controllo delle metastasi cutanee.

Gli ambiti futuri della ricerca dovranno focalizzare le risorse da un lato sul potenziamento delle diagnosi precoce di melanoma, dall'altro sul trattamento dei pazienti con malattia metastatica utilizzando farmaci che associno attività clinica e tollerabilità, garantendo un significativo mantenimento della qualità di vita.

Abstract

The cornerstone of treatment for cutaneous melanoma, whose incidence has greatly increased during the last decades, is represented by an early diagnosis with surgical removal of the primary lesion. Indeed, patients with thick melanomas are weighted by a frequently poor prognosis with frequent spreading to visceral sites.

Recently, the improvement in the molecular biology techniques allowed the identification of specific gene mutations which take place in the melanoma cells. One of the most commonly found (50%-60% of cases) interests the BRAF gene, which codify for a protein-kinase involved in the cell growth regulation; on the other hand, NRAS mutation is less frequent (15-30% of cases) and it is mutually exclusive with that of BRAF. CKIT mutations are more frequently observed in acral melanomas, mucosal sites or photo-damaged skin. The identification of such mutations is of overwhelming relevance for therapeutic strategies, in as much as they can constitute a target towards monoclonal antibodies can be designed. Vemurafenib is a BRAF inhibitor which acts in the presence of a pV600E mutation. Phase III randomised clinical trials demonstrated his superiority with respect to dacarbazine in terms of response rates and overall survival. Ipilimumab is a monoclonal antibody directed against CTLA-4, a molecule expressed on the T-cell surface; the binding of the drug with its target releases the brake induced by the tumour on the host immune response. Randomised clinical trials demonstrated a significant increase of overall survival with respect to standard dacarbazine. The development of electrochemotherapy, a therapeutic strategy which associates the administration of low dose chemotherapy

with the delivery of electric pulses directly within the cutaneous lesions, have induced a significant improvement in the clinical management of skin metastases. Future research strategies should focus on the improvement of early diagnoses (using methods such as dermoscopy and confocal microscopy) as well as the identification of effective treatments for advanced-disease patients, coupling clinical activity and tolerability, thus improving the quality of life.

Epidemiologia

Il melanoma, tumore maligno cutaneo originato dal melanocita e dotato di un elevato potenziale metastatico, è tra i tumori che presentano il maggior aumento di incidenza. Secondo il SEER⁽¹⁾, l'incidenza stimata negli USA nel 1973 era di 6,8 per 100.000 persone-anno, mentre nel 2005 è aumentata a 20,8. Il melanoma si posiziona al quinto posto per incidenza nel mondo, tuttavia ci sono molte variazioni nelle differenti etnie ed aree geografiche. Anche in Italia il trend è in continua crescita, con una tendenza al raddoppiamento delle diagnosi in 10 anni. Nel Nord Europa e negli USA rappresenta il 2-3% di tutti i tumori maligni, escludendo i carcinomi cutanei. In Europa la sua frequenza è pari all'1% di tutti i tumori nel maschio e all'1,8% nella femmina.

Il paese nel mondo nel quale l'incidenza del melanoma è più elevata è rappresentato dall'Australia (55,8 casi per 100.000 abitanti negli uomini e di 41,1 nelle donne)⁽²⁾, seguita dalla Nuova Zelanda e dal Nord Europa, mentre l'incidenza è più bassa in Giappone e Africa centrale (0,4/100.000 abitanti).

In Italia i tassi di incidenza variano da 6 casi per 100.000 al Sud a 15 casi per 100.000 nelle regioni del Nord. Vi sono differenze tra le varie regioni: i tassi maggiori, compresi tra 12,5 e 13 si registrano in Friuli Venezia Giulia, Romagna, Marche, Trentino e Toscana, con un picco massimo nella città di Torino, dove i maschi si attestano su un tasso di 14 e le donne di 14,8; quelli più bassi si riferiscono alle città di Napoli, Sassari e Ragusa.

Sebbene fino alla fine degli anni '90 il melanoma tendesse a colpire più frequentemente le donne, negli ultimi anni, si è osservato un progressivo incremento delle diagnosi nei maschi, fino ad arrivare ad una sostanziale simile incidenza indipendentemente dal sesso, a partire dal 2000. L'età mediana di diagnosi è circa 50 anni, anticipata rispetto a quella delle altre neoplasie cutanee epiteliali.

Fattori di rischio

Sono sia di tipo intrinseco (costituzionali) sia di tipo estrinseco (ambientali). Tra i fattori intrinseci un ruolo importante è rappresentato dal fototipo: soggetti con pelle chiara e occhi verdi/celesti e tendenza a sviluppare lentiggini (fototipo I-II) hanno un rischio significativamente più elevato di sviluppare un melanoma, così come soggetti con elevato numero di nevi (> 100), numerosi nevi atipici e anamnesi positiva per ustioni solari, soprattutto in età infantile⁽³⁻⁵⁾. Inoltre costituisce un importante fattore di rischio la storia personale e/o familiare di melanoma. L'ereditarietà del melanoma è

poligenica, e circa il 5-10% dei casi di melanoma è familiare. Pazienti affetti da melanoma hanno un rischio di 9 volte maggiore rispetto alla popolazione generale di sviluppare un secondo melanoma⁽⁶⁾. Il più importante fattore di rischio estrinseco è rappresentato dall'esposizione a sorgenti naturali e/o artificiali di UV⁽⁷⁾. Il pattern di esposizione agisce in maniera indipendente dalla durata: l'esposizione solare intensa di tipo intermittente è associata al melanoma a diffusione superficiale mentre l'esposizione cronica è associata alla lentigo maligna. È stato inoltre recentemente dimostrato come il mancato utilizzo di fattori di protezione solare costituisca un fattore di rischio per lo sviluppo del melanoma.

Aspetti clinici e istopatologici

Il melanoma può insorgere in qualunque distretto corporeo, su cute sana oppure su un nevo melanocitico congenito o acquisito. Più raramente insorge in sedi diverse, quali l'occhio (congiuntiva o corioide), la vulva, l'ano, le cavità orale e nasale. In una percentuale non trascurabile di casi la diagnosi viene fatta in seguito alla comparsa di metastasi linfonodali o viscerali senza che il melanoma primitivo sia clinicamente evidente (“primitivo sconosciuto”)⁽⁸⁾.

Dal punto di vista clinico, nel melanoma si distinguono tre varianti: il melanoma piano, che si presenta come una macchia pigmentata di diametro solitamente superiore ai 6 mm, a forma irregolare e con tendenza all'accrescimento in senso centrifugo; il melanoma piano-cupoliforme, che presenta nelle fasi iniziali le stesse caratteristiche del melanoma piano, ma successivamente tende ad accrescersi in direzione verticale; il melanoma cupoliforme, che è meno frequente rispetto alle altre varietà (18% dei casi), compare generalmente su cute sana e tende ad accrescersi con una modalità di crescita prevalentemente verticale. Può avere colore bruno nerastro ma anche essere acromico; può inoltre ulcerarsi e sanguinare. Circa il 10% dei pazienti affetti da melanoma sviluppa ulteriori melanomi durante il follow-up⁽⁹⁾. La prognosi di tali pazienti è condizionata non dal numero delle lesioni ma dallo spessore del melanoma più spesso e non è in ogni caso peggiore rispetto a quella dei pazienti con un melanoma unico.

La classificazione in istotipi è basata sulla consensus conference di Sidney del 1982⁽¹⁰⁾. La principale distinzione è tra il melanoma *in situ* e le diverse varianti del melanoma invasivo. Per melanoma *in situ* si intende una proliferazione intraepidermica, a cellule singole o a nidi, di melanociti atipici di dimensione e forma variabile. Tale proliferazione è confinata all'epidermide

e per questo motivo è virtualmente impossibile che il melanoma *in situ* possa dare origine a metastasi. Per quanto riguarda il melanoma invasivo, si possono distinguere 4 istotipi principali^(11,12). La forma più comune (70%) è quella a diffusione superficiale; il restante 30% è distribuito in maniera uguale tra le tre varietà lentigo maligna-melanoma, acrale lentiginoso e nodulare. Il melanoma nodulare è caratterizzato fin dall'origine da una proliferazione di tipo verticale e ha come corrispettivo clinico il melanoma cupoliforme; le altre varietà presentano una prima fase di crescita radiale-orizzontale che ha come corrispettivo clinico il melanoma piano e una fase tardiva di crescita verticale corrispondente clinicamente al melanoma piano-cupoliforme. Varianti meno comuni sono rappresentate dal melanoma desmoplastico, dal melanoma a cellule di Schwann, dal melanoma a cellule globose e dal melanoma mixoide.

Diagnosi

La diagnosi clinica del melanoma, basata fino ad alcuni anni or sono esclusivamente sull'identificazione di peculiari caratteristiche di asimmetria, irregolarità nei bordi e nel colore, incremento dimensionale e evolutività nell'ambito delle lesioni pigmentate (regola dell'ABCDE), attualmente si avvale dell'ausilio della dermatoscopia, una metodica non invasiva che può essere ulteriormente implementata mediante l'utilizzo di sistemi computerizzati di analisi di immagine. Tale metodica permette di visualizzare caratteristiche morfologiche degli strati superficiali della cute (dal corneo fino al derma superficiale) non altrimenti apprezzabili ad occhio nudo e correlabili con specifiche strutture istologiche. Indipendentemente dallo strumento di osservazione utilizzato, esistono sistemi di archiviazione dell'immagine digitale, adatti al monitoraggio delle lesioni pigmentate nei successivi controlli. La dermatoscopia permette di migliorare l'accuratezza diagnostica del 15-20% rispetto alla semplice osservazione clinica; tuttavia l'esame dermatoscopico può risultare scarsamente affidabile nel caso di lesioni completamente amelanotiche, in quelle con pigmentazione troppo intensa oppure nel caso di lesioni traumatizzate⁽¹³⁻¹⁵⁾.

Stadiazione del melanoma e storia naturale della patologia

La stadiazione attualmente seguita per il melanoma è quella proposta dall'American Joint Committee on Cancer (AJCC)⁽¹⁶⁾. Rispetto alle versioni precedentemente utilizzate⁽¹⁷⁾ vengono mantenuti immutati i cut-off dello

spessore di Breslow che individuano i differenti T-score (≤ 1 ; 1-2; 2-4; > 4 mm) e l'ulcerazione mantiene il ruolo di fattore prognostico indipendente, in grado di modificare lo stadio a parità di spessore di Breslow. A differenza della precedente versione, però, il livello di Clark non viene più preso in considerazione, mentre è inserito il parametro delle mitosi limitatamente a melanomi di spessore ≤ 1 mm. Per quanto riguarda i melanomi più spessi, viene confermata la necessità di effettuare la biopsia del linfonodo sentinella. Hanno un ruolo prognostico anche la sede del melanoma primitivo, il tipo istologico, l'età e il sesso del paziente. La progressione di malattia si verifica in una percentuale di pazienti compresa tra il 15 e il 35% circa⁽¹⁸⁾. La metastatizzazione può avvenire per contiguità, per via linfatica (ai linfonodi regionali o "in transit") o per via ematica, mentre la comparsa di recidive locali è prevalentemente conseguente ad una escissione chirurgica non radicale. La maggiore incidenza di metastasi si riscontra nei primi anni dopo l'asportazione del melanoma primitivo, ma nel 2-3% dei casi sono descritte anche metastasi che compaiono tardivamente, 10 e più anni dopo la prima exeresi. La sede del melanoma primitivo condiziona significativamente la sede della prima progressione: per i melanomi localizzati all'arto inferiore, la prima sede di metastasi è quasi sempre rappresentata dai linfonodi inguinali, mentre metastasi viscerali "d'embliè" sono più frequenti per melanomi localizzati al dorso, capo-collo e arti superiori.

Trattamento del melanoma primitivo e delle metastasi linfonodali

Il trattamento elettivo per il melanoma primitivo è chirurgico⁽¹⁹⁾. La lesione pigmentata con caratteristiche di sospetto va asportata interamente, con margini non superiori a 5 mm. La biopsia incisionale è indicata solo per lesioni di grandi dimensioni o localizzate in sedi critiche quali il volto, le mucose, le unghie. Quando la diagnosi di melanoma viene confermata dall'esame istologico, è necessario procedere ad un secondo intervento di radicalizzazione, con ampliamento dei margini del tessuto circostante la sede della prima lesione ed estensione in profondità fino alla fascia muscolare. I margini dell'asportazione variano da 1 a 3 cm a seconda dello spessore della lesione primitiva⁽²⁰⁾.

In concomitanza con l'intervento di radicalizzazione, per melanomi ad elevato rischio di metastasi (spessore di Breslow uguale o $>$ di 1 mm; ulcerazione; numero di mitosi ≥ 1 /mm) viene effettuata la ricerca del linfonodo sentinella, secondo la metodica descritta da Morton nel 1992⁽²¹⁾. Tale procedura, oltre ad essere indispensabile per la corretta stadiazione del

melanoma, è da considerarsi terapeutica: in caso di positività del infonodo sentinella viene infatti effettuata la dissezione completa della stazione linfonodale corrispondente.

Nella letteratura, il tasso di linfonodi sentinella falsi negativi varia dal 2 al 16%, ma questo tasso è spesso calcolato non correttamente. Nella nostra esperienza solo una frazione di pazienti con biopsia negativa che ha subito una progressione clinica dovrebbe essere considerato come falso negativo. In uno studio condotto dal nostro gruppo⁽²²⁾ abbiamo analizzato i dati clinici raccolti da 688 pazienti con melanoma sottoposti a biopsia del linfonodo sentinella. Abbiamo concentrato la nostra attenzione sui pazienti che hanno sviluppato una progressione della malattia dopo una biopsia del linfonodo sentinella negativa, pari al 22,7% del totale, evidenziando come i pazienti anziani e/o con melanomi ad alto rischio avessero una maggiore probabilità di progressione della malattia. Tra questi, le donne con età elevata alla diagnosi e con melanoma agli arti inferiori sviluppavano prevalentemente metastasi cutanee all'arto stesso, mentre i maschi con melanoma primitivo al tronco sviluppavano prevalentemente metastasi viscerali, facendo ipotizzare vie di drenaggio alternative rispetto a quella linfatica.

Terapia adiuvante

L'unico farmaco per cui finora è stata documentata una potenziale efficacia nel trattamento adiuvante del melanoma è l'interferon-alfa (IFN). Gli studi pubblicati in letteratura hanno utilizzato schemi a differenti dosi di IFN, anche se però finora non è stato raggiunto un pieno accordo su quali siano le dosi e le modalità di somministrazione più efficaci.

Per quanto riguarda il melanoma primitivo, è stato evidenziato un beneficio sull'intervallo libero da malattia solo per quanto riguarda l'IFN a basse dosi in due studi randomizzati^(23,24). Per quanto riguarda, invece, il trattamento adiuvante dei pazienti con malattia metastatica regionale, i dati più consistenti riguardano l'uso di IFN ad alte dosi. I risultati riportati da Kirkwood et al. (ECOG 1684), confermati in due studi successivi (E1690, E1694) hanno documentato un vantaggio prognostico mediante impiego di IFN ad alte dosi (20 MU/m² endovena per 5 giorni alla settimana per 4 settimane, poi 10 MU/m² per via sottocutanea 3 volte alla settimana per 48 settimane). Il tasso di sopravvivenza è del 37% nel gruppo di controllo e del 46% nel gruppo trattato. Nonostante la severa tossicità sistemica (il 67% dei pazienti ha sviluppato una tossicità di grado III) la FDA ha approvato l'impiego di IFN ad alte dosi come trattamento adiuvante post-chirurgico. In

Italia, l'impiego di IFN ad alte dosi è autorizzato come terapia adiuvante in pazienti liberi da malattia in seguito ad intervento chirurgico ad alto rischio di recidiva sistemica, alle dosi previste dal protocollo di Kirkwood.

Terapia delle metastasi cutanee

Il coinvolgimento cutaneo o sottocutaneo è un evento frequente nel decorso clinico del melanoma: lesioni cutanee sono presenti nel 10-17% dei pazienti e in quasi il 50% dei pazienti con malattia metastatica. Sulla base della distanza dal melanoma primario, le metastasi cutanee sono descritte come recidive locali (ricrescita del tessuto neoplastico non asportato completamente), malattia in transito (tra il sito del melanoma primario e i linfonodi regionali) o metastasi a distanza (per disseminazione ematogena).

Da un punto di vista clinico, l'aspetto più comune delle metastasi cutanee è dato da papule o noduli di colore bruno-nerastro, talvolta ulcerate. Tuttavia, un ampio spettro morfologico delle lesioni è stato descritto: chiazze o placche eritematose, lesioni infiammatorie erisipelatoidi, lesioni sclerodermiformi, aree di alopecia o lesioni vescico-bollose a distribuzione zosteriforme⁽²⁵⁾.

Nella nostra esperienza, nel 56,3% dei pazienti, la cute era il primo sito di coinvolgimento metastatico dopo la diagnosi del melanoma primario, mentre il 28,4% della metastasi sorgeva dopo malattia linfonodale regionale. Un coinvolgimento cutaneo dopo metastasi viscerali è stata rilevato nel 3,1% dei pazienti, mentre nel 12% metastasi cutanee sono state diagnosticate contemporaneamente a metastasi linfonodali e viscerali. Nel gruppo di pazienti con metastasi a distanza, il melanoma primario era localizzato prevalentemente a tronco e dorso, mentre gambe e piedi erano la sede più rappresentata del melanoma primario per pazienti con metastasi cutanee a diffusione locoregionale. L'intervallo libero da malattia dalla prima diagnosi melanoma era di soli 1,3 anni per i pazienti con prima recidiva locoregionale cutanea, tuttavia, lo stesso gruppo di pazienti ha mostrato una progressione molto tardi per malattia viscerale, con un tempo di progressione di più di 62,5 mesi. Al contrario, i pazienti con lesioni cutanee diffuse come primo sito di progressione, avevano un intervallo più lungo dalla prima diagnosi (2,9 anni) ma un più breve tempo di progressione viscerale⁽²⁶⁾. Le differenze tra i due gruppi erano statisticamente significative e a nostro avviso devono essere prese in considerazione nella loro gestione clinica e nella scelta delle opzioni terapeutiche. Inoltre, la scelta della modalità di trattamento per le metastasi cutanee dipende da sede e numero di lesioni, presenza di coinvolgimento sistemico, età e condizioni generali dei pazienti.

La chirurgia è il trattamento più adeguato quando le lesioni sono raggruppate in un'area circoscritta. Per metastasi diffuse ad un singolo arto può essere considerata la perfusione ipertermica con antiproliferativi, con un tasso di risposta globale del 48-91%. La radioterapia può essere utilizzata solo a scopo palliativo. Recentemente, anche l'elettrochemioterapia è stata proposta come nuova modalità di trattamento per le metastasi cutanee, con un tasso di risposta globale del 88% e una percentuale di remissione completa del 42%⁽²⁷⁾.

Terapia del melanoma metastatico in fase avanzata

In presenza di malattia metastatica disseminata, la prognosi è infausta, con una sopravvivenza mediana di 6-8 mesi ed un tasso di sopravvivenza a 5 anni pari al 6-10%. L'impiego di farmaci chemioterapici per via sistemica rappresenta il trattamento di scelta in pazienti affetti da melanoma metastatico in fase avanzata, con localizzazioni viscerali, non trattabili chirurgicamente (stadio IV secondo la classificazione AJCC)⁽²⁹⁾. Le principali opzioni terapeutiche includono l'impiego di agenti chemioterapici e di modulatori della risposta biologica, quali l'interferone e l'interleuchina-2, anche in associazione in protocolli polichemioterapici o (poli)chemio-immunoterapici.

Numerosi protocolli terapeutici sono stati analizzati nel tentativo di aumentare l'attività clinica rispetto alla monochemioterapia e modificare la storia naturale della malattia^(30,31). L'impiego di protocolli polichemioterapici non è risultato associato ad un significativo incremento della sopravvivenza rispetto alla sola dacarbazina. Per quanto riguarda i tassi di risposta, le percentuali ottenute con la dacarbazina (da 5,3% fino a 28,6%) sono solo lievemente inferiori, se non sovrapponibili, a quelle riscontrate con l'utilizzo di protocolli polichemioterapici, gravati tuttavia da una tossicità sistemica nettamente maggiore. Gli incoraggianti risultati ottenuti in studi di fase II con schemi integrati o sequenziali di chemioimmunoterapia, per lo più con cisplatino, interleuchina-2 e interferone, non sono stati confermati in studi randomizzati. Infatti, sebbene protocolli chemioimmunoterapici possano determinare un incremento delle percentuali di risposta (dal 22,9% fino al 48%) rispetto alla polichemioterapia, tale incremento non si traduce in un parallelo aumento della sopravvivenza, che rimane inferiore ad 1 anno.

Negli ultimi anni, l'approccio terapeutico al paziente con melanoma metastatico in fase avanzata si è radicalmente trasformato grazie all'individuazione di farmaci in grado di riconoscere selettivamente specifici "target" espressi dalla cellula di melanoma, quali molecole che giocano

un ruolo chiave nei meccanismi di controllo della reazione immunitaria o mutazioni a livello di pathways coinvolte nel processo di proliferazione o metastatizzazione. È importante sottolineare come per due di questi (ipilimumab e vemurafenib), per la prima volta nel campo della terapia del melanoma metastatico, studi randomizzati abbiano dimostrato un significativo incremento del tasso di risposta e/o della sopravvivenza rispetto alla chemioterapia standard rappresentata dalla dacarbazina.

In particolare, l'Ipilimumab, registrato nel 2011 dalla FDA, e recentemente approvato per uso commerciale in Italia, è un anticorpo monoclonale umano che si lega a CTLA-4, molecola di superficie delle cellule T helper che svolge un ruolo critico nella regolazione della risposta immunitaria naturale, bloccandone l'attività e quindi inducendo una risposta immunitaria attiva contro le cellule tumorali⁽³²⁾. Studi randomizzati hanno dimostrato come l'impiego di ipilimumab consenta un significativo incremento della sopravvivenza rispetto alla chemioterapia standard in pazienti in fase avanzata. Lo studio randomizzato multicentrico di Robert et al⁽³³⁾ condotto su 502 pazienti evidenziava un significativo incremento della sopravvivenza mediana in pazienti trattati con ipilimumab alle dosi di 10 mg/kg (11,2 mesi) rispetto ai pazienti trattati con dacarbazina (9 mesi). Un secondo studio randomizzato confermava una significativa maggiore efficacia di ipilimumab (alle dosi di 3 mg/kg) nei confronti di vaccino con peptide gp100⁽³⁴⁾.

Negli ultimi anni, i notevoli progressi in campo biomolecolare hanno portato all'individuazione di specifiche mutazioni a livello dei geni della cellula melanocitaria. Il 50-60% dei melanomi a diffusione superficiale presenta mutazioni a carico di BRAF, gene che codifica per una proteina-chinasi coinvolta nei processi di regolazione della crescita cellulare. Tra le altre mutazioni identificate, la mutazione di NRAS si osserva nel 15-30% dei melanomi ed è mutuamente esclusiva con la mutazione di BRAF; p16 e p14ARF (CDKN2A) sono spesso inattivati nei melanomi che insorgono su cute cronicamente fotoesposta, mentre mutazioni di cKIT si osservano più frequentemente nei melanomi acrali, mucosi e su cute fotodanneggiata⁽³⁵⁾. Al di là del significato biologico, l'individuazione di tali mutazioni costituisce un target per lo sviluppo di farmaci che le riconoscono e legandosi al gene mutato, inducono con vari meccanismi la necrosi o l'apoptosi della cellula tumorale. Sono sempre più numerosi i trials clinici riguardanti farmaci con attività inibitoria che hanno come target queste mutazioni. Tra questi, il più promettente sembra essere il vemurafenib, un inibitore di BRAF che agisce in presenza della mutazione pV600E. Studi di fase III hanno evidenziato la sua superiorità nei confronti della dacarbazina in termini sia di sopravvivenza

globale sia di tassi di risposta. In uno studio randomizzato multicentrico (BRIM3)⁽³⁶⁾ condotto su 680 pazienti in stadio IIIC o IV, non operabili né precedentemente trattati, positivi per tale mutazione, si sono confrontati gli effetti del trattamento con Vemurafenib e Dacarbazina: si è visto un incremento del tasso di risposta (dal 5% con dacarbazina al 48% con Vemurafenib) e della sopravvivenza mediana da 8 mesi per i pazienti trattati con Dacarbazina a 12,3 mesi per quelli trattati con Vemurafenib. Il trattamento con Vemurafenib ha determinato una riduzione del rischio di morte del 64%.

Fattori prognostici “immunologici”: infiltrato infiammatorio, vitiligine, regressione

La stretta correlazione tra attivazione immunitaria e storia naturale del melanoma emerge con tutte le sue problematiche dall’analisi di tre aspetti.

L’infiltrato infiammatorio linfocitario (TILs) rappresenta la risposta immune cellulo-mediata del paziente diretta verso le cellule di melanoma e si classifica in tre categorie: Brisk (infiltrato infiammatorio linfocitario diffuso in tutta la massa neoplastica), Non brisk (infiltrazione linfocitaria focale) e Assente^(37, 38). Alcuni studi effettuati mediante microscopia ed immunohistochimica considerano l’infiltrato infiammatorio come un fattore prognostico favorevole, mentre altri non dimostrano una relazione statisticamente significativa tra TIL e prognosi. Questa discordanza potrebbe essere imputabile all’associazione di altri fattori prognostici all’infiltrato infiammatorio, tanto da alterarne i risultati. Gli studi più recenti si soffermano maggiormente sull’importanza dell’entità e dello stato di attivazione dell’infiltrato linfocitario più che sulla tipologia dello stesso.

Per quanto riguarda la vitiligine, a partire dagli anni ‘70 è stato ipotizzato che l’associazione tra le due malattie possa non essere casuale, sebbene sia opposto il meccanismo patogenetico: se infatti il melanoma è determinato dalla proliferazione incontrollata dei melanociti, la vitiligine è il risultato della loro completa distruzione. Nella nostra esperienza, su un totale di 2.954 pazienti affetti da melanoma sono stati evidenziati 80 casi di vitiligine pari al 2,7% della popolazione considerata⁽³⁹⁾. I dati ottenuti dall’analisi di questa casistica dimostrano come una ristretta, ma significativa percentuale di pazienti affetti da melanoma possa sviluppare, durante il loro decorso clinico e dopo una mediana di più di 3 anni dalla prima diagnosi, lesioni vitiligoidi. La maggiore prevalenza di tale fenomeno rispetto alla popolazione sana ne testimonierebbe la rilevanza clinica e biologica. Inoltre, il trattamento con farmaci modulatori della risposta biologica potrebbe ulteriormente accrescere

l'espressività clinica di tale fenomeno. La presenza di vitiligine è associata ad una prognosi migliore, in termini di sopravvivenza globale, sia per quanto riguarda i pazienti con melanoma localizzato esclusivamente alla cute, sia in pazienti metastatici.

Il fenomeno della regressione a carico della lesione primitiva di melanoma si verifica a seguito dell'interazione tra le cellule del sistema immunitario e le cellule tumorali. Si tratta di un processo articolato in più fasi: inizialmente infatti si ha un infiltrato linfo-istioide accompagnato da processi neo-angiogenetici, mentre in fase più avanzata si verifica un fenomeno di fibrosclerosi diffuso. Il ruolo come fattore prognostico è ancora controverso. Alcuni studi hanno dimostrato un rischio di progressione significativamente aumentato per melanomi sottili che presentavano regressione; la regressione, essendo legata alla distruzione della componente della fase di crescita verticale, potrebbe quindi causare una sottostima dello spessore di Breslow. Altre proposte si basavano invece sull'assunto che la presenza di cellule metastatiche nei linfonodi regionali potessero stimolare una risposta immune provocando quindi la regressione del tumore primitivo. Partendo da queste considerazioni alcuni autori hanno quindi riconsiderato il fenomeno della regressione, individuandone un ruolo come fattore prognostico favorevole^(40,41).

BIBLIOGRAFIA

1. *Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program*. "National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program, Cancer Statistics Branch", 2008; SEER*Stat Database.
2. Curado MP, Edwards B, Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M, Boyle A. *Cancer Incidence in Five Continents*. IARC Scientific Publications 2007; Lyon, IARC.
3. Fargnoli MC, Piccolo D, Altobelli E, Formicone F, Chimenti S, Peris K. *Constitutional and environmental risk factors for cutaneous melanoma in an Italian population. A case-control study*. *Melanoma Res* 2004; 14: 151-157.
4. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, Melchi CF. *Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi*. *Eur J Cancer* 2005; 41: 28-44.

5. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C, Boyle P, Melchi CF. *Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors*. Eur J Cancer. 2005; 41: 2040-2059.
6. Bradford PT, Freedman DM, Goldstein AM, Tucker MA. *Increased risk of second primary cancers after a diagnosis of melanoma*. Arch Dermatol. 2010; 146: 265-272.
7. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, Melchi CF. *Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure*. Eur J Cancer. 2005; 41: 45-60.
8. Savoia P, Fava P, Osella-Abate S, Nardò T, Comessatti A, Quaglino P, Bernengo MG. *Melanoma of unknown primary site: a 33-year experience at the Turin Melanoma Centre*. Melanoma Res. 2010; 20: 227-232.
9. Savoia P, Quaglino P, Verrone A, Bernengo MG. *Multiple primary melanomas: analysis of 49 cases*. Melanoma Res. 1998; 8: 361-366.
10. Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. *A study of tumor progression: the precursors lesions of superficial spreading and nodular melanoma*. Hum Pathol. 1984; 15: 1147-65.
11. McGovern VJ, Cochran AJ, Van der Esch EP, Little JH, MacLennan R. *The classification of malignant melanoma, its histological reporting and registration. A revision of the 1972 Sydney classification*. Pathology. 1986; 18: 12-21.
12. Reed RJ. *The histological variance of malignant melanoma: the interrelationship of histological subtype, neoplastic progression and biological behaviour*. Hum Pathol. 1985; 17: 301.
13. Argenziano G, Kittler H, Ferrara G, Rubegni P, Malvey J, Puig S, Cowell L, Stanganelli I, De Giorgi V, Thomas L, Bahadoran P, Menzies SW, Piccolo D, Marghoob AA, Zalaudek I. *Slow-growing melanoma: a dermoscopy follow-up study*. Br J Dermatol. 2010; 162: 267-273.
14. Carli P, De Giorgi V, Crocetti E, Mannone F, Massi D, Chiarugi A, Giannotti B. *Improvement of malignant/benign ratio in excised melanocytic lesions in the 'dermoscopy era': a retrospective study 1997-2001*. Br J Dermatol. 2004; 150:687-692.
15. Carli P, De Giorgi V, Chiarugi A, Nardini P, Weinstock MA, Crocetti E, Stante M, Giannotti B. *Addition of dermoscopy to conventional naked-eye examination in melanoma screening: a randomized study*. J Am Acad Dermatol. 2004; 50: 683-689.
16. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. *Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification*. J Clin Oncol. 2009; 20: 6199-6206.
17. Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. *Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma*. J Clin Oncol. 2001; 19: 3635-3648.
18. Bernengo MG, Quaglino P, Cappello N, Fierro MT, DOveil GC, Macripò G, Osella-Abate S, Peroni A, Lisa F, Savoia P. *Time course and pattern of relapse in stage I-II primary cutaneous melanoma: a multivariate analysis of disease-free survival in 3174 patients followed-up at the Turin Melanoma Centre from 1975 to 2004*. G It Dermatol Venereol. 2005; 140: 191-200.

19. Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, Grob JJ, Malvey J, Newton-Bishop J, Stratigos A, Pehamberger H, Eggermont A. *Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline*. Eur J Cancer. 2010; 46: 270-283.
20. Lens MB, Nathan P, Bataille V. *Excision Margins for Primary Cutaneous Melanoma: updated pooled analysis of randomised controlled trials*. Arch Surg. 2007; 142.
21. Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, Foshag LJ, Cochran AJ. *Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma*. Arch Surg. 1992; 127: 392-399.
22. Savoia P, Fava P, Caliendo V, Osella-Abate S, Ribero S, Quaglino P, Macripò G, Bernengo MG. *Disease progression in melanoma patients with negative sentinel lymph node: does false-negative specimens entirely account for this phenomenon?* J Eur Acad Dermatol Venereol. 2012; 26: 242-248.
23. Grob JJ, Dreno B, de la Salmoniere P, Delaunay M, Cupissol D, Guillot B, Souteyrand P, Sassolas B, Cesarini JP, Lionnet S, Lok C, Chastang C, Bonerandi JJ. *Randomised trial of interferon alpha-2a as adjuvant therapy in resected primary melanoma thicker than 1.5 mm without clinically detectable node metastases*. Lancet. 1998; 351: 1905-1910.
24. Kirkwood JM, Ibrahim JG, Sondak VK, Richards J, Flaherty LE, Ernstoff MS, Smith TJ, Rao U, Steele M, Blum RH. *High- and low-dose Interferon Alfa-2b in high-risk melanoma: first analysis of Intergroup trial E1690/S9111/C9190*. J Clin Oncol. 2000; 18: 2444-2458.
25. Kirkwood JM, Ibrahim JG, Sosman JA, Sondak VK, Agarwala SS, Ernstoff MS, Rao U. *High-dose interferon alfa-2b significantly prolongs relapse-free and overall survival compared with the GM2-KLH/QS-21 vaccine in patients with resected stage IIb-III melanoma: results of intergroup trial E1694/S9512/C509801*. J Clin Oncol. 2001; 19: 2370-2380.
26. Savoia P, Fava P, Deboli T, Quaglino P, Bernengo MG. *Zosteriform cutaneous metastases: a literature meta-analysis and a clinical report of three melanoma cases*. Dermatol Surg. 2009; 35: 1355-1363.
27. Savoia P, Fava P, Nardò T, Osella-Abate S, Quaglino P, Bernengo MG. *Skin metastases of malignant melanoma: a clinical and prognostic survey*. Melanoma Res. 2009; 19: 321-326.
28. Quaglino P, Mortera C, Osella-Abate S, Barberis M, Illengo M, Rissone M, Savoia P, Bernengo MG. *Electrochemotherapy with intravenous bleomycin in the local treatment of skin melanoma metastases*. Ann Surg Oncol. 2008; 15: 2215-2222.
29. Eigentler TK, Caroli UM, Radny P, Garbe C. *Palliative therapy of disseminated malignant melanoma: a systematic review of 41 randomised clinical trials*. Lancet Oncol. 2003; 4: 748-759.
30. Ives NJ, Stowe RL, Lorigan P, Wheatley K. *Chemotherapy compared with biochemotherapy for the treatment of metastatic melanoma: a meta-analysis of 18 trials involving 2,621 patients*. J Clin Oncol. 2007; 25: 5426-5434.
31. Ollila DW. *Complete metastasectomy in patients with stage IV metastatic melanoma*. Lancet Oncol. 2006; 7: 919-924.
32. Tarhini A, Lo E, Minor DR. *Releasing the Brake on the Immune System: Ipilimumab in Melanoma and Other Tumors*. Cancer Biother & Radiopharm. 2010; 25: 601-613.

33. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Garbe C, Lebbe C, Baurain JF, Testori A, Grob JJ, Davidson N, Richards J, Maio M, Hauschild A, Miller WH Jr, Gascon P, Lotem M, Harmankaya K, Ibrahim R, Francis S, Chen TT, Humphrey R, Hoos A, Wolchok JD. *Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma*. N Engl J Med. 2011; 364: 2517-2526.
34. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbé C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma*. N Engl J Med. 2010; 363: 711-723.
35. Vidwans SJ, Flaherty KT, Fisher DE, Tenenbaum JM, Travers MD, Shrager J. *A melanoma molecular disease model*. PLoS One. 2011; 6: 1-10.
36. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA. *Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation*. N Engl J Med. 2011; 364: 2507-2516.
37. Oble DA, Loewe R, Yu P, Mihm MC Jr. *Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma*. Cancer Immun. 2009; 9: 3-12.
38. Taylor RC, Patel A, Panageas KS, Busam KJ, Brady MS. *Tumor-infiltrating lymphocytes predict sentinel lymph node positivity in patients with cutaneous melanoma*. J. Clin. Oncol. 2007; 25: 869-875.
39. Quaglino P, Marengo F, Osella-Abate S, Cappello N, Ortoncelli M, Salomone B, Fierro MT, Savoia P, Bernengo MG. *Vitiligo is an independent favourable prognostic factor in stage III and IV metastatic melanoma patients: results from a single-institution hospital-based observational cohort study*. Ann Oncol. 2010, 4: 409-414.
40. Kaur C, Thomas RJ, Desai N, Green MA, Lovell D, Powell BW, Cook MG. *The correlation of regression in primary melanoma with sentinel lymph node status*. J Clin Pathol. 2008; 61: 297-300.
41. Liskay G, Orosz Z, Péley G, Csuka O, Plótár V, Sinkovics I, Bánfalvi T, Fejös Z, Gilde K, Kásler M. *Relationship between sentinel lymph node status and regression of primary malignant melanoma*. Mel Res. 2005; 15: 509-514.

FATTORI GENETICI PREDISPONENTI AL CARCINOMA DELLA MAMMELLA

*Barbara Pasini^{1,2}, Francesca Vignolo Lutati², Guido Casalis Cavalchini²,
Anna Allavena², Paola Ogliara², Cecilia Bracco^{1,2}*

¹ Dipartimento di Scienze Mediche - Università degli Studi di Torino

² SC Genetica Medica DU, AO Città della Salute e della Scienza di Torino

Parole chiave: *Carcinoma della mammella*
Predisposizione genetica
BRCA1
BRCA2
Prevenzione

Key words: *Breast cancer*
Genetic predisposition
BRCA1
BRCA2
Prevention

Riassunto

A circa 20 anni di distanza dalla dimostrazione dell'esistenza dei tumori ereditari della mammella, la componente genetica del rischio di sviluppare questa neoplasia appare quanto mai complessa e lascia presagire un futuro nel quale il percorso diagnostico consisterà nella determinazione di "profili genetici di rischio" piuttosto che nella semplice analisi di due o più geni maggiori di suscettibilità. Tuttavia, al momento, la ricerca di mutazioni dei geni *BRCA1* e *BRCA2* rappresenta l'unico test genetico offerto a scopo assistenziale in caso di tumore giovanile della mammella o di ricorrenza familiare di tumori della mammella e/o dell'ovaio. La sorveglianza senologica e la chirurgia di riduzione del rischio si sono dimostrate efficaci nel ridurre la morbilità e la mortalità per entrambe le neoplasie. L'avvento delle tecnologie di nuova generazione sia di sequenziamento del DNA sia di genotipizzazione consentirà nel futuro di estendere i test genetici anche ai numerosi geni di suscettibilità a rischio moderato e di personalizzare le stime di rischio includendo anche polimorfismi a bassa penetranza.

Abstract

Twenty years after the demonstration of the existence of inherited breast cancers, the genetic component of the risk of developing this neoplasia seems highly complex and lets foresee a future in which the diagnostic procedure will consist in the determination of risk profiles rather than in the simple analysis of two or more major susceptibility genes. However, currently, the search for germline mutations in *BRCA1* and *BRCA2* genes represents the only genetic test provided on a clinical basis in case of early-onset breast cancer or familial clustering of breast and/or ovarian cancers. Breast surveillance and risk reducing surgery have been proven effective in reducing morbidity and mortality for both tumors. The advent of new technologies of next generation sequencing and genotyping will allow in the future to extent the analysis to the many moderate risk genes and to customize the risk estimation including also low penetrance polymorphisms.

Fattori genetici predisponenti al carcinoma della mammella

Il carcinoma della mammella femminile ha una frequenza nella popolazione italiana del 7-10% e si presenta in forma familiare in circa il 15% dei casi. Per questa neoplasia sono noti numerosi fattori di rischio quali la durata della stimolazione ormonale della ghiandola (menarca precoce e menopausa tardiva), l'obesità, la vita sedentaria, il consumo di alcool, la densità mammaria e la familiarità. Di questi, tuttavia, la storia familiare positiva è considerato fin dagli anni '80 il principale fattore di rischio soprattutto all'aumentare del numero delle parenti affette e al decrescere dell'età alla diagnosi⁽¹⁾. Negli anni '90, la raccolta e lo studio di nuclei familiari con numerosi casi di tumore della mammella giovanile e pre-menopausale ha indotto ad ipotizzare l'esistenza di uno o più geni di predisposizione allo sviluppo del tumore mammario in grado di conferire, in caso di mutazione, un rischio molto alto (cosiddetti geni ad "alta penetranza"). Nei nuclei familiari "ad alto rischio" il tumore della mammella poteva essere considerato la manifestazione di una classica malattia ereditaria mendeliana e l'utilizzo dell'analisi di linkage ha permesso di assegnare ai cromosomi 17q e 13q i primi due loci di suscettibilità denominati BRCA1 (BRest CAncer 1) e BRCA2^(2,3) cui è seguita in breve tempo l'identificazione dei rispettivi geni^(4,5) (Tabella I). Negli anni successivi, l'applicazione dell'analisi di *linkage* allo studio dei nuclei familiari ad alto rischio privi di mutazioni dei geni *BRCA1* e *BRCA2* non ha permesso di identificare ulteriori geni di suscettibilità, mettendone persino in dubbio l'esistenza⁽⁶⁾. Nello stesso periodo, la scoperta che le proteine codificate dai geni *BRCA* fanno parte di complessi multi-proteici coinvolti nel riparo del DNA, ha dato avvio alla ricerca sistematica, nei casi di tumore della mammella familiari e sporadici, di mutazioni germinali, in classi di geni con funzione simile. L'approccio cosiddetto di *analisi dei geni candidati* ha permesso di identificare i cosiddetti "geni a penetranza intermedia" le cui mutazioni in eterozigosi conferiscono un rischio 2-4 volte superiore di sviluppare il tumore della mammella mentre i soggetti con mutazioni in omozigosi sono affetti da malattie, per lo più pediatriche, appartenenti alla categoria delle sindromi da instabilità cromosomica (sindrome di Fanconi, sindrome di Nijmegen, Atassia Telangiectasia)⁽⁷⁾ (Tabella I e Figura 1). Infine, lo sviluppo delle tecnologie di analisi massiva dei polimorfismi in singolo nucleotide (SNPs) ha dato impulso agli studi di associazione cosiddetti GWAS (*Genome Wide Association Studies*) che hanno portato alla identificazione di un numero sempre crescente di SNPs responsabili di modeste (OR < 1.5) ma significative fluttuazioni del rischio oncologico⁽⁷⁾. A circa 20 anni di distanza dalla dimostrazione dell'esistenza dei tumori ereditari della mammella, la

Gene	Cromosoma	Anno della scoperta	Nome della malattia, caratteristiche cliniche e rischio oncologico (rischio assoluto espresso in percentuale o rischio relativo espresso come <i>odd ratio</i>)
<i>BRCA1</i> <i>BRCA2</i>	17q21.31 13q13.1	1994 1995	Tumore ereditario della mammella e dell'ovaio rischio di tumore della mammella del 45-80%, dell'ovaio del 10-60%, del pancreas, della prostata (30-40%) e del tratto gastro-enterico (10-15%)
Geni responsabili di altre forme di predisposizione allo sviluppo di tumori			
<i>TP53</i>	17p13.1	1990	Sindrome di Li-Fraumeni: rischio di tumore della mammella pre-menopausale del 50-60% < 45 anni [sarcoma osso e tessuti molli, astrocitoma, glioblastoma, medulloblastoma, carcinoma dei plessi coroidei, tumore polmonare bronchiolo-alveolare, tumore della corteccia del surrene pediatrico e dell'adulto]
<i>CDH1</i>	16q22.1	1998	Tumore gastrico diffuso ereditario: rischio di tumore lobulare della mammella del 20-40% (fino al 60%) [rischio di tumore gastrico diffuso del 40-70% e fino all'80]
<i>PTEN</i>	10q23.31	1997	Sindrome di Cowden: rischio tumore della mammella del 25-50% (fino all'85%) [polipi amartomatosi multipli e ganglioneuromi del colon-retto, trichilemmomi e papule multiple del volto, cheratosi multiple palmo-plantari, papillomatosi multipla della mucosa orale, macrocefalia, gangliocitoma displastico del cervelletto, rischio di tumore dell'endometrio (5-10%), tiroide (3-10%), rene, colon (9%), melanoma]
<i>STK11^{LKB1}</i>	19p13.3	1998	Sindrome di Peutz-Jeghers: rischio di tumore della mammella del 32-54% [polipi di Peutz-Jeghers lungo l'intero tratto digerente (digiuno, ileo, duodeno, colon, retto e stomaco) e polipi adenomatosi, caratteristiche lesioni pigmentate delle labbra e della mucosa orale, rischio significativo di tumori del tratto gastro-enterico (38-66%), del pancreas (11-36%), del polmone (7-17%), ginecologici e del testicolo]
<i>NF1</i>	17q11.2	1990	Neurofibromatosi tipo 1: rischio di tumore della mammella del 20-35% < 70 anni [macchie caffè-latte (> 95%), freckling ascellare-inguinale (90%), neurofibromi cutanei (> 90%), displasia dello sfenoide e/o della tibia, scoliosi (6-40%), ipertensione, vasculite, neurofibroma plessiforme, glioma della via ottica (5-15%), schwannoma maligno (10%), feocromocitoma (5%), GIST (5%), leucemie e mielodisplasie, astrocitoma, melanoma, neoplasia della mammella (20-35%)]

Tabella I. Geni di suscettibilità allo sviluppo delle neoplasie della mammella (e dell'ovaio). Oltre ai due geni principali, BRCA1 e BRCA2, sono noti numerosi altri geni di (segue →)

Geni cosiddetti a penetranza intermedia o rischio moderato di tumore della mammella			
<i>ATM</i>	11q22.3	1995	OR = 2.4 (negli omozigoti: Atassia Telangectasia)
<i>CHEK2</i>	22q12.1	1999	OR = 2.0-5.7 per le mutazioni c.1100delC, delezione esoni 9-10, IVS2+1G>A a seconda della storia oncologica familiare e della popolazione (aumento del rischio anche per tumori del colon e della prostata)
<i>PALB2</i>	16p12.2	2007	OR = 2.3-4 e fino a 6 (aumento del rischio anche per tumori del pancreas, prostata, ovaio e melanoma) (negli omozigoti: Anemia di Fanconi - FANC-N con alto rischio oncologico)
<i>BRIP1</i>	17q23.2	2006	OR = 2-3 (negli omozigoti: Anemia di Fanconi - FANC-J)
<i>RAD51C</i>	17q22	2010	tumore ereditario della mammella e dell'ovaio con penetranza più tardiva rispetto alle mutazioni di <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> (negli omozigoti: fenotipo Anemia di Fanconi-like - FANC-O)
<i>SLX4</i>	16p13.3	2011	un solo caso descritto di tumore familiare della mammella con mutazione (negli omozigoti: sindrome di Fanconi - FANC-P)
<i>NBN^{NBS1}</i>	8q21.3	1998	OR = 2.8 per la mutazione c.657del5 (negli omozigoti: sindrome di Nijmegen)
<i>RAD50</i>	5q31.1	2009	OR = 4.3 per la mutazione p.687delT (negli omozigoti: fenotipo Nijmegen-like)
<i>MRE11A</i>	11q21	1998	poche mutazioni descritte in casi di tumore della mammella e di tumore ovarico (negli omozigoti: fenotipo Atassia-Telangiectasia-like)
<i>BARD1</i>	2q25	1998	poche mutazioni descritte di sicuro effetto patogenetico in casi di tumore della mammella e dell'ovaio
<i>RAP80</i>	5q35.2	2009	un solo caso descritto di tumore familiare della mammella con mutazione

predisposizione allo sviluppo del tumore della mammella che possiamo suddividere nelle due categorie dei "Geni responsabili di altre forme di predisposizione allo sviluppo di tumori" (malattie ereditarie autosomiche dominanti di cui vengono brevemente riassunte le principali caratteristiche cliniche) e dei "Geni cosiddetti a penetranza intermedia o a rischio moderato" (le cui mutazioni in eterozigosi conferiscono un aumento di rischio apparentemente meno significativo rispetto ai geni BRCA: alcuni di questi geni, se mutati in omozigosi, sono responsabili di malattie recessive facenti parte delle cosiddette Sindromi da instabilità cromosomica).

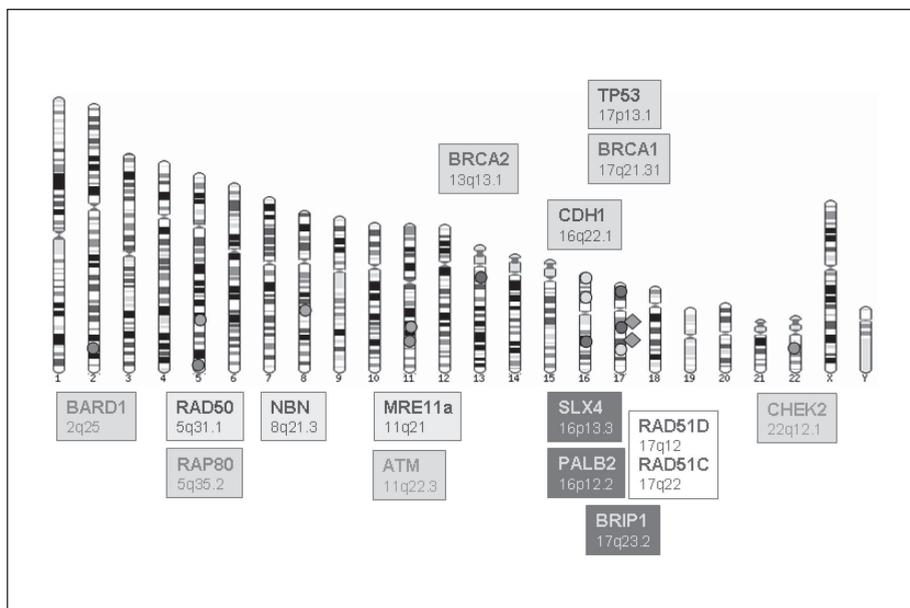


Figura 1. Geni di suscettibilità allo sviluppo del tumore della mammella.

Distribuzione nel genoma umano, rappresentato dagli ideogrammi dei 23 cromosomi, dei principali geni di predisposizione allo sviluppo del tumore della mammella. Nella metà superiore sono riportati i geni cosiddetti ad “alto rischio” (BRCA1, BRCA2, TP53 e CDH1); nella metà inferiore i geni cosiddetti a “rischio moderato” comprendenti i geni della risposta al danno del DNA (ATM e CHEK2), del pathway dell’Anemia di Fanconi (BRIP1, PALB2, SLX4), del complesso MRN (MRE11A, RAD50, NBN), codificanti proteine di legame con BRCA1 (BARD1, RAP80) e i geni paraloghi di RAD51 (RAD51C, RAD51D).

componente genetica del rischio di sviluppare questa neoplasia appare quanto mai complessa e lascia presagire un futuro nel quale il percorso diagnostico consisterà nella determinazione di “profili genetici di rischio” piuttosto che nella semplice analisi di due o più geni maggiori di suscettibilità.

I geni *BRCA1* e *BRCA2* e il tumore ereditario della mammella e dell’ovaio.

I geni *BRCA1* e *BRCA2* codificano due proteine di 1863 e 3418 aminoacidi, a struttura complessa, coinvolte nel riparo delle rotture del DNA a doppio filamento attraverso il meccanismo, considerato libero da errori, della ricombinazione omologa.

La proteina *BRCA2* partecipa direttamente al processo della ricombinazione omologa. *BRCA2* promuove infatti la corretta localizzazione

delle molecole di ricombinasi RAD51 lungo il DNA a singolo filamento attraverso la sua regione centrale composta da 8 ripetizioni BRC mentre il dominio C-terminale DBD (DNA/DSS1 Binding Domain), lega le strutture ibride di DNA a doppio e singolo filamento che si formano durante il processo della ricombinazione. Il corretto posizionamento dei monomeri di RAD51 consente alla ricombinasi di catalizzare l'appaiamento e lo scambio tra i filamenti omologhi di DNA durante il processo di riparo.

La proteina BRCA1 sembra svolgere un ruolo più complesso partecipando non solo alla ricombinazione omologa ma anche al controllo del ciclo cellulare, ai fenomeni di ubiquitinazione, alla regolazione della trascrizione e al rimodellamento della cromatina. Per quanto riguarda il riparo delle rotture a doppio filamento, la proteina BRCA1 sembra coinvolta nell'assemblaggio di complessi multi-proteici reclutati ai siti del danno attraverso la sua capacità di legare abraxas-RAP80 (riconoscimento degli istoni ubiquitinilati vicini al danno), il complesso MRN (MRE11-RAD50-NBN con attività elicastica), CtIP (con attività di resezione delle rotture), PALB2-BRCA2 (assemblaggio dei monomeri di RAD51). La capacità di BRCA1 di legarsi ad altre proteine sembra suggerire un ruolo di integrazione dei processi di riparo con altre risposte cellulari quali l'arresto del ciclo cellulare in fase G1/S (legame con BARD1 e attivazione di p53 e p21), in fase S (legame con BRIP1-TOPBP1) e in fase G2/M (legame con abraxas-RAP80), il rimodellamento della cromatina (legame con il complesso SW1-SNF) e il controllo della trascrizione (legame con la RNA polimerasi II attraverso i due domini C-terminali BRCT che potrebbe promuovere la trascrizione di p21, p27, GADD45 e reprimere la trascrizione della ciclina B1 e di MYC).

Una mutazione del gene *BRCA1* o del gene *BRCA2* è presente in circa 1 individuo su 400 e conferisce un alto rischio di sviluppare neoplasie della mammella e dell'ovaio (5-10 volte superiore) nonché rischi inferiori per lo sviluppo di altre neoplasie (prostata, pancreas, tumori del tratto gastroenterico). L'entità del rischio oncologico associato alle mutazioni dei geni *BRCA* è ancora controversa. Lo studio dei nuclei famigliari con numerosi membri affetti, utilizzati per le analisi di *linkage* che hanno permesso la scoperta dei geni *BRCA*, suggerivano un rischio di tumore della mammella a 70 anni superiore all'80% e un rischio di tumore ovarico superiore al 40% per *BRCA1* e intorno al 30% per *BRCA2*^(8,9). Le stime derivate dai nuclei famigliari identificati attraverso l'analisi dei geni *BRCA* in casi consecutivi di tumore suggeriscono rischi inferiori sia per il tumore della mammella (a 70 anni: 65-69% per BRCA1 e del 45-74% per BRCA2) sia per il tumore ovarico

(a 70 anni: 39-46% per BRCA1 e del 10-12% per BRCA2)^(10,11). Stime di rischio ancora diverse derivano dallo studio dei nuclei famigliari identificati attraverso i servizi di consulenza genetica con fluttuazioni significative tra popolazioni diverse (rischio di tumore della mammella: 52-68% per BRCA1, 47-75% per BRCA2; rischio di tumore ovarico: 22-60% per BRCA1, 18-30% per BRCA2)^(12,13). Tra i fattori che influenzano la penetranza delle mutazioni dei geni *BRCA1* e *BRCA2* bisogna considerare la coorte di nascita (con rischi decisamente superiori per le coorti più recenti), il fenotipo famigliare (con rischi superiori nelle famiglie con maggior numero di casi e diagnosi più giovanili), fattori ambientali e abitudini di vita, nonché la contemporanea presenza di varianti polimorfiche favorevoli o sfavorevoli⁽¹⁴⁾. La variabilità del rischio oncologico tra nuclei famigliari diversi pur con mutazione dello

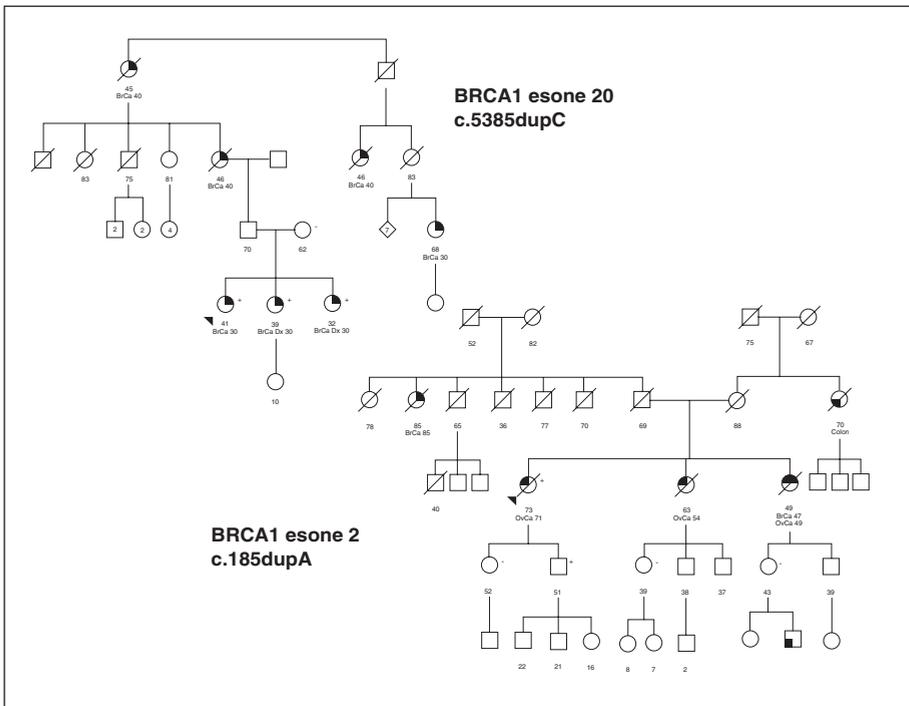


Figura 2. Nuclei famigliari con mutazione del gene BRCA1. Due nuclei famigliari con mutazione del gene BRCA1. Nella prima famiglia, la manifestazione prevalente di malattia è rappresentata dal tumore della mammella femminile (BrCa, icone con spicchio nero in alto a destra) mentre nella seconda dal tumore ovarico (OvCa, icone con spicchio blu in alto a sinistra). Gli individui affetti da altre neoplasie sono indicati dalle icone con spicchio nero in basso a sinistra.

stesso gene è ben evidente negli alberi genealogici riportati in Figura 2 e 3 dove sono rappresentate famiglie con prevalente ricorrenza della neoplasia mammaria o della neoplasia ovarica con mutazioni sia del gene *BRCA1* sia del gene *BRCA2*.

I tumori della mammella e dell'ovaio associati alle mutazioni dei geni *BRCA1* e *BRCA2* presentano caratteristiche morfologiche distintive⁽¹⁵⁾ che possono riflettersi in differenze nella prognosi⁽¹⁶⁾ e nella risposta alla terapia medica⁽¹⁷⁾. I tumori mammari associati alle mutazioni *BRCA1* sono più spesso di alto grado, talora con caratteristiche *basal-like* o descritti come midollari o midollari atipici e più spesso “triplo-negativi” (68%) rispetto ai tumori sporadici: il 78% non esprime i recettori per gli estrogeni (ER), il 79% non esprime i recettori per il progesterone (PgR) e il 90% non presenta

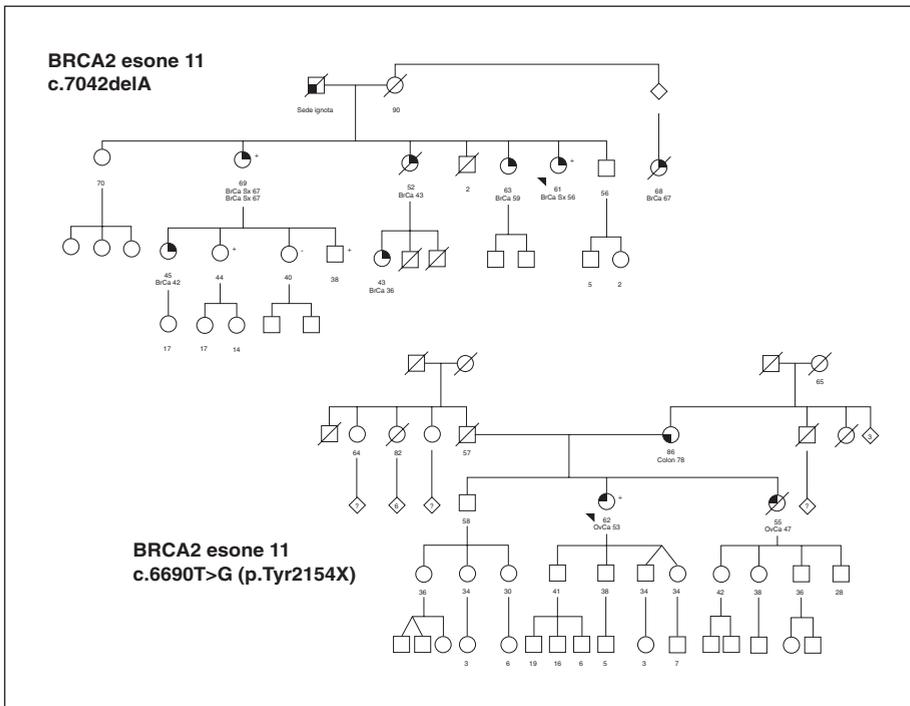


Figura 3. Nuclei famigliari con mutazione del gene *BRCA2*.

Due nuclei famigliari con mutazione del gene *BRCA2*. Nella prima famiglia, la manifestazione prevalente di malattia è rappresentata dal tumore della mammella femminile (BrCa, icone con spicchio nero in alto a destra) mentre nella seconda dal tumore ovarico (OvCa, icone con spicchio blu in alto a sinistra). Gli individui affetti da altre neoplasie sono indicati dalle icone con spicchio nero in basso a sinistra (verde in caso di neoplasia del colon).

amplificazione dell'oncogene HER2. I tumori associati alle mutazioni *BRCA2* sono "triplo-negativi" solo nel 16% dei casi mentre presentano positività per ER nel 77%, positività per PgR nel 65% ma negatività per l'HER2 nell'87% dei casi. In caso di mutazioni *BRCA1*, all'avanzare dell'età alla diagnosi aumenta la percentuale di tumori che esprimono i recettori ormonali mentre in caso di mutazioni *BRCA2* questi ultimi diminuiscono. Il rischio di tumore mammario contro-laterale si aggira intorno al 20-35% con un intervallo medio di 5 anni tra le due neoplasie. I tumori ovarici sono tipicamente sieroso-papilliferi (65%) e di alto grado (70%) senza differenze significative tra tumori associati a mutazioni di *BRCA1* o di *BRCA2*. Il 12% dei tumori ovarici sono endometriodi mentre solo il 2% a cellule chiare e l'1% di tipo mucinoso: è significativo il rischio di tumori ad insorgenza dalle fimbrie delle tube e di tumori peritoneali. Nel sesso maschile, il rischio di tumore della mammella è basso in presenza di mutazioni *BRCA1* ed è comunque inferiore al 10% nei casi con mutazioni *BRCA2*: questi ultimi presentano anche un rischio superiore di tumore della prostata (39%) che, in presenza di mutazione di questo gene, sembra avere anche un comportamento più aggressivo⁽¹⁸⁾.

Gestione clinica del rischio oncologico in presenza di mutazioni dei geni *BRCA1* e *BRCA2*

Nonostante le incertezze sulla stima della penetranza delle mutazioni dei geni *BRCA1* e *BRCA2*, la dimensione del rischio è tale da giustificare il ricorso a specifici programmi di sorveglianza clinica e di prevenzione chirurgica⁽¹⁹⁾.

La sorveglianza clinica viene di solito suggerita a partire dai 25-30 anni con visita senologica semestrale e risonanza magnetica mammaria annuale associata alla mammografia dopo i 35 anni. Non vi sono evidenze circa l'efficacia della sorveglianza degli annessi uterini che viene eseguita, in attesa della chirurgia preventiva, dai 30-35 anni con ecografia trans-vaginale e dosaggio del CA125 ogni 6 mesi circa. La chirurgia preventiva mammaria (meglio definita "chirurgia di riduzione del rischio") ha dimostrato una notevole efficacia nel prevenire lo sviluppo della neoplasia mammaria e le nuove tecniche chirurgiche *skin-sparing* e *nipple-sparing* sembrano facilitare la fase ricostruttiva assicurando buoni risultati estetici. Dei cinque studi recenti^(20,21,22,23,24) che riportano dati di *follow-up* su un totale di 831 donne con mutazioni dei geni *BRCA* sottoposte a mastectomia preventiva (Tabella II) solo uno⁽²¹⁾ segnala la diagnosi di tumore mammario dopo chirurgia preventiva in 3 donne con mutazione del gene *BRCA1* mentre due studi^(20,24) segnalano il riscontro di tumori

Autore (anno)	N° casi	N° casi con tumore mammario				Follow- Up (anni)	OR/HR	Note
		<i>BRCA1</i> MB +	<i>BRCA2</i> MB +	<i>BRCA1</i> MB -	<i>BRCA2</i> MB -			
Heemskerk -Gerritsen BAM (2013)	570	0/156 (0%)	0/56 (0%)	49/249 (20%)	8/109 (7%)	6.3	nd	Studio prospettico monocentrico (Rotterdam Family Cancer Clinic) Riscontro istologico di IDC o DCIS in 6 casi (2.8%) (4 <i>BRCA1</i> e 2 <i>BRCA2</i>) all'esame istologico; sopravvivenza a 10 anni: 99% nel gruppo MB+, 96% nel gruppo MB- (beneficio del 3%)
Skytte AB (2011)	307	3/67 (4%)	0/29 (0%)	12/134 (9%)	4/77 (5%)	ns	0.39 (0.11-1.3)	Studio retrospettivo e prospettico multicentrico in Danimarca (1996-2008). Nessun tumore oculto all'esame istologico
Arvel B (2011)	129	0/98 (0%)	0/31 (0%)	-	-	6.6	nd	Studio retrospettivo multicentrico in Finlandia
Domchek SM (2010)	1619	0/159 (0%)	0/88 (0%)	63/873 (7.2%)	35/499 (7%)	3	nd	Studio prospettico multicentrico 22 centri in Europa e Nord America Consorzio PROSE (1974-2008)
Kaas R (2010)	147	0/100 (0%)	0/47 (0%)	-	-	6.1 (<i>BRCA1</i>) 3.7 (<i>BRCA2</i>)	nd	Studio retrospettivo monocentrico NKI-AVL – Olanda (1995-2008) Riscontro istologico di 1 IDC (<i>BRCA2</i>) e 6 DCIS (4 <i>BRCA1</i> e 2 <i>BRCA2</i>) all'esame istologico (5%)

Tabella II. Studi recenti sull'efficacia della mastectomia bilaterale (MB) profilattica in donne con mutazioni dei geni *BRCA1* e *BRCA2*.

Dati derivati da cinque studi recenti^(20,21,22,23,24) sull'efficacia della mastectomia profilattica bilaterale nella prevenzione del tumore della mammella in donne con mutazione dei geni *BRCA1* e *BRCA2*. MB+ casi sottoposti a mastectomia; MB- casi non sottoposti a mastectomia, IDC = carcinoma duttale infiltrante, DCIS = carcinoma duttale in situ.

Autore (anno)	N° casi	N° casi con tumore peritoneale/ovarico				Follow- up (anni)	OR/ HR	95% CI	Note
		<i>BRCA1</i> OSB +	<i>BRCA2</i> OSB +	<i>BRCA1</i> OSB -	<i>BRCA2</i> OSB -				
Domchek SM (2010)	2617	10/681 (1.5%)	0/258 (0%)	76/1006 (7.5%)	22/672 (3.3%)	6	0.28 senza BrCa 0.14 precedente BrCa	0.12-0.69 0.04-0.59	Studio prospettico multicentrico 22 centri in Europa e Nord America Consorzio PROSE (1974-2008) Mortalità HR=0.40 (OvCa HR=0.21)
Kauff ND (2008)	792	3/325 (0.9%)	0/184 (0%)	10/173 (5.8%)	2/110 (1.8%)	3	0.15 <i>BRCA1</i>	0.04-0.56	Studio prospettico multicentrico 12 centri in Europa e Nord America Consorzio PROSE (1994-2004)
Laki F (2007)	85	0/53	0/32	–	–	3.3	nd	nd	Studio retrospettivo monocentrico su 89 donne sottoposte a OSB di cui 4 con diagnosi di tumore al momento dell'intervento (4.5%)
Finch A (2006)	1255	6/365 (1.6%)	1/111 (0.9%)	29/546 (5.3%)	3/233 (1.3%)	3.5	0.20	0.07-0.58	Studio prospettico multicentrico 32 centri in Europa, Nord America e Israele. Diagnosi di tumore al momento dell'intervento in 11/490 (2.2%)

Tabella III. Studi recenti sull'efficacia dell'ovaro-salpingectomia bilaterale (OSB) profilattica in donne con mutazioni dei geni *BRCA1* e *BRCA2*.

Dati derivati da quattro studi recenti^(23,25,26,27) sull'efficacia della ovaro-salpingectomia bilaterale nella prevenzione del tumore di origine annessiale in donne con mutazione dei geni *BRCA1* e *BRCA2*. OSB+ casi sottoposti a ovaro-salpingectomia bilaterale; OSB- casi non sottoposti a ovaro-salpingectomia bilaterale BrCa = tumore mammella.

mammari occulti nel 2,8-5% dei casi. La chirurgia di riduzione del rischio ovarico (ovaro-salpingectomia bilaterale) ha dimostrato una efficacia del 70-96% nel prevenire lo sviluppo di neoplasie di tipo ovarico^(23,25,26,27), con maggiore efficacia in caso di mutazioni *BRCA2* o di pregresso tumore mammario (Tabella III). Data la prognosi peggiore del tumore ovarico

rispetto a quello mammario, l'ovaro-salpingectomia bilaterale ha un impatto significativo sul rischio di mortalità (HR = 0,40) e in particolare sulla mortalità per tumore ovarico (HR = 0,21). L'asportazione preventiva delle ovaie, se eseguita in età pre-menopausale e prima dello sviluppo del tumore mammario, esercita anche un effetto di riduzione del rischio del 40-60% sul tumore della mammella^(23,25,28,29) con maggiore efficacia in caso di mutazioni BRCA2 (HR = 0,28-0,36), se eseguita prima dei 50 anni (HR = 0,51 vs 0,63) e nei confronti di tumori con recettori degli estrogeni espressi (OR = 0,22). L'ovaro-salpingectomia bilaterale ha un impatto favorevole anche sulla mortalità per tumore della mammella (HR = 0,44) e la sua efficacia nel ridurre il rischio di questo tumore permane anche somministrando una terapia ormonale sostitutiva a breve termine.

Quando proporre l'analisi dei geni *BRCA1* e *BRCA2*

Nella popolazione italiana i geni *BRCA1* e *BRCA2* presentano uno spettro mutazionale molto ampio: il test genetico si basa quindi sulla ricerca di mutazioni puntiformi nell'intera regione codificante dei due geni in sequenza o mediante tecniche conformazionali di buona sensibilità quali l'analisi in DHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*) o HRM (*High Resolution Melting*) integrata con la ricerca di delezioni/duplicazioni mediante metodica MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). In linea generale, il test genetico viene offerto in presenza di una probabilità di mutazione superiore al 10% calcolata mediante modelli informatici (es. BRCApro, BOADICEA, Cuzick-Tyrer ecc.) o sulla base delle seguenti indicazioni:

- casi sporadici di tumore della mammella < 35 anni (mutazioni nel 10% dei casi circa)
- casi sporadici di tumore della mammella maschile (< 50-60 anni) (mutazioni nel 10% dei casi circa)
- casi sporadici di tumore della mammella e dell'ovaio (mutazioni nel 30% dei casi circa)
- almeno due parenti di primo grado affetti da: tumore della mammella femminile < 50 anni, tumore della mammella femminile bilaterale, tumore della mammella triplo-negativo, tumore dell'ovaio, tumore della mammella maschile
- almeno tre parenti (tra loro di primo grado) affetti da neoplasia della mammella femminile a qualsiasi età

Fenotipo clinico	N° di affetti in famiglia	Totale casi	Totale casi con mutazione	% casi con mutazione	N° casi con mutazione <i>BRCA1</i>	N° casi con mutazione <i>BRCA2</i>	Totale casi senza mutazione	% casi senza mutazione
Solo neoplasie della mammella femminile e/o maschile	1 (BrCa F < 36 anni)	79	7	9	5	2	72	91
	1 (BrCa M.)	11	1	9	1	0	10	91
	2	157	19	12	11	8	138	88
	3	177	22	12	5	17	155	88
	4	113	12	11	3	9	101	89
	5	46	15	33	5	10	31	67
	da 6 a 11	28	6	21	0	6	22	79
totale		611	82	13%	30	52	529	87%
Neoplasie della mammella (F-M) e dell'ovaio	1	17	7	41	5	2	10	59
	2	51	16	31	13	3	35	69
	3	38	21	55	16	5	17	45
	4	35	25	71	21	4	10	29
	5	13	9	69	8	1	4	31
	da 6 a 12	18	15	83	9	6	3	17
totale		172	93	54 %	72	21	79	46%
Solo neoplasie dell'ovaio	1	3	2	67	2	0	1	33
	da 2 a 4	9	5	56	4	1	4	44
totale		12	7	58%	6	1	5	42
Totale casistica		795	182	23%	108	74	613	77%

Tabella IV. Risultato dell'analisi dei geni *BRCA1* e *BRCA2* eseguita in 795 casi indice affetti da tumore e suddivisi in base al fenotipo clinico.

Dati inerenti l'analisi dei geni *BRCA1* e *BRCA2* eseguita dal laboratorio della SC Genetica Medica DU del presidio Molinette di Torino in 795 casi indice affetti da tumore e suddivisi in base al fenotipo clinico ovvero in casi/nuclei famigliari con sole neoplasie della mammella (BrCa) femminile (F) e/o maschile (M), con neoplasie della mammella e dell'ovaio o con sole neoplasie ovariche.

Poiché in caso di test positivo per mutazione la sorveglianza clinica è di solito raccomandata a partire dai 25-30 anni, il test genetico per la ricerca di una mutazione nota in famiglia di solito viene eseguito dopo i 20-25 anni.

In tabella IV è riportata l'esperienza del nostro laboratorio nell'analisi dei geni *BRCA* in 795 casi indice malati di tumore selezionati in base ai criteri di cui sopra. Nei nuclei famigliari con soli tumori mammari, le mutazioni dei geni *BRCA1* e *BRCA2* vengono identificate complessivamente nel 13% dei casi. La probabilità di mutazione aumenta in presenza di casi diagnosticati in età giovanile (23%) e/o pre-menopausale (28%), di tumori bilaterali (16%) e di tumori della mammella maschile (33%). Nei nuclei famigliari con tumori della mammella e dell'ovaio le mutazioni dei geni *BRCA* sono presenti nel 54% dei casi con maggiore probabilità all'aumentare del numero dei parenti affetti (dal 31% all'83%), in presenza di tumori mammari giovanili (79%) e/o pre-menopausali (96%), di tumori bilaterali (68%) e di tumori della mammella maschile (67%). Nei nuclei famigliari con soli tumori ovarici le mutazioni dei geni *BRCA* sono ancora più frequenti (58% dei casi).

Altri geni di suscettibilità allo sviluppo del tumore della mammella

Un aumento significativo del rischio di sviluppare il tumore della mammella (Tabella I e Figura 1) è presente anche nella sindrome di Li-Fraumeni (50-60% prima dei 45 anni), nel tumore ereditario gastrico diffuso (50-60% per il carcinoma lobulare infiltrante) e in altre sindromi con rischio oncologico quali le poliposi amartomatose di Peutz-Jeghers (32-54%) e di Cowden (25-50%) e la neurofibromatosi tipo 1 (20-35%).

Diversi geni codificanti proteine coinvolte nell'attivazione della risposta al danno del DNA o partecipanti direttamente ai meccanismi di riparo, rappresentano geni di suscettibilità allo sviluppo del tumore della mammella con mutazioni più rare rispetto ai geni *BRCA* e penetranza inferiore: si stima che collettivamente possano essere responsabili di circa il 5% dei casi famigliari di questa neoplasia⁽⁷⁾.

Il gene *ATM*, responsabile della malattia pediatrica autosomica recessiva Atassia Telangiectasia, rappresenta il maggiore attivatore della risposta cellulare alle rotture del DNA a doppio filamento attraverso la fosforilazione di proteine chiave come *BRCA1*, *CHEK2* e *NBN*. Il gene *ATM* è stato oggetto di numerosi studi volti a definire il suo ruolo quale gene di suscettibilità allo sviluppo del tumore della mammella: i dati più recenti^(30,31) sembrano suggerire una frequenza delle mutazioni in eterozigosi dell'1-3% nei casi famigliari di questa neoplasia con un rischio relativo stimato di 2,4.

Il gene *CHEK2* codifica una serina/treonina chinasi attivata dalle proteine ATM e ATR in risposta alle rotture del DNA con la funzione di propagare all'interno della cellula il segnale di attivazione dei meccanismi di riparo e di arresto del ciclo cellulare. Il gene *CHEK2* presenta diverse mutazioni troncanti ricorrenti (c.1100delC, delezione esoni 9-10, IVS2+1G>A) la cui frequenza varia a seconda delle popolazioni ed è massima (0,5-0,8% della popolazione) nel nord-est dell'Europa. Il rischio di tumore della mammella associato alle mutazioni troncanti di *CHEK2* varia a seconda della storia oncologica familiare suggerendo la loro interazione con altri fattori di rischio di tipo ambientale e/o genetico. Il rischio relativo stimato è di 2-3,3 nei casi isolati di tumore della mammella e di 4,8-5,7 nei casi famigliari^(32,33).

In seguito alla identificazione di mutazioni in omozigosi del gene *BRCA2* nei casi di Anemia di Fanconi appartenenti al gruppo di complementazione D2⁽³⁴⁾, altri geni responsabili di questa malattia sono stati estesamente analizzati in casi sporadici e famigliari di tumore della mammella. L'Anemia di Fanconi è una rara malattia pediatrica recessiva caratterizzata da anomalie di sviluppo (bassa statura, anomalie del pollice, ipoplasia/agenesia del radio, rene a ferro di cavallo, anomalie della colonna vertebrale), progressiva insufficienza del midollo ematopoietico (trombocitopenia e leucopenia dai 7-8 anni, anemia) e rischio oncologico (leucemia mieloide acuta, medulloblastoma, tumore di Wilms, neuroblastoma, tumori squamocellulari del capo-collo, esofago, vulva, cervice uterina). A tutt'oggi sono noti 15 geni diversi responsabili della malattia che codificano proteine coinvolte nel riparo dei danni al DNA causati da sostanze *cross-linking* quali la mitomicina C e il cisplatino. Oltre a *BRCA2*, altri quattro geni responsabili della malattia presentano rare mutazioni germinali associate ad un aumento del rischio di neoplasia mammaria:

- *BRIP1* (*BRCA1 interacting protein*) presenta mutazioni estremamente rare in casi sporadici e famigliari di neoplasia della mammella con rischio relativo stimato di 2 (OR: 3.5 < 50 anni)⁽³⁵⁾.
- *PALB2* (*Partner and Localizer of BRCA2*) responsabile dello 0.6-2.3% dei casi di tumore familiare della mammella con OR: 2.3-4 e fino a 6, con un 38-40% dei tumori mammari triplo-negativi; mutazioni di *PALB2* sono responsabili di un aumento del rischio anche per tumori del pancreas, prostata, ovaio e melanoma⁽³⁶⁾.
- *RAD51C* (gene paralogo di *RAD51* coinvolto nell'attivazione della risposta al danno del DNA) presenta mutazioni germinali in eterozigosi nell'1-3% dei casi famigliari di neoplasie della mammella e dell'ovaio con

manifestazioni cliniche simili alle mutazioni dei geni *BRCA1* e *BRCA2* ma penetranza più tardiva⁽³⁷⁾; anche il gene paralogo *RAD51D*, non associato ad Anemia di Fanconi, presenta rare mutazioni germinali in nuclei famigliari con ricorrenza del tumore ovarico per il quale conferirebbe un rischio relativo 6.3 mentre l'aumento del rischio di sviluppare tumori mammari sembra inferiore (OR = 1.32)⁽³⁸⁾.

- *SLX4* di cui è nota una sola famiglia con mutazione⁽³⁹⁾.

Analogamente a *BRIP1*, anche i geni *BARD1* (*BRCA1 associated RING domain 1*) e *RAP80* codificano proteine che legano BRCA1 e cooperano alla sua funzione: per *RAP80* è noto un solo caso di mutazione germinale associata a predisposizione allo sviluppo del tumore mammario⁽⁴⁰⁾ mentre per *BARD1* sono descritte mutazioni di sicuro significato patogenetico in un numero esiguo di nuclei famigliari con ricorrenza del tumore mammario e in casi di tumore ovarico mentre sono riportati dati molto controversi sul ruolo di alcune varianti missenso.

Infine mutazioni dei geni codificanti il complesso proteico MRN (*MRE11A*, *RAD50* e *NBN*) sono state identificate in casi sporadici e famigliari di tumore mammario. In particolare, mutazioni del gene *NBN* e *RAD50*, responsabili in omozigosi delle malattie recessive sindrome di Nijmegen e Nijmegen-like, sembrano conferire un rischio relativo di neoplasia mammaria rispettivamente di 2.8 e 4.3 mentre non è stato stimato il rischio relativo associato alle rare mutazioni del gene *MRE11A*. Mutazioni germinali nei tre geni sono state identificate anche in casi di tumore ovarico, tubarico e peritoneale⁽⁴¹⁾.

BIBLIOGRAFIA:

1. Pharoah PD, Day NE, Duffy S, Easton DF, Ponder BA. *Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis*. Int J Cancer. 1997; 71: 800-809.
2. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. *Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21*. Science. 1990; 250: 1684-1689.
3. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D, et al. *Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13*. Science. 1994; 265: 2088-2090.
4. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W. *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1*. Science. 1994; 266: 66-71.
5. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G. *Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2*. Nature. 1995; 378: 789-792.
6. Smith P, McGuffog L, Easton DF, Mann GJ, Pupo GM, Newman B, Chenevix-Trench G; kConFab Investigators, Szabo C, Southey M, Renard H, Odefrey F, Lynch H, Stoppa-Lyonnet D, Couch F, Hopper JL, Giles GG, McCredie MR, Buys S, Andrulis I, Senie R; BCFS, BRCAX Collaborators Group, Goldgar DE, Oldenburg R, Kroeze-Jansema K, Kraan J, Meijers-Heijboer H, Klijn JG, van Asperen C, van Leeuwen I, Vasen HF, Cornelisse CJ, Devilee P, Baskcomb L, Seal S, Barfoot R, Mangion J, Hall A, Edkins S, Rapley E, Wooster R, Chang-Claude J, Eccles D, Evans DG, Futreal PA, Nathanson KL, Weber BL; Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), Rahman N, Stratton MR. *A genome wide linkage search for breast cancer susceptibility genes*. Genes Chromosomes Cancer. 2006; 45: 646-655.
7. Mavaddat N, Antoniou AC, Easton DF, Garcia-Closas M. *Genetic susceptibility to breast cancer*. Mol Oncol. 2010; 4: 174-191.
8. Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE, Breast Cancer Linkage Consortium. *Risks of cancer in BRCA1 mutation carriers*. Lancet. 1994;343:692-695.
9. Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT, et al. *Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes*. Am J Hum Genet. 1998; 62: 676-689.
10. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg A, Pasini B, Radice P, Manoukian S, Eccles DM, Tang N, Olah E, Anton-Culver H, Warner E, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, Tulinius H, Thorlacius S, Eerola H, Nevanlinna H, Syrjäkoski K, Kallioniemi OP, Thompson D, Evans C, Peto J, Lalloo F, Evans DG, Easton DF. *Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies*. Am J Hum Genet. 2003; 72: 1117-1130.
11. King MC, Marks JH, Mandell JB; New York Breast Cancer Study Group. *Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2*. Science. 2003; 302: 643-646.
12. Evans DG, Shenton A, Woodward E, Lalloo F, Howell A, Maher ER. *Penetrance estimates for BRCA1 and BRCA2 based on genetic testing in a Clinical Cancer Genetics service setting: risks of breast/ovarian cancer quoted should reflect the cancer burden in the family*. BMC Cancer. 2008; 8: 155.

13. Milne RL, Osorio A, Cajal TR, Vega A, Llorc G, de la Hoya M, Díez O, Alonso MC, Lazaro C, Blanco I, Sánchez-de-Abajo A, Caldés T, Blanco A, Graña B, Durán M, Velasco E, Chirivella I, Cardeñosa EE, Tejada MI, Bristain E, Miramar MD, Calvo MT, Martínez E, Guillén C, Salazar R, San Román C, Antoniou AC, Urioste M, Benítez J. *The average cumulative risks of breast and ovarian cancer for carriers of mutations in BRCA1 and BRCA2 attending genetic counseling units in Spain.* Clin Cancer Res. 2008; 14: 2861-2869.
14. Mulligan AM, Couch FJ, Barrowdale D, Domchek SM, Eccles D, Nevanlinna H, Ramus SJ, Robson M, Sherman M, Spurdle AB, Wappenschmidt B, Lee A, McGuffog L, Healey S, Sinilnikova OM, Janavicius R, Hansen Tv, Nielsen FC, Ejlersen B, Osorio A, Muñoz-Repeto I, Durán M, Godino J, Pertesi M, Benítez J, Peterlongo P, Manoukian S, Peissel B, Zaffaroni D, Cattaneo E, Bonanni B, Viel A, Pasini B, Papi L, Ottini L, Savarese A, Bernard L, Radice P, Hamann U, Verheus M, Meijers-Heijboer HE, Wijnen J et al. *Common breast cancer susceptibility alleles are associated with tumour subtypes in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2.* Breast Cancer Res. 2011; 13: R110.
15. Mavaddat N, Barrowdale D, Andrulis IL, Domchek SM, Eccles D, Nevanlinna H, Ramus SJ, Spurdle A, Robson M, Sherman M, Mulligan AM, Couch FJ, Engel C, McGuffog L, Healey S, Sinilnikova OM, Southey MC, Terry MB, Goldgar D, O'Malley F, John EM, Janavicius R, Tihomirova L, Hansen TV, Nielsen FC, Osorio A, Stavropoulou A, Benítez J, Manoukian S, Peissel B, Barile M, Volorio S, Pasini B, Dolcetti R, Putignano AL, Ottini L, Radice P, Hamann U, Rashid MU, Hogervorst FB, Kriege M, van der Luijt RB; HEBON, Peock S, Frost D, Evans DG, Brewer C, Walker L, Rogers MT, Side LE, Houghton C et al. *Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA).* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2012; 21: 134-47.
16. Lee EH, Park SK, Park B, Kim SW, Lee MH, Ahn SH, Son BH, Yoo KY, Kang D; KOHBRA Research Group; Korean Breast Cancer Society. *Effect of BRCA1/2 mutation on short-term and long-term breast cancer survival: a systematic review and meta-analysis.* Breast Cancer Res Treat. 2010; 122: 11-25.
17. Bayraktar S, Glück S. *Systemic therapy options in BRCA mutation-associated breast cancer.* Breast Cancer Res Treat. 2012; 135: 355-366.
18. Narod SA, Neuhausen S, Vichodez G, Armel S, Lynch HT, Ghadirian P, Cummings S, Olopade O, Stoppa-Lyonnet D, Couch F, Wagner T, Warner E, Foulkes WD, Saal H, Weitzel J, Tulman A, Poll A, Nam R, Sun P; Hereditary Breast Cancer Study Group, Danquah J, Domchek S, Tung N, Ainsworth P, Horsman D, Kim-Sing C, Maugard C, Eisen A, Daly M, McKinnon W, Wood M, Isaacs C, Gilchrist D, Karlan B, Nedelcu R, Meschino W, Garber J, Pasini B, Manoukian S, Bellati C. *Rapid progression of prostate cancer in men with a BRCA2 mutation.* Br J Cancer. 2008; 99: 371-374.
19. NCCN Guidelines for Management of BRCA1/2 Carriers.
20. Heemskerk-Gerritsen BA, Menke-Pluijmers MB, Jager A, Tilanus-Linthorst MM, Koppert LB, Obdeijn IM, van Deurzen CH, Collée JM, Seynaeve C, Hooning MJ. *Substantial breast cancer risk reduction and potential survival benefit after bilateral mastectomy when compared with surveillance in healthy BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a prospective analysis.* Ann Oncol. 2013; 24: 2029-2035.

21. Skytte AB, Crüger D, Gerster M, Laenkholtm AV, Lang C, Brøndum-Nielsen K, Andersen MK, Sunde L, Kølvrå S, Gerdes AM. *Breast cancer after bilateral risk-reducing mastectomy*. Clin Genet. 2011; 79: 431-437.
22. Arver B, Isaksson K, Atterhem H, Baan A, Bergkvist L, Brandberg Y, Ehrencrona H, Emanuelsson M, Hellborg H, Henriksson K, Karlsson P, Loman N, Lundberg J, Ringberg A, Askmalm MS, Wickman M, Sandelin K. *Bilateral prophylactic mastectomy in Swedish women at high risk of breast cancer: a national survey*. Ann Surg. 2011; 253: 1147-1154.
23. Domchek SM, Friebel TM, Singer CF, Evans DG, Lynch HT, Isaacs C, Garber JE, Neuhausen SL, Matloff E, Eeles R, Pichert G, Van t'Veer L, Tung N, Weitzel JN, Couch FJ, Rubinstein WS, Ganz PA, Daly MB, Olopade OI, Tomlinson G, Schildkraut J, Blum JL, Rebbeck TR. *Association of risk-reducing surgery in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality*. JAMA. 2010; 304: 967-975.
24. Kaas R, Verhoef S, Wesseling J, Rookus MA, Oldenburg HS, Peeters MJ, Rutgers EJ. *Prophylactic mastectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: very low risk for subsequent breast cancer*. Ann Surg. 2010; 251: 488-492.
25. Kauff ND, Domchek SM, Friebel TM, Robson ME, Lee J, Garber JE, Isaacs C, Evans DG, Lynch H, Eeles RA, Neuhausen SL, Daly MB, Matloff E, Blum JL, Sabbatini P, Barakat RR, Hudis C, Norton L, Offit K, Rebbeck TR. *Risk-reducing salpingo-oophorectomy for the prevention of BRCA1- and BRCA2-associated breast and gynecologic cancer: a multicenter, prospective study*. J Clin Oncol. 2008; 26: 1331-1337.
26. Laki F, Kirova YM, This P, Plancher C, Asselain B, Sastre X, Stoppa-Lyonnet D, Salmon R; IC-BOCRSG IC-BOCRSG: Institut Curie - Breast Ovary Cancer Risk Study Group. *Prophylactic salpingo-oophorectomy in a series of 89 women carrying a BRCA1 or a BRCA2 mutation*. Cancer. 2007; 109: 1784-1790.
27. Finch A, Beiner M, Lubinski J, Lynch HT, Moller P, Rosen B, Murphy J, Ghadirian P, Friedman E, Foulkes WD, Kim-Sing C, Wagner T, Tung N, Couch F, Stoppa-Lyonnet D, Ainsworth P, Daly M, Pasini B, Gershoni-Baruch R, Eng C, Olopade OI, McLennan J, Karlan B, Weitzel J, Sun P, Narod SA; Hereditary Ovarian Cancer Clinical Study Group. *Salpingo-oophorectomy and the risk of ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancers in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation*. JAMA. 2006; 296: 185-192.
28. Rebbeck TR, Levin AM, Eisen A, Snyder C, Watson P, Cannon-Albright L, Isaacs C, Olopade O, Garber JE, Godwin AK, Daly MB, Narod SA, Neuhausen SL, Lynch HT, Weber BL. *Breast cancer risk after bilateral prophylactic oophorectomy in BRCA1 mutation carriers*. J Natl Cancer Inst. 1999; 91: 1475-1479.
29. Rebbeck TR, Lynch HT, Neuhausen SL, Narod SA, Van't Veer L, Garber JE, Evans G, Isaacs C, Daly MB, Matloff E, Olopade OI, Weber BL; Prevention and Observation of Surgical End Points Study Group. *Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations*. N Engl J Med. 2002; 346: 1616-1622.
30. Renwick A, Thompson D, Seal S, Kelly P, Chagtai T, Ahmed M, North B, Jayatilake H, Barfoot R, Spanova K, McGuffog L, Evans DG, Eccles D; Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), Easton DF, Stratton MR, Rahman N. *ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles*. Nat Genet. 2006; 38: 873-875.

31. Pylkäs K, Tommiska J, Syrjäkoski K, Kere J, Gatei M, Waddell N, Allinen M, Karppinen SM, Rapakko K, Kääriäinen H, Aittomäki K, Blomqvist C, Mustonen A, Holli K, Khanna KK, Kallioniemi OP, Nevanlinna H, Winqvist R. *Evaluation of the role of Finnish ataxia-telangiectasia mutations in hereditary predisposition to breast cancer*. *Carcinogenesis*. 2007; 28: 1040-1045.
32. Weischer M, Bojesen SE, Ellervik C, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. *CHEK2*1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: meta-analyses of 26.000 patient cases and 27.000 controls*. *J Clin Oncol*. 2008; 26: 542-548.
33. Cybulski C, Wokołorczyk D, Jakubowska A, Huzarski T, Byrski T, Gronwald J, Masojć B, Deebniak T, Górski B, Blecharz P, Narod SA, Lubiński J. *Risk of breast cancer in women with a CHEK2 mutation with and without a family history of breast cancer*. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 3747-3752.
34. Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, De Die-Smulders C, Persky N, Grompe M, Joenje H, Pals G, Ikeda H, Fox EA, D'Andrea AD. *Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia*. *Science*. 2002; 297: 606-609.
35. Cantor SB, Guillemette S. *Hereditary breast cancer and the BRCA1-associated FANCD1/BACH1/BRIP1*. *Future Oncol*. 2011; 7: 253-261.
36. Tischkowitz M, Xia B. *PALB2/FANCN: recombining cancer and Fanconi anemia*. *Cancer Res*. 2010; 70: 7353-7359.
37. Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, Erven V, Wappenschmidt B, Niederacher D, Freund M, Lichtner P, Hartmann L, Schaal H, Ramser J, Honisch E, Kubisch C, Wichmann HE, Kast K, Deissler H, Engel C, Müller-Myhsok B, Neveling K, Kiechle M, Mathew CG, Schindler D, Schmutzler RK, Hanenbergh H. *Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene*. *Nat Genet*. 2010; 42: 410-414.
38. Loveday C, Turnbull C, Ramsay E, Hughes D, Ruark E, Frankum JR, Bowden G, Kalmyrzaev B, Warren-Perry M, Snape K, Adlard JW, Barwell J, Berg J, Brady AF, Brewer C, Brice G, Chapman C, Cook J, Davidson R, Donaldson A, Douglas F, Greenhalgh L, Henderson A, Izatt L, Kumar A, Lalloo F, Miedzybrodzka Z, Morrison PJ, Paterson J, Porteous M, Rogers MT, Shanley S, Walker L; Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), Eccles D, Evans DG, Renwick A, Seal S, Lord CJ, Ashworth A, Reis-Filho JS, Antoniou AC, Rahman N. *Germline mutations in RAD51D confer susceptibility to ovarian cancer*. *Nat Genet*. 2011; 43: 879-882.
39. Bakker JL, van Mil SE, Crossan G, Sabbaghian N, De Leeneer K, Poppe B, Adank M, Gille H, Verheul H, Meijers-Heijboer H, de Winter JP, Claes K, Tischkowitz M, Waisfisz Q. *Analysis of the novel fanconi anemia gene SLX4/FANCP in familial breast cancer cases*. *Hum Mutat*. 2013; 34: 70-73.
40. Nikkilä J, Coleman KA, Morrissey D, Pylkäs K, Erkkö H, Messick TE, Karppinen SM, Amelina A, Winqvist R, Greenberg RA. *Familial breast cancer screening reveals an alteration in the RAP80 UIM domain that impairs DNA damage response function*. *Oncogene*. 2009; 28: 1843-1852.
41. Walsh T, Casadei S, Lee MK, Pennil CC, Nord AS, Thornton AM, Roeb W, Agnew KJ, Stray SM, Wickramanayake A, Norquist B, Pennington KP, Garcia RL, King MC, Swisher EM. *Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: 18032-18037.

INFARTO MIOCARDICO ACUTO: LA TERAPIA RIGENERATIVA CELLULARE

Sebastiano Marra

Dipartimento Cardiovascolare e Toracico
Azienda Ospedaliera Città della Salute e della Scienza di Torino

Parole chiave: *Infarto Miocardico*
Terapia cellulare
Cellule staminali

Key words: *Myocardial infarction*
Cell therapy
Stem cells

Riassunto

La terapia cellulare è una branca della Medicina Rigenerativa il cui paradigma consiste nel sostituire o rigenerare le cellule, i tessuti e gli organi per ristabilirne la fisiologica funzione. Il processo che in ambito scientifico porta dalla ricerca di base alla sperimentazione clinica sull'uomo viene definito come "processo traslazionale". In ambiente cardiovascolare, cellule staminali e progenitori cellulari sono state applicate nei quadri nosologici dell'infarto miocardico acuto e della cardiomiopatia cronica. Le tipologie cellulari utilizzate in ricerca clinica sono le cellule di derivazione ostemidollare, le cellule mesenchimali, i mioblasti. Le cellule staminali cardiache sono al momento in fase di studio preclinico. La via di somministrazione delle cellule più efficace nei pazienti con esiti di infarto miocardico acuto è quella intracoronarica. Gli studi clinici finora condotti sono concordanti nel dimostrare un effetto favorevole della terapia cellulare sulla funzione ventricolare sinistra. Il meccanismo di azione più accreditato è quello di un effetto paracrino. Studi clinici di fase 1 e 2 sono ancora necessari per chiarire i punti chiave in grado di rendere tale branca della medicina veramente efficace ed applicabile su ampia scala. Il Dipartimento Cardiovascolare e Toracico della Città della Salute e della Scienza di Torino è attivo in tale ambito di ricerca clinica da circa 10 anni con applicazioni dirette ed indirette di medicina rigenerativa.

Abstract

The cell therapy is aimed to mending cells, tissues and organs reestablishing their normal physiology. The translational process is the way that step by step leads from the laboratory bench to the clinical application. In cardiovascular medicine, this process has been applied in studies involving patients with myocardial infarction and chronic cardiomyopathy. Bone marrow derived stem cell, mesenchimal stem cells and myoblasts have been applied in different clinical studies with encouraging results in terms of left ventricular function preservation. The cells delivery ways are the intracoronary in the myocardial infarction setting and the intramyocardial either epi- or endocardial in the chronic setting. The paracrine effect is the most reliable mechanism of action of cells leading to restoration of myocardial function. Before an effective and widespread application of cell therapy more phase I and II studies are necessary to investigate many key issues. From ten years the Cardiovascular and Thoracic Diseases Department of Città della Scienza e della Salute di Torino is involved in this field of clinical research with direct and indirect applications of regenerative medicine.

Introduzione

La terapia cellulare o “Cell therapy” è il processo con il quale si introducono nuove cellule in un tessuto con il fine di migliorarne la funzionalità. Si tratta di una branca della Medicina Rigenerativa il cui paradigma consiste nel sostituire o rigenerare le cellule, i tessuti e gli organi per ristabilirne la fisiologica funzione. Sebbene si tratti di una tecnologia ancora poco conosciuta la sua origine non è recente. Le trasfusioni di sangue, i trapianti di midollo osseo sono ormai terapie universalmente accettate e non sono altro che applicazioni della terapia cellulare.

Le cellule staminali sono cellule primitive non specializzate, dotate della capacità di trasformarsi in diversi altri tipi di cellule del corpo umano. Possono essere classificate in base al loro potenziale differenziativo: cellule totipotenti, che possono differenziare in tutti i tessuti compresi quelli extraembrionali; cellule pluripotenti, in grado di dare origine a tutti i tessuti contenuti nell’uomo adulto; multipotenti, che possono differenziare in un numero limitato di tipi cellulari. I progenitori sono tipicamente i discendenti delle cellule staminali; questi hanno solitamente una ridotta capacità di riprodursi e di differenziare in tipologie cellulari differenti.

In ambiente cardiovascolare, cellule staminali e progenitori cellulari sono state applicate nei quadri nosologici dell’infarto miocardico acuto e della cardiomiopatia cronica.

Il processo che in ambito scientifico porta dalla ricerca di base alla sperimentazione clinica sull’uomo viene definito come “processo traslazionale”.

Spesso descritta come il tentativo di portare la conoscenza scientifica “from bench to bedside”, dal laboratorio al letto del paziente, la medicina traslazionale si basa sui progressi della ricerca di base e li utilizza per sviluppare nuove terapie o procedure mediche. La terapia cellulare in Cardiologia è un esempio paradigmatico del processo traslazionale.

Bisogno Clinico

La moderna terapia dell’infarto miocardico acuto è basata sulla riperfusione meccanica della coronaria responsabile dell’infarto con la metodica dell’angioplastica primaria. Questa procedura ha avuto un impatto drammatico sul miglioramento della prognosi immediata e a distanza dei pazienti, ma pur utilizzando le metodiche più attuali (tromboaspirazione, stent medicati di II generazione) ed i farmaci adiuvanti più efficaci (inibitori delle glicoproteine IIb/IIIa, bivalirudina, clopidogrel, ticagrelor, prasugrel) resta un

tetto di efficacia condizionato dal ritardo di presentazione dei pazienti e dal danno microcircolatorio non prevenibile con le metodiche suddette⁽¹⁾.

Tale problematica insieme con l'innalzamento delle attese di vita e l'elevata incidenza di patologie croniche quali ipertensione e diabete, porta all'elevata prevalenza di scompenso cardiaco soprattutto nelle fasce di età superiori ai 60 anni con il conseguente impatto in termini economici e sociali⁽²⁾.

Razionale Fisiopatologico

Perché studiare la terapia cellulare per il cuore? Fino agli anni '90 il cuore è stato definito come un organo post-mitotico, incapace di rigenerare il parenchima. Questo dogma ha condizionato la ricerca di base e clinica in cardiologia. L'idea consolidata era che le uniche risposte del cardiomiocita allo stress fossero l'ipertrofia o la morte. Dai primi anni 2000 è stato dimostrato che il cuore è un organo in grado di autorinnovarsi, sostanzialmente grazie a due osservazioni clinico-sperimentali: il chimerismo e la dimostrazione dell'esistenza di cellule staminali cardiache.

La dimostrazione di cellule cardiache originate dal midollo osseo (chimerismo) è stata ottenuta studiando campioni autoptici o biotipici di muscolo cardiaco in soggetti di sesso maschile trapiantati con cuori di sesso femminile ed in soggetti di sesso femminile trapiantati con midollo osseo di sesso maschile: il cromosoma Y all'interno delle cellule è stato utilizzato come marker della loro origine midollare.

Le staminali cardiache sono cellule indifferenziate e si caratterizzano per l'espressione contemporanea degli antigeni di superficie c-kit, MDR1 e Sca-1. Tali cellule sono state identificate a livello degli atri e dell'apice del cuore⁽³⁾.

Un altro fenomeno di grande interesse speculativo e come base all'applicazione clinica delle cellule staminali di derivazione osteomidollare è rappresentato dalla mobilitazione di progenitori cellulari dal midollo osseo in risposta al danno cardiaco e vascolare ed il rapporto inversamente proporzionale tra la concentrazione plasmatica di tali cellule ed il recupero funzionale miocardico dopo infarto miocardico acuto⁽⁴⁾.

Mentre in alcune specie animali quali i pesci "zebrafish" la capacità rigenerativa cellulare è in grado di rigenerare organi quali pelle, cuore e cervello, nell'uomo i meccanismi suddetti non sono in grado di rigenerare autonomamente il cuore a causa del cosiddetto "gap rigenerativo": un paziente con scompenso cardiaco subisce il danneggiamento di almeno il 25% del miocardio ventricolare sinistro, pari ad un deficit di miociti nell'ordine del miliardo⁽⁵⁾. È però possibile ipotizzare l'amplificazione a scopo terapeutico

dei meccanismi riparativi fisiologici suddetti. L'approfondita conoscenza dei meccanismi di riparazione tessutale è pertanto fondamentale per arrivare all'applicazione della terapia cellulare a scopo terapeutico.

Tecniche e prodotti cellulari

Ad oggi in terapia sono stati utilizzati diversi tipi di cellule staminali:

- *Cellule ematopoietiche ottenute dal midollo osseo*
Sono state utilizzate sia cellule non selezionate estratte dal midollo osseo sia cellule purificate sulla base dell'espressione di proteine di membrana (CD34⁺, CD133⁺).
- *Cellule staminali o progenitori cellulari circolanti nel sangue periferico*
Di derivazione midollare, vengono raccolte inducendone la mobilitazione con G-CSF, filtrando il sangue periferico e selezione in base all'espressione di proteine di membrana.
- *Cellule Mesenchimali*
Le cellule staminali mesenchimali (MSC) costituiscono una popolazione di cellule staminali adulte multipotenti, di origine mesodermica, con morfologia fibroblastoide e capaci di differenziare in cellule del tessuto adiposo, cartilagineo, osseo, del muscolo cardiaco e dello stroma midollare che supporta l'ematopoiesi.
- *Mioblasti del muscolo scheletrico*
I mioblasti che non formano le fibre muscolari si differenziano in cellule satellite: queste sono cellule progenitrici che normalmente esistono in uno stato quiescente, localizzate al di sotto della membrana basale formata dalle fibre muscolari mature. Possiedono la capacità di diventare attive, di auto-rinnovarsi e di differenziarsi in vivo permettendo, in questo modo, la rigenerazione di un muscolo dopo un evento dannoso.
- *Cellule di derivazione embrionale*
Sono state utilizzate soprattutto le cellule di derivazione cordonale, che presentano capacità di differenziamento in tutte le cellule della linea ematopoietica. L'uso di tali cellule è estremamente limitato essenzialmente per motivazioni di tipo etico.

Sono state utilizzate diverse vie di somministrazione. L'obiettivo principale è quello di recapitare un numero ottimale di cellule all'area target utilizzando la via meno invasiva e più efficace possibile. Ad oggi le cellule sono state

impiantate nel miocardio attraverso infusione intra-coronarica e iniezione intra-miocardica.

L'inoculazione di cellule a livello intra-coronarico è una procedura mini-invasiva sicura e permette di selezionare l'area da trattare sulla base del ramo coronarico in cui le cellule vengono liberate. L'attecchimento delle cellule nel miocardio è però subordinato all'adesione di queste all'endotelio ed all'attraversamento di quest'ultimo. La distribuzione e l'attecchimento delle cellule nel miocardio dipende anche dall'azione chemiotattica esercitata da alcune citochine secrete dai tessuti ischemici. Si è infatti rilevato che con questa via di somministrazione l'attecchimento delle cellule è superiore in condizioni di ischemia acuta piuttosto che in situazioni ischemiche croniche proprio perché in condizioni croniche la quantità di citochine secrete è ridotta.

L'iniezione intra-miocardica supera il problema dell'attraversamento delle membrane vascolari e sembra essere la soluzione preferibile in condizioni di cardiomiopatia ischemica cronica. Le cellule possono essere iniettate nel miocardio dal lato epicardico, con approccio chirurgico, o dall'endocardio con approccio percutaneo, utilizzando cateteri dotati di un ago. Inoltre, attraverso mappaggio elettro-anatomico, è possibile studiare la parete cellulare da trattare e iniettare le cellule solo nel miocardio vitale, perdendo quindi un numero minore di cellule⁽⁶⁾.

Meccanismi d'azione ipotizzati

- 1) Fornire progenitori cellulari in grado di attecchire nel tessuto target e qui fornire una linea di cellule differenziate capaci di migliorarne vascolarizzazione e la struttura.

I precursori cellulari possono indurre direttamente la formazione di nuovi miociti, cellule stromali e vasi differenziandosi in cellule endoteliali mature. Incorporandosi in vasi danneggiati già esistenti possono incrementarne il processo riparativo.

- 2) Sfruttare la capacità paracrine delle cellule trapiantate ovvero il rilascio di citochine e fattori di crescita.

Tale meccanismo sarebbe in grado di aumentare la riparazione tissutale fisiologica, diminuirne gli aspetti lesivi e limitare l'azione apoptotica. Inoltre i precursori cellulari sono capaci di reclutare le cellule staminali presenti nel tessuto cardiaco.

- 3) Trans-differenziazione ovvero la possibilità di differenziarsi in una linea cellulare appartenente ad un'altra tipologia cellulare.

In passato si sono cercate evidenze della trasformazione dei progenitori endoteliali in cellule muscolari cardiache, attualmente non si hanno ancora dati certi a questo riguardo⁽⁶⁾.

Studi clinici

Nella Tabella I sono elencati i principali studi clinici sperimentali che hanno utilizzato cellule staminali o precursori cellulari nell'infarto miocardico acuto⁽⁷⁾.

Le conclusioni dei diversi studi dimostrano che il trapianto di cellule si traduce in uno spettro di risposte terapeutiche ma in assenza di dimostrazioni certe di significativa transdifferenziazione, ritenzione, sopravvivenza cellulare nel tessuto ospite.

A prescindere dal preciso meccanismo d'azione esiste un'intrigante possibilità che la terapia cellulare possa produrre effetti benefici maggiori indipendentemente da qualsiasi effetto diretto sulla rigenerazione miocitaria, ma intervenendo prevalentemente con un effetto farmacologico di tipo paracrino ed agendo come una sorta di "laboratorio biologico" in grado di produrre nel contesto del miocardio sostanze con attività farmacologica.

Prospettive cliniche

Al momento attuale il ruolo clinico della terapia cellulare è confinato ad un ambito di ricerca clinica e di ricerca di base. Prima di arrivare ad una terapia cellulare veramente efficace in clinica ed ottimizzata è necessario ancora rispondere ad una serie di quesiti fondamentali mediante studi di tipo traslazionale. I punti ancora aperti nella ricerca relativa alla terapia cellulare in cardiologia sono molteplici:

- Cellule. Quali le sorgenti di cellule ottimali, la tipologia, la preparazione e l'eventuale condizionamento.
- Modalità di somministrazione.
- Dosaggio e ripetizione delle somministrazioni.
- Tempistica della somministrazione in rapporto ai diversi contesti nosologici.
- Relazione dose-risposta.
- Determinanti della funzione cellulare.
- Identificazione delle migliori metodiche per la definizione degli effetti della terapia.

Stem Cell Therapy in Acute Myocardial Infarction						
Strauer 2001 (1) (C)	1	6 days	BMC	12 x 10 ⁶	EF +16% Cardiac Index + 30% Infarct size -36%	GBP GBP SPECT
Strauer 2002 (3) (C)	20 1:1 vs. control	7-9 days	BMC	28 x 10 ⁶	EF +9% Infarct size -60%	LV angiogram LV angiogram
TOPCARE-AMI (4) (C)	59	4-6 days	Circ. Prog. BMC	16 x 10 ⁶ 213 x 10 ⁶	EF +16% ESV -25%	LV angiogram LV angiogram
Chen (97) (C)	69 1:1 vs. control	18 days	MSC from bone marrow		EF +36% ESV -53% Infarct size -60%	LV angiogram LV angiogram
BOOST (5) (R)	60 1:1 random	4-6 days	BMC vs. rand. controls	2.460 x 10 ⁶	EF +13% ESV -2% Infarct size -43%	MRI MRI MRI
Janssens (6) (R)	67 1:1 rand. placebo, double-blind	< 24h	BMC vs. i.c. placebo	304 x 10 ⁶	EF +7% ESV -3% Infarct size -50%	MRI MRI MRI
BALANCE (32) (R)	124	7 days	BMC vs. rand. controls	6.1 x 10 ⁷	EF +4.6% ESV -3.6 ml Infarct size -8.2%	LV angiogram LV angiogram LV angiogram
TACT-PB-AMI (83) (R)	54	3 days	PBSC	5 x 10 ⁹	EF +13%	LV angiogram
Cardiac Study (84) (R)	38	4 days	BMC vs. rand. controls	41.8 x 10 ⁷	EF +13,1%	SPECT
REGENT (85) (R)	200	3-12 days	BMC CD34+CXCR4+	178 x 10 ⁶ 1.9 x 10 ⁶	EF +3% EF +3%	MRI MRI
BONAMI (87) (R)	100	7-10 days	BMC vs. rand. controls	98 x 10 ⁶	BMC, EF +4.3% Controls, EF +3.3%	SPECT SPECT
ASTAMI (89) (R)	100 1:1 rand.	6 days	BMC vs. rand. controls	87 x 10 ⁶	EF +1.9% Infarct size -25%	SPECT SPECT
REPAIR-AMI (46) (R)	204 1:1 rand. placebo, double-blind	4 days	BMC vs. i.c. placebo	> 230 x 10 ⁶	EF +11% ESV -1%	LV angiogram LV angiogram

Tabella I. Studi di terapia cellulare nell'infarto miocardico acuto.

Colonna 1: Autore o acronimo.

Colonna 2: numerosità del campione e schema di eventuale randomizzazione.

Colonna 3: tempistica di somministrazione.

Colonna 4: tipologia di cellule utilizzate, MSC = mesenchimal stem cells,
BMC = bone marrow cells, PBSC = peripheral blood stem cells.

Colonna 5: numero medio cellule impiantate.

Colonna 6: effetti della terapia cellulare sulla funzione ventricolare sinistra,
EF = ejection fraction, ESV = end sistolic volume.

Colonna 7: metodica di imaging utilizzata per la valutazione della funzione ventricolare sinistra (ecocardiografia, risonanza magnetica, angiografia, medicina nucleare).

- Vitalità e ritenzione cellulare nel tessuto ospite.
- Identificazione dei pazienti “responders”.

Tali quesiti possono essere chiariti mediante ricerca di base e studi clinici di fase 1 e 2 per il trattamento della disfunzione ventricolare sinistra nell'infarto miocardico acuto e lo scompenso cardiaco cronico. Tali studi sono la premessa indispensabile ai successivi studi di fase 3 per la verifica dell'efficacia clinica su ampia scala. La ricerca clinica in ambito di terapia cellulare è però fortemente limitata dalle normative vigenti che assimilano la produzione di cellule a quelle di farmaci e ne limitano la produzione e la manipolazione solo in centri “GMP certificati” (nessun centro certificato in Piemonte) e dai costi (un trattamento ha un costo dell'ordine di 10.000 Euro).

Attività di ricerca clinica presso il Dipartimento Cardiovascolare e Toracico dell'Azienda Ospedaliera Città della Salute e della Scienza di Torino

Negli ultimi 10 anni presso la nostra struttura sono state condotti diversi studi clinici sperimentali relativi ad applicazioni di terapia rigenerativa e cellulare. Tali studi possono essere classificati in applicazioni dirette ed indirette di terapia cellulare.

Applicazioni indirette di terapia cellulare

Il primo studio effettuato è stato quello di mobilitazione di precursori endoteliali con citochine (G-CSF e GM-CSF) nell'infarto miocardico acuto, condotto in collaborazione con l'Ematologia Universitaria. Si è trattato di uno studio di fase 1-2 che ha consentito di dimostrare fattibilità della metodica ed una potenziale efficacia in termini di neovascolarizzazione e recupero funzionale, ma che ha lasciato alcuni dubbi circa la possibilità che l'azione proinfiammatoria e neoangiogenetica delle citochine potesse favorire i meccanismi di progressione di malattia intracoronarica^(8,9).

Altra esperienza di applicazione indiretta di terapia cellulare è stato l'utilizzo di stent bio-ingegnerizzati rivestiti di anticorpi monoclonali in grado di catturare i precursori endoteliali CD 34 nell'infarto miocardico acuto. Premessa indispensabile è stata lo studio delle cinetiche cellulari delle cellule CD 34 nel contesto dell'infarto acuto: abbiamo evidenziato una mobilitazione spontanea significativa e persistente per il primo mese dopo l'infarto. L'utilizzo degli stent a cattura di precursori endoteliali si è associata ad un'assenza di eventi trombotici intracoronarici post-procedurali

verosimilmente secondaria all'accelerazione dei fisiologici processi riparativi cellulari intracoronarici⁽¹⁰⁾.

È tuttora in corso uno studio estremamente promettente di applicazione di terapia rigenerativa cellulare indiretta con l'applicazione di onde d'urto ("shock waves") al miocardio in pazienti con coronaropatia avanzata postinfartuale non rivascularizzabile. Il meccanismo biologico coinvolto sembra essere la produzione di mediatori paracrini e l'induzione della neoangiogenesi. I dati preliminari sono molto interessanti e paiono dimostrare un miglioramento statisticamente significativo della perfusione miocardica e della funzione.

Applicazioni dirette

In collaborazione con il Centro Trapianti di midollo osseo dell'OIRM-Regina Margherita e l'Istituto Farmacologico Mario Negri di Milano sono stati condotti una serie di studi in vitro ed in vivo come parte del processo traslazionale per l'applicazione di cellule CD 34 purificate ed espanse nei pazienti con infarto miocardico acuto rivascularizzato con angioplastica primaria e disfunzione ventricolare sinistra residua. I dati sperimentali sono stati promettenti⁽¹¹⁾, ma non si è arrivati all'applicazione su paziente del prodotto cellulare per le limitazioni legate alla certificazione GMP della "cell factory".

Attualmente sono in fase di valutazione presso l'AIFA e l'ISS due studi clinici di applicazione diretta di terapia cellulare: lo studio ADVANCE che prevede l'applicazione per via intracoronarica di precursori cellulari mesenchimali derivati dal tessuto adiposo nel post-infarto e lo studio RECARDIO che prevede l'applicazione di precursori endoteliali CD 133 in pazienti con coronaropatia avanzata non rivascularizzabile.

BIBLIOGRAFIA

1. Lerman A, Holmes DR, Herrmann J, Gersh BJ. *Microcirculatory dysfunction in ST-elevation myocardial infarction: cause, consequence, or both?*. Eur Heart J. 2007; 28: 788-797.
2. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Huffman MD, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Magid D, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER, Moy CS, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Schreiner PJ, Sorlie PD, Stein J, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB. American Heart Association Statistics, Committee. Stroke Statistics, Subcommittee. *Executive summary: heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association*. Circulation. 2013; 127: 143-152.
3. Anversa P, Kajstura J, Leri A, Bolli R. *Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology*. Circulation. 2006; 113: 1451-1463.
4. Leone AM, Rutella S, Bonanno G, Abbate A, Rebuzzi AG, Giovannini S, Lombardi M, Galiuto L, Liuzzo G, Andreotti F, Lanza GA, Contemi AM, Leone G, Crea F. *Mobilization of bone marrow-derived stem cells after myocardial infarction and left ventricular function*. Eur Heart J. 2005; 26: 1196-1204.
5. Murry CE, Reinecke H, Pabon LM. *Regeneration gaps: observations on stem cells and cardiac repair*. J Am Coll Cardiol. 2006; 47: 1777-1785.
6. Tongers J, Losordo DW, Landmesser U. *Stem and progenitor cell-based therapy in ischaemic heart disease: promise, uncertainties, and challenges*. Eur Heart J. 2011; 32: 1197-1206.
7. Strauer BE, Steinhoff G. *10 years of intracoronary and intramyocardial bone marrow stem cell therapy of the heart: from the methodological origin to clinical practice*. J Am Coll Cardiol. 2011; 58: 1095-1104.
8. Bruno S, Bussolati B, Scacciatella P, Marra S, Sanavio F, Tarella C, Camussi G. *Combined administration of G-CSF and GM-CSF stimulates monocyte-derived pro-angiogenic cells in patients with acute myocardial infarction*. Cytokine. 2006; 34: 56-65.
9. Marra S, Scacciatella P, Usmiani T, D'Amico M, Giorgi M, Andriani M, Baccega M, Boccadoro M, Omede P, Sanavio F, Tarella C. *Concurrent G-CSF and GM-CSF administration for the induction of bone marrow-derived cell mobilization in patients with acute myocardial infarction: a pilot study evaluating feasibility, safety and efficacy*. EuroIntervention. 2006; 1: 425-431.
10. Scacciatella P, D'Amico M, Pennone M, Conrotto F, Meliga E, Usmiani T, Meynet I, Gunetti M, Ferrero I, Rustichelli D, Fagioli F, Marra S. *Effects of EPC capture stent and cd34+ mobilization in acute myocardial infarction*. Minerva Cardioangiol. 2013; 61: 211-219.
11. Gunetti M, Noghero A, Molla F, Staszewsky LI, De Angelis N, Soldo A, Russo I, Errichiello E, Frasson C, Rustichelli D, Ferrero I, Gualandris A, Berger M, Geuna M, Scacciatella P, Basso G, Marra S, Bussolino F, Latini R, Fagioli F. *Ex vivo-expanded bone marrow CD34(+) for acute myocardial infarction treatment: in vitro and in vivo studies*. Cytotherapy. 2011; 13: 1140-1152.

IL RUOLO EMERGENTE DEL SISTEMA RANKL-RANK-OPG IN MEDICINA INTERNA E ONCOLOGIA

Alberto Angeli

Professore Emerito di Medicina Interna - Università di Torino

Parole chiave: *Receptor Activator of Nuclear factor kB Ligand, RANKL*
Receptor Activator of Nuclear factor kB, RANK
Osteoprotegerina, OPG
Riassorbimento osseo
Osteoclasti
Osteoimmunologia
Osteoncologia
Osteoporosi
Metastasi ossee

Key words: *Receptor Activator of Nuclear factor kB Ligand, RANKL*
Receptor Activator of Nuclear factor kB, RANK
Osteoprotegerin, OPG
Bone resorption
Osteoclasts
Osteoimmunology
Osteoncology
Osteoporosis
Bone metastases

Conflitto
di interesse: Nessuno

Riassunto

Receptor Activator of Nuclear Factor kB Ligand (RANKL), citochina afferente alla superfamiglia del *Tumor Necrosis Factor (TNF)*; il suo specifico recettore cellulare *Receptor Activator of Nuclear Factor kB (RANK)*; il recettore solubile “trappola”, alternativo a RANK, *Osteoprotegerina (OPG)* costituiscono il più importante sistema di controllo del riassorbimento osseo.

RANKL e OPG sono prodotti da cellule stromali del midollo osseo e da cellule della linea osteoblastica. RANK è presente sulla membrana delle cellule della linea osteoclastica, a partire da precursori che provengono da monociti circolanti. L'interazione RANKL-RANK ha un ruolo chiave nel promuovere l'osteoclastogenesi e l'attività riassorbitiva della matrice ossea da parte degli osteoclasti maturi. L'interazione RANKL-OPG sottrae il ligando al suo recettore e blocca questi processi. Le produzioni di RANKL e OPG sono controllate da un complesso sistema di segnali endocrini, paracrini e autocrini. Gli estrogeni riducono RANKL e aumentano OPG. Nelle donne in menopausa, la caduta estrogenica altera l'equilibrio del sistema favorendo una maggiore disponibilità di RANKL per l'osteoclastogenesi. I glicocorticoidi aumentano RANKL e riducono OPG. Dopo somministrazione di dosi medio-elevate di cortisonici si ha, soprattutto in queste donne, una rapida perdita di massa ossea. Negli anni più recenti, è emerso con chiarezza che il sistema RANKL-RANK-OPG è importante anche per il coinvolgimento del sistema immune nelle malattie metaboliche dell'osso, in primo luogo l'osteoporosi primaria (osteoimmunologia). Altrettanto dicasi per il circolo vizioso osteoclasti-cellule tumorali che caratterizza le metastasi osteolitiche (osteoncologia). L'anticorpo di composizione totalmente umana denosumab, altamente specifico per RANKL, è già di uso consolidato nel trattamento dell'osteoporosi di varia origine e si sta rivelando un farmaco biologico di grandi possibilità applicative anche in campo oncologico, in particolare nei tumori caratterizzati da osteotropismo metastatico.

Abstract

Receptor Activator of Nuclear factor kB Ligand (RANKL), a member of the Tumor Necrosis Factor (TNF) superfamily; its cognate cellular receptor, Receptor Activator of Nuclear factor kB (RANK); its decoy soluble receptor, Osteoprotegerin (OPG), are the components of the most important signaling system which leads to bone resorption. RANKL and OPG are produced by stromal cells of the bone marrow and cells of the osteoblastic lineage. RANK is expressed on the membrane of cells of the osteoclastic lineage, notably of precursors coming from blood monocytes. Binding of RANKL to RANK is a crucial step for activating osteoclastogenesis, hence the bone resorptive activity of mature osteoclasts. Binding of RANKL to OPG takes away the signal from its obvious target and prevents these processes. Gene expressions of RANKL and OPG are controlled by a number of interacting mechanisms, which involve endocrine, paracrine and autocrine factors. Estrogens decrease RANKL and increase OPG. In postmenopausal women, estrogen deficiency throws off balance the system allowing more RANKL for osteoclastogenesis. Glucocorticoids increase RANKL and decrease

OPG. After administration of moderate-to-high doses of synthetic glucocorticoid derivatives, a rapid bone loss may occur, in particular in those women. In recent years, evidence has been increasing to support the view that the RANKL-RANK-OPG system plays a major role in mediating the action of immune cells in the pathogenesis of metabolic bone disorders, first primary osteoporosis (osteoimmunology). The same could be said with relevance to the vicious circle which characterizes the cross-talking osteoclasts-cancer cells in the microenvironment of osteolytic metastases (osteoncology). The fully human antibody denosumab, highly specific for RANKL, is efficacious in treating osteoporosis and preventing fractures in different clinical settings and is also promising as an innovative biologic agent in the therapeutic strategy for patients bearing osteotropic cancers.

I. Introduzione

Il sistema noto con gli acronimi RANKL-RANK-OPG è entrato nella letteratura scientifica da meno di 15 anni. In questo ristretto arco temporale, e soprattutto negli anni più recenti, non vi è dubbio che sia aumentato progressivamente, e in misura vistosa, l'interesse per il ruolo fisiopatologico e la possibile modulazione farmacologica di questo sistema. Gli acronimi identificano i seguenti termini: RANKL, *Receptor Activator of Nuclear factor kB Ligand*; RANK, *Receptor Activator of Nuclear factor kB*; OPG *Osteoprotegerin* (Osteoprotegerina). Prima che fosse scelto e condiviso in ambito internazionale l'uso di questi termini (sulla base della raccomandazione di un Comitato ad hoc dell'*American Society for Bone and Mineral Research*), i componenti del sistema avevano avuto altre denominazioni. Ancora, in ragione dell'appartenenza alla superfamiglia del *Tumor Necrosis Factor* (TNFSF) oppure a quella dei relativi recettori (TNFRSF), nella nomenclatura codificata di queste superfamiglie ritroviamo TNFSF 11 (RANKL), TNFRSF 11A (RANK), TNFRSF 11B (OPG)⁽¹⁾.

Negli ultimi anni del secolo scorso, gruppi di ricerca indipendenti, negli Stati Uniti e in Giappone, lavorando sui determinanti molecolari del riconoscimento recettoriale del TNF, che già aveva alle spalle una ricca letteratura ed era nel mirino dell'industria farmaceutica, si imbarcarono in un caso curioso. Un componente della famiglia recettoriale, contrariamente alla regola, non era espresso sulla membrana cellulare; essendo privo di una porzione (*domain*) transmembrana, risultava libero nell'ambiente extracellulare. Questo recettore solubile, in breve tempo caratterizzato come molecola composta di 401 residui aminoacidici, è l'OPG. Il terzo componente del sistema fu quindi il primo a essere scoperto. L'aumentata espressione in topi transgenici e insieme la sua iniezione in vari modelli animali si caratterizzavano per una diffusa, severa osteoporosi. Erano evidenti il blocco del riassorbimento osseo mediato dagli osteoclasti e la riduzione ai minimi termini della popolazione osteoclastica: di qui il termine inizialmente proposto di *osteoclastogenesis inhibitory factor* (OCIF)⁽²⁾.

La natura recettoriale dell'OCIF sollecitava l'individuazione del ligando specifico. Non ci volle molto. Era, ovviamente, una molecola "sorella" del TNF, una proteina transmembrana di tipo II, composta da 316 amminoacidi e, guardacaso, denominata *osteoclast differentiating factor* (ODF). Il cloning molecolare effettuato a rotta di collo dimostrò che ODF era identico come composizione e struttura ad altre proteine, scoperte pressoché contemporaneamente e identificate, rispettivamente, con gli acronimi TRANCE (TNF – *related activation-induced cytokine*) e RANKL da due diversi gruppi

di ricerca, focalizzati sul dialogo intercellulare nel sistema immunitario e sorpresi (ma non tanto!) nel ritrovare gli stessi segnali di dialogo nelle cellule dell'osso. Il terzo componente del sistema, RANK, venne da una cDNA *library* di cellule dendritiche umane. È una proteina transmembrana di tipo I, costituita da 616 amminoacidi e caratterizzata nella porzione extracellulare da 4 regioni ricche in cisteina (*cysteine-rich domains*), sostanzialmente identiche a 4 analoghe regioni N-terminali di OPG/OCIF^(2,3,4).

Nei primi anni 2000, un accumularsi tumultuoso di studi portò non solo alla denominazione definitiva del sistema ma anche a ulteriori, convincenti acquisizioni. Ciò grazie soprattutto ai modelli animali transgenici o, per converso, *knock-out* di specifici segnali, allo studio analitico dei fenotipi di questi animali; alle tecniche di genetica molecolare che consentono di valutare espressione e modulazione dei geni in esame in funzione della differenziazione cellulare e del microambiente tissutale.

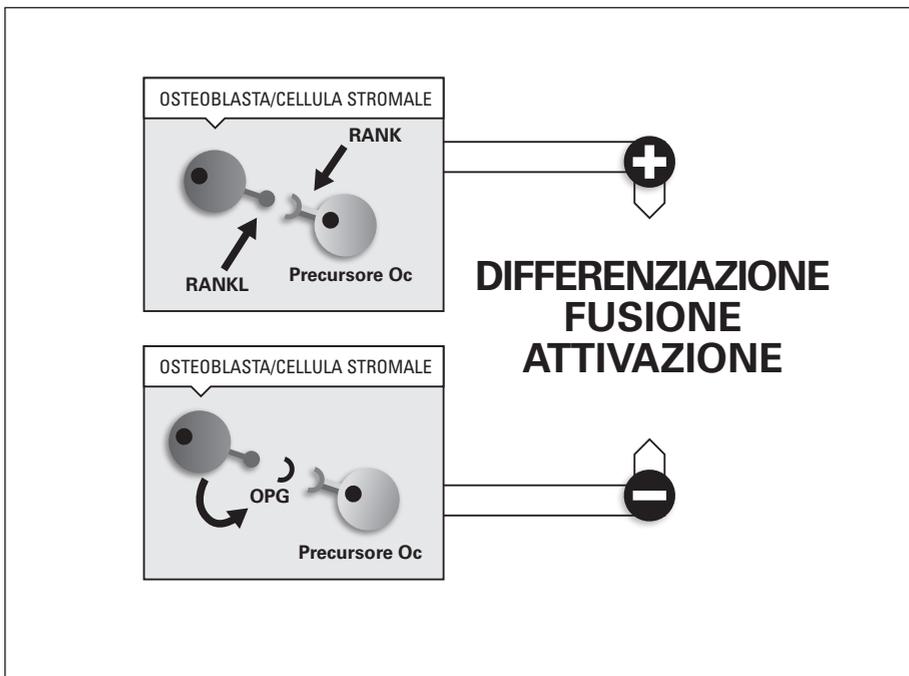


Figura 1. Rappresentazione schematica del sistema RANKL-RANK-OPG e del suo ruolo nel riassorbimento osseo mediato dagli osteoclasti (Oc). I precursori Oc sono il bersaglio cellulare privilegiato, ma anche l'attività riassorbitiva degli osteoclasti maturi che esprimono il recettore RANK è controllata dal sistema.

È oggi chiaro che RANK è lo specifico recettore che media l'azione di RANKL sulla osteoclastogenesi, e che OPG è un recettore "trappola" (*decoy receptor*) che al di fuori della cellula bersaglio blocca RANKL impedendone l'interazione con RANK. La logica conseguenza della maggiore o minore disponibilità di OPG nel microambiente osseo è il ridotto o, al contrario, l'eccessivo riassorbimento osseo mediato dagli osteoclasti (di qui il nome adottato di osteoprotegerina, quasi fosse una sostanza endogena anti-osteoporosi). È altrettanto chiaro che il sistema RANKL-RANK-OPG ha, al di fuori come all'interno dell'osso, un importante ruolo fisiologico nella differenziazione e funzione di cellule immunitarie, come T-linfociti e, in modo particolare, di monociti-macrofagi e cellule dendritiche, che condividono con gli osteoclasti la derivazione dagli stessi precursori emopoietici. Siamo in pieno in quell'area di competenza, culturalmente avanzata e già ricca di prospettive cliniche, che ha preso il nome di *osteo-immunologia*^(5,6,7,8).

II. RANKL-RANK-OPG e riassorbimento osseo

Il riassorbimento osseo dipende dell'attività degli osteoclasti. Fisiologicamente, almeno nello scheletro adulto, la distruzione di osso preesistente ad opera degli osteoclasti è controbilanciata dalla formazione di nuovo osso ad opera degli osteoblasti. Il *coupling* distruzione-formazione avviene in unità anatomo-funzionali caratterizzate da stretti contatti cellulari, altamente sofisticate e rigorosamente controllate. Queste unità sono denominate *basic multicellular units* (BMU). Nell'adulto, sono assemblate 3-4 milioni di BMU ogni anno, e ne sono attive in ogni momento circa 1 milione^(5,9,10).

Gli osteoclasti sono cellule multinucleate, differenziate per la loro funzione specifica. Derivano da precursori emopoietici. Quelli più immaturi risiedono nella *colony forming units-granulocyte macrophage* (CFU-GM). Successivi precursori sono CD14⁺ monociti. Si ritiene che l'1-2% dei monociti circolanti possa differenziarsi compiutamente in osteoclasti^(3,10,11).

La progressione maturativa dai monociti agli osteoclasti comporta l'attivazione di un complesso processo trascrizionale, che si palesa con l'espressione di specifiche caratteristiche fenotipiche. La linea (*lineage*) osteoclastica acquisisce enzimi, come la fosfatasi acida tartrato-resistente (*tartrate resistant acid phosphatase*, TRAP), la catepsina K, la carbossianidasi di tipo II, e recettori come quelli per la calcitonina, la vitronectina, e lo stesso RANK. Si verifica anche la fusione citoplasmatica,

ma non nucleare, di più precursori ormai avanti nel grado differenziativo. Si arriva infine all'osteoclasta maturo, una sorta di megacellula sinciziale (15-20 nuclei o anche più), con polarità di organizzazione endocellulare tale da realizzare, attraverso la superficie a spazzola (*ruffled membrane*) che “pesca” nella lacuna di Howship, e l'acidificazione di questo spazio, la distruzione-digestione della matrice ossea^(3,4,11).

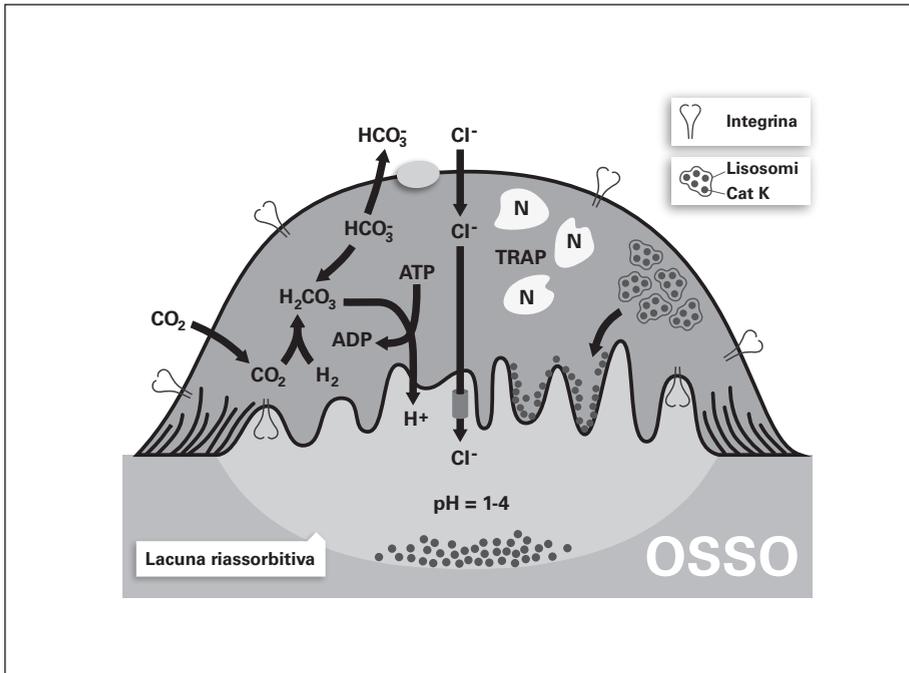


Figura 2. Osteoclasta maturo con più nuclei (N). Principali meccanismi ionici che sottendono l'attività riassorbitiva. Ai lati della cellula sono evidenziate le zone di adesione all'osso, che concorrono a delimitare la cavità riassorbitiva. Cat K: catepsina K; TRAP: fosfatasi acida tartrato resistente.

Tutto il processo che va dal reclutamento osseo dei monociti circolanti allo stadio finale di osteoclasta è RANKL-dipendente, anche se in molti punti il RANKL deve agire di concerto con un altro fattore essenziale, il *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF). Quest'ultimo, fra l'altro, promuove l'espressione di RANK sulla membrana cellulare dei precursori osteoclastici, favorendo così l'interazione RANKL-RANK^(5,12,13). Va comunque ribadito

che il binomio RANKL-RANK è il “regista” dell’osteoclastogenesi. La controprova è fornita dall’instaurarsi di una severa osteopetrosi in quei rari pazienti che hanno mutazioni/delezioni nei geni codificanti per il ligando o il recettore⁽¹⁴⁾.

RANKL è prodotto dalle cellule stromali del midollo osseo e dalle cellule della linea osteoblastica, che derivano da precursori indifferenziati mesenchimali (*mesenchymal stem cells*, MSC)^(5,7). Nel microambiente osseo, gli osteoblasti e soprattutto gli osteociti (terminale differenziativo della linea osteoblastica) sono i principali produttori di RANKL⁽¹⁵⁾. Gli osteoblasti anche sintetizzano e liberano nello spazio cellulare OPG, il recettore solubile che può legare RANKL prima che questo sia riconosciuto da RANK e attivi l’osteoclastogenesi (*decoy receptor*). In sintesi, il numero e la funzione degli osteoclasti dipendono dal numero e dalla funzione (produzione di segnali specifici) degli osteoblasti (e osteociti). Non stupisce che anche M-CSF sia prodotto dalle stesse cellule della linea osteoblastica^(12,13).

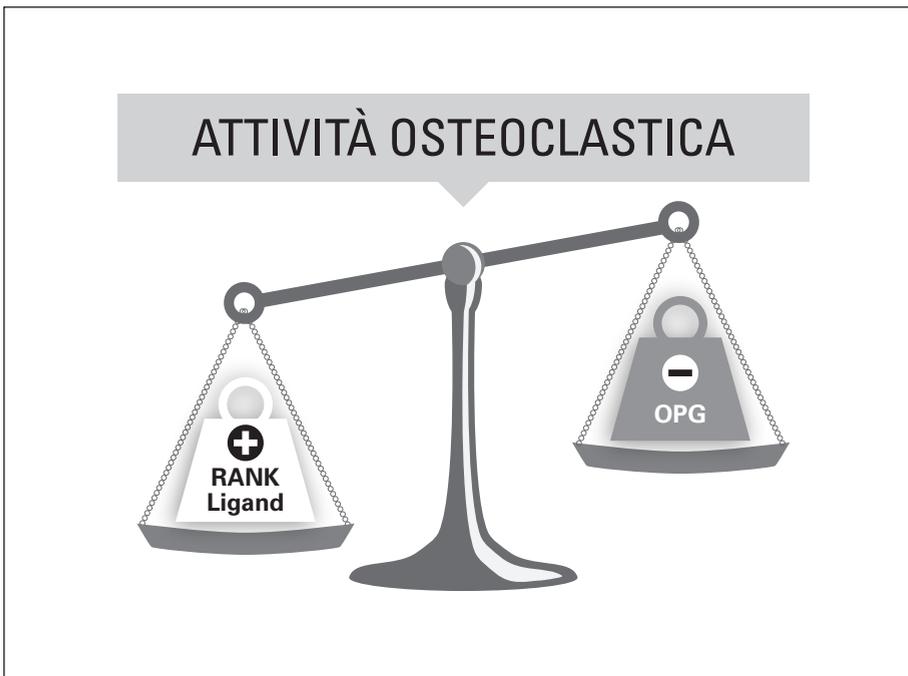


Figura 3. Bilancio RANKL/OPG nel microambiente osseo. I pesi sui piatti della bilancia variano in funzione di un complesso sistema di segnali di stimolo o inibizione delle due citochine che controllano l’attività osteoclastica.

RANKL era stato inizialmente caratterizzato come proteina transmembrana. Come tale, è espresso sulla membrana di cellule stromali e di osteoblasti che nelle BMU prendono diretto contatto con i precursori osteoclastici, i quali, a lor volta, presentano il recettore di membrana RANK. È evidente come il messaggio attivatore della catena di eventi post-recettoriali che controllano l'espressione genica (nella nomenclatura acquisita è inserito il fattore di trascrizione NF κB!) sia facilitato dalla cosiddetta *cell-to-cell interaction*. Ma RANKL esiste anche in forma solubile, "secreto" come tale al di fuori delle cellule produttrici o liberato dalla precedente sede di membrana ad opera di metalloproteinasi attive nell'ambiente. Ignoriamo se il rapporto fra le due quote di RANKL abbia significato per i possibili legami, RANK d'un lato e OPG dall'altro. La quota fissa, ancorata alla membrana, è quella maggiormente espressa dagli osteoblasti; la quota solubile è quella immessa nel cosiddetto sistema (rete) lacuno-canalicolare intraosseo dagli osteociti, ed è anche quella prodotta da tutta una serie di cellule presenti, in condizioni fisiologiche oppure patologiche, nel microambiente osseo. La lista è lunga e magari provvisoria: linfociti di vario tipo, fibroblasti, macrofagi, sinoviociti, cellule neoplastiche metastatiche^(2,5,16,17).

Come è intuibile, l'espressione genica dei vari componenti del sistema RANKL-RANK-OPG è sottoposta a uno stretto controllo, sofisticato e duttile, articolato in segnali endocrini, paracrini, autocrini. Il ruolo chiave del sistema nell'osteoclastogenesi e, più in generale, nell'attività delle BMU e nel continuo rimodellamento scheletrico, fa subito pensare all'eccesso di RANKL e/o al difetto di OPG nelle malattie metaboliche dell'osso caratterizzate da perdita di massa ossea, in primo luogo l'osteoporosi cosiddetta primaria^(6,7). Quella più comune e più studiata, clinicamente assimilabile a una malattia degenerativa cronica, è l'osteoporosi che sopravviene nel sesso femminile dopo la menopausa. E allora, qual'è l'effetto degli estrogeni sul sistema?

Sintetizzando l'ampia letteratura dell'ultimo decennio, è emerso con chiarezza che gli estrogeni sono modulatori negativi di RANKL e modulatori positivi di OPG; riducono anche l'aumento di RANKL indotto da vari segnali (in primo luogo, citochine definite pro-osteoclastogeniche); sono, in definitiva, ormoni che si oppongono al reclutamento, alla differenziazione e all'attività degli osteoclasti, e quindi al riassorbimento osseo^(6,18,19). Agiscono in modo opposto gli ormoni glicocorticoidi e i loro derivati sintetici di uso comune nella cosiddetta terapia cortisonica. Sono, questi steroidi, modulatori positivi di RANKL e modulatori negativi di OPG. L'osteoporosi indotta da glicocorticoidi (*glucocorticoid induced osteoporosis*, GIO) è la più comune forma di osteoporosi secondaria. Riconosce una patogenesi

complessa e differenziata, tipicamente bifasica⁽²⁰⁾. È sempre presente, comunque, una ridotta formazione ossea, conseguenza del depauperamento della popolazione osteoblastica e osteocitaria. Ma non v'è dubbio che nella fase iniziale, caratterizzata dalla rapida perdita di massa ossea (e di qualità ossea!) e dal rapido aumento del rischio fratturativo, soprattutto nelle donne in menopausa, giochi un ruolo importante l'eccessivo riassorbimento RANKL-dipendente^(20,21). Anche il paratormone (*parathyroid hormone*, PTH) e il suo analogo peptidico (*parathyroid hormone-related peptide*, PTH-rP), quest'ultimo prodotto e secreto da numerosi istotipi tumorali, sono in grado di incrementare l'espressione di RANKL (meccanismo autocrino in alcune cellule tumorali!), rendendo ragione delle distruzioni ossee e dell'ipercalcemia severa che sopravvengono nell'iperparatiroidismo primitivo e nei tumori con metastasi osteolitiche secernenti PTH-rP^(5,16,22,23).

Si è accennato alle citochine pro-osteoclastogeniche. Si tratta di un gruppo composito, eterogeneo, di sostanze accreditate di attività pro- o anti-infiammatoria, o di entrambe, prodotte soprattutto da cellule immunitarie ma anche da cellule derivate da MSC, come, ad esempio, l'interleukina-6 (IL-6) prodotta dagli adipociti. Nell'età avanzata, la popolazione degli adipociti nel midollo osseo aumenta progressivamente a scapito della popolazione osteoblastica (midollo giallo delle vecchie descrizioni anatomiche)^(9,11). Alcune citochine, come l'interleukina-1 (IL-1), agiscono sugli osteoclasti già completamente differenziati, aumentandone l'attività riassorbitiva. Intervengono in misura marginale sulla osteoclastogenesi. La loro azione è mediata da specifici recettori di membrana e da segnali intercellulari RANKL-indipendenti. Altre citochine, come le interleukine -6, -11, -17 (IL-6, IL-11, IL-17), sono invece in grado di stimolare direttamente la produzione di RANKL da parte delle cellule stromali e delle cellule della linea osteoblastica^(3,5,24,25). Altre ancora, come il TNF- α , agiscono in entrambi i modi, e quindi possono amplificare in misura rilevante il riassorbimento osseo laddove sono presenti in alte concentrazioni^(3,26).

È quanto si verifica nell'artrite reumatoide, che ha fra i suoi segni caratteristici (*hallmark*) l'erosione ossea subcondrale ma che è anche spesso causa di osteoporosi generalizzata (elevati livelli ematici di IL-6!). Il rationale di utilizzo dei farmaci "biologici" anti-TNF- α si basa anche sulla progressione locale e sistemica del danno osseo. Lo stesso discorso vale per tutte le malattie infiammatorie ed immuno-mediate che presentano un coinvolgimento osteo-articolare^(8,17,27). Basti citare la malattia di Crohn, l'artrite psoriasica, la stessa osteoartrite, di casa nel generale contesto della malattia poliartrosica. Ovviamente, il degrado osseo che consegue

all'eccessivo riassorbimento è più vistoso e più pericoloso nelle pazienti menopausali (non vi è l'azione protettiva "anti-RANKL" degli estrogeni!), soprattutto se assumono cortisonici (GIO!).

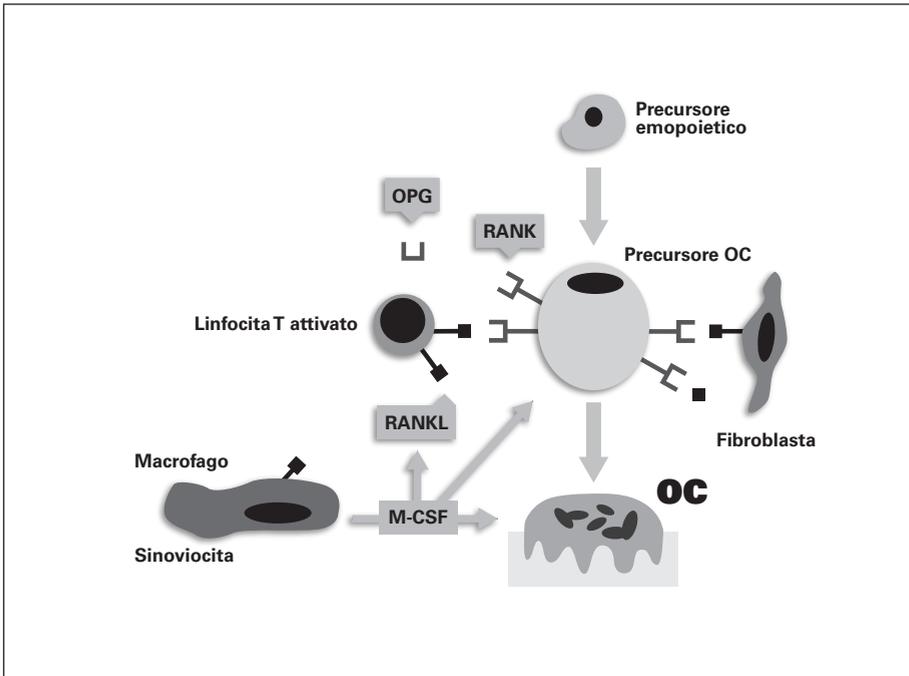


Figura 4. Nelle articolazioni infiammate dell'artrite reumatoide, l'osso subcondrale viene eroso per aumentata attività osteoclastica, a sua volta sostenuta da eccesso di RANKL prodotto da T linfociti attivati, fibroblasti, macrofagi e sinoviociti.

Le fumatrici aggiungono un ulteriore fattore di rischio; la nicotina interferisce negativamente sulla produzione estrogenica inibendo l'aromatasi, che dopo la menopausa è enzima critico per questa produzione⁽²⁸⁾.

Diverso è il caso del *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β). Le citochine pro-osteoclastogeniche sopracitate sono prodotte e liberate nel microambiente osseo da una eterogenea popolazione cellulare reclutata e attivata nelle sedi di infiammazione. Il TGF-β è invece accumulato in complessi inattivi nella matrice ossea, dalla quale è rilasciato in forma attiva quanto questa è digerita e riassorbita dagli osteoclasti. L'osso è certamente la più importante sede di stoccaggio del TGF-β o meglio, di vari componenti della superfamiglia TGF-β^(3,5). Il loro ruolo fisiopatologico è complesso e incerto. Sono ritenuti

importanti segnali per il processo di *coupling*, in quanto favoriscono la chemiotassi e la differenziazione degli osteoblasti che formano nuovo osso nel ciclo di rimodellamento dopo la prima fase di riassorbimento⁽¹⁰⁾. Aumentano quindi le produzioni di RANKL e OPG. Se il bilancio dei modulatori positivi e negativi privilegia l'uno o l'altro componente del sistema, TGF- β accelera o decelera il turnover osseo. Comunque sia, ciò che importa è che la matrice ossea è tutt'altro che un mezzo inerte; anch'essa modula l'attività delle BMU^(10,11,16).

In molti pazienti neoplastici con metastasi osteolitiche, la distruzione della matrice è rapida e libera grandi quantità di TGF- β . Recettori specifici sono espressi sulle cellule tumorali, oltreché sulle cellule ossee e su cellule immunitarie presenti in gran numero nelle lesioni metastatiche. In queste circostanze, la squadra di segnali condensata nel termine TGF- β gioca su

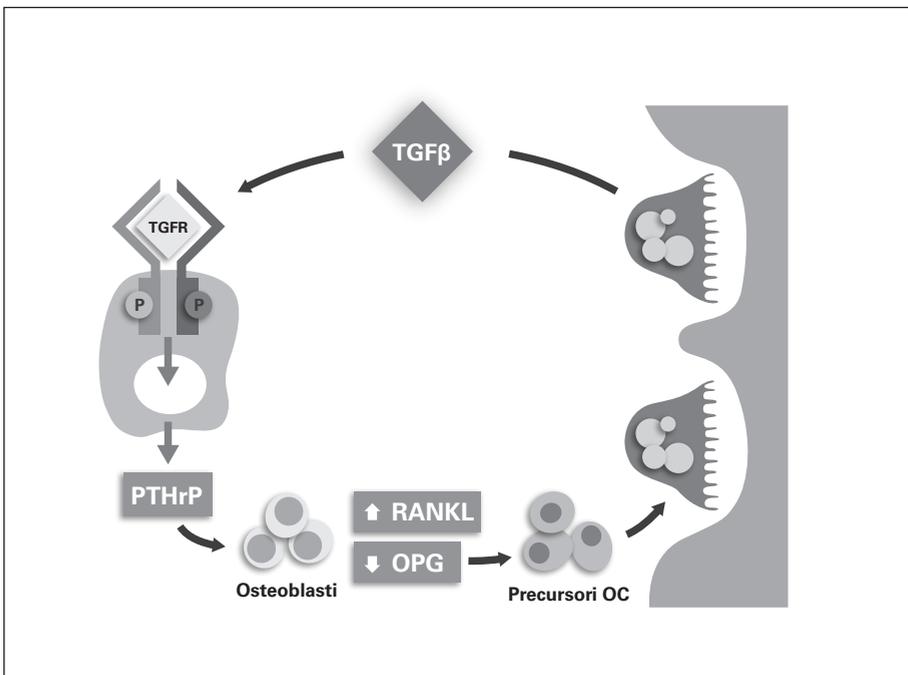


Figura 5. Circolo vizioso osteoclasti – cellule tumorali nel microambiente di una metastasi osteolitica. La distruzione della matrice ossea da parte degli osteoclasti libera TGF β attivo che può interagire con un complesso recettoriale specifico espresso sulla membrana di cellule tumorali. Viene stimolata l'espressione genica di PTHrP che, a sua volta, aumenta la produzione di RANKL e/o inibisce quella di OPG da parte di cellule che esprimono il recettore di riconoscimento specifico per PTH/PTHrP (PTHRI). Questo recettore è presente sulla membrana delle cellule della linea osteoblastica.

molti fronti. Gli effetti possono così compendiarsi: immunosoppressione, angiogenesi, aumentata chemiotassi per cellule tumorali osteotrope, aumentata modulazione di PTH-rP che, a sua volta, aumenta RANKL, osteoclastogenesi e distruzione ossea. È un circolo vizioso ben noto agli oncologi clinici^(16,22,23,29).

Nella Tabella I sono elencati i modulatori endogeni (endocrini, paracrini, autocrini) del rapporto RANKL/OPG nel microambiente osseo. L'aumento o la diminuzione del rapporto causano analoghe variazioni nel riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti.

▲ RANKL/OPG
<ul style="list-style-type: none"> - Glicocorticoidi - Noradrenalina - Paratormone (PTH) - Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) - Interleukina - 6 - Interleukina - 11 - Tumor Necrosis Factor - α (TNF - α) - Prostaglandina E₂ (PGE₂)
▼ RANKL/OPG
<ul style="list-style-type: none"> - Estrogeni - Androgeni - Growth Hormone (GH) - Interleukina - 4 - Interleukina - 13 - Interferon - β - Interferon - γ
▲ RANKL/OPG o ▼ RANKL/OPG*
<ul style="list-style-type: none"> - Vitamina D (1,25(OH)₂ D₃) - Insulina - Insulin-like growth factor I (IGF - I) - Transforming growth factor - β (TGF - β)
* Possibili effetti bidirezionali o divergenti in funzione di particolari condizioni microambientali.

Tabella I. Segnali endocrini, paracrini e autocrini che aumentano o diminuiscono il rapporto RANKL/OPG nel microambiente osseo.

III. RANKL-RANK-OPG e sistema immune

Il termine osteoimmunologia è ormai di uso corrente per gli studiosi e i clinici che si occupano di malattie metaboliche dell'osso. Il coinvolgimento del sistema immune nella patogenesi dell'osteoporosi è oggetto di recenti rassegne, alle quali si rinvia il lettore interessato, nonché di una brillante relazione alla nostra Accademia^(17,25,27). Lavorando su diversi modelli animali generati nei suoi laboratori ad Atlanta, Roberto Pacifici ha documentato in modo inequivoco l'importante ruolo di T e B linfociti nell'osteoclastogenesi RANKL- e TNF- α -dipendente, e ha richiamato l'attenzione sui complessi rapporti fra sistema endocrino (estrogeni e paratormone) e sistema immune nel microambiente osseo^(19,30). I suoi risultati sono stati confermati anche in pazienti menopausali con osteoporosi primaria e secondaria a malattie immuno-mediate⁽³¹⁾.

Come s'è già detto, RANKL può anche essere prodotto e rilasciato nella sua forma solubile da linfociti variamente specializzati, cellule NK (*natural killer*), monociti-macrofagi, plasmacellule. È intuibile come, in parallelo con l'aumento delle conoscenze, sia cresciuto l'interesse degli ematologi per il possibile coinvolgimento del sistema RANKL-RANK-OPG nelle malattie linfo- ed immunoproliferative^(22,32,33). In questa sede, vale la spesa focalizzare l'attenzione su due aspetti, emersi nella più recente letteratura e che hanno importanti ricadute cliniche. In primo riguarda una particolare sottopopolazione linfocitaria, quella dei cosiddetti Th regolatori, o Th 17 linfociti, sempre più accreditati di un ruolo di primo piano nel dialogo intercellulare che regola l'attività della BMU.

I linfociti T *helper* sono divisi in tre fondamentali categorie funzionali, che si distinguono per il ventaglio di citochine prodotte; Th1, Th2 e, appunto, Th17. La differenziazione da precursori (Th 0) avviene in risposta a specifici segnali. Il fenotipo Th 17 richiede per essere tale l'espressione del recettore per l'interleukina-23 (IL-23) e quindi l'azione stimolante del ligando IL-23. Le citochine prodotte da questi particolare T *helper* sono soprattutto interleukina-17 (IL-17), ma anche interleukine-21 e -22 (IL-21, IL-22)⁽³⁴⁾. L'attributo "regolatori" sta a significare che singolarmente o insieme le citochine prodotte sono in grado di amplificare o ridurre l'intensità della risposta infiammatoria e della risposta immunitaria ad antigeni di vario tipo (azione di *tuning*). Il ruolo dei Th 17 (in letteratura sono anche indicati come Tregs) è stato molto valorizzato nella patogenesi di malattie autoimmuni⁽³⁴⁾. Poiché la prevalenza di molte malattie autoimmuni è di gran lunga maggiore nel sesso femminile, si è subito pensato che gli estrogeni fossero modulatori della differenziazione e/o dell'attività dei Th 17. Così è, in effetti, anche se la

letteratura in oggetto ha ancora zone d'ombra^(13,35). Comunque sia, va sempre più emergendo il convincimento che per alcune condizioni cliniche (emblematica è l'artrite reumatoride in menopausa) il venir meno del "freno" estrogenico inneschi una catena di eventi Th 17-dipendenti che esitano in danno immuno-mediato^(13,30,36). Fra i bersagli cellulari dei Th 17 vi sono certamente le cellule "presentanti antigeni", in primo luogo le cellule dendritiche (*dendritic cells*, DC), ma anche gli osteoclasti. Fra l'altro, i linfociti Th 17 sono anche buoni produttori di TNF- α ⁽¹³⁾. In breve, questi linfociti, vanno considerati importanti attori, se non protagonisti, nello scenario osteoimmunologico che consegue alla carenza estrogenica, soprattutto se vi è comorbidità autoimmune. I laboratori dell'industria farmaceutica sono attivamente impegnati nella ricerca di sostanze modulatrici dell'attività dei Th 17, anche se questa non appare mai in senso unico (stimolatoria o inibitoria *tout-court*), ma piuttosto bidirezionale e variabile a seconda delle condizioni sperimentali *in vitro* e del microambiente tissutale *in vivo*.

Il secondo punto riguarda la stretta parentela fra osteoclasti e cellule dendritiche. Si può dire che siano cellule sorelle, derivando entrambi da comuni precursori emopoietici. Ma vi è di più. In particolari condizioni sperimentali, è possibile trasformare DC in osteoclasti, e viceversa. Ignoriamo in quali circostanze questo processo di trans-differenziazione, realizzabile *in vitro*, possa aver luogo *in vivo*, in particolare nella specie umana. Ma le premesse perchè ciò si verifichi ci son tutte. Gli osteoclasti sono cellule non solo altamente specializzate ma anche giganti, che possono presentare decine di nuclei e riassorbire tumultuosamente notevoli quantità di matrice, come nella malattia di Paget e nei tumori gigantomitotici dell'osso. È singolare e concettualmente stimolante che abbiano la potenzialità di esprimere molecole del sistema maggiore di istocompatibilità (MHC), CD 40, CD 80 e comportarsi come cellule che presentano antigeni e attivano T linfociti⁽³⁷⁾. Il processo di fusione cellulare che dà luogo all'osteoclasta multinucleato era stato poco considerato dalla ricerca scientifica, ma oggi è sotto la luce dei riflettori. Fra i vari fattori favorenti la fusione, è di importanza critica una proteina inizialmente individuata nelle cellule dendritiche, la *dendritic cell-specific transmembrane protein* (DC-STAMP)^(13,38). Non stupisce. L'espressione di questa proteina è aumentata dalla vitamina E (α -tocoferolo) e, per contro, ridotta da sostanze oggi note soltanto come sigle usate nei laboratori di ricerca farmacologica⁽³⁹⁾. La sensibilità di DC-STAMP (ma vi è anche una *osteoclast-specific*, OC-STAMP!) nei confronti di potenziali farmaci fa intravedere nuove vie terapeutiche per le malattie caratterizzate da abnorme distruzione ossea⁽⁴⁰⁾.

Una importante implicazione clinica del binomio DC-osteoclasti riguarda l'osteonecrosi mandibola-mascella, nota con il termine inglese di *osteonecrosis of the jaw*, ONJ⁽⁴¹⁾. Si tratta di una grave complicanza della terapia con bisfosfonati (in larghissima misura aminobisfosfonati usati in oncologia), ma rilevata anche con altri farmaci, sempre d'uso oncologico, come inibitori dell'angiogenesi (bevacizumab, sunitinib) e con le alte dosi "oncologiche" dell'anticorpo monoclonale anti-RANKL denosumab^(41,42). L'osteomielite distruttrice caratteristica dell'ONJ è espressione di immunodeficienza locale. La patogenesi è multifattoriale, ma certamente un ruolo di primo piano va attribuito al danno farmaco-indotto delle DC, particolarmente numerose nella sottomucosa del cavo orale. Queste cellule richiedono anch'esse il segnale RANKL per la loro maturazione funzionale. Analogamente agli osteoclasti, incorporano al loro interno gli aminobisfosfonati. Nel tempo, viene disorganizzato un sistema intracellulare critico per trasportare sulla superficie molecole di riconoscimento e di segnale essenziali per la risposta immunitaria a batteri provenienti dal cavo orale e colonizzanti l'osso sottostante^(42,43,44).

IV. Denosumab: Applicazioni nelle malattie metaboliche dell'osso

OPG era stato il primo componente del sistema a essere identificato; OPG fu anche il primo componente a essere proposto quale farmaco efficace nel ridurre l'eccessivo riassorbimento osseo RANKL-dipendente. Studi preclinici su vari modelli animali e anche studi pilota in donne con osteoporosi post menopausale confermarono l'evidente inibizione del riassorbimento, testimoniata dalla rapida caduta dei relativi marcatori biochimici, dopo singola iniezione di OPG ricombinante coniugata al frammento Fc di immunoglobulina IG1 (Fc-OPG)^(2,45). Questi risultati convinsero la comunità scientifica che il blocco di RANKL era una via percorribile e razionale per inserire nella pratica clinica nuovi farmaci anti-riassorbitivi, alternativi ai bisfosfonati⁽¹⁸⁾. Il meccanismo d'azione, in effetti, è del tutto diverso per i due tipi di farmaci. Mentre i bisfosfonati riducono l'attività degli osteoclasti maturi inserendo ostacoli nella complessa macchina metabolica di queste cellule, la sottrazione di RANKL ai precursori osteoclastici ostacola la differenziazione a osteoclasti maturi e riduce il numero di cellule attive⁽⁴⁶⁾.

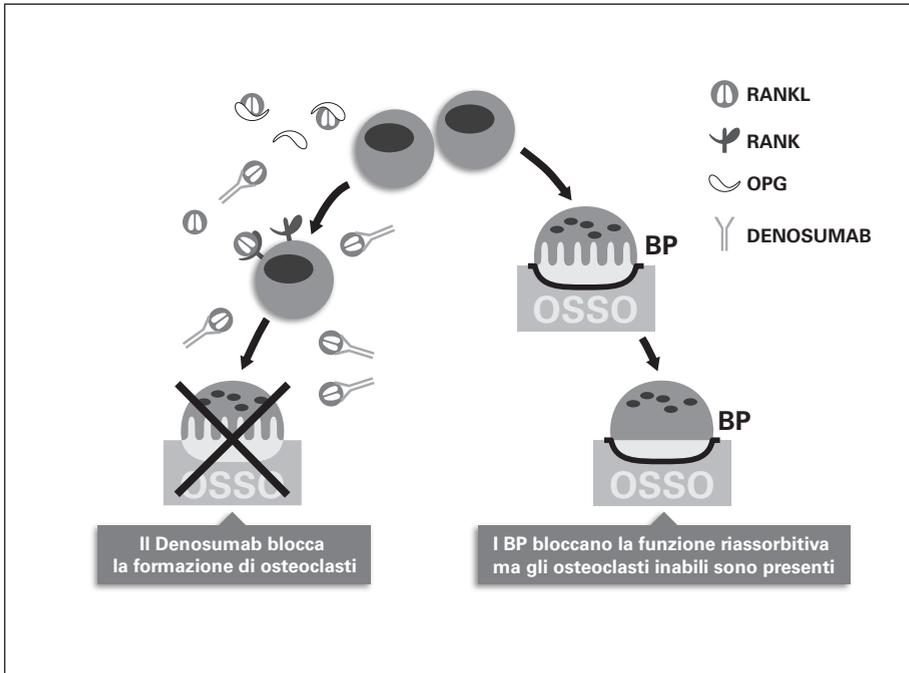


Figura 6. Denosumab e bisfosfonati (BP) hanno meccanismi d'azione differenti. Denosumab blocca la differenziazione cellulare della linea osteoclastica e riduce il numero degli osteoclasti attivi. I bisfosfonati si concentrano a livello delle lacune riassorbitive e bloccano l'attività metabolica degli osteoclasti ma non ne riducono il numero.

I risultati incoraggianti ottenuti con Fc-OPG furono messi in disparte nei primi anni 2000 dal successo di un agente biologico dal profilo farmacocinetico e farmacodinamico chiaramente preferibile. In tutto il mondo è oggi ufficialmente registrato e commercializzato l'anticorpo monoclonale di composizione totalmente umana denosumab (inizialmente noto con la sigla AM 162), che ha RANKL come bersaglio specifico. Denosumab è una immunoglobulina IG2, che si caratterizza per un'affinità per la molecola bersaglio particolarmente elevata ($K_d = 3 \cdot 10^{-12}$ M). È un anticorpo altamente specifico, in quanto non riconosce altri membri della superfamiglia TNF, quali TNF- α , TNF- β , *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) e CD40^(2,45).

Una mole impressionante di ricerche, precliniche e cliniche, hanno via via definito modalità e possibilità applicative del nuovo farmaco biologico, subito accreditato di indubbia efficacia. Nelle malattie metaboliche dell'osso

con squilibrio RANKL/OPG e, come suol dirsi, eccessivo *turnover*, laddove cioè, la quota di matrice riassorbita nelle BMU eccede la quota neoformata, l'iniezione sottocutanea di denosumab 60 mg ogni 6 mesi è in grado di aumentare massa e densità ossee (*bone mineral density*, BMD), sia nella componente trabecolare che in quella corticale. L'osso risulta in tal modo più resistente a eventi lesivi, acquista forza (*strength*) e, in sostanza, riduce il rischio di fratturarsi^(6,45,47).

Nel nostro paese, a tutt'oggi, l'autorità regolatoria (Agenzia Italiana del Farmaco, AIFA) ha limitato l'uso del denosumab alle seguenti indicazioni terapeutiche: trattamento dell'osteoporosi in donne in post-menopausa ad aumentato rischio di fratture; trattamento della perdita ossea associata a terapia ormonale ablativa in uomini con cancro della prostata ad aumentato rischio di fratture. Si è tenuto conto dei risultati di studi internazionali, multicentrici, randomizzati (RCT, *randomized clinical trials*), ben noti ai clinici del settore con una serie di acronimi: FREEDOM, DEFEND, HALT^(48,49,50).

Non è questa la sede per discutere la scelta restrittiva di AIFA nei confronti di farmaci biologici innovativi e indubbiamente costosi. Abbiamo una serie di note cogenti per i medici prescrittori e gli assessorati regionali. Il loro scopo è l'inserimento di questi farmaci in un contesto "garantito" di *evidence-based medicine* (EBM), requisito ineludibile perché il servizio sanitario nazionale se ne faccia carico. Nell'applicazione pratica, sul campo, come suol dirsi, il sistema adottato per far freno a una dilagante prescrizione ha sollevato non poche critiche. Nel caso nostro, è intuibile come l'indicazione generica di aumentato rischio di fratture si presti a interpretazioni diverse e richieda competenze specifiche, non superficiali e talora multidisciplinari. La burocrazia e la fredda applicazione di norme impersonali dovrebbero cedere il campo alla responsabilità professionale e al dialogo fiduciale fra le diverse componenti della sanità pubblica. Il discorso è innanzitutto culturale, se ancora ha valore la parola qualità nella cura di malattie croniche invalidanti. Ma si rimane scettici sulle possibilità che venga recepito.

La lezione che arriva al clinico dal progresso incessante delle conoscenze e dalla disponibilità di nuovi farmaci è sempre la stessa, e la medicina interna ne è la portavoce più accreditata. Malato e non malattia, questa è la scelta. In altri termini, individualizzazione della strategia terapeutica sulla base della valutazione "globale" del caso, della storia passata e delle prospettive future, della comorbidità e dei farmaci concomitanti, della percepita qualità della vita. E dialogo costante con i colleghi esperti di specifici aspetti, perchè pazienti sempre più anziani sono anche pazienti sempre più complessi. Chi scrive da tempo sostiene, in molte sedi, questa impostazione concettuale,

che valorizza anche il coinvolgimento del paziente stesso nelle scelte terapeutiche (consenso informato, sia dei benefici attesi che dei possibili effetti indesiderati). Si può constatare con piacere, che anche dall'altra parte dell'Atlantico, dopo la stagione delle *guidelines* (che non vanno affatto abbandonate!), si approda oggi ad una analoga visione^(51,52,53).

In quest'ottica, il profilo di sicurezza di denosumab (al dosaggio approvato di 60 mg come iniezione singola sottocutanea una volta ogni 6 mesi!) merita qualche parola. Abbiamo dati su pazienti monitorati a lungo, con trattamento protratto per parecchi anni, come le donne post-menopausali arruolate nel più importante studio registrativo di fase III, denominato FREEDOM (*Fracture Reduction Evolution of Denosumab in Osteoporosis Every 6 Months*). Va affermandosi con sempre maggior evidenza la più che buona tollerabilità del farmaco^(47,54). Si è detto che Amgen, l'azienda che ha brevettato e commercializzato denosumab, è stata "inaspettatamente fortunata" (*unexpectedly lucky*), vista l'importanza extra-ossea del segnale RANKL per diversi ambienti cellulari, e la sua espressione in cellule dendritiche, macrofagi e linfociti. Ma nelle pazienti in trattamento con denosumab l'incidenza di infezioni e neoplasie (immunosorveglianza!) non è risultata superiore a quella attesa nella generale popolazione, e anche il rischio di alcune infezioni cutanee, come cellulite ed erisipela, sul quale si era richiamata l'attenzione dopo iniziali segnalazioni, si è molto ridimensionato con l'andare del tempo. Modelli murini deprivati di RANK specificamente nei B linfociti fanno pensare a vie alternative per il raggiungimento della completa differenziazione fenotipica⁽⁵⁵⁾. L'immunità umorale non viene quindi meno in corso di terapia con denosumab, contrariamente a quanto temuto dopo l'osservazione del mancato sviluppo linfonodale negli animali *knock-out* per RANKL⁽¹³⁾.

V. Denosumab: Applicazioni in oncologia clinica

In ragione della sua efficacia anti-riassorbitiva e della linea osteoclastica (precursori e osteoclasti maturi) quale privilegiato bersaglio cellulare, denosumab è entrato a pieno titolo fra i farmaci che nei pazienti con metastasi ossee trovano indicazione per prevenire i cosiddetti *skeletal-related events* (SRE), ritardare la progressione metastatica, migliorare la qualità di vita (Tabella II). Il denosumab condivide queste indicazioni con i bisfosfonati, in particolare con potenti aminobisfosfonati iniettabili per via endovenosa come l'acido zoledronico. Vantaggi del denosumab possono essere l'iniezione sottocutanea, l'emivita della molecola circolante inferiore al mese, il mancato

<i>Skeletal related events. Complicanze cliniche delle metastasi ossee</i>
<ul style="list-style-type: none"> – Frattura patologica – Dolore che necessita di radioterapia palliativa – Intervento di stabilizzazione scheletrica – Compressione del midollo spinale – Ipercalcemia neoplastica

Tabella II.

accumulo nell'osso, la clearance mediata dal sistema reticolo endoteliale e indipendente dalla funzione renale⁽⁵⁶⁾.

Un iniziale studio di fase II aveva documentato l'efficacia del denosumab in pazienti metastatici ossei precedentemente trattati con bisfosfonati endovena (pamidronato e acido zoledronico⁽⁵⁷⁾). In una fase successiva tre studi di fase III hanno supportato la tesi di una superiorità del denosumab nei confronti dell'acido zoledronico, almeno per quanto attiene alla prevenzione degli SRE in alcuni tipi di cancro metastatico. Le popolazioni di pazienti esaminate erano affette, rispettivamente, da carcinoma mammario, carcinoma della prostata, e altre neoplasie che non fossero le due precedenti (in maggioranza carcinoma del polmone e mieloma multiplo)^(58,59,60). In questi studi, i pazienti erano randomizzati a ricevere 120 mg di denosumab sottocute *versus* acido zoledronico 4 mg endovena ogni 4 settimane.

Com'era logico attendersi, la diffusione di questi risultati nella comunità scientifica (anticipati in sede congressuale e poi pubblicati in riviste prestigiose) ha prodotto un turbinio di ricerche oncologiche, sia d'ordine basico-preclinico sia cliniche. Importanti studi di fase III in corso ormai da tempo, si concluderanno non prima del 2015. Il quesito di fondo, sollevato anche per l'acido zoledronico e tutt'ora irrisolto, è se il denosumab, bloccando RANKL, abbia come bersaglio soltanto la popolazione osteoclastica che causa la distruzione ossea nelle sedi metastatiche, oppure agisca anche direttamente sulle cellule neoplastiche e sulla loro interazione con il microambiente tissutale ovunque si trovino, osso in primo luogo ma non solo^(29,61,62).

Non è certo questa la sede per una disamina a vasto raggio della letteratura che si va accumulando e che riguarda i più svariati tipi di cancro, soprattutto quelli che con significativa frequenza danno luogo a metastati scheletriche. Fra l'altro, va emergendo che RANKL ha un importante e peculiare ruolo nella biologia di cloni onco-ematologici, modulando la produzione di

citochine e la differenziazione immunofenotipica più di quanto non sia evidente nelle neoplasie solide^(33,63,64). Anche per questo, l'utilizzo del denosumab per contrastare la progressione ossea della malattia mielomatosa, apparentemente logico e razionale, necessita di ulteriori studi prima dell'approvazione definitiva. Ciò premesso, e con il beneficio d'inventario del mancato aggiornamento sulle più recenti pubblicazioni, vale la spesa fermare l'attenzione su denosumab e RANKL nel carcinoma della mammella. È la neoplasia più indagata, sia per l'osteotropismo della diffusione metastatica sia per la riconosciuta espressione di RANKL nella differenziazione lobulo-alveolare necessaria alla lattogenesi, e anche nella trasformazione tumorale inducibile in modelli animali^(65,66,67).

Va ricordata, innanzitutto, l'efficacia del denomasub (al dosaggio "anti-osteoporotico" di 60 mg ogni 6 mesi, di gran lunga inferiore a quello scelto per gli studi oncologici sopracitati) nell'incrementare la densità minerale ossea e prevenire fratture in pazienti post-menopausali con carcinoma mammario non metastatico, sottoposte a terapia adiuvante con inibitori dell'aromatasi (*Aromatase Inhibitors, AI*)^(56,66). È noto come un importante effetto collaterale della terapia con AI sia l'aumentato riassorbimento osseo che, a sua volta, aumenta il rischio fratturativo.

È oggi in corso uno studio di fase III, finalizzato a verificare l'ipotesi di una maggiore efficacia di denosumab *versus* placebo in un'ampia popolazione di pazienti con carcinoma mammario in stadio II-III, a rischio elevato di ripresa di malattia (studio D-CARE; *trial* NCT01077154). Sono parecchi gli *outcomes* oncologici in studio ma l'obiettivo primario è la durata di malattia libera da metastasi scheletriche (*bone metastasis-free survival*). Denosumab è somministrato al dosaggio di 120 mg ogni 4 settimane per i primi 6 mesi, e poi ogni 3 mesi per una durata totale di trattamento di 5 anni. L'impianto dello studio è stato modellato sulla falsariga di precedenti studi di fase III sull'uso di acido zoledronico nel trattamento adiuvante del carcinoma mammario; si tratta di studi che hanno avuto vasta eco e sollevato opinioni contrastanti fra gli oncologi clinici^(68,69,70). Vi è quindi molta attesa per i risultati di D-CARE, anche perchè l'interesse per il ruolo di RANKL nella progressione metastatica del carcinoma della mammella va espandendosi a macchia d'olio, man mano che vengono pubblicati dati sui modelli preclicini, compatibili con la tesi che l'espressione di RANKL da parte delle cellule di carcinoma mammario non favorisca soltanto la loro colonizzazione ossea ma anche quella in altre sedi, ad esempio nel polmone⁽⁶²⁾. Dev'essere comunque ribadito che l'estrapolazione concettuale all'oncologia clinica, all'utilizzo cioè di denosumab per una chemioprevenzione della malattia

metastatica, non può essere ancora accettata senza le evidenze documentate da RCT^(56,71).

E in conclusione, vale la spesa fermare l'attenzione non solo sul ligando del sistema oggetto di queste pagine ma anche sullo specifico recettore, cioè su RANK. Vi sono evidenze che le cellule di un buon numero di tumori metastatici all'osso esprimono RANK in misura significativa (apprezzabile istochimicamente), e che vi è buona concordanza di espressione fra tumore primario e tumore metastatico^(72,73,74). È acquisito che nel microambiente osseo sede di metastasi sopravviene un circolo vizioso. Se ne è già sottolineata l'importanza. Semplificando al massimo processi complessi, d'un lato si amplifica nel tempo il danno scheletrico per il continuo reclutamento di osteoclasti attivi e dall'altro, aumenta progressivamente la massa tumorale per lo stimolo operato da segnali (fattori di crescita, citochine) rilasciati da cellule ossee e dalla matrice ossea distrutta. Se nella lista di questi segnali c'è anche RANKL, e l'attivazione dei *pathways* intracellulari indotti dall'interazione RANKL-RANK sostiene caratteristiche fenotipiche e funzionali delle cellule neoplastiche, allora la disponibilità su queste cellule di RANK in un ambiente dove RANKL è per definizione abbondante può risultare elemento critico per la colonizzazione e la progressione metastatica. È il rovescio della medaglia. Quale delle due facce, corrispondenti, rispettivamente, a osteoclasti e cellule neoplastiche, sia privilegiata dal blocco anticorpale di RANKL, oppure, com'è logico ipotizzare, entrambe ne traggano vantaggio, non è oggi dato sapere. Quel che è certo, è che il fervore di studi dedicati a questa affascinante area dell'osteoncologia produce incessantemente nuove conoscenze e fa già intravedere importanti sviluppi applicativi nel prossimo futuro.

BIBLIOGRAFIA

1. Feng X. *Regulatory roles and molecular signaling of TNF family members in osteoclasts*. *Gene*. 2005; 350: 1-13.
2. Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. *Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease*. *Endocr Rev*. 2008; 29: 155-192.
3. Takahashi N, Udagawa N, Kobayashi Y, Takami M, Martin TJ, Suda T. *Osteoclast generation*. In "Principles of Bone Biology, 3rd Edition, Volume 1", 2008: 175- 192, Academic Press, San Diego.
4. Vaanamen HK, Zhao H. *Osteoclast function: biology and mechanisms*. In "Principles of Bone Biology, 3rd Edition, Volume 1", 2008: 193-209, Academic Press, San Diego.
5. Angeli A, Dovic A. *Physiology of the bone*. In "Osteo-oncology Textbook", 2010: 33-63, Poletto Editore, Milano.
6. Hofbauer LC, Kühne CA, Viereck V. *The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases*. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2004; 4: 268-275.
7. Boyce BF, Xing L. *Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling*. *Arch Biochem Biophys*. 2008; 473: 139-146.
8. Leibbrandt A, Penninger JM. *RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology*. *Ann NY Acad Sci*. 2008; 1143: 123-150.
9. Manolagas SC. *Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis*. *Endocr Rev*. 2000; 21: 115-137.
10. Seeman E. *Bone modeling and remodeling*. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2009; 19: 219-233.
11. Marotti G. *Functional anatomy of bone*. In "Osteo-oncology Textbook", 2010: 2-32, Poletto Editore, Milano.
12. Nakashima T, Hayashi M, Takayanagi H. *New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms*. *Trends Endocrinol Metab*. 2012; 23: 582-590.
13. Boyce BF. *Advances in osteoclast biology reveal potential new drug targets and new roles for osteoclasts*. *J Bone Miner Res*. 2013; 28: 711-722.
14. Del Fattore A, Cappariello A, Teti A. *Genetics, pathogenesis and complications of osteopetrosis*. *Bone*. 2008; 42: 19-29.
15. Bonewald LF. *The amazing osteocyte*. *J Bone Miner Res*. 2011; 26: 229-238.
16. Bertoldo F, Flamini E, Santini D, Ibrahim T. *Physiopathology of bone metastases*. In "Osteo-oncology Textbook", 2010: 64-98, Poletto Editore, Milano.
17. Takayanagi H. *Osteoimmunology: shared mechanisms and cross-talk between the immune and bone systems*. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7: 292-304.
18. Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, Riggs BL. *Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women*. *J Clin Invest*. 2003; 111: 1221-1230.
19. Weitzmann MN, Pacifici R. *Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale*. *J Clin Invest*. 2006; 116: 1186-1194.

20. Mazziotti G, Angeli A, Bilezikian JP, Canalis E, Giustina A. *Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update*. Trends Endocrinol Metab. 2006; 17: 144-149.
21. Angeli A, Guglielmi G, Dovio A, Capelli G, De Feo D, Giannini S, Giorgino R, Moro L, Giustina A. *High prevalence of asymptomatic vertebral fractures in post-menopausal women receiving chronic glucocorticoid therapy: a cross-sectional outpatient study*. Bone. 2006; 39: 253-259.
22. Roodman GD. *Mechanisms of bone metastasis*. N Engl J Med. 2004; 350:1655-1664.
23. Dougall WC, Chaisson M. *The RANK/RANKL/OPG triad in cancer-induced bone diseases*. Cancer Metast Rev. 2006; 25: 541-549.
24. Weitzmann MN, Cenci S, Rifas L, Haug J, Dipersio J, Pacifici R. *T cell activation induces human osteoclast formation via receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-dependent and -independent mechanisms*. J Bone Miner Res. 2001; 16: 328-337.
25. Rho J, Takami M, Choi Y. *Osteoimmunology: interactions of the immune and skeletal systems*. Mol Cells. 2004; 17: 1-9.
26. Fuller K, Murphy C, Kirstein B, Fox SW, Chambers TJ. *TNFalpha potently activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL*. Endocrinology. 2002; 143: 1108-1118.
27. Takayanagi H. *New developments in osteoimmunology*. Nat Rev Rheumatol. 2012; 8: 684-689.
28. Brand JS, Chan MF, Dowsett M, Folklerd E, Wareham NJ, Luben RN, van der Schouw YT, Khaw KT. *Cigarette smoking and endogenous sex hormones in postmenopausal women*. J Clin Endocrinol Metab. 2011; 96: 3184-3192.
29. Dougall WC. *Molecular pathways: osteoclast-dependent and osteoclast-independent roles of the RANKL/RANK/OPG pathway in tumorigenesis and metastasis*. Clin Cancer Res. 2012; 18: 326-335.
30. Pacifici R. *Role of T cells in ovariectomy induced bone loss-revisited*. J Bone Miner Res. 2012; 27: 231-239.
31. D'Amelio P, Grimaldi A, Di Bella S, Brianza SZ, Cristofaro MA, Tamone C, Giribaldi G, Ulliers D, Pescarmona GP, Isaia G. *Estrogen deficiency increases osteoclastogenesis up-regulating T cells activity: a key mechanism in osteoporosis*. Bone. 2008; 43: 92-100.
32. Farrugia AN, Atkins GJ, To LB, Pan B, Horvath N, Kostakis P, Findlay DM, Bardy P, Zannettino AC. *Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression by human myeloma cells mediates osteoclast formation in vitro and correlates with bone destruction in vivo*. Cancer Res. 2003; 63: 5438-45.
33. Schmiedel BJ, Scheible CA, Nuebling T, Kopp HG, Wirths S, Azuma M, Schneider P, Jung G, Grosse-Hovest L, Salih HR. *RANKL expression, function, and therapeutic targeting in multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia*. Cancer Res. 2013; 73: 683-694.
34. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. *IL-17 and Th17 Cells*. Annu Rev Immunol. 2009; 27: 485-517.
35. Pacifici R. *The immune system and bone*. Arch Biochem Biophys. 2010; 503: 41-53.
36. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, Tanaka S, Kodama T, Akira S, Iwakura Y, Cua DJ, Takayanagi H. *Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction*. J Exp Med. 2006; 203: 2673-2682.

37. Li H, Hong S, Qian J, Zheng Y, Yang J, Yi Q. *Cross talk between the bone and immune systems: osteoclasts function as antigen-presenting cells and activate CD4+ and CD8+ T cells.* Blood. 2010; 116: 210-217.
38. Yagi M, Miyamoto T, Sawatani Y, Iwamoto K, Hosogane N, Fujita N, Morita K, Ninomiya K, Suzuki T, Miyamoto K, Oike Y, Takeya M, Toyama Y, Suda T. *DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells.* J Exp Med. 2005; 202: 345-351.
39. Fujita K, Iwasaki M, Ochi H, Fukuda T, Ma C, Miyamoto T, Takitani K, Negishi-Koga T, Sunamura S, Kodama T, Takayanagi H, Tamai H, Kato S, Arai H, Shinomiya K, Itoh H, Okawa A, Takeda S. *Vitamin E decreases bone mass by stimulating osteoclast fusion.* Nat Med. 2012; 18: 589-594.
40. Miyamoto H, Suzuki T, Miyauchi Y, Iwasaki R, Kobayashi T, Sato Y, Miyamoto K, Hoshi H, Hashimoto K, Yoshida S, Hao W, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Morioka H, Matsumoto M, Chiba K, Takeya M, Toyama Y, Miyamoto T. *Osteoclast stimulatory transmembrane protein and dendritic cell-specific transmembrane protein cooperatively modulate cell-cell fusion to form osteoclasts and foreign body giant cells.* J Bone Miner Res. 2012; 27: 1289-1297.
41. Woo SB, Hellstein JW, Kalmar JR. *Systematic review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws.* Ann Intern Med. 2006; 144: 753-761.
42. Reid IR. *Osteonecrosis of the jaw: who gets it, and why?* Bone. 2009; 44: 4-10.
43. Angeli A, Calzolari G, Data V. *Pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw(ONJ): focus on osteoimmunology.* Bone. 2009; 45: S128.
44. Kalyan S, Quabius ES, Wiltfang J, Mönig H, Kabelitz D. *Can peripheral blood $\gamma\delta$ T cells predict osteonecrosis of the jaw? An immunological perspective on the adverse drug effects of aminobisphosphonate therapy.* J Bone Miner Res. 2013; 28: 728-735.
45. Delmas PD. *Clinical potential of RANKL inhibition for the management of postmenopausal osteoporosis and other metabolic bone diseases.* J Clin Densitom. 2008; 11: 325-338.
46. Baron R, Ferrari S, Russell RG. *Denosumab and bisphosphonates: different mechanisms of action and effects.* Bone. 2011; 48: 677-692.
47. Anastasilakis AD, Toulis KA, Goulis DG, Polyzos SA, Delaroudis S, Giomisi A, Terpos E. *Efficacy and safety of denosumab in postmenopausal women with osteopenia or osteoporosis: a systematic review and a meta-analysis.* Horm Metab Res. 2009; 41: 721-729.
48. Cummings SR, San Martin J, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, Delmas P, Zoog HB, Austin M, Wang A, Kutilek S, Adami S, Zanchetta J, Libanati C, Siddhanti S, Christiansen C. *Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis.* N Engl J Med. 2009; 361: 756-765.
49. Smith MR, Egerdie B, Hernández Toriz N, Feldman R, Tammela TL, Saad F, Heracek J, Szwedowski M, Ke C, Kupic A, Leder BZ, Goessl C. *Denosumab in men receiving androgen-deprivation therapy for prostate cancer.* N Engl J Med. 2009; 361: 745-755.
50. Miller PD, Wagman RB, Peacock M, Lewiecki EM, Bolognese MA, Weinstein RL, Ding B, San Martin J, McClung MR. *Effect of denosumab on bone mineral density and biochemical markers of bone turnover: six-year results of a phase 2 clinical trial.* J Clin Endocrinol Metab. 2011; 96: 394-402.

51. Fraenkel L, Fried TR. *Individualized medical decision making: necessary, achievable, but not yet attainable*. Arch Intern Med. 2010; 170: 566-569.
52. Goldberger JJ, Buxton AE. *Personalized medicine vs guideline-based medicine*. JAMA. 2013; 309: 2559-2560.
53. Kerr EA, Hayward RA. *Patient-centered performance management: enhancing value for patients and health care systems*. JAMA. 2013; 310: 137-138.
54. Brown JP, Roux C, Törring O, Ho PR, Beck Jensen JE, Gilchrist N, Recknor C, Austin M, Wang A, Grauer A, Wagman RB. *Discontinuation of denosumab and associated fracture incidence: analysis from the Fracture Reduction Evaluation of Denosumab in Osteoporosis Every 6 Months (FREEDOM) trial*. J Bone Miner Res. 2013; 28: 746-752.
55. Perlot T, Penninger JM. *Development and function of murine B cells lacking RANK*. J Immunol. 2012; 188: 1201-1205.
56. Yee AJ, Raje NS. *Denosumab, a RANK ligand inhibitor, for the management of bone loss in cancer patients*. Clin Interv Aging. 2012; 7: 331-338.
57. Fizazi K, Lipton A, Mariette X, Body JJ, Rahim Y, Gralow JR, Gao G, Wu L, Sohn W, Jun S. *Randomized phase II trial of denosumab in patients with bone metastases from prostate cancer, breast cancer, or other neoplasms after intravenous bisphosphonates*. J Clin Oncol. 2009; 27: 1564-1571.
58. Stopeck AT, Lipton A, Body JJ, Steger GG, Tonkin K, de Boer RH, Lichinitser M, Fujiwara Y, Yardley DA, Viniegra M, Fan M, Jiang Q, Dansey R, Jun S, Braun A. *Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study*. J Clin Oncol. 2010; 28: 5132-5139.
59. Fizazi K, Carducci M, Smith M, Damião R, Brown J, Karsh L, Milecki P, Shore N, Rader M, Wang H, Jiang Q, Tadros S, Dansey R, Goessl C. *Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study*. Lancet. 2011; 377: 813-822.
60. Henry DH, Costa L, Goldwasser F, Hirsh V, Hungria V, Prausova J, Scagliotti GV, Sleeboom H, Spencer A, Vadhan-Raj S, von Moos R, Willenbacher W, Woll PJ, Wang J, Jiang Q, Jun S, Dansey R, Yeh H. *Randomized, double-blind study of denosumab versus zoledronic acid in the treatment of bone metastases in patients with advanced cancer (excluding breast and prostate cancer) or multiple myeloma*. J Clin Oncol. 2011; 29: 1125-1132.
61. Fornier MN. *Denosumab: second chapter in controlling bone metastases or a new book?* J Clin Oncol. 2010; 28: 5127-5131.
62. Azim H, Azim HA Jr. *Targeting RANKL in breast cancer: bone metastasis and beyond*. Expert Rev Anticancer Ther. 2013; 13: 195-201.
63. Lai FP, Cole-Sinclair M, Cheng WJ, Quinn JM, Gillespie MT, Sentry JW, Schneider HG. *Myeloma cells can directly contribute to the pool of RANKL in bone bypassing the classic stromal and osteoblast pathway of osteoclast stimulation*. Br J Haematol. 2004; 126: 192-201.
64. Schmiedel BJ, Nuebling T, Steinbacher J, Malinowska A, Wende CM, Azuma M, Schneider P, Grosse-Hovest L, Salih HR. *Receptor activator for NF- κ B ligand in acute myeloid leukemia: expression, function, and modulation of NK cell immunosurveillance*. J Immunol. 2013; 190: 821-831.

65. Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, Elliott R, Scully S, Voura EB, Lacey DL, Boyle WJ, Khokha R, Penninger JM. *The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development*. Cell. 2000; 103: 41-50.
66. Hofbauer LC, Rachner TD, Hamann C. *From bone to breast and back- the bone cytokine RANKL and breast cancer*. Breast Cancer Res. 2011; 13: 107-111.
67. Schramek D, Sigl V, Penninger JM. *RANKL and RANK in sex hormone-induced breast cancer and breast cancer metastasis*. Trends Endocrinol Metab. 2011; 22: 188-194.
68. Gnant M, Mlineritsch B, Stoeger H, Luschin-Ebengreuth G, Heck D, Menzel C, Jakesz R, Seifert M, Hubalek M, Pristauz G, Bauernhofer T, Eidtmann H, Eiermann W, Steger G, Kwasny W, Dubsky P, Hochreiner G, Forsthuber EP, Fesl C, Greil R. *Adjuvant endocrine therapy plus zoledronic acid in premenopausal women with early-stage breast cancer: 62-month follow-up from the ABCSG-12 randomised trial*. Lancet Oncol. 2011; 12: 631-641.
69. Gnant M, Mlineritsch B, Schippinger W, Luschin-Ebengreuth G, Pöstlberger S, Menzel C, Jakesz R, Seifert M, Hubalek M, Bjelic-Radusic V, Samonigg H, Tausch C, Eidtmann H, Steger G, Kwasny W, Dubsky P, Fridrik M, Fitzal F, Stier M, Rücklinger E, Greil R; ABCSG-12 Trial Investigators, Marth C. *Endocrine therapy plus zoledronic acid in premenopausal breast cancer*. N Engl J Med. 2009; 360: 679-691.
70. Coleman RE, Marshall H, Cameron D, Dodwell D, Burkinshaw R, Keane M, Gil M, Houston SJ, Grieve RJ, Barrett-Lee PJ, Ritchie D, Pugh J, Gaunt C, Rea U, Peterson J, Davies C, Hiley V, Gregory W, Bell R; AZURE Investigators. *Breast-cancer adjuvant therapy with zoledronic acid*. N Engl J Med. 2011; 365: 1396-1405.
71. Canon JR, Roudier M, Bryant R, Morony S, Stolina M, Kostenuik PJ, Dougall WC. *Inhibition of RANKL blocks skeletal tumor progression and improves survival in a mouse model of breast cancer bone metastasis*. Clin Exp Metastasis. 2008; 25: 119-129.
72. Kitazawa S, Kitazawa R. *RANK ligand is a prerequisite for cancer-associated osteolytic lesions*. J Pathol. 2002; 198: 228-236.
73. Bhatia P, Sanders MM, Hansen MF. *Expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB is inversely correlated with metastatic phenotype in breast carcinoma*. Clin Cancer Res. 2005; 11: 162-165.
74. Santini D, Perrone G, Roato I, Godio L, Pantano F, Grasso D, Russo A, Vincenzi B, Fratto ME, Sabbatini R, Della Pepa C, Porta C, Del Conte A, Schiavon G, Berruti A, Tomasino RM, Papotti M, Papapietro N, Onetti Muda A, Denaro V, Tonini G. *Expression pattern of receptor activator of NFκB (RANK) in a series of primary solid tumors and related bone metastases*. J Cell Physiol. 2011; 226: 780-784.

NUOVI APPROCCI AL TRATTAMENTO MEDICO DELLA RETINOPATIA DIABETICA

Massimo Porta, Sara Gallo

Centro Retinopatia Diabetica
Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Torino

Parole chiave: *Diabete mellito*
Retinopatia diabetica
Sistema renina-angiotensina
Lipidi sierici
Fattore di crescita endoteliale vascolare

Key words: *Diabetes mellitus*
Diabetic retinopathy
Renin-angiotensin system
Serum lipids
Vascular Endothelial Growth Factor

Riassunto

La retinopatia diabetica (RD) è una delle principali cause di disabilità visiva in età lavorativa nei paesi industrializzati. Essa viene classificata in non-proliferante (lieve, moderata o grave) e proliferante, con possibile sviluppo di edema maculare diabetico in tutte queste fasi. La prevalenza e l'incidenza della RD aumentano con l'aumentare della durata del diabete e con il peggioramento del controllo metabolico e della pressione arteriosa. Gli attuali approcci per prevenire e/o curare la RD includono l'ottimizzazione del controllo della glicemia e della pressione arteriosa e lo screening per l'identificazione precoce delle lesioni retiniche ad alto rischio, anche se ancora asintomatiche. I risultati di recenti studi clinici suggeriscono un ruolo dei bloccanti del sistema renina-angiotensina (inibitori dell'enzima convertente l'angiotensina e antagonisti del recettore dell'angiotensina II) e del fenofibrato nel ridurre la progressione e/o indurre la regressione della RD non proliferante lieve-moderata. È inoltre stato dimostrato che la somministrazione intra-vitrea di agenti anticorpali anti-fattore di crescita

endoteliale vascolare (VEGF) è capace non solo di bloccare ma in molti casi di invertire il processo di perdita visiva nell'edema maculare.

Summary

Diabetic Retinopathy (DR) is a leading cause of visual impairment in working age in industrialized countries. It is classified as non proliferative (mild, moderate or severe) and proliferative, with diabetic macular edema potentially developing at any of these stages. The prevalence and incidence of DR increase with diabetes duration and worsening of metabolic and blood pressure control. Current approaches to prevent and/or treat DR include optimized control of blood glucose and blood pressure and screening for early identification of high risk, though still asymptomatic retinal lesions. Results from recent clinical trials suggest a role for blockers of the renin-angiotensin system (angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers) and for fenofibrate in reducing progression and/or inducing regression of mild to moderate non proliferative DR. Intra-vitreous administration of anti-VEGF agents was shown to reduce visual loss in more advanced stages of DR, especially in macular edema.

Dati epidemiologici e classificazione

La retinopatia diabetica rimane una delle prime cause di deficit visivo in età lavorativa nei paesi industrializzati e può raggiungere gli stadi più avanzati e gravi nella pressochè totale assenza di sintomi. La sua prevalenza è di circa il 70% nei pazienti con diabete di tipo 1 e del 40% fra quelli di tipo 2, senza differenze di genere⁽¹⁾. La prevalenza aumenta con la durata del diabete e praticamente tutti i pazienti con diabete mellito di tipo 1 sviluppano retinopatia, proliferante nella metà dei casi, entro 20 anni dalla diagnosi. Le forme più gravi di retinopatia, quella proliferante e l'edema maculare, sono presenti rispettivamente nel 23% e 14% dei pazienti con diabete di tipo 1 e tipo 2. Presso il Centro Retinopatia Diabetica di Torino, su 6.857 pazienti consecutivi sottoposti a screening dal 1992 al 2003, la prevalenza di retinopatia era del 39%, di cui il 19% in forma lieve, l'11% in forma moderata e nei casi rimanenti in forma grave.

Alla base della retinopatia diabetica sono presenti alterazioni dei capillari retinici quali: occlusioni multiple, aumento della permeabilità della parete e, nella forma proliferante, crescita di vasi neoformati. Le occlusioni causano aree di ischemia e dilatazione focale (*microaneurismi*) e generalizzate dei capillari. I vasi dilatati, fragili e iperpermeabili, danno luogo a *microemorragie* e alla trasudazione di siero e lipoproteine a livello della neuroretina, con la formazione di edema e di quelli che vengono definiti "*essudati duri*". L'occlusione dei vasi di diametro maggiore può produrre infarti ischemici della retina, che appaiono come aree bianco-grigiastre a margini sfumati, denominate *noduli cotonosi*. La presenza di queste lesioni definisce la retinopatia diabetica "non proliferante", che può essere lieve, moderata o severa e che può evolvere verso due forme ad alto rischio di cecità: l'edema maculare diabetico (DME) e la retinopatia proliferante⁽²⁾.

Quando le lesioni della retinopatia coinvolgono la macula, la parte della retina responsabile della visione dei dettagli e dei colori, consegue una grave compromissione di queste funzioni. L'*edema maculare* (Figura 1) colpisce prevalentemente i pazienti con diabete di tipo 2 e, poiché questi rappresentano più del 90% della popolazione diabetica, risulta quantitativamente la principale causa di deficit visivo secondario al diabete. La progressiva ischemia della periferia retinica può causare invece la retinopatia diabetica proliferante (Figura 2), con la crescita di *neovasi* che invadono il corpo vitreo e possono dare luogo ad *emorragie endoculari* ed allo sviluppo di *tessuto fibroso* che, contraendosi, può causare *distacco* della retina. Se l'ischemia procede verso la parte anteriore dell'occhio la neovascolarizzazione può raggiungere l'iride ("*rubeosi dell'iride*"), causando la grave condizione definita *glaucoma neovascolare*.

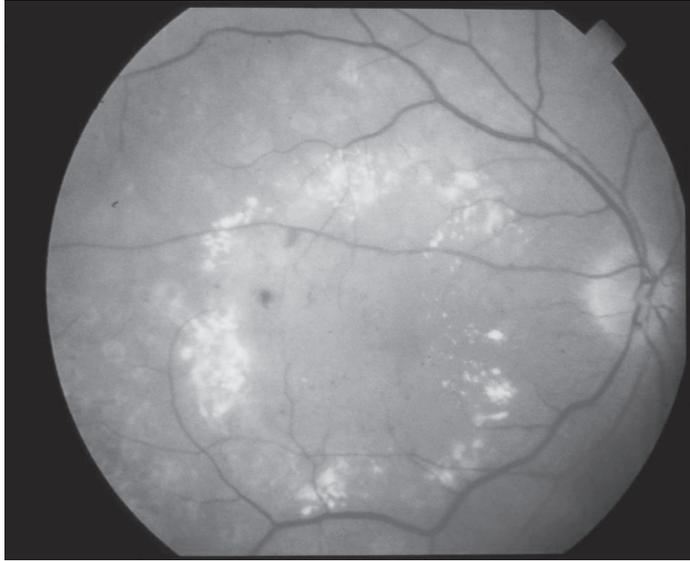


Figura 1. Edema maculare diabetico con ispessimento della retina in regione maculare e deposizione di essudati duri.

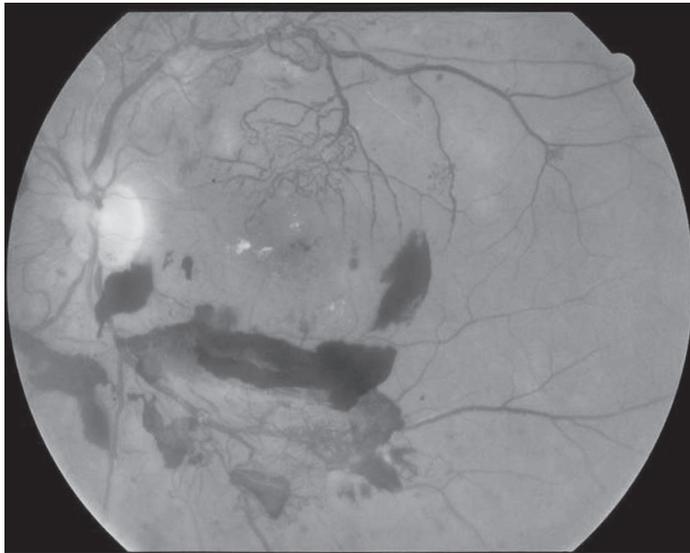


Figura 2. Retinopatia proliferante con evidenti arcate di neovascolarizzazione. Sono presenti segni di sanguinamento preretिनico. Alcuni essudati duri in regione maculare indicano la contemporanea presenza di edema maculare.

Sebbene la retinopatia diabetica sia considerata una patologia prevalentemente a carico dei piccoli vasi, sempre maggiori evidenze considerano la degenerazione della neuroretina (apoptosi delle cellule gangliari e attivazione delle cellule gliali) come un evento precoce che può precedere e forse contribuire alle anomalie del microcircolo^(3,7). Il danno a carico della neuroretina può causare la perdita della capacità della discriminazione dei colori e della sensibilità al contrasto, come rilevabile da studi elettrofisiologici nei pazienti con breve durata di diabete^(8,10), e il ritardo della risposta all'elettroretinogramma multifocale potrebbe predire lo sviluppo della microangiopatia precoce^(11,13). Vie metaboliche e di segnale coinvolte nella neurodegenerazione retinica possono infatti prendere parte o attivare meccanismi coinvolti nella patogenesi della microangiopatia⁽¹⁴⁾.

Fisiopatologia

Quattro ipotesi sono state individuate tra i possibili meccanismi di danno vascolare glucosio-indotto e quindi considerate potenziali targets terapeutici:

- i) aumento del flusso lungo la via dei polioli,
- ii) aumentata formazione di prodotti finali di glicazione avanzata (AGEs),
- iii) attivazione della proteina chinasi C (PKC),
- iv) aumentato flusso attraverso la via delle esosamine.

L'aldoso reduttasi è l'enzima chiave della via dei polioli. Essa riduce l'aldeide, tossica, in alcoli inattivi e il glucosio intracellulare in eccesso in sorbitolo consumando NADPH con conseguente pseudoipossia iperglicemica⁽¹⁵⁾ e aumento della suscettibilità allo stress ossidativo intracellulare⁽¹⁶⁾. In alcuni studi clinici tuttavia il sorbinil, un inibitore dell'aldoso reduttasi, non è stato osservato modificare il decorso della retinopatia diabetica⁽¹⁷⁾.

Alti livelli di glucosio intracellulare reagiscono con proteine, aminoacidi e acidi nucleici attraverso la condensazione di basi di Schiff con gruppi amminici con successiva riorganizzazione irreversibile in prodotti di Amadori. Gli AGE vengono prodotti lentamente attraverso ulteriori reazioni di Maillard. Gli AGE possono anche derivare da prodotti precoci della glicazione attraverso glucossidazione o attraverso frammenti dicarbonilici reattivi generati da glucosio libero. Gli AGE a loro volta possono modificare le proteine intracellulari⁽¹⁸⁾, la matrice extracellulare⁽¹⁹⁾ e le proteine circolanti, determinando l'attivazione dei recettori AGE (rAGE) con la produzione di citochine infiammatorie e fattori di crescita. Nella retinopatia diabetica sperimentale⁽²⁰⁾ l'inibizione degli AGE attraverso aminoguanidina previene alcuni cambiamenti strutturali ma, a causa della sua tossicità, non è possibile provarla nell'uomo.

Alti livelli di glucosio intracellulare determinano un incremento della sintesi de novo del diacilglicerolo, un secondo messaggero lipidico che, a sua volta, attiva la sintesi di PKC⁽²¹⁾ provocando una serie di effetti quali la diminuzione della sintesi di ossido nitrico sintasi endoteliale e aumento della sintesi di endotelina 1, del Transforming Growth Factor β , dell' inibitore dell'attivatore del plasminogeno 1⁽²²⁾ e del fattore nucleare-kB(NF-kB)⁽²³⁾. La ruboxistaurina, un inibitore specifico per le isoforme β 1 e 2 della PKC, molto espresse nella retina diabetica, è stata sviluppata e sottoposta a studi clinici. Nonostante il suo utilizzo fosse stato associato ad una migliore acuità visiva rispetto al placebo in pazienti con DME e nonostante fossero stati segnalati pochi effetti collaterali, tale agente non ha ottenuto la registrazione per l'indicazione al trattamento della RD⁽²⁴⁾.

Infine, l'eccesso di fruttosio-6-fosfato, derivato dall'elevata disponibilità intracellulare di glucosio, può essere trasformato in glucosamina-6-fosfato e quindi in uridina difosfato Nacetilglucosamina, che agisce sui residui di serina e treonina di fattori di trascrizione, con conseguente alterazione patologica dell'espressione genica⁽²⁵⁾. Questa via sembra peraltro attiva soprattutto nella patogenesi della nefropatia diabetica.

Brownlee e collaboratori hanno ipotizzato che il possibile denominatore comune ('meccanismo unificante') di queste vie biochimiche apparentemente indipendenti sia l'eccessiva produzione glucosio-indotta di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte della catena mitocondriale di trasporto degli elettroni all'interno l'endotelio, come risultato di flusso aumentato attraverso il ciclo di Krebs^(16,23). Le specie reattive dell'ossigeno causando la rottura di filamenti di DNA nucleare, attivano la poli-(ADP-ribosio) polimerasi (PARP), che a sua volta inibisce l'attività della GAPDH⁽²⁶⁾, quindi spingendo i metaboliti dalla glicolisi verso le vie sopramenzionate.

La benfotiamina, un derivato della tiamina che può essere somministrato oralmente, blocca tutti i principali percorsi citati implicati nella patogenesi della retinopatia diabetica, ed è stata dimostrata essere efficace nel prevenire la retinopatia diabetica sperimentale⁽²⁷⁾. Tuttavia mancano studi clinici che ne dimostrino l'efficacia nell'uomo.

Attuali possibilità di trattamento

Le possibilità di prevenzione e terapia a nostra disposizione includono l'ottimizzazione del controllo della glicemia e della pressione arteriosa e l'individuazione precoce della retinopatia ad alto rischio ma ancora asintomatica attraverso lo screening.

Il Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) ha dimostrato in pazienti con diabete di tipo 1 che il trattamento insulinico ottimizzato riduce l'incidenza della retinopatia del 76%, la progressione di una forma non proliferante lieve del 54% e la necessità di fotocoagulazione del 56%⁽²⁸⁾. Nei pazienti di tipo 2, nel UK Prospective Diabetes Study (UKPDS), il controllo metabolico ottimizzato ha mostrato una riduzione del 21% della progressione della retinopatia e della necessità di intervento di cataratta nel 24% dei casi⁽²⁹⁾. Il follow-up dei pazienti coinvolti in questi studi ha dimostrato che gli effetti benefici del controllo glicemico nel tempo determinano una sorta di 'memoria' metabolica⁽³⁰⁾, in base alla quale ogni periodo della vita trascorso con un buon controllo glicemico risulterebbe utile nella prevenzione della retinopatia e delle altre complicanze. Tuttavia, una recente metaanalisi condotta su tutti i più importanti trial clinici relativi al diabete tipo 2 conclude che se il controllo ottimizzato della glicemia è efficace nel ridurre l'incidenza di nuova RD e la progressione delle sole forme lievi, esso non previene l'utilizzo della fotocoagulazione e l'incidenza del danno visivo grave e della cecità. Per contro, il trattamento intensivo più che raddoppia l'insorgenza delle ipoglicemie gravi⁽³¹⁾.

L'UKPDS ha anche dimostrato che ridurre la pressione arteriosa (nel corso del trial da 154/87 a 144/82 mmHg in otto anni) riduce la progressione della retinopatia del 34% e il rischio complessivo di peggioramento dell'acuità visiva del 47%⁽³²⁾ probabilmente riducendo l'edema maculare diabetico. Fino a poco tempo fa il solo studio indirizzato a supportare l'efficacia di un rigido controllo dell'ipertensione per la prevenzione della RD è stato lo UKPDS. Tuttavia gli studi Action in Diabetes and Vascular disease preterax and diamicronmrControlled Evaluation (ADVANCE)⁽³³⁾ e ACTION to CONTROL cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD)⁽³⁴⁾ non sono riusciti a confermare l'influenza dell'abbassamento della pressione arteriosa sulla progressione della RD. Comunque i pazienti appartenenti allo studio UKPDS avevano avuto maggiori riduzioni pressorie rispetto a quelli appartenenti allo studio ADVANCE (-5,6 mmHg sulla pressione sistolica e -2,2 sulla pressione diastolica a partire dai valori 145/81 mmHg con un follow-up di 4,3 anni)⁽³³⁾ o allo studio ACCORD, partendo da valori di 135/75 e scendendo a 128/68 con un follow-up di 3,7 anni⁽³⁴⁾, suggerendo sia che un abbassamento della pressione sia più efficace nei casi di ipertensione scarsamente controllata sia la necessità di follow-up più lunghi per osservare un effetto sulla progressione della RD. Non sono stati osservati effetti ereditari nel controllo della pressione nei pazienti appartenenti allo studio UKPDS⁽³¹⁾.

Le attuali linee-guida raccomandano di perseguire livelli di HbA1c inferiori a 7.0% e valori pressori inferiori a 130/80. Peraltro, il raggiungimento di questi obiettivi appare tutt'altro che agevole nella popolazione diabetica generale e dati raccolti in USA⁽³⁵⁾, Francia⁽³⁶⁾, UK⁽³⁷⁾, Italia⁽³⁸⁾ ed altri paesi mostrano che meno della metà, spesso meno di un terzo, dei pazienti riesce a raggiungere e mantenere tali obiettivi. I pazienti a trattamento insulinico hanno un controllo peggiore di quelli trattati con ipoglicemizzanti orali e, a loro volta, questi ultimi vanno peggio di quelli trattati con sola dieta⁽³⁷⁾ probabilmente riflettendo i livelli della residua secrezione dell'insulina endogena. I possibili motivi di questo alto grado di fallimento terapeutico comprendono l'inerzia medica, la ridotta aderenza dei pazienti alle prescrizioni e l'insufficiente efficacia dei provvedimenti farmacologici e dello stile di vita. Spesso i medici sono scarsamente proattivi nel correggere livelli elevati di emoglobina glicata e pressione arteriosa come mostra un sondaggio in 30 cliniche universitarie americane⁽³⁵⁾. Questa tuttavia probabilmente non è l'unica ragione. Uno studio clinico di intervento della durata di due anni condotto a Liverpool su 200 pazienti con insufficiente controllo metabolico ha mostrato che gli sforzi dei sanitari erano scarsamente ricompensati da un calo dell'HbA1c, con la sola eccezione dei pazienti trattati con sola dieta⁽³⁷⁾. La situazione è particolarmente grave fra i bambini e gli adolescenti diabetici dove, secondo un recente lavoro, meno del 5% raggiunge un'HbA1c inferiore a 7.0% e più dell'80% è su livelli superiori a 8.0%⁽³⁹⁾. È anche possibile che gli obiettivi terapeutici siano semplicemente troppo ambiziosi, almeno per i gruppi di età più giovane e più avanzata, come suggerito dall'incremento di mortalità osservata nel tentativo di abbassare l'emoglobina glicata al di sotto di 6,5%⁽⁴⁰⁾. È anche possibile che ogni paziente sia in qualche modo "settato" su un livello individuale di gravità del diabete, e quindi su valori più o meno elevati di emoglobina glicata nelle differenti fasi della loro vita. Certamente tale punto di vista può essere considerato pragmatico o utilitaristico, forse politicamente scorretto e comunque non supportato da evidenze scientifiche. In realtà, se si vanno a verificare i fattori di motivazione personale si scopre che solo circostanze eccezionali e di durata limitata nel tempo, come la gravidanza, sono associate a livelli di HbA1c inferiori o uguali a 6,5% in più dell'80% delle pazienti⁽⁴¹⁾ per poi ritornare più elevati dopo il parto.

In ogni caso, i livelli di assistenza diabetologica sembrano migliorare progressivamente in tutto il mondo, grazie alla crescente sensibilizzazione e disponibilità di materiali per l'automonitoraggio e la terapia. I dati del National Health And Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2004 dimostrano un lento ma costante aumento della percentuale di pazienti

statunitensi con HbA1c inferiore a 7.0%⁽⁴²⁾. Probabilmente in connessione con questo fenomeno positivo, anche i dati epidemiologici raccolti in Scandinavia e nel Wisconsin mostrano una minore incidenza cumulativa di retinopatia proliferante nei pazienti che hanno contratto il diabete tipo 1 negli anni più recenti^(43,44). Nella coorte dello studio DCCT/EDIC, a 30 anni dall'ingresso nello studio, l'incidenza cumulativa della retinopatia proliferante è risultata del 21% nei pazienti che furono randomizzati alla terapia ottimizzata, contro il 50% in quelli che rimasero a trattamento convenzionale⁽³⁰⁾.

Benché importanti dal punto di vista generale, la ricaduta di questi dati sul paziente individuale rimangono da verificare. È possibile che la progressione della retinopatia venga ritardata, piuttosto che ridotta, e che con il prolungamento dell'aspettativa di vita dei pazienti diabetici il risultato finale sia uno spostamento della curva di incidenza e che la retinopatia compaia lo stesso, solo più tardi. Dati estrapolati dalla casistica del DCCT avevano mostrato che il trattamento insulinico ottimizzato per tutta la vita prolungherebbe di 14,7 anni il periodo libero da retinopatia proliferante, di 8,2 anni il periodo libero da edema maculare e di 7,7 anni il periodo libero da cecità⁽⁴⁵⁾, a fronte di un rischio di ipoglicemie gravi di due o tre volte maggiore e dell'aumento di peso. Infine rimangono possibili altri fattori predisponenti non meglio identificati come suggerito dalla pratica clinica quotidiana e la cui importanza fu ben dimostrata, sempre nella casistica DCCT. Infatti uno studio retrospettivo di tutti i pazienti che parteciparono allo studio dimostrò che il 10% di quelli che erano rimasti nel miglior quintile di HbA1c ($\leq 6.87\%$) sviluppò comunque retinopatia mentre ben il 43% di quelli che erano rimasti nel quintile peggiore ($\text{HbA1c} \geq 9.49\%$) non svilupparono lesioni retiniche nel corso dello studio⁽⁴⁶⁾. La ricerca di determinanti genetiche che rendono i pazienti suscettibili alla, o protetti dalla, microangiopatia rimane un campo aperto che ha finora prodotto pochi risultati generalizzabili.

Attualmente, il principale mezzo terapeutico a nostra disposizione per prevenire il deficit visivo conseguente alla retinopatia diabetica è la fotocoagulazione laser, che riduce del 95% l'incidenza di cecità da retinopatia proliferante e del 50% la perdita di acuità visiva dovuta all'edema maculare⁽⁴⁷⁾. Quando il laser non è sufficiente, perché applicato tardivamente o perché la retinopatia è molto aggressiva, possono essere prese in considerazione procedure di chirurgia vitreo-retinica (vitrectomia)⁽⁴⁸⁾.

Poiché i livelli di glicemia e pressione arteriosa raccomandati dalle linee-guida non sono sempre raggiungibili, e poiché la retinopatia si può sviluppare anche nei pazienti ben compensati, è indispensabile l'organizzazione

di programmi di screening sistematico della popolazione diabetica. Per screening si intende una procedura diagnostica semplice, applicata ad un'intera popolazione a rischio, con lo scopo di individuare lesioni severe che possono essere sottoposte ad idoneo trattamento prima che causino sintomi o danno funzionale. Lo screening non rappresenta perciò un iter diagnostico completo, ma una metodica per individuare i pazienti che necessitano di ulteriori indagini.

L'efficacia dello screening per la retinopatia diabetica è stata dimostrata in quei luoghi, quali l'Islanda o la Svezia, in cui ha portato alla riduzione della cecità correlata al diabete⁽⁴⁹⁾. Un programma nazionale di screening capillare della retinopatia è stato istituito nel Regno Unito⁽⁵⁰⁾, ed i risultati saranno disponibili nei prossimi anni.

Nuove prospettive terapeutiche

La mancanza di una terapia mirata a specifici meccanismi patogenetici rimane un grave limite alla prevenzione della cecità secondaria al diabete. Numerose evidenze sperimentali suggeriscono un coinvolgimento del sistema renina-angiotensina (RAS) ed è probabile l'esistenza di un RAS intraoculare fisiologicamente attivo, con l'angiotensina 2 che, tramite i recettori AT-1, favorirebbe l'espressione retinica di VEGF e la proliferazione endoteliale. Lo studio EUCLID⁽⁵¹⁾ aveva segnalato che il lisinopril, un ACE-inibitore, riduce la progressione della retinopatia e l'incidenza della forma proliferante in pazienti con diabete di tipo 1. Peraltro, la retinopatia non era un obiettivo primario dello studio, che risultava sottodimensionato dal punto di vista statistico. Il più recente studio ADVANCE/ ADREM (ADvance REtinal Measurements)⁽⁵²⁾ sembra mostrare un effetto protettivo, non statisticamente significativo, sulla progressione della retinopatia di un altro ACE-inibitore, il perindopril, associato a un diuretico, l'indapamide, in un gruppo di 1241 pazienti con diabete tipo 2.

DIRECT (DIabetic RETinopathy Candesartan Trials) è un gruppo di 3 studi clinici multicentrici, randomizzati e controllati con placebo, finalizzati a verificare se il blocco farmacologico del RAS mediante Candesartan, 32 mg, sia in grado di prevenire la comparsa della retinopatia diabetica in pazienti con diabete di tipo 1 (DIRECT Prevent-1) e di prevenirne la progressione o favorirne la regressione in pazienti con diabete di tipo 1 (DIRECT Protect-1) e tipo 2 (DIRECT Protect-2)^(53,54). In totale sono stati randomizzati 5231 pazienti normoalbuminurici. Tutti i pazienti con diabete tipo 1 e il 27% di quelli con diabete tipo 2 erano normotesi mentre gli altri erano in trattamento

con farmaci per l'ipertensione non bloccanti il sistema RAS. Il follow-up medio è stato di 4,7 anni.

DIRECT Prevent-1 ha mostrato che il candesartan riduce del 35% il rischio di insorgenza della retinopatia nel diabete di tipo 1, con un NNT di 18 pazienti trattati per prevenire un evento. La stadiazione della retinopatia al termine dello studio era significativamente più favorevole nei pazienti trattati con candesartan sia in DIRECT Prevent-1 che in DIRECT Protect-1 (539, come pure in DIRECT Protect-2⁽⁵⁴⁾). Quest'ultimo studio ha dimostrato una riduzione del 13%, non statisticamente significativa, del rischio di progressione della retinopatia ed un aumento del 34%, altamente significativo, delle probabilità di miglioramento della stessa nel diabete tipo 2, con un NNT di 21 pazienti trattati per un evento conseguito. I risultati di DIRECT Protect-2 rappresentano la prima descrizione in letteratura di regressione della retinopatia diabetica indotta da un farmaco. L'effetto favorevole del blocco del RAS è stato confermato dallo studio RASS (Renin Angiotensin System Study)⁽⁵⁵⁾ condotto su 285 pazienti normotesi trattati con enalapril 20 mg/die, losartan 100 mg/die o placebo. Enalapril e losartan hanno ridotto le probabilità di progressione della retinopatia rispettivamente del 65 e 70% in pazienti con diabete di tipo 1.

Sebbene i risultati degli studi precedenti siano fortemente indicativi di un effetto positivo del blocco di RAS nelle prime fasi della retinopatia diabetica, nessuno di essi fu sufficiente per la registrazione di questa indicazione specifica. Quindi, il loro uso non può essere formalmente raccomandato nei pazienti con RD che non abbiano anche ipertensione e / o microalbuminuria.

Per quanto riguarda altri possibili meccanismi, lo studio FIELD ha dimostrato in pazienti trattati con fenofibrato 200 mg/die una riduzione di circa il 30% della necessità di trattamento laser, sia per edema maculare che per retinopatia proliferante. Il farmaco preveniva la progressione della retinopatia già esistente, indipendentemente dagli effetti metabolici del farmaco, ma non dimostrava efficacia in termini di prevenzione primaria⁽⁵⁶⁾. Peraltro, l'eventuale effetto sulla retinopatia rappresentava un obiettivo terziario, misurato in 1012 sui 9795 pazienti dello studio. Un altro studio clinico, ACCORD⁽³⁴⁾, ha confermato la riduzione della progressione della RD nei pazienti con diabete di tipo 2 trattati con fenofibrato e statine, rispetto ai pazienti trattati con statine da sole. I possibili meccanismi di questa azione inattesa del fenofibrato restano da chiarire.

Da lungo tempo si sospetta che un'aumentata tendenza all'aggregazione piastrinica nel diabete giochi un ruolo nel determinare le occlusioni capillari che caratterizzano le fasi intermedie della retinopatia non proliferante.

Sottoposti a trial clinici ancora negli anni '70 e '80, gli antiaggreganti piastrinici (aspirina, dipiridamolo, ticlopidina) hanno dimostrato una modesta efficacia nel rallentare la formazione di nuovi microaneurismi nella retinopatia non proliferante iniziale^(57,58) ma di non influenzarne l'evoluzione quando questa abbia raggiunto le forme pre-proliferanti e proliferanti⁽⁵⁹⁾. L'aspirina non aumenta tuttavia il rischio di emorragie dai neovasi, per cui la retinopatia proliferante non rappresenta una controindicazione al suo uso per altre indicazioni⁽⁵⁹⁾.

L'unico esempio di un trattamento efficace e con meccanismo patogenetico nella RD è l'uso di agenti anti-VEGF nel DME. L'espressione intraoculare del VEGF è aumentata nel DME⁽⁶⁰⁾ ed esso potrebbe essere il mediatore principale di un aumento della permeabilità retinica⁽⁶¹⁾. Gli agenti anti-VEGF devono essere iniettati direttamente nel corpo vitreo ad intervalli regolari. Il bevacizumab, il ranibizumab e il pegaptanib e il VEGF Trap-Eye sono i più studiati. Se il trattamento laser consente al massimo di preservare l'acuità visiva, alcuni studi sostengono che con iniezioni ripetute di 1,25 mg di bevacizumab⁽⁶²⁾, 0,5 mg di ranibizumab⁽⁶³⁾ e 0,3 mg di pegaptanib⁽⁶⁴⁾ la visione possa migliorare. Un miglioramento medio dell'acuità visiva di 4.7 lettere è stato ottenuto con una media di cinque iniezioni di 0,3 mg di pegaptanib in 36 settimane e di 5,6 lettere con una media di nove iniezioni di 1,25 mg bevacizumab in 1 anno. Inoltre VEGF Trap-Eye ha mostrato una promettente riduzione dei tempi per avere dei risultati in uno studio di fase II⁽⁶⁵⁾.

Infine, triamcinolone intravitreale è stato ampiamente usato per il trattamento di DME e PDR, considerando la presenza di componenti infiammatorie nella patogenesi di queste fasi della RD⁽⁶⁶⁾. Tuttavia, i benefici sono di breve durata, accompagnati da alti tassi di cataratta, glaucoma ed infezioni, e l'acuità visiva a tre anni risulta peggiore di quella ottenuta con il solo trattamento laser⁽⁶⁷⁾. I benefici sull'acuità visiva ottenuti con gli steroidi sono paragonabili a quelle degli anti-VEGF solamente nei pazienti afachici⁽⁶⁸⁾. Sono peraltro in corso studi clinici sugli effetti di impianti endoculari di cortisonici a lento rilascio che, pur conservando gli effetti collaterali del triamcinolone, eviterebbero la necessità di iniezioni ripetute con i rischi connessi.

Conclusioni

Nel complesso, i risultati dei trial clinici suggeriscono che interventi con farmaci sistemici mirati ai possibili meccanismi patogenetici potrebbero essere efficaci nella retinopatia iniziale o lieve, piuttosto che negli stadi moderati o avanzati, dove i danni a carico della parete capillare e della

neuroretina potrebbero essere ormai troppo progrediti. Qui si pone il problema dell'esistenza o meno di un "punto di non ritorno" nella storia naturale della retinopatia.

I farmaci antiaggreganti piastrinici apparivano rallentare la retinopatia in uno stadio molto iniziale caratterizzato dalla presenza dei soli microaneurismi^(57,58), ma non successivamente quando prevalevano i fenomeni di occlusione capillare⁽⁵⁹⁾. Anche in DIRECT Protect-2⁽⁵⁴⁾ la somministrazione di candesartan era associata alla regressione della sola retinopatia minima o lieve (cioè alla presenza di microaneurismi con rare microemorragie, essudati duri e/o noduli cotonosi) mentre anche gli stadi classificati come retinopatia non proliferante moderata si sono dimostrati non responsivi, suggerendo che il blocco del RAS possa essere efficace in situazioni più precoci di quelle inizialmente ipotizzate, di nuovo quando il danno della parete capillare è minimo. Ciò significa che l'(iper)attivazione del RAS intraoculare esercita i propri effetti patogeni attraverso meccanismi differenti dall'attivazione del VEGF, oppure che quest'ultimo può avere effetti patogeni indipendenti dalla nota capacità di indurre iperpermeabilità di parete e neoangiogenesi, probabilmente legati alle sue proprietà neuroprotettive.

Tuttavia, i dati emersi dallo studio FIELD⁽⁵⁶⁾ ed ACCORD⁽³⁴⁾ sembrano mostrare che l'evoluzione della retinopatia possa essere arrestata dal fenofibrato anche nei suoi stadi più progrediti, classificati come non proliferanti moderati e severi, lasciando intravedere la possibilità che meccanismi patogenetici diversi, responsivi a differenti agenti farmacologici, intervengano nei vari stadi di tale complicità.

I progressi avvenuti nel trattamento medico della RD restano incompleti, proprio come la nostra comprensione dei meccanismi alla base di questa complicità. L'utilizzo degli inibitori del VEGF consente di ottenere risultati importanti nelle fasi avanzate nell'evoluzione della RD, ma siamo ancora lontani dal giorno in cui la retinopatia sarà trattata puntando direttamente alla causa (come facciamo, ad esempio, con la terapia marziale nell'anemia da carenza specifica) o ad un meccanismo (come con gli inibitori della pompa protonica per l'ulcera peptica). Le cause della difficoltà a identificare un *primum movens* per la retinopatia e, più in generale, per la microangiopatia diabetica comprendono una serie di buone ragioni: la mancanza di finanziamenti e ricercatori dedicati al problema specifico, una patogenesi presumibilmente multifattoriale, e l'indubbia complessità dei fenomeni coinvolti. È auspicabile che, rappresentando il diabete con le sue complicanze un fenomeno in aumento in tutto il mondo, le sue conseguenze sulla salute e sulla dimensione economica possano stimolare le ricerche in questo campo.

BIBLIOGRAFIA

1. Klein R, Klein BEK, Moss SE. *Prevalence of diabetes mellitus in Southern Wisconsin*. American Journal of Epidemiology. 1984; 119: 54-61.
2. Porta M, Bandello F. *Diabetic retinopathy. A clinical update*. Diabetologia. 2002; 45: 1617-1634.
3. Antonetti DA, Barber AJ, Bronson SK, Freeman WM, Gardner TW, Jefferson LS, Kester M, Kimball SR, Krady JK, LaNoue KF, Norbury CC, Quinn PG, Sandrasegarane L, Simpson IA, JDRF Diabetic Retinopathy Center Group. *Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease*. Diabetes. 2006; 55: 2401-2411.
4. Lieth E, Gardner TW, Barber AJ, Antonetti DA, Penn State Retina Research Group. *Retinal neurodegeneration: early pathology in diabetes*. Clin Exp Ophthalmol. 2000; 28: 3-8.
5. Rungger-Brandle E, Dosso AA, Leuenberger PM. *Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000; 4: 1971-1980.
6. Lorenzi M, Gerhardinger C. *Early cellular and molecular changes induced by diabetes in the retina*. Diabetologia. 2002; 44: 791-804.
7. Garcia-Ramírez M, Hernández C, Villarroel M, Canals F, Alonso MA, Fortuny R, Masmiquel L, Navarro A, García-Arumí J, Simó R. *Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) is downregulated at early stages of diabetic retinopathy*. Diabetologia. 2009; 52: 2633-2641.
8. Roy MS, Gunkel RD, Podgor MJ. *Color vision defects in early diabetic retinopathy*. Arch Ophthalmol. 1986; 104: 225-228.
9. Shirao Y, Kawasaki K. *Electrical responses from diabetic retina*. Prog Retin Eye Res. 2008; 17: 59-76.
10. Barber AJ. *A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2003; 27: 283-290.
11. Bearse MA Jr, Adams AJ, Han Y, Schneck ME, Ng J, Bronson-Castain K, Barez S. *A multifocal electroretinogram model predicting the development of diabetic retinopathy*. Prog Retin Eye Res. 2006; 25: 425-448.
12. Bronson-Castain KW, Bearse MA Jr, Neuville J, Jonasdottir S, King-Hooper B, Barez S, Schneck ME, Adams AJ. *Adolescents with type 2 diabetes: early indications of focal retinal neuropathy, retinal thinning, and venular dilation*. Retina. 2009; 29: 618-626.
13. Fletcher EL, Phipps JA, Ward MM, Puthussery T, Wilkinson-Berka JL. *Neuronal and glial cell abnormality as predictors of progression of diabetic retinopathy*. Curr Pharm Des. 2009; 13: 2699-2712.
14. Asnaghi V, Gerhardinger C, Hoehn T, Adeboje A, Lorenzi M. *A role for the polyol pathway in the early neuroretinal apoptosis and glial changes induced by diabetes in the rat*. Diabetes. 2003; 52: 506-511.
15. Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, Nyengaard JR, van den Enden M, Kilo C, Tilton RG. *Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications*. Diabetes. 1993; 42: 801-813.
16. Brownlee M. *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*. Nature. 2001; 414: 813-820.

17. Sorbinil Retinopathy Trial Research Group. *A randomized trial of sorbinil, an aldose reductase inhibitor, in diabetic retinopathy*. Arch Ophthalmol. 1990; 108: 1234-1244.
18. Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. *Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycosylation in diabetes*. J Clin Invest. 1994; 94: 110-117.
19. Charonis AS, Reger LA, Dege JE, Kouzi-Koliakos K, Furcht LT, Wohlhueter RM, Tsilibary EC. *Laminin alterations after in vitro nonenzymatic glycosylation*. Diabetes. 1990; 39: 807-814.
20. Hammes HP, Martin S, Federlin K, Geisen K, Brownlee M. *Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy*. Proc Natl Acad Sci USA. 1991; 88: 11555-11558.
21. Koya D, King GL. *Protein kinase C activation and the development of diabetic complications*. Diabetes. 1998; 47: 859-866.
22. Koya D, Jirousek MR, Lin YW, Ishii H, Kuboki K, King GL. *Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats*. J Clin Invest. 1997; 100: 115-126.
23. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. *Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage*. Nature. 2000; 404: 787-790.
24. Sheetz MJ, Aiello LP, Shahri N, Davis MD, Kles KA, Danis RP, Mbdv Study Group. *Effect of ruboxistaurin (RBX) on visual acuity decline over a 6-year period with cessation and reinstitution of therapy. Results of an open-label extension of the Protein Kinase C Diabetic Retinopathy Study 2 (PKC-DRS2)*. Retina. 2011; 31:1053-9.
25. Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M. *Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation*. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97: 12222-12226.
26. Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengellér Z, Szabó C, Brownlee M. *Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose)polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells*. J Clin Invest. 2003; 108: 1049-1057.
27. Beltramo E, Berrone E, Tarallo S, Porta M. *Effects of thiamine and benfotiamine on intracellular glucose metabolism and relevance in the prevention of diabetic complications*. Acta Diabetologica. 2008; 45: 131-141.
28. The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) Research Group. *The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus*. New Engl J Med. 1993; 329: 977-986.
29. UKPDS Group. *Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33)*. Lancet. 1998; 352: 837-853.
30. The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Research Group. *Modern-day clinical course of type 1. Diabetes mellitus after 30 years' duration. The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications and Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Experience (1983-2005)*. Arch Intern Med. 2009; 169: 1307-1316.

31. Boussageon R, Bejan-Angoulvant T, Saadatian-Elahi M, Lafont S, Bergeonneau C, Kassai B, Erpeldinger S, Wright JM, Gueyffier F, Cornu C. *Effect of intensive glucose lowering treatment on all cause mortality, cardiovascular death, and microvascular events in type 2 diabetes: meta-analysis of randomised controlled trials*. Br Med J. 2011; Jul 26; 343: d4169. doi: 10.1136/bmj.d4169.
32. UK Prospective Diabetes Study Group. *Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38*. BMJ. 1998; 317: 703-713.
33. Patel A, ADVANCE Collaborative Group, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Woodward M, Billot L, Harrap S, Poulter N, Marre M, Cooper M, Glasziou P, Grobbee DE, Hamet P, Heller S, Liu LS, Mancia G, Mogensen CE, Pan CY, Rodgers A, Williams B. *Effects of a fixed combination of perindopril and indapamide on macrovascular and microvascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus (the ADVANCE trial): a randomised controlled trial*. Lancet. 2007; 370: 829-840.
34. ACCORD Study Group, ACCORD Eye Study Group, Chew EY, Ambrosius WT, Davis MD, Danis RP, Gangaputra S, Greven CM, Hubbard L, Esser BA, Lovato JF, Perdue LH, Goff DC Jr, Cushman WC, Ginsberg HN, Elam MB, Genuth S, Gerstein HC, Schubart U, Fine LJ. *Effects of medical therapies on retinopathy progression in type 2 diabetes*. N Engl J Med. 2010; 363: 233-244.
35. Grant RW, Buse JB, Meigs JB, for the University Health System Consortium (UHC) Diabetes Benchmarking Project Team. *Quality of diabetes care in U.S. Academic Medical Centers low rates of medical regimen change*. Diabetes Care. 2005; 28: 337-442.
36. Prévost G, Phan TM, Mounier-Vehier C, Fontaine P. *Control of cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes and hypertension in a French national study (Phenomen)*. Diabetes Metabol. 2005; 31: 479-485.
37. Gill GV, Woodward A, Pradhan S, Wallymahmed M, Groves T, English P, Wilding JP. *Intensified treatment of type 2 diabetes. Positive effects on blood pressure but not glycaemic control*. Q J Med. 2003; 96: 833-836.
38. De Berardis G, Pellegrini F, Franciosi M, Belfiglio M, Di Nardo B, Greenfield S, Kaplan SH, Rossi MC, Sacco M, Tognoni G, Valentini M, Nicolucci A, QuED Study. *Quality of care and outcomes in type 2 diabetic patients. A comparison between general practice and diabetes clinics*. Diabetes Care. 2004; 27: 398-406.
39. Saunders SA, Wallymahmed M, Macfarlane IA. *Glycaemic control in a type 1 diabetes clinic for younger adults*. Q J Med. 2004; 97: 575-580.
40. Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group, Gerstein HC, Miller ME, Byington RP, Goff DC Jr, Bigger JT, Buse JB, Cushman WC, Genuth S, Ismail-Beigi F, Grimm RH Jr, Probstfield JL, Simons-Morton DG, Friedewald WT. *Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes*. N Engl J Med. 2008; 358: 2545-2559.
41. Mathiesen ER, Kinsley B, Amiel SA et al. On behalf of the Insulin Aspart Pregnancy Study Group. *Maternal glycaemic control and hypoglycemia in type 1 diabetic pregnancy. A randomized trial of insulin aspart versus human insulin in 322 pregnant women*. Diabetes Care. 2007; 30: 771-776.
42. Ford ES, Little RR, Li C, Mokdad AH. *Trends in A1c concentrations among U.S. adults with diagnosed diabetes from 1999 to 2004*. Diabetes Care. 2008; 31: 102-104.

43. Hovind P, Tarnow L, Rossing K, Rossing P, Eising S, Larsen N, Binder C, Parving HH. *Decreasing incidence of severe diabetic microangiopathy in type 1 diabetes*. Diabetes Care. 2003; 26: 1258-1264.
44. Klein R, Knudtson MD, Lee KE, Gangnon R, Klein BEK. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy XXII. *The twenty-five-year progression of retinopathy in persons with type 1 diabetes*. Ophthalmology. 2008; 115: 1859-1868.
45. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *Lifetime benefits and costs of intensive therapy as practiced in the Diabetes Control and Complications Trial*. JAMA. 1996; 276: 1409-1415.
46. Zhang LY, Krzentowski G, Albert A, Lefevbre PJ. *Risk of developing retinopathy in Diabetes Control and Complications Trial type 1 diabetic patients with good or poor metabolic control*. Diabetes Care. 2001; 24: 1275-1279.
47. Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Early photocoagulation for diabetic retinopathy*. ETDRS Report No. 9. Ophthalmology. 1991; 98: 766-785.
48. Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Research Group. *Early vitrectomy for severe vitreous haemorrhage in diabetic retinopathy*. Two-year results of a randomized trial. DRVS Report No 2. Arch Ophthalmol. 1985; 103: 1644-1652.
49. Stefansson E, Bek T, Porta M, Larsen N, Kristinsson JK, Agardh E. *Screening and prevention of diabetic blindness*. Acta Ophthalmol Scand. 2000; 78: 374-385.
50. Scanlon PH. *The English national screening programme for sightthreatening diabetic retinopathy*. J Med Screen. 2008; 15: 1-4.
51. Chaturvedi N, Sjolie AK, Stephenson JM, Abrahamian H, Keipes M, Castellarin A, Rogulja-Pepeonik Z, Fuller JH. *Effect of lisinopril on progression of retinopathy in normotensive people with type 1 diabetes*. The EUCLID Study Group. EURODIAB Controlled Trial of Lisinopril in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. Lancet. 1998; 35: 28-31.
52. Beulens JW, Patel A, Vingerling JR, Cruickshank JK, Hughes AD, Stanton A, Lu J, McG Thom SA, Grobbee DE, Stolk RP; AdRem project team; ADVANCE management committee. *Effects of blood pressure lowering and intensive glucose control on the incidence and progression of retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial*. Diabetologia. 2009; 52: 2027-2036.
53. Chaturvedi N, Porta M, Klein R, Orchard T, Fuller J, Parving HH, Bilous R, Sjølie AK, DIRECT Programme Study Group. *Effect of candesartan on prevention (DIRECT-Prevent 1) and progression (DIRECT-Protect 1) of retinopathy in type 1 diabetes: randomised, placebocontrolled trials*. Lancet. 2008; 372: 1394-1402.
54. Sjølie AK, Klein R, Porta M, Orchard T, Fuller J, Parving HH, Bilous R, Chaturvedi N; DIRECT Programme Study Group. *Effect of candesartan on progression and regression of retinopathy in type 2 diabetes (DIRECT-Protect 2): a randomised placebo-controlled trial*. Lancet. 2008; 372: 1385-1393.
55. Mauer M, Zinman B, Gardiner R, Suissa S, Sinaiko A, Strand T, Drummond K, Donnelly S, Goodyer P, Gubler MC, Klein R. *Renal and retinal effects of enalapril and losartan in type 1 diabetes*. N Engl J Med. 2009; 361: 40-51.

56. Keech AC, Mitchell P, Summanen PA, O'Day J, Davis TM, Moffitt MS, Taskinen MR, Simes RJ, Tse D, Williamson E, Merrifield A, Laatikainen LT, d'Emden MC, Crimet DC, O'Connell RL, Colman PG, FIELD study investigators. *Effect of fenofibrate on the need for laser treatment for diabetic retinopathy (FIELD study): a randomized controlled trial*. *Lancet*. 2007; 370: 1687-1697.
57. The DAMAD Study Group. *Effect of aspirin alone and aspirin plus dipyridamole in early diabetic retinopathy. A multicentre randomized controlled clinical trial*. *Diabetes*. 1989; 38: 491-498.
58. The TIMAD Study Group. *Ticlopidine treatment reduces the progression of non-proliferative diabetic retinopathy*. *Arch Ophthalmol*. 1990; 108: 1577-1583.
59. Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study Group. *Effects of aspirin treatment of diabetic retinopathy. ETDRS Report No. 8*. *Ophthalmology*. 1991; 98: 757-765.
60. Funatsu H, Yamashita H, Ikeda T, Mimura T, Eguchi S, Hori S. *Vitreous levels of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema*. *Ophthalmology*. 2003; 110: 1690-1696.
61. Bhagat N, Grigorian RA, Tutela A, Zarbin MA. *Diabetic macular edema: pathogenesis and treatment*. *Surv Ophthalmol*. 2009; 54: 1-32.
62. Michaelides M, Kaines A, Hamilton RD, Fraser-Bell S, Rajendram R, Quhill F, Boos CJ, Xing W, Egan C, Peto T, Bunce C, Leslie RD, Hykin PG. *A prospective randomized trial of intravitreal bevacizumab or laser therapy in the management of diabetic macular edema (BOLT study) 12-month data: report 2*. *Ophthalmology*. 2010; 117: 1078-1086.
63. Massin P, Bandello F, Garweg JG, Hansen LL, Harding SP, Larsen M, Mitchell P, Sharp D, Wolf-Schnurrbusch UE, Gekkieva M, Weichselberger A, Wolf S. *Safety and efficacy of ranibizumab in diabetic macular edema (RESOLVE Study): a 12-month, randomized, controlled, double-masked, multicenter phase II study*. *Diabetes Care*. 2010; 33: 2399-2405.
64. Cunningham ET Jr, Adamis AP, Altaweel M, Aiello LP, Bressler NM, D'Amico DJ, Goldbaum M, Guyer DR, Katz B, Patel M, Schwartz SD; Macugen Diabetic Retinopathy Study Group. *A phase II randomized double-masked trial of pegaptanib, an anti-vascular endothelial growth factor aptamer, for diabetic macular edema*. *Ophthalmology*. 2005; 112: 1747-1757.
65. Do DV, Nguyen QD, Boyer D et al. DA VINCI Study Group. *One-Year Outcomes of the DA VINCI Study of VEGF Trap-Eye in Eyes with Diabetic Macular Edema*. *Ophthalmology* 2012; 119: 1658-1665.
66. Ahmadi H, Ramezani A, Shoeibi N, Bijanzadeh B, Tabatabaei A, Azarmina M, Soheilian M, Keshavarzi G, Mohebbi MR. *Intravitreal bevacizumab with or without triamcinolone for refractory diabetic macular edema; a placebo-controlled, randomized clinical trial*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008; 246: 483-489.
67. Diabetic Retinopathy Clinical Research Network (DRCR.net), Beck RW, Edwards AR, Aiello LP, Bressler NM, Ferris F, Glassman AR, Hartnett E, Ip MS, Kim JE, Kollman C. *Three-year follow-up of a randomized trial comparing focal/grid photocoagulation and intravitreal triamcinolone for diabetic macular edema*. *Arch Ophthalmol*. 2009; 127: 245-251.
68. Elman MJ, Bressler NM, Qin H, Beck RW, Ferris FL 3rd, Friedman SM, Glassman AR, Scott IU, Stockdale CR, Sun JK, Diabetic Retinopathy Clinical Research Network. *Expanded 2-year follow-up of ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema*. *Ophthalmology*. 2011; 118: 609-614.

**LE EMOPATIE MALIGNI DELL'ANZIANO:
PROGRESSI NELLA TERAPIA E NELLE CONOSCENZE
BIOLOGICHE**

*Alessandro Cignetti^{1,2}, Angela Gueli^{1,2}, Riccardo Bruna^{1,2},
Marco Ruella^{1,2}, Corrado Tarella^{1,2}*

¹ SCU Ematologia e Terapie Cellulari - A.O. Ordine Mauriziano - Umberto I

² Molecular Biotechnology Center - Università di Torino

Parole chiave: *Linfoma mantellare*
Leucemia acuta mieloide
Anziano
Terapia cellulare
Trapianto allogenico

Keywords: *Mantle cell lymphoma*
Acute myeloid leukemia
Elderly
Cell therapy
Allogeneic transplantation

Abstract

I linfomi non Hodgkin e le leucemie acute sono patologie molto frequenti negli ultrasessantenni, con una incidenza di circa 19.7/100,000 per anno e 15.9/100,000 per anno rispettivamente. Nel nostro centro tra il 2008 e il 2011 abbiamo diagnosticato 331 pazienti con linfoma Non-Hodgkin e 150 con leucemia acuta mieloide, più del 60% dei pazienti aveva più di 60 anni. Recentemente sono stati proposti diversi nuovi approcci per il trattamento dei pazienti anziani affetti da linfoma. È stata da poco pubblicata una interim analisi di uno studio multicentrico di fase Ib-II per il trattamento dei pazienti anziani affetti da linfoma mantellare. In questo studio si è valutata la tollerabilità e l'efficacia di un nuovo tipo di trattamento con Ofatumumab, Bendamustina e desametasone rispetto al trattamento standard. Lo studio mostra una remissione completa nel 88% dei pazienti con la negativizzazione della malattia minima residua (MRD) su midollo nel 94% dei casi. Anche nel

trattamento dei pazienti anziani con leucemia acuta mieloide è stato proposto un trattamento di terapia cellulare basato sulla raccolta di cellule staminali emopoietiche da sangue periferico di donatori consanguinei aploidentici e sulla loro reinfusione ai pazienti al termine della chemioterapia di induzione e di consolidamento. Anche nel nostro centro abbiamo utilizzato questo tipo di trattamento in 3 pazienti ottenendo promettenti risultati senza tossicità particolari.

La nostra esperienza evidenzia inoltre che nel trattamento del paziente anziano sono importanti le comorbidità, un ambiente familiare che sia vicino al malato e la somministrazione di trattamenti adeguati, perché spesso trattamenti troppo sottodosati possono essere più dannosi che di beneficio.

Abstract

Non Hodgkin's lymphoma and acute myeloid leukemia are frequent disease in older patients (> 60y), with an incidence of 19.7/100,000 per year and 15.9/100,000 per year respectively. In our experience between 2008 and 2011 we diagnosed 331 patients with Non-Hodgkin lymphoma and 150 acute myeloid leukemia (AML), more than 60% of patients was over 60 years old. Recently several new approaches for treating elderly patients have been proposed for these hematological neoplasm. A first interim analysis of a multicenter phase Ib-II study for the treatment of elderly patient affected by Mantle cell lymphoma, has recently been presented. This study evaluates the efficacy and the safety of a new regimen based on Ofatumumab, bendamustine and dexametasone vs conventional therapy. Preliminary data show a superiority of the experimental arm with a complete remission of 88% and a MRD negativization in 94% of cases. An innovative strategy for the treatment elderly patients affected of acute myeloid leukemia has been recently published, which consists on the infusion after chemotherapy of peripheral blood stem cells (PBSC) derived from haploidentical familial donors. This approach significantly improved the outcome in elderly AML patients, without major toxicities. We treated 3 patients in our Center with the same approach, two of them with very unfavorable prognosis, confirming the safety and the efficacy of this treatment also in high risk patients.

Finally, our clinical experience suggests that important factors for a successful treatment of elderly patients are: i) lack of comorbidities; ii) a supportive familiar environment; iii) the intensity of treatment, because a dose reduction often results in side effects without clinical responses.

Introduzione

Lo straordinario aumento della aspettativa di vita ha fatto aumentare in modo esponenziale l'incidenza di numerose neoplasie ematologiche proprie dell'anziano. Molte sono le malattie ematologiche che mostrano un'incidenza particolarmente elevata dopo i 60 anni. Tra queste ci sono i linfomi Non Hodgkin, un gruppo eterogeneo di neoplasie. L'incidenza dei linfomi Non Hodgkin è pari a 19.7 casi per 100,000 per anno⁽¹⁾ ed è progressivamente incrementata nel corso degli ultimi decenni. Globalmente la diagnosi di linfoma Non Hodgkin prevale tra i soggetti di sesso maschile e in età avanzata: l'incidenza raggiunge il picco tra i 65 e i 74 anni. Anche nelle mielodisplasie e nelle leucemie acute mieloidi l'età mediana alla diagnosi è avanzata, 67 anni. Sebbene la sopravvivenza globale in queste patologie sia variabile nell'ambito dei vari sottotipi, la prognosi può essere particolarmente sfavorevole, come purtroppo accade nella maggior parte dei pazienti con leucemia acuta mieloide e mielodisplasie. Pertanto una questione da affrontare nel trattamento dei pazienti oncoematologici è la gestione dei pazienti anziani.

Le strategie terapeutiche adottate per la cura delle neoplasie ematologiche prevedono l'impiego della chemioterapia, di anticorpi monoclonali e in alcuni casi si ricorre al trapianto di cellule staminali emopoietiche. Spesso questi trattamenti possono essere tossici e potenzialmente pericolosi per i pazienti anziani. In questa categoria di pazienti la situazione è particolarmente delicata perché da un lato occorre avviare il trattamento per arrestare il decorso della malattia che può essere rapidamente mortale; d'altro canto la terapia deve essere adeguata altrimenti rischia di essere inefficace. In molti casi, per non precludere il trattamento di una neoplasia ematologica basandosi unicamente sull'età del paziente, sono stati sviluppati schemi di terapia a dosi adattate al fine di ridurre la tossicità ed ottenere l'efficacia terapeutica che, in alcune neoplasie ematologiche, può condurre alla guarigione.

La casistica del nostro centro

Da un'analisi della casistica che afferisce alla S.C.D.U. Ematologia e Terapie Cellulari dell'Ospedale Mauriziano Umberto I abbiamo potuto constatare che il campione riflette in modo particolarmente evidente l'incremento di incidenza della maggior parte delle neoplasie ematologiche nei pazienti anziani. L'età mediana dei 331 pazienti con diagnosi di Linfoma Non Hodgkin afferiti nel nostro Centro dal 2008 al 2011 è 64 anni con range 18-97 anni. Se si osserva la distribuzione dell'incidenza della malattia nelle diverse fasce di età si conferma il dato già noto della prevalenza di diagnosi

tra gli ultrasessantenni, 68% dei pazienti; tra questi il 28% dei pazienti ha età compresa tra 60 e 70 anni, 24% tra 70 e 80 anni, il 16% oltre 80 anni.

Una delle neoplasie ematologiche che è tipicamente più frequente nell'anziano è la Leucemia Linfatica Cronica. Sono 243 i casi diagnosticati presso la nostra Ematologia dal 2008 al 2011. L'età mediana è 73 anni, con range 40-95. Tra questi l'11% ha età inferiore a 60 anni, il 29% tra 60 e 70 anni, 38% tra 70 e 80 anni e 22% è ultraottantenne. Anche nel gruppo dei disordini mielodisplastici e delle Leucemie Acute Mieloidi, corrispondenti a 150 nuovi casi tra il 2009 e il 2011, si è osservata nella nostra casistica la nota prevalenza della diagnosi in età avanzata. In particolare l'età mediana alla diagnosi è 77 anni e il picco di incidenza è stato osservato nella fascia di età compresa tra i 70 e gli 80 anni.

Progressi nella terapia: l'esempio del linfoma mantellare

Un esempio emblematico della possibilità di ottenere ottimi risultati anche nel trattamento delle neoplasie ematologiche dell'anziano è rappresentato da uno schema di terapia che è stato recentemente sviluppato per i pazienti affetti da Linfoma Mantellare. Nell'ambito dei vari sottotipi istologici il linfoma Mantellare costituisce il 6% dei Linfomi Non Hodgkin e prevale nei pazienti di età compresa tra i 50 e i 70 anni⁽²⁾. All'esordio si presenta in genere in stadio avanzato con frequente interessamento midollare e splenico. Il decorso è moderatamente aggressivo ed è caratterizzato da scarsa risposta alla chemioterapia⁽³⁾. Il tasso di risposte complete alla chemio-immunoterapia standard con lo schema Rituximab-CHOP (Ciclofosfamide, adriblastina, vincristina, prednisone) o Rituximab-Bendamustina varia nei diversi studi dal

Farmaco	Dose/via di somministrazione	Giorno
Desametasone (mg)	40; ev	1,2,3,4
Ofatumumab (mg)	300 (1° dose); 1000 (succ.); ev	1
Bendamustina (mg/m²)	120; ev	2,3
G-CSF (µg/kg)	5; sc 10; sc	5-9 10-fino a raccolta

Tabella I. Schema del protocollo di trattamento DOT. Il G-CSF è somministrato al quarto ciclo per la raccolta di cellule staminali e dopo il sesto ciclo nei pazienti che hanno fallito la mobilizzazione dopo il quarto ciclo. Negli altri casi è somministrato in caso di neutropenia.

34 al 50%. In uno studio italiano multicentrico di fase Ib-II si sta valutando, in pazienti con linfoma Mantellare di età superiore a 60 anni, l'efficacia di un nuovo schema di chemio-immunoterapia che prevede l'impiego di Ofatumumab, un anticorpo monoclonale anti-CD20 di nuova generazione, in associazione a Bendamustina e desametasone (Tabella I). Dall'analisi ad interim eseguita sui primi 26 pazienti arruolati è emerso che l'età mediana della popolazione in studio era di 69 anni (range 60-82) e c'era una prevalenza di pazienti che presentavano uno stadio avanzato. I risultati relativi al tasso di risposta completa al termine del trattamento hanno rilevato una netta superiorità della nuova associazione chemio-immunoterapica con 88% di risposte complete a fronte di una bassa tossicità. La proporzione di pazienti con negativizzazione della malattia molecolare a livello midollare a 6 mesi dal termine del trattamento è stata pari al 94%⁽⁴⁾. Queste risposte finora osservate nello studio e ottenute in una popolazione fragile sono state promettenti e vanno a consolidare l'idea che in assenza di comorbidità anche i pazienti anziani possono essere trattati con l'obiettivo di ottenere la remissione.

La leucemia mieloide acuta dell'anziano: palliazione o terapia?

La problematica della gestione delle neoplasie ematologiche dell'anziano è ancora più sentita nel trattamento della leucemia mieloide acuta. La prognosi per i pazienti che non possono effettuare un trattamento intensivo è nella gran parte dei casi infausta. La questione è molto dibattuta nella comunità scientifica e si è cercato anche di identificare degli score di comorbidità per selezionare i pazienti che possano beneficiare di un trattamento intensivo nonostante l'età avanzata.

A questo proposito in un interessante studio svedese è stata indagata la correlazione tra tipo di approccio terapeutico e l'outcome dei pazienti con diagnosi di Leucemia Acuta Mieloide⁽⁵⁾. I dati relativi a 2767 pazienti sono stati rilevati dal registro svedese delle Leucemie Acute Mieloidi. L'età mediana dei pazienti con questa diagnosi è 72 anni, con un picco di incidenza tra 80 e 84 anni. Almeno il 70% dei pazienti ultraottantenni ha un buon performance status. Nelle diverse aree geografiche svedesi si è osservata una variabilità nell'atteggiamento terapeutico con prevalenza di centri che hanno adottato un approccio intensivo nelle regioni del nord e una maggiore tendenza alla terapia di palliazione nei centri delle regioni meridionali. Con grande rilevanza, lo studio ha dimostrato che la terapia intensiva standard riduce piuttosto che aumentare la percentuale di mortalità precoce ed è un prerequisito per la sopravvivenza a lungo termine nella maggior parte dei

pazienti di età superiore a 80 anni. I risultati di questo studio suggeriscono che la remissione, seppur di breve durata, è un obiettivo ragionevole anche nei pazienti anziani.

La leucemia mieloide acuta dell'anziano: il trapianto "al contrario"

Nella leucemia mieloide acuta il trapianto allogenico di midollo da donatore HLA-compatibile è al momento l'unico trattamento proponibile con possibilità di efficacia duratura, ma tale procedura viene riservata a pazienti che presentino segni di marcata riduzione dell'estensione della malattia e generalmente con un'età inferiore ai 65 anni. Va aggiunto che comunque per molti pazienti spesso non è disponibile un donatore familiare compatibile. Quindi l'opzione del trapianto allogenico convenzionale è al momento impraticabile nei pazienti anziani.

Recentemente è stato pubblicato sulla rivista internazionale "Blood" da un gruppo cinese uno studio clinico randomizzato, nel quale 30 pazienti con età > 60 anni, affetti da leucemia mieloide acuta, sono stati trattati all'esordio di malattia con chemioterapia convenzionale, seguita, a distanza di 48 ore, dalla infusione di cellule staminali ematopoietiche del sangue periferico ottenute da un donatore consanguineo aploidentico, ovvero non-HLA identico. Nella maggior parte dei casi, il donatore aploidentico era un figlio del paziente. Questo trattamento è stato ripetuto per altre 2 due volte, anche dopo la chemioterapia di consolidamento con alte dosi di citarabina (Figura 1). Il

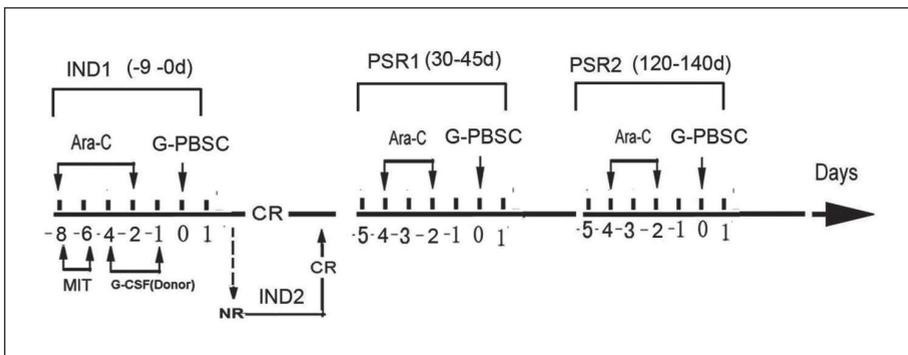


Figura 1. Schema del protocollo di trattamento con cellule staminali periferiche aploidentiche in associazione alla chemioterapia convenzionale in pazienti anziani con leucemia acuta. G-PBSC indica PBSC (Peripheral Blood Stem cells) mobilizzate con il G-CSF; Ara-c indica citarabina; MIT, mitoxantrone; IND1, prima induzione; IND2, seconda induzione; PSR1, primo trattamento post-remissione; PSR2, secondo trattamento post-remissione.

risultato del trattamento non è stato l'attecchimento delle cellule del donatore bensì il loro rigetto: per questo l'abbiamo definito il trapianto "al contrario". Nei pazienti trattati, in effetti, le cellule trapiantate non hanno attecchito, ma hanno comunque esercitato un potente effetto anti-leucemico: rispetto ai pazienti trattati con sola chemioterapia convenzionale, che in accordo con la casistica internazionale hanno un'aspettativa di vita inferiore a 2 anni nel 90% dei casi, il 40% dei pazienti trattati con le cellule aploidentiche è risultato vivo e libero da malattia a distanza di 5 anni. Inoltre il trattamento non ha mostrato alcun tipo di tossicità: non vi sono state particolari reazioni avverse né si è mai manifestato alcun segno o sintomo della temibile "Graft versus Host Disease" (GVHD) che frequentemente si osserva nei trapianti allogenici di midollo. Al contrario, l'infusione delle cellule aploidentiche ha consentito di ridurre la tossicità della chemioterapia, riducendo i tempi di recupero ematopoietico e conseguentemente l'incidenza delle infezioni post-chemioterapia. Quindi le cellule infuse sono risultate di "supporto" alla ripresa ematopoietica dopo chemioterapia di induzione, ma questo non è sufficiente a spiegarne l'efficacia terapeutica, che potrebbe essere ascrivibile sia all'attività antitumorale di alcune sottopopolazioni linfocitarie presenti nella reinfusione (in particolare le cellule NK), sia al forte stimolo che le cellule allogeniche del donatore esercitano sul sistema immunitario del paziente, in particolare sui linfociti T.

Questo tipo di approccio perciò offre il vantaggio di poter effettuare programmi terapeutici innovativi senza dover rinunciare ai trattamenti convenzionali: la classica chemioterapia di induzione delle leucemie mieloidi acute, infatti, fa comunque parte del trattamento proposto. Nel nostro centro abbiamo trattato tre pazienti anziani (> 60 anni) affetti da leucemia mieloide acuta su base compassionevole, dopo avere ottenuto parere favorevole dal nostro Comitato etico⁽⁶⁾. Rispetto all'esperienza del gruppo cinese, i nostri 3 pazienti erano tutti affetti da leucemia acuta ad alto rischio. Una paziente (paziente #1) aveva una leucemia secondaria insorta durante la chemioterapia effettuata per carcinoma ovarico e un sottotipo di leucemia tra le più aggressive, vale a dire una leucemia bifenotipica con un cariotipo complesso; gli altri 2 pazienti avevano una leucemia secondaria a mielodisplasia. Abbiamo utilizzato il medesimo protocollo pubblicato su Blood, raccogliendo mediante aferesi la cellule staminali del sangue periferico del donatore aploidentico dopo stimolazione con fattore di crescita granulocitario (G-CSF) per 4 giorni. Una quota della cellule raccolte è stata reinfusa ai pazienti 2 giorni dopo il termine della chemioterapia di induzione, mentre le restanti cellule sono state criopreservate per successive eventuali reinfusioni da effettuarsi nel caso il trattamento mostrasse di avere qualche beneficio, con segni di

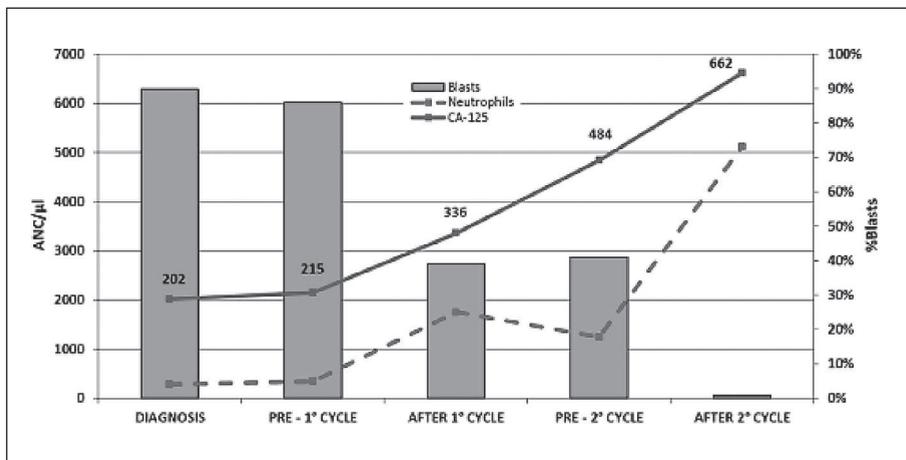


Figura 2. Riassunto della paziente #1 durante i primi 2 cicli. ANC, conta assoluta dei neutrofili.

regressione della malattia. Abbiamo verificato preliminarmente *in vitro* nei nostri laboratori che i linfociti del paziente fossero reattivi contro i linfociti del donatore familiare mediante un test di coltura mista linfocitaria. Alla reattività dimostrata *in vitro* ha fatto sempre riscontro *in vivo* il rigetto delle cellule del donatore e l'assenza della temibile GVHD. Infatti la terapia è stata ben tollerata in tutti ai casi e non si è mai osservata nessun complicanza a breve e a lungo termine riconducibile alla infusione delle cellule. La paziente #1 ha avuto una risposta parziale, dopo la quale abbiamo effettuato una chemioterapia di salvataggio e reinfuso nuovamente le cellule aploidentiche del figlio, ottenendo una remissione completa, seppur di breve durata (Figura 2). La paziente infatti dopo 2 mesi è recidivata ed è deceduta poche settimane dopo. Anche gli altri 2 pazienti sono stati sottoposti a chemioterapia standard e reinfusione di cellule aploidentiche da donatore consanguineo (sempre dai figli). Un paziente non ha avuto risposta, ha rifiutato ulteriori trattamenti ed è deceduto pochi mesi dopo. L'ultima paziente trattata ha avuto una risposta completa e non ha potuto effettuare ulteriore chemioterapia a causa di una endoftalmite fungina (*Fusarium*) secondaria a diabete e sinusite cronica, sviluppata al termine del trattamento. Nonostante sia stata sottoposta ad un solo ciclo di terapia, questa paziente è attualmente in remissione completa di malattia dopo un anno di follow up.

In conclusione, la risposta completa ottenuta in 2 pazienti su 3 è molto promettente in qualche modo inaspettata soprattutto considerando la tipologia di pazienti trattati, tutti con prognosi molto sfavorevole. Sulla base di questa

esperienza preliminare, stiamo preparando un protocollo clinico sperimentale da sottoporre al comitato etico, per valutare l'efficacia della procedura nei pazienti anziani, specialmente in quelli con meno opzioni terapeutiche di successo, vale a dire quelli con leucemia acuta secondaria a mielodisplasia o a precedente chemioterapia⁽⁶⁾.

Conclusioni

Dall'analisi della nostra casistica abbiamo potuto vedere che anche nel paziente anziano si ottengono sempre più frequentemente risultati clinicamente inaspettati. A questo proposito, vi sono tre aspetti importanti da sottolineare:

- 1) il paziente non deve avere eccessive comorbidità;
- 2) è fondamentale un ambiente familiare che sia vicino al malato, ed occorre sottolineare che nella nostra realtà è ciò che si osserva nella maggior parte dei casi;
- 3) il medico deve voler cercare di somministrare il massimo del trattamento, perché trattamenti troppo sottodosati possono essere più dannosi che di beneficio.

Quando si sono verificate queste condizioni, abbiamo sicuramente ottenuto risultati promettenti e questo atteggiamento sembra adesso ancora più praticabile e con maggiori possibilità di successo grazie ad alcune opportunità emergenti, sia come nuovi agenti farmacologici sia come strategie terapeutiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Neyman N, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010*. National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/.
2. Foon KA, Fisher RI. *The non-Hodgkin lymphomas*. In “Williams Hematology 7th ed.”, 2006: pp. 1407-1459, McGraw-Hill Ed, New York.
3. Ghielmini M, Zucca E. *How I treat mantle cell lymphoma*. *Blood*. 2009, 114: 1469-1476.
4. Magni M, Di Nicola M, Carlo-Stella C, Devizzi L, Guidetti A, Matteucci P, Viviani S, Zambelli S, Ferreri AJM, Rambaldi A, Di Raimondo F, Tarella C, Gallamini A, Nobile F, Vallisa D, Carella AM, Patti C, Quarta G, Rizzoli V, Benedetti F, Corradini P, Gianni AM. *Safety, Tolerability and Activity of Ofatumumab, Bendamustine and Dexamethasone Combination As First-Line Treatment of Mantle-Cell Lymphoma in the Elderly: A Multicenter Study*. *Blood*. 2011; 118: 1647.
5. Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, Lehmann S, Möllgård L, Stockelberg D, Tidefelt U, Wahlin A, Höglund M. *Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry*. *Blood*. 2009, 113: 4179-4187.
6. Cignetti A, Ruella M, Elia A, Tassi V, Redoglia V, Gottardi D, Tarella C. *Haploidentical cellular therapy in elderly patients with acute myeloid leukemia: Description of its use in high risk patients*. *Am J Hematol*. 2013, 88: 720-721.

**E-LEARNING E ALTA FORMAZIONE
IN MEDICINA DEI DISASTRI:
L'ESPERIENZA DELLO EUROPEAN MASTER
IN DISASTER MEDICINE**

*Pier Luigi Ingrassia, Luca Ragazzoni, Marco Tengattini,
Alba Ripoll, Francesco Della Corte*

CRIMEDIM - Centro di Ricerca Interdipartimentale in Medicina d'Emergenza
e dei Disastri e di Informatica applicata alla pratica ed alla didattica Medica
Dipartimento di Medicina Traslazionale
Università degli studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro" - Novara

Parole chiave: *Medicina delle catastrofi
Simulazione
Apprendimento collaborativo
Master di II livello*

Key words: *Disaster medicine
Simulation
Collaborative learning
II level master*

Riassunto

Lo European Master in Disaster Medicine è un corso di alta formazione in Medicina delle Catastrofi erogato in e-learning e frequentato da discenti provenienti da tutto il mondo. Il programma comprende 1) una fase a distanza articolata in più sezioni, ciascuna guidata da un membro del corpo docente, basata sull'apprendimento per risoluzione di problemi e completata da attività collaborative in gruppo; 2) un corso residenziale di due settimane, dove gli studenti interagiscono con i docenti in dibattiti, verificano la capacità di applicare quanto appreso a distanza, svolgono esercizi di simulazione virtuale e dal vivo; 3) la compilazione di una tesi e 4) un esame finale on-line. Gli sviluppi tecnologici più interessanti che caratterizzano questo corso internazionale vanno nella direzione del *game-based learning*, ovvero lo sviluppo di ambienti virtuali che permettono di costruire scenari di grandi

incidenti, di definire piani di emergenza per gli ospedali dell'area, e di simulare uno scenario di incidente ipotizzato, allo scopo di valutare la risposta all'emergenza e la validità dei piani elaborati dai discenti.

Abstract

The European Master in Disaster Medicine is an advanced training course in Disaster Medicine delivered in e-learning format and attended by students from all over the world. The program includes 1) a distance learning path, divided into several sections, each led by a member of the faculty, based on problem-based learning and collaborative activities to be completed in groups; 2) a two-week residential course, where students interact with teachers in debates, verify the ability to apply what they have learned at a distance, have the opportunity to be involved in virtual and live simulations; 3) the writing of a research thesis, and 4) a final online exam. The most interesting technological developments that characterize this international course go in the direction of *game-based learning*, namely the development of virtual environments that allow to build scenarios of major incidents, to define plans for hospitals in local area, and to simulate assumed mass casualty events to evaluate the efficacy of medical disaster response and the validity of the plans drawn up by the learners.

1. Introduzione

I disastri sono definiti come emergenze sanitarie in cui i bisogni eccedono le risorse disponibili⁽¹⁾. Le emergenze ed i disastri colpiscono tutte le parti del mondo e causano danno alle persone, alle infrastrutture, all'economie ed all'ambiente⁽²⁾. Purtroppo si stima che nel corso del XXI secolo il numero dei disastri tenderà ad aumentare a causa dell'aumento della popolazione, della degradazione ambientale, del cambiamento climatico e dello squilibrio economico fra le diverse aree del globo⁽³⁾. Un'analisi attenta degli eventi mostra che la risposta al disastro e la magnitudine delle conseguenze è strettamente dipendente della capacità di risposta dei sistemi locali, delle risorse disponibili e del livello di preparazione.

La formazione gioca pertanto un ruolo chiave nel fornire quelle conoscenze e quelle capacità pratiche che sono spesso estranee alla abituale pratica professionale⁽⁴⁾. Eventi, quali disastri o maxiemergenze, richiedono che il personale sanitario abbia un'elevata esperienza clinica, ma anche delle abilità non propriamente sanitarie, come nozioni di logistica e tattica. A tutt'oggi però non esistono metodologie standard ed uniformi per la formazione professionale degli operatori sanitari nonostante la World Association of Disaster and Emergency Medicine abbia enfatizzato la necessità di un approccio sistematico e maggiormente scientifico⁽⁵⁾.

Lo European Master in Disaster Medicine (EMDM) è un tentativo di rispondere a questa esigenza: attivo da 12 anni ha già contribuito a formare alcune centinaia di professionisti provenienti dai cinque continenti⁽⁶⁾. Il corso si avvale di una metodologia centrata sulla risoluzione di problemi, e fa uso di tecnologie dell'informazione e dalla comunicazione sia per lo svolgimento a distanza di gran parte del corso, sia per la realizzazione di simulazioni individuali e di gruppo. In questo capitolo si descriveranno gli obiettivi, l'ambiente per l'apprendimento a distanza, la metodologia didattica (con particolare attenzione all'uso della simulazione). Sarà inoltre discusso il metodo adottato per la valutazione continua del processo formativo.

2. Il Master Europeo in Medicina dei Disastri

Lo EMDM è un master di II livello organizzato dall'Università del Piemonte Orientale e dalla Vrije Universiteit Brussel. Istituito nel 2000 con l'obiettivo di armonizzare e standardizzare la formazione in medicina dei disastri a livello europeo, ebbe subito il supporto di numerose società scientifiche e associazioni internazionali quali l'Organizzazione Mondiale della Sanità, l'International Committee of Red Cross, la European Academy of Disaster Medicine e la European Society for Emergency Medicine.

Ad oggi, oltre alle due Università fondatrici, partecipano nell'organizzazione del master altre cinque istituzioni internazionali: Centre for Teaching & Research in Disaster Medicine and Traumatology, Linköping, Svezia; University of California at Irvine, Center for Disaster Medical Science, USA; University of Geneva, Faculty of Medicine and University Hospital of Geneva, Svizzera; Swiss Academy for Military and Disaster Medicine, Bern, Svizzera.

Giunto alla sua undicesima edizione, il Master conta circa 370 professionisti provenienti da 60 paesi diversi che dal 2005 si sono riuniti in una associazione di *Alumni* con l'obiettivo di contribuire allo sviluppo della medicina dei disastri come disciplina accademica promuovendo un approccio basato sull'evidenza e finalizzato allo studio dei fenomeni sanitari legati ad eventi maggiori.

2.1 L'obiettivo didattico

Lo scopo ultimo dell'educazione medica è migliorare la prestazione clinica, piuttosto che aumentare la mera conoscenza. In una disciplina come la Medicina dei Disastri, dove l'obiettivo primario è la cura delle vittime, l'allievo deve utilizzare una combinazione di conoscenza, capacità ed attitudini professionali⁽⁷⁾. Tale combinazione identifica la competenza, ossia la determinata abilità a svolgere uno specifico servizio professionale. Nel caso di eventi disastrosi, tale servizio è rappresentato dalla gestione sanitaria delle operazioni di soccorso sia nella fase acuta successiva all'evento che quella più tardiva di recupero per poi continuare con la preparazione ad affrontare il prossimo evento. Lo EMDM pertanto si pone come obiettivo quello di creare professionisti della gestione di crisi sanitarie maggiori in tutte le sue fasi, con particolare attenzione all'aspetto tattico e strategico. Per fare ciò si prefigge di trasferire conoscenze teoriche, di garantire l'acquisizione di attitudini appropriate e verificare il conseguimento di osservabili capacità meccaniche ed intellettuali.

2.2 L'ambiente didattico

I disastri sono situazioni complicate e stressanti, caratterizzate da una sostanziale incertezza, dalla compressione del tempo e dalla necessità di cure qualificate. Gli enti e le agenzie coinvolte nella gestione di questo tipo di crisi lavorano di concerto per cercare di ridurre al minimo mortalità e morbilità. Il singolo individuo ha necessità di interagire e collaborare con categorie diverse di professionisti ed operatori, mettendo a disposizione le proprie competenze e nello stesso tempo richiedendo il supporto di altre figure.

Per ottenere al meglio questo risultato lo EMDM si basa su un ambiente didattico collaborativo, nel quale cioè lo studente oltre che lavorare per il raggiungimento dei propri obiettivi formativi individuali deve lavorare in piccoli gruppi per raggiungere un obiettivo comune. L'approccio didattico si basa quindi sul *collaborative problem solving*, dove la risoluzione dei problemi avviene attraverso le interazioni tra un gruppo di persone nel quale nessun singolo individuo possiede tutte le risorse e nessun singolo individuo ha probabilità di risolvere il problema o raggiungere gli obiettivi senza almeno qualche input dagli altri membri del gruppo stesso⁽⁸⁾. Tale approccio è risultato efficace sia se applicato alla didattica tradizionale che a distanza⁽⁹⁾.

Il programma risulta inoltre innovativo per la metodologia con cui viene erogato, in quanto combina didattica tradizionale con didattica a distanza. Il Modular Object-Oriented Dynamic Learning Environment (Moodle) è utilizzato come Learning Management System (LMS) in quanto offre ottime possibilità di interazione. La piattaforma web viene utilizzata come stazione di apprendimento, sistema di tutoraggio, contenitore di informazioni e centro di comunicazioni, sincrone ed asincrone⁽¹⁰⁾. Moodle viene utilizzato come ambiente di apprendimento e formazione a distanza (FAD) rappresentando il punto di incontro di diversi modelli teorici e tendenze dottrinarie, basate sulle teorie dell'apprendimento attivo, con un ruolo sempre più dinamico assegnato ai soggetti coinvolti nei processi di apprendimento che tendono a personalizzarsi al fine di superare il modello di attività formativa basato sulla mera erogazione di informazioni come avveniva spesso nella semplice didattica tradizionale.

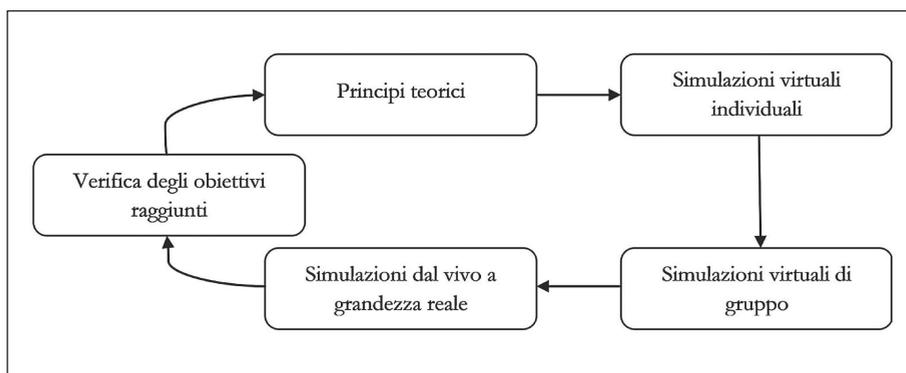


Figura 1. Ciclo formativo EMDM.

In linea generale, lo EMDM si basa su una concezione ciclica e graduale della formazione. Il piano didattico prevede in modo sequenziale:

- 1) una trasmissione dei principi teorici, generali e specifici, di gestione di eventi disastrosi,
- 2) l'acquisizione di capacità meccaniche ed intellettuali attraverso simulazioni virtuali individuali,
- 3) il raggiungimento di attitudini specifiche e competenze gestionali e strategiche attraverso simulazioni di gruppo virtuali ed a grandezza reale, ed infine
- 4) verifica degli obiettivi didattici raggiunti (Figura 1).

2.3 La struttura e la metodologia didattica

Il format educativo prevede:

- 1) un periodo di auto-apprendimento sotto la supervisione e la guida di docenti e/o tutor basato su metodologia *problem-based* ed integrato in una piattaforma di e-learning su Moodle;
- 2) un corso residenziale di due settimane durante il quale gli studenti incontrano i docenti ed i tutor interagendo in dibattiti, esercitazioni e letture, verificando l'abilità dei discenti di mettere in pratica le nozioni acquisite di gestione sanitaria di situazioni di disastro;
- 3) una esercitazione funzionale a grandezza reale di gestione di una maxiemergenza a conclusione del periodo residenziale;
- 4) la partecipazione ad attività di simulazione online relative a scenari catastrofici che valutano la capacità di risposta sanitaria ed organizzativa;
- 5) la stesura di una tesi o un progetto di ricerca in medicina dei disastri sotto la supervisione di un tutor;
- 6) un esame finale online costituito da una simulazione elettronica di gestione sanitaria di un evento catastrofico ed un questionario a risposta multipla sui contenuti del master.

Questa proposta formativa nell'ambito della Medicina dei Disastri rappresenta un esempio unico di *blended learning* in quanto unisce strumenti formativi tradizionali (aula in presenza, *coaching*, *mentoring*,) e online (FAD, forum, ecc.), al fine di offrire un sistema di apprendimento flessibile ed integrato⁽¹¹⁾. In sostanza, si utilizzano in maniera sinergica auto-apprendimento, aula tradizionale, nuove metodologie formative, FAD, strumenti di apprendimento collaborativi.

3. Simulazione

In genere nell'esercizio dell'attività medica, il risultato deleterio di un trattamento è descritto come "errore" medico. Evitare gli errori richiede una combinazione di fattori tra cui esperienza, capacità cognitive, attenzione e motivazione⁽¹²⁾. L'esperienza risulta sicuramente essere un ottimo insegnante in quanto non solo espone a fatti, ma genera conoscenza in un contesto significativo. Ovviamente l'esperienza può essere guadagnata nel mondo reale dove gli errori però hanno un impatto negativo. Questo si amplifica nel caso di eventi che coinvolgono molti individui come i disastri, e dove le conseguenze di un singolo errore possono essere molto più deleterie. È nostra convinzione che l'esperienza possa essere acquisita e valutata attraverso l'esposizione a simulazioni.

L'uso della simulazione in medicina, in generale, ed in medicina dei disastri, in particolare, è ampiamente documentato^(13,14,15,16,17,18). Le simulazioni esperenziali sono giochi di apprendimento dove i partecipanti hanno un ruolo attivo nella simulazione di un processo o un sistema. Si crea un ambiente realistico, governato da una serie di regole, nel quale gli allievi compiono azioni significative e sperimentano conseguenze appropriate come risposta al loro comportamento in quell'ambiente⁽¹⁹⁾. Il motore chiave delle simulazioni esperenziali è il concetto di *learning by doing*: i discenti partecipano attivamente, analizzano informazioni, prendono decisioni e vivono il risultato delle loro azioni, migliorando il loro processo di apprendimento⁽²⁰⁾.

Nell'ambito dello EMDM la simulazione viene utilizzata in varie forme e in diverse fasi del processo formativo: dal punto di vista degli strumenti utilizzati, si spazia da simulazioni *table-top* a esercitazioni a grandezza reale, ad ambienti virtuali. Tali sistemi complementari permettono ai discenti di mettere alla prova le proprie competenze in materia di pianificazione della risposta alle emergenze, ma anche la capacità di sperimentare quanto appreso rispondendo in tempo reale ad esempi concreti di situazioni catastrofiche. Un secondo obiettivo è far conoscere ai discenti vari metodi e sistemi utilizzabili per la formazione delle diverse figure professionali preposte alla gestione delle emergenze.

3.1 Riceland

Si tratta di un ambiente virtuale in cui gli studenti vengono immersi dopo aver appreso le nozioni teoriche della disciplina: sulla base di tale ambiente i discenti acquisiscono capacità gestionali e strategiche attraverso le

simulazioni individuali e di gruppo *table-top*. All'interno di questo ambiente virtuale, che riproduce però fedelmente le strutture sanitarie, logistiche e l'organizzazione istituzionale della provincia di Novara, i partecipanti sono divisi in piccoli gruppi e lavorano come responsabili del sistema sanitario con l'obiettivo di creare il piano per il massiccio afflusso di pazienti in caso di maxiemergenze o disastri, sia per gli ospedali che per il sistema di emergenza territoriale.

Esplorando una mappa posta sulla piattaforma web gli studenti vengono a conoscenza delle caratteristiche geografiche della regione, delle risorse disponibili, delle strutture viarie, dei presidi industriali e delle città. I vari nosocomi vengono quindi rappresentati con maggiore dettaglio, tanto in termini di risorse umane che materiali, presenti e potenzialmente implementabili. Utilizzando forum interattivi, che coinvolgono sia un *Sim-master* (figura che coordina il gioco garantendo le risposte necessarie alle richieste degli studenti) che i tutor degli ospedali, si definiscono le risorse disponibili ed utilizzabili, i possibili rischi e le misure per far fronte ad un eventuale scenario di massiccio afflusso. Web-meeting sincroni completano i sistemi di comunicazione a disposizione degli studenti. Al termine del lavoro ogni gruppo redige il proprio piano di intervento in caso di evento maggiore, il quale viene valutato sia dai docenti che dai partecipanti degli altri gruppi. Lo stesso piano sarà poi testato con una conclusiva simulazione virtuale di gruppo durante la fase residenziale dello EMDM con l'utilizzazione dei programmi simulativi riportati nel paragrafo 3.3.

3.2 Simulazione *table-top* (Emergo Train System®)

Emergo Train System® (ETS) è uno strumento pedagogico di simulazione sviluppato dal Centre for Teaching and Research in Disaster Medicine and Traumatology dell'Università di Linköping in Svezia ed è ad oggi usato in numerosi paesi. L'ETS consiste di simboli magnetici che si posizionano su lavagne bianche in cui vengono illustrati scenari di disastro e riprodotte sezioni di ospedali. Una banca di circa 300 vittime permette di simulare eventi di diversa gravità. Il sistema è utilizzato per analizzare l'appropriatezza dei piani di emergenza e la gestione clinica delle vittime. I risultati permettono di identificare punti di forza e di debolezza nell'organizzazione di un sistema. Inoltre l'ETS, basandosi su criteri di valutazione misurabili, permette di comparare eventi simulativi e relativi risultati sia fra diverse organizzazioni che in una stessa organizzazione a distanza di tempo.

può svolgere e le relative conseguenze⁽²²⁾. I partecipanti sono quindi forzati a tenere in considerazione gli aspetti logistici dei tempi di attivazione, dei tempi di trasporto e di trattamento delle vittime che evolveranno in base alla correttezza delle scelte fatte e della loro tempestività. In altre parole, il sistema pone i discenti davanti a problemi di natura tattica e strategica che sono costretti ad affrontare i gestori del soccorso durante eventi reali.

La valutazione di indicatori di performance, quali ad esempio la correttezza del triage, il numero di trattamenti corretti eseguiti, il numero di esami diagnostici richiesti, l'esecuzione di azioni chiave di comando, permette quindi di valutare la qualità della risposta del sistema sanitario consentendo una successiva revisione dei piani.

3.4 Simulazione a grandezza reale

Le simulazioni su scala reale hanno acquistato negli ultimi anni un sempre maggiore credito tanto come strumento per l'addestramento che come strumento di valutazione della risposta d'emergenza⁽²³⁾. L'efficacia di tali eventi simulativi è però subordinata al realismo delle azioni e dello scenario e all'accuratezza dell'analisi delle azioni svolte, che possono risultare problematici negli ambienti dinamici, come le simulazioni di maxiemergenza⁽²⁴⁾. Le simulazioni a grandezza reale permettono di valutare sia procedure che funzionalità delle strutture quali ospedali, centrali operative, etc. Normalmente coinvolgono tutti gli enti e le organizzazioni che partecipano al soccorso in caso di crisi.

Il realismo è garantito dall'intervento di figuranti che, adeguatamente truccati simulano le condizioni cliniche delle vittime (Figura 3).

Gli studenti dello EMDM partecipano come operatori sanitari in questo ambiente reale che conoscono nonostante la differente provenienza geografica grazie alla familiarità con l'ambiente virtuale di Riceland. Sono quindi chiamati a gestire le operazioni di risposta interagendo e collaborando con altri operatori sanitari, con personale tecnico del soccorso e con le forze dell'ordine, ancora una volta in un ambiente di apprendimento esperienziale (Figura 3). Una valutazione qualitativa e quantitativa delle azioni svolte conclude l'evento formativo.

L'utilizzo di nuove tecnologie, tanto nella progettazione, implementazione, raccolta dei dati e ricostruzione degli eventi, fornisce una visione coerente degli azioni cruciali e quindi migliorare l'efficacia della simulazione. Negli ultimi anni è stato sviluppato un sistema per la creazione, valutazione e successiva ricostruzione delle esercitazioni su scala reale accessibile da computer e smartphone.



Figura 3. Immagine scattata durante la simulazione a grandezza reale organizzata per la IX edizione dello EMDM.

L'applicazione, denominata “DSS – Disaster Simulation Suite®”, realizzata utilizzando il linguaggio PHP e il Database Management System MySQL, consta di 4 strumenti:

- *Disaster Scenario Creator* - permette di selezionare la tipologia di evento, il numero delle vittime che si desidera simulare, la loro gravità media e genera un set di vittime, la cui distribuzione delle lesioni è determinato su base epidemiologica. Il database di vittime da cui vengono estrapolate è stato costruito con casi clinici di pazienti ammessi nel dipartimento di emergenza dell’Ospedale Maggiore della Carità di Novara durante il servizio ordinario. Per ciascuna vittima lo strumento fornisce in forma cartacea delle *Dynamic Victim Cards*, in cui sono rappresentati i parametri vitali; linee guida per i figuranti; istruzioni per i truccatori; risultati dei test di laboratorio e di radiologia (diversi sulla base del tempo trascorso e dei trattamenti eseguiti) e moduli per la raccolta di dati (tempi interazione sanitario-vittima e tempi di trattamento).
- *Disaster Simulation Manager* - permette di inserire online i dati sui trattamenti effettuati dal personale medico sulle vittime ed il tempo in cui azioni chiave sono condotte; permette la raccolta online di predeterminati

indicatori di performance da parte degli osservatori; permette la gestione del laboratorio e della radiodiagnostica in ambiente intra-ospedaliero con la possibilità di stampare esami ed immagini delle vittime, in accordo con la loro evoluzione clinica e i trattamenti effettuati al momento della richiesta; facilita infine il recupero dei moduli cartacei di raccolta dati alla fine dell'esercitazione.

- *Disaster Simulation Reviewer* – consente l'analisi e la rapida valutazione dell'intera esercitazione in maniera quantitativa con l'ausilio di grafici e tabelle. In particolare vengono discriminati:
 - 1) rapidità di evacuazione delle vittime dalla scena;
 - 2) accuratezza del triage,
 - 3) gestione delle vittime in base al codice di priorità,
 - 4) correttezza delle azioni di comando e controllo,
 - 5) correttezza dei trattamenti effettuati,
 - 6) appropriatezza di esami di laboratorio e di radiodiagnostica effettuati,
 - 7) rapidità di gestione delle vittime nel dipartimento di emergenza.
- *Disaster Simulation Tracker* – consente il tracciamento geografico nel tempo di vittime e personale sanitario, mediante l'utilizzo di tecnologie RFID e GPS e visualizzazione in remoto dell'esercitazione.

Conclusioni

Fino a qualche decade fa, i disastri erano visti come eventi straordinari la cui gestione era affidata alle sfortunate popolazioni colpite senza tenere in considerazione le implicazioni e le cause che li hanno generati. Oggi questa attitudine sta progressivamente cambiando dando maggiore enfasi alla prevenzione e preparazione contro tali eventi. Una sempre maggiore importanza ha assunto la formazione specifica di professionisti sanitari con competenze spesso estranee alla pratica clinica e gestionale di ogni giorno. Le nuove tecnologie informatiche hanno gradualmente trovato maggiore spazio in quest'ambito motivate anche dalle nuove teorie didattiche di apprendimento dell'adulto. L'associazione di diversi strumenti didattici è in grado di ottimizzare il processo di apprendimento e quindi di migliorare l'efficacia didattica⁽²⁵⁾. Lo EMDM rappresenta un valido esempio di questo approccio, condotto in parte utilizzando metodologie di e-learning, ed inoltre sfruttando le potenzialità del *game-based learning*. Inoltre gli ex-studenti hanno dato vita alla EMDM *Alumni Association* una vera e propria comunità capace di dare continuità all'obiettivo di condivisione e creazione di conoscenza nel settore.

BIBLIOGRAFIA

1. Council of the European Society for Emergency Medicine. *Manifesto for Emergency Medicine in Europe European*. Eur J Emerg Med. 1998; 5: 7-8.
2. Noji EK. *The public health consequences of disasters*. Prehosp Disaster Med. 2000; 15: 147-157.
3. Arnold JL. *Disaster medicine in the 21st Century: Future hazards, vulnerabilities, and risks*. Prehosp Disaster Med. 2002; 17: 3-11.
4. Grant J. *Measurement of learning outcomes in continuing professional development*. J Contin Educ Health Prof. 1999; 19: 214-219.
5. World Association for Disaster and Emergency Medicine, Education Committee Working Group. *International Standards and Guidelines on Education and Training for the Multi-disciplinary Health Response to Major Events that Threaten the Health Status of a Community*. Prehosp Disaster Med. 2004; 19: 16-30.
6. Debacker M, Deloos H, Della Corte F. *The European Master Program in Disaster Medicine (EMDM): A Unique Education and Training Model*. International Journal of Disaster Medicine. 2003; 1: 35-41.
7. Leinstar S. *Medical education and the changing face of healthcare delivery*. Medical Teacher. 2002; 24: 13-15.
8. O'Neil HF, Chuang SH, Chung GKWK. *Issues in the computer-based assessment of collaborative problem solving*. Assessment in Education. 2003; 10: 361-373.
9. Trentin, G. *La sostenibilità didattico-formativa dell'e-learning. Social networking e apprendimento attivo*. Ed. Franco Angeli, 2008, Milano.
10. Maciel DT, Soares W, Amaral E. *Moodle platform for online tutoring during internships*. Med Educ. 2009; 43: 1113-1114.
11. Graham R. *Blended Learning Systems: Definitions, Current Trends, and Future Directions*. In "The Handbook of Blended Learning: Global Perspectives", 2005: 3-21, Bonk CJ and Graham R Ed, San Francisco.
12. Stash U, Streufert S. *Value of a cognitive simulation in medicine: towards optimizing decision making performance of healthcare personnel*. Qual Saf Health Care. 2002; 11: 163-167.
13. Gofrit ON, Leibovici D, Shemer J, Henig A, Shapira SC. *The efficacy of integrating "smart simulated casualties" in hospital disaster drills*. Prehosp Disaster Med. 1997; 12: 97-101.
14. McGaghie WC, Issenberg SB, Petrusa ER, Scalese RJ. *A critical review of simulation-based medical education research: 2003-2009*. Medical Education. 2010; 44: 50-63.
15. Kobayashi L, Shapiro MJ, Suner S, Williams KA. *Disaster medicine: the potential role of high fidelity medical simulation in mass casualty incident training*. Med Health R I. 2003; 86: 196-200.
16. Franc-Law JM, Bullard M, Della Corte F. *Simulation of a hospital disaster plan: a virtual, live exercise*. Prehosp Disaster Med. 2008; 23: 346-353.
17. Ingrassia PL, Prato F, Geddo A, Colombo D, Tengattini M, Calligaro S, La Mura F, Franc JM, Della Corte F. *Evaluation of medical management during a mass casualty incident exercise: an objective assessment tool to enhance direct observation*. J Emerg Med. 2010; 39: 629-636.

18. Franc-Law JM, Ingrassia PL, Ragazzoni L, Della Corte F. *The effectiveness of training with an emergency department simulator on medical student performance in a simulated disaster*. CJEM. 2010; 12: 27-32.
19. Colella V. *Participatory simulations: Building collaborative understanding through immersive dynamic modelling*. The journal of the learning sciences. 2000; 9: 471-500.
20. Kopf S, Scheele N, Winschel L, Effelsberg W. *Improving Activity and Motivation of Students with Innovative Teaching and Learning Technologies*. Paper presented at the Proceedings of Methods and Technologies for Learning, April, 2005, Palermo, Italy. Available at http://pi4.informatik.uni-mannheim.de/~kopf/publications/2005/Kopf_2005c.pdf. Accessed July 12, 2013.
21. La Mura F, Franceschinis G, Della Corte F. *Ambienti collaborativi come strumenti di ricerca e didattica in medicina dei disastri e d'emergenza: i simulatori e-DISTRICT CiPro ed HPDnetS*. Paper presented at the Proceedings of the VI Convegno Tecnico Scientifico MIMOS, October 18-20, 2006, Torino, Italy. Available at <http://www.mimos.it/public/LaMuraFranceschinisDellaCorte.pdf>. Accessed July 12, 2013.
22. Botte B, Matera C, Sponsiello M. *Serious Games between simulation and game. A proposal of taxonomy*. Journal of e-Learning and Knowledge Society. 2009; 5: 11-21.
23. Gebbie KM, Valas J, Merrill J, Morse S. *Role of exercises and drills in the evaluation of public health in emergency response*. Prehosp Disaster Med. 2006; 21: 173-182.
24. Hoffman RR, Crandall B, Shadbolt NR. *Use of the critical decision method to elicit expert knowledge: a case study in the methodology of cognitive task analysis*. Human Factors. 1998; 40: 254-276.
25. Hsu EB, Jenckes MW, Catlett CL, Robinson KA, Feuerstein CJ, Cosgrove SE, Green G, Guedelhoefer OC, Bass EB. *Training to hospital staff to respond to a mass casualty incident*. Evid Rep Technol Assess (Summ). 2004; 95: 1-3.

IDEE DELLA MEDICINA OTTOCENTESCA SULLA NATURA FEMMINILE, PRIMA DI LOMBROSO

Giuseppe Armocida, Gaetana Silvia Rigo

Dipartimento di Biotecnologie e Scienze della Vita
Università degli Studi dell'Insubria (Varese)

Parole chiave: *Femminismo*
Emancipazione femminile
Diritti civili

Key words: *Feminism*
Women's liberation
Civil rights

Riassunto

A fine Ottocento le idee sulle diseguglianze intellettuali e sulla superiorità del maschio rispetto alla femmina erano espresse anche dalle forti personalità di Cesare Lombroso, di Paolo Mantegazza e di diversi altri autorevoli rappresentanti della medicina del tempo. Tuttavia, una lettura della trattatistica medica e segnatamente di quella fisiologica tra la fine del XVIII e la prima metà del XIX secolo dimostra che il concetto di una naturale inferiorità della donna era già saldo nel pensiero scientifico precedente.

Abstract

At the end of the nineteenth century beliefs about intellectual inequalities and superiority of the man upon the woman were also expressed by eminent personalities like Cesare Lombroso, Paolo Mantegazza and many other great representatives of the medical science of the time. However, a reading of the medical treatises, and especially the physiological works, demonstrate that between the end of the eighteenth century and the first half of the nineteenth century, the idea of a natural inferiority of the woman was already well-established in the previous scientific thought.

Le celebrazioni del centenario della morte di Lombroso, nel 2009, hanno visto riproporre anche il tema di una certa misoginia dello scienziato, le cui idee contribuirono a rinforzare il concetto di una naturale inferiorità femminile, usando la suggestione di una terminologia darwiniana con stereotipi culturali intrinseci alla teoria generale dell'evoluzione. La donna normale, più resistente alle malattie e conservatrice della specie, sarebbe meno intelligente dell'uomo ed in un certo senso più atavica, meno evoluta e meno differenziata. Progressista in politica, Lombroso non si opponeva al riscatto della condizione delle donne rispetto a certe diseguaglianze di diritti. Riusciva anche ad esprimersi in favore del divorzio, ma di fronte alle esigenze dell'emancipazionismo il suo pensiero si arrestava ed arretrava. Si andava verso la fine del secolo XIX e con le altre voci, anche in concorrenza con l'antico ed ora non più amico Cesare Lombroso, emergeva la potenza comunicativa di un altro medico, Paolo Mantegazza. Protagonista tra i più ascoltati nella divulgazione delle idee scientifiche, Mantegazza non aveva mancato di spiegare le indubitabili diversità esistenti tra maschio e femmina e vi aggiungeva la certezza che la donna è come un uomo arrestato nel suo sviluppo. Forse una parte delle differenze psichiche proveniva dal ruolo subordinato in cui la donna era stata sempre tenuta, ma la condizione oppressiva non bastava a spiegarne la inferiorità. Con espressioni di sicurezza, palese confessione del proprio intendere di maschio, Mantegazza scriveva che la donna era stata, era e sarebbe sempre stata meno intelligente dell'uomo:

noi vogliamo la donna molto donna e vogliamo quindi, che corrisponda fisicamente non solo, ma moralmente e intellettualmente al tipo del suo sesso. Fisicamente ci ripugna se ha la barba e non ha fianchi; moralmente, se è senza cuore o prepotente; intellettualmente, se emerge nelle lettere e nelle scienze /.../ la donna fu ed è e sarà sempre meno intelligente dell'uomo; e il carattere generale del suo pensiero è quello di essere infantile. Nella lunga via dell'evoluzione intellettuale essa si ferma sempre a stazioni più vicine al punto di partenza /.../ la folle mania dell'*uguaglianza*, utopia delle utopie, ha spostato il problema, invocando per la donna diritti eguali ai nostri; noi tutti dobbiamo invece adoperarci, perché essa goda non dei *nostri*, ma dei *suoi* diritti⁽¹⁾.

Con molto meno visibilità di Lombroso o di Mantegazza, su questo oggetto si era espresso anche il direttore del manicomio di Girifalco, Silvio Venturi, che in un saggio di psicopatologia sociale (*Le mostruosità dello spirito*, 1899), su una impostazione di dottrina diversa dalla scuola lombrosiana, spiegava

come la genialità intellettuale fosse rara nella donna. Era in sostanza lo stesso modo di intendere di un affermato ginecologo del tempo, il socialista Luigi Maria Bossi, professore nell'Università di Genova:

Moleschott giunse a dire che l'utero è nella donna un secondo cervello. Certo straordinaria è l'influenza che l'utero esercita sul fisico della donna /.../ asserì la donna altro non essere che un veicolo per uova, si vedrebbe però come tutte le sue funzionalità convergono alla funzionalità generativa. Leso l'utero tutti gli altri organi, e specialmente il sistema nervoso, ne risentono⁽²⁾.

Bossi era convinto della influenza che le alterazioni della sfera genitale determinavano sul sistema nervoso e sulla psiche della donna e non temeva di essere accusato di esagerazione affermando che due terzi degli squilibri nervosi e psichici femminili, un gran numero di psicopatie ed anche certe forme criminali della donna, erano dipendenti da alterazioni degli organi genitali. Era la stagione in cui l'intesa tra psichiatri e ginecologi nella clinica era giunta a proporre finanche l'ovaroclasia, con speciali strumenti chirurgici studiati per distruggere l'ovaio nel trattamento delle manifestazioni isteriche. Venne poi il neurologo Paul Julius Moebius che pubblicava in Germania il libello *L'inferiorità mentale della donna* (1900), spiegando come quell'inferiorità mentale fosse da ritenersi un postulato fisiologico:

la donna è qualche cosa di mezzo fra il fanciullo e l'uomo, e lo è altresì, almeno per molti riguardi, anche dal punto di vista psichico /.../ nella donna sono meno sviluppate che nell'uomo porzioni del cervello, le quali sono della massima importanza per la vita psichica, quali le circonvoluzioni del lobo frontale e temporale /.../ la deficienza mentale della donna non solo esiste, ma per di più è necessaria; non soltanto è un fatto fisiologico, ma è altresì un postulato fisiologico⁽³⁾.

Per il neurologo tedesco ogni sforzo diretto a rimuovere le naturali differenze che facevano la donna intellettualmente inferiore era inevitabilmente destinato a fallire, perché l'inferiorità era legata a realtà biologiche e non a condizionamenti sociali o culturali.

Queste idee sui caratteri psicofisici differenti nei due sessi, con la forza di tante voci diverse di antropologi e freniatri espliciti nello spiegare l'inferiorità intellettuale della donna, anche d'intesa con i ginecologi, hanno stimolato la nostra curiosità verso certe idee scientifiche di quel momento. I processi di discriminazione che si agirono dentro il determinismo biologico della seconda metà del XIX secolo sono già ben noti^(4,5). Tuttavia, ci sembrava

che la storiografia non avesse ancora sufficientemente indagato le origini di quell'argomentare scientifico. Abbiamo così scelto di percorrere la strada di una analisi delle fonti nelle quali – prima di Lombroso e della sua epoca – si leggevano le disegualanze di identità maschile o femminile. E crediamo di aver dimostrato che nel riconoscere il femminile in una naturale inferiorità rispetto al maschile, ad alimentare e rinforzare i pregiudizi, l'ammaestramento della scienza medica aveva ben preceduto Lombroso, Mantegazza, Bossi, Moebius e i loro contemporanei che in realtà avevano solo recuperato un concetto di naturalità già saldo nel pensiero medico precedente. Lo avevano irrobustito e se ne erano fatti divulgatori di successo, nutrendosi con le idee di chi, prima di loro, aveva descritto la donna meno intelligente e più emotiva dell'uomo⁽⁶⁾. Dunque occorre guardare più lontano e cercare le anticipazioni di certe presunzioni che poi, nei decenni del trionfo positivista, alimentarono le teorie antropologiche, freniatriche e ginecologiche sulla struttura psichica della donna. Si vedrà che i medici della seconda metà dell'Ottocento, con le loro voci molto ascoltate, avevano dato corpo divulgativo robusto a idee che già da molto tempo circolavano nei trattati di medicina e che si trascinarono fin dentro il positivismo. La medicina su questi temi transitò dai sistemi di stampo settecentesco all'Ottocento scientifico con animo conciliante, per affermare che una differenza naturale era innegabile e così asseverava l'ineluttabilità dei destini diversi maschili e femminili nella società. Una ideologia naturalistica diffusa sosteneva la inferiorità della donna con molte argomentazioni. In diversi trattati si spiegava ancora che l'uomo è “caldo e secco”, mentre la donna deve essere “umida” e di temperamento sanguigno, come sarebbe il maschio in età infantile. Cabanis nella memoria *De l'influence des sexes sur le caractère des idées et des affections morales*, vedeva nella donna “la pulpe cérébrale plus molle, et le tissu cellulaire plus muqueux et plus lâche”, mentre notava il vigore del sistema nervoso e del sistema muscolare maschile. Si deve poi riconoscere l'influenza di Pierre Roussel, autore del *Système physique et moral de la femme* (1775), letto ed apprezzato in tante successive edizioni e traduzioni fin dentro il secolo XIX. Anche Roussel spiegava che la fisiologia femminile “si piegava naturalmente” al concetto di temperamento sanguigno, con tracce della dottrina degli umori e delle qualità di caldo, freddo, secco e umido degli antichi. Era indiscutibile l'idea che le differenze avessero influenza sul modo di sentire, di pensare e di agire ed era assai saldo il concetto di “simpatia” tra le varie parti dei corpi, intesa come un rapporto di vicendevole influenza tra i diversi organi, anche se distanti tra loro. Il pensiero fisiologico di primo Ottocento si legge nel monumentale *Dictionnaire des sciences médicales* (Parigi 1812-1822). La voce *Femme* occupa più di centocinquanta

pagine, nelle quali ci si aggira tra le consuete distinzioni di sesso, tra forza e grazia, tra ragione e passione, tra luoghi comuni e affermazioni temerarie o banali. Si scriveva che ogni individuo femminile è creato unicamente per la propagazione della specie, perché gli organi della riproduzione sono il centro di tutta la struttura della donna. Dall'utero originavano influenze e irradiazioni verso tutti gli altri organi, nella fisiologia come nella patologia, sicché la dottrina della "simpatia" guidava ad ammettere come indubitabile l'interdipendenza tra utero e cervello. Correavano le descrizioni delle diverse complessioni di architettura dello scheletro e dei muscoli, delle qualità della pelle, della forma di distribuzione pilifera. Le femmine hanno ossa più piccole, sottili, esili; hanno un tessuto cellulare più spongioso, più umido; nella costituzione femminile si ha una quantità di liquidi maggiore rispetto ai solidi; il tessuto grassoso è più esteso; il polso è più piccolo e rapido; il sangue si porta maggiormente nella cavità addominale e pelvica; la donna preferisce nutrirsi con cibi diversi da quelli di cui si nutre abitualmente l'uomo; persino nella dentizione si troverebbero differenze, perché le donne dovrebbero avere meno molari e perché in loro non emerge sempre il dente del giudizio e via dicendo. In queste corrispondenze tra parti anatomiche si imbrogliava una trattazione meccanicistica delle misteriose funzioni dello psichismo. Ai pilastri che già reggevano l'edificio delle differenze si era aggiunto quello delle misurazioni del cranio e dell'encefalo, guida utile alla concettualizzazione di una minore capacità intellettuale della donna. Il lobo anteriore nel cervello femminile era di dimensioni minori rispetto a quello dell'uomo, mentre sembrava più sviluppata la parte superiore della zona occipitale. Anche il cervelletto si vedeva più piccolo. La differenza di conformazione definiva ovviamente le diverse funzioni. La costituzione corporale della donna è simile alla natura del bambino o a quella dell'eunuco: gli organi cedono facilmente agli impulsi, la sensibilità è viva e variabile, si da non riuscire a dominare a lungo le sensazioni, in una continua oscillazione di sentimenti. Ricca di dettagli risultava la descrizione dei profili di personalità e di psichismo, correlati sempre alla "simpatia" che collegava l'utero agli altri organi. Era evidentemente una costruzione concettuale fondata sulla dominanza delle funzioni generatrici, perché il femminile si incardinava quasi esclusivamente alla maternità. La donna esiste per essere madre e questa frase si trovava ripetuta nei trattati di fisiologia. Il genere femminile inclina per natura al sentimento, alla bontà ed all'assistenza, ma pure, all'opposto, vi possono essere donne capaci di deragliare dalle proprie naturali virtù e allora sarebbero attrici di vizi e crudeltà in misura superiore all'uomo. È chiaro che qui si offrivano anticipazioni dell'antropologia criminale lombrosiana

di un cinquantennio dopo. Il genere femminile era sempre stato estraneo alle conquiste dello spirito umano e tutti sapevano che è proprio del mondo femminile il lasciarsi persuadere dai ciarlatani, il divenire sibille, pitonesse, streghe, l'aderire ad eresie, superstizioni e credulità. Quando gli studi si aggiornavano e svelavano molte funzioni della vita, una parte della trattatistica fisiologica ancora si adagiava nelle differenze naturali:

ogni sesso ha in tutta la sua economia sì distinti attributi, che si richiederebbero volumi a tutti descriverli. Chi non conosce la mobilità nervosa e la maggiore sensibilità della donna. In lei tutto è sensazione, sente e molto e giustamente; pertanto il sentimento fa in lei le veci di giudizio; il suo tatto si mostra squisito e pronto; sente e tosto decide secondo la sensazione, prima anche d'aver tempo per giudicare. Quanto non si disputò sul grado delle sue facoltà morali ed intellettuali! Quante volte non si cercò di eguagliarle a quelle dell'uomo⁽⁷⁾.

Anche il fisiologo Michele Medici non sembrava aver dubbi quando scriveva che in certe donne destinate dalla natura alla sterilità si vedevano molti caratteri dell'uomo:

e di tali donne favellando /.../ dirò che hanno un portamento nobile, le forme del corpo gentili a un tempo, e robuste, serio lo aspetto, la voce grave, e talvolta una lanugine al mento, e al petto, la cute non tanto liscia, né molle, mancanza dei mestruai, gagliardia di movimenti, tolleranza delle fatiche⁽⁸⁾.

Si descrivevano le diversità scheletriche e muscolari, ma quando ci si inoltrava nelle funzioni intellettuali le spiegazione diventavano opinioni. La donna ha più attività di sentimenti e meno energia di volontà, ha una sensualità più delicata, passioni più vive, ma meno profonde, più pudore, più gaiezza e più curiosità, ma solo di "choses personnelles":

Quant aux facultés intellectuelles et aux sentiments moraux, qui s'influencent tant mutuellement et dont les variétés sont infinies, on a dit, d'une manière très générale, et par consequent qui apprend peu de choses, que l'intelligence domine chez l'homme, et le sentiment chez la femme, que l'un pense plus qu'il ne sent, l'autre sent plus qu'elle ne pense⁽⁹⁾.

In area italiana circolava il *Dizionario di medicina* (Venezia 1833- 1840) esemplato sull'opera francese già citata, da cui derivava come traduzione,

ma con molti aggiornamenti ed aggiunte. Vi leggiamo la lunga voce *Donna* che manteneva salda l'idea della forte influenza esercitata dagli organi della generazione su tutto l'organismo. La diversità segnava gusti, tendenze, inclinazioni, difetti. La debolezza muscolare e l'inferiorità intellettuale obbligavano la donna ad esistere solo dentro i confini della famiglia e per piacere all'uomo:

gli organi destinati ad indicare in ispecialità il suo sesso /.../ diventano in qualche guisa la radice e la base della struttura interna della donna /.../ è creata per piacere all'uomo. Ella esiste per lui, per andargli a genio, per essergli giovevole, per farsi da esso amare e onorare, allevarlo giovane, consolarlo se grande, e rendergli la vita aggradevole ed amena; ecco i suoi doveri in ogni tempo, ed ecco la parte che natura le destinò /.../ potremmo piuttosto sussistere noi senza di loro, anziché le donne senza di noi⁽¹⁰⁾.

Il difetto intellettuale non si riteneva emendabile nemmeno con un'educazione diversa da quella convenzionale. L'inferiorità non discendeva dalla troppo lieve istruzione, ma era determinata dalla natura che non consentiva sforzi intellettuali alle donne, esposte alla tirannia delle sensazioni, schiave dei propri sensi e della propria immaginazione, atte più a sentire che a creare. Le donne brillano per spirito amabile, seguono il proprio gusto ed in generale non fanno nulla di profondo. In una scienza medica segnata dalle suggestioni del magnetismo era facile insinuare che sono degli individui magnetici per eccellenza, con una eccessiva suscettibilità del sistema nervoso. Tanto sensibili, soffrono più spesso il bisogno di dormire, ma di un sonno meno profondo, disturbato dai sogni ed anche accompagnato da "sonnambulismo":

l'uomo e la donna non solo differiscono nei loro organi genitali propriamente detti, ma tutte le altre parti della loro organizzazione, sebbene analoghe, portano l'impronta della differenza del loro sesso; non evvi verun organo che sia loro comune e niuna delle loro funzioni che non presenti qualche specialità /.../ sul viso i muscoli riescono meno distinti, immersi in più grasso, locché rende la fisionomia delle donne più inclinevole alla espressione dell'occhio ed al sorriso che all'azione degli altri lineamenti⁽¹¹⁾.

Il sesso penetra talmente con la sua influenza negli organi al punto da dare carattere specifico ad ogni parte e ad ogni osso dello scheletro. Sono diversi i capelli, le unghie, la pelle e il tessuto cellulare sottocutaneo, più abbondante nella femmina. Il dizionario spiegava le differenze di nutrizione, sistema

linfatico, parenchimi, secrezioni ed escrezioni e del sistema circolatorio, così come il ruolo centrale dell'utero nelle sue connessioni con tutti gli altri organi, attraverso le funzioni del simpatico. Nella donna dominano le facoltà affettive e nell'uomo quelle intellettive. Una donna poteva farsi scrittrice, ma solo di romanzi, mentre non avrebbe avuto alcun valore nelle cose di scienza: le donne scienziate erano sempre state poche e quelle che si dicevano tali apparivano inevitabilmente "ridicole". Si arrivava ad ammettere che, dando buone prove in opere intellettuali, una donna poteva addirittura perdere le grazie del suo sesso. Qui sembra proprio di cogliere un avvertimento che l'uomo di medicina voleva far giungere alle donne, un consiglio a restare nei loro ruoli per non guastare bellezza e grazia. Spiegava che se fossero state diverse avrebbero cessato di appartenere al loro sesso. Ansaldo Feletti, primario negli ospedali di Bologna, nel 1870 conosceva qualche donna dispensatrice di rimedi curativi empirici, ma si doveva diffidarne, cogliendone addirittura l'abnormità fisica:

si chiamano donne, né veramente so il perché; io le direi piuttosto esseri neutri, non offrendo esse i caratteri spettanti all'uomo, e meno quelli propri della donna: del primo non hanno la forza, la fermezza, il senno; della seconda non la grazia, la dolcezza, l'abnegazione. Nel maggior numero dei casi il volto s'accorda coll'animo; e vien fatto di trovar guernite di peli le labbra che lasciano passare voce di donna: ovvero una promiscuità di lineamenti virili e donneschi nella medesima faccia⁽¹²⁾.

Si tratta di un pensiero sempre uguale dall'inizio alla seconda metà del secolo. Le scuole di medicina formavano i loro allievi senza staccarsi da queste salde visioni e si conoscono le resistenze opposte dalla Facoltà Medica di Parigi alle donne che, intorno al 1870, aspiravano agli studi di medicina. Lo stato giuridico femminile non consentiva pieni diritti, ma pure si segnalava la natura incompatibile con la professione medica perché le donne non avrebbero le qualità virili, l'intelligenza aperta e pronta, il carattere serio e fermo, il sangue freddo, il dominio completo di sé, il rigore morale e la forza muscolare, qualità necessarie nell'esercizio della medicina. Le donne nelle crudeltà della professione medica avrebbero perso la grazia, lo *charme* e le attrattive del sesso: non sarebbero state più né donne né uomini. Si arrivava a scrivere che un medico donna sarebbe apparso come un essere di sesso dubbio, una sorta di mostruosità ermafrodita⁽¹³⁾. Si faceva sentire ed era molto ascoltata anche la voce di T. L. Bischoff che nel 1872 si dichiarava deciso avversario dell'ingresso delle donne nella professione medica, adducendo tra le altre motivazioni anche la conformazione del cervello

femminile inadeguato a certi studi. Dunque, girata la metà del secolo, una parte della medicina, con cronica perseveranza, non si staccava ancora dalle idee che l'avevano nutrita fino dall'inizio del secolo e giustificava la tematica di realtà differenti, la maschile raziocinante e la femminile senziente. Un fronte culturale era sostanzialmente unitario in questo senso. Indagando il funzionamento di organi ed apparati del corpo umano si procedeva di successo in successo, ma i fenomeni della mente non erano esplorabili con gli strumenti di misurazione quantitativa e davanti alla complessità dell'organo cerebrale ci si aggirava in labirinti di pensiero, persistendo le suggestioni della craniometria che misurava crani, pesava cervelli e traeva conseguenze da una pretesa relativa microcefalia della donna. La lettura del femminile ricadeva nella antica dottrina di correlazioni tra gli organi della generazione ed il sistema nervoso, con tutte le generalizzazioni interpretative che ne discendevano. In Italia correva sulle strade della divulgazione un volumetto di Filippo Lussana, *Fisiologia della donna* (in due edizioni: Padova 1868 e 1874). Lontane dalla solennità dei trattati scientifici, quelle pagine facili da leggere non si staccavano dalla trattatistica precedente, non si aggiornavano e riproponevano le argomentazioni ben note sulla morfologia della massa cerebrale. La conoscenza imperfetta dei meccanismi della mente si imbrogliava nelle costruzioni di ipotesi di corrispondenza tra il fisico ed il mentale, tra la struttura corporea e le caratteristiche intellettuali e morali. Si può notare la banalità di un siffatto orientamento, ma queste spiegazioni rappresentavano l'ordinario intendere della scienza medica. Appartenevano anche a chi, tra gli scienziati, era favorevole ad una moderata emancipazione delle donne e così le certezze mediche si prestavano a rassicurare il pensiero conservatore preoccupato dell'avanzare delle istanze emancipazioniste. Offrivano una solida base alle posizioni resistenti. Una conformazione naturale giustificava le naturali disuguaglianze di ruoli nella società: l'uomo è più forte e perciò comanda.

Ecco che dunque possiamo sollevare in parte gli alienisti e antropologi di fine Ottocento da certe responsabilità scientifiche. Il mondo della medicina, sulla questione delle differenze tra maschi e femmine, aveva vissuto una sorta di poco feconda pace interna, di tranquillo conformismo lungo tutto il secolo XIX. A fine Ottocento le idee sulle disuguaglianze intellettuali restavano scientificamente indubitabili e godevano di una assai vasta visibilità, ma non erano del tutto originali. Erano solo diversi i propagandisti. Lombroso o Mantegazza, con la loro straordinaria notorietà e le forti personalità divulgative, segnarono veramente il pensiero dell'epoca, ma dobbiamo intendere che essi si trovarono già istruiti in certe idee ereditate

dalla medicina delle generazioni precedenti. Scolpendo in leggi di natura le iscrizioni di una inferiorità femminile, già prima di Lombroso, i medici dell'Ottocento nei loro trattati avevano davano forza a quanti non volevano trasferire certi diritti alle donne e così avevano assolto il loro compito di solidarietà maschile.

BIBLIOGRAFIA

1. Mantegazza P. *Fisiologia della donna*. Treves, 1893, Milano, vol. II, pp. 187, 207, 227.
2. Bossi LM. *L'igiene della donna in rapporto alla profilassi ostetrica e ginecologica*. Tip. Di Angelo Ciminago, 1888, Genova, p. 9.
3. Moebius PJ. *L'inferiorità mentale della donna*. Einaudi, 1978, Torino, pp. 6, 7, 16.
4. Babini VP, Minuz F, Taglavini A. *La donna nelle scienze dell'uomo. Immagini del femminile nella cultura scientifica italiana di fine secolo*. Franco Angeli, 1989, Milano.
5. Babini VP. *Un altro genere. La costruzione scientifica della "natura femminile"*. In "Nel nome della razza", 1999: 135-147, Mulino, Bologna.
6. Armocida G. *Donne naturalmente. Discussioni scientifiche ottocentesche intorno alle "naturali" disuguaglianze tra maschi e femmine*. Franco Angeli, 2011, Milano.
7. Brachet JL, Fouilhoux LMG. *Note del curatore dell'edizione italiana*. In "Fisiologia elementare dell'uomo scritta dai dottori Brachet e Fouilhoux medici dell'ospedale civile di Lione. Versione italiana dal francese" 1841: I-LVIII, vol.1, Giuseppe Antonelli, Venezia.
8. Medici M. *Manuale di fisiologia*. Guidi all'Ancora, 1840, Bologna, p. 239.
9. AA.VV. *Encyclographie des Sciences Médicales, Répertoire général de ces sciences au XIXe siècle, Etablissement encyclographique*. 1841, Bruxelles, tomo 27, p. 298.
10. Levi MG. *Dizionario classico di medicina interna ed esterna*. Antonelli, 1834, Venezia, tomo 9, pp. 458, 462.
11. Levi MG. *Dizionario classico di medicina interna ed esterna*. Antonelli, 1834, Venezia, tomo 41, pp. 313-322.
12. Feletti A. *Il medico e la società*. Fava e Garagnani, 1870, Bologna, p. 242.
13. Pigeard N. *L'entrée des femmes en médecine*. Vesalius, 2010; XVI, 1: 24-29.

L'EPIDEMIOLOGIA DELLE MALATTIE CRONICHE: PROSPETTIVE FUTURE

*Franco Merletti, Claudia Galassi,
Carlotta Sacerdote, Lorenzo Richiardi*

Epidemiologia dei Tumori - Dipartimento di Scienze Mediche
Università e AO Città della Salute e della Scienza di Torino
Centro di Riferimento per l'Epidemiologia e la Prevenzione Oncologica
in Piemonte - CPO Piemonte

Parole chiave: *Epidemiologia*
Nutrizione
Inquinamento atmosferico
Life-course epidemiology
Coorti di nuovi nati

Key words: *Epidemiology*
Nutrition
Air pollution
Life-course epidemiology
Birth-cohorts

Riassunto

Negli ultimi decenni del secolo scorso l'epidemiologia ha dato un enorme contributo alla identificazione delle cause delle malattie croniche. Tuttavia con il passare del tempo i rischi associati alle esposizioni studiate sono risultati sempre minori. Le cause di malattia che davano rischi molto elevati (rischi relativi (RR) di 10-15 per fumo di tabacco e tumore del polmone), sono stati identificati prima delle cause con rischi meno elevati (fumo attivo di tabacco e malattie cardiovascolari con RR da 1.5 a 2 e fumo passivo e tumore del polmone con RR intorno a 1.3). Oggi le cause ambientali delle malattie croniche (inquinamento atmosferico, componenti della dieta, ad esempio) sono attribuibili a fattori con RR modesti, anche se diffusi a livello di popolazione generale. Solo grandi studi di coorti seguite nel tempo o studi caso-controllo basati su serie di casi emergenti da larghe popolazioni

di più paesi o di più continenti possono aspirare ad identificarle. Lo studio delle interazioni geni-ambiente ed il recente sviluppo dell'epidemiologia molecolare ha creato consorzi di studi e di banche biologiche di grandissime dimensioni. Contemporaneamente lo sviluppo tecnologico dell'informatica permette oggi l'utilizzo di grandi basi di dati demografici, di esposizione e di incidenza e mortalità da malattia che coprono la popolazione europea, permettendo il collegamento tra le basi dati degli studi epidemiologici e le basi dati correnti. Lo sviluppo di sensori di monitoraggio individuale sia a livello di esposizioni che, ad esempio, di parametri biochimici in tele-medicina aprono nuovi scenari negli studi di popolazione. Il futuro va verso il coordinamento di queste enormi risorse per la ricerca per poter replicare velocemente i risultati in popolazioni diverse, per poter rispondere velocemente a quesiti di interesse per i decisori politici e per poter studiare malattie meno frequenti ed esposizioni rare. Le prospettive future dell'epidemiologia delle malattie croniche sono quindi numerose. Tra le molte abbiamo scelto in questa relazione di affrontare alcuni case-studies sull'inquinamento atmosferico, sui fattori della dieta e sulle coorti di nuovi nati.

Abstract

In the last decades of last century epidemiology gave a large contribution to the identification of the causes of chronic diseases. Exposures related to large risk factors such as active smoking and lung cancer were identified before exposures with smaller risk such as active smoking and cardiovascular diseases or Environmental Tobacco Exposure and lung cancer. Today environmental causes of chronic diseases (air pollution, dietary aliments and nutrients ecc.) are likely to be attributable to very low risks, prevalent in large populations. Only very large cohorts followed over time or case-control studies based on populations at European or inter-continental levels will have sufficient power to identify them. Gene-environment interactions studies and the recent development of molecular epidemiology gave rise to large consortia and large bio-banks. At the same time the development of computer sciences has made the use of demographical, exposures and diseases data bases of most of the European population linking data-bases of consortia studies and data-bases of current data. Monitoring of individual exposures in environmental epidemiology and the development of e-health open new scenarios in population studies. Future perspectives in chronic disease epidemiology are therefore rapidly emerging. Among them we will cover here three case-studies of air pollution, dietary factors and birth-cohorts.

Negli ultimi decenni del secolo scorso l'epidemiologia ha dato un enorme contributo alla identificazione delle cause delle malattie croniche. La quasi totalità degli agenti cancerogeni sono stati ad esempio classificati grazie a studi epidemiologici combinati con studi di cancerogenesi animale e a dati "meccanicistici" che confermavano la plausibilità biologica dei risultati di questi lavori. Sono stati i decenni degli studi descrittivi sui trend temporali, sulle differenze di frequenza geografica delle malattie croniche e del loro variare nelle popolazioni migranti. Negli anni settanta i risultati di questi studi sono stati alla base dell'ipotesi di lavoro della Agenzia Internazionale per le Ricerche sul Cancro di Lione (IARC) secondo la quale tra il 70 e il 90% dei tumori umani è dovuto a fattori ambientali e pertanto prevenibili⁽¹⁾, indipendentemente dalla loro interazione con fattori genetici. Ipotesi confermata anche recentemente dagli studi di epidemiologia eziologica. La Tabella I modificata dalle fonti IARC^(2,3) evidenzia il contributo dell'epidemiologia alla conoscenza delle cause delle malattie, ma anche come con il passare del tempo i rischi associati alle esposizioni ai fattori cancerogeni siano sempre più piccoli, anche se diffusi spesso a livello di popolazione generale. In altre parole le cause di malattia che davano rischi molto elevati (rischi relativi (RR) di 10-15 per fumo di tabacco e tumore del polmone, ad esempio) sono stati identificati prima delle cause con rischi meno elevati (fumo attivo di tabacco e malattie cardiovascolari con RR da 1.5 a 2 e fumo passivo e tumore del polmone con RR intorno a 1.3).

Oggi l'ipotesi di lavoro degli epidemiologi è che le cause ambientali delle malattie croniche (inquinamento atmosferico, componenti della dieta, ad

Decennio	N° carcinogeni	RR
1970-1980	23	> 4
1981-1990	27	~ 2
1991-2000	24	~ 1.5
2001-2010	25	~ 1.3

Tabella I. Numero di agenti cancerogeni per l'uomo identificati per decennio e stima della media dei rischi relativi (RR).

esempio) siano attribuibili a fattori con RR modesti e che solo grandissimi studi di coorti seguite nel tempo o studi caso-controllo basati su serie di casi emergenti da larghissime popolazioni di più paesi o di più continenti possano aspirare ad identificarle. Questo ha comportato e comporterà sempre più il disegno di studi multicentrici, la loro confluenza in consorzi in cui tutti i ricercatori che hanno dati su una determinata esposizione li mettano in comune per analisi combinate (pooled). La necessità di studiare le interazioni geni-ambiente ed il recente sviluppo dell'epidemiologia molecolare, in cui tecniche molecolari sono applicate agli studi popolazione, ha portato ad associare a questi consorzi anche biologiche di grandi dimensioni su centinaia di migliaia di soggetti. Contemporaneamente lo sviluppo tecnologico dell'informatica permette oggi in tutti i paesi sviluppati l'utilizzo di grandi basi di dati demografici, di esposizione e di incidenza e mortalità da malattia che coprono ad esempio la popolazione europea, permettendo il collegamento tra le basi dati degli studi epidemiologici e le basi dati correnti. Lo sviluppo di sensori di monitoraggio individuale sia a livello di esposizioni nell'epidemiologia ambientale che, ad esempio, di parametri biochimici in tele-medicina aprono nuovi scenari negli studi di popolazione. Queste possibilità di utilizzo di dati da fonti diverse sono rilevanti in ogni campo dello studio della salute umana, ma particolarmente nel settore delle coorti di nuovi nati dove i soggetti sono seguiti dal periodo in utero in poi, secondo l'ipotesi di lavoro che le esposizioni precoci determineranno molto del carico di patologia o salute nel corso della vita. Le prospettive future dell'epidemiologia delle malattie croniche sono quindi numerose. Tra le molte abbiamo scelto in questa relazione di affrontare alcuni case-studies su nuovi studi sull'inquinamento atmosferico, sui fattori della dieta e sulle coorti di nuovi nati.

Studi epidemiologici sugli effetti dell'inquinamento atmosferico

L'esistenza di effetti avversi per la salute (in termini di mortalità e morbosità) legati all'esposizione ad inquinamento atmosferico è stata messa in evidenza a seguito degli episodi di grave inquinamento ambientale avvenuti negli anni '30-'50 del secolo scorso, quali ad esempio il "Big Smoke" di Londra del 1952.

La ricerca epidemiologica si è successivamente indirizzata alla valutazione degli effetti sulla salute di esposizioni ad inquinanti atmosferici a concentrazioni molto più basse. L'attenzione si è rivolta in particolare allo studio degli effetti acuti per la salute, conseguenti ad esposizioni di breve

periodo. Nella seconda metà degli anni Novanta sono stati avviati studi multicentrici di grandi dimensioni negli Stati Uniti (il progetto NMMAPS-National Morbidity, Mortality and Air Pollution Study)⁽⁴⁾ ed in Europa (il progetto APHEA-Air Pollution and Health: a European Approach)⁽⁵⁾, a cui ne sono seguiti numerosi altri in diversi Paesi. Lo studio multicentrico italiano più recente è rappresentato dal progetto EPIAIR-Inquinamento atmosferico e salute. Sorveglianza epidemiologica e interventi di prevenzione⁽⁶⁾, condotto in dieci città italiane (Milano, Mestre, Torino, Bologna, Firenze, Pisa, Roma, Taranto, Cagliari, Palermo). Gli studi epidemiologici disponibili evidenziano in maniera coerente una associazione tra incrementi sul breve periodo degli inquinanti atmosferici (in particolare delle polveri aerodisperse) ed effetti sanitari di diverso tipo (mortalità per cause naturali, ricoveri ospedalieri, ricorso a prestazioni sanitarie in emergenza).

Meno numerosi sono gli studi che hanno valutato gli effetti avversi per la salute conseguenti ad esposizioni di lungo periodo ad inquinanti atmosferici. Le evidenze disponibili su questo argomento derivano principalmente da studi condotti negli Stati Uniti, e molto si è dibattuto sulla loro applicabilità nel contesto europeo in relazione alle possibili differenze esistenti tra le due aree, comprese ad esempio le caratteristiche del traffico veicolare. Il progetto ESCAPE (European Study of Cohorts for Air Pollution Effects, ENV.2007.1.2.2.2.) è un progetto finanziato dall'Unione Europea nell'ambito del VII Programma Quadro, ed è stato specificamente disegnato per valutare gli effetti sulla salute (in termini di incidenza di patologie e di mortalità) dovuti ad esposizioni di lungo periodo agli inquinanti atmosferici in diversi paesi europei (Figura 1). Il progetto (www.escapeproject.eu) è coordinato dall'Università di Utrecht (Olanda) in collaborazione con diversi partner europei (per l'Italia, il Dipartimento di Epidemiologia della Regione Lazio). Numerosi enti nazionali e internazionali partecipano a diverso titolo alla realizzazione del progetto, tra cui il CPO Piemonte, l'AO Città della Salute e della Scienza di Torino, l'Università di Torino, l'ARPA Piemonte, l'ASL TO3 di Grugliasco (Torino), l'ARPA Emilia-Romagna.

Un aspetto innovativo del progetto ESCAPE è il metodo usato per la stima dell'esposizione all'inquinamento. A differenza della maggior parte degli studi precedenti, dove ad ogni soggetto veniva attribuita l'esposizione media della città di residenza, in ESCAPE è stato sviluppato un metodo più accurato per stimare l'esposizione dei singoli soggetti presso la loro residenza, attraverso l'uso di modelli matematici del tipo Land-Use Regression Models. L'attenzione è stata rivolta soprattutto all'inquinamento da polveri aerodisperse (PM10 e PM2,5, particolato con diametro aerodinamico rispettivamente

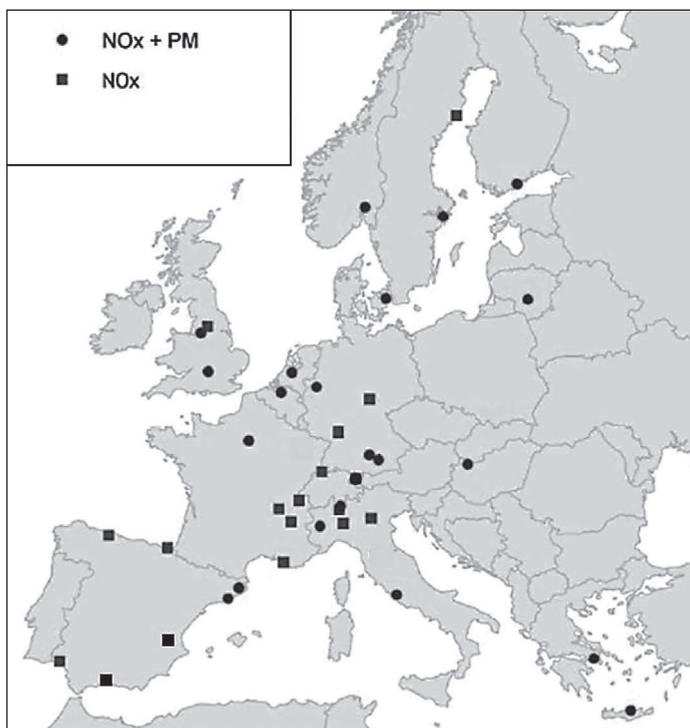


Figura 1. Aree europee in cui è stato condotto il progetto ESCAPE.

(modificata da: http://www.escapeproject.eu/rsc/pdf/news/ESCAPE_newsletter-01.pdf).

inferiore a 10 e 2,5 micron), che a livello urbano derivano principalmente dal traffico veicolare, dagli impianti di riscaldamento e dalle attività industriali, e da ossidi di azoto (NO_x).

I primi risultati dello studio recentemente pubblicati⁽⁷⁾ derivano dall'analisi di 312,944 soggetti residenti in nove paesi europei, inclusi in 17 coorti. In Italia sono state coinvolte oltre 12,000 residenti a Torino, 9.100 residenti a Roma e 9.500 residenti a Varese. L'associazione tra l'esposizione di lungo periodo ad inquinanti e l'insorgenza di tumore del polmone (dopo un follow-up medio di 13 anni) è stata stimata, per ciascuna coorte, al netto di possibili fattori di confondimento quali l'abitudine al fumo di tabacco, lo stato socio-economico e l'occupazione, utilizzando un protocollo standardizzato per la conduzione delle analisi statistiche. I risultati ottenuti in ciascuna coorte sono stati successivamente sintetizzati tramite una procedura di meta-analisi.

Confermando i risultati dei due principali studi di coorte condotti negli Stati Uniti, lo studio ha evidenziato un'associazione significativa tra esposizione a

polveri e insorgenza di tumore al polmone: per ogni aumento nell'esposizione di $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ di PM10 il rischio di sviluppare un tumore al polmone aumenta significativamente del 22%, mentre per ogni incremento di $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ di PM2.5 il rischio aumenta del 18% (con una stima al limite della significatività statistica). Questi effetti sono più forti per un tipo particolare di tumore (l'adenocarcinoma) che è il solo tipo di tumore polmonare che si sviluppa anche in un numero sostanziale di non fumatori, e nei soggetti che non hanno cambiato la residenza nel corso del periodo di follow-up. Come già osservato in precedenti indagini, l'associazione sembra essere di tipo lineare e senza soglia.

Il progetto ESCAPE prevede la valutazione dell'associazione tra esposizioni di lungo periodo agli inquinanti atmosferici e numerosi altri potenziali effetti avversi sulla salute, tra i quali la mortalità generale e causa-specifica, l'insorgenza di patologie respiratorie e cardiovascolari, ed anche potenziali effetti avversi nella prima infanzia (ad esempio basso peso alla nascita, alterazioni dello sviluppo cognitivo e motorio, insorgenza di asma e allergie, alterazioni della funzionalità respiratoria) grazie all'inclusione nel progetto di coorti di nuovi nati. Le analisi su questi aspetti sono attualmente in corso, ed i risultati saranno disponibili in letteratura nei prossimi mesi.

I risultati del progetto ESCAPE, così come l'estesa revisione di letteratura sugli effetti dell'inquinamento atmosferico appena pubblicata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità⁽⁸⁾, forniscono importanti elementi di conoscenza, rilevanti per supportare politiche finalizzate al miglioramento della qualità dell'aria.

Studi in epidemiologia nutrizionale

In Europa ogni anno si diagnosticano circa 3,2 milioni di nuovi casi di tumori maligni che portano a morte 1,7 milioni di malati⁽⁹⁾. La grande maggioranza di questi, anche se in una rete causale di interazione geni-ambiente, è dovuto a fattori legati a stile di vita (tra cui fumo, dieta, alcol, sedentarietà, obesità e esposizione al sole), infezioni e inquinanti ambientali aprendo la strada a grandi opportunità per la prevenzione⁽¹⁰⁾.

Tra i fattori legati allo stile di vita, è ampiamente accettato il fatto che l'alimentazione e i fattori associati ad essa, quali l'attività fisica, abbiano un ruolo importante nella comparsa del cancro, tali da rappresentare forse le cause principali dopo il fumo. Tuttavia, a dispetto di decenni di indagini epidemiologiche, le prove scientifiche della relazione tra diverse sedi tumorali e alcuni alimenti e nutrienti sono ancora insufficienti o incoerenti, tali da

rendere difficile l'elaborazione di solide e robuste conclusioni. A tale scopo, lo studio Europeo sul Cancro e l'Alimentazione (EPIC) (<http://epic.iarc.fr/>) è stato specificamente disegnato per indagare la relazione tra dieta e malattie croniche.

EPIC è uno studio prospettico multicentrico volto a indagare le relazioni tra dieta, stile di vita, fattori genetici e ambientali e incidenza di tumori e malattie croniche a cui hanno partecipato 23 centri in 10 paesi europei: Danimarca, Francia, Germania, Grecia, Italia, Olanda, Norvegia, Spagna, Svezia e Regno Unito. Lo studio EPIC ha raccolto dati e campioni biologici di 519.978 partecipanti (366.521 donne e 153.457 uomini), di età compresa tra 35 e i 65 anni, reclutati tra il 1992 e il 1998, tra la popolazione generale residente nelle aree geografiche di interesse. Fra i cinque centri Italiani, Torino partecipa allo studio EPIC con una coorte di più di 10.000 volontari (Figura 2).

In tutta la popolazione dello studio sono effettuati follow up periodici atti ad identificare lo stato in vita dei partecipanti e i nuovi casi incidenti di tumore (più di 50.000 casi finora riscontrati).

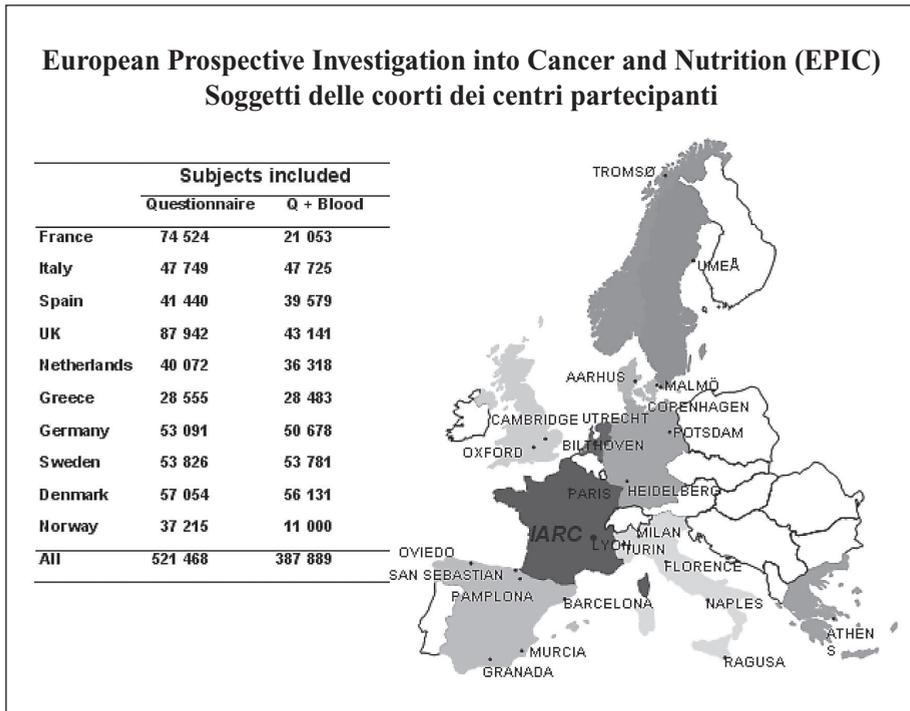


Figura 2. Centri partecipanti a EPIC.

Fra i risultati che sono emersi dallo studio EPIC vi sono l'associazione inversa fra il rischio di cancro gastrico ed elevati livelli di vitamina C, carotenoidi e retinolo plasmatici, e fra un elevato apporto di fibre alimentari e il tumore del colon. Inoltre l'adesione alla dieta mediterranea è protettiva per diverse sedi tumorali, in particolare del tratto digerente. Un elevato consumo di frutta e verdura da parte dei fumatori è stato associato ad un ridotto rischio di cancro al polmone, anche se l'effetto dannoso del fumo è di gran lunga maggiore del modesto effetto protettivo dell'alimentazione. Un aumento del rischio di tumore al seno è stato associato ad un'elevata assunzione di grassi saturi e ad un elevato consumo di alcol. Nelle donne in post-menopausa, l'indice di massa corporea è stato associato ad un aumentato rischio di tumore al seno, mentre l'attività fisica è stata associata ad un rischio ridotto. Infine un elevato consumo di proteine del latte e di calcio da prodotti lattiero-caseari e un'elevata concentrazione nel siero di IGF-1 sono stati associati ad un aumentato rischio di cancro alla prostata. Questi risultati forniscono ulteriori prove scientifiche per l'adozione di appropriate strategie di salute pubblica e di prevenzione volte a ridurre il carico complessivo del cancro nella popolazione⁽¹⁾.

In combinazione con i dati di altri studi prospettici, lo studio EPIC contribuisce alla formulazione su basi scientifiche di adeguate politiche di sanità pubblica e di strategie volte a ridurre il carico globale del cancro nella popolazione. Infatti sempre più studi epidemiologici come EPIC si organizzano in consorzi per effettuare analisi dati in collaborazione e presentare insieme domande di finanziamento.

I consorzi di studi epidemiologici sono gruppi di studiosi, provenienti da istituti di ricerca diversi, che cooperano e uniscono gli sforzi per studiare patologie o esposizioni poco comuni e raggiungere una numerosità campionaria sufficiente ad avere dei risultati stabili. Inoltre la collaborazione di un gruppo di esperti su un determinato argomento, aumenta di molto le probabilità di ricevere finanziamenti alle ricerche e la possibilità di pubblicare in maniera tempestiva e completa i risultati dello studio (Tabella II).

Lo studio EPIC così come molti studi di coorte disegnati negli ultimi 20 anni ha previsto la raccolta di campioni biologici, che sono archiviati in una banca biologica. Le banche biologiche sono strutture adibite alla raccolta ed archiviazione di campioni biologici inclusi in studi clinici, in progetti di ricerca o per i quali la conservazione è un obbligo di legge. Queste strutture possono conservare campioni biologici di varia natura, quali siero, plasma, urine, liquor, cellule e tessuti in condizioni di preservazione delle caratteristiche biomolecolari al fine di poterli analizzare in tempi successivi alla loro raccolta. Gli studi epidemiologici raccolgono in genere campioni di sangue, conservati

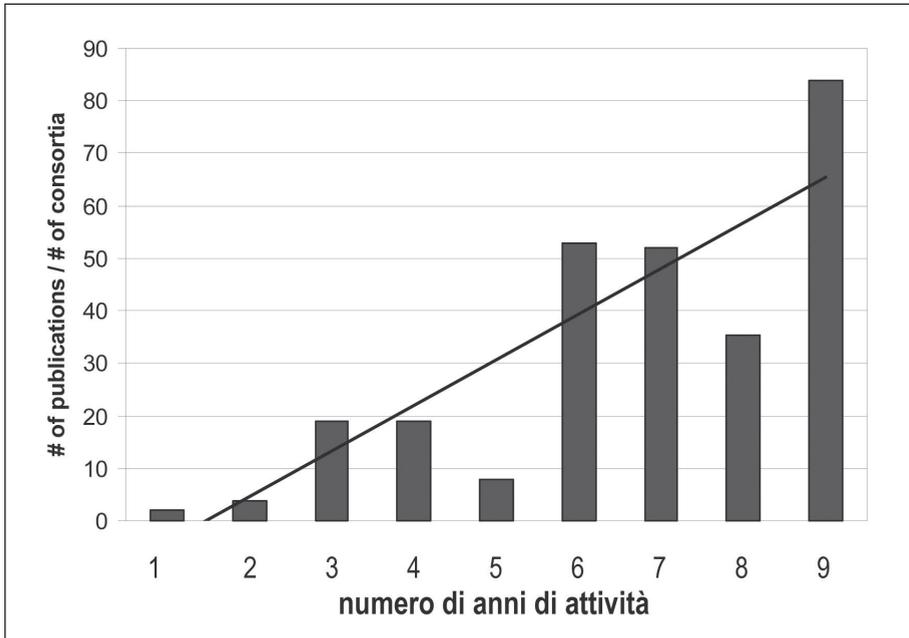


Tabella II. Rapporto tra il numero di pubblicazioni e gli anni di attività dei consorzi di epidemiologia genetica di specifiche sedi di tumore, 1995 - 2010.

in aliquote o DNA già estratto da sangue o cellule buccali. La conservazione in sistemi criogenici (in genere azoto liquido a -180°) da un lato assicura ottimali condizioni di stabilità per i campioni biologici, e dall'altro rende di facile identificazione i campioni archiviati, attraverso sistemi di mappatura gestiti tramite database, il tutto appositamente progettato per applicazioni specifiche. L'uso delle banche di campioni biologici ha proliferato negli ultimi anni di ricerca epidemiologica, in virtù dello sviluppo di tecniche di laboratorio che permettono lo studio di biomarcatori genetici su grandi popolazioni con tempi e costi ridotti. L'organizzazione di una banca biologica permette di verificare delle nuove ipotesi di studio che non erano state pianificate al momento del disegno dello studio stesso e del reclutamento dei pazienti, in quanto emerse da ricerche più recenti o rese possibili da avanzamenti tecnologici.

Life-course epidemiology

L'idea che esposizioni che agiscono precocemente nella vita possano avere un effetto a lungo termine sulla salute non è nuova in medicina⁽¹²⁾. Solo in

anni relativamente più recenti, a cominciare dalla metà degli anni ottanta e soprattutto dagli anni novanta in poi, questa idea ha però dato origine a molti studi epidemiologici che hanno cercato di individuare a livello empirico e di popolazione un link tra esposizioni precoci e malattie croniche dell'adulto. Si parla della cosiddetta ipotesi di Barker (o fetal programming) secondo cui alterazioni della nutrizione fetale e del suo stato endocrino causano risposte adattive del feto che danno origine ad alterazioni permanenti della fisiologia e del metabolismo della persona. Questi cambiamenti predispongono poi all'insorgenza di malattie metaboliche, cardiovascolari ed endocrine in età adulta⁽¹³⁾. David Barker, per i suoi studi che già negli anni ottanta mettevano in luce un'associazione tra basso peso alla nascita e mortalità cardiovascolare negli uomini e nelle donne, è stato insignito del Richard Doll Price per l'epidemiologia nel 2011. Una sorta di evoluzione della teoria di Barker è la cosiddetta Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD), che più in generale sostiene che l'insorgenza di diverse malattie croniche in età adulta è influenzata da fattori ambientali che agiscono precocemente nella vita (non necessariamente solo nella vita fetale)⁽¹⁴⁾. L'approccio epidemiologico a questi aspetti si riassume nella life-course epidemiology, che cerca di valutare gli effetti individuali e congiunti di esposizioni che si accumulano nel corso della vita per causare malattie croniche in età adulta.

Nel corso degli anni si sono accumulate numerose prove degli effetti sulla salute delle esposizioni precoci. L'osservazione di Barker, basata su dati inglesi, di un'associazione tra basso peso alla nascita o nascita pre-termine con l'incidenza di malattie cardiovascolari ed il diabete in età adulta è stata replicata in diverse popolazioni, come nei paesi nordici utilizzando grandi basi dati di popolazione. Molti studi hanno trovato un'associazione tra caratteristiche pre-natali e insorgenza di tumore in età adulta. Nel 1990, uno dei primi studi condotti su questo tema e pubblicato su Lancet si intitolava "Hypothesis: does breast cancer originate in utero?"⁽¹⁵⁾. Una meta-analisi di numerosi studi, pubblicata nel 2008, stimava un aumento di rischio di tumore del seno del 6% per ogni aumento di mezzo chilo di peso alla nascita. Su questi rischi ovviamente, si vanno poi ad inserire molti altri fattori che agiscono nel corso della vita; per il tumore del seno, ad esempio, l'età al menarca, il numero di figli, la durata dell'allattamento al seno, l'età alla menopausa, ecc. La salute respiratoria del bambino e dell'adulto è stata associata ad esposizioni che agiscono precocemente: il rischio di asma, ad esempio, è aumentato in persone la cui madre ha avuto complicanze in gravidanza, come pre-eclampsia o diabete, o è diminuito in persone che hanno frequentato il nido nel corso dei primi due anni di vita. Oppure, facendo ancora un esempio,

lo sviluppo cognitivo del bambino è stato associato all'esposizione a mercurio assunto dalla mamma in gravidanza attraverso la dieta.

L'ipotesi di un'origine precoce delle malattie è di forte interesse sia in termini della comprensione dei meccanismi patogenetici sia in termini di prevenzione: a quale età e su quali esposizioni è più conveniente e più equo agire se le malattie originano dall'accumulo di esposizioni nel corso della vita? È chiaro che per rispondere a domande di questo tipo e per studiare l'effetto di esposizioni che si sono verificate decine di anni prima dell'insorgenza della malattia bisogna ideare studi epidemiologici complessi e non distorti, che siano all'altezza del compito. In tutta Europa, a cominciare dagli anni novanta, si è iniziato a condurre studi di coorte di nuovi nati in cui, attraverso le mamme, i bambini vengono reclutati nello studio alla nascita o già durante la vita fetale. Dopo il reclutamento si continua a seguire i bambini nel tempo con diversi questionari su numerosi esposizioni e outcome. Solitamente, viene anche costituita una banca biologica in cui sono raccolti campioni di sangue materno, possibilmente campioni di sangue cordonale e altri campioni che possono essere utili per la determinazione di esposizioni specifiche (ad esempio il cortisolo in campioni di capello oppure i metalli pesanti in campioni di unghia). Possibilmente si ottengono informazioni anche su esposizioni ambientali attraverso metodi complessi, come la modellistica utilizzata per determinare i livelli individuali di esposizione a inquinamento atmosferico o il prelievo di campioni di polvere indoor. Questi studi diventano informativi solo quando il campione di persone coinvolte è sufficientemente grande.

Si capisce quindi la complessità in termini organizzativi, di tempo e di costi che comportano le coorti di nuovi nati. Ciononostante, in Europa negli ultimi venti anni è stato possibile iniziare più di 70 studi di questo tipo, almeno stando ai dati di un recente inventario di studi di coorti di nuovi nati (www.birthcohorts.net), aggiornato attraverso il progetto di coordinamento europeo CHICOS (Developing a Child Cohort Strategy for Europe, www.chicosproject.eu) a cui partecipa l'Università di Torino. Gli studi sono tra di loro molto diversi, alcuni hanno reclutato circa 1.000 bambini, mentre altri coinvolgono molte migliaia di persone⁽¹⁶⁾. I due studi di più ampie dimensioni in Europa sono lo studio DNBC (Danish National Birth Cohort) con più di 90.000 bambini reclutati in Danimarca e lo studio MoBa (Norwegian Mother and Child Birth Cohort) con più di 100.000 bambini reclutati in Norvegia. Queste dimensioni sono però un'eccezione e la maggior parte degli studi include tra i 1.000 ed i 10.000 bambini.

Anche in Italia esistono alcune coorti di nuovi nati. Nel 2005, all'Università di Torino, abbiamo iniziato lo studio NINFEA (Nascita ed Infanzia: gli Effetti

dell'Ambiente), che utilizza internet per reclutare in Italia le donne durante la gravidanza e seguire i loro bambini nel tempo con questionari ripetuti⁽¹⁷⁾. Le mamme possono registrarsi sul sito www.progettoninfea.it dello studio in qualsiasi momento durante la gravidanza compilando un primo questionario on-line. Sono poi ricontattate per compilare ulteriori questionari on-line 6 mesi, 18 mesi, 4 anni e 7 anni dopo la nascita del bambino (ulteriori questionari saranno preparati in futuro con l'invecchiamento della coorte). Inoltre otteniamo campioni di saliva (da cui estrarre il DNA) sia dalle mamme che dai bambini. Al momento hanno partecipato allo studio più di 6.000 mamme in gravidanza. Un secondo studio importante a livello italiano è la coorte Piccolipiù (www.piccolipiu.it) che sta reclutando 3.000 bambini in diverse città italiane, tra cui Torino, in cui sono stati coinvolti 500 bambini tra il 2011 ed il 2012. Anche questo studio prevede un questionario al momento del reclutamento e ci sono ulteriori questionari con cadenze periodiche di 6 mesi o 1-2 anni. Al momento della nascita è stato raccolto un campione di sangue dalla mamma e di sangue cordonale che sono mantenuti a -80 °C presso una banca biologica all'Istituto Superiore di Sanità. La Tabella III

Coorte ^{&}	Popolazione coperta	Periodo di reclutamento	Momento del reclutamento	Dimensione
GASPII	Roma	2003-2004	Nascita	708 bambini
CoNER	Bologna	2004-2005	Nascita	654 bambini
NINFEA	Italia, utilizzatori di internet	2005+	Gravidanza	7.500 donne in gravidanza*
Trieste cohort	Trieste	2007-2009	Gravidanza	900 bambini
MUBICOS	Gemelli in 8 punti nascita in Italia	2009+	Nascita	1.000 bambini
Piccolipiù	6 punti nascita in Italia	2011+	Nascita	3.000 bambini*

[&] GASPII, Genetica e Ambiente: Studio Prospettico dell'Infanzia in Italia; CoNER, Coorte di Neonati in Emilia Romagna; NINFEA, Nascita ed Infanzia: gli Effetti dell'Ambiente; MUBICOS, Multiple Births Cohort Study.
^{*} Numerosità attesa, il reclutamento è ancora in corso.

Tabella III. Coorti italiane di nuovi nati in Italia.

riassume gli studi di coorte di nuovi nati esistenti in Italia e registrati presso l'inventario europeo birthcohorts.net

Il futuro va verso il coordinamento di queste enormi risorse per la ricerca sia a livello italiano che a livello europeo per poter replicare velocemente i risultati in popolazioni diverse, per poter rispondere velocemente a quesiti di interesse per i decisori politici e per poter studiare malattie meno frequenti ed esposizioni rare. In questa direzione ci si è già mossi in Gran Bretagna in cui il progetto CLOSER (Cohort & Longitudinal Studies Enhancement Resources, www.closerprogramme.co.uk) appena finanziato vuole mettere insieme i dati di nove coorti inglesi di nuovi nati. Analogamente, nell'ambito del progetto europeo CHICOS si stanno conducendo analisi congiunte di molte coorti europee su temi specifici, come l'effetto dell'alcool a basse dosi assunto durante la gravidanza, l'effetto del consumo di pesce in gravidanza sugli esiti riproduttivi, l'effetto sul peso alla nascita e durata gestazionale di esposizioni occupazionali in gravidanza e l'effetto di complicanze in gravidanza e del peso pre-gravidanza sul rischio di asma nel bambino. I risultati di questi studi saranno disponibili in letteratura presumibilmente dall'inizio del 2014.

Ringraziamenti

Parzialmente finanziato dalla Compagnia di San Paolo, ESCAPE ENV 2007 FP7, CHICOS HEALTH 2009 FP7. Grazie a Emanuela Ciliberto per utili commenti.

BIBLIOGRAFIA

1. Doll R, Peto R. *The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today*. J Natl Cancer Inst. 1981; 66: 1191-1308.
2. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol 100. *A Review of Human Carcinogens*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2011. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/PDFs/index.php>.
3. Cogliano VJ, Baan R, Straif K, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Wild CP. *Preventable exposures associated with human cancers*. J Natl Cancer Inst. 2011; 103: 1827-1839.
4. Samet JM, Dominici F, Curriero FC, Coursac I, Zeger SLN. *Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987-1994*. Engl J Med. 2000; 343: 1742-1749.
5. Katsouyanni K, Zmirou D, Spix C, Sunyer J, Schouten JP, Pönkä A, Anderson HR, Le Moulec Y, Wojtyniak B, Vigotti MA et al. *Short-term effects of air pollution on health: a European approach using epidemiological time-series data. The APHEA project: background, objectives, design*. Eur Respir J. 1995; 8: 1030-1038.
6. Berti G, Galassi C, Faustini A, Forastiere F. *EPIAIR. Inquinamento atmosferico e salute. Sorveglianza epidemiologica e interventi di prevenzione*. Epidemiol Prev. 2009; 33 (Suppl 1).
7. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, Samoli E, Stafoggia M, Weinmayr G, Hoffmann B, Fischer P, Nieuwenhuijsen MJ, Brunekreef B, Xun WW, Katsouyanni K, Dimakopoulou K, Sommar J, Forsberg B, Modig L, Oudin A, Oftedal B, Schwarze PE, Nafstad P, De Faire U, Pedersen NL, Ostenson CG, Fratiglioni L, Penell J, Korek M, Pershagen G, Eriksen KT, Sørensen M, Tjønneland A, Ellermann T, Eeftens M, Peeters PH, Meliefste K, Wang M, Bueno-de-Mesquita B, Key TJ, de Hoogh K, Concin H, Nagel G, Vilier A, Grioni S, Krogh V, Tsai MY, Ricceri F, Sacerdote C, Galassi C, Migliore E, Ranzi A, Cesaroni G, Badaloni C, Forastiere F, Tamayo I, Amiano P, Dorronsoro M, Trichopoulou A, Bamia C, Vineis P, Hoek G. *Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE)*. Lancet Oncol. 2013; 14: 813-822.
8. WHO. *Review of evidence on health aspects of air pollution – REVIHAAP Project: Final technical report*. WHO/Europe, 2013. <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/environment-and-health/air-quality/publications/2013/review-of-evidence-on-health-aspects-of-air-pollution-revihaap-project-final-technical-report>. Ultimo accesso 26 agosto 2013.
9. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. *Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008*. Eur J Cancer. 2010; 46: 765-781.
10. Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB. *Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes*. Pharm Res. 2008; 25: 2097-2116.
11. Gonzalez CA, Riboli E. *Diet and cancer prevention: Contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study*. Eur J Cancer. 2010; 46: 2555-2562.
12. Dubos R, Savage D, Schaedler R. *Biological Freudianism. Lasting effects of early environmental influences*. Pediatrics. 1966; 38: 789-800.
13. Godfrey KM, Barker DJ. *Fetal nutrition and adult disease*. Am J Clin Nutr. 2000; 71 (Suppl): 1344S-1352S.

14. Gluckman PD, Hanson MA. *Living with the past: evolution, development, and patterns of disease*. Science. 2004; 305: 1733-1736.
15. Trichopoulos D. *Hypothesis: does breast cancer originate in utero?* Lancet. 1990; 335: 939-940.
16. Larsen PS, Kamper-Jørgensen M, Adamson A, Barros H, Bonde JP, Brescianini S, Brophy S, Casas M, Devereux G, Eggesbø M, Fantini MP, Frey U, Gehring U, Grazuleviciene R, Henriksen TB, Hertz-Picciotto I, Heude B, Hryhorczuk DO, Inskip H, Jaddoe VW, Lawlor DA, Ludvigsson J, Kelleher C, Kiess W, Koletzko B, Kuehni CE, Kull I, Kyhl HB, Magnus P, Momas I, Murray D, Pekkanen J, Polanska K, Porta D, Poulsen G, Richiardi L, Roeleveld N, Skovgaard AM, Sram RJ, Strandberg-Larsen K, Thijs C, Van Eijsden M, Wright J, Vrijheid M, Andersen AM. *Pregnancy and birth cohort resources in europe: a large opportunity for aetiological child health research*. Paediatr Perinat Epidemiol. 2013; 27: 393-414.
17. Richiardi L, Baussano I, Vizzini L, Douwes J, Pearce N, Merletti F, NINFEA cohort. *Feasibility of recruiting a birth cohort through the Internet: the experience of the NINFEA cohort*. Eur J Epidemiol. 2007; 22: 831-837.

THE MOLECULAR BASES OF MULTIDRUG RESISTANCE (MDR)

*Chiara Riganti, Elisabetta Aldieri, Sophie Doublier, Joanna Kopecka,
Ivana Campia, Martha Leonor Pinzòn-Daza, Giada Gelsomino,
Manuela Polimeni, Carolina Dimas Belisario, Dario Ghigo*

Department of Oncology - University of Turin - Italy

Parole chiave: *Resistenza multifarmaco*
Chemioterapia

Key words: *Multidrug resistance*
Chemotherapy

Riassunto

Un grosso limite all'efficacia della chemioterapia è lo sviluppo della resistenza multifarmaco, un complesso insieme di strategie adottate dalla cellula tumorale per superare gli effetti tossici dei chemioterapici. Uno dei modi più utilizzati è l'aumento di attività e/o espressione di una famiglia di proteine, i cosiddetti trasportatori ABC, in grado di facilitare, sfruttando l'energia della cellula, l'efflusso di molti farmaci verso l'esterno: nel caso di farmaci antitumorali questo significa una minore capacità di uccidere le cellule bersaglio. Le principali proteine di questa famiglia sono la glicoproteina P (Pgp, MDR1), la multidrug-resistance protein 1 (MRP1) e la breast cancer-resistance protein (BCRP), alle quali nuovi membri si stanno ora aggiungendo come responsabili della farmaco-resistenza. Questa osservazione ha stimolato i ricercatori a trovare farmaci in grado di inibire i trasportatori ABC, al fine di migliorare l'efficacia dei chemioterapici, ma dopo circa 35 anni di studio nessun risultato efficace è stato ancora ottenuto. Un nuovo approccio consiste ora nell'uccidere di preferenza le cellule resistenti rispetto a quelle sensibili, traendo vantaggio dalla conoscenza delle diverse caratteristiche metaboliche che distinguono i due gruppi cellulari, e in cui i trasportatori ABC hanno un ruolo importante. Esponiamo qui brevemente le principali linee di ricerca che stiamo seguendo per ottenere risultati efficaci nella resistenza multifarmaco con questo nuovo approccio.

Abstract

A great restraint to the efficacy of chemotherapy is the development of multidrug resistance, a complex array of strategies adopted by the tumor cell to overcome the toxic effects of anti-neoplastic drugs. One of the most used ways is to increase the activity and/or expression of the so-called ATP-binding cassette (ABC) transporters, a family of energy-dependent proteins able to facilitate the efflux of many drugs from the target cell to the outside: in the case of anti-tumor drugs, this means a minor capacity to kill cancer cells. The main proteins of this family are P-glycoprotein (Pgp, MDR1), multidrug-resistance protein 1 (MRP1, ABCC1) and breast cancer-resistance protein (BCRP), to which other members are now being added as responsible for drug resistance. This has stimulated researchers to find drugs able to inhibit these transporters, in order to improve the efficacy of anti-neoplastic drugs, but after 35 years no effective result has been obtained in this field. A new approach is now addressing at killing preferentially resistant tumor cells versus sensitive ones, taking advantage from the knowledge of the different metabolic features between the two cell groups, including the different behavior of ABC transporters. We are briefly exposing here the main lines of research we are following to obtain effective results in the treatment of multidrug resistance with this new approach.

Introduction.

Patients having cancer that does not respond to local excision or radiation and patients with hematological malignancies are treated with chemotherapy, which is also the primary approach in the treatment of metastatic cancer⁽¹⁾. Why can some patients be cured by these approaches and others respond transiently or incompletely?

The neoplastic cells need to constantly readapt to different stimulations to preserve cells survival and tumor homeostasis in unfavorable conditions. To overcome the toxic effects of curative compounds, cancer cells continuously implement and strengthen normal physiological functions or mature *de novo* mechanisms of resistance against single selected compounds or multiple agents, often apparently unrelated⁽²⁾.

Chemoresistance is often a multifactorial process involving different processes, which are acquired in response to a selection pressure by the drug treatment (acquired resistance) or expressed by cells already resistant and that will never respond to the drug treatment (intrinsic resistance)⁽³⁾.

In general, cancer cells initially respond to chemotherapy. Unfortunately, a large number of patients will develop drug resistance during the treatment and will no longer be responsive to multiple anticancer drugs that are functionally and structurally unrelated, a phenomenon called “multidrug resistance” or MDR⁽⁴⁾. The incidence of MDR depends on the tumor type, treatment status and other factors. Drug resistance to chemotherapeutic agents accounts for treatment failure in more than 90% of patients with metastatic cancer, representing one of the major obstacles to the successful treatment of tumors⁽⁵⁾.

Mechanisms of cancer drug resistance

Failure of a patient’s cancer to respond to a specific therapy can result from one of two general causes: host factors (that impair delivery of anticancer drugs to tumor cells) and specific genetic or epigenetic alterations in the cancer cells (that affect drug sensitivity)^(1,6).

Drugs in the host are subject to variations in absorption, delivery and metabolism. These variations can be specific to individual patients and result in low serum levels of drugs. Tumors can be located in parts of the body into which drugs do not easily penetrate, or could be protected by local environments due to bulky tumors, increased tissue hydrostatic pressure or altered tumor vasculature^(1,6,7,8). Poor nutrient delivery, hypoxia and acidity are also hallmarks of tissue not proximal to vasculature. These characteristics may select for a slow-growing, drug-resistant cellular phenotype⁽⁸⁾. Once the anticancer drug

reaches the tumor cell, other mechanisms can be found. Normal cells are all alike in their response to drugs, but cancer cells each respond in their own way. Cells within a cancer, even though clonally derived, exhibit an enormous amount of heterogeneity with respect to drug resistance⁽⁶⁾.

Many mechanisms are presumed to be responsible for the MDR phenotype of a cell. These mechanisms can be divided into two groups: those that reduce intracellular drug accumulation and those that reduce the consequences of intracellular drug accumulation⁽⁹⁾.

Under another point of view, there are three major mechanisms of drug resistance in cells^(2,6,7):

- 1) decreased uptake of water-soluble drugs such as folate antagonists, nucleoside analogues and cisplatin, which require transporters to enter cells;
- 2) various changes in cells that affect the capacity of cytotoxic drugs to kill cells, including alterations in cell cycle, increased repair of DNA damage, reduced apoptosis, increased detoxification of drugs, alteration by mutation or altered expression of the specific target of a drug, compartmentalization;
- 3) increased energy-dependent efflux of hydrophobic drugs that can easily enter the cells by diffusion through the plasma membrane.

Some of these mechanisms result in resistance to only a small number of related drugs. In such cases, use of multiple drugs with different mechanisms of entry into cells and different cellular targets allows for effective chemotherapy and high cure rates.

MDR is a generic term for a variety of strategies that tumor cells develop to evade the cytotoxic effects of anticancer drugs. Tumor cells become resistant simultaneously to different drugs, structurally and functionally unrelated, even when exposed to a single chemotherapeutic drug⁽¹⁰⁾.

Optimizing drug efficacy and minimizing drug toxicity requires that the drug reaches its target at adequate concentration, without excessive accumulation in other tissues. For many drugs in clinical use today, intracellular concentration is determined by the balance in activity of multiple uptake and efflux transporters that facilitate the drugs' movement across biological membranes⁽¹¹⁾.

ABC transporters and their physiological and pathological roles

An energy-dependent drug transport system is perhaps the most efficient and common cause for acquired resistance, i.e. the increased efflux of a broad

class of hydrophobic cytotoxic drugs mediated by members of a family of energy-dependent transporters, known as ATP-binding cassette (ABC) transporters^(4,7,12).

ABC transporters are ubiquitous membrane-bound pumps in prokaryotes and eukaryotes, which can move substrates in or out of cells. They transport a number of endogenous substrates, including inorganic anions, metal ions, peptides, amino acids, lipids, sugars, a large number of hydrophobic compounds and metabolites across plasma membrane and intracellular membranes⁽¹³⁾. They are important determinants of the tissue distribution and elimination of many clinically relevant drugs⁽¹⁴⁾. Many endogenous or xenobiotic lipophilic substances are eliminated from the cells by the sequence of oxidation, conjugation to an anionic group (glutathione, glucuronate or sulfate) and transport across the plasma membrane into the extracellular space⁽¹⁵⁾.

So far, 48 human ABC genes have been identified in the human and divided into seven distinct subfamilies (ABCA–ABCG) on the basis of their sequence homology and domain organization⁽¹⁾. Several ABC genes mutations are known to cause severe inherited diseases⁽¹³⁾, such as Dubin-Johnson syndrome or cystic fibrosis^(4,13). Three mammalian ABC proteins, P-glycoprotein (Pgp, MDR1, ABCB1), multidrug-resistance protein 1 (MRP1, ABCC1) and breast cancer-resistance protein (BCRP, ABCG2), were originally discovered because of their ability to confer resistance to anti-neoplastic agents in tumor cells, lowering intracellular concentrations of drugs to below therapeutic levels^(14,16). At least 15 ABC drug transporters can transport and confer resistance to practically the entire spectrum of cancer drugs, but Pgp, MRP1 and BCRP seem to account for most of the MDR tumor cells^(4,17). The 50% of human cancers express Pgp at detectable levels, and some evidence exists that MRP1 and BCRP expression in several tumors leads to decreased response to chemotherapy⁽¹⁶⁾. ABC transporters are membrane proteins consisting of both transmembrane domains (TMDs), which form substrate-binding pockets, and distinctive nucleotide-binding domains (NBDs), which generate energy from ATP hydrolysis to actively transport a variety of compounds across biological membranes^(4,18).

The pivotal role of ABC transporters in host detoxification and protection of the body against xenobiotics is revealed by their tissue distribution. ABC proteins are highly expressed in important pharmacological barriers, such as the brush border membrane of intestinal cells, the biliary canalicular membrane of hepatocytes, the luminal membrane in proximal tubules of the kidney⁽⁷⁾. Whereas ABC transporters are expressed in the brain, testis and placenta to protect these “sanctuaries” from cytotoxins, the liver, gastrointestinal tract

and kidney use them to excrete toxins, protecting the entire organism⁽¹⁾. They can be found also in many other cell types⁽¹⁹⁾.

Pgp and MDR

Pgp plays a significant role in clinical drug resistance^(1,6) and cells transfected with Pgp are less sensitive to chemotherapeutic drugs⁽¹⁰⁾. Pgp can detect and bind a large variety of hydrophobic drugs that are neutral or positively charged. Because of this binding promiscuity, many different drugs are substrates for this transport system^(1,6) (Table 1). Pgp is now accepted as a factor limiting oral bioavailability of anticancer drugs and affects therapeutic outcome in patients, prevents drug penetration through the blood-brain barrier and potentially affects chemotherapy of patients with either epilepsy or Alzheimer's disease⁽⁴⁾. Gene amplification has long been recognized as a major contributor to the increased expression of Pgp⁽³⁾, which can be induced by drug exposure⁽¹⁾.

MRPs and MDR

A large number of molecules are transported across the plasma membrane by the MRPs, widely expressed in many human tissues and cancers. Many are organic anions derived from exogenous sources such as conjugated neutral drug metabolites including anthracyclines, vinca alkaloids, and antivirals⁽¹⁴⁾. Endogenous substrates of MRP1 include glutathione, leukotrienes, ceramide, sphingolipids, bile salts, prostaglandins⁽¹¹⁾. MRP1 shares many, but not all, substrates with Pgp. Cells transfected with MRP1 are resistant to doxorubicin, daunorubicin, epirubicin, etoposide, actinomycin D, vincristine, vinblastine, irinotecan. The simultaneous activity of the two proteins, rather than the separate expression of either one, seems to be the decisive factor in MDR⁽²⁰⁾.

BCRP and MDR

Some anticancer drugs, such as mitoxantrone, are poor substrates for Pgp and MRP1, but are good substrates for BCRP, also known as MXR (mitoxantrone resistance protein), or ABC-P (ABC transporter in placenta)⁽¹⁾. Substrates of BCRP include statins, antibiotics, numerous environmental toxins, and endogenous substrates such as sulfate- and glucuronide-conjugated steroid hormones, folates, uric acid and porphyrins^(4,11,21). Many anticancer agents are BCRP substrates: etoposide, topotecan, irinotecan, imatinib, gefitinib, docetaxel, paclitaxel, saquinavir, mitoxantrone, methotrexate, anthracyclines^(4,11). The partial overlap in substrate specificity between BCRP and Pgp can lead to a synergistic effect in MDR⁽²²⁾.

Class	Compound
Anti-cancer drugs	Anthracyclines: doxorubicin, daunorubicin, epirubicin, idarubicin Camptothecins: topotecan Epipodophyllotoxins: etoposide, teniposide Taxanes: paclitaxel, docetaxel Vinca alkaloids: vinblastine, vincristine, vinorelbine, vindesine
Tyrosine kinase inhibitors	Imatinib mesylate Gefitinib
Natural products	Flavonoids Curcuminoids Colchicine Actinomycin D
Fluorescent dyes	Rhodamine 123 Hoechst 33342 Calcein AM (calcein acetoxymethylester)
Steroids	Aldosterone Corticosterone Dexamethasone
Pesticides	Methylparathion
Anti-epileptics	Endosulfan Topiramate
Analgesics	Morphine
Antibiotics	Erythromycin
Cholesterol-lowering agents	Lovastatin Simvastatin
Anthelmintics	Ivermectin
Anti-hypertensives	Reserpine
Antihistamines	Terfenadine
Ca²⁺ channel blockers	Nifedipine Diltiazem Verapamil
Calmodulin antagonists	Trifluoperazine trans-Flupentixol
Cardiac glycosides	Digoxin
HIV protease inhibitors	Nelfinavir Ritonavir Saquinavir Indinavir
Immunosuppressive agents	Cyclosporin A Tacrolimus
Miscellaneous	Reserpine Cimetidine polycyclic aromatic hydrocarbons technetium (^{99m} Tc) sestamibi synthetic and natural opiates (enkephalins) phospholipids: sphingomyelin, phosphatidylcholine

Table 1. Partial list showing some molecules transported by Pgp.

ABC inhibitors and in vitro treatment of MDR

Of the transporters shown, only inhibitors of Pgp, and to a lesser extent MRP1 and BCRP, have been evaluated in clinical trials using more or less specific efflux inhibitors⁽⁷⁾.

First generation Pgp inhibitors

The first studies were performed with modulators approved for clinical uses different from inhibition of Pgp. Two first inhibitors used in laboratory and clinical trials to reverse MDR were the calcium channel blocker verapamil and the immunosuppressant cyclosporin A. These agents were found to be weak inhibitors which are toxic at high doses⁽¹⁾. These agents often produced disappointing results in vivo because their low binding affinities needed the use of high doses, resulting in unacceptable toxicity. Many of the first chemosensitizers identified were themselves substrates for Pgp and for other transporters and enzymes, resulting in unpredictable pharmacokinetic interactions. In Table II only few of the proposed ABC pumps inhibitors are shown.

Second generation Pgp inhibitors

Subsequent studies were performed with “second generation” modulators, compounds with somewhat increased potency but still limited by toxicity, such as valspodar (PSC 833; SDZ PSC833) and biricodar (VX710)⁽⁶⁾. The best characterized is valspodar, a non-immunosuppressive derivative of cyclosporin D that inhibits Pgp with 10- to 20-fold greater activity than cyclosporin A. Biricodar citrate (VX-710) has also undergone extensive clinical development: it interferes with drug efflux by directly binding with high affinity to Pgp and also by inhibiting MRP1. Second-generation Pgp modulators have a better pharmacologic profile than the first-generation compounds, but they also retain some characteristics limiting their clinical usefulness. In particular, they significantly inhibit the metabolism and excretion of cytotoxic agents, thus leading to unacceptable toxicity, and some of them are substrates for cytochrome P450, leading to unpredictable pharmacokinetic interactions. In addition to inhibiting Pgp, many second-generation modulators also function as substrates for other transporters, particularly those of the ABC transporter family, inhibition of which could lessen the ability of normal cells and tissues to protect themselves from cytotoxic agents⁽⁶⁾ (Table II).

Third generation Pgp inhibitors

Recently, a new generation of inhibitors has reached clinical testing. These “third generation” inhibitors promise to be nontoxic, more specific, and more

Modulator	ABC drug transporter(s) affected
First generation	
Verapamil	Pgp MRP1
Cyclosporin A	Pgp MRP1 BCRP
Antimalarials	Pgp MRP1
Polyphenols (quercetin, resveratrol, genistein)	Pgp MRP1 BCRP
Second generation	
Valspodar	Pgp MRP1
Biricodar	Pgp MRP1 BCRP
Third generation	
Tariquidar	Pgp
Zosuquidar	Pgp
Laniquidar	Pgp
Ontogen	Pgp
MK-571	MRP1
Ko143	BCRP

Table II. Several inhibitors of major ABC drug transporters, ABCB1 (Pgp), ABCC1 (MRP1) and ABCG2 (BCRP).

potent than the earlier inhibitors used in trials of Pgp modulation⁽⁶⁾. Molecules specifically and potently inhibiting Pgp function have been developed, which do not affect cytochrome P450 at relevant concentrations and do not inhibit other ABC transporters. This specificity minimizes the possibility that the blockade of more than one pump might result in altered bioavailability or excretion of the chemotherapy agents. These preclinical data have translated to clinical trials, in which no third-generation agent caused clinically relevant alterations in the pharmacokinetics of the coadministered cytotoxic agents⁽⁶⁾.

The third generation Pgp inhibitors currently in clinical development include the anthranilamide derivative tariquidar (XR9576), the cyclo-

propyldibenzosuberane zosuquidar (LY335979), laniquidar (R101933) and the substituted diarylimidazole ONT-093 (OC144-093, Ontogen). In 1995, a leukotriene LTD4 receptor antagonist MK-571 was discovered to inhibit MRP1-mediated transport without any effects on Pgp. Being low in intrinsic toxicity, relatively potent and specific, MK-571 is thus still the benchmark inhibitor to block MRP1-mediated drug transport. Soon after the discovery of BCRP, a fungal toxin Fumitremorgin C (FTC), was shown to inhibit BCRP-mediated transport. FTC is both highly potent and specific, but with undesirable neurotoxic effects *in vivo*. Subsequent studies resulted in the development of Ko143, a new tetracyclic analog of FTC that is even more potent and specific yet non-toxic⁽¹⁸⁾. Ko143 was nontoxic *in vitro* at therapeutic concentrations and *in vivo* in mice either through oral or intra-peritoneal administration. Subsequently, other FTC-type inhibitors were identified and studies on these inhibitors are ongoing⁽³⁾ (Table II).

ABC inhibitors and *in vivo* treatment of MDR

The role of ABC transporters in clinical anticancer resistance has been difficult to assess, because of the heterogeneity of tumors that have Pgp- and non-Pgp-mediated mechanisms of drug resistance⁽⁷⁾.

Pgp inhibitors have been used with limited clinical success, as the co-administration of a cytotoxic drug with an inhibitor often produces unpredictable or undesirable pharmacokinetics. In addition, expression of Pgp is not the only mechanism of MDR⁽¹⁶⁾. The negative clinical trials are also linked to limited inhibition of Pgp, excessive toxicities from inhibition of drug disposition, alternative MDR and other drug resistance mechanisms, and suboptimal clinical trial designs⁽²³⁾. A clinically validated assay for Pgp or other ABC transporters has never been established. Correlative studies detecting Pgp in tumor tissue were not conducted in a standardized fashion. Patients were not selected based on tumor expression of Pgp: to conduct a trial able to determine the impact of ABC transporter inhibitors in MDR, it is crucial to select the subset of patients whose tumors express ABC transporters as a dominant mechanism of resistance. A number of single nucleotide polymorphisms have been identified that may contribute to inter-individual variation in drug metabolism, altering folding, impairing function or causing lower expression levels in some ABC transporter variants⁽¹⁹⁾.

Two large randomized trials testing tariquidar in lung cancer closed early for toxicity, and a trial using zosuquidar in acute myeloid leukemia failed to demonstrate an improvement in overall survival when added to standard

therapy. This, plus the negative trials with valspodar, resulted in almost total abandonment of the hypothesis that drug resistance could be overcome by the addition of an efflux inhibitor⁽⁸⁾.

Despite clear *in vitro* evidence that Pgp is able to dramatically reduce drug concentrations in cultured cells, and that drug accumulation can be increased by small molecule inhibitors, clinical trials testing this paradigm have mostly failed. Some have argued that it is no longer worthy of study. However, repeated analyses have demonstrated Pgp expression in a tumor is a poor prognostic indicator leading some to conclude that Pgp is a marker of a more aggressive phenotype, rather than a mechanism of drug resistance⁽²⁴⁾.

Collateral sensitivity (CS)

An alternative strategy to overcome and exploit clinical MDR is to identify compounds that selectively kill MDR cells but not the non-resistant parental cells from which they are derived, a phenomenon termed collateral sensitivity (CS). CS is a type of synthetic lethality, wherein the genetic alterations accrued while developing resistance towards one agent are accompanied by the development of hypersensitivity towards a second agent. CS thus creates an “Achilles’ heel” which can be exploited for the targeting and selective killing of MDR cells, and its efficacy is independent of the existence of other MDR mechanisms in cancer cells⁽¹⁶⁾.

The complex mechanisms by which CS agents exert selective killing of MDR cells have not been elucidated. At least four main hypotheses have been proposed to account for CS, each supported by limited experimental evidence. CS agents could:

- 1) produce reactive oxygen species (ROS) via futile hydrolysis of ATP,
- 2) exploit energetic sensitivities,
- 3) extrude endogenous substrates which are essential for cell survival, or
- 4) perturb the plasma membrane⁽²¹⁾.

Our contribution to the problem of MDR

To identify new potential targets in MDR we have analyzed some key metabolic features that differentiate chemosensitive and chemoresistant tumors. We first investigated the different synthesis of nitric oxide (NO) in response to chemotherapeutic drugs, like doxorubicin. Doxorubicin is able to up-regulate the inducible NO synthase (iNOS) enzyme, that responds to the chemotherapeutic stress by producing huge amounts of NO⁽²⁵⁾. At

micromolar concentrations, NO is highly cytotoxic, by increasing the intracellular concentration of nitrogen reactive species, inducing an oxidative damage, impairing the metabolic flux through glycolysis, tricarboxylic acids cycle and mitochondrial respiratory chain⁽²⁶⁾. NO is thus considered a mediator of the cytotoxic effect of doxorubicin in chemosensitive cells. To the contrary, we found that doxorubicin did not induce any up-regulation of iNOS or increase in NO production in chemoresistant cells, where it was effluxed outside the cells through ABC transporters⁽²⁷⁾. Interestingly, although resistant to doxorubicin, MDR cells were sensitive to NO, since NO donors, like S-nitrosoaminopenicillamine or sodium nitroprusside, or iNOS inducers other than doxorubicin, like cytokines, were able to exert cytotoxic effects in resistant cells⁽²⁷⁾. Surprisingly, NO-releasing compounds also restored the sensitivity to doxorubicin in resistant cells: by eliciting the nitration of critical tyrosines on Pgp and MRPs, NO impaired the catalytic activity of the transporters and limited the efflux of doxorubicin from ABC transporter-overexpressing cells^(27,28).

In the light of these data, increasing the release of NO within resistant cells may represent an effective chemosensitizer strategy. To this aim, we followed two approaches:

- 1) we associated doxorubicin to inducers of iNOS gene;
- 2) we directly conjugated doxorubicin with NO-releasing moieties and tested the efficacy of these synthetic anthracyclines in resistant cells.

iNOS gene is induced by the NF- κ B transcription factor, that in its inactive form is retained in cytosol by the inhibitor protein I κ B- α . The phosphorylation of I κ B- α , which primes the latter for ubiquitination and proteasomal degradation, is operated by the I κ B-kinase (IKK) complex, which in many epithelial tumors is negatively controlled by the small GTPase RhoA and the downstream effector RhoA kinase⁽²⁹⁾. The activity of RhoA is in turn controlled by its level of prenylation, which is granted by the continuous supply of geranylgeranylpyrophosphate (GGPP). The so-called “mevalonate pathway”, which converts acetyl-coenzyme A into isoprenoid molecules and cholesterol, provides GGPP and can be considered responsible for the high activity of RhoA and the low production of NO in resistant cells. We indeed restored synthesis of NO and sensitivity toward doxorubicin in resistant cells by lowering the activity of the mevalonate pathway with the specific 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors statins^(30,31) or by silencing RhoA protein⁽³²⁾.

The second approach that we chose to increase the delivery of NO within resistant cells has led to the synthesis of a spectrum of NO-releasing doxorubicins, like 3-phenylsulfonylfuroxane doxorubicin and nitrooxy-

doxorubicin⁽³³⁾: these pro-drugs offer the advantage to release NO within resistant cells, induce a strong nitration of the ABC transporters and increase the intracellular content and toxicity of doxorubicin⁽³³⁾. Another advantage is that the NO-releasing doxorubicins add the cytotoxic effects of NO to those elicited by doxorubicin, resulting more effective than free doxorubicin in killing resistant cells.

The analysis of the mevalonate pathway in chemosensitive and chemoresistant cells pointed out a second striking difference between the two cell types: resistant cells had a significantly higher synthesis of cholesterol, accompanied by a significantly higher amount of cholesterol in the plasma membrane⁽³⁴⁾. This observation is in keeping with previous experimental findings, showing that the plasma membrane of resistant tumors is richer in cholesterol and glycosphingolipids than the membrane of sensitive tumors⁽³⁵⁾; an high content of cholesterol in the cell membrane is essential for the activity of Pgp⁽³⁶⁾. The mevalonate pathway could be considered an interesting target to induce a collateral sensitivity: in the presence of statins, the decrease of the cholesterol synthesis was dramatically more pronounced in drug-resistant than in drug-sensitive cells and was accompanied by significant reduction in the activity of Pgp⁽³⁴⁾, suggesting that resistant cells are more sensitive to statins than sensitive ones. Most mammalian cells respond to the reduced endogenous synthesis of cholesterol elicited by statins, with an increased exposure of the receptor of LDL (LDLR) on the cell surface⁽³⁷⁾. Tumor cells make no exceptions. However, despite the higher levels of cholesterol synthesis, resistant cells had higher levels of LDLR in basal conditions and were more prone to increase LDLR in response to simvastatin than sensitive cells⁽³⁴⁾, suggesting that the cholesterol homeostasis in resistant tumors may be not subjected to the physiological feed-back control operating in non transformed cells. Of note, thanks to the high levels of LDLR, resistant cells easily phagocytosed liposomal nanoparticles loaded with doxorubicin and conjugated with a recombinant peptide from human apo-B100 containing the LDLR-binding site, necessary to trigger the LDLR-mediated endocytosis. Taking advantage from this mechanism, we pretreated resistant cells with simvastatin, which reduced the activity of Pgp and increased the exposure of LDLR, followed by LDL-masked liposomal nanoparticle, which was more uptaken. Thanks to this trick, doxorubicin was more delivered and less effluxed from resistant cells, reaching the same order of intracellular concentration and toxicity of doxorubicin-sensitive cells⁽³⁴⁾. Moreover, when encapsulated within liposomes, drugs are less effluxed by Pgp⁽³⁸⁾, adding a further advantage to this system.

The sequential administration of simvastatin followed by the LDL-masked liposomal nanoparticles appeared as a versatile tool not only in the context of resistant tumors, but every time we deal with tissues sensitive to statins and rich of Pgp. This was the case of the blood-brain barrier, which displays high amount of Pgp on the luminal side and impairs the delivery to brain parenchyma of a vast number of drugs, as mentioned above. Encouraging results obtained in an *in vitro* model of human blood-brain barrier suggested that the encapsulation of a poorly delivered drug (like doxorubicin) in LDL-masked liposomal nanoparticles produced a dramatic increase in the drug delivery across the brain-blood barrier cells pretreated with statins⁽³⁹⁾. These observation may enlarge the investigation field outside classical MDR: several drugs that are hardly delivered across the blood-brain barrier because substrates of Pgp, such as chemotherapeutic, analgesic, antibiotic, anti-retroviral, anti-epileptic drugs, might be more transported if the sequential scheme – treatment with a statin followed by LDL-masked liposomal drugs – would be adopted.

A third promising target of collateral sensitivity relies on the differential sensibility to oxidative stress between sensitive and resistant cells: it is a common observation that resistant tumors have higher levels of anti-oxidant enzymes, like superoxide dismutase, catalase, and detoxifying enzymes, like GSH-S-transferase^(40,41). The conjugation of chemotherapeutic drugs (like doxorubicin or cisplatin) with GSH favors the specific efflux of the GSH-conjugates via MRP1 and MRP2 transporters⁽⁴²⁾. We found that resistant cells have a significantly higher activity of the pentose phosphate pathway and of its pace-maker enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase G6PD⁽⁴³⁾. Interestingly, the only overexpression of G6PD transformed the sensitive cells into resistant ones; on the other hand, inhibitors of G6PD such as dehydroepiandrosterone and 6-aminonicotinamide increased the intracellular retention of doxorubicin and restored cytotoxicity⁽⁴³⁾. The major limitations in this direction is the poor specificity of the G6PD inhibitors; such a limitation reduces the possibility of using these compounds *in vivo*. However, the design of more selective inhibitors of G6PD is raising great interest because of their potential use as MDR reversing agents.

In summary, many metabolic differences exist between chemosensitive and chemoresistant cells; their exact knowledge will improve the therapeutic approach towards resistant tumors: from the design of chemosensitizer agents directed against ABC transporters, we are moving towards the design of specific metabolism-modifiers, that aim to target the critical metabolic pathways of resistant cells and have stronger efficacy against resistant cells.

Some ways of collateral sensitivity have been unraveled in the recent years; most of them remain to be clarified. The chemosensitizing strategies based on the amplification of a collateral sensitivity are continuously expanding. Under this perspective, MDR tumors must not be regarded only as hard therapeutic obstacles, but also as source of great challenges and opportunities to improve the patients outcome.

BIBLIOGRAPHY

1. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. *Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters*. Nat Rev Cancer. 2002; 2: 48-58.
2. Fodale V, Pierobon M, Liotta L, Petricoin E. *Mechanism of cell adaptation: when and how do cancer cells develop chemoresistance?* Cancer J. 2011; 17: 89-95.
3. Mo W, Zhang JT. *Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance*. Int J Biochem Mol Biol. 2012; 3:1-27.
4. Wu CP, Hsieh CH, Wu YS. *The emergence of drug transporter-mediated multidrug resistance to cancer chemotherapy*. Mol Pharm. 2011; 8: 1996-2011.
5. Starlard-Davenport A, Lyn-Cook B, Beland FA, Pogribny IP. *The role of UDP-glucuronosyltransferases and drug transporters in breast cancer drug resistance*. Exp Oncol. 2010; 32: 172-180.
6. Gottesman MM. *Mechanisms of cancer drug resistance*. Ann Rev Med. 2002; 53: 615-627.
7. Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. *Targeting multidrug resistance in cancer*. Nat Rev Drug Discov. 2006; 5: 219-234.
8. Robey RW, Massey PR, Amiri-Kordestani L, Bates SE. *ABC transporters: unvalidated therapeutic targets in cancer and the CNS*. Anticancer Agents Med Chem. 2010; 10: 625-633.
9. Sietsma H, Veldman RJ, Kok JW. *The involvement of sphingolipids in multidrug resistance*. J. Membrane Biol. 2001; 181: 153-162.
10. Simon SM. *Role of organelle pH in tumor cell biology and drug resistance*. Drug Discovery Today. 1999; 4: 32-38.
11. DeGorter MK, Xia CQ, Yang JJ, Kim RB. *Drug transporters in drug efficacy and toxicity*. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2012; 52: 249-273.

12. Sui H, Fan ZZ, Li Q. *Signal transduction pathways and transcriptional mechanisms of ABCB1/Pgp-mediated multiple drug resistance in human cancer cells.* J Int Med Res. 2012; 40: 426-435.
13. Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert DW. *Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family.* Hum Genom. 2008; 3: 281-290.
14. Slot AJ, Molinski SV, Cole SP. *Mammalian multidrug-resistance proteins (MRPs).* Essays Biochem. 2011; 50: 179-207.
15. Homolya L, Varadi A, Sarkadi B. *Multidrug resistance-associated proteins: export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfate.* Biofactors 2003; 17: 103-114.
16. Pluchino KM, Hall MD, Goldsborough AS, Callaghan R, Gottesman MM. *Collateral sensitivity as a strategy against cancer multidrug resistance.* Drug Resist Updat. 2012; 15: 98-105.
17. Jones PM, O'Mara ML, George AM. *ABC transporters: a riddle wrapped in a mystery inside an enigma.* Trends Biochem Sci. 2009; 34: 520-531.
18. Wu CP, Calcagno AM, Ambudkar SV. *Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance in cancer cells: evaluation of current strategies.* Curr Mol Pharm. 2008; 1: 93-105.
19. Tamaki A, Ierano C, Szakacs G, Robey RW, Bates SE. *The controversial role of ABC transporters in clinical oncology.* Essays Biochem. 2011; 50: 209-232.
20. Sodani K, Patel A, Kathawala RJ, Chen ZS. *Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance.* Chin J Cancer. 2012; 31: 58-72.
21. Natarajan K, Xie Y, Baer MR, Ross DD. *Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance.* Biochem Pharmacol. 2012; 83: 1084-1103.
22. Ni Z, Bikadi Z, Rosenberg MF, Mao Q. *Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2).* Curr Drug Metab. 2010; 11: 603-617.
23. Chen KG, Sikic BI. *Molecular pathways: regulation and therapeutic implications of multidrug resistance.* Clin Cancer Res. 2012; 18: 1863-1869.
24. Amiri-Kordestani L, Basseville A, Kurdziel K, Fojo AT, Bates SE. *Targeting MDR in breast and lung cancer: discriminating its potential importance from the failure of drug resistance reversal studies.* Drug Resist Updat. 2012; 15: 50-61.
25. Aldieri E, Bergandi L, Riganti C, Costamagna C, Bosia A, Ghigo D. *Doxorubicin induces an increase of nitric oxide synthesis in rat cardiac cells that is inhibited by iron supplementation.* Toxicol Appl Pharmacol. 2002; 185: 85-90.
26. Huerta S, Chilka S, Bonavida B. *Nitric oxide donors: Novel cancer therapeutics.* Int J Oncol. 2011; 33: 909-927.
27. Riganti C, Miraglia E, Viarisio D, Costamagna C, Pescarmona G, Ghigo D, Bosia A. *Nitric oxide reverts the resistance to doxorubicin in human colon cancer cells by inhibiting the drug efflux.* Cancer Res. 2005; 65: 516-525.
28. De Boo S, Kopecka J, Brusa D, Gazzano E, Matera L, Ghigo D, Bosia A, Riganti C. *iNOS activity is necessary for the cytotoxic and immunogenic effects of doxorubicin in human colon cancer cells.* Mol Cancer. 2009; 8: 108-118.
29. Kraynack NC, Corey DA, Elmer HL, Kelley TJ. *Mechanisms of NOS2 regulation by Rho GTPase signaling in airway epithelial cells.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2002; 283: L604-L611.

30. Riganti C, Orecchia S, Pescarmona G, Betta PG, Ghigo D, Bosia A. *Statins revert doxorubicin resistance via nitric oxide in malignant mesothelioma*. Int J Cancer. 2006; 119: 17-27.
31. Riganti C, Doublier S, Costamagna C, Aldieri E, Pescarmona G, Ghigo D, Bosia A. *Activation of nuclear factor-kappa B pathway by simvastatin and RhoA silencing increases doxorubicin cytotoxicity in human colon cancer HT29 cells*. Mol Pharmacol. 2008; 74: 476-484.
32. Doublier S, Riganti C, Voena C, Costamagna C, Aldieri E, Pescarmona G, Ghigo D, Bosia A. *RhoA silencing reverts the resistance to doxorubicin in human colon cancer cells*. Mol Cancer Res. 2008; 6: 1607-1620.
33. Chegaev K, Riganti C, Lazzarato L, Rolando B, Guglielmo S, Campia I, Fruttero R, Bosia A, Gasco A. *Nitric oxide donor – doxorubicin conjugates accumulate into doxorubicin resistant human colon cancer cells inducing cytotoxicity*. ACS Med Chem Lett. 2011; 2: 494-497.
34. Kopecka J, Campia I, Olivero P, Pescarmona G, Ghigo D, Bosia A, Riganti C. *A LDL-masked liposomal-doxorubicin reverses drug resistance in human cancer cells*. J Contr Rel 2011; 149: 196-205.
35. Lavie Y, Fiucci G, Czarny M, Liscovitch M. *Changes in membrane microdomains and caveolae constituents in multidrug-resistant cancer cells*. Lipids 1999; 34: S57-S63.
36. Troost J, Lindenmaier H, Haefeli WE, Weiss J. *Modulation of cellular cholesterol alters P-glycoprotein activity in multidrug-resistant cells*. Mol Pharmacol. 2004; 66: 1329-1332.
37. Liao JK, Laufs U. *Pleiotropic effects of statins*. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2005; 45: 89-118.
38. Riganti C, Voena C, Kopecka J, Corsetto P, Montorfano G, Enrico E, Costamagna C, Rizzo A, Ghigo D, Bosia A. *Liposome-encapsulated doxorubicin reverses drug-resistance by inhibiting P-glycoprotein in human cancer cells*. Mol Pharm. 2011; 8: 683-700.
39. Pinzón-Daza ML, Garzón R, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Ghigo D, Bosia A, Riganti C. *The association of statins plus LDL receptor-targeted liposome-encapsulated doxorubicin increases the in vitro drug delivery across blood-brain barrier cells*. Brit J Pharmacol. 2012; 167: 1431-1447.
40. Kuo MT. *Redox regulation of multidrug resistance in cancer chemotherapy*. Antioxid Redox Signal. 2009; 11: 99-134.
41. Sau A, Pellizzari Tregno F, Valentino F, Federici G, Caccuri AM. *Glutathione transferases and development on new principles to overcome drug-resistance*. Arch Biochem Biophys. 2010; 500: 116-122.
42. Morrow CS, Peklak-Scott C, Bishwokarma B, Kute LE, Smitherman PK, Townsend AJ. *Multidrug resistance protein 1 (MRP1) mediated resistance to mitoxantrone via glutathione-dependent drug efflux*. Mol Pharmacol. 2006; 69: 1499-1505.
43. Polimeni M, Voena C, Kopecka J, Riganti C, Pescarmona G, Bosia A, Ghigo D. *Modulation of doxorubicin resistance by the glucose 6-phosphate dehydrogenase activity*. Biochem J 2011; 439:141-149.

LA DONAZIONE DI ORGANI: ASPETTI SCIENTIFICI, ETICI E SOCIALI

*Pier Paolo Donadio¹, Raffaele Potenza¹,
Maria Elena Donadio², Anna Guermani¹*

¹ S.C. Anestesia Rianimazione 3 - Coordinamento Regionale Prelievi
A.O. Città della Salute e della Scienza di Torino

² Facoltà di Medicina e Chirurgia - Università degli Studi di Torino

Parole chiave: *Donazione di organi*
Trapianti
Carenza di organi
Coordinatori dei prelievi
Procurement di organi

Key words: *Organ donation*
Transplantation
Organ shortage
Transplant coordinators
Organ procurement

Riassunto

La scarsità di organi è il più grande limite allo sviluppo dei trapianti e va fatto ogni sforzo per aumentarne il numero. Il procurement è l'insieme delle conoscenze necessarie per riuscirci. La possibilità di prelevare organi si fonda sulla diagnosi della morte con criteri neurologici e il suo accertamento giuridico è normato dalla Legge; la certezza della morte ed il rispetto della "dead donor rule" sono indispensabili dal punto di vista etico. La legge italiana prevede il silenzio assenso alla donazione, ma concede l'espressione dell'opposizione non solo in vita, ma anche su testimonianza dalla famiglia del defunto. L'aumento dei donatori dipende poco dalla riduzione delle opposizioni, che sono già oggi basse, e molto dalla identificazione e segnalazione di tutti i donatori potenziali da parte dei rianimatori. Per questo la figura chiave per lo sviluppo del procurement è il coordinatore ospedaliero, che predispone tutto quanto necessario perché il processo di donazione e

prelievo, che è molto complesso e ha molti attori, non gravi anche dal punto di vista organizzativo sul rianimatore che ha in carico il potenziale donatore. Per favorire la donazione sono fondamentali la formazione non solo tecnica ma anche relazionale degli operatori e la qualità percepita del sistema sanitario. Le campagne di sensibilizzazione costano molto e non hanno alcuna efficacia dimostrata, mentre la comunicazione da parte dei media di notizie buone o cattive dal mondo sanitario in generale e dei trapianti in particolare ha una dimostrata ricaduta, positiva o negativa, sulla favorevolezza o contrarietà alla donazione; per questo si può avere un buon livello procurement solo nell'ambito di una buona sanità percepita tale dai cittadini.

Abstract

Organ shortage remains a major issue in transplant medicine, and every effort must be done to overcome this problem. The outcome of procurement depends by the effort to optimize the number of donors. The possibility of procurement is based on cerebral death defined by neurologic criteria and confirmed by the law. The certainty of cerebral death and the dead donor rule are essential from an ethical stand point of view. The Italian law provides for the silent consensus to organ donation, but allows opting out not only during life but also after death if the family oppose to donate. A key role for increasing the number of donors is played by the identification of any potential donor from the critical care units. In order to accomplish this is mandatory to have a transplant coordinator who oversees all the complex issues related to donation and explantation. The role of the transplant coordinator will complement the work of the critical care doctors alleviating the organizational portion of the process. The training of the coordinators and the quality of the public health system are pivotal for increasing donations. Promoting organ donation with the public is expensive and not effective. Conversely, positive or negative media communications about health issues, and specifically transplants, have been shown to promote support or opposition to donations, respectively. Therefore, a good level of procurement can be achieved only in if the community perceives the public health system as being capable of delivering a high quality care.

Introduzione

A partire dall'introduzione della ciclosporina, il primo farmaco immunosoppressore efficace e tollerabile, i trapianti sono usciti dalla fase sperimentale e sono diventati una terapia consolidata ed affidabile, ed i sistemi sanitari nazionali hanno realizzato che la carenza di organi disponibili era il principale ostacolo alla crescita della trapiantologia. Sono nate quindi negli Stati Uniti le prime OPO (Organ Procurement Organizations) ed in Spagna la ONT (Organisacion Nacional des Transplantes) le quali hanno elaborato strategie di procurement di organi e tessuti che sono state prese a modello dagli altri Paesi; in Italia tale compito è svolto dal Centro Nazionale Trapianti e dalla rete dei Centri di Coordinamento Regionali che a loro volta agiscono attraverso la rete dei Coordinamenti Ospedalieri, presenti in tutti gli ospedali sede di reparti di rianimazione.

Col termine procurement si intende l'insieme delle conoscenze e delle procedure necessarie per procurare al sistema sanitario organi e tessuti da trapiantare; si tratta di un insieme variegato, che riguarda aspetti scientifici, etici, giuridici e sociali. Da un punto di vista medico scientifico occorre saper identificare i potenziali donatori, diagnosticare la morte encefalica, mantenere il cadavere a cuore battente, eseguire il prelievo chirurgico degli organi, conservare e trasportare gli organi prelevati. Non meno importanti sono gli aspetti etici della questione: a chi, in quali condizioni e col consenso di chi è lecito prelevare organi, a quali pazienti e con quali criteri vanno distribuiti. L'insieme delle conoscenze scientifiche e dei principi etici va trasmesso al legislatore per indirizzarlo verso l'emanazione di leggi che regolino l'attività in modo equo, non pregiudizievole per alcuno e coerente con le evidenze scientifiche. Infine molte delle conoscenze scientifiche e delle regole del sistema devono essere divulgate, in modo che i cittadini, che possono trovarsi sia nella condizione di aver bisogno di un organo sia nella condizione di poterlo donare, possano esercitare scelte consapevoli ed orientate; con la donazione degli organi infatti la società cura se stessa, e senza donazione non c'è cura.

Il processo di donazione e prelievo

La donazione ed il prelievo di organi e tessuti si concretizzano in un processo multidisciplinare che vede come attori da un lato il sistema sanitario e dall'altro la società. La definizione "donazione e prelievo" è volutamente ambigua: se da un lato si tratta infatti di un processo diagnostico e operativo, dall'altra parte esso ha bisogno, per realizzarsi, del consenso dell'interessato,

espresso in vita oppure manifestato dagli aventi diritto. Il processo si snoda attraverso l'identificazione del potenziale donatore mediante la diagnosi e l'accertamento della morte con criteri neurologici, il mantenimento del donatore a cuore battente per il tempo necessario, la valutazione di idoneità del donatore per escludere la trasmissione di patologie neoplastiche o infettive, la valutazione dell'idoneità al trapianto dei singoli organi, il prelievo chirurgico e la ricomposizione della salma. Durante una delle fasi sopra dette, ma comunque prima del prelievo, deve intervenire il consenso.

La morte encefalica

La grande maggioranza dei trapianti viene eseguita con organi provenienti da donatore cadavere, sia perché organi unici come il cuore o il fegato non possono ovviamente essere asportati a un vivo, sia perché, anche quando la donazione da vivente è possibile come nel caso del rene, essa diventa eticamente proponibile solo dopo che un sistema sanitario abbia utilizzato tutti gli organi disponibili da cadavere.

I potenziali donatori di organi sono i soggetti deceduti nella particolare condizione definita impropriamente di "morte encefalica". Si tratta di soggetti colpiti da una lesione cerebrale primitiva (accidente cerebrovascolare, trauma cranico, neoplasia cerebrale o anossia acuta) sottoposti a terapia intensiva con supporto meccanico della ventilazione, la cui evoluzione clinica va verso una ipertensione endocranica intrattabile: quando la pressione endocranica (PIC) diventa maggiore della pressione arteriosa media (PA) si determina un arresto completo della circolazione cerebrale, cui consegue la cessazione irreversibile per necrosi delle funzioni cerebrali. Non si tratta più quindi di uno stato di coma, ma di morte vera e propria, che si identifica con la cessazione irreversibile di tutte le funzioni dell'encefalo. In questa condizione, essendo il soggetto sottoposto a ventilazione meccanica e non intervenendo quindi una anossia, il battito cardiaco è mantenuto, pur essendosi verificata la morte: questi soggetti, e solo questi, sono i potenziali donatori di organi.

L'esistenza di uno stato di "coma dépassé" (al di là del coma) venne segnalata da Mollaret e Goulon nel 1959⁽¹⁾, agli albori della rianimazione, quando essi per primi riscontrarono in soggetti neurolesiti sottoposti a ventilazione meccanica un quadro caratterizzato da apnea, silenzio elettrico cerebrale e assenza di tutti i riflessi del tronco encefalico che andava ben al di là di tutte le condizioni cliniche precedentemente osservate. Osservazioni successive ripetute in tutti i paesi nei quali la ventilazione meccanica e la rianimazione andavano diffondendosi confermarono questo quadro, che

invariabilmente si concludeva con l'arresto cardiaco dopo qualche ora o qualche giorno, e nel giro di un decennio (1968) si giunse alla formulazione dei criteri di Harvard da parte di un Comitato Ad Hoc⁽²⁾ che definì tale quadro "brain death", morte encefalica. L'identificazione tra l'arresto del circolo e del respiro e la morte dell'individuo venne così meno, e si comprese che la morte biologica dell'uomo consisteva nella cessazione irreversibile di tutte le funzioni dell'encefalo, che nella stragrande maggioranza dei casi avveniva (e tuttora avviene) in seguito all'arresto del circolo e del respiro, ma che poteva anche verificarsi in soggetti neurolesesi connessi a un respiratore senza che vi fosse l'arresto del cuore. Questo spostamento dell'attenzione dal torace alla testa venne recepito da tutte le società scientifiche e da tutte le legislazioni, e da quasi 50 anni è ormai chiaro a tutti che un cadavere è tale non perché non respira o non ha battito cardiaco, ma perché non ha perfusione ematica cerebrale.

È bene sottolineare che la diagnosi di morte non è stata ridefinita, ma semplicemente meglio compresa. Da un lato verificare l'arresto del cuore e del respiro consente di accertare indirettamente l'arresto della perfusione cerebrale e conseguentemente la morte; dall'altro lato la verifica diretta della cessazione irreversibile di tutte le funzioni dell'encefalo rappresenta verifica della morte anche in presenza di battito cardiaco e respiro meccanico. Sarebbe quindi più corretto non parlare di morte "cerebrale" e di morte "cardiaca" ma di morte senza aggettivazione alcuna: morte accertata con criteri cardiologici e morte accertata con criteri neurologici; la dizione "morte cerebrale" è comunque diventata di uso comune, e come tale anche qui per brevità se ne farà uso.

La dottrina sulla morte cerebrale è largamente condivisa dalle società scientifiche, dalle legislazioni nazionali e da tutte le religioni e le correnti di pensiero laico, con pochissime eccezioni; ancora recentemente, nel 2008, un editoriale di *Neurology* a firma di J.L. Bernat⁽³⁾ afferma che "quella della morte encefalica è la questione bioetica sulla quale si è registrato il più ampio consenso, ed i suoi oppositori non sono riusciti a convincere alcuna società scientifica, né scuola di pensiero né legislazione della validità delle loro obiezioni".

In Italia la determinazione della morte con criteri neurologici è stata dapprima codificata con la Legge 644 del 1975, che disciplinava l'attività di trapianto; ciò diede luogo ad una terribile ambiguità, perché l'accertamento con criteri neurologici veniva riservato solo ai donatori di organi: si verificava quindi l'assurdo che se il soggetto morto era donatore se ne poteva dichiarare la morte, se non lo era per mancanza di consenso o non lo poteva essere

per controindicazioni cliniche non poteva essere dichiarato deceduto. A questa assurdità pose rimedio la Legge 578 del 1993, che separò l'attività di donazione e prelievo di organi dall'accertamento della morte, prescrivendo da allora in poi di accertare la morte di qualunque soggetto, a seconda della situazione, con criteri cardiologici oppure neurologici. La Legge 578 recepisce correttamente il concetto di morte e stabilisce che "la morte si identifica con la cessazione irreversibile di tutte le funzioni dell'encefalo" rimandando ai decreti applicativi per le modalità pratiche dell'accertamento. I decreti a loro volta vengono periodicamente riveduti da comitati di esperti alla luce della evoluzione tecnica degli strumenti diagnostici; questo è accaduto, ad esempio, per l'introduzione dell'angioTAC o del doppler transcranico tra le metodologie per accertare l'assenza di flusso ematico cerebrale, precedentemente eseguibile solo con l'angiografia tradizionale.

La "dead donor rule"

Fondamentale, sia per questioni etiche che per questioni di consenso sociale, è il mantenimento della cosiddetta "dead donor rule" (regola del donatore morto). Per "dead donor rule" si intende il principio etico, morale e sociale condiviso in egual misura dai medici e dalla popolazione per il quale è possibile prelevare organi solo a soggetti sottoposti a riconoscimento giuridico della morte. Questo principio è e resta rigidamente applicato, nonostante alcuni auspichino la possibilità di prelevare organi da soggetti "morenti" ma senza determinazione giuridica della morte, sulla base di un consenso informato espresso in vita dal soggetto stesso. A queste "fughe in avanti" si oppongono, giustamente, ragioni etiche e ragioni di opportunità; il prelievo degli organi prima della morte, in qualsivoglia condizione clinica di deficit neurologico sia pure grave ed irreversibile, sarebbe da molti considerato un atto di per sé illecito, e priverebbe tutti della indispensabile tranquillità e fiducia nell'esprimere la propria posizione verso la donazione. La certezza che non si prelevano organi di morenti, moribondi, terminali, preterminali, gravi neurolesi ecc. è indispensabile per consentire a qualsiasi cittadino di esprimersi con serenità sul destino dei propri organi dopo la morte; qualsiasi altra regola, anche se dettata da una buona intenzione ed anche se limitata a coloro che la accettano, porterebbe la donazione degli organi a collocarsi tra le molte questioni bioetiche delle quali molto si discute in questi anni e sulle quali molto ci si divide, mentre la dead donor rule, che rassicura chiunque sul fatto che solo di cadaveri si tratti quando si parla di donazione di organi, è quella che consente di avere il più ampio consenso sociale e bioetico da

parte di tutti⁽⁴⁾. Non si può sottacere il fatto che i fautori del superamento della dead donor rule abbiano a cuore non tanto e non solo la questione della donazione di organi, quanto piuttosto quella più ampia, sulla quale non ha luogo qui parlare, del fine vita; senza entrare nel merito di quelle questioni qui è importante ribadire che la donazione degli organi da cadavere deve restare oggetto del massimo consenso sociale e bioetico possibile, come lo è oggi, e quindi deve rimanere “blindata” dalla “regola del donatore morto”⁽⁵⁾.

Il consenso

È opinione prevalente in tutti i sistemi sanitari che, pur essendo un cadavere “res nullius”, occorra, per procedere al prelievo degli organi, una qualche forma di consenso, implicito od esplicito, espresso dal defunto in vita o dai suoi congiunti dopo la morte.

Con l’espressione “opt in” si definiscono i sistemi che considerano donatori soltanto i cittadini che in vita hanno esplicitamente scelto di esserlo; con quella “opt out” si definiscono i sistemi che considerano donatori tutti i cittadini, ad eccezione di coloro che in vita hanno esplicitamente scelto di non diventarlo.

La regola “opt in” presenta due limiti; dal punto di vista dell’efficienza procura pochi donatori, perché solo una esigua minoranza della popolazione fa questa scelta in vita, mentre dal punto di vista etico carica coloro che non si esprimono di una responsabilità che non hanno: infatti il non essersi espressi in vita a favore della donazione non significa ipso facto essere contrari, ma il più delle volte è solo il frutto della rimozione dell’idea della propria morte, e negare la propria morte non significa negare i propri organi.

Da un punto di vista di efficienza appare più conveniente un sistema basato sul principio “opt out”: tutti sono donatori a meno che non lo abbiano esplicitamente negato in vita. Da un punto di vista etico, tuttavia, le considerazioni sullo scarso numero di persone che si esprimono in vita riguardo alla propria morte valgono anche in questo caso e l’equiparazione del silenzio con l’assenso si presta a qualche critica; ma là dove si consideri l’importanza della donazione di organi per il bene comune, un sistema “opt out” pare comunque assai più accettabile di uno “opt in”⁽⁶⁾.

In questo senso si è espressa la legge 91/99 che prevedeva il cosiddetto silenzio assenso informato; tutti i cittadini avrebbero dovuto ricevere una notificazione che li metteva al corrente del fatto che, in assenza di una espressione di volontà in vita, sarebbe stati considerati donatori. Al momento di rendere operativa questa parte della legge, ci si è tuttavia accorti da un

lato della difficoltà oggettiva di applicarla, poiché ogni giorno un certo numero di cittadini diventa maggiorenne e dovrebbe essere raggiunto dalla notificazione, e dall'altro della pessima accoglienza che la legge stessa aveva avuto da parte dei media e dell'opinione pubblica: il silenzio assenso, sia pure informato, è stato visto come un prelievo fiscale post mortem. Alla luce di ciò, ed anche del fatto che la maggior parte delle famiglie interpellate dopo la morte del congiunto acconsente al prelievo, la parte della legge 91/99 relativa al silenzio assenso informato non è mai entrata in vigore, e le disposizioni transitorie dell'art. 23 sono diventate definitive. Esse prevedono la prevalenza della volontà espressa in vita sull'opinione della famiglia; tale volontà, esprimibile presso punti di raccolta presenti in ogni ASL, viene registrata nel sistema informativo dei trapianti (S.I.T.), che viene consultato dal Centro Regionale Trapianti ogni qual volta una rianimazione segnala la presenza di un potenziale donatore; nel S.I.T. sono registrate anche le dichiarazioni di volontà degli iscritti all'A.I.D.O. (Associazione Italiana Donatori di Organi), ragione per cui chi voglia esprimere il proprio consenso alla donazione in vita può farlo non solo recandosi al punto di raccolta della propria ASL ma anche iscrivendosi all'A.I.D.O.. Nel caso (che è il più frequente) in cui dall'interrogazione del S.I.T. risulti che il deceduto non si è espresso in vita, viene interpellata la famiglia; non si chiede però ai congiunti cosa essi pensino della donazione, ma se sono in grado di testimoniare o di supporre quale fosse in vita l'opinione del deceduto. Questo cambiamento è rilevante, perché consente a ciascuno di sapere che la propria volontà, anche se non espressa in modo formale ma soltanto comunicata ai propri famigliari, sarà comunque rispettata, e dall'altro consente ai famigliari di interporre l'opposizione solo dichiarandosi al corrente del fatto che il deceduto era contrario alla donazione: nel caso in cui non siano al corrente di una tale contrarietà si fa valere, sia pure senza forzature di sorta, il principio dell'opt out per il quale il silenzio equivale ad un assenso; si tratta quindi di ottenere non già un "consenso" ma una "non opposizione". Il congiunto personalmente contrario alla donazione può affermare di essere al corrente della contrarietà del defunto anche se questo mai la aveva espressa, e nessuno lo può smentire, ma l'alta percentuale di "non opposizioni" ottenuta dalla rete delle rianimazioni dimostra che questo accade raramente.

Posto che alla famiglia resta consentita l'opposizione in nome e per conto del defunto, ma che nessuno è in grado di impedire che questa venga espressa in realtà per conto proprio, quali sono le variabili che entrano in gioco per giungere alla cosiddetta "non opposizione"? L'analisi dei risultati regione per regione, ospedale per ospedale e operatore per operatore (che è

una delle funzioni del Coordinamento Regionale dei Prelievi) evidenzia che gli elementi determinanti che orientano la scelta, quando questa è operata dai famigliari, sono la qualità percepita delle cure ricevute dal defunto e la capacità relazionale di chi comunica la morte e propone la donazione. Le grandi differenze nelle percentuali di opposizioni che si osservano tra le regioni italiane e nell'ambito delle rianimazioni di una stessa regione sono riconducibili a queste due variabili; per questo la formazione degli operatori alla relazione di aiuto alle famiglie in lutto e più in generale ad una comunicazione corretta ed empatica ha la massima importanza, insieme con tutta una serie di miglioramenti della qualità tecnica e di comunicazione delle reti ospedaliere. In parole assai povere ma chiare, è difficile che persone che si sono sentite maltrattate o trascurate, che hanno atteso per ore notizie date col contagocce ed espresse in incomprensibile "medichese", senza un tempo ed un luogo dove fare domande, capire ed essere accolti siano ben disposte verso la donazione degli organi del loro congiunto deceduto. Se la comunicazione precedente è stata cattiva, arrogante, fredda, distaccata, se la qualità delle cure magari c'è anche stata ma non è stata percepita, difficilmente si giunge alla donazione. Viceversa se la relazione è stata empatica, se si è stati attenti alle persone durante tutta la degenza, se si è creata una sintonia con la famiglia, se essa ha potuto vedere quanto ci si è impegnati per impedire quella morte che poi è avvenuta, difficilmente la donazione verrà negata. Senza una qualità percepita delle cure e una qualità reale della comunicazione anche i favorevoli diventano contrari, mentre un atteggiamento di accoglienza a tutto campo, di disponibilità al dialogo, alla spiegazione, alla ripetizione e soprattutto all'ascolto delle famiglie dei degenti in rianimazione, oltre che essere in sé dovuto, porta anche buoni frutti sul versante della donazione.

Agli albori dei prelievi di organi si riteneva che chiedere la donazione degli organi a chi aveva appena subito un lutto, magari improvviso ed imprevisto, fosse "la più difficile delle domande, alla più disgraziata delle famiglie nel più inopportuno dei momenti". In realtà non è così; quella donazione non è una richiesta, ma una proposta, un'offerta, un'opportunità data di trarre del bene da qualcosa che viene percepito come totalmente negativo; non basta di certo a cancellare il dolore né a dare un senso alla morte, ma rappresenta comunque un "dare qualcosa alla famiglia", non un "prendere qualcosa al morto". Tutta la formazione relazionale di coloro che si relazionano con le famiglie in lutto parte da questo presupposto, che non è soltanto un modo diverso di dire la stessa cosa, ma che è il frutto del follow up di tante famiglie che hanno donato o che hanno negato la donazione, follow up che

ha evidenziato, nel medio periodo, una valenza consolatoria importante della donazione; la consapevolezza di non essere dei questuanti importuni ma qualcuno che ha qualcosa da dire e da dare e che sa come dirlo e come darlo, pur nel rispetto più assoluto delle opinioni degli altri, è uno dei punti di forza della formazione degli operatori.

Come l'evoluzione tecnica della chirurgia e della immunologia hanno migliorato non solo i trapianti ma anche tanta altra parte della medicina, così la necessità di ottenere la non opposizione delle famiglie dei potenziali donatori migliora le capacità di comunicazione degli operatori a vantaggio di tutti i pazienti e di tutte le famiglie, non solo dei deceduti in morte encefalica. Per questo l'attività formativa degli operatori delle rianimazioni che la rete dei prelievi di organi porta avanti da anni ha una ricaduta migliorativa sulla qualità di tutta l'attività delle terapie intensive.

L'insieme di tutte queste considerazioni rende evidente che il problema della scarsità di organi da trapiantare non si risolve con né con una legge più rigida che tolga la possibilità di opporsi, che creerebbe immediatamente anticorpi sociali tali da indurre la politica a cambiarla in breve tempo, né con le campagne pubblicitarie che invitano alla donazione; la vera chiave del successo che alcune regioni italiane hanno in questo campo (in primis la Toscana, ma anche il Piemonte, il Friuli, l'Emilia Romagna) e dei miglioramenti significativi che tutte hanno conseguito nell'ultimo decennio passa attraverso la formazione tecnica e relazionale dei rianimatori ed attraverso l'opera dei coordinatori ospedalieri dei prelievi.

L'organizzazione della rete regionale di procurement

Quando si parla della carenza di donatori di organi inevitabilmente si sente invocare un'azione di "sensibilizzazione" al problema e di diffusione della cosiddetta "cultura della donazione", oppure, in alternativa, una legislazione più coercitiva che non consenta l'opposizione al prelievo.

Occorre dire con franchezza, tuttavia, che la maggior causa di perdita di potenziali donatori non sta nelle opposizioni alla donazione, ma nel sistema sanitario che non segnala tutti i potenziali donatori, e domandarsene le ragioni ed intervenire su di esse.

Identificare un potenziale donatore in morte encefalica, segnalarlo al Centro Regionale Trapianti, convocare la commissione di accertamento della morte (un medico legale, un neurofisiopatologo e un rianimatore), mantenerlo a cuore battente per il tempo dell'accertamento, spiegare alla famiglia la realtà della morte, richiedere la non opposizione, valutare l'idoneità del

donatore in toto e degli organi eventualmente prelevabili e portare il soggetto in sala operatoria è un lavoro aggiuntivo molto gravoso per il rianimatore e può rendersi necessario in qualunque ora del giorno e in qualunque giorno dell'anno; per di più un potenziale donatore in morte encefalica non identificato e non segnalato tempestivamente va incontro all'arresto cardiaco in poche ore senza lasciare traccia di sé; se non è adeguatamente supportato è facile per il rianimatore cedere alla tentazione di non segnalare la morte encefalica a causa delle mille difficoltà organizzative e pratiche che si incontrano e che si sommano a quelle proprie del suo lavoro.

Per avere un buon numero di donatori sono perciò assolutamente necessari due fattori: il primo è una organizzazione ospedaliera che predisponga il percorso di accertamento, mantenimento, valutazione di idoneità e prelievo in modo che non diventi un impossibile tour de force per "un uomo solo al comando"; il secondo è una buona formazione tecnica, relazionale e motivazionale dei rianimatori.

A questo scopo è nata in Spagna la figura del transplant coordinator, successivamente introdotta anche in Italia; si tratta di un medico formato ad hoc che dedica parte del proprio tempo a risolvere preventivamente i problemi che si possono insorgere durante una donazione ed a formare tutti i professionisti coinvolti nel processo. Il coordinatore ospedaliero affronta e risolve i problemi organizzativi "prima", affinché il rianimatore non debba affrontarli "durante"; in staff alla direzione sanitaria per questa parte del proprio lavoro, il coordinatore individua "chi fa che cosa e quando" in un processo che coinvolge decine di persone, che avviene raramente, e che deve svolgersi con la stessa efficacia ed efficienza in ogni ospedale dotato di rianimazione, anche in quelli piccoli che non hanno a disposizione tutte le competenze e le strutture di quelli grandi. Dagli esami di laboratorio non di routine ma che in questo caso vanno fatti in urgenza, alle indagini diagnostiche come le ecografie addominali e cardiache, dall'elettroencefalogramma alla convocazione del collegio di accertamento della morte, dal portinaio che guida l'equipe di prelievo alla sala operatoria all'autista che porta i campioni biologici al centro regionale per le tipizzazioni, tutto deve essere previsto prima, affinché il rianimatore che segnala il potenziale donatore non si trovi a dover fare l'impossibile. Oltre a questo compito organizzativo il coordinatore ospedaliero individua i bisogni formativi e provvede, in collaborazione col Coordinamento Regionale dei Prelievi al loro soddisfacimento, in modo che tutti gli operatori coinvolti siano aggiornati e consapevoli del loro compito. A sua volta il Coordinamento Regionale dei Prelievi organizza la formazione dei coordinatori, monitorizza i decessi di tutte le rianimazioni della rete, supporta

h 24 i coordinatori ospedalieri e i rianimatori impegnati nel procurement, interviene con le Procure della Repubblica in caso di problemi giuridici, cura la comunicazione sociale.

La comunicazione individuale e sociale della donazione

Il Coordinamento Regionale dei Prelievi del Piemonte ha creato dei corsi di formazione alla comunicazione ed alla relazione con le famiglie in lutto che, impiegando tra i docenti medici, infermieri e psicologi, ed avvalendosi della collaborazione di attori professionisti per esercitazioni di role playing nelle quali i discenti interpretano i sanitari e gli attori impersonano i congiunti, conducono ad una consapevolizzazione delle proprie reazioni nei confronti della perdita e del lutto, e successivamente alla acquisizione di abilità relazionali specifiche, che aiutano di molto sia il colloquio di donazione e più in generale la relazione di aiuto. Tali corsi sono stati assunti nell'offerta formativa nazionale del Centro Nazionale Trapianti. Riprendendo il concetto espresso nel precedente paragrafo, è da sottolineare che il primo frutto di questa formazione non è un aumento dei consensi, ma delle segnalazioni di potenziali donatori; acquisiti degli strumenti non solo tecnici ma psicologici e relazionali il rianimatore non ha più paura di accostare le famiglie e quindi non omette più di segnalare i soggetti in morte encefalica. Ovviamente anche l'esito finale dei colloqui di donazione migliora, ma, come già detto, esso è il frutto di molte altre variabili: dall'espressione in vita della volontà del defunto, che se c'è stata è inviolabile, alla qualità delle cure percepite dalla famiglia, dalla percezione sociale del sistema sanitario in quel tempo in quella regione all'effetto positivo o negativo di eventi di cronaca particolari (si pensi alla storia di Nicholas Green da un lato o agli scandali sanitari dall'altro).

La comunicazione sociale è cosa costosissima; “nel rumore di fondo” della pubblicità che investe miliardi farsi sentire con i mezzi della sanità pubblica è impossibile; si fanno sporadicamente campagne pubblicitarie, ma la loro efficacia è tutta da dimostrare, e presumibilmente è quasi nulla: servono sostanzialmente a dare a pazienti ed operatori (gli unici che nel rumore di fondo le notano perché hanno già attenzione all'argomento) la sensazione che all'istituzione importi qualcosa del problema.

In tempi di crisi economica, per di più, occorre quindi impiegare le risorse in modo particolarmente oculato. A tale scopo si tende sempre più frequentemente alla valutazione di risultato delle iniziative informative, ad esempio mediante interviste telefoniche fatte a coloro che dovrebbero aver ricevuto materiale informativo, come i neo diciottenni che ogni anno vengono

raggiunti da una lettera e da materiale del Coordinamento Regionale dei Prelievi, oppure mediante rilevazioni fatte presso le edicole nella settimana successiva alla veicolazione del materiale informativo attraverso i settimanali. È opinione sempre più condivisa che le campagne informative per la popolazione debbano essere ben mirate, calibrate e verificate quanto meno nella loro capacità di giungere effettivamente ai destinatari; più difficile valutarne gli effetti sulla favorevolezza della popolazione perché sono troppi i fattori confondenti. È un dato di fatto, comunque, che sia l'istituzione sanitaria che le associazioni di volontariato stiano professionalizzando anche questo aspetto della loro attività. Il Coordinamento Regionale Prelievi del Piemonte ha ricevuto in regalo oltre dieci anni fa dallo Studio Testa il proprio logo (il cuore nel pacchetto rosso col fiocco bianco) e il proprio slogan: "chi aspetta un organo non aspetta altro"; oltre al regalo lo Studio Testa ci ha dato anche una semplice lezione: non cambiare, ma cercare di accreditare lentamente nel tempo quel logo e quello slogan in modo da supplire almeno parzialmente con la continuità alla scarsa intensità imposta dalle poche risorse finanziarie. Un'altra lezione importante ricevuta dai comunicatori professionisti è che assai più della pubblicità sono utili le buone notizie; per questo, e non per narcisismo, si cerca di far comunicare dai media gli straordinari successi che la medicina dei trapianti sta conseguendo, consapevoli del fatto che queste notizie orientano la popolazione verso la donazione molto di più delle campagne pubblicitarie e a costo zero. È questa un'altra prova che la medicina dei trapianti rappresenta davvero "la società cura se stessa"; la comunicazione del buon risultato diventa il mezzo più efficace perché la società dia alla medicina il farmaco necessario per essere essa stessa curata.

BIBLIOGRAFIA

1. Mollaret P, Goulon M. *Le Coma Dépassé*. Rev Neurol. 1959; 101: 3-15.
2. Ad Hoc Committee of the Harvard Medical School to Examine the Definition of Brain Death. *A Definition of Irreversible Coma*. JAMA. 1968; 205: 337-340.
3. Bernat J.L. *Editorial*. Neurology. 2008; 70: 252-253.
4. Birch SC. *The dead donor rule: a defense*. J Med Philos. 2013; 38: 426-440.
5. Procaccio F, Doandio PP, Bernasconi AM, Gianelli Castiglione A, Nanni Costa A. *Determinazione di morte con standard neurologico*. http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_publicazioni_1009_allegato.pdf.
6. Rithalia A, McDaid C, Suekarran S, Norman G, Myers L, Sowden A. *A Impact of presumed consent for organ donation on donation rates: a systematic review*. BMJ. 2009; 338: a3162.

**IL DISTURBO DELL' IDENTITÀ DI GENERE
L'ATTIVITÀ DEL CIDIGeM
LA CHIRURGIA DEL TRANSESSUALISMO**

*Dario Fontana, Luigi Rolle, Carlo Ceruti,
Massimiliano Timpano, Marco Falcone*

S.C. Urologia U
Città della Salute e della Scienza di Torino - Presidio Molinette

Parole chiave: *Transsessualismo*
Disturbo di identità di genere
Riattribuzione chirurgica dei caratteri sessuali

Key words: *Transsexualism*
Gender identity disorder
Sexual reassignment surgery

Riassunto

Il Disturbo di Identità di Genere, altrimenti noto come Transsessualismo, è una situazione esistenziale drammatica che consiste in una profonda incompatibilità tra sesso biologico e sesso psichico, cioè il sesso cui il soggetto sente di appartenere. Si tratta di una condizione rara che si ritiene colpisca 1 maschio su 30.000 ed 1 femmina su 100.000. In tutti i paesi più avanzati esistono Centri che si occupano di queste persone, il cui obiettivo è quello di raggiungere il sesso cui si sentono di appartenere. Presso l'Ospedale Molinette di Torino, dal 2005 è attivo il CIDIGeM (Centro Interdipartimentale Disturbi Identità di Genere Molinette), che vede coinvolti più di 20 professionisti di differente estrazione, che assicurano un approccio multidisciplinare a questo grave problema. Ad oggi, presso il Centro, hanno concluso il lungo percorso e sono stati sottoposti agli interventi di Riattribuzione Chirurgica del Sesso (RCS) 53 soggetti, di cui 44 da maschio a femmina (M to F) e 9 da femmina a maschio (F to M).

Abstract

Gender Identity Disorder (GID), otherwise known as Transsexualism, is a dramatic existential situation which consists of a deep incompatibility between biological and psychological sex. GID is a rare condition that occurs in 1 male every 30.000 and 1 female every 100.000. In all developed countries we can find centers that deal with these people, whose objective is to achieve the gender they feel to belong to. At the "Molinette" Hospital of Turin, since 2005, is active the CIDIGeM (Interdepartmental Centre for Gender Identity Disorders - Molinette), involving more than 20 professionals from different backgrounds, ensuring a multi-disciplinary approach to this serious problem.

To date, at our Centre, 53 subjects, including 44 male-to-female (M to F) and 9 female to male (F to M), were submitted to Sex Reassignment Surgery (SRS).

Per Disturbo di Identità di Genere, più noto come Transessualismo, si intende una situazione esistenziale drammatica, per fortuna rara, che può anche portare al suicidio, caratterizzata da una netta incompatibilità tra il sesso biologico ed il sesso psichico, situazione che può essere trattata solo adeguando il sesso corporeo a quello psichico e, purtroppo, non viceversa. Esistono, come è noto, altre forme di ambiguità sessuale, ma il vero transessualismo è, per fortuna, molto raro; si stima che sia transessuale 1 uomo ogni 30.000 (MtoF) ed 1 donna ogni 100.000 (FtoM).

Anche se il termine “Transessualismo” compare, per la prima volta, nel 1953 su di una rivista americana di psichiatria⁽¹⁾ in uno studio condotto da Benjamin e lo stesso autore, nel 1966, ribadisce l’esistenza del fenomeno⁽²⁾, tuttavia il problema è ben noto sin dall’antichità e, nei secoli passati, queste persone sono state emarginate, derise, talora perseguitate ed, ancora oggi, gran parte dell’opinione pubblica le considera persone viziose. Il primo intervento chirurgico di “cambio di sesso” fu eseguito in Danimarca nel 1952⁽³⁾ e, da allora, il problema è stato affrontato con interesse sempre maggiore dalla scienza medica. Sino alla fine del ‘900 si riteneva che il Transessualismo fosse dovuto, prevalentemente, a cause psico-socio-ambientali, cioè che l’Identità di Genere, determinata soprattutto dal corredo genetico, potesse essere modificata da traumi psichici di vario genere che si verificassero durante l’infanzia o l’adolescenza^(4,5,6). Da quando il problema del Transessualismo ha cominciato ad essere affrontato in modo scientifico, sono stati condotti e si stanno conducendo studi di tipo genetico, anatomico e neuro-fisiologico che dimostrerebbero, invece, una prevalenza delle cause biologiche, cioè il Transessualismo potrebbe dipendere da una anomala “impregnazione ormonale” del cervello durante la vita intra-uterina, in conseguenza di anomalie genetiche, come per esempio dei geni che codificano per il recettore per gli androgeni^(7,8,9,10,11). Il problema è estremamente complesso ed affascinante e, in tutto il mondo, anche a Torino, si stanno conducendo studi in questo senso.

Nei paesi più avanzati esistono Centri che si occupano di questo difficile problema. Presso l’Ospedale Molinette di Torino è attivo, dal 2005, un Centro, che abbiamo denominato CIDIGeM (Centro Interdipartimentale Disturbi Identità di Genere Molinette), nato dalla collaborazione tra la Divisione Universitaria di Urologia allora da me diretta, la Divisione Universitaria di Endocrinologia e Malattie del Metabolismo diretta dal Prof. Ezio Ghigo, la Divisione Universitaria di Psichiatria diretta dal Prof. Filippo Bogetto, la Fondazione Carlo Molo e l’ONIG (Osservatorio Nazionale Disturbi Identità

di Genere), naturalmente con il sostegno della Direzione Sanitaria. Il Centro fu, poi, riconosciuto come Centro di Eccellenza dalla Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Torino e come Centro di Riferimento dalla Regione Piemonte.

Nel CIDIGeM, il cui Direttore Scientifico è il Prof. Dario Fontana, sono impegnate, con competenze diverse, più di 20 persone (Figura 1) che lavorano in modo interdisciplinare. Dal momento che il problema si manifesta, spesso, già nella prima infanzia o nell'adolescenza ed, in questi casi, si possono verificare situazioni molto difficili per la famiglia, dal 2010 abbiamo attivato una collaborazione con la Neuro-Psichiatria Infantile diretta dal Prof. Roberto Rigardetto e con l'Istituto di Terapia Familiare diretto dalla Dott. Patrizia Petiva, che prendono in carico i familiari ed il bambino fino al 18° anno di età.

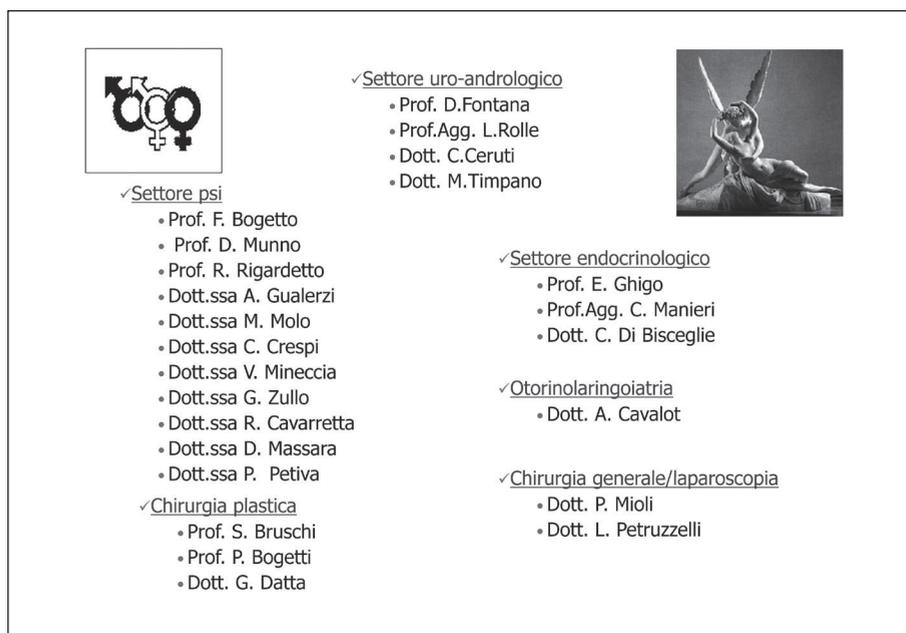


Figura 1. Organigramma del CIDIGeM.

Abbiamo attivato alle Molinette uno sportello telefonico di accoglienza (011/6334387), raggiungibile il giovedì dalle 13,30 alle 16,30, al quale si può rivolgere chiunque pensi di avere problemi di questo genere, che

magari non è mai riuscito a confidare a nessuno; troverà all'apparecchio una psicologa che lo ascolterà e, se lo riterrà opportuno, lo convocherà per un primo colloquio. Se la psicologa pensa che si possa trattare di un Disturbo di Identità di Genere, allora inizierà una fase psico-diagnostica gestita dagli psicologi e dagli psichiatri, della durata di circa 6 mesi e, nel caso in cui il sospetto diagnostico venga confermato, allora il soggetto verrà affidato agli endocrinologi che lo tratteranno con gli ormoni del sesso che desidera raggiungere, per un periodo di 1/2 anni; in questo periodo modificherà progressivamente il proprio aspetto ed il proprio comportamento e questa trasformazione verrà attentamente seguita dagli endocrinologi e dagli psicologi. Alla fine di questo lungo percorso di preparazione, il soggetto, esibendo le relazioni dei vari specialisti, potrà richiedere al Tribunale di residenza l'autorizzazione per poter essere sottoposto agli interventi di Riattribuzione Chirurgica del Sesso (RCS), in base alla Legge n.164 del 1982, requisito indispensabile anche per poter ottenere, dopo gli interventi chirurgici, la variazione anagrafica.

La Figura 2 riassume l'attività del CIDIGeM dal marzo del 2005 all'ottobre del 2012. Le persone che si sono presentate alla prima visita sono state 331,

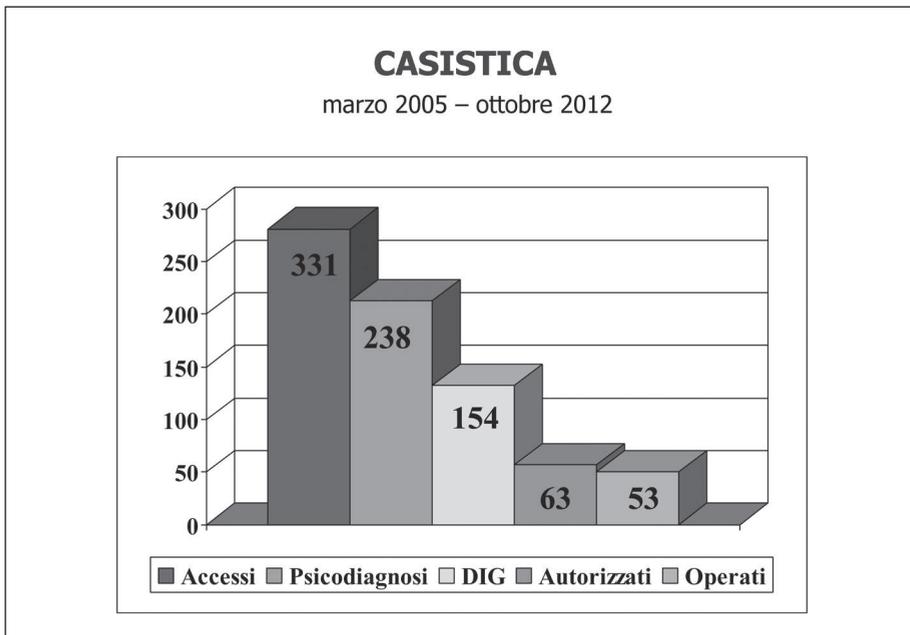


Figura 2. Attività del CIDIGeM.

238 quelle che sono state sottoposte alla fase psico-diagnostica, 154 quelle ritenute affette da Disturbo di Identità di Genere e che, quindi, sono state affidate agli endocrinologi per le terapie ormonali, 53 sono state sottoposte agli interventi di Riattribuzione Chirurgica del Sesso (RCS), di cui 44 da maschio a femmina (M to F) e 9 da femmina a maschio (FtoM); 63 soggetti, studiati altrove, anche all'estero, hanno chiesto di poter essere operati presso il nostro Centro.



Figura 3. Asportazione dei corpi cavernosi e del glande, dal quale è stata staccata una porzione che costituirà il neo-clitoride.

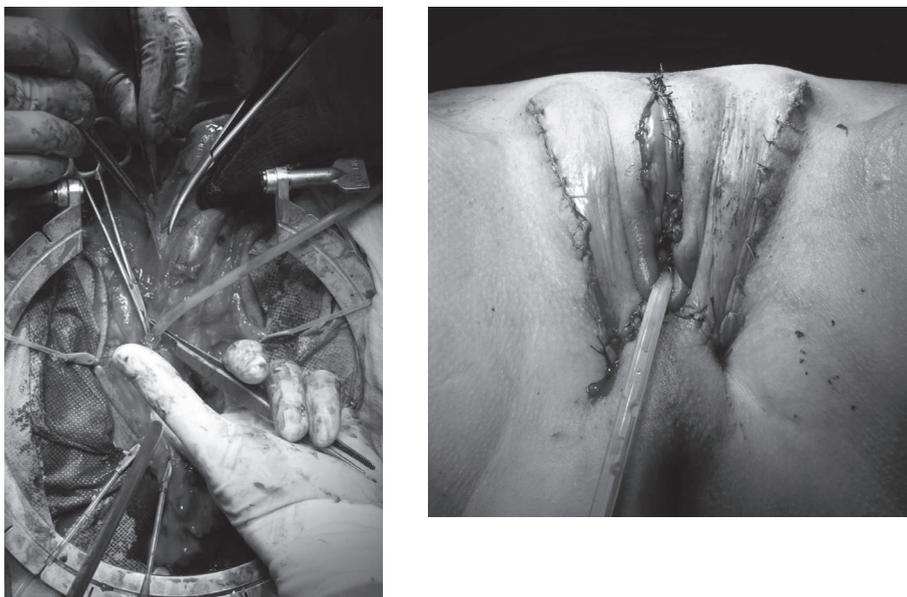


Figura 4. Costruzione della neovagina utilizzando due lembi di cute (penieno e perineo-scrotale) e sua introflessione nel canale costruito fra retto e prostata; si costruiscono, quindi, le piccole, le grandi labbra ed il clitoride.

Per quanto riguarda la Riattribuzione Chirurgica del Sesso in senso MtoF, l'intervento genitale, indubbiamente molto complesso, viene eseguito in tempo unico e consiste nella asportazione del pene e dei testicoli e nella costruzione della vagina con lembi cutanei, delle piccole e grandi labbra e del neoclitoride, utilizzando una porzione di glande naturalmente vascolarizzata ed innervata (Figure 3,4).

Altri interventi chirurgici extra-genitali che la paziente può richiedere sono la mastoplastica additiva ed un intervento sulle corde vocali per modificare il tono della voce.

Mentre nella chirurgia da maschio a femmina l'intervento genitale viene eseguito in tempo unico, nella chirurgia da femmina a maschio (FtoM) sono necessari più interventi, ancora più complessi e dai risultati estetici e funzionali meno brillanti. In un primo intervento si eseguono la istero-annessiectomia laparoscopica e la mastoplastica riduttiva, in un secondo intervento si esegue la falloplastica, generalmente utilizzando un lembo di cute addominale (Figura 5) e si applicano le due protesi testicolari; in un intervento successivo si impianta la protesi idraulica del pene per consentire l'erezione del neo-

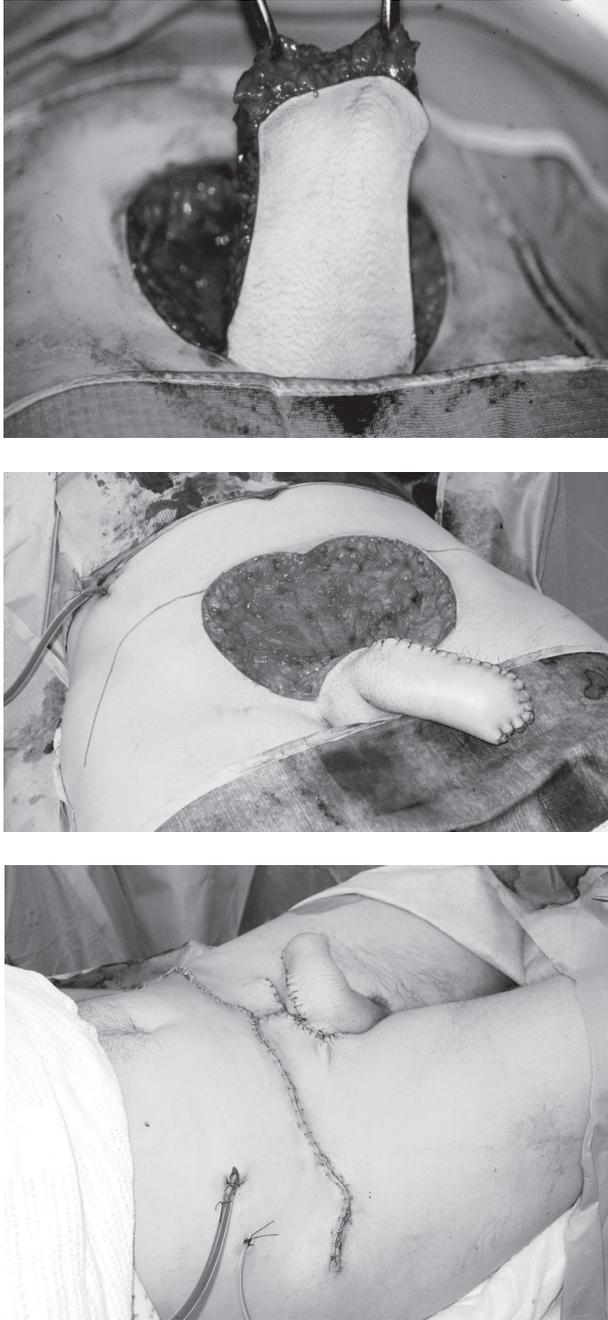


Figura 5. Costituzione del neofallo utilizzando un lembo di cute addominale.

fallo. Il neo-fallo può essere costruito anche utilizzando un lembo libero di cute prelevato dall'avambraccio, i cui vasi e nervi vengono poi anastomizzati ai vasi ed ai nervi dell'area genitale con tecnica microchirurgica.

La chirurgia del Transessualismo, come abbiamo visto, è una chirurgia molto complessa, che espone a possibili complicanze e reinterventi e che deve essere preceduta da un lungo percorso diagnostico e di preparazione. Ciononostante, la grande maggioranza dei soggetti operati, alla domanda se erano pentiti di essersi sottoposti ad una avventura così lunga, complessa e disseminata di dolori, ha risposto che lo avrebbe rifatto, a conferma delle gravi sofferenze psichiche provocate dalla condizione di Transessualismo.

BIBLIOGRAFIA

1. Benjamin H. *Travestitism and transsexualism*. Int Journal of Sexology. 1963; 7: 1-12.
2. Benjamin H. *The transsexual phenomenon*. Ed. Julian Press, 1966, New York.
3. Jorgensen C. *A Personal Biography*. Ed. Cleis Press Inc, 1967, San Francisco.
4. Cauldwell D. *Desire for surgical sex transmutation, an insane fancy of near males*. In "Effects of Castration on Men and Women: Accidental, Voluntary and Involuntary Castration Eunuchism and History – Medical Treatment and Aspects" 1947: section IV, Ed. Haldeman-Julius Publications, Kansas.
5. Blanchard J. *The concept of autogynephilia and typology of male gender dysphoria*. J Nerv Ment Dis. 1989; 177: 616-623.
6. Coolidge FL, Thede LL, Young SE. *The heritability of gender identity disorder in a child and adolescent twin sample*. Behav Genet. 2002; 32: 251-257.
7. Kruijver FP, Zhou JN, Pool CW, Hofman MA, Gooren LJ, Swaab DF. *Male-to-female transsexuals have female neuron numbers in a limbic nucleus*. J Clin Endocrinol Metab. 2000; 85: 2034-2041.
8. Chung WC, De Vries GJ, Swaab DF. *Sexual differentiation of the bed nucleus of the stria terminalis in humans may extend into adulthood*. J Neurosci. 2002; 22: 1027-1033.
9. Garcia-Falgueras A, Swaab DF. *A sex difference in the hypothalamic uncinate nucleus: relationship to gender identity*. Brain. 2008; 131: 3132-3146.
10. Luders E, Sánchez FJ, Gaser C, Toga AW, Narr KL, Hamilton LS, Vilain E. *Regional gray matter variation in male-to-female transsexualism*. Neuroimage. 2009; 46: 904-907.
11. Berglund H, Lindström P, Dhejne-Helmy C, Savic I. *Male-to-female transsexuals show sex-atypical hypothalamus activation when smelling odorous steroids*. Cereb Cortex. 2008; 18: 1900-1908.

I DISTURBI DELL' IDENTITÀ DI GENERE: QUALE TERAPIA?

Filippo Bogetto¹, Donato Munno²

¹ Professore Ordinario di Psichiatria - Dipartimento di Neuroscienze
Scuola di Medicina - Università di Torino

² Professore Associato Confermato di Psicologia Clinica
Dipartimento di Neuroscienze - Scuola di Medicina - Università di Torino

Parole chiave: *DIG*
Diagnosi differenziale
DSM-IV-TR
WPATH
Terapia

Key words: *GID*
Differential diagnosis
DSM-IV-TR
WPATH
Treatment

Riassunto

In questo articolo vengono affrontate le problematiche diagnostiche legate al Disturbo dell'Identità di Genere, l'attenzione agli aspetti psicologico-soggettivi dell'orientamento sessuale ed agli aspetti culturali e sociali in evoluzione continua. Nello specifico, facendo riferimento all'esperienza del nostro centro, si riportano le fasi dell'assessment psicologico-clinico, della valutazione testistica e dei percorsi psicologici e psicofarmacoterapici precedenti e conseguenti agli interventi ormonali e di riconversione chirurgica del sesso. Si conclude ricordando le problematiche ancora aperte rispetto a un problema così complesso della natura umana affrontato al momento in un'ottica psicologico-medica e chirurgica.

Summary

In this article, diagnostic problems related to Gender Identity Disorder, with direct attention to subjective-psychological aspects of sexual orientation and cultural and social aspects in continuous evolution, are presented. Specifically, with reference to the experience in our center, there are reported clinical and psychological assessment phases, which preexist and ensue hormonal interventions and sex reassignment surgery. We conclude remembering still open problems about the complex theme of human nature, faced up through a medical-psychological and surgical view.

Per affrontare questo argomento estremamente complesso dal punto di vista clinico, medico, professionale ed anche esistenziale, è fondamentale fare alcune riflessioni introduttive:

- 1) Avere ben presenti le problematiche legate alla diagnosi differenziale, alla esclusione di una condizione fisica, che possa condurre all'intersessualità (insensibilità agli androgeni, iperplasia surrenale) e alla non esclusione teorica di un *terzo sesso* non ancora dimostrato biologicamente.
- 2) Riflettere sui rapporti tra una medicina *curativa*, una medicina *migliorativa* e una medicina *senza limiti*. Il confronto nasce tra coloro che considerano gli interventi "terapeutici" (ormonali o RCS) contro natura e chi pensa che questi interventi chiariscano uno stato di natura biologico ed addirittura lo possano correggere.
- 3) Per i medici, gli psichiatri, gli psicologi, il punto di riferimento rimangono i nostri manuali diagnostici che indirizzano la diagnosi e di conseguenza il percorso della cura in un'ottica strettamente medica, con particolare attenzione alle comorbidità psichiatriche.
- 4) Esistono però anche nuove Linee Guida per la Salute delle Persone Transessuali, Transgender e di Genere Non Conforme, promosse dalla WPATH (World Professional Association for Transgender Health 2011⁽¹⁾). I movimenti internazionali incidono molto nel cambiare il panorama della salute transgender. Infatti la prima grande conquista è l'affermazione che la *non-conformità di genere non è una patologia*. Si abbandona la prospettiva medico-psichiatrica e si afferma la depatologizzazione a favore dell'autodeterminazione dell'identità sessuale. Si coglie quindi l'importanza, rispetto a questo tipo di problematiche, delle diverse concezioni della cultura, della salute, della ricerca e dell'educazione, sempre nel rispetto della dignità delle persone transessuali⁽²⁾.

Riguardo alla nostra esperienza diretta il punto di partenza rimane costituito dai criteri del DSM-IV TR per la diagnosi del Disturbo dell'Identità di Genere che di seguito riportiamo⁽³⁾:

- A. Una forte e persistente identificazione col sesso opposto (non solo un desiderio di qualche presunto vantaggio culturale derivante dall'appartenenza al sesso opposto).

Nei bambini il disturbo si manifesta con quattro (o più) dei seguenti sintomi:

- 1) desiderio ripetutamente affermato di essere, o insistenza sul fatto di essere, dell'altro sesso

- 2) nei maschi, preferenza per il travestitismo o per l'imitazione dell'abbigliamento femminile; nelle femmine, insistenza nell'indossare solo tipici indumenti maschili
- 3) forti e persistenti preferenze per i ruoli del sesso opposto nei giochi di simulazione, oppure persistenti fantasie di appartenere al sesso opposto
- 4) intenso desiderio di partecipare ai tipici giochi e passatempi del sesso opposto
- 5) forte preferenza per i compagni di gioco del sesso opposto

Negli adolescenti e negli adulti, l'anomalia si manifesta con sintomi come desiderio dichiarato di essere dell'altro sesso, o di farsi passare spesso per un membro dell'altro sesso, desiderio di vivere o essere trattato come un membro dell'altro sesso, oppure la convinzione di avere sentimenti e reazioni tipici dell'altro sesso.

- B. Persistente malessere riguardo al proprio sesso o senso di estraneità riguardo al ruolo sessuale del proprio sesso.

Nei bambini, l'anomalia si manifesta con uno dei seguenti sintomi: nei maschi, affermazione di disgusto verso i propri genitali, o speranza che essi scompaiano, o avversione verso i giochi di baruffa e rifiuto dei tipici giocattoli e attività maschili; nelle femmine, rifiuto di urinare in posizione seduta, rifiuto nei confronti della crescita del seno e nei confronti del ciclo mestruale, speranza che i genitali diventino di tipo maschile, avversione verso l'abbigliamento femminile tradizionale.

Negli adolescenti e negli adulti, l'anomalia si manifesta con sintomi come preoccupazione di sbarazzarsi delle proprie caratteristiche sessuali e/o convinzione di essere nati del sesso sbagliato.

- C. L'anomalia non è concomitante con una condizione fisica intersessuale.

- D. L'anomalia causa disagio clinicamente significativo o compromissione dell'area sociale o lavorativa.

Specificare se (per soggetti sessualmente maturi):

- Sessualmente attratto da maschi
- Sessualmente attratto da femmine
- Sessualmente attratto sia da maschi che da femmine
- Non attratto sessualmente né da maschi né da femmine

Le nostre modalità di procedere, per impostare correttamente la diagnosi, presuppongono una serie di osservazioni di approfondimento sul DIG e sui percorsi che deve affrontare la persona transessuale a livello endocrinologico, psicologico e chirurgico.

Una persona con DIG (transessuale) sente di appartenere al genere opposto rispetto a quello in cui è nato, è consapevole di tale discrepanza, e sente la necessità di adeguare il suo corpo al suo vissuto interno⁽⁴⁾.

Il DIG è una condizione rara: il DSM-IV-TR stima che, in Europa, circa 1 maschio adulto su 30.000 sente di essere femmina (MtF - Male to Female), ed una femmina adulta su 100.000 sente di essere maschio (FtM - Female to Male): entrambi perciò richiedono interventi chirurgici per vivere in un corpo il più possibile coerente con il proprio vissuto psicologico e desiderano possedere documenti anagrafici che confermino l'identità di genere a cui sentono di appartenere. La condizione transessuale è pertanto differente rispetto alla condizione delle persone transgender, le quali non sentono di appartenere in maniera così rigida né all'uno né all'altro genere.

Quando parliamo di persone transessuali, quindi, parliamo di identità di genere, ovvero il "sentimento di appartenenza" all'uno o all'altro genere, indipendentemente dal sesso anatomico di nascita, basato sul corredo cromosomico. Questa dissociazione tra corpo e identità genera profondo disagio, confusione e a fatica viene compresa dalla persona transessuale e da chi la circonda. Generalmente, superata la confusione e la paura, viene intrapreso un percorso di transizione verso il genere desiderato, che talora può giungere alla trasformazione chirurgica delle caratteristiche anatomiche sessuali.

Secondo diversi studi clinici, alla base del fenomeno del transessualismo si può individuare la combinazione complessa di fattori bio-psico-sociali. Le caratteristiche biologiche predisponenti, le relazioni affettive significative, l'ambiente sociale ed educativo in cui l'individuo si trova a crescere e le esperienze di vita portano allo sviluppo della personalità e all'acquisizione dell'identità di genere. Pertanto l'individuo presenta alla nascita determinate caratteristiche costituzionali che possono svilupparsi o manifestarsi allorquando si verificano anche certe condizioni esterne.

È importante sottolineare che parlando di "scelta transessuale" si intende il momento in cui la persona decide di esternare ciò che da tempo vive dentro di sé: la scelta non è attuata nel senso intenzionale o volontario del termine, ma perché nessun'altra vita risulta tollerabile⁽⁵⁾.

Il percorso che la persona transessuale deve effettuare è molto lungo (Osservatorio Nazionale sull'Identità di Genere), e, in Italia, nel caso in cui si voglia arrivare alla riconversione chirurgica del sesso, è regolamentato dalla legge.

L'iter è composto da differenti fasi:

La persona, afflitta da un persistente disagio col proprio corpo e col ruolo che deve condurre nella società, inizia a interrogarsi sulla propria identità e a sentire il bisogno di confrontarsi su questi temi.

- 1) *Il primo contatto con i professionisti* può avvenire o direttamente o mediato dalle diverse associazioni di utenti. Il soggetto arriva a contattare gli specialisti (in prima battuta viene inviato allo psicologo del servizio) o con l'obiettivo di comprendere meglio ciò che sente o decisamente per ottenere terapie ormonali o chirurgiche.
- 2) *Il percorso psicologico*: è una delle fasi fondamentali, anche se spesso viene vissuto come "obbligo" e pertanto non sempre adeguatamente utilizzato dalle persone transessuali. Si tratta di un percorso prevalentemente volto alla psicodiagnosi, durante il quale vengono esplorati gli aspetti di personalità, la storia di vita, e approfondita l'autenticità della motivazione a proseguire nell'iter^(6,7). Durante il percorso psicologico è previsto per tutti i pazienti un approfondimento diagnostico della personalità e di alcune dimensioni psicopatologiche attraverso la somministrazione di test psicologici quali il Test di Rorschach e il Minnesota Multiphasic Personality Inventory - 2 (MMPI-2); vengono inoltre somministrati il WHOQOL-100, questionario sulla qualità della vita e il Gender Identity Dysphoria Questionnaire. Sono inoltre previste ulteriori batterie di test per la raccolta di informazioni utili per la ricerca scientifica, previa autorizzazione del paziente.
- 3) *La terapia ormonale*: al termine di almeno sei mesi di percorso psicologico viene valutata con l'équipe l'opportunità di autorizzare una terapia ormonale, in accordo con l'endocrinologo. L'obiettivo della terapia è quello di modificare i caratteri sessuali terziari ed inibire manifestazioni funzionali proprie del sesso biologico di appartenenza⁽⁸⁾.
La terapia ormonale ha anche una forte valenza "auto-diagnostica", in quanto tali effetti possono avere sul soggetto una spinta confermativa, o, al contrario, indurlo a riconsiderare tutto il percorso. Il compito dello psicologo consiste nel supportare il paziente in questi percorsi confermativi o regressivi rispetto alla ricerca della propria identità.

- 4) *Il “test di vita reale”* (RLT, Real Life Test): il soggetto, con l’aiuto dell’inizio della terapia ormonale, inizia a “vivere” nel contesto sociale come persona del sesso a cui sente di appartenere, adottando il ruolo di genere consono. Anche questa fase è supportata con colloqui psicologici ed è fortemente auto-diagnostica dal momento che il soggetto ha modo di sperimentarsi per raggiungere la certezza di essere in grado di vivere nel mondo reale nel genere scelto.
- 5) *L’iter legale*: a due anni dall’inizio del percorso psicologico, nel caso in cui sussista il desiderio di sottoporsi all’intervento chirurgico di riconversione del sesso, vengono stilate dai professionisti che hanno in carico la persona interessata delle relazioni su questa e sul percorso effettuato. Queste relazioni supporteranno la richiesta di autorizzazione all’intervento chirurgico, che deve essere inoltrata al Tribunale competente per residenza. Il giudice, dopo aver accettato le perizie di parte e sentito il parere di periti d’ufficio, può decidere se concedere l’autorizzazione con sentenza. In base alla legge 164, in seguito all’intervento chirurgico, può essere effettuato un secondo ricorso, supportato dalla cartella clinica attestante l’avvenuto intervento, per ottenere la rettifica dei dati anagrafici da parte del Tribunale, a cui segue la correzione del nominativo su tutta la documentazione anagrafica (patente, licenze, titoli di studio, depositi bancari ecc...).
- 6) *La RCS (Riconversione Chirurgica di Sesso)*: ottenuta l’autorizzazione all’intervento, la persona viene inserita nella lista d’attesa per l’intervento chirurgico. L’attesa può durare da pochi mesi ad alcuni anni, a seconda del tipo di struttura (pubblica o privata), dell’affluenza di utenza in quella specifica struttura e dal tipo di conversione (da uomo a donna o viceversa). In ogni caso la fase chirurgica prevede l’asportazione degli organi genitali primari e secondari e la ricostruzione, in gradi diversi, di strutture fisiche somiglianti il più possibile agli organi sessuali secondari del sesso desiderato (neo-vagina, neo-pene)⁽⁹⁾.
- 7) *Il “follow-up”*: sarebbe importante, oltre ai dovuti controlli specialistici, effettuare alcuni incontri di follow-up generalizzati (a 6 mesi, 1 anno, 2 anni dalla RCS) per monitorare la stabilità del benessere della persona verificando l’inserimento sociale e le condizioni psicofisiologiche connesse con gli adeguamenti effettuati. Fondamentale mantenere costante il monitoraggio ormonale nel corso di tutta la vita.

Nel caso in cui sia necessario un percorso psicologico post-intervento o nel caso in cui il paziente dovesse richiedere un percorso psicologico curativo

per Disturbo di Identità di Genere, i pazienti vengono inviati al C.S.M. di competenza o presso la Clinica Psichiatrica Universitaria.

Il percorso psicologico continua in parallelo a tutti gli steps successivi, accompagnando la persona durante tutte le fasi della transizione.

Sono proposte terapie farmacologiche, dallo specialista psichiatra, a persone transessuali nei seguenti casi:

- Sintomi psichiatrici concomitanti al Disturbo di Identità di Genere, come ad esempio depressione, ossessività, psicosi.
- Accompagnamento all'intervento ormonale e chirurgico: è stato evidenziato come, nel corso dello stressante percorso che la persona deve affrontare, si sono frequentemente manifestati disturbi del sonno, ansia, binge-eating, meritevoli di ausilio farmacoterapico. Utile in parallelo effettuare eventualmente un counseling per i familiari.
- Ausilio per “soportare” il Disturbo di Identità di Genere: nel caso in cui la persona rifiuti l'intervento ormonale e/o chirurgico o questi non vengano concessi dalla valutazione dello psichiatra.

Sottolineiamo in conclusione l'importanza di riuscire ad affrontare questa grossa sofferenza soggettiva che si traduce in difficoltà psicologiche, sociali e lavorative. Fondamentale il percorso formativo propedeutico per tutti gli operatori che lavorano in questo ambito, l'effettuazione di continue supervisioni, l'attenzione ai rischi del burnout e l'alimentazione di una continua capacità di ascolto, associata alla volontà di comprensione e di aiuto operativo.

Tornando quindi al titolo della nostra conferenza e ai quattro punti introduttivi, rimangono comunque aperte alcune problematiche teorico-cliniche: la terapia è secondaria ad una patologia riconosciuta e viene effettuata da professionisti della sanità secondo percorsi teorico-tecnici collaudati. Nell'ottica di una depatologizzazione questa premessa salta, quindi viene escluso il momento della diagnosi, il percorso di assessment medico e psicosessuologico, viene rivendicata l'autodeterminazione dell'identità sessuale e si “esige” la *terapia* dai professionisti della salute.

Si precisa inoltre che per anni, prima dell'esperienza del CIDIGEM si è tentato inutilmente, tramite interventi psicoterapici di diverso indirizzo, di modificare senza successo il Disturbo di Identità di Genere.

BIBLIOGRAFIA

1. Coleman E, Bockting W, Botzer M, Cohen-Kettenis P, DeCuypere G, Feldman J, Fraser L, Green J, Knudson G, Meyer WJ, Monstrey S, Adler RK, Brown GR, Devor AH, Ehrbar R, Ettner R, Eyler E, Garofalo R, Karasic DH, Lev AI, Mayer G, Meyer-Bahlburg H, Hall BP, Pfaefflin F, Rachlin K, Robinson B, Schechter LS, Tangpricha V, van Trotsenburg M, Vitale A, Winter S, Whittle S, Wylie KR, Zucker K. *Standards of Care for the Health of Transsexual, Transgender, and Gender-Nonconforming People, Version 7*. Int J Transgender, 2011; 13: 165-232.
2. Ruspini E, Inghilleri M. *Transessualità e scienze sociali: identità di genere nella postmodernità*. Ed. Liguori, 2008, Napoli.
3. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition (Text Revision)*. Ed. American Psychiatric Publishing, 2000, Washington D.C and London.
4. Felici A, Corsi F, Cavalieri L. *Disturbi dell'identità di genere*. In Muller EE, Rigamonti AE (Ed.) "La funzione sessuale. Aspetti biologici, psicologici e clinici", 2001: Pythagora Press, Milano.
5. Dettore D. *Il disturbo dell'identità di genere. Diagnosi, eziologia, trattamento*. Ed. McGraw-Hill, 2005, Milano.
6. Schaefer LC, Wheeler CC, Futterweit W. *Gender Identity Disorders (Transsexualism)*. In Gabbard GO (Ed.) "Treatment of Psychiatric Disorders", 1995: vol. 2, Washington DC, American Psychiatric Press.
7. K Rachlin. *Transgender Individuals' Experiences of Psychotherapy*. Int J Transgender, 2002; 6: 1.
8. Gooren L. *The endocrinology of transsexualism: a review and commentary*. Psychoneuroendocrinology, 1990; 15: 3-14.
9. Selvaggi G, Ceulemans P, De Cuypere G, VanLanduyt K, Blondeel P, Hamdi M, Bowman C, Monstrey S. *Gender Identity Disorder: General Overview and Surgical Treatment for Vaginoplasty in Male-to-Female Transsexuals*. Plast Reconstr Surg, 2005; 116: 135-145.

I DISTURBI D'IDENTITÀ DI GENERE: QUALE TERAPIA? IL TRATTAMENTO ORMONALE

*Chiara Manieri, Cataldo Di Bisceglie,
Elena Castellano, Ezio Ghigo*

S.C.D.U. Endocrinologia, Diabetologia e Metabolismo
Dipartimento di Scienze Mediche - Università degli Studi di Torino
C.I.D.I.Ge.M. - A.O. Città della Salute e della Scienza di Torino - Molinette

Parole chiave: *Disturbo Identità di Genere (DIG)*
Percorso di transizione
Trattamento ormonale sostitutivo
Ormoni del sesso opposto
Riassegnazione chirurgica del sesso (RCS)

Key Words: *Gender Identity Disorder (GID)*
Real Life Experience
Hormonal Replacement Therapy
Cross sex hormones
Surgical Sexual Reassignment (SSR)

Riassunto

Il Disturbo di Identità di Genere rappresenta una realtà con la quale la Medicina deve confrontarsi per saper dare risposte esaurienti almeno in termini di trattamenti volti a migliorare la qualità della vita dei soggetti che ne sono affetti. In diverse parti del mondo sono stati definiti degli Standard di Cura che prevedono un supporto in ambito psicologico, endocrinologico e chirurgico. In questa sede viene tratteggiato il trattamento ormonale “cross sex” effettuato in Italia in accordo con gli standard d'intervento dell'Osservatorio Nazionale sull'Identità di Genere (O.N.I.G.). Il trattamento dei soggetti in transizione da maschio a femmina (MtF) viene effettuato con estradiolo ed antiandrogeni mentre nei soggetti in transizione da femmina a maschio (FtM) con testosterone. I trattamenti standardizzati sono, comunque, personalizzabili nella posologia, via di somministrazione e tipo di associazione tra farmaci

e devono essere mantenuti fino agli interventi di riassegnazione chirurgica del sesso. Dopo la chirurgia inizia il trattamento ormonale sostitutivo con l'ormone del nuovo sesso di appartenenza che è auspicabile mantenere "a vita". Questi trattamenti sono in complessivo sicuri su di un piano di salute quando somministrati a soggetti sani o ben compensati qualora affetti da co-patologie; presentano scarsi e tollerabili effetti collaterali se somministrati nei dosaggi corretti e non paiono determinare rischi neanche nei tempi lunghi di utilizzo. Il follow up endocrino-metabolico personalizzato rappresenta lo strumento indispensabile per mantenere questi soggetti in condizioni di buona salute evitando le complicanze dell'ipogonadismo scompensato.

Abstract

Gender Identity Disorder is a medical condition that physicians have to face in order to give appropriate responses in terms of treatments aimed to improve the patients' quality of life. Specific Standards of Care have been formulated in several Countries. These standards include a psychologic, endocrine and surgical approach. Here we describe the cross-sex hormonal treatment performed in Italy according to the ONIG (National Observatory on Gender Identity) standards of care. MtF subjects are treated with estradiol and antiandrogens while FtM subjects receive testosterone. Standard treatments may be individualized in terms of dosage, administration route, and drug associations and must be continued until surgical sexual reassignment is performed. After surgery, lifelong hormonal replacement therapy is initiated. These hormonal therapies are overall safe when administered to healthy subjects or to patients with well-controlled co-morbidities. When given at appropriate dosage they show few and tolerable side effects and do not seem to determine significant risks in the long term. Tailored endocrine and metabolic follow-up is an essential tool to keep these subjects in good health and to avoid the complications of non-compensated hypogonadism.

Introduzione

Le persone con Disturbo dell'Identità di Genere (DIG) sempre più frequentemente si rivolgono alla classe medica per essere aiutati nella loro ricerca di un aspetto più consono all'identità percepita. In questo contesto si pone il trattamento ormonale che è in grado di revertire gran parte del fenotipo specifico del sesso biologico e di indurre i caratteri sessuali secondari del sesso opposto.

Il trattamento ormonale (TO) è indicato per le persone maggiorenni con DIG che richiedono un adeguamento fenotipico alla propria identità le quali sono, nella grande maggioranza, orientate alla successiva conversione chirurgica del sesso (RCS). Il TO si articola in due fasi:

1. Il percorso di transizione (già inteso come test della vita reale o RLE)
2. Il trattamento sostitutivo cronico (replacement therapy - RT)

L'endocrinologo dedicato alla gestione clinica dei soggetti con DIG nel suo operare deve attenersi ai consigli operativi messi a punto dalle maggiori Associazioni/Società scientifiche che si occupano dell'argomento, nello specifico: il WPATH (World Professional Association for Transgender Health), l'ONIG (Osservatorio Nazionale Identità di Genere), la SIAMS (Società Italiana di Andrologia e Medicina della Sessualità)^(1,2,3) (Tabella I).

Associazione / Società scientifica	Sito Internet	Standards of Care (SOC) e rif. bibliografico
World Professional Association for Transgender Health (WPATH)	www.wpath.org	versione 7 - 2011 ⁽¹⁾
Osservatorio Nazionale Identità di Genere (ONIG)	www.onig.it	revisione 2009 ⁽²⁾
Società Italiana di Andrologia e Medicina della Sessualità (SIAMS)	www.siams.info	Consensus SIAMS-ONIG 2009 ⁽³⁾

Tabella I. Percorsi codificati e riferimenti operativi per la gestione clinica dei soggetti con DIG.

In base a tali linee d'intervento l'endocrinologo può iniziare a trattare una persona con DIG esclusivamente quando questa sia in possesso di una relazione dei professionisti della salute mentale (psicologo/psichiatra) che attestino, nello specifico, l'indicazione al trattamento con ormoni del sesso cui il soggetto sente di appartenere ("cross sex"). In Italia gli standard

d'intervento dell'O.N.I.G. prevedono che la persona durante la RLE debba essere contemporaneamente seguita in psicoterapia.

La gestione clinica del trattamento ormonale

Prima della prescrizione ormonale l'endocrinologo deve valutare la persona attraverso: anamnesi, E.O. ed esami (ematochimici generali, ormonali e strumentali), finalizzati all'approfondimento delle condizioni complessive di salute ed all'eventuale compenso o risoluzione di problematiche eventualmente presenti che possano creare difficoltà nella gestione del trattamento ormonale cross sex. Parimenti dovrà escludere la possibilità di un trattamento ormonale qualora siano presenti situazioni patologiche severe che rappresentino controindicazioni assolute.

Percorso di transizione (RLE)

La persona con DIG maggiorenne prima di iniziare il TO deve dimostrare di aver ben compreso il significato e le modalità del TO e deve firmare i consensi informati all'assunzione dei preparati ormonali "off label" dopo averne valutato le schede esplicative. Per le persone in percorso da maschio a femmina (MtF) il TO si articola su due capisaldi: estrogeni (estradiolo) ed anti-androgeni. L'estradiolo è l'unico estrogeno attualmente consigliato da tutte le linee d'intervento che hanno definitivamente bandito l'etinil-estradiolo e gli estrogeni coniugati equini; può essere somministrato per via orale, transdermica (TD) o parenterale in un dosaggio che è circa il doppio di quanto utilizzato come replacement nelle donne biologiche. Gli anti-androgeni esercitano un effetto anti "maschile" mediante meccanismi diversi a livello dei recettori degli androgeni o dell'attivazione del testosterone a livello dell'unità pilo-sebacea. Le molecole utilizzabili sono: Ciproterone Acetato, Spironolattone, inibitori della 5 α reduttasi (dutasteride, finasteride).

La posologia va personalizzata in base alla situazione clinica di partenza e ad alcuni parametri quali i livelli di testosterone e di estradiolo in corso di somministrazione, gli effetti riferiti dagli interessati e le modificazioni fenotipiche indotte⁽⁴⁾. La posologia media delle molecole utilizzate è riportata nella Tabella II.

I livelli circolanti di estradiolo e gonadotropine vanno mantenuti in un range femminile paragonabile a quello di un periodo follicolare avanzato ed il testosterone va velocemente azzerato. La PRL spesso aumenta a livelli medi (< 100 ng/ml) come conseguenza iatrogena; tale reperto, per lo più,

Preparati estrogenici orali		Preparati estrogenici TD		Antiandrogeni centrali/periferici	
Formulazione	Posologia media	Formulazione	Posologia media	Formulazione	Posologia media
Estradiolo valerato cp 2 mg	2 - 6 mg/die	Gel: Estradiolo emidrato corrispondente a 1 mg di estradiolo	2 mg o più/die	Ciproterone acetato 50 mg	25 - 200 mg/die
Estradiolo micronizzato cp 2 mg	2 - 6 mg/die			Spironolattone 25 - 100 mg	25 - 300 mg/die
				Flutamide 250 mg	125 - 250 mg/die
				Finasteride 5 mg	2,5 - 5 mg/die
				Dutasteride 0,5 mg	0,25 - 0,5 mg/die

Tabella II. Preparati utilizzati nel trattamento MtF e loro posologia media.

non costituisce preoccupazione e concorre allo sviluppo della ghiandola mammaria desiderata⁽⁵⁾.

Le maggiori modificazioni fenotipiche in senso femminile avvengono nello spazio di 12-18 mesi in base alla capacità dell'organismo di rispondere agli ormoni somministrati; questa risposta è determinata dalla funzionalità dei recettori per gli steroidi sessuali, stabilita su base genetica⁽⁶⁾. Le maggiori modificazioni avvengono con una successione abbastanza costante (Tabella III) ma è, comunque, comune il rilievo di un perfezionamento degli effetti endocrini a livello dei vari tessuti ancora negli anni successivi di trattamento.

La recettorialità per gli ormoni gonadici, definita su base genetica, spiega l'ampia variabilità della risposta fenotipica a trattamenti steroidei analoghi, come è facilmente osservabile, per esempio, a riguardo della ginecomastia iatrogena. È importante comunicare questi concetti alle persone trattate per non determinare false o irreali aspettative: il fenotipo può modificarsi in base alla capacità genetica di risposta agli steroidi sessuali mentre l'endocrinologo può agire solo modificando il pool ormonale disponibile!

Per le persone in percorso da femmina a maschio (FtM) il TO si basa sulla somministrazione di testosterone (T) a dosaggi crescenti fino a determinare valori plasmatici in un range maschile fisiologico per i pari età. Il T può essere somministrato raramente per via orale (T undecanoato), più frequentemente

Soggetti MtF	Soggetti FtM
Entro sei mesi <ul style="list-style-type: none"> • Assottigliamento cute e riduzione dell'androgenismo cutaneo • Riduzione/scomparsa erezioni spontanee 	Entro sei mesi <ul style="list-style-type: none"> • Iperandrogenismo cutaneo • Incremento dimensioni clitoride • Scomparsa dei flussi mestruali
Oltre sei mesi <ul style="list-style-type: none"> • Ridistribuzione del grasso corporeo in senso ginoide • Ginecomastia • Atrofia testicolare 	Oltre sei mesi <ul style="list-style-type: none"> • Aumento massa muscolare con redistribuzione del grasso corporeo • Abbassamento del tono della voce

Tabella III. Effetti della terapia ormonale cross-sex durante la RLE (casistica personale).

per via TD o i.m. In questo caso sono a disposizione preparazioni “classiche” con effetto “picco” dopo la somministrazione oppure la più moderna formulazione long acting a rilascio costante^(7,8). La posologia va personalizzata in base alle caratteristiche del soggetto ed i parametri da considerare sono: i livelli di testosterone e di estradiolo in corso di somministrazione, le modificazioni fenotipiche indotte, il blocco del ciclo mestruale e gli effetti riferiti dagli interessati stessi. Le posologie delle formulazioni di T sono riportate nella Tabella IV.

Preparati T orali		Preparati T TD		Preparati T i.m.	
Formulazione	Posologia media	Formulazione	Posologia media	Formulazione	Posologia media
Testosterone undecanoato cps 40 mg	160 - 240 mg/die	Gel corrispondente a 50 mg di testosterone	50 - 100 mg /die	Testosterone undecanoato 1000 mg	1000 mg/12-16 settimane
				Testosterone enantato 100 mg	100 - 200 mg/1-2 settimane
				Miscela di esteri	1 fiala/2 settimane

Tabella IV. Preparati utilizzati nel trattamento FtM e loro posologia media.

Soggetti MtF	Soggetti FtM
<ul style="list-style-type: none"> • Emocromo con formula, glicemia, creatinina • Colesterolo totale, trigliceridi, HDL • LH • Estradiolo, testosterone, PRL • AST, ALT, bilirubina totale • Na e K (se in trt con spironolattone) • Altri esami in base alle condizioni cliniche ed eventuali comorbidità 	<ul style="list-style-type: none"> • Emocromo con formula, glicemia, creatinina • Colesterolo totale, trigliceridi, HDL • LH • Testosterone • Estradiolo (se più alto del range maschile) • Altri esami in base alle condizioni cliniche ed eventuali comorbidità

Tabella V. Esami ematochimici ed ormonali effettuati trimestralmente durante la RLE.

Le maggiori modificazioni fenotipiche in senso maschile avvengono nello spazio di 12-18 mesi in base alla capacità dell'organismo di rispondere al T somministrato in relazione alla funzionalità del recettore per gli androgeni (Tabella III), argomento ampiamente dibattuto in letteratura negli ultimi 10 anni⁽⁹⁾. In ogni caso anche per questo gruppo di persone l'effetto mascolinizzante si esprime anche negli anni successivi di trattamento.

L'endocrinologo controlla la persona in RLE ogni 3-4 mesi sia sul piano clinico che tramite esami ematochimici ed ormonali (Tabella V). La maggior parte delle modificazioni fenotipiche vengono registrate e valutate solo sul piano osservazionale non essendoci metodi standardizzati di facile fruibilità nella pratica clinica. Solo per la valutazione obiettiva della ginecomastia è stata messa a punto, dalla radiologia senologica del nostro presidio ospedaliero, una misurazione durante la mammografia che permette di considerare adeguato come sviluppo ghiandolare uno spessore muscolo pettorale – capezzolo > 6 cm. Uno degli aspetti maggiormente problematici ed oggetto di controllo endo-metabolico speciale è il peso corporeo. Il nuovo assetto ormonale e le modificazioni metaboliche che questo comporta possono, in entrambi i sessi biologici ed in entrambi i percorsi, facilitare un accumulo di adipe se coesistono errori del comportamento alimentare su base polifattoriale.

Durante il TO le modificazioni indotte consentono ai soggetti un ruolo di genere sempre più aderente al sesso cui sentono di appartenere e tale condizione determina, generalmente, un consistente miglioramento della qualità di vita, evidenziabile tramite tests psicologici proiettivi e dai rilievi emergenti nella psicoterapia di supporto che questi soggetti mantengono durante l'intera RLE. È interessante sottolineare, ad esempio, come l'immagine corporea, valutata

attraverso le risposte ai test specifici, sia fonte di profondo disagio prima del trattamento ormonale mentre venga percepita in modo molto più positivo dopo il primo anno di TO in entrambi i gruppi di soggetti (dati personali non pubblicati). Gli effetti collaterali di questi trattamenti sono rari, generalmente modesti e ben tollerabili se gli ormoni somministrati determinano “in vivo” valori plasmatici in range fisiologico (Tabelle VI-VII). È sempre da evitarsi una condizione in cui vi siano prolungati livelli plasmatici sovra-fisiologici di ormoni sessuali⁽¹⁰⁾.

Al termine del periodo standard di trattamento ormonale l'endocrinologo e gli specialisti della salute mentale redigono una relazione circa lo svolgimento del periodo medesimo indispensabile all'interessato per fare richiesta al Giudice del Tribunale competente di RCS e successivo cambio anagrafico ai sensi della Legge 164/84 (e successive modifiche). Dal punto di vista

Livello di rischio	Ormoni femminilizzanti	Ormoni mascolinizzanti
<i>Probabile aumento del rischio</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Trombosi venosa profonda¹ • Aumento transaminasi • Calcolosi biliare • Aumento di peso • Ipertrigliceridemia 	<ul style="list-style-type: none"> • Policitemia • Aumento di peso • Alopecia • OSAS
<i>Probabile aumento del rischio in presenza di fattori di rischio addizionali²</i>	<ul style="list-style-type: none"> • CAD 	
<i>Possibile aumento del rischio</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Iperensione • Iperprolattinemia 	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento transaminasi • Iperlipidemia
<i>Possibile aumento del rischio in presenza di fattori di rischio addizionali</i>	<ul style="list-style-type: none"> • DM 2 	<ul style="list-style-type: none"> • Slatentizzazione di patologie psichiatriche³ • CAD • Iperensione • DM 2
<i>Non aumento del rischio</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tumore mammario 	<ul style="list-style-type: none"> • Osteoporosi • Tumore mammario • Tumore ovarico • Tumore uterino
<p>¹ Il rischio è aumentato per somministrazione di estrogeni orali rispetto alla somministrazione TD.</p> <p>² I fattori di rischio addizionali includono anche l'età.</p> <p>³ Disturbo bipolare, schizoaffective ed altri con sintomi maniacali o psicotici. Questo evento avverso appare associato a livelli sovra-fisiologici di testosterone.</p>		

Tabella VI. Rischi associati alla terapia ormonale cross-sex.

Soggetti MtF	Soggetti FtM
<ul style="list-style-type: none"> • Incremento ponderale • Astenia • Deflessione tono umore • Ginecomastia dolorosa • IperPRL 	<ul style="list-style-type: none"> • Incremento ponderale • Aumento appetito • Agitazione/nervosismo insonnia • Defluvium ed iperandrogenismo • Spotting sporadico

Tabella VII. Effetti collaterali durante la RLE in corso di cross-sex terapia (casistica personale).

ormonale il soggetto, in tutto il periodo che lo separa da detto intervento, dovrà effettuare il TO stabilito con visite di controllo ogni 4-6 mesi in base alla situazione clinica.

Circa 1 mese prima dell'intervento di RCS la persona MtF dovrà sospendere il trattamento con estradiolo e ciproterone acetato, per non elevare il rischio trombotico già presente in una chirurgia pelvica di durata non trascurabile, mentre potrà mantenere fino all'intervento gli inibitori della 5 α reduttasi e lo spironolattone. Non è da porre analogia indicazione per i soggetti FtM in quanto il testosterone non determina rischi trombotici ed, invece, è di estremo supporto per migliorare l'outcome del soggetto dopo una contemporanea istero-annessiectomia e mastectomia.

Il trattamento sostitutivo dopo RCS (RT)

Dopo la RCS le persone che hanno effettuato la conversione (neodonne e neouomini) risultano ipogonadici iatrogeni. Per non incorrere nelle note complicanze di questa condizione (osteoporosi, alterazioni metaboliche, cardio-vasculopatie, ecc), devono effettuare una RT: estradiolo nelle neodonne e testosterone nei neo uomini⁽¹¹⁾. Le molecole ed i preparati farmaceutici sono assolutamente analoghi a quelli utilizzati nella fase del percorso ma la posologia potrà essere ridotta, non essendo più necessario, in questo contesto, inibire anche la gonade. Il valore rispettivamente di estradiolo o testosterone, comprensivo della gonadotropina specifica (LH) va controllato almeno ogni 6 mesi nei primi anni dopo l'intervento, per verificarne la correttezza e successivamente annualmente come per ogni soggetto affetto da ipogonadismo.

Questi RT dovrebbero essere mantenuti per moltissimi anni se non addirittura per l'intera vita e questo pone alcune difficoltà perché bisogna motivare il mantenimento del follow up.

Talvolta ci si trova a decidere circa la ripresa di un trattamento con estradiolo interrotto per anni in un soggetto fumatore: condizione nota come a rischio trombotico. In tali condizioni diventa indispensabile agire sullo stile di vita modificando comportamenti e condizioni di rischio cardio-vascolare e scegliere la via di somministrazione TD che meno impatta sull'equilibrio emocoagulativo.

Gli studi fino ad ora pubblicati lasciano relativamente tranquilli, invece, circa il basso rischio di malattie oncologiche e la netta riduzione degli incidenti vascolari acuti da quando non si somministra più l'etinil estradiolo^(12,13,14).

Il DIG nei bambini ed adolescenti

Il DIG primario si manifesta di norma in un'età molto precoce, quando il soggetto inizia a manifestare spontaneamente atteggiamenti e preferenze tipicamente del sesso opposto⁽¹⁵⁾. In questi ultimi anni si è cominciato a prestare attenzione, da parte dei gender teams più avanzati, in Europa particolarmente in Olanda ed Inghilterra, ad un'entità definibile come A.G.I.O. (Atypical Gender Identity Organization)⁽¹⁶⁾. Sono nati teams specificamente orientati ai minori che garantiscono un supporto ai ragazzi ed alle famiglie. Quando il team si esprime circa l'opportunità di un trattamento ormonale, questo viene effettuato con molecole ad attività antagonista nei confronti del GnRH (GnRHA) che determinano il blocco degli ormoni della pubertà permettendo all'interessato di vivere senza la presenza di ormoni gonadici il tempo necessario per mantenere un ulteriore approfondimento psicologico prima di iniziare il TO "cross sex"^(17,18). In Italia si sono appena avviati i primi centri di accoglienza e supporto psicologico per minorenni e famiglie in presenza di A.G.I.O. a Roma, Torino, Firenze e Bologna, mentre gli endocrinologi si stanno confrontando circa i protocolli d'intervento da adottare.

Conclusioni e prospettive

Attualmente l'intervento clinico nei confronti dei soggetti con DIG adulti che si rivolgono ai servizi specialistici è normato dagli standard d'intervento redatti da Associazioni nazionali, internazionali e Società scientifiche che hanno cercato di coordinare le richieste degli interessati con le scarse evidenze scientifiche tuttora presenti in letteratura. Le modalità ed i concetti base relativi al TO sono ormai largamente condivisi ma l'esperienza e la discrezionalità dell'endocrinologo, che segue questo specifico settore, rappresentano ancora un valore aggiunto nella gestione spesso complessa di questi soggetti che

sono persone sane che devono assumere ormoni “cross sex” per il resto della loro vita! Questo è uno scenario nuovo che impone agli operatori sanitari ulteriori responsabilità, soprattutto nei termini di mantenere follow up regolari e standardizzati nei lunghi periodi dopo l’RCS. È altresì necessario che i pochi gender teams dedicati a questa attività si mantengano in stretto contatto per poter accumulare esperienze numericamente più significative che possano permettere di raggiungere, in tempi ragionevoli, livelli buoni di evidenza circa i comportamenti clinici migliori a tutti i livelli. Questo sarà ancora più necessario nell’ambito della gestione dell’A.G.I.O. – DIG dei soggetti giovanissimi, nei confronti dei quali la responsabilità degli operatori è massima e solo esperienze condivise potranno aiutare a discriminare le scelte terapeutiche migliori che già si stanno cercando di normare.

BIBLIOGRAFIA

1. Coleman E, Bockting W, Botzer M, Cohen-Kettenis P, DeCuypere G, Feldman J, Fraser L, Green J, Knudson G, Meyer WJ, Monstrey S, Adler RK, Brown GR, Devor AH, Ehrbar R, Ettner R, Eyler E, Garofalo R, Karasic DH, Lev AI, Mayer G, Meyer-Bahlburg H, Hall BP, Pfaefflin F, Rachlin K, Robinson B, Schechter LS, Tangpricha V, van Trotsenburg M, Vitale A, Winter S, Whittle S, Wylie KR, Zucker K. *Standards of Care for the Health of Transsexual, Transgender, and Gender-Nonconforming People, Version 7*. Int J Transgenderism. 2011; 13: 165-232.
2. Osservatorio Nazionale Sull’Identità Di Genere - ONIG. *Standard Sui Programmi di Adeguamento nel Disturbo dell’Identità di Genere*. 2009. www.onig.it.
3. Godano A, Maggi M, Jannini E, Meriggiola MC, Ghigo E, Todarello O, Lenzi A, Manieri C. *SIAMS-ONIG Consensus on hormonal treatment in gender identity disorders*. J Endocrinol Invest. 2009; 32: 857-864.
4. Hembree WC, Cohen-Kettenis P, Delemarre-van de Waal HA, Gooren LJ, Meyer WJ 3^d, Spack NP, Tangpricha V, Montori VM; Endocrine Society. *Endocrine treatment of transsexual persons: an Endocrine Society clinical practice guideline*. J Clin Endocrinol Metab. 2009; 94: 3132-3154.

5. Gooren LJ, Harmsen-Louman W, van Kessel H. *Follow-up of prolactin levels in long-term oestrogen-treated male-to-female transsexuals with regard to prolactinoma induction.* Clin Endocrinol. 1985; 22: 201-207.
6. Nott SL, Huang Y, Fluharty BR, Sokolov AM, Huang M, Cox C, Muyan M. *Do estrogen receptor beta polymorphisms play a role in the pharmacogenetics of estrogen signaling?* Curr Pharmacogenomics Person Med. 2008; 6: 239-259.
7. Jacobbeit JW, Gooren LJ, Schulte HM. *Safety aspects of 36 months of administration of long-acting intramuscular testosterone undecanoate for treatment of female-to-male transgender individuals.* Eur J Endocrinol. 2009; 161: 795-798.
8. Meriggiola MC, Armillotta F, Costantino A, Altieri P, Saad F, Kalthorn T, Perrone AM, Ghi T, Pelusi C, Pelusi G. *Effects of testosterone undecanoate administered alone or in combination with letrozole or dutasteride in female to male transsexuals.* J Sex Med. 2008; 10: 2442-2453.
9. Zitmann N. *Androgen receptor gene CAG repeat length and body mass index modulate the safety of long-term intramuscular testosterone undecanoate therapy in hypogonadal men.* J Clin Endocrinol Metab. 2007; 92: 3844-3853.
10. Gooren LJ, Giltay E, Bunck M. *Long-Term Treatment of Transsexuals with Cross-Sex Hormones: Extensive Personal Experience.* J Clin Endocrinol Metab. 2008; 93: 19-25.
11. Mueller A, Kiesewetter F, Binder H, Beckmann M, Dittrich R. *Long-Term Administration of Testosterone Undecanoate Every 3 Months for Testosterone Supplementation in Female-to-Male Transsexuals.* J Clin Endocrinol Metab. 2007; 92: 3470-3475.
12. Mueller A, Gooren L. *Hormone-related tumors in transsexuals receiving treatment with cross-sex hormones.* Eur J Endocrinol. 2008; 159: 197-202.
13. Meriggiola MC, Berra M. *Long-term cross-sex hormone treatment is safe in transsexual subjects.* Asian J Androl. 2012; 14: 813-814.
14. Van Kesteren PJ, Asscheman H, Megens JA, Gooren LJ. *Mortality and Morbidity in transsexual subject treated with cross-sex hormones.* Clin Endocrinol. 1998; 47: 337-342.
15. Cohen-Kettenis P, Pfäfflin F. *The DSM Diagnostic Criteria for Gender Identity Disorder in Adolescents and Adults.* Arch Sex Behav. 2010; 39: 499-513.
16. Di Ceglie D. *Reflections on the nature of the atypical gender identity organisation.* In "A Stranger in My Own Body: Atypical Gender Identity Development and Mental Health", Eds Di Ceglie D with Freedman D, 1998: 9-25, Karnac Books, London.
17. Carel J, Rogol A, Ghizzoni L, Palme M. *Consensus Statement on the Use of Gonadotropin-Releasing Hormone Analogs in Children.* Pediatrics 2009; 123: 752-762.
18. Cohen-Kettenis P, Van de Waal D, Gooren L. *The Treatment of Adolescent Transsexuals: Changing Insights.* J Sex Med. 2008; 5: 1892-1897.

ALCOOL: PATOLOGIA E VULNERABILITÀ DI GENERE

Vittorio Gallo¹, Alessandra Venesia¹, Sebastiano Colombatto²

¹ IV Medicina Interna - Dipartimento di Scienze Mediche
Scuola di Medicina - Università di Torino,

² Sezione di Biochimica - Dipartimento di Oncologia
Scuola di Medicina - Università di Torino

Parole chiave: *Alcool*
Genere
Attività alcool deidrogenasica

Key words: *Alcohol*
Gender
Alcohol dehydrogenase activity

Riassunto

L'abuso di bevande alcoliche è una delle cause più rilevanti di malattia e mortalità nei paesi occidentali. Inoltre, gli studi epidemiologici degli ultimi anni hanno evidenziato un netto incremento del consumo di alcool nel sesso femminile, con un impatto di ordine clinico più rilevante e precoce rispetto a quanto accade nei maschi.

I motivi della variabilità degli effetti dell'alcool tra gli appartenenti a generi diversi sono legati alle differenze costituzionali tra i due sessi in relazione alla diversa struttura fisica, alla differente distribuzione delle sostanze esogene nel contesto dell'organismo, all'assetto ormonale e, non ultimo, al corredo enzimatico, che costituisce al momento attuale, un interessante motivo di approfondimento di queste tematiche in particolare per quanto riguarda l'attività enzimatica della alcool deidrogenasi gastrica.

Altra rilevante variabile pare essere quella legata alla presenza nello stomaco e nel duodeno dell'*Helicobacter Pylori* e dell'eventuale associazione con la gastrite e fatti infiammatori associati.

A lato di tutto ciò si pone l'aspetto sociale del problema. In Italia circa il 67% delle donne attualmente consuma bevande alcoliche, a fronte del 43%

degli anni '80. L'incremento riguarda sia le giovani generazioni di donne, che iniziano a bere alcool ad un'età sempre più precoce, sia donne più mature, prive di un'educazione formale sulla "cultura dell'alcool".

Questi dati sono sufficienti per farci riconsiderare il problema non solo dal punto di vista epidemiologico, clinico ed etico, ma anche in relazione alle fisiologiche differenze biologiche "di partenza" esistenti tra maschi e femmine.

Abstract

Alcohol abuse is a major cause of morbidity in western countries. The rate of women abusing in alcoholic beverages is increasing in the last decades and alcohol abuse causes heavier damages in women than in men.

The reasons of this fact are the physiological differences about body composition, enzymatic and hormonal patterns. Different types of drinking behavior are delineated. The stomach is involved in first-pass metabolism of alcohol in humans. Clinical and experimental data have been published regarding the influence of age and gender on the activity of alcohol dehydrogenase (ADH) in human gastric mucosa. ADH activity in human gastric mucosa is negatively associated with consumption of larger quantities of alcohol. The question of whether ADH activity is higher in males or females could be answered with respect to age. ADH activity in young men is distinctly higher compared to young women, but the opposite is true in middle-aged subjects. ADH activity is also presumably affected by the presence of *Helicobacter Pylori*, the presence of chronic gastritis and smoke habit. It is important to remember that risks related to alcohol consumption exist at any level, and increase progressively with the amount consumed; it seems therefore fair to better define "safe" as "low risk" quantities.

A daily alcohol intake can be considered "low risk" when it is lower than 20-40 grams in men and 10-20 grams in women.

Quali sono i confini tra un innocuo uso di bevande alcoliche e un uso a rischio di malattie alcool-correlate? Quali i fattori di rischio nei confronti delle malattie da alcool? Esistono differenti comportamenti tra generi in rapporto al consumo di alcool? Esiste la possibilità di trovarsi di fronte ad un diverso tipo di danno alcool-correlato nei maschi e nelle femmine? È possibile, come alcune ricerche hanno parzialmente dimostrato, che la donna ammalii in maniera più grave e più velocemente dell'uomo di malattie legate all'uso e all'abuso di etanolo? Dunque l'appartenenza al genere femminile per sé può costituire un fattore di rischio?

Queste le lecite domande che è necessario porsi di fronte al complesso panorama che riguarda le cosiddette abitudini voluttuarie, fra le quali il consumo di etanolo assume un ruolo di primo piano per il suo impatto clinico, sociale ed economico.

Trattare questo argomento è tanto più importante oggi quanto più si stanno facendo rigide le norme che regolano il consumo di bevande alcoliche in relazione alle diverse attività svolte nella vita quotidiana e nell'ambito medico. L'esempio che vale per tutti è il controllo del consumo di alcool nei soggetti alla guida di autoveicoli o in quelli in particolari situazioni lavorative.

Premesse

Nel mondo occidentale l'alcool rappresenta la sostanza di abuso più diffusa ed utilizzata, meno criminalizzata e più reclamizzata, un cocktail (per stare in tema) che porta a considerarla una delle piaghe più infette e dilaganti che in qualche modo infestano la nostra società.

Pur essendo a tutti gli effetti una droga con potenti effetti ansiolitici e maleadattativi, pur procurando tolleranza e crisi di astinenza, pur essendo strettamente correlata ad episodi di violenza e/o di situazioni tragiche (vedi incidenti stradali, aggressioni), pur essendo certa la sua dinamica quale causa di una lunga serie di malattie (gastriti, ulcere gastriche, epatiti, tumori, cirrosi, infertilità, teratogenicità), l'alcool è alla facile portata di tutti a costi accessibili senza un sostegno cognitivo riferentesi alle reali problematiche che esso procura.

In realtà siamo immersi in una serie di immagini e di messaggi pubblicitari orientati ad aumentare il consumo di alcolici. Le strade sono invase da enormi cartelloni pubblicitari che reclamizzano superalcolici legando il loro consumo alla possibilità di "entrare in un mondo fantastico", prevalendo così la proposizione estetica ed accattivante. La pubblicità televisiva aggiunge all'immagine anche il suono, che facilita ulteriormente

l'assorbimento del messaggio lesivo e deviante. La nostra stessa cultura riferisce l'utilizzo dell'alcool ad una sorta di rituale di iniziazione all'età adulta, lo stesso gesto del bere nell'immaginario collettivo viene legato ad espressioni di socializzazione, i luoghi del bere associati all'incontro e alla solidarietà.

Esiste, invece, una diversa realtà che parla di imprecisione di manovre anche semplici, di sopravvalutazioni delle proprie capacità di guida, di riduzione dei riflessi e di perdita del potere di valutazione critica della realtà. Ecco quindi le drammatiche immagini delle "stragi del sabato sera". Una realtà che parla di epatiti e pancreatici acute e croniche, di cirrosi, di tachicardie parossistiche, di delirium tremens, di episodi di coma, di violenze pubbliche e private. Di atteggiamenti irresponsabili e smentizzazione dei nostri peggiori sentimenti e desideri.

Introduzione

La grande quantità di controlli effettuati negli ultimi anni su soggetti d'ambo i sessi, ha confermato alcuni dati già presenti nella letteratura medica a partire dagli anni 80 riguardanti la maggior "vulnerabilità" del genere femminile in rapporto all'uso e all'abuso di bevande alcoliche^(1,2).

In Italia circa il 67% delle donne attualmente consuma bevande alcoliche, a fronte del 43% degli anni '80. L'incremento non riguarda solo le giovani generazioni ma coinvolge anche le donne più mature, prive di un'educazione formale sulla "cultura dell'alcool". L'effetto sulla salute della donna s'è dunque mostrato attraverso l'incremento delle patologie alcol-correlate.

I dati italiani più recenti indicano circa 13.000 donne alcoliste in trattamento presso le strutture del Servizio Sanitario Nazionale, 24.000 all'anno i ricoveri di donne per cause totalmente attribuibili all'alcol, e circa 30.000 decessi, nell'anno 2002, tra maschi e femmine al di sopra dei 20 anni per cause alcool-correlate. A questi è da aggiungere il numero crescente di giovani che muore al di sotto dei 20 anni a causa di incidenti stradali in cui l'abuso di alcool ha giocato un drammatico ruolo. Nell'ambito delle dipendenze da sostanze, l'alcol è dunque la causa principale di disabilità e di malattie croniche che potrebbero essere parzialmente o totalmente evitate attraverso semplici variazioni dello stile di vita ed è, al momento attuale, solo o in associazione con altri principi attivi, la maggior causa di morte e morbilità in questo ambito socio-sanitario.

In Italia l'alcool è causa:

- del 3% circa di tutti i decessi femminili e del 6,5% di quelli maschili,
- del 3% di tutti i decessi per tumori femminili (mammella, utero ecc.),
- del 2% dei decessi femminili da patologie cardiovascolari,
- del 40% dei decessi per cirrosi epatica nella donna,
- del 12% della mortalità femminile per incidenti,
- del 12% della mortalità femminile a causa di lesioni volontarie.

(Dati del Ministero della Sanità).

Nell'ambito della distribuzione per età dell'abitudine al bere bevande alcoliche, è interessante notare le differenze di comportamento nelle diverse fasce.

– *Le adolescenti.*

Bevono prevalentemente birra, aperitivi superalcolici. A distanza si attesta il consumo del vino. Bevono usualmente in gruppo, fuori pasto, fuori dal contesto familiare o domestico e concentrano il consumo (e l'abuso) nei fine settimana.

Il 10% circa va incontro ad alterazioni comportamentali almeno una volta nell'anno consumando più di 5 bevande alcoliche in un'unica occasione (binge drinking).

Le adolescenti bevono per lo più in funzione delle potenzialità dell'alcol come sostanza disinibente e socialmente aggregante, piuttosto che per il gusto "estetico" dell'alcool di per sé.

– *Le donne tra i 35 e i 45 anni*

Sono quelle che in Italia costituiscono il numero più elevato di bevitrici problematiche. Le bevande preferite sono, nell'ordine, vino, birra, aperitivi alcolici, amari. È in aumento il numero di donne che bevono fuori pasto. Circa il 10% pratica il "binge drinking" in solitudine o in compagnia. Si tratta dunque, sovente, di abitudini sommerse.

– *Le donne anziane*

Le donne over 65 anni bevono prevalentemente, nell'ordine, vino, birra e amari nel contesto domestico, mantenendo così nascosta la loro abitudine per timore di riprovazione sociale. Tale atteggiamento rende più difficoltoso il rilevamento di eventuali problemi alcol-correlati ed è il motivo di un riscontro spesso tardivo, ma frequente, dell'alcol-dipendenza tra pensionate e casalinghe della "terza età". La vedovanza, una minore partecipazione alla vita attiva e l'isolamento sociale secondario a limitazioni fisiche possono favorire fenomeni di abuso.

Il metabolismo dell'alcool

È conveniente ricordare brevemente, per completezza di trattazione, alcuni noti e meno noti dati riguardanti il metabolismo dell'etanolo⁽¹³⁾.

L'alcool si ottiene dalla fermentazione facoltativa di zuccheri da parte di lieviti.

1. glucosio \rightleftharpoons piruvato \rightleftharpoons acetaldeide attiva + CO₂
2. acetaldeide attiva + alcol deidrogenasi + NADH + H⁺ \rightleftharpoons etanolo + NAD⁺

Alcuni esempi di bevande alcoliche e, tra parentesi, il vegetale da cui si ricavano.

Vino, brandy, cognac, grappa (uva)

Birra (orzo)

Rhum (canna da zucchero)

Whisky (orzo e avena)

Vodka (frumento, segale, patate)

Calvados (mele)

Gin (frutta, cereali, bacche di ginepro)

L'etanolo non è una componente necessaria della dieta ma può essere considerato come: nutriente, come agente tossico (tossicità acuta e tossicità cronica), come droga psicoattiva (causa disturbi comportamentali, induce dipendenza a seconda di diverse circostanze quali quantità, frequenza di assunzione, ingestione con altri nutrienti, differenze individuali genetiche, sociali, in rapporto alla assunzione di farmaci). Gli effetti dell'etanolo sono pertanto variabili.

L'alcool è comunque un'importante fonte energetica fornendo, 1 grammo di sostanza, circa 7,1 kcal (29,7 kJ). Tali calorie vengono identificate col termine di "calorie vuote", non apportando esse all'organismo alcun nutriente.

L'etanolo rappresenta 1-3% dell'introito calorico giornaliero nei soggetti che ne fanno un uso "sociale", mentre nei forti bevitori l'apporto calorico può giungere fino anche 50%.

Per la potenziale tossicità e per l'incapacità di accumularlo, l'organismo tende a metabolizzarlo ed eliminarlo il più rapidamente possibile. La priorità metabolica dell'etanolo, rispetto agli altri nutrienti è, alla fine, la causa principale degli effetti metabolici di questa sostanza su quasi tutti i nutrienti e sul rischio di malattia.

L'etanolo è una molecola debolmente polare che si muove facilmente tra le membrane e raggiunge facilmente l'equilibrio fra sangue e tessuti, viene

rapidamente assorbito per diffusione lungo tutto il tratto digerente: cavo orale, esofago, stomaco ed intestino. La massima velocità di assorbimento avviene quando si trova diluito (20%) e con l'aggiunta di anidride carbonica (spumanti e champagne). A digiuno viene assorbito per 80-90% e il picco alcolemico avviene dopo 30-45 minuti a digiuno e a 60-90 minuti in concomitanza del pasto. L'alcol diffonde immediatamente in tutti i tessuti e fluidi corporei in quantità proporzionale al loro contenuto in acqua, cosa che dà contezza delle differenze di concentrazioni alcoolemiche tra generi in relazione alla maggior quantità di acqua corporea del maschio rispetto alla femmina, motivo di maggiore diluizione e quindi di ridotta concentrazione.

L'alcolemia dipende dalla quantità ingerita, dalla concentrazione alcolica della bevanda, dalla modalità di assunzione (digiuno/pasto), peso, sesso – assetto ormonale, acqua corporea, *first pass metabolism* (vedi dopo) –, dai fattori genetici, dalla capacità individuale di metabolizzare l'alcool e infine dall'abitudine al consumo di alcool.

Il 90-95% della quantità di alcool assunta è metabolizzato dal fegato. Prima di giungere al fegato una piccola parte subisce un primo passaggio metabolico – *first pass metabolism* – (vedi dopo)⁽⁷⁾ a livello gastrico. Una ulteriore piccola quota viene metabolizzata dai reni, polmoni e muscoli.

1) Il meccanismo metabolico principale è rappresentato dalla *ossidazione* che avviene ad opera di enzimi deidrogenasici. La prima deidrogenasi che l'alcool incontra è, come detto, quella gastrica. Questa rappresenta una prima barriera metabolica. La quota di alcool non metabolizzata a livello gastrico viene quindi assorbita e giungerà al fegato attraverso il circolo generale, dove subirà la metabolizzazione più importante ad opera di tre sistemi enzimatici diversi. Il primo è costituito da due deidrogenasi:

- alcool deidrogenasi epatica
- aldeide deidrogenasi

La prima reazione trasforma l'alcool in acetaldeide, con liberazione di H⁺ e consumo di NAD⁺.

La seconda trasforma l'acetaldeide che si è creata in acido acetico, con liberazione di idrogeno e ancora consumo di NAD⁺

Queste due ossidazioni comportano sbilanciamento del rapporto NAD⁺ / NADH e ad eccesso di H⁺ all'interno della cellula con conseguente aumento di acidità e attivazione di misure atte a rialzare il pH: blocco della via metabolica che da piruvato porta alla formazione di glucosio, con trasformazione del piruvato in acido lattico. Le conseguenze relative

a tali variazioni metaboliche sono importanti e a volte gravi: nell'abuso acuto di alcool l'ipoglicemia è una delle complicazioni più temibili, specie quando si associa alla malnutrizione, tanto frequente negli alcoolisti cronici, nei quali si viene a creare acutamente un'ulteriore riduzione delle riserve epatiche di glicogeno a fronte della impossibilità di sopperire con la gluconeogenesi, bloccata a livello del piruvato.

Anche la beta ossidazione degli acidi grassi viene alterata. Gli idrogenioni in eccesso entrano nei mitocondri dove sono utilizzati al posto di quelli prodotti nel metabolismo degli acidi grassi, via che viene bloccata, con conseguente eccesso di grassi che si depositano negli epatociti creando il fenomeno della steatosi epatica, che a sua volta darà inizio alla cascata di eventi che porteranno al danno epatico da alcool fino alla cirrosi alcolica. (Figura 1).

- 2) Il secondo sistema è quello costituito dagli enzimi microsomiali, MEOS (*microsomal ethanol oxidizing system*), dove ad agire è una NADPH-ossidasi. Il citocromo P450E1 possiede alta affinità per l'etanolo che, anche qui, viene trasformato in acetaldeide e acqua. Il MEOS è un sistema inducibile, capace di aumentare la sua attività in caso di aumentata richiesta. La sua funzione può anche triplicarsi per far fronte alle necessità metaboliche di un eccesso di alcool introdotto (Figura 1). Il citocromo

1. Consumo moderato:	
Interviene la ALCOL DEIDROGENASI (enzima costitutivo), è un enzima citosolico Zn^{++} dipendente con $K_m = 1 \text{ mM}$. La Alcol Deidrogenasi è in grado di metabolizzare anche il metanolo.	
$CH_3CH_2OH + NAD^+$	$CH_3CHO + NADH + H^+$
2. Consumo elevato:	
Interviene il SISTEMA MICROSOMIALE CHE OSSIDA L'ETANOLO (MEOS, <i>microsomal ethanol oxidizing system</i> , sistema inducibile)	
$CH_3CH_2OH + NADPH + H^+ + O_2$	$CH_3CHO + NADP^+ + H_2O$ CYP2E1

Figura 1.

P450 e la catena metabolica mitocondriale, se stimolate, o in carenza di sistemi antiossidanti, come nell'alcolismo cronico, producono accumulo di radicali liberi intracellulari, come lo ione superossido, radicali idrossilici e il perossido di idrogeno, in grado di indurre alterazioni della permeabilità di membrana e alterazioni della sintesi delle proteine.

- 3) Il terzo sistema metabolizzante l'alcool è costituito dalla catalasi, che partecipa all'evento solo in minima parte, e comunque sempre con la formazione di acetaldeide come risultato.

Le differenze tra maschi e femmine

Il metabolismo dell'etanolo, sopra riassunto, è ormai noto da tempo, e la patogenesi di buona parte dei suoi effetti patologici, su organi come il fegato ed il pancreas, sul sistema nervoso centrale e periferico, sul sistema immunitario e riproduttivo e sull'apparato cardiovascolare, per citare gli eventi possibili più noti, sono ormai chiariti per una buona parte.

In ambito epidemiologico, parallelamente ad un'aumentata abitudine al fumo, si rileva dunque una dilagante abitudine all'alcol tra le nuove generazioni di donne. Gli studi di genere mettono ora l'accento proprio sul binomio alcool-donna. Nel passato, un minor "interesse" degli studi di genere nei confronti della donna poteva essere giustificato dal supposto più ampio campione di maschi disponibile in questo tipo di consumi, e dalla maggior riluttanza delle donne a parlare e ad affrontare un problema da sempre "sommerso". Così, nella maggior parte degli studi effettuati, i soggetti di genere maschile e femminile venivano usualmente associati, e i risultati clinici ed epidemiologici per decenni sono stati rappresentativi solo del loro insieme non mostrando, quindi, le differenze biologiche e cliniche esistenti tra maschi e femmine riguardo all'uso e all'abuso di alcol.

Fu solo all'inizio degli anni ottanta che si iniziò a focalizzare la differenza dell'impatto che l'alcool provocava in modo differente nei due sessi. Uno studio americano condotto su un'ampia coorte di soggetti con disturbi psichiatrici mostrò una prevalenza di abuso di alcool nel 23% dei maschi e nel 4% delle femmine (rapporto 5:1)⁽²⁾. Ma dieci anni dopo, in un successivo analogo studio, la prevalenza di abuso di alcool risultò essere del 20% nei maschi e del 8% nelle donne (rapporto 2.45:1)⁽³⁾. Altri, più recenti, studi clinico-epidemiologici hanno confermato un reale, pesante incremento del consumo e della dipendenza da etanolo nel sesso femminile⁽⁴⁾. In Europa lo

scenario è analogo, confermandosi anche la progressiva riduzione dell'età del primo contatto con l'alcol.

I prodotti di consumo con base alcolica sono diventati “bevanda sociale” comune tra le donne europee dei paesi industrializzati, e fra queste sono parallelamente aumentate le patologie organiche ed i problemi alcool-correlati. Un lavoro di Greenfield del 2002 ha mostrato come le donne vadano incontro ad “intossicazioni” più gravi con quantità di alcool inferiori a quelle ingerite dal maschio, sviluppando patologie più severe in tempi più brevi e più evidenti alterazioni dei processi cognitivi e delle prestazioni psicomotorie⁽⁵⁾.

Dunque, il sesso femminile raggiunge una concentrazione ematica alcolica più elevata rispetto ai maschi a parità di tempo, ammalando così di malattie alcol-correlate in tempi più brevi e in maniera più severa, rispetto al maschio, a fronte di quantità consumate inferiori o uguali.

Negli ultimi anni, un certo numero di lavori ha cercato di chiarire i meccanismi fisiopatologici alla base di questi eventi che sembrano, almeno in parte, essere legati al diverso assetto ormonale della donna rispetto all'uomo e, nella stessa donna, alle differenze ormonali tra periodo fertile e quello post-menopausale; ma anche essere in relazione all'assorbimento, al volume di distribuzione, al tasso di eliminazione e alla minore attività enzimatica della ADH gastrica.

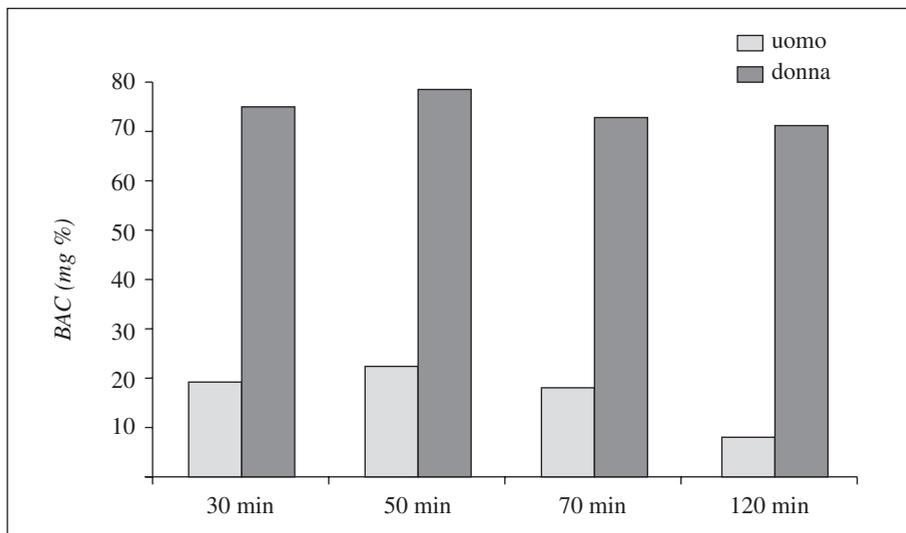


Figura 2. Differenza di concentrazione ematica alcolica (mg%) tra maschi e femmine a parità di assunzione alcolica.

Assai dimostrativi sono i dati ottenuti da Mancinelli e Guiducci⁽⁷⁾ sulle differenze di assorbimento tra maschio e femmina: somministrata la stessa quantità di alcool con le medesime modalità di assunzione in soggetti di sesso diverso e con differente BMI, si sono state misurate le alcolemie ad intervalli regolari nell'arco di 2 ore. La concentrazione massima raggiunta dall'uomo fu di circa 20 mg/100 ml con rapido ritorno a zero. Nella donna, invece, l'alcolemia raggiunse gli 80 mg/100 ml, dunque quattro volte tanto, con valori ancora elevati a distanza di 2 ore dall'assunzione. (Figura 2).

Ma non solo questo. Sono state le più recenti acquisizioni in ambito metabolico, infatti, a dischiudere differenti orizzonti riguardo al “modo” di ammalare di patologie alcool-correlate che il genere femminile mostra in confronto al maschio. Entra qui in gioco il meccanismo già sopra accennato del “*first pass metabolism*”, ovvero del metabolismo gastrico dell'etanolo che, sia in ordine di tempo sia anatomicamente, interviene prima di quello epatico.

Il first pass metabolism e la alcool-deidrogenasi gastrica

Grande rilevanza hanno assunto dunque le ricerche sul *first pass metabolism* (FPM) a livello gastrico⁽⁷⁾, in relazione alla quantità, all'attività e all'efficacia dell'alcool-deidrogenasi gastrica (ADH gastrica). La quantità di etanolo che non viene metabolizzata rapidamente con il FPM entra in circolo e viene quindi metabolizzata per la maggior quota nel fegato attraverso il sistema dell'alcol-deidrogenasi epatica. Si può quindi affermare che più è funzionante e attivo il metabolismo attuato dalla ADH gastrica, meno alcool dovrà impegnare il fegato nei successivi passaggi metabolici.

Nel fondamentale lavoro di Parlesak del 2002, si sottolineano i diversi fattori che possono contribuire al rilievo di risultati non sempre concordanti sull'attività dell'ADH gastrica in relazione all'età e alle difficoltà che si incontrano su diversi piani, laboratoristici e concettuali⁽⁹⁾. Ne diamo un breve riassunto di seguito.

- a) L'attività dell'ADH gastrica diminuisce nei pazienti con malattie infiammatorie della mucosa gastrica, in particolare quando si inserisce un'infezione da *Helicobacter Pylori*, e nella gastrite atrofica.
- b) Il polimorfismo genetico e le differenze nella distribuzione dei fenotipi isoenzimatici dell'ADH gastrica possono influenzare l'attività enzimatica.
- c) Molti farmaci interferiscono con l'attività dell'ADH gastrica: gli H2 antagonisti, l'aspirina, il paracetamolo, il propranololo.

- d) Le differenti concentrazioni di substrato usate nei diversi lavori possono essere responsabili dei diversi risultati.
- e) Nei vari studi effettuati è stata rilevata una larga variabilità inter-individuale di attività enzimatica ADH – gastrica.
- f) Il troppo piccolo campione di mucosa gastrica esaminato può, infine, essere causa di errore statistico di tipo I o II.

Nel genere femminile, l'attività dell'ADH gastrica, e dunque il FPM, è comunque e certamente inferiore a quella del maschio, il 50% circa, ed è anche dipendente dall'età. Nella donna che abusa cronicamente di alcool l'attività dell'ADH gastrica è quasi inesistente; in questo modo al fegato giunge una maggior quantità di etanolo, che potrà essere causa di epatopatie e altre patologie alcool-correlate.

Le differenze di concentrazione ematica di alcool, rilevate da Parlesak, sono visualizzate nella Figura 3 e brevemente discusse qui di seguito.

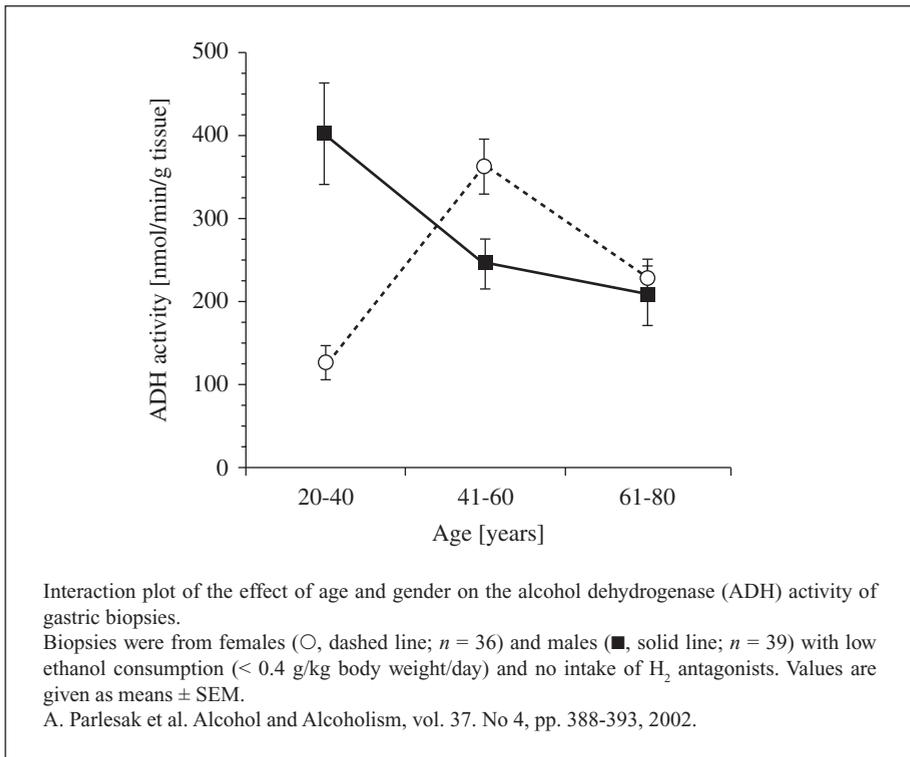


Figura 3.

Nel maschio “bevitore sociale” l’attività dell’ADH gastrica si riduce con l’età, risultando essere, nella fascia tra i 60 e gli 80 anni, il 50% circa di quella presente nella fascia tra i 20 ed i 40 anni.

Nelle femmine tra i 60 e gli 80 anni l’attività è altrettanto ridotta, rispetto a quelle di fascia tra i 40 e i 60 anni, ma stranamente il valore medio delle giovani donne (20-40 anni) è un terzo di quello riscontrato nel gruppo 40-60 anni.

Confrontando uomini e donne per fasce di età, si notano differenze importanti tra i 20 ed i 40 anni, quando l’attività ADH gastrica è la massima per i maschi e la minima per le donne, e nella fascia 40-60 anni dove il rapporto si inverte raggiungendo il massimo nelle donne mentre continua a ridursi nei maschi.

Nella fascia 60-80 le differenze scompaiono nella loro globale riduzione.

Precedentemente, nel 1992, Seitz⁽¹⁰⁾ aveva rilevato massima attività enzimatica della ADH gastrica negli uomini di età < 50 anni, con la tendenza a ridursi progressivamente con l’avanzare dell’età, nelle donne una minima ADH nelle donne di età < 50 anni, e valori più elevati nelle donne anziane.

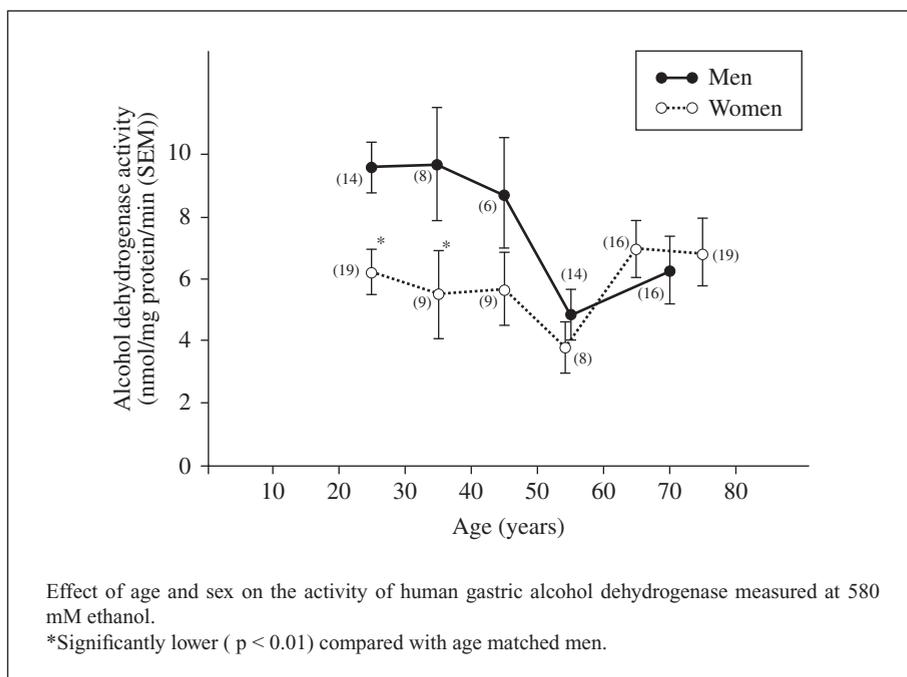


Figura 4.

Nel confronto uomini – donne per fasce di età Seitz rilevò, nella fascia < 50 anni, attività ADH massima per gli uomini e minima nelle donne, mentre nella fascia > 50 anni l'attività ADH diminuiva negli uomini, mentre era in lieve aumento per le donne (Figura 4).

Dunque da questi dati si evince che sia l'età sia il sesso sono in grado di influenzare l'attività dell'ADH gastrica e dimostrano che nella femmina, soprattutto nella giovane, l'attività ADH è particolarmente bassa, con una conseguente maggior vulnerabilità all'alcol. Infatti, di cirrosi alcolica muoiono proporzionalmente più femmine che maschi.

Alcool e ormoni femminili

Anche gli ormoni femminili, come detto, possono giocare un ruolo determinante nella spiegazione dei dati sopra riportati^(11,12). Le fluttuazioni ormonali (estrogeni e progesterone) nel corso del ciclo mestruale possono influenzare il metabolismo dell'alcol e soprattutto l'attività dell'ADH epatica. Gli stessi estrogeni aumenterebbero la suscettibilità della donna alla patologia epatica alcolica. Una spiegazione può trovarsi nella capacità, mostrata dagli estrogeni, di poter di aumentare la permeabilità gastrointestinale alle endotossine con conseguente effetto sulle cellule di Kupffer che incrementerebbero la loro produzione di tumor necrosis factor (TNF). D'altra parte è stato dimostrato che il trattamento di ratti femmine con estrogeni aumenta la sensibilità alle endotossine. Ciò troverebbe spiegazione nella aumentata espressione del recettore per l'endotossina CD14 e della citochina TNF-alfa nelle cellule di Kupffer. La cronica abitudine all'alcool può inoltre essere causa di menopausa precoce, fatto di comune riscontro in particolare nella cirrosi alcolica femminile.

Ancora, i contraccettivi orali, assunti in genere da donne in fascia giovanile, proprio quando l'attività dell'ADH gastrica è minima nella storia naturale della donna, possono aggravare l'epatopatia alcolica con l'attivazione di meccanismi cellulari di difesa.

Alcune altre variabili

In lavori del 1994 e del 1998, Salmela e Thuluvath hanno indicato nella presenza dell'*Helicobacter Pylori* gastrico una ulteriore variabile da tenere in considerazione per spiegare alcuni risultati conflittuali in relazione all'età dei pazienti e delle pazienti per quanto concerne l'attività dell'ADH gastrica^(14, 15).

Attività ancora influenzata dal polimorfismo genetico e dalla distribuzione dei fenotipi degli isoenzimi dell'ADH dello stomaco. Senza contare che molti farmaci, in primis gli antagonisti dei recettori H2 (cimetidina, ranitidina e altri), interferiscono con l'attività ADH, così come l'aspirina, il paracetamolo ed il propranololo⁽⁹⁾.

Conclusioni

1. Il consumo di alcool nel genere femminile è in incremento rispetto al consumo nel maschio.
2. I danni alcool-correlati nel sesso femminile si creano più celermente e appaiono più precocemente rispetto ai maschi.
3. La spiegazione a questi fatti è riferibile a cause intrinseche al genere (assetto ormonale, acqua corporea) e anche alla ridotta attività dell'alcool deidrogenasi gastrica nella donna, almeno in età giovanile.
4. Altre variabili, quali la presenza di *Helicobacter Pylori*, gastrite, fumo di sigaretta, consumo cronico di alcool, uso di farmaci, possono costituire motivo di variabilità del danno alcool indotto intra e inter generi.
5. La ricerca intorno a questi particolari aspetti dovrà prendere in considerazione tutte le variabili in grado di influenzare il danno associato all'uso o all'abuso di etanolo e in particolare le differenze tra generi delle concentrazioni enzimatiche gastriche di alcool e anche di aldeide deidrogenasi.

BIBLIOGRAFIA

1. *Alcohol and women*. Bethesda, MD: National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism; 1990.
2. Helzer JE, Burnam A, McEvoy LT. *Alcohol abuse and dependence*. In Robins LN, Ragier DA (Ed). "Psychiatric disorders in America: the epidemiologic catchment area study". New York: Free Press; 1991; 81-115.
3. Kessler RC, McGonagle KA, Zhao S, Nelson CB, Hughes M, Eshleman S, Wittchen HU, Kendler KS. *Lifetime and 12 months prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States: results from the National Comorbidity Survey*. Arch Gen Psychiatry. 1994; 51: 8-19.
4. Substance Abuse and mental Health Services Administration. *Summary of findings from the 1999 National Household Survey on Drug Abuse*. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services.
5. Greenfield SF. *Women and alcohol use disorders*. Harv. Rev Psychiatry 2002; 10: 76-85.
6. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. *Women and alcohol: health related issues*. Rockville, MD: NIAAA; 2003.
7. Mancinelli R, Guiducci MS. *La donna e l'alcool: vulnerabilità biologica?* Ann Ist Super Sanità. 2004; 40: 19-23.
8. Mumenthaler MS, Taylor JL, O'Hara R, Yesavage JA. *Gender differences in moderate drinking effects*. Alcohol Res Health 1999; 23: 55-64.
9. Parlesak A, Billinger MHU, Bode C, Bode JC. *Gastric alcohol dehydrogenase activity in man: influence of gender, age, alcohol consumption and smoking in a Caucasian population*. Alcohol 2002; 37: 388-393.
10. H.K. Seitz, Egerer G, Simanowski UA, Waldherr R, Eckey R, Agarwal DP, Goedde HW, von Wartburg JP. *Human gastric alcohol dehydrogenase activity: effect of age, sex, and alcoholism*. Gut. 1993; 34: 1433-1437.
11. Mohage H. *Alcohol liver disease: a matter of hormones*. J. Hepathol. 2001; 35: 130-133.
12. Lammers SMM. *Do alcohol pharmacokinetics in women vary due to menstrual cycle?* Addiction 1995; 90: 23-30.
13. Lieber CS. *Metabolism of ethanol*. In: Lieber CS, ed. "Metabolic aspects of alcoholism". Baltimore, University Park Press, 1977.
14. Salmela K, Salaspuro M, Gentry RT, Methuen T, Höök-Nikanne J, Kosunen TU, Roine RP. *Helicobacter infection and gastric ethanol metabolism*. Alcoholism: Clinical and Experimental research 1994; 18: 1294-1299.
15. Thuluvath P, Woino KJ, Yardley JH, Mezey E. *Effects of Helicobacter pylori infection and gastritis on gastric alcohol dehydrogenase activity*. Alcoholism: Clinical and Experimental research 1994; 18: 795-798.

**NON C'È SOLO ALCOL NEL VINO:
CONSIDERAZIONI SULLA COMPOSIZIONE DEI VINI
E SULLA LORO DIVERSITÀ**

Vincenzo Gerbi

Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari - Università di Torino

Parole chiave: *Vino*
Polifenoli
Dieta mediterranea
Educazione alimentare

Key words: *Wine*
Polyphenols
Mediterranean diet
Dietary education

Riassunto

L'abuso di bevande alcoliche è un fattore di rischio riconosciuto per l'insorgenza di molte e gravi patologie per l'uomo, tuttavia un uso moderato e costante è considerato tollerabile, soprattutto se l'assunzione avviene attraverso una bevanda, il vino, con una peculiare composizione, ricca di sostanze fenoliche ad elevato valore antiossidante. La ricerca in campo viticolo ed enologico ha permesso di incrementare la concentrazione nei vini di sostanze a elevato valore antiossidante, nel contempo consentendo una notevole differenziazione qualitativa su base varietale e territoriale, che rappresenta anche un valore aggiunto per l'economia del settore.

Summary

the abuse of alcohol is a risk factor for humans health, source of many serious diseases, but a steady and moderate consumption is considered tolerable, especially by the intake of a particular drink, the wine, with a peculiar composition, particularly rich in phenolic substances with high antioxidant value. The research in the field of viticulture and enology has allowed to increase the concentration of substances in wines with an

high antioxidant value, also determining a considerable qualitative differentiation of wines (varietal and territorial characters), which also allows an added value to the economy of the sector.

Il vino è da considerare un prodotto peculiare nel panorama delle bevande alcoliche. Il tenore in alcol deriva dalla trasformazione degli zuccheri contenuti nella materia prima uva, con una resa di circa il 60% (peso/volume). Il tenore alcolico che ne deriva non viene modificato dopo la fermentazione da operazioni tecnologiche come la distillazione, che ne aumentano la concentrazione a scapito, nel contempo, della parte non volatile presente nella matrice vegetale. Le bevande fermentate e non distillate contengono quindi tenori in alcol molto più bassi e una differenziazione compositiva derivante dalla matrice vegetale utilizzata, nella maggior parte dei casi frutti, che contengono zuccheri immediatamente fermentescibili come glucosio e fruttosio (vini e sidri). Altre volte gli zuccheri fermentescibili (glucosio) derivano dall'idrolisi di amido da cereali, come per le birre. Il tenore alcolico in questo caso non è quello potenziale della materia prima, ma è determinato in fase di preparazione del mosto dal livello di diluizione deciso dal produttore. Il processo di produzione prevede la preliminare maltazione del cereale e la successiva cottura della miscela di acqua e farina. La composizione delle birre è quindi principalmente derivata da scelte tecnologiche e dal livello di tostatura a cui è sottoposto il cereale maltato. Si può parlare in effetti di arte del mastro birraio, che ha una possibilità di influenzare la composizione del prodotto finito molto superiore a quella del vinificatore, il quale accompagna la trasformazione dell'uva, ma non ne può cambiare la composizione.

Un discorso a parte lo meritano i liquori e le bevande alcoliche di fantasia (aperitivi, cocktail, ecc.), la cui composizione deriva dalla applicazione di una ricetta ed il cui tenore in alcol può essere molto variabile, ma non influenzato dalla composizione delle materie prime di origine.

Nella Tabella I sono riportati, a titolo di esempio non esaustivo, i titoli alcolometrici di alcune bevande alcoliche e distillati, allo scopo di confrontare

Bevanda alcolica	Alcol % in vol.	Zuccheri g/l	Grammi di alcol assunti con un bicchiere da 100 ml
Birra	4-9	0-20	3-7
Vino (secco)	10-14	0	8-11
Grappa, whisky	40-45	0	31-35
Tipo Breezer	4	10-100	3
aperitivi	10-15	5-50	8-12

Tabella I. Confronto tra il contenuto alcolico di alcune bevande di uso frequente.

le rilevanti differenze presenti, spesso poco considerate al momento delle scelte dei consumatori, soprattutto se giovani. L'alcol presenta una densità relativa ($d_{20/20}$) di circa 0,78, quindi per approssimazione si può considerare in massa circa l'80% del titolo alcolometrico espresso in % in volume. Questa semplice informazione dovrebbe far parte del bagaglio di conoscenze di base dell'educazione alimentare.

La bevanda alcolica più consumata nel mondo è la birra, i cui consumi *pro-capite* presentano differenze molto rilevanti da un Paese all'altro, in funzione delle abitudini e della cultura alimentare locale (ad esempio oltre 150 litri/anno in Repubblica Ceca). Nella realtà italiana la birra non ha ancora soppiantato il vino nelle preferenze dei consumatori, ma il consumo *pro-capite*, che all'inizio del '900 era trascurabile, ha raggiunto e superato i 30 litri/anno. Per contro il vino, secondo i dati forniti dall'OIV (Organisation Internationale de la vigne et du Vin) è sceso nello stesso periodo da 100 a 42 litri/anno, rappresentando un forte cambio di abitudini alimentari.

Il vino si può considerare la bevanda alcolica più conosciuta e consumata nei paesi del bacino del Mediterraneo. Nel 2010 l'Unesco ha dichiarato la dieta mediterranea patrimonio immateriale dell'umanità. L'etimologia greca del termine "dieta" fa riferimento allo "stile di vita" e di questo fa pienamente parte l'abitudine al consumo moderato di vino⁽¹⁾.

L'uso consapevole e moderato di vino è stato considerato protettivo contro lo sviluppo delle malattie coronariche e delle patologie associate allo stress ossidativo. Il potenziale beneficio del vino sulla salute è stato ampiamente attribuito ai composti polifenolici, principalmente flavonoidi, presenti in abbondanza nel vino (2-3000 mg/l)⁽²⁾. Recentemente alcuni risultati di studi *in vivo* suggeriscono che i polifenoli bioattivi del vino rosso possano attenuare anche neuropatologie degenerative. Tali risultati sono incoraggianti, ma c'è ancora molto da capire sui meccanismi della bioattività delle sostanze fenoliche⁽³⁾.

Per chi studia il vino dal punto di vista biologico, chimico e tecnologico, queste informazioni sono state di stimolo per il perseguimento di alcuni obiettivi che paiono fondamentali per una moderna enologia. Non si intende produrre solo una generica bevanda alcolica, complemento all'alimentazione, da scegliere e valutare solo in base al grado alcolico che sviluppa, bensì un prodotto connotato anche dal valore aggiunto dovuto alla sua composizione, alla sua diversità e, non ultimo, al piacere sensoriale che può provocare. Principale attenzione è stata quindi dedicata al miglioramento della qualità, quantità e conservazione delle componenti fenoliche del vino.

Va considerato infatti che la produzione di vino si rivolge attualmente a *target* differenti, che comprendono i consumatori alla ricerca del miglior rapporto qualità prezzo, ma anche gli estimatori disposti a spendere per i vini una parte del denaro destinato alla soddisfazione personale.

Infatti il vino di elevata qualità deve essere una bevanda alcolica di prezzo necessariamente elevato. Quando l'uva è prodotta in vigneti ad alta vocazione per posizione e giacitura, i costi di conduzione del vigneto e quelli di trasformazione e conservazione non possono essere contenuti. Esistono certamente vini molto economici, derivati da produzioni intensive, oggi anche provenienti da paesi extra UE, ma non vengono scelti dal consumatore per convinzione, bensì per necessità. Si può affermare che l'offerta si sta velocemente adeguando alla domanda di un cliente che consuma meno vino, ma richiede qualità percepibile, sicurezza alimentare, tracciabilità, elevato valore evocativo, elevata biodiversità e, cosa non trascurabile, elevata presenza di sostanze potenzialmente nutraceutiche.

Per quanto riguarda la diversità, il nostro Paese gode di un particolare vantaggio dovuto alla presenza di un grande numero di vitigni di tradizione locale, selezionati nel tempo per la loro particolare attitudine enologica, e alla particolare vocazione del territorio. La diversità dei vitigni italiani, che un tempo era considerato uno svantaggio per la produzione di vini di massa adatti a soddisfare un mercato indifferenziato, oggi viene invece considerata un elemento di differenziazione dell'offerta. Le differenze compositive che spiegano maggiormente le differenze sono, ancora una volta, quelle a carico della componente polifenolica.

Acquistare una bottiglia di vino è diventata una scelta consapevole, lontana sia da sensi di colpa, sia dalla attesa di promesse non mantenibili.

Ci possiamo quindi chiedere se la ricerca enologica abbia fatto qualcosa di utile rispetto alle composizione dei vini, particolarmente per migliorarne il contenuto di sostanze sicuramente pregevoli, come i flavonoidi e altri composti antiossidanti. In sintesi si può affermare che l'enologia è rapidamente passata da una fase storica, che potremmo definire "correttiva", in cui l'enologo cercava di eliminare i difetti dovuti alla materia prima di scarsa qualità o alla vinificazione approssimativa, ad una che potremmo definire "di espressione", in cui la tecnologia serve a estrarre di più e selettivamente i componenti dell'uva, riducendo nel contempo il ricorso ad additivi e conservanti.

L'attenzione dei ricercatori si è spostata sul miglioramento della qualità dell'uva, giungendo ad aumentarne la concentrazione in componenti di pregio e la diversità varietale⁽⁴⁾. Parallelamente le tecnologie si sono sempre più ispirate alle *mild technologies*, avendo come obiettivo il salvataggio

dei componenti nobili dell'uva nel corso del processo di vinificazione. Ad esempio negli ultimi vent'anni grandi progressi sono stati compiuti nella comprensione dei fenomeni di affinamento dei vini e nella definizione del ruolo dell'ossigeno e del legno nella stabilizzazione del colore dei vini rossi e bianchi⁽⁵⁾. L'erogazione ed il controllo dell'ossigeno nell'affinamento appare come uno dei progressi tecnologici che hanno davvero rivoluzionato il concetto di conservazione del vino. Il ritorno massiccio all'uso del legno in cantina, dopo un'epoca di abbandono delle botti a favore di materiali più moderni, sembra essere un omaggio alla tradizione, ma in realtà è il frutto di una serie di conoscenze di carattere chimico e biologico, che la ricerca ha messo a disposizione

Da rilevare, infine, che il miglioramento delle conoscenze sul comportamento dei microrganismi del vino e la migliore conoscenza dei meccanismi di ossidazione dei composti fenolici del vino, ha consentito un generalizzato calo del tenore in solfiti nei vini, che oggi si assesta mediamente alla metà del limite legalmente consentito⁽⁶⁾.

In conclusione si può affermare che il vino ha conservato la sua immagine di bevanda tradizionale nell'alimentazione mediterranea, ma ha intrapreso anche un percorso di miglioramento qualitativo in cui gli aspetti salutistici hanno avuto grande attenzione.

BIBLIOGRAFIA

1. Giacosa A, Barale R, Bavaresco L, Gatenby P, Gerbi V, Janssens J, Johnston B, Kas K, La Vecchia C, Mainguet P, Morazzoni P, Negri E, Pelucchi C, Pezzotti M, Rondanelli M. *Cancer prevention in Europe: the Mediterranean diet as a protective choice*. *Eu J Cancer Prev*. 2013; 22: 90-95.
2. Baur JA, Sinclair DA. *Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence*. *Nat Rev Drug Discov*. 2006; 5: 493-506.
3. Passamonti S, Terdoslavich M, Franca R., Vanzo A, Tramer F, Braidot E, Petrusa E, Vianello A. *Bioavailability of flavonoids: a review of their membrane transport and the function of bilitranslocase in animal and plant organisms*. *Curr Drug Metab*. 2009; 10: 366-394.
4. Cagnasso E, Rolle L, Caudana A, Gerbi V. *Relationship between grape phenolic maturity and red wine phenolic composition*. *Ital J Food Sci*. 2008; 20:3 65-380.
5. Gerbi V, Caudana A, Zeppa G, Cagnasso E. *Effetto della micro-ossigenazione in relazione alla composizione fenolica di vini rossi*. *Industria delle bevande*. 2006; 35: 462-470.
6. Sonni F, Clark AC, Prenzeler PD, Riponi C, Scollary GR. *Antioxidant action of glutathione and the ascorbic acid/glutathione pair in a model white wine*. *J Agric Food Chem*. 2001; 59: 3940-3949.

**DETERIORAMENTO COGNITIVO
E PATTERN DI MULTIMORBILITÀ:
ANALISI DI CLUSTER**

Premio “Gianpiero Gaidano” 2010/2011
Tesi di Laurea premiata dalla Fondazione Piera, Pietro e Giovanni Ferrero
in collaborazione con l’Accademia di Medicina di Torino

*Annalisa Mastrapasqua, Giorgia Fornelli, Simona Mondino,
Massimiliano Massaia, Giancarlo Isaia*

Dipartimento di Scienze Mediche - Università degli Studi di Torino

Parole chiave: *Deterioramento cognitivo*
Demenza
Cluster
Comorbilità
Multimorbilità

Key words: *Cognitive impairment*
Dementia
Cluster
Comorbidity
Multimorbidity

Riassunto

La multimorbilità è un problema molto comune nella popolazione anziana ed è associata ad una maggiore mortalità, disabilità e peggioramento della qualità di vita. Inoltre, essa si correla ad un incremento dell’utilizzo di servizi sanitari con ulteriore aumento di costi, tempo di degenza e numero di visite mediche. È stato condotto uno studio retrospettivo che ha valutato la multimorbilità in una popolazione di pazienti anziani affetti da deterioramento cognitivo. Dai risultati si è evidenziato che le diverse forme di deterioramento cognitivo risultano essere associate ad un numero di comorbilità inferiore rispetto ad altre patologie croniche che comunemente affliggono l’anziano. L’applicazione dell’analisi di cluster e la stratificazione per età ha permesso

di evidenziare 5 cluster, che rappresentano le modalità più frequenti di raggruppamento delle diverse patologie prese in esame in un soggetto anziano. Un primo cluster formato da MCI, ipovisione, ipoacusia, diabete, frattura di femore, secondo quartile di età e sesso maschile. Un secondo cluster “vascolare” comprendente la Demenza Vascolare, il deterioramento cognitivo lieve a genesi vascolare, il terzo quartile di età ed altre comuni patologie croniche dell’anziano quali l’ipertensione, lo scompenso cardiaco e la fibrillazione atriale. Un terzo cluster formato dalla Demenza Mista, sesso femminile ed il quarto quartile di età. Il quarto ed il quinto clusters formati solo da una patologia ciascuno, rispettivamente la Demenza di Alzheimer e la Sindrome ansioso-depressiva. Migliorare le conoscenze sulla multimorbilità è necessario, soprattutto nell’anziano, per non incorrere nell’errore di focalizzarsi su problemi considerati come “primari” sottostimando le patologie concomitanti.

Summary

Multimorbidity is a common problem in the elderly population and it is associated with higher mortality, disability and reduced quality of life. Moreover, it is associated with increased sanitary need with a raise in costs, hospitalisation time and number of visits. We conducted a retrospective study evaluating multimorbidity in a population of elderly patients with cognitive impairment. The results of this study show that different forms of cognitive impairment are associated with lower number of comorbidities compared with other chronic diseases afflicting the elderly. Cluster analysis and age stratification allowed the identification of 5 clusters, representing the commonest association of pathologies in the elderly. The first cluster includes MCI, sight and hearing impairment, diabetes, hip fracture, second age quartile, male gender. A second “vascular” cluster includes vascular dementia, mild cognitive impairment with vascular ethiology, third age quartile and other common chronic pathologies of the elderly, such as hypertension, heart failure, atrial fibrillation. Third cluster is composed by double ethiology vascular/degenerative dementia, female gender, fourth age quartile. Fourth and fifth cluster are formed by just one pathology: respectively Alzheimer dementia and anxious-depressive syndrome. Improving knowledge about multimorbidity is necessary, mainly in the elderly, in order not to focus on primary problems, underestimating comorbidities.

La multimorbilità

Migliaia di persone ogni giorno oltrepassano la soglia dei 65 anni^(1,2). Per quanto riguarda l'Italia, secondo i dati ISTAT, la popolazione residente al primo Gennaio 2010, con età superiore o uguale a 65 anni, risulta essere pari a 12.206.470 ed il 41.70% di questi ultimi dichiara di essere affetto da almeno una malattia cronica grave, come per esempio: diabete, enfisema, cirrosi epatica, tumore maligno, bronchite cronica, malattia di Alzheimer o demenze senili. Osservando invece il numero di malattie croniche dichiarate è evidente come questo incrementi per classe di età.

L'aspettativa di vita ha ormai raggiunto e superato i 75 anni in 57 paesi e ci si aspetta che tale valore continui a salire nei prossimi anni⁽³⁾. La proporzione di ultra sessantenni nel mondo è cresciuta dal 8.1% del 1960 al 10% del 2000 e, nonostante l'evidente preoccupazione derivata da questi dati e la consapevolezza che il fenomeno dell'invecchiamento sia un problema mondiale, le informazioni riguardanti la salute ed i trend della popolazione anziana sono ancora inadeguati. È evidente che, nell'ultimo secolo, le malattie di tipo cronico hanno prevalso sulle patologie infettive come problema principale e che queste siano correlate palesemente all'invecchiamento. La maggioranza degli studi finora disponibili sono principalmente focalizzati su specifiche malattie o sulla copresenza di un numero ristretto di patologie, come le patologie cardiovascolari, il diabete o le neoplasie, piuttosto che sull'intera gamma di patologie croniche che affliggono le persone anziane. Pochi studi si sono occupati di come le malattie si distribuiscano o coesistano nello stesso individuo e lo hanno fatto utilizzando gli approcci più svariati⁽⁴⁾. I termini utilizzati per indicare la presenza di due o più patologie nello stesso individuo sono "comorbilità e multimorbilità".

Il termine comorbilità, introdotto per la prima volta nel 1970 da Feinstein, si riferisce alla presenza nello stesso individuo di plurime patologie oltre ad una patologia considerata di riferimento (index disorder)⁽⁵⁾. Tale definizione implica che l'interesse principale sia comunque focalizzato su una singola malattia e che le altre condizioni vengano considerate solo per l'eventuale influenza sulla patologia predominante. Al contrario, il termine multimorbilità si riferisce alla concomitanza di due o più patologie, croniche o acute, nello stesso paziente^(6,7). La multimorbilità è un problema molto comune nella popolazione anziana, infatti la sua prevalenza varia tra il 55% ed il 98%, se si considerano solamente gli ultra sessantacinquenni. Molti studi confermano tale dato e sottolineano che la prevalenza della multimorbilità risulta essere molto più alta rispetto alla prevalenza delle più comuni patologie dell'anziano, come per esempio l'insufficienza cardiaca o la demenza⁽⁸⁾.

Fattori più frequentemente associati alla multimorbilità sono l'età avanzata, il sesso femminile, l'obesità e il basso livello socioculturale. I fattori di rischio correlati alla multimorbilità sono l'incremento dell'età, l'elevato numero di precedenti patologie e il basso livello educativo, mentre le conseguenze sono rappresentate da declino dello stato funzionale, disabilità e una minor qualità di vita⁽⁹⁾. Inoltre, si riscontra un maggior utilizzo dei servizi sanitari in termini di costi, tempo di degenza e numero di visite mediche.

Una recente review, condotta dal gruppo di ricerca del Karolinska Institute dell'Università di Stoccolma, ha messo in evidenza come le conoscenze sui fattori di rischio per la multimorbilità, quali il background genetico, le cause biologiche, gli stili di vita e i fattori ambientali, siano ancora troppo limitate e che i dati finora disponibili siano insufficienti per un approccio di cura basato sull'evidenza, per pazienti affetti da pluripatologie⁽¹⁰⁾. Una migliore conoscenza dello sviluppo e della storia naturale della multimorbilità sta divenendo sempre di più una necessità per la salute pubblica e la clinica pratica.

Scopo dello studio

Valutare la comorbilità e la multimorbilità in una popolazione di pazienti ambulatoriali affetti da deterioramento cognitivo ed afferenti all'ambulatorio dell'Unità Valutativa Alzheimer (UVA) del reparto di Geriatria e Malattie Metaboliche dell'Osso dell'Ospedale San Giovanni Battista di Torino.

Materiali e metodi

Lo studio ha valutato in modo retrospettivo un campione di pazienti afferiti all'ambulatorio dell'Unità di Valutazione Alzheimer (U.V.A.) della SC di Geriatria e Malattie Metaboliche dell'Osso dell'Ospedale Molinette (Città della Salute e delle Scienze), nel periodo tra Aprile 2009 e Giugno 2011.

È stata effettuata un'attenta rilettura di tutta la documentazione disponibile (essenzialmente le cartelle complete contenenti i referti delle visite effettuate), presente all'interno del database informatizzato dell'ambulatorio, volta a selezionare i pazienti idonei allo studio.

Per ogni paziente sono stati raccolti i dati riguardanti sesso, età al momento della visita, scolarità in anni, l'anamnesi patologica remota e prossima, la terapia in corso, l'esame obiettivo sia generale che neurologico e i punteggi ottenuti al Mini Mental State Evaluation (MMSE).

I pazienti sono stati suddivisi in 4 quartili di età. I quartile ≤ 73 anni, II quartile da 74 a 78 anni, III quartile da 79 a 82 anni e IV quartile ≥ 83 anni.

A fine selezione, i pazienti ritenuti idonei e inseriti nello studio sono stati quelli che presentavano una diagnosi di:

- Malattia di Alzheimer (AD)
- Demenza Vascolare (VAD)
- Demenza mista (Demenza di Alzheimer + Demenza Vascolare)
- Mild Cognitive Impairment (MCI)
- Deterioramento cognitivo a genesi vascolare (VCI)

Patologia	Prevalenza (%)	Prevalenza senza morbidità (%)
Ipertensione arteriosa	33.3%	3.3%
Scompenso cardiaco	2.6%	0%
CAD	6.1%	2.9%
Ipovisus	19%	4.1%
Anemia	2.5%	0%
FA	9.2%	5.3%
Depressione	15%	5.6%
Ipoacusia	4.2%	4.2%
BPCO	1.8%	0%
Neoplasie	16.6%	3.2%
Diabete	2.2%	0%
Frattura di femore	2.8%	1.6%
Distiroidismi	10.4%	2.5%
Patologie cerebrovascolari	12.2%	2.9%
Cardiopatie valvolari	7.8%	4%

Tabella I. Prevalenza delle singole categorie diagnostiche in assoluto e senza comorbidità.

Considerando l'elevata prevalenza riscontrata, sono stati inclusi nello studio anche i pazienti affetti da disturbo distimico o quadro ansioso-depressivo, anche nel caso in cui non presentassero un deterioramento cognitivo. Si è deciso di escludere, invece, i pazienti affetti da forme più rare di demenza quale la Demenza a Corpi di Lewy, la Demenza Frontotemporale con tutte le sue varianti e il Parkinson's Dementia.

Di ogni paziente sono state prese in considerazione le patologie croniche da cui è affetto, codificate seguendo la Classificazione Internazionale delle Malattie, decima revisione.

Le patologie sono state considerate croniche quando rispettavano uno o più dei seguenti criteri⁽¹¹⁾:

- Condizione permanente
- Causata da un'alterazione patologica non reversibile
- Necessità di riabilitazione o un lungo periodo di cure

Alla luce dello scopo del presente studio, l'analisi è stata effettuata considerando solo le 15 patologie croniche più frequenti (prevalenza > 1.5%) come riportato in Tabella I.

Per ogni condizione patologica è stata calcolata la prevalenza (per 100 persone) ed è stata stimata la media \pm deviazione standard delle patologie copresenti. A conferma dei risultati è stato condotto un modello a regressione logistica per analizzare le associazioni tra ogni paio di patologie copresenti. Per analizzare i diversi patterns di multimorbilità, senza nessuna ipotesi a priori, è stata effettuata un'analisi di cluster. L'analisi di cluster ci permette di valutare come le patologie tendano a presentarsi in associazione l'una con le altre. Tramite questa tecnica è possibile ottenere un quadro generale di come le patologie siano associate tra loro in una particolare popolazione. Inoltre, per analizzare con maggior dettaglio la distribuzione delle patologie, è stata effettuata l'analisi di cluster dopo aver stratificato la popolazione in esame per età.

Risultati

Al termine dello studio sono stati valutati 2267 pazienti. L'età media è risultata essere 78.28 ± 7.38 anni.

La patologia più frequente è risultata essere il deterioramento cognitivo lieve a genesi vascolare con il 15.9%, seguito dalla Demenza Vascolare (15.2%) e dalla Demenza Mista (14.3%), come si può osservare dalla Tabella II. La patologia meno gravata da comorbidità è risultata il disturbo

Patologia	Prevalenza (%)	Prevalenza senza comorbidità (%)
AD	9.7%	27.1%
VAD	15.2%	34.8%
Mista	14.3%	27%
MCI	12.7%	27.7%
VCI	15.9%	33.1%
SAD	10.5%	35%

Tabella II. Tipo e distribuzione di deterioramento cognitivo e patologie co-presenti.

Patologia	Numero di casi	Casi senza comorbidità	Patologie co-presenti (media±DS)
Ipertensione arteriosa	756	25	2.36±6.07
Scompenso cardiaco	59	0	3.12±6.8
CAD	138	4	2.57±6.31
Ipovisus	430	18	2.91±6.26
Anemia	56	0	2.93±6.75
FA	208	11	2.55±6.36
Depressione	338	19	2.40±6.03
Ipoacusia	95	2	2.84±6.60
BPCO	40	0	3.15±6.80
Neoplasie	377	12	2.55±6.18
Diabete	50	0	2.78±6.47
Frattura di femore	64	1	2.77±6.38
Distiroidismi	236	6	2.58±6.14
Patologie cerebrovascolari	276	8	2.49±6.30
Cardiopatie valvolari	175	7	2.87±6.84

Tabella III. Distribuzione e co-presenza di patologie croniche nella popolazione in esame.

distimico, in cui ben il 35% dei pazienti non presenta altre patologie associate.

Le diverse forme di deterioramento cognitivo risultano avere un numero di comorbidità inferiore rispetto a tutte le altre patologie croniche. Al contrario, lo scompenso cardiaco e la Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO) risultano essere associate con il numero più elevato di patologie, con una media rispettivamente di 3.12 e 3.15 come indicato dalla Tabella III.

Il modello a regressione logistica corretto per confondenti ha evidenziato, come riportato in Tabella IV, una forte associazione tra la demenza di tipo Alzheimer ed il primo quartile di età e nessuna altra associazione significativa con condizioni morbose croniche valutate. Tale dato conferma, come è ben noto, che l'AD è rappresentata maggiormente nelle fasce di età più giovani (nel nostro studio, nel quartile inferiore a 73 anni).

Un'altra associazione evidenziata è stata quella tra demenza mista, quarto quartile e sesso femminile; questo può essere spiegato dal fatto che tali forme miste colpiscono di solito le persone di età più avanzata ed il sesso femminile che è quello statisticamente più rappresentato in tali fasce.

Un'ulteriore associazione risultata significativa è quella tra la VAD, l'ipertensione e le patologie cerebrovascolari: ciò può essere dovuto al fatto che l'ipertensione e gli eventi cerebrovascolari, sia acuti che considerati come vasculopatia cerebrale cronica di tipo cortico-sottocorticale, rappresentano fattori di rischio per lo sviluppo di una demenza vascolare.

L'ultima associazione riguarda depressione e sindrome ansioso-depressiva: la correlazione tra queste due patologie può essere supportata dal fatto che,

Patologie croniche	Numero casi	OR (95% IC)
AD – Età (I quartile)	77	1.8 (1.34 - 2.43)*
Demenza mista – Età (IV quartile)	178	3.7 (2.9 - 4.7)*
Demenza mista – Sesso femminile	236	1.6 (1.2 - 2.1) ⁺
VAD – Ipertensione	92	1.2 (1.1 - 1.5) ⁺
VAD – Patologie cerebrovascolari	56	1.3 (1.1 - 1.9) ⁺
SAD – Depressione	25	1.4 (1.1 - 2.1) ⁺

Tabella IV. Modello a regressione logistica: associazioni tra le diverse forme di deterioramento cognitivo considerate e patologie croniche (OR; aggiustato per confondenti). $P < ^*.001$, $^+.01$.

sovente, la sindrome depressiva si associa ad una compromissione timica di tipo ansioso.

Nel presente studio, l'analisi di cluster ha messo in evidenza cinque differenti clusters come riportato in Tabella V.

Un cluster è formato da MCI, ipovisus, ipoacusia, diabete, frattura di femore, il secondo quartile di età e sesso maschile. Un secondo cluster "vascolare" correla la Demenza Vascolare e il deterioramento cognitivo lieve a genesi vascolare con l'ipertensione, lo scompenso cardiaco, la fibrillazione atriale, le cardiopatie valvolari, le patologie cerebrovascolari, le neoplasie, la CAD (Coronary Artery Disease), anemia, depressione, BPCO, ipertensione arteriosa, i distiroidismi e il terzo quartile di età. Un terzo cluster raggruppa la Demenza Mista con il sesso femminile ed il quarto quartile di età. Infine

1	2	3	4	5
AD	MCI	Demenza mista	VAD	SAD
Età (I quartile)	Età (II quartile)	Età (IV quartile)	VCI	
	Sesso maschile	Sesso femminile	Età (III quartile)	
	Ipovisus		Depressione	
	Ipoacusia		CAD	
	Diabete		FA	
	Frattura di femore		BPCO	
			Scompenso cardiaco	
			Ipertensione	
			Patologie cerebro-vascolari	
			Cardiopatie valvolari	

Tabella V. Analisi di cluster. Distribuzione e aggregazione nelle popolazioni osservate.

abbiamo evidenziato due clusters formati solo da una patologia ciascuno, rispettivamente la Demenza di Alzheimer e la Sindrome ansioso-depressiva.

Stratificando per l'età, l'analisi di cluster evidenzia come l'AD correli con un'età più giovane (primo quartile), mentre la Demenza Mista correla con il gruppo di pazienti più anziani (quarto quartile). Il secondo quartile si inserisce nel cluster appartenente all'MCI e il terzo a quello della VAD e VCI.

Conclusione

Il presente studio mostra diversi tipi di approcci utili per descrivere la comorbidità e la multimorbidità in una popolazione di soggetti anziani. Tali metodi ci hanno permesso di mettere in luce alcuni aspetti interessanti sull'argomento.

In generale, abbiamo osservato come tutte le patologie croniche sembrano presentarsi più frequentemente associate a comorbidità che non da sole, mentre le forme di deterioramento cognitivo sono risultate quelle con il più basso numero di patologie associate. I risultati dell'analisi di cluster possono essere particolarmente utili sia per il ricercatore che per il clinico e l'evidenza che specifiche patologie si raggruppano insieme in modo non casuale può suggerire nuove spiegazioni fisiopatologiche.

Nella pratica clinica, comprendere meglio il tipo di relazioni che esistono tra patologie coesistenti può portare ad individuare nuovi target di intervento. Per esempio, il raggruppamento MCI, diabete e frattura di femore suggerisce che i pazienti affetti da una di queste patologie possono essere a rischio di sviluppare le altre. Questo tipo di informazioni rivestono un ruolo particolarmente rilevante, soprattutto in prevenzione terziaria.

Infine, la multimorbidità richiede terapie e cure complesse che richiedono particolari attenzioni, abilità e conoscenze da parte di medici, infermieri e famigliari. È ormai stato dimostrato che, nei pazienti affetti da multiple patologie croniche, i problemi non classificati come "primari" siano sottostimati⁽¹²⁾ e che i trattamenti mirati a una sola condizione patologica, ignorando le malattie concomitanti, possono essere dannosi⁽¹³⁾.

BIBLIOGRAFIA

1. Cohen JE. *Human population: the next half century*. Science. 2003; 302: 1172-1175.
2. Kinsella K, Velkoff VA. *Global Aging: the challenge of success*. Popul. Bull. 2005; 60: 3-42.
3. Oeppen J, Vaupel JW. *Demography. Broken limits to life expectancy*. Science. 2002; 296: 1029-1031.
4. Gijssen R, Hoeymans N, Schellevis FG, Ruwaard D, Satariano WA, van den Bos GA. *Causes and consequences of comorbidity: a review*. J. Clin. Epidemiol. 2001; 54: 661-674.
5. Feinstein AR. *The pretherapeutic classification of comorbidity in chronic disease*. J Chronic Dis. 1970; 23: 455-468.
6. van den Akker M, Buntinx F, Knottnerus JA. *Comorbidity or multimorbidity: What's in a name? A review of literature*. Eur J Gen Pract. 1996; 2: 65-70.
7. Batstra L, Bos EH, Neeleman J. *Quantifying psychiatric comorbidity lessons from chronic disease epidemiology*. Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol. 2002; 37: 105-111.
8. Marengoni A, Winblad B, Karp A, Fratiglioni L. *Prevalence of chronic diseases and multimorbidity among the elderly population in Sweden*. Am J Public Health. 2008; 98: 1198-1200.
9. Loza E, Jover JA, Rodriguez L, Carmona L, EPISER study group. *Multimorbidity: prevalence, effect on quality of life and daily functioning, and variation on this effect when one condition is a rheumatic disease*. Semin Arthritis Rheum. 2009; 38: 312-319.
10. Marengoni A, Angleman S, Melis R, Mangialasche F, Karp A, Garmen A, Meinow B, Fratiglioni L. *Aging with multimorbidity: A systematic review of the literature*. Ageing Res Rev. 2011; 10: 430-439.
11. Timmreck TC, Cole GE, James G, Butterworth DD. *Health education and health promotion: A look at the jungle of supportive fields, philosophies and theoretical foundations*. Health Educ. 1987; 18: 23-28.
12. Redelmeier DA, Tan SH, Booth GL. *The treatment of unrelated disorders in patients with chronic medical diseases*. N Engl J Med. 1998; 338: 1516-1520.
13. Boyd CM, Darer J, Boult C, Fried LP, Boult L, Wu AW. *Clinical practice guidelines and quality of care for older patients with multiple comorbid diseases: implications for pay for performance*. JAMA. 2005; 294: 716-724.

**NUOVI MARCATORI DI FLOGOSI
NELLE PATOLOGIE SISTEMICHE AUTOIMMUNI
A CONFRONTO CON LE GLOMERULONEFRITI PRIMITIVE:
UN RUOLO PER OSTEOPONTINA E RECETTORE SOLUBILE
DELL'ATTIVATORE DEL PLASMINOGENO?**

Premio "Italo Arneodo" 2010/2011

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

*Sara Monti¹, Piero Stratta¹, Umberto Dianzani²,
Marco Quaglia¹, Caterina Canavese¹*

¹ SCU Nefrologia e Trapianto - Dipartimento di Medicina Traslationale
Università del Piemonte Orientale - Novara

² Dipartimento di Scienze Mediche e IRCAD
Università del Piemonte Orientale - Novara

Parole chiave: *Osteopontina (OPN)*
Recettore Solubile dell'attivatore del Plasminogeno di tipo
Urochinasico (suPAR)
Patologie autoimmuni sistemiche
Glomerulonefriti primitive

Key words: *Osteopontin (OPN)*
Soluble Urokinase Plasminogen Activator Receptor (suPAR)
Systemic autoimmune diseases
Primary glomerulonephritis

Riassunto

Obiettivo. La patogenesi delle patologie autoimmuni è ancora in larga parte sconosciuta. Recentemente, particolare attenzione è stata rivolta al ruolo di due marcatori di flogosi pleiotropici: Osteopontina (OPN) e Recettore Solubile dell'Attivatore del Plasminogeno di tipo Urochinasico (suPAR). Il presente studio ha lo scopo di analizzare i livelli sierici di OPN e suPAR in pazienti affetti da patologie sistemiche autoimmuni, a confronto con glomerulonefriti

(GN) primitive e controlli sani, valutandone l'associazione con numerose caratteristiche clinico-laboratoristiche.

Metodi. I livelli sierici di OPN e suPAR sono stati analizzati in 197 pazienti (n = 151 patologie autoimmuni; n = 46 GN), a confronto con 138 controlli sani. Le determinazioni dei livelli sierici sono state effettuate tramite test ELISA.

Risultati. I livelli sierici di entrambi i marcatori sono risultati più elevati nelle patologie autoimmuni, in particolare nelle Vasculiti e nella Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi, sia rispetto alle GN (OR = 2.549; IC: 1.027-6.325), che rispetto ai sani (OR = 5.423, IC: 2.035-14.453). I livelli di suPAR sono significativamente aumentati rispetto ai controlli sani (OR = 8.869, IC: 3.387-23.226). Esiste una correlazione lineare tra i due marcatori ($p < 0.001$). Dall'analisi multivariata è emerso che i livelli di OPN correlano con la presenza di insufficienza renale (OR = 3.330, IC: 1.389-7.988), proteinuria (OR = 2.249, IC: 1.062-4.760), autoimmunità (OR = 2.549, IC: 1.027-6.325), anemia (OR = 2.528, IC: 1.265-5.053). Gli ACE-inibitori sono associati a ridotti livelli di OPN (OR = 0.403, IC: 0.179-0.906). suPAR è risultato associato a funzione renale (OR = 2.525, IC: 1.115-5.718) e proteinuria (OR = 3.112, IC: 1.503-6.443).

Conclusioni. Questo studio dimostra che i livelli sierici di OPN e suPAR correlano con l'interessamento renale. È ipotizzabile che queste due molecole non siano soltanto marcatori ma veri e propri mediatori di danno renale. L'associazione inversa con l'ACE-inibitore potrebbe introdurre un nuovo razionale di utilizzo di questi farmaci nelle patologie autoimmuni con interessamento renale.

Abstract

Objectives. The pathogenesis of autoimmune disorders is far from being fully understood. Recently, great attention has been paid to the role of two pleiotropic inflammatory molecules: Osteopontin (OPN) and Soluble Urokinase Plasminogen Activator Receptor (suPAR). The present study aimed to investigate OPN and suPAR serum levels in a population of patients with systemic autoimmune diseases compared to patients with primary glomerulonephritis (GN) and healthy controls, analyzing the association with clinical and laboratory features.

Methods. Serum OPN and suPAR levels were analysed in 197 patients, with systemic autoimmune diseases (n = 151) or primary glomerulonephritis (n = 46), compared to 138 healthy controls. OPN and suPAR serum levels were measured with ELISA test.

Results. Serum levels of both markers were higher in autoimmune disorders, particularly in patients with Vasculitides and Antiphospholipid syndrome. OPN

serum levels were significantly increased in systemic autoimmune diseases compared with primary GN (OR = 2.549, IC: 1.027-6.325) and healthy controls (OR = 5.423, CI: 2.035-14.453). suPAR levels were significantly higher compared with healthy controls (OR = 8.869, IC: 3.387-23.226). A linear correlation between OPN and suPAR was found ($p < 0.001$). Multivariate analysis confirmed an inverse association between serum OPN levels and GFR (OR = 3.330, CI: 1.389-7.988), proteinuria (OR = 2.249, CI: 1.062-4.760), autoimmunity (OR = 2.549, CI: 1.027-6.325) and anemia (OR = 2.528, CI: 1.265-5.053). ACE-inhibitors reduced plasma OPN levels (OR = 0.403, CI: 0.179-0.906). Also for suPAR a significant association with reduced GFR (OR = 2.525, IC: 1.115-5.718) and proteinuria (OR = 3.112, IC: 1.503-6.443) was demonstrated.

Conclusions. This study demonstrates that elevated OPN and suPAR serum levels significantly correlate with renal involvement. It is conceivable that the two molecules play a key pathogenetic role in immune-mediated nephropathies. The inverse association of OPN levels with ACE-inhibitors may provide a new rationale for employment of this class of drugs in autoimmune disorders with renal involvement.

Introduzione

I meccanismi patogenetici alla base delle Patologie Autoimmuni Sistemiche sono ancora in larga parte sconosciuti. La ricerca di nuovi marcatori o mediatori di danno renale in queste patologie è di fondamentale importanza per le possibili applicazioni diagnostiche e terapeutiche che ne possono derivare. Sulla base di questi presupposti, lo studio presentato ha lo scopo di valutare il ruolo di due citochine pleiotropiche coinvolte nella disfunzione endoteliale e nella flogosi cronica, Osteopontina (OPN) e Recettore Solubile dell'Attivatore del Plasminogeno di tipo Urochinasico (suPAR), in un'ampia popolazione di pazienti affetti da diverse Patologie Autoimmuni Sistemiche confrontata con una popolazione di pazienti affetti da Glomerulonefriti (GN) primitive ed un gruppo di controlli sani. Abbiamo inoltre analizzato le correlazioni tra ciascuno dei due marcatori e numerosi aspetti clinico-laboratoristici.

Osteopontina e Recettore solubile del recettore del Plasminogeno

Osteopontina (OPN) è una glicoproteina fosforilata secreta e sintetizzata in diversi tessuti e cellule e coinvolta in numerosi processi fisiologici e patologici. OPN è fisiologicamente espressa a livello di diversi tessuti, tra cui il rene⁽¹⁾. OPN è coinvolta in diverse funzioni cellulari comprendenti adesione, migrazione e sopravvivenza e svolge un ruolo importante nella difesa dalle infezioni⁽²⁾. Patologicamente, OPN è un fattore indipendente di rischio cardiovascolare⁽³⁾ ed è coinvolta nello sviluppo di neoplasie⁽⁴⁾. OPN è una proteina centrale nella regolazione dell'infiammazione e della risposta immunitaria cellulo-mediata ed umorale, stimolando la produzione anticorpale^(5,6,7). La proteina è strettamente correlata all'autoimmunità. I livelli di OPN risultano elevati sia nei siti di lesione che a livello plasmatico in molte patologie autoimmuni tra cui Lupus Eritematoso Sistemico (LES), vasculiti ANCA-associate, Artrite Reumatoide (AR)^(1,8,9). Nel LES è stata dimostrata una correlazione tra polimorfismi del gene che codifica per OPN e lo sviluppo di autoimmunità^(9,10). Studi clinici hanno inoltre dimostrato una correlazione tra livelli plasmatici di OPN e attività di malattia⁽¹¹⁾. La proteina è infine coinvolta nella patologia renale, mediando il danno tubulo-interstiziale e glomerulare. È stata dimostrata una correlazione tra i livelli tissutali renali di OPN e l'infiltrato infiammatorio locale, la funzione renale e la proteinuria in pazienti con glomerulonefrite a depositi di IgA e LES⁽¹²⁾ ed è stata dimostrata un'associazione dei livelli plasmatici di OPN e l'interessamento renale in corso di vasculiti ANCA associate⁽¹³⁾.

Il Recettore dell'Attivatore del Plasminogeno di tipo Urochinasico (uPAR) è un componente fondamentale nel sistema di attivazione del Plasminogeno, un sistema di serin-proteasi coinvolte in: trombolisi, infiammazione, migrazione cellulare, rimodellamento tissutale, invasione tumorale. Esiste una forma solubile di tale recettore (suPAR), che deriva dal clivaggio del recettore di membrana ad opera di proteasi o che può essere rilasciato direttamente da cellule macrofagiche, endoteliali o tumorali^(14,15). Bassi livelli di suPAR sono presenti anche nel sangue di soggetti sani, mentre un aumento della concentrazione sierica del marcatore è spesso un indice aspecifico di patologia. Elevati livelli di suPAR sono associati ad un aumentato rischio cardiovascolare, indipendentemente dai classici fattori di rischio⁽¹⁶⁾. I livelli di uPAR e suPAR sono aumentati in diverse neoplasie. suPAR svolge importanti azioni di reclutamento delle cellule immunitarie, pro-infiammatorie e di difesa dalle infezioni⁽¹⁴⁾. La valutazione dei livelli sierici di suPAR è stata proposta quale indicatore prognostico in pazienti con diverse infezioni e nella sepsi⁽¹⁷⁾. Gli studi riguardanti il ruolo di suPAR nell'autoimmunità non sono ancora molto numerosi anche se sono stati individuati alcuni dati interessanti. Elevati livelli di suPAR a livello sierico e del liquido sinoviale sono stati riscontrati in pazienti con AR con una correlazione con gli indici di infiammazione e di attività di malattia⁽¹⁸⁾. Infine, le conoscenze relative alla forma solubile del recettore e i meccanismi di danno renale sono ancora poco note. I livelli di suPAR sono inversamente correlati ai valori di eGFR e risultano essere aumentati nei pazienti con insufficienza renale cronica⁽¹⁹⁾.

Materiali e metodi

La popolazione arruolata nello studio è costituita da due gruppi di pazienti:

A) Patologie Sistemiche Autoimmuni - LES, Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi primitiva (APS), Vasculiti sistemiche ed un gruppo definito Altre Patologie Autoimmuni comprendente diverse patologie autoimmuni (vedi risultati).

B) Glomerulonefriti primitive biotticamente accertate.

Lo studio è stato effettuato arruolando pazienti afferenti alla Nefrologia Universitaria dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria "Maggiore della Carità" di Novara-Università del Piemonte Orientale e presso diversi reparti universitari ed ospedalieri coinvolti in un precedente studio. Le rilevazioni di laboratorio sono state effettuate in collaborazione con il Laboratorio di

Immunologia dell'Università del Piemonte Orientale utilizzando tecnica ELISA, (kit commerciale DuoSet R&D system, Minneapolis, USA). I dati raccolti sono stati analizzati utilizzando il programma statistico SAS 9.1. I livelli sierici di OPN e suPAR sono stati suddivisi in tre categorie (livelli sierici bassi, medi, elevati) individuando i terzili nella distribuzione di frequenza di ciascun marcatore, dividendo così la popolazione in 3 gruppi omogenei per numero di soggetti.

Risultati

Lo studio è stato condotto su una popolazione di $n = 197$ pazienti, dei quali $n = 151$ affetti da varie Patologie Autoimmuni (gruppo A) e $n = 46$ da GN primitive (gruppo B), e su un gruppo di controllo costituito da un totale di $n = 138$ soggetti sani (51 nei quali è stata dosata OPN e 87 nei quali è stato dosato suPAR).

I pazienti del gruppo A sono stati suddivisi in 4 gruppi in base al tipo di patologia:

- **LES**: $n = 101$
- **APS**: $n = 18$
- **Vasculiti**: $n = 21$ pazienti: $n = 4$ Crioglobulinemia, $n = 3$ Malattia di Beçhet, $n = 2$ Panarterite Nodosa, $n = 6$ vasculite p-ANCA associata, $n = 2$ vasculite c-ANCA associata, $n = 2$ Porpora di Shönlein Henoch, $n = 1$ Arterite di Takayasu, $n = 1$ Arterite Gigantocellulare.
- **Altre Patologie Autoimmuni**: $n = 11$ pazienti: $n = 4$ AR, $n = 2$ Sclerosi Sistemica, $n = 2$ Sindrome di Sjögren, $n = 2$ Spondiloentesoartrite, $n = 1$ Epatite autoimmune, Vitiligine, Piastrinopenia autoimmune.

I pazienti del gruppo B sono risultati composti da:

- **Glomerulonefriti primitive**: $n = 46$ pazienti: $n = 24$ GN a depositi di IgA, $n = 15$ GN membranosa, $n = 4$ GN focale, $n = 3$ GN a lesioni minime.

Nella Tabella I sono rappresentate le caratteristiche generali e la presenza o meno di interessamento renale al momento del reclutamento nello studio nelle diverse popolazioni analizzate.

L'analisi del confronto tra i livelli di OPN e suPAR nelle diverse popolazioni ha dimostrato che entrambe queste citochine sono più elevate nella popolazione delle Patologie Sistemiche Autoimmuni (Tabella II); in questo gruppo i livelli sierici di Osteopontina sono significativamente più elevati sia rispetto alle GN (OR = 2.549; IC: 1.027-6.325) che ai controlli sani (OR = 5.423; IC: 2.035-

N / tot (%)	LES (n = 101)	APA (n = 18)	VASCULITI (n = 21)	ALTRE AUTOIMM (n = 11)	GN (n = 46)	P
Età al Prelievo (anni)						
≤ 40	58/101 (57.43)	6/18 (33.33)	1/21 (4.76)	1/11 (9.09)	15/46 (32.61)	< 0.0001
> 40	43/101 (42.57)	12/18 (66.67)	20/21 (95.24)	10/11 (90.91)	31/46 (67.39)	
media +/- dev st (min, max)	42.14 +/- 14.24 (17.0; 79.0)	52.22 +/- 16.10 (33.0; 77.0)	64.33 +/- 12.94 (35.0; 80.0)	61.64 +/- 15.67 (33.0; 80.0)	50.80 +/- 15.08 (20.0; 83.0)	0.0001
Durata della malattia (anni)						
< 5	26/101 (25.74)	12/18 (66.67)	17/21 (80.95)	3/11 (27.27)	35/46 (76.09)	< 0.0001
5-15	49/101 (48.51)	5/18 (27.78)	3/21 (14.29)	6/11 (54.55)	6/46 (13.04)	
> 15	26/101 (25.74)	1/18 (5.56)	1/21 (4.76)	2/11 (18.18)	5/46 (10.87)	
media +/- dev st (min, max)	10.27 +/- 7.90 (0.15; 33.31)	4.08 +/- 4.33 (0.03; 15.13)	4.35 +/- 8.23 (0; 38.64)	12.72 +/- 14.02 (1.44; 50.64)	5.03 +/- 7.03 (0.06; 36.96)	< 0.0001
Creatinina (mg/dl)						
≤ 1.2	79/101 (78.22)	11/18 (61.11)	6/21 (28.57)	5/11 (45.45)	27/46 (58.70)	0.0001
> 1.2	22/101 (21.78)	7/18 (38.89)	15/21 (71.43)	6/11 (54.55)	19/46 (41.30)	
media +/- dev st (min, max)	1.13 +/- 0.97 (0.50; 6.70)	1.42 +/- 1.34 (0.60; 6.70)	2.26 +/- 1.49 (0.80; 5.10)	1.37 +/- 0.83 (0.60; 3.71)	1.46 +/- 0.92 (0.62; 5.00)	0.0001
Clearance (ml/min)						
> 90	46/101 (45.54)	1/18 (5.56)	0/21 (0)	2/11 (18.18)	11/46 (23.91)	< 0.0001
≤ 90	55/101 (54.46)	17/18 (94.44)	21/21 (100)	9/11 (81.82)	35/46 (76.09)	
media +/- dev st (min, max)	83.24 +/- 32.88 (7.90; 154.00)	62.24 +/- 24.28 (6.80; 119.30)	42.59 +/- 25.56 (10.40; 86.80)	59.11 +/- 28.66 (14.10; 120.10)	67.51 +/- 31.41 (11.70; 125.10)	0.0001
Proteinuria (g/24h)						
≤ 0,150	42/101 (41.58)	13/17 (76.47)	5/21 (23.81)	7/11 (63.64)	9/46 (19.57)	0.0002
> 0,150	59/101 (58.42)	4/17 (23.53)	16/21 (76.19)	4/11 (36.36)	37/46 (80.43)	
media +/- dev st (min, max)	0.76 +/- 1.35 (0.0; 9.0)	0.11 +/- 0.22 (0.0; 0.90)	1.10 +/- 1.26 (0.0; 4.70)	1.18 +/- 2.95 (0.05; 10.0)	1.61 +/- 1.85 (0.02; 6.00)	0.0001
Microematuria						
Presente	26/101 (25.74)	1/18 (5.56)	10/21 (47.62)	1/11 (9.09)	18/46 (39.13)	0.0095
Assente	75/101 (74.26)	17/18 (94.44)	11/21 (52.38)	10/11 (90.91)	28/46 (60.87)	

Tabella I. Caratteristiche generali della popolazione al momento del reclutamento nello studio.

14.453). Per suPAR questo trend è meno forte per quanto riguarda il confronto con le GN (OR = 1.373; IC: 0.666-2.830) ma viene mantenuto nel confronto con i sani (OR = 8.869; IC: 3.387-23.226). Inoltre nell'ambito delle Patologie Autoimmuni i livelli più elevati di entrambi i mediatori si sono riscontrati nelle Vasculiti e nella APS. Livelli moderatamente elevati, ma comunque superiori a quelli dei controlli sani, si riscontrano nelle GN primitive (Figure 1 e 2).

media +/- dev st (min, max) mediana	LES (n = 101)	APS (n = 18)	VASCULITI (n = 21)	ALTRE AUTOIMM (n = 11)	GN (n = 46)	SANI (n = 51)	p
OPN (ng/ml)	23.20 +/- 20.62 (1.06; 129.69) 17.93	36.94 +/- 19.70 (6.40; 59.50) 45.48	33.36 +/- 32.04 (2.64; 143.06) 27.36	21.37 +/- 29.22 (0.84; 85.16) 4.09	18.10 +/- 17.58 (0.70; 54.84) 10.15	10.65 +/- 11.21 (1.10; 49.51) 5.96	< 0.0001
suPAR (ng/ml)	4.47 +/- 2.77 (0.52; 15.15) 3.62	4.52 +/- 2.68 (0.68; 12.19) 3.99	6.19 +/- 4.30 (1.30; 19.31) 4.72	4.41 +/- 3.22 (1.72; 13.04) 3.90	3.66 +/- 2.43 (0.57; 11.16) 3.11	1.86 +/- 1.70 (0.15; 8.68) 1.45	< 0.0001

Tabella II. Livelli medi di OPN e suPAR nelle popolazioni patologiche e nei controlli sani.

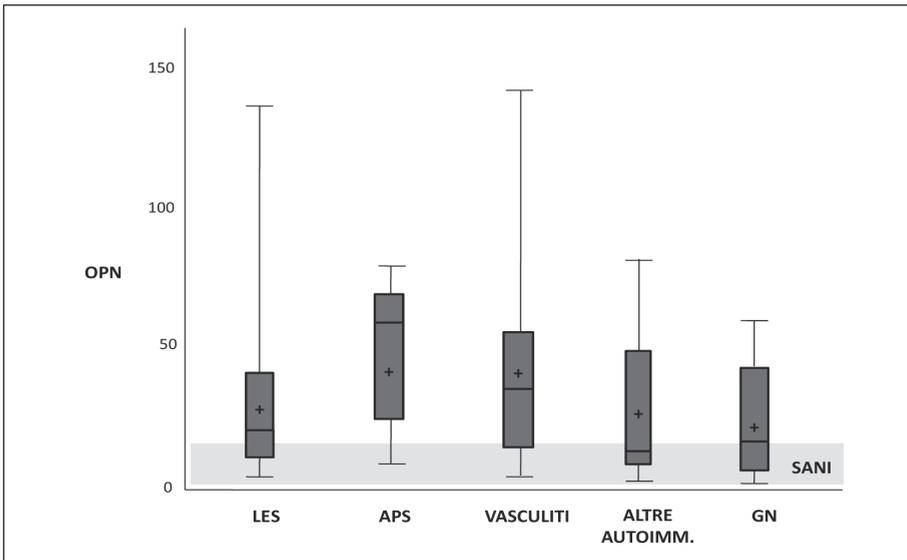


Figura 1. Box Plots rappresentanti i livelli di OPN nei diversi gruppi in studio (gruppo A e B) in relazione anche ai controlli sani (banda in basso). Il segno (+) rappresenta la Media.

L'analisi della correlazione lineare tra OPN e suPAR nelle popolazioni patologiche dimostra una correlazione statisticamente significativa tra i due marcatori, in presenza però di un'ampia dispersione dei dati ($Rho = 0.36$; $p < 0.0001$) (Figura 3).

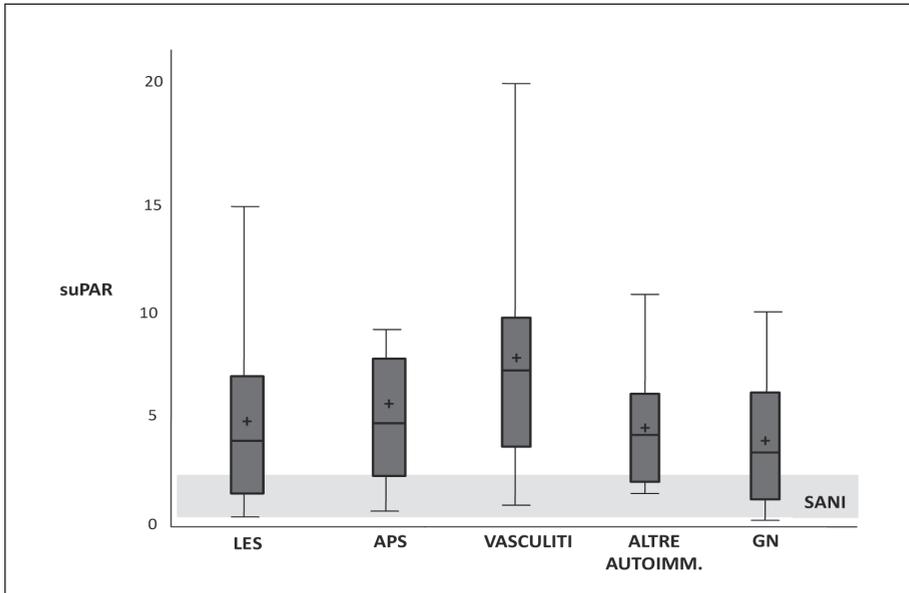


Figura 2. Box Plots rappresentanti i livelli di suPAR nei diversi gruppi in studio (gruppo A e B) in relazione anche ai controlli sani (banda in basso). Il segno (+) rappresenta la Media.

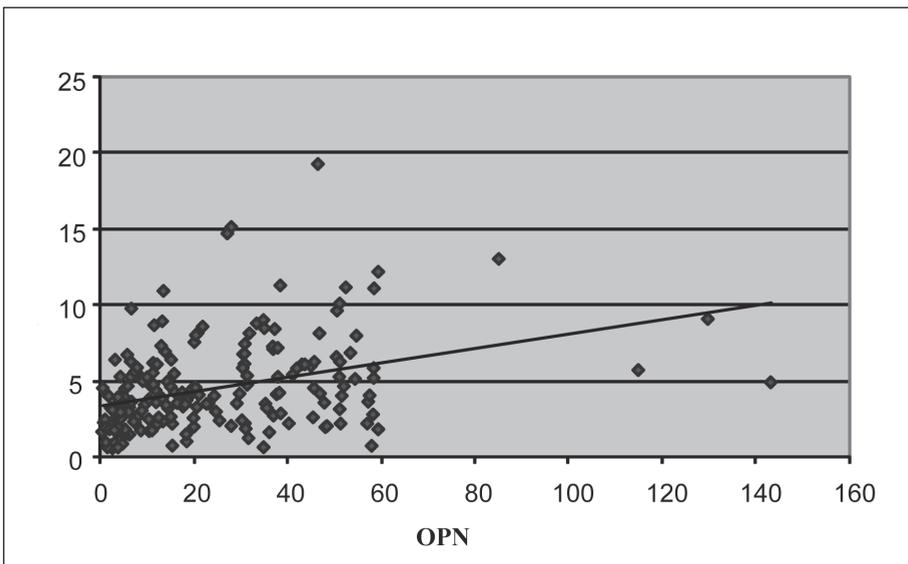


Figura 3. Correlazione lineare tra OPN e suPAR nelle popolazioni LES, APS, Vasculiti, Altre Patologie Autoimmuni e GN.

Un'estesa analisi della correlazione tra i livelli sierici di ciascuno dei due marcatori e diversi parametri clinici e di laboratorio è stata effettuata al fine di valutarne l'utilità quali potenziali marcatori di aspetti specifici di malattia. Dall'analisi logistica multivariata sono emersi alcuni potenziali fattori di rischio per elevati valori di OPN (Tabella III, Figura 4).

<i>Fattori di Rischio</i>	OR	IC 95%
Età	0.621	0.292 - 1.319
Sesso	1.659	0.773 - 3.558
Clearance Creatinina	3.330	1.389 - 7.988
Proteinuria 24 ore	2.249	1.062 - 4.760
Emoglobina	2.528	1.265 - 5.053
Terapia con ACE-inibitori	0.403	0.179 - 0.906
Autoimmunità Vs Glomerulonefriti	2.549	1.027 - 6.325

Tabella III. Analisi Multivariata tra fattori di rischio e OPN

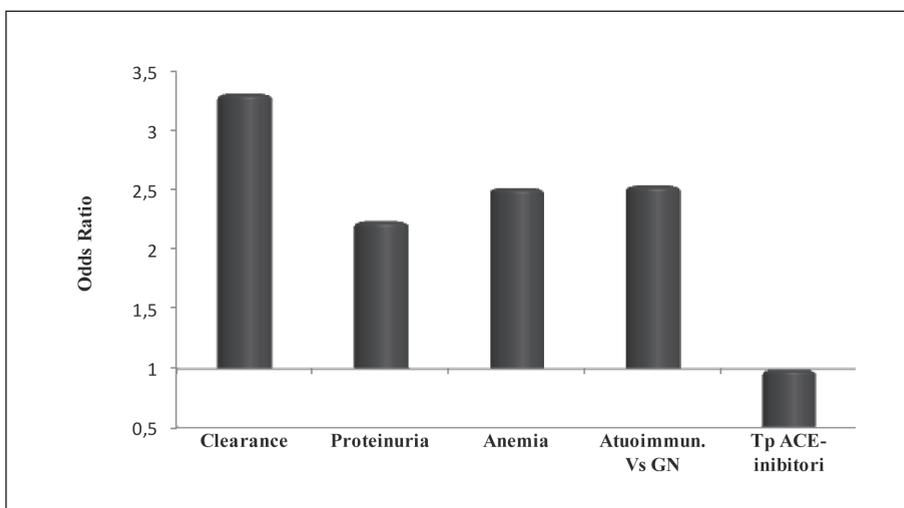


Figura 4. Rilevanza dei diversi fattori di rischio risultati statisticamente significativi all'analisi multivariata determinanti il rischio di avere elevati livelli sierici di OPN.

I pazienti con Clearance della Creatinina ridotta ($\text{ClCr} \leq 90 \text{ ml/min}$) hanno un rischio di 3.33 volte di avere elevati livelli sierici di OPN, a parità di età, sesso, proteinuria delle 24 ore, valori di emoglobina, terapia con ACE-inibitori e presenza di una Patologia Autoimmune. In presenza di proteinuria delle 24 ore ($> 150 \text{ mg/24 ore}$) il rischio di avere elevati livelli sierici del marcatore è circa doppio (OR 2.249). I pazienti con anemia hanno un rischio di 2.528 volte di avere elevati livelli sierici di OPN, indipendentemente dagli altri fattori di rischio considerati. I pazienti affetti da Patologie Autoimmuni hanno

<i>Fattori di Rischio</i>	p	IC 95%
Età	0.848	0.417-1.728
Sesso	1.205	0.591-2.457
Clearance Creatinina	2.525	1.115-5.718
Proteinuria 24 ore	3.112	1.503-6.443
Terapia con ACE-inibitore	0.559	0.265-1.175
Autoimmunità Vs Glomerulonefriti	1.841	0.808-4.193

Tabella IV. Analisi Multivariata tra fattori di rischio e suPAR.

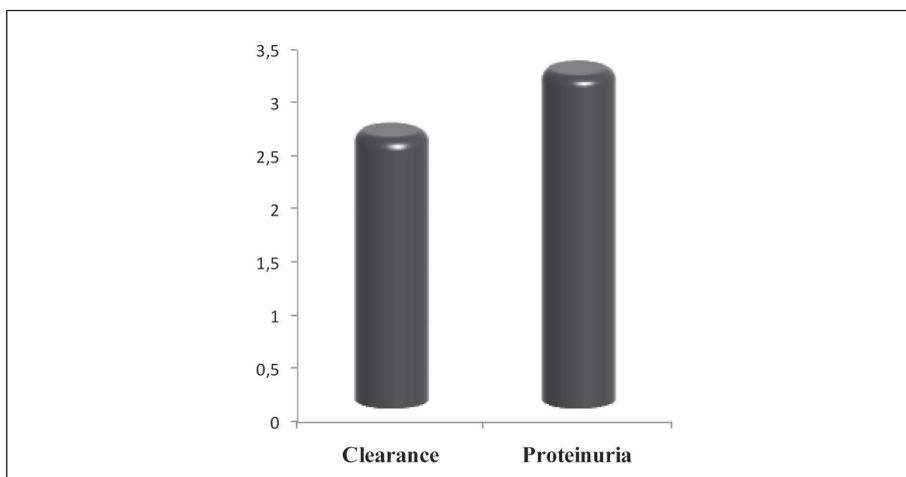


Figura 5. Rilevanza dei diversi fattori di rischio risultati statisticamente significativi all'analisi multivariata nel determinare il rischio di avere elevati livelli sierici di suPAR.

un rischio di 2.549 volte di avere elevati livelli sierici di OPN. Dall'analisi multivariata riguardante suPAR (Tabella IV, Figura 5) è invece emerso che: in presenza di ridotta funzione renale ($\text{ClCr} \leq 90 \text{ ml/min}$) il rischio di avere elevati livelli sierici di suPAR aumenta di 2.525 volte, a parità di età, sesso, proteinuria delle 24 ore, terapia con ACE-inibitori e presenza di una Patologia Autoimmune. I pazienti con Proteinuria delle 24 ore patologica ($> 150 \text{ mg/24 ore}$) hanno un rischio di 3.112 volte di avere elevati livelli sierici del marcatore a parità dei fattori di rischio considerati.

Discussione

La ricerca di nuovi marcatori in grado di caratterizzare dal punto di vista clinico o sierologico le Patologie Autoimmuni Sistemiche è cruciale per affinare la nostra capacità diagnostica e prognostica in questo contesto. Recentemente un ruolo crescente sta emergendo per due citochine pleiotropiche: OPN e suPAR. Dai risultati del nostro studio è emerso che entrambi questi marcatori sono significativamente più elevati nelle Patologie Autoimmuni Sistemiche sia rispetto al gruppo delle GN primitive che rispetto ai controlli sani. I livelli in assoluto più elevati di entrambi i marcatori si sono registrati nella APS e nelle Vasculiti. Una possibile interpretazione potrebbe essere che in queste patologie l'endotelio è primitivamente danneggiato e questo si rifletterebbe in un incremento dei livelli sierici delle due molecole, entrambe strettamente associate alla microinfiammazione e alla disfunzione endoteliale. Nel caso di suPAR, inoltre, l'incremento dei livelli potrebbe riflettere un'inibizione del sistema della fibrinolisi⁽²⁰⁾, un meccanismo di danno rilevante sia nella APS che nelle Vasculiti. Numerose malattie autoimmuni sono state associate con un'aterosclerosi "accelerata", sostenuta da citochine e chemochine proinfiammatorie, con conseguente aumento del rischio cardiovascolare⁽²¹⁾. Sia OPN che suPAR potrebbero giocare un ruolo importante nel determinare una vasculopatia infiammatoria nel contesto di una malattia autoimmune.

Un ulteriore aspetto rilevante che emerge dal confronto dei livelli di OPN e suPAR nelle diverse patologie è che, considerando globalmente tutte le Patologie Sistemiche Autoimmuni Versus le GN primitive, OPN è significativamente più elevata nelle prime, mentre per suPAR questo trend è meno forte. I livelli di OPN appaiono quindi correlati alla flogosi sistemica e sono più bassi nelle GN primitive nelle quali questa dovrebbe essere assente. Tuttavia è interessante notare che anche i livelli di entrambi i marcatori rilevati nelle GN primitive sono significativamente più elevati di quelli dei controlli sani, suggerendo che anche nelle GN primitive esista un certo grado di

microinfiammazione sistemica, anche se di minor intensità rispetto a quanto rilevato nell'autoimmunità.

I livelli sierici dei due marcatori correlano tra di loro, in accordo con la comune associazione con la disfunzione endoteliale ed il rischio cardiovascolare.

Livelli elevati sia di OPN che di suPAR sono risultati significativi fattori di rischio per la presenza di un coinvolgimento renale, correlando sia con la presenza di proteinuria che di insufficienza renale cronica, come confermato all'analisi multivariata. La presenza di livelli elevati di OPN raddoppia il rischio di avere proteinuria (OR = 2.249; IC: 1.062-4.760) e triplica quello di avere insufficienza renale (OR = 3.33; IC: 1.389-7.988). Analogamente, nel modello di analisi multivariata scelto per suPAR, in presenza di livelli elevati di suPAR, il rischio di avere una proteinuria triplica (OR = 3.112; IC: 1.503-6.443) e raddoppia quello di avere un'insufficienza renale (OR = 2.525; IC: 1.115-5.718). Questi dati sono coerenti con alcune recenti segnalazioni della letteratura per quanto riguarda OPN, mentre evidenziano per la prima volta un'associazione tra suPAR e nefropatia. Il ruolo di OPN nel condizionare lo sviluppo di una proteinuria glomerulare è suggerito da diversi studi sperimentali: l'espressione del mRNA di OPN a livello renale è aumentata in modelli murini di nefropatia diabetica e sindrome nefrosica⁽²²⁾, e topi knock-out per OPN risultano protetti dallo sviluppo di espansione mesangiale e albuminuria nella nefropatia diabetica⁽²³⁾. OPN è in grado di attivare il TGF beta esercitando quindi un effetto pro-fibrotico che favorirebbe la progressione della nefropatia diabetica⁽²⁴⁾. Anche alcuni studi clinici confermerebbero l'associazione tra OPN e proteinuria: la concentrazione urinaria e renale di OPN è risultata aumentata in pazienti con sindrome nefrosica⁽²³⁾ e i livelli sierici aumenterebbero parallelamente alla progressione della nefropatia diabetica⁽²⁵⁾. Altri Autori hanno sottolineato per contro che i livelli circolanti di OPN sono strettamente dipendenti dal filtrato glomerulare, suggerendo una ritenzione di OPN in presenza di insufficienza renale⁽²⁶⁾.

L'analisi dei nostri dati ci consente di affermare che i livelli sierici di **OPN** correlano con la presenza di insufficienza renale non solo per un effetto di ritenzione ma anche come conseguenza di un'azione nefrolesiva della citochina, in quanto l'analisi logistica multivariata ha rilevato un'associazione indipendente con la presenza di proteinuria, a parità di funzione renale. Questo risultato delinea per la prima volta un ruolo indipendente dei livelli sierici di OPN come fattore di progressione del danno renale in una popolazione di pazienti affetti da patologia sistemica autoimmune e GN cronica, analogamente a quanto osservato nella nefropatia diabetica.

In questo contesto l'evidenza di un **effetto protettivo degli ACE-inibitori** rispetto alla presenza di livelli elevati di OPN (OR = 0.403; IC: 0.179-0.906) consente di ipotizzare che uno dei meccanismi attraverso i quali questi farmaci determinano una nefroprotezione consista proprio nella riduzione dei livelli sierici e tissutali di OPN. In effetti è stato dimostrato che l'Angiotensina 2 è un potente stimolatore della sintesi di OPN a livello del tessuto renale e che il trattamento con ACE-inibitore ne corregge l'iperpressione in modelli sperimentali, rallentando così la progressione del danno tubulo-interstiziale^(27,28). È presente un unico studio che abbia dimostrato una riduzione dei livelli sierici di OPN da parte degli ACE-inibitori in una popolazione di pazienti affetti da arteriopatia periferica⁽²⁹⁾. Benché i rapporti tra livelli sierici e tissutali di OPN non siano definiti e richiedano ulteriori studi, appare biologicamente plausibile che una riduzione dei livelli sierici di OPN possa avere un impatto anche su quelli tissutali, determinando gli effetti positivi documentati dai modelli sperimentali che abbiamo precedentemente descritto.

Anche i nostri risultati relativi a **suPAR** si inseriscono coerentemente nel panorama delle evidenze della letteratura, benché queste siano molto più frammentarie. Per quanto riguarda i livelli sierici di suPAR, valori elevati sono stati dimostrati nell'insufficienza renale cronica⁽¹⁹⁾ e sembrano correlare con lo stato iperfibrinolitico compensatorio che caratterizza questa condizione di per sé trombofilica, oltre che con lo stress ossidativo e con la prevalenza di malattia cardiovascolare. Per quanto riguarda invece le azioni tissutali, uPAR attraverso l'interazione con vari co-recettori e l'azione chemiotattica promuoverebbe il reclutamento di vari tipi di cellule infiammatorie e la progressione delle lesioni renali⁽³⁰⁾. Tuttavia, a differenza di OPN, non è presente in letteratura alcuna evidenza di una correlazione tra suPAR e nefropatia nell'uomo. Esiste infatti un'unica segnalazione di un'associazione fra livelli sierici e rapporto albuminuria/creatininuria espressione di disfunzione endoteliale e di danno d'organo subclinico⁽¹⁶⁾. Il nostro studio evidenzia per la prima volta una correlazione indipendente di suPAR con la proteinuria e con la presenza di insufficienza renale, suggerendo che, in analogia a OPN, anche i livelli sierici di suPAR siano correlati alla presenza di un coinvolgimento renale clinicamente manifesto.

È importante sottolineare, tuttavia, che il presente studio è di tipo retrospettivo e non è possibile stabilire una relazione causa-effetto tra le associazioni. Le associazioni tra livelli sierici di OPN e suPAR e le manifestazioni del coinvolgimento renale non consentono un'interpretazione univoca e necessitano di conferme da ulteriori studi.

Un ultimo aspetto degno di nota è la correlazione tra elevati livelli sierici di OPN e anemia che risulta plausibile nel contesto di flogosi cronica che caratterizza queste patologie. È stato inoltre dimostrato che OPN inibisce la proliferazione delle cellule staminali ematopoietiche⁽³¹⁾. L'insieme di questi dati induce ritenere plausibile che livelli sierici elevati di OPN possano contribuire a determinare un'anemia e che questa associazione sottenda un nesso causale da confermare con studi prospettici.

Conclusioni

I livelli sierici di OPN e suPAR sono più elevati nei pazienti “immunologici” globalmente considerati (Patologie Sistemiche Autoimmuni e GN primitive) rispetto ai controlli sani. All'interno della popolazione patologica, i livelli di OPN sono significativamente più elevati nelle Patologie Autoimmuni rispetto a alle GN primitive, ed un analogo trend si evidenzia per i livelli di suPAR; infine, nell'ambito delle Patologie Autoimmuni i livelli di OPN e suPAR appaiono più elevati nelle Vasculiti e nella APS. Queste differenze riflettono verosimilmente differenti gradi di disfunzione endoteliale e microinfiammazione. I livelli sierici di OPN e suPAR correlano con l'interessamento renale. Livelli elevati di OPN e suPAR sono un fattore di rischio indipendente per la presenza sia di insufficienza renale che di proteinuria, a prescindere dal tipo di malattia immunologica (autoimmunità sistemica o patologia renale primitiva). È ipotizzabile che queste citochine non siano solo marcatori ma anche mediatori di danno renale. Livelli elevati di OPN – ma non di suPAR – sono inoltre associati ad una maggior frequenza di malattia autoimmune e di anemia mentre è emersa un'associazione negativa con la terapia con ACE-inibitore, introducendo un possibile inedito meccanismo di nefroprotezione da parte di questa classe di farmaci in pazienti con patologie immuno-mediate. Ulteriori studi saranno necessari per confermare tali risultati.

BIBLIOGRAFIA

1. Wang KX, Denhardt DT. *Osteopontin: Role in immune regulation and stress responses.* Cytokine & Growth Factor Rev. 2008; 19: 333-345.
2. Lund SA, Giachelli CM, Scatena M. *The role of osteopontin in inflammatory processes.* J Cell Commun Signal. 2009; 3: 311-322.
3. Ohmori R, Momiyama Y, Taniguchi H, Takahashi R, Kusuhara M, Nakamura H, Ohsuzu F. *Plasma osteopontin levels are associated with the presence and extent of coronary artery disease.* Atherosclerosis. 2003; 170: 333-337.
4. Hirama M, Takahashi F, Takahashi K, Akutagawa S, Shimizu K, Soma S, Shimanuki Y, Nishio K, Fukuchi Y. *Osteopontin overproduced by tumor cells acts as a potent angiogenic factor contributing to tumor growth.* Cancer Letters. 2003; 198: 107-117.
5. Koh A, Silva AP, Bansal AK, Bansal M, Sun C, Lee H, Glogauer M, Sodek J, Zohar R. *Role of osteopontin in neutrophil function.* Immunology. 2007; 122: 466-475.
6. O'Regan AW, Chupp GL, Lowry JA, Goetschkes M, Mulligan N, Berman JS. *Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro.* J Immunol. 1999; 162: 1024-1031.
7. Rothstein TL, Guo B. *Receptor crosstalk: reprogramming B cell receptor signalling to an alternate pathway results in expression and secretion of the autoimmunity-associated cytokine, osteopontin.* J of Intern Med. 2009; 265: 632-643.
8. Xu G, Nie H, Li N, Zheng W, Zhang D, Feng G, Ni L, Xu R, Hong J, Zhang JZ. *Role of osteopontin in amplification and perpetuation of rheumatoid synovitis.* J Clin Invest. 2005; 115: 1060-1067.
9. Chiocchetti A, Indelicato M, Bensi T, Mesturini R, Giordano M, Sametti S, Castelli L, Bottarel F, Mazzarino MC, Garbarini L, Giacomelli F, Valesini G, Santoro C, Dianzani I, Ramenghi U, Dianzani U. *High Levels of osteopontin associated with polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation.* Blood. 2004; 103: 1376-1382.
10. D'alfonso S, Barizzone N, Giordano M, Chiocchetti A, Magnani C, Castelli L, Indelicato M, Giacomelli F, Marchini M, Scorza R, Danieli MG, Cappelli M, Migliaresi S, Bigliardo B, Sabbadini MG, Baldissera E, Galeazzi M, Sebastiani GD, Minisola G, Ravazzolo R, Dianzani U, Momigliano-Richiardi P. *Two single-nucleotide polymorphisms in the 5' and 3' ends of the osteopontin gene contribute to susceptibility to systemic lupus erythematosus.* Arthritis & Rheum. 2005; 52: 539-547.
11. Wong CK, Lit LCW, Tam SL, Li EK, Lam CW. *Elevation of plasma Osteopontin concentration is correlated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus.* Rheum. 2005; 44: 602-606.
12. Okada H, Moriwaki K, Konishi K, Kobayashi T, Sugahara S, Nakamoto H, Saruta T, Suzuki H. *Tubular Osteopontin expression in human glomerulonephritis and renal vasculitis.* Am J of Kidney Dis. 2000; 36: 498-506.
13. Lorenzen J, Svjetlana L, Krämer R, Haller H, Haubitz M. *Osteopontin in antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis: relation to disease activity, organ manifestation and immunosuppressive therapy.* Ann Rheum dis. 2010; 69: 1169-1171.
14. Montuori N, Visconte V, Rossi G, Ragno P. *Soluble and cleaved forms of the urokinase-receptor: degradation products or active molecules?* Thromb Haemost. 2005; 93: 192-198.

15. Mondino A, Blasi F. *uPA and uPAR in fibrinolysis, immunity and pathology*. *TRENDS in Immunol.* 2004; 25: 450-455.
16. Sehestedt T, Lyngbaek S, Eugen-Olsen J, Jeppesan J, Andersen O, Hansen TW, Linneberg A, Jorgensen T, Haugaard SB, Olsen MH. *Soluble urokinase plasminogen activator receptor is associated with subclinical organ damage and cardiovascular events*. *Atherosclerosis.* 2011; 216: 237-243.
17. Eugen-Olsen J. *suPAR-a future risk marker in bacteremia*. *J Intern Med.* 2011; 270: 29-31.
18. Pliyev BK, Menshikov MY. *Release of the soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (suPAR) by activated neutrophils in rheumatoid arthritis*. *Inflammation.* 2010; 33: 1-9.
19. Pawlak K, Buraczewska-Buczko A, Mysliwiec M, Pawlak D. *Hyperfibrinolysis, uPA/suPAR system, kynurenes and the prevalence of cardiovascular disease in patients with chronic renal failure on conservative treatment*. *Anticancer Res.* 2004; 24: 1981-1985.
20. Sloand EM, Pfannes L, Scheinberg P, More K, Wu CO, Horne M, Young NS. *Increased soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) is associated with thrombosis and inhibition of plasmin generation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) patients*. *Exp Hematol.* 2008; 36: 1616-1624.
21. Churg J, Bernstein J, Glassock RJ. *Lupus nephritis*. In "Classification and Atlas of Glomerular Disease", 1995: 151-156, Igaku-Shoin ed, New York.
22. Berden AE, Nolan SL, Morris HL, Bertina RM, Erasmus DD, Hagen EC, Hayes DP, van Tilburg NH, Bruijn JA, Savage CO, Bajema IM, Hewins P. *Anti-plasminogen antibodies compromise fibrinolysis and associate with renal histology in ANCA-associated vasculitis*. *J Am Soc Nephrol.* 2010; 21: 2169-2179.
23. Lorenzen J, Shah R, Biser A, Staicu SA, Niranjana T, Garcia AM, Gruenwald A, Thomas DB, Shatat IF, Supe K, Woroniecki RP, Susztak K. *The role of Osteopontin in the development of albuminuria*. *J Am Soc Nephrol.* 2008; 19: 884-890.
24. Susztak K, Böttinger E, Novitsky A, Liang D, Ciccone E, Wu D, Dunn S, McCue P, Sharma K. *Molecular profiling of diabetic mouse kidney reveals novel genes linked to glomerular disease*. *Diabetes.* 2004; 53: 784-794.
25. Nicholas SB, Liu J, Kim J, Ren Y, Collins AR, Nguyen L, Hsueh WA. *Critical role for osteopontin in diabetic nephropathy*. *Kidney Int.* 2010; 77: 588-600.
26. Yamaguchi H, Igarashi M, Hirata A, Tsuchiya H, Sugiyama K, Morita Y, Jimbu Y, Ohnuma H, Daimon M, Tominaga M, Kato T. *Progression of diabetic nephropathy enhances the plasma osteopontin level in type 2 diabetic patients*. *Endocr J.* 2004; 51: 499-504.
27. Shiomi K, Shiomi S, Ishinaga Y, Sakuraba M, Hagiwara Y, Miyashita K, Maeda M, Suzuki K, Takahashi K, Hino O. *Impact of Renal Failure on the Tumor Markers of Mesothelioma, N-ERC/Mesothelin and Osteopontin*. *Anticancer Res.* 2011; 31: 1427-1430.
28. Li C, Yang CW, Park CW, Ahn HJ, Kim WY, Yoon KH, Suh SH, Lim SW, Cha JH, Kim YS, Kim J, Chang YS, Bang BK. *Long-term treatment with Ramipril attenuates renal Osteopontin expression in diabetic rats*. *Kidney Int.* 2003; 63: 454-463.
29. Koshikawa M, Aizawa K, Kasai H, Izawa A, Tomita T, Kumazaki S, Tsutsui H, Koyama J, Shimodaira S, Takahashi M. *Elevated Osteopontin levels in patients with peripheral arterial disease*. *Angiology.* 2009; 60: 42-45.

30. Wiggins KJ, Tiauw V, Zhang Y, Gilbert RE, Langham RG, Kelly DJ. *Perindopril attenuates tubular hypoxia and inflammation in an experimental model of diabetic nephropathy in transgenic Ren-2 rats*. *Nephrology*. 2008; 13: 721-729.
31. Haylock DN, Nilsson SK. *Osteopontin: a bridge between bone and blood*. *BJH*. 2006; 134: 467-474.

OSTRUZIONE DELLE VIE AEREE DA ESERCIZIO FISICO E DEFICIT DI VITAMINA D

Premio “Italo Arneodo” 2010/2011
Tesi di Laurea premiata in collaborazione con
l'Accademia di Medicina di Torino

*Davide Varenni, Beatrice Culla, Giuseppe Guida,
Luisa Brussino, Caterina Bucca*

Servizio di Fisiopatologia Respiratoria
Dipartimento di Scienze Mediche - Università di Torino
A.O. Città della Salute e della Scienza di Torino

Parole chiave: *Laringospasmo indotto da esercizio fisico*
Broncospasmo indotto da esercizio fisico
Deficit di vitamina D
Test all'iperventilazione volontaria eucapnica

Key words: *Exercise-induced laryngospasm*
Exercise-induced bronchospasm
Vitamin D deficiency
Eucapnic voluntary hyperventilation test

Riassunto

Obiettivo. Il broncospasmo indotto da esercizio fisico (EI-B) è frequente nella popolazione generale, soprattutto tra gli atleti. La sintomatologia dell'EI-B può essere simulata dal laringospasmo che si verifica durante esercizio fisico (EI-L). Quest'ultimo è favorito da condizioni determinanti l'ipocalcemia, quale il deficit di vitamina D. Recenti osservazioni indicano che la vitamina D svolge un ruolo importante su salute e funzione delle vie aeree ed è implicata nella patogenesi dell'asma bronchiale. Scopo del presente lavoro era valutare se il deficit di vitamina D potesse favorire la comparsa di EI-B e di EI-L.

Metodi. Sono stati arruolati 37 giovani atleti sani (24 maschi e 13 femmine). Sono stati valutati livelli di vitamina D, parametri ematologici,

inclusi i parametri nutrizionali, spirometria basale e test all'iperventilazione volontaria eucapnica (EHV) utilizzato come surrogato del test di provocazione bronchiale all'esercizio fisico. Per valutare la risposta broncospastica all'EHV è stato utilizzato il volume espiratorio massimo al primo secondo (FEV_1), per quella laringospastica il massimo flusso medio inspiratorio (MIF_{50}).

Risultati. Dei 37 soggetti, 32 (86%) presentavano deficit di vitamina D, moderato-grave nel 32% dei casi. Il test EHV dimostrava EI-B in 10 soggetti (27%) ed EI-L in 16 (43%); in 6 soggetti (16%) si evidenziava sia iperreattività bronchiale che laringea. Gli atleti con EI-L, rispetto a quelli senza EI-L, avevano livelli di vitamina D significativamente inferiori ($19,0 \pm 1,6$ vs $27,2 \pm 1,4$; $p = 0,001$) e di paratormone significativamente più elevati ($30,5 \pm 3,6$ vs $19, \pm 1,8$; $p = 0,005$). La massima caduta del MIF_{50} risultava significativamente correlata ai livelli di vitamina D ($r = 0,51$; $p = 0,001$) e di paratormone ($r = 0,53$; $p = 0,001$).

Conclusioni. La maggior parte dei giovani atleti esaminati aveva deficit di vitamina D e oltre il 40% di essi aveva laringospasmo al test all'iperventilazione. La soglia di risposta laringospastica era significativamente correlata al livello di vitamina D. Questi risultati confortano l'ipotesi che la carenza di vitamina D favorisca lo spasmo della muscolatura striata laringea durante iperventilazione. I livelli di vitamina D dovrebbero essere controllati in tutti i soggetti che effettuano attività sportiva.

Abstract

Exercise-induced bronchospasm (EI-B) is rather common in the general population, particularly in the athletes. EI-B may be mimicked by laryngospasm occurring during exercise (EI-L). This abnormal response is favoured by conditions causing hypocalcemia, such as vitamin D deficiency. Recent observations indicate that vitamin D has a role in respiratory health and function and its deficiency has been implicated in asthma pathogenesis.

The aim of the present study was to evaluate if vitamin D deficiency has a role in EI-B and EI-L.

Methods. Thirtyseven young healthy athletes (24 men and 13 women) underwent clinical examination, blood drawing for nutritional assessment, spirometry and eucapnic voluntary hyperventilation (EHV) test as surrogato of exercise bronchoprovocation test. The markers of EHV test were the forced expiratory volume in 1 second (FEV_1) for the bronchial response and the maximum mid-inspiratory flow (MIF_{50}) for the laryngeal response.

Results. Most of the 37 athletes (86%) had vitamin D deficiency, which was severe (below 9 ng/ml) in 3. EHV test showed EI-B in 10 subjects (27%), EI-L in 16 (43%); and combined EI-B plus EI-L in 6 (16%). The athletes with EI-L, as compared to those without EI-L, had significantly lower vitamin D levels ($19,0 \pm 1,6$ vs $27,2 \pm 1,4$; $p = 0,001$) and significantly higher parathormone levels ($30,5 \pm 3,6$ vs $19, \pm 1,8$; $p = 0,005$). The maximum MIF_{50} fall was significantly related to both vitamin D ($r = 0,51$; $p = 0,001$) and parathormone level ($r = 0,53$; $p = 0,001$).

Conclusions. Most of the young athletes had vitamin D deficiency. EI-L was more common than EIB. More than 40% of the athletes had a laryngospastic response to the EHV test and this response was closely related to vitamin D and parathormone level. These findings suggest that vitamin D deficiency favours the spasm of the laryngeal striatal muscle spasm during hyperventilation. Vitamin D should be assessed in all the subjects practicing physical activity.

Introduzione

Il broncospasmo indotto da esercizio fisico (EI-B) consiste nella transitoria ostruzione bronchiale indotta dallo sforzo e si diagnostica quando il volume espiratorio massimo al primo secondo (FEV_1), utilizzato come marker di broncospasmo, si riduce almeno del 10% rispetto al valore basale^(1,2). Questa risposta allo sforzo è presente nella maggior parte dei pazienti con asma bronchiale (fino al 90%) ed in tal caso è definito come asma da sforzo (EI-A). L'EI-B è molto frequente anche nei soggetti non asmatici⁽³⁾, in particolare negli atleti. Negli atleti olimpici la prevalenza di EI-B è risultata cinque volte elevata di quella osservata nella popolazione generale^(4,5). In alcune specialità sportive, quali sport invernali, attività di endurance, nuoto, ciclismo e corsa sulle lunghe distanze, la prevalenza di EI-B raggiunge il 50%^(3,5).

I sintomi di EI-B consistono in tosse, sibilo, costrizione toracica e dispnea ed insorgono durante o poco dopo lo sforzo, raggiungendo la massima intensità a 5-10 minuti dal termine.

Il meccanismo con cui lo sforzo fisico determina la broncocostrizione non è chiaro.

La teoria patogenetica più accreditata sostiene che il broncospasmo sia determinato dal rilascio di mediatori dalle cellule infiammatorie, soprattutto i leucotrieni dai mastociti, indotto dalla disidratazione e dal conseguente aumento dell'osmolarità delle cellule epiteliali bronchiali provocato dall'iperventilazione^(3,6,7).

Al broncospasmo da sforzo contribuiscono anche fenomeni fisici, come la riduzione della temperatura dell'aria inspirata dovuta all'iperventilazione, che provoca congestione del letto vascolare bronchiale con edema di mucosa e sottomucosa e conseguente ostruzione delle vie aeree^(7,8) (Figura 1).

In alcuni soggetti lo sforzo fisico può scatenare una risposta laringospastica ovvero una adduzione paradossa delle corde vocali con stridore inspiratorio e iperventilazione^(9,10,11). Tale disfunzione delle corde vocali (VCD) indotta da esercizio fisico (EI-L), a differenza dell'EI-B, compare di solito immediatamente al termine dello sforzo e regredisce entro pochi minuti.

È ampiamente riconosciuto che la VCD può simulare una crisi d'asma, rappresentando un importante problema nella diagnosi differenziale⁽¹²⁾. Il gold standard per la diagnosi di VCD è la laringoscopia⁽¹³⁾. Effettuando la laringoscopia durante sforzo Røksund et al⁽⁹⁾ hanno dimostrato l'insorgenza di laringospasmo scatenato da esercizio fisico. Combinando a questo test anche la registrazione della curva flusso-volume in- ed espiratoria, è stato osservato che il laringospasmo è associato ad una significativa riduzione dei flussi inspiratori. Abbiamo precedentemente osservato che il massimo flusso

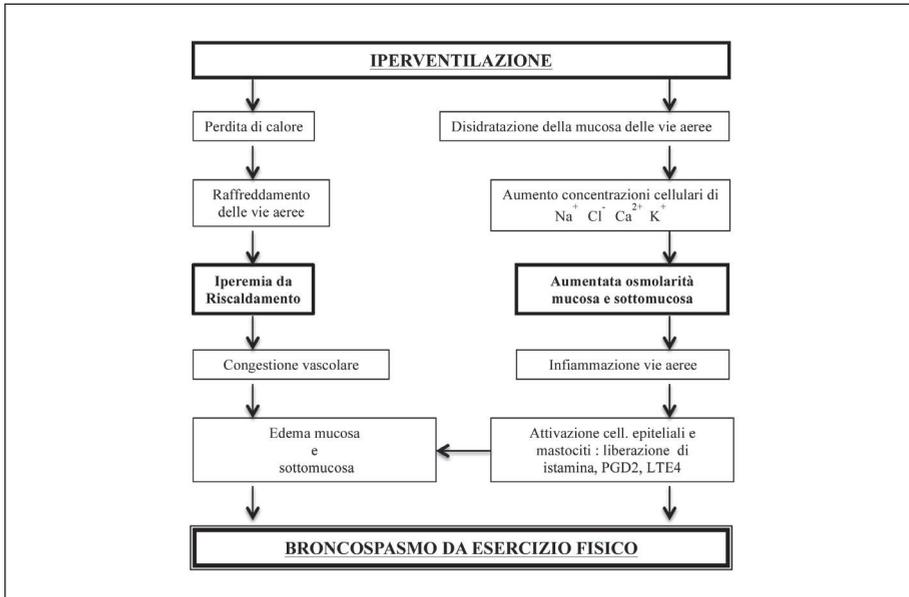


Figura 1. Patogenesi del broncospasmo da esercizio fisico.

inspiratorio al 50% della capacità vitale (MIF_{50}) è un indice sensibile della risposta laringospastica all'inalazione di istamina. Infatti la sua riduzione è risultata significativamente correlata alla riduzione del calibro glottico misurato mediante laringoscopia⁽¹⁴⁾.

La VCD può essere favorita da molteplici condizioni quali le anomalie anatomiche e le patologie infiammatorie delle vie aeree extratoraciche⁽¹⁵⁾. Abbiamo inoltre osservato che la VCD è aggravata dall'ipocalcemia associata a deficit di vitamina D⁽¹⁶⁾.

Recenti osservazioni indicano che il deficit di vitamina D influenza la funzione respiratoria soprattutto durante l'infanzia ed è associato a maggiore prevalenza di asma bronchiale^(17,18). Chinellato et al⁽¹⁹⁾ hanno dimostrato che il deficit di vitamina D, quando presente in bambini ed adolescenti asmatici, si associa ad una maggiore broncocostrizione da sforzo.

Lo scopo del presente lavoro era di valutare la prevalenza di EI-B e di EI-L nei giovani atleti sani in relazione ai livelli di vitamina D. Come test da sforzo è stato utilizzato il test all'iperventilazione volontaria eucapnica (EVH), la cui efficacia nel rilevare l'EI-B è considerata paragonabile ai comuni test da sforzo standardizzati, quali il tappeto rotante ed il cicloergometro⁽²⁰⁾.

Materiali e metodi

Lo studio è stato effettuato nei mesi di marzo-aprile, al termine della stagione invernale. Sono stati arruolati giovani atleti non fumatori, membri di una squadra di canottaggio. I criteri di selezione erano i seguenti: anamnesi negativa per patologie sistemiche e broncopolmonari, test di funzionalità respiratoria nella norma, assenza di terapia farmacologica in atto e assenza di infezioni respiratorie nei 2 mesi precedenti lo studio.

Protocollo dello studio

I soggetti sono stati sottoposti ad esame clinico incluso questionario respiratorio, accertamenti allergologici, dosaggio di 25(OH) vitamina D e paratormone, oltre ad altri parametri nutrizionali, spirometria basale ed EVH.

Lo studio è stato realizzato con finanziamento del Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica (PRIN 2007) ed è stato approvato dal comitato etico locale. Tutti i soggetti hanno rilasciato consenso informato allo studio.

Test di funzionalità respiratoria

I volumi polmonari e la curva flusso-volume sono stati misurati con uno spirometro computerizzato a campana (BAIRES SYSTEM Biomedin, Padova). La curva flusso-volume è stata registrata invitando il paziente ad effettuare una inspirazione massimale fino alla capacità polmonare totale, seguita da una espirazione massimale fino al volume residuo e successivamente una nuova inspirazione massimale. Il test è stato ripetuto fino ad ottenere 3 curve con una variazione della capacità vitale forzata (FVC) inferiore al 5%. FVC, FEV₁ e flusso medio inspiratorio (MIF₅₀) sono stati calcolati dalla prova migliore.

Come valori di riferimento sono stati utilizzati i teorici consigliati dall'European Respiratory Society⁽²¹⁾.

Test all'iperventilazione volontaria eucapnica (EVH)

Il test è stato effettuato utilizzando la tecnica modificata secondo Anderson⁽²⁰⁾.

Il soggetto veniva invitato ad effettuare una massima ventilazione volontaria per 5 minuti respirando una miscela arricchita di anidride carbonica (CO₂ 5% in O₂ 21% e N₂ 74%). Al termine della iperventilazione veniva effettuata una spirometria con registrazione della curva flusso-volume inspiratoria ed espiratoria massimale. Il FEV₁ veniva considerato l'indice di

risposta bronchiale e il MIF_{50} l'indice di risposta laringea. Spirometria e curva flusso-volume (ripetute 2 volte) venivano effettuate 5, 10, 15 e 30 minuti dopo il termine dell'iperventilazione.

È stata considerata indicativa di EI-B una caduta del FEV_1 del 10% rispetto al valore basale, e indicativa di EI-L una caduta del MIF_{50} del 25% del rispettivo valore basale, confermata in due spirometrie consecutive.

Dosaggi plasmatici

Tutti i soggetti venivano sottoposti a prelievo di sangue venoso per la determinazione di: conta dei globuli bianchi, livelli di emoglobina, dosaggi di ferritina, magnesio, fosforo, acido folico, vitamina B12, vitamina C, 25(OH) vitamina D e paratormone. I dosaggi sono stati effettuati presso la Struttura Complessa di Biochimica Clinica "Baldi Riberi" dell'Azienda San Giovanni Battista di Torino. I valori di 25(OH) vitamina D erano considerati sufficienti in presenza di concentrazioni maggiori o uguali a 30 ng/ml, suggestivi di insufficienza lieve-moderata per valori compresi tra 10 e 30 ng/ml e di insufficienza grave se inferiori a 10 ng/ml⁽²²⁾.

Analisi statistica

I dati sono stati analizzati utilizzando il software SPSS (IBM SPSS Statistics n. 17).

Per l'analisi delle caratteristiche generali sono stati utilizzati i metodi di statistica descrittiva, calcolando medie e deviazione standard per le variabili continue, e la frequenza percentuale per le variabili binarie (es. sesso, atopìa, tipo di risposta all'EHV). Il paragone tra caratteristiche dei soggetti in base alla risposta al test è stato effettuato con il test T di Student per campioni indipendenti. La relazione del valore di vitamina D con la caduta del FEV_1 e del MIF_{50} , espressi come percentuale del rispettivo valore basale, è stata effettuata con il test di regressione lineare di Pearson. Le differenze fra valore basale e dopo iperventilazione sono state usate come variabili dipendenti in un'analisi di regressione lineare che aveva come parametri predittivi il valore di vitamina D, e il valore basale di FEV_1 o MIF_{50} e come variabili confondenti parametri demografici, atopìa, parametri nutrizionali e valore del paratormone. Le variabili confondenti erano mantenute nel modello solo se la loro inclusione produceva significative modificazioni dei valori del coefficiente di regressione per la vitamina D.

I risultati dei test sono stati considerati statisticamente significativi per valori di P inferiori a 0,05.

Risultati

Sono stati arruolati 37 giovani atleti non fumatori, con spirometria normale, 24 di sesso maschile e 13 di sesso femminile di età compresa tra i 13 e i 25 anni. Tutti gli atleti negavano sintomi asmatici, 16 erano atopici ma non denunciavano malattie allergiche al momento dell'esame clinico.

La maggior parte dei soggetti aveva deficit di vitamina D (< 30 ng/ml), che era lieve-moderato in 32 soggetti (86%) e grave (< 10 ng/ml) in 3 (8%).

La risposta al test all'iperventilazione eucapnica consisteva in EI-B in 4 soggetti (11%), EI-L in 10 (27%), EI-B combinato con EI-L in 6 soggetti (16%) (Figura 2). Quindi la prevalenza complessiva di EI-B era del 27% (4 + 6 soggetti) e quella di EI-L era del 43% (10 + 6 soggetti). Il paragone fra

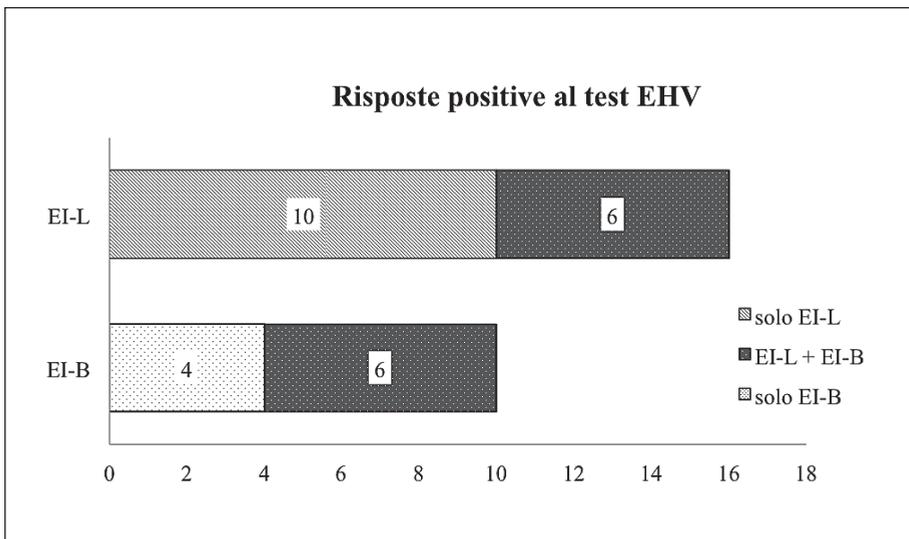


Figura 2. Correlazione tra i livelli di paratormone e massima caduta del MIF_{50} in percentuale dopo test EHV ($r = 0,53$; $p = 0,001$).

atleti con e senza EI-B per le variabili considerate è mostrato in Tabella I, quello tra atleti con e senza EI-L in Tabella II. L'unica differenza rilevante fra soggetti con e senza EI-B era nell'età, significativamente inferiore in quelli con broncospasmo da iperventilazione ($14,6 \pm 0,7$ vs $18,1 \pm 0,8$; $p = 0,015$) (Tabella I). Al contrario, il confronto fra soggetti con e senza EI-L, mostrava che i primi avevano valori di vitamina D significativamente più bassi ($19,0 \pm$

	EI-B - (media ± ES)	EI-B + (media ± ES)	t	P
età (anni)	18,1 ± 0,8	14,6 ± 0,7	2,549	0,015
FVC (% teorico)	102,4 ± 2,5	104,4 ± 4,6	-0,396	0,694
FEV₁ (% teorico)	103,2 ± 2,1	102,4 ± 4,6	0,176	0,862
FEV1/VC (% teorico)	83,8 ± 1,4	83,6 ± 1,5	0,086	0,932
25(OH) VitaminaD (ng/ml)	23,7 ± 1,6	23,5 ± 2,2	0,074	0,942
Calcio (mmol/l)	2,4 ± 0,0	2,5 ± 0,0	-1,717	0,096
Fosforo (mmol/l)	1,3 ± 0,0	1,5 ± 0,1	-2,568	0,015
Magnesio (mmol/l)	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0	-0,849	0,402
ALP (UI/l)	135,6 ± 18,9	172,9 ± 28,7	-1,039	0,308
Paratormone (pg/ml)	23,3 ± 1,9	26,3 ± 6,1	-0,644	0,524
Ferritina (ng/ml)	41,5 ± 4,9	35,5 ± 5,7	0,678	0,503
Vitamina B12 (pg/ml)	414,1 ± 22,2	466,1 ± 51,3	-1,047	0,304
Folati (ng/ml)	5,2 ± 0,3	5,0 ± 0,2	0,429	0,671
Vitamina C (mg/l)	8,6 ± 0,6	9,5 ± 1,1	-0,828	0,415
HGB (g/dl)	14,2 ± 0,3	13,7 ± 0,4	1,086	0,288
WBC (10³/μl)	6,1 ± 0,3	5,6 ± 0,4	0,887	0,383

Tabella I. Paragone fra soggetti con (EI-B+) e senza (EI-B-) broncospasmo da esercizio fisico.

	EI-L - (media ± ES)	EI-L + (media ± ES)	t	P
età (anni)	16,9 ± 0,7	17,5 ± 1,2	-0,485	0,631
FVC (% teorico)	99,1 ± 2,6	108,1 ± 3,4	-2,151	0,038
FEV₁(% teorico)	101,1 ± 2,6	105,5 ± 2,9	-1,131	0,266
FEV1/VC (% teorico)	85,0 ± 1,4	82,1 ± 1,6	1,386	0,174
25(OH) VitaminaD (ng/ml)	27,2 ± 1,5	19,0 ± 1,6	3,725	0,001
Calcio (mmol/l)	2,4 ± 0,0	2,4 ± 0,0	0,584	0,563
Fosforo (mmol/l)	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1	0,499	0,621
Magnesio (mmol/l)	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0	-4,075	0,000
ALP (UI/l)	164,6 ± 23,6	123,9 ± 19,9	1,294	0,206
Paratormone (pg/ml)	19,2 ± 1,8	30,5 ± 3,6	-3,032	0,005
Ferritina (ng/ml)	43,7 ± 4,6	34,5 ± 6,7	1,181	0,246
Vitamina B12 (pg/ml)	440,1 ± 29,3	406,7 ± 28,6	0,798	0,431
Folati (ng/ml)	4,9 ± 0,2	5,5 ± 0,5	-1,297	0,203
Vitamina C (mg/l)	8,8 ± 0,6	8,8 ± 0,9	0,004	0,997
HGB (g/dl)	13,9 ± 0,3	14,2 ± 0,4	-,515	0,611
WBC (10³/μl)	6,2 ± 0,4	5,7 ± 0,3	0,862	0,397

Tabella II. Paragone fra soggetti con (EI-L+) e senza (EI-L-) laringospasmo da esercizio fisico.

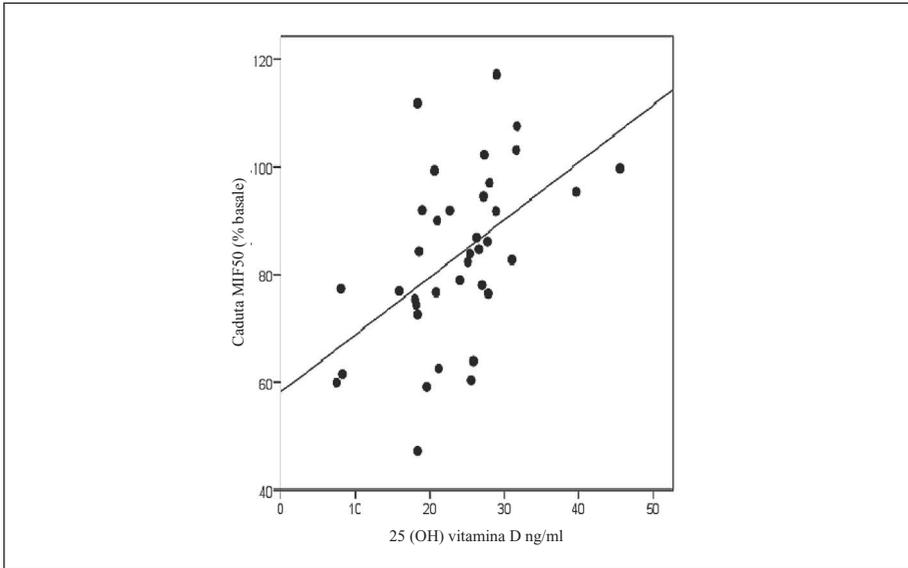


Figura 3. Correlazione inversa tra i livelli di vitamina D e massima caduta del MIF_{50} in percentuale dopo test EHV ($r = 0,51$; $p = 0,001$).

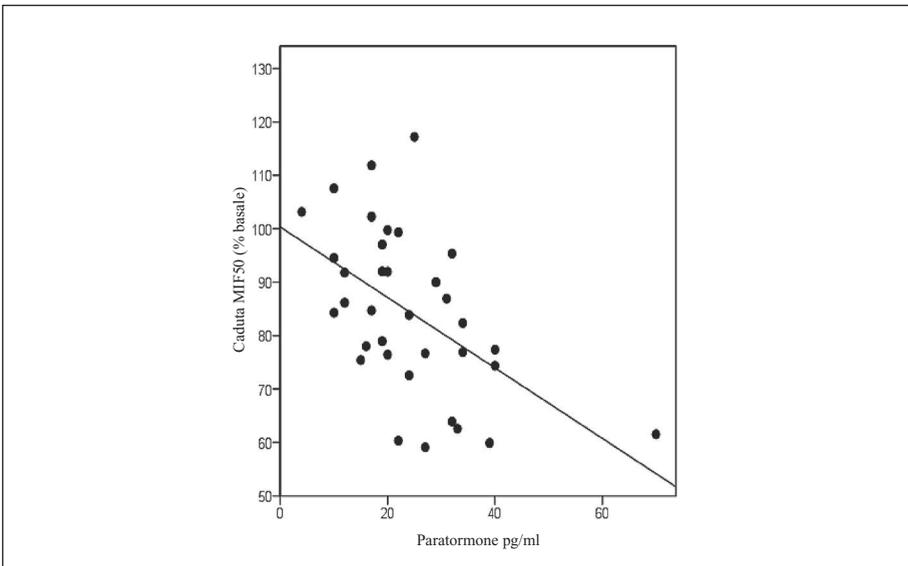


Figura 4. Correlazione diretta tra i livelli di paratormone e massima caduta del MIF_{50} in percentuale dopo test EHV ($r = 0,53$; $p = 0,001$).

1,6 vs $27,2 \pm 1,5$; $p = 0,001$) e paratormone più alto ($30,5 \pm 3,6$ vs $19,2 \pm 1,8$; $p = 0,005$) di quelli senza laringospasmo da iperventilazione (Tabella II).

I livelli di 25(OH) vitamina D sono risultati significativamente inversamente correlati alla risposta costringitiva laringea al test all'iperventilazione, ovvero alla massima caduta del MIF_{50} ($r = 0,51$; $p = 0,001$) (Figura 3) e direttamente correlati ai livelli di paratormone ($r = 0,53$; $p = 0,001$) (Figura 4).

Discussione

I risultati di questo studio dimostrano che la disfunzione delle vie aeree indotta da esercizio fisico è frequente fra i giovani atleti sani e asintomatici. Il 35% dei soggetti esaminati mostrava infatti una caduta significativa del FEV_1 al test all'iperventilazione, suggestiva di broncospasmo indotto dall'esercizio fisico. Ancor più frequente è risultata la risposta laringospastica all'EHV, indice di EI-L, evidenziata nel 43% dei soggetti. Questo dato è piuttosto interessante, alla luce del fatto che il laringospasmo può simulare l'asma, poiché suggerisce che la prevalenza di asma da sforzo negli atleti può essere sopravvalutata.

Comunque, tra gli atleti esaminati in questo studio, nessuno riferiva sintomi respiratori durante l'attività sportiva. È bene osservare che nella maggior parte dei soggetti la caduta dei flussi aerei era di modesta entità e quindi non tale da produrre importante dispnea. È possibile che l'insorgenza di modesto laringospasmo e broncospasmo durante la abituale attività sportiva, venga ignorata grazie a fenomeni di adattamento analoghi a quelli descritti nei pazienti asmatici⁽²³⁾.

Non sono emersi fattori predittivi dell'EI-B a parte l'età anagrafica, significativamente minore negli atleti con iperreattività bronchiale, a suggerire un meccanismo legato alla maturazione delle strutture bronchiali^(24,25). In particolare, non è emersa alcuna associazione tra EI-B e deficit di vitamina D, a differenza dei dati riportati in letteratura, sia riguardo al broncospasmo da sforzo⁽¹⁹⁾ che all'asma bronchiale^(18,19,26,27). Comunque i 7 atleti che presentavano sia broncospasmo che laringospasmo da EHV avevano i valori medi di vitamina D più bassi di tutta la popolazione studiata.

Il risultato più interessante di questo studio è l'elevata prevalenza di risposta laringospastica allo sforzo e la sua stretta correlazione con il deficit di vitamina D. Sebbene il meccanismo attraverso il quale la carenza di vitamina D possa favorire il laringospasmo non sia noto, si può ipotizzare che esso sia correlato al disturbo dell'omeostasi del calcio. Nel tessuto muscolare, il deficit di vitamina D determina una riduzione della frazione ionizzata del calcio

(Ca²⁺), sia a livello intra che extracellulare, promuovendo l'insorgenza di uno stato tetanico. Al contempo l'ipocalcemia può aumentare la permeabilità delle fibre nervose al sodio causando depolarizzazione e abbassamento della soglia dei potenziali d'azione con comparsa di attività muscolare spontanea.

Questi fenomeni, durante lo sforzo fisico, sono potenziati dall'alcalosi respiratoria da iperventilazione che induce ipocalcemia attraverso lo scambio di ioni idrogeno con il calcio extracellulare.

Un commento particolare merita l'elevata prevalenza (86%) del deficit di vitamina D riscontrata nella nostra casistica. È verosimile che essa dipenda dal fatto che lo studio è stato condotto al termine del periodo invernale, in condizioni di scarsa esposizione alla luce solare alla latitudine in cui si trova la città di Torino, situata oltre il 37° parallelo⁽²⁸⁾.

In conclusione, il deficit di vitamina D è molto comune fra i giovani atleti sani, per lo meno alle nostre latitudini. Tale deficit favorisce la comparsa di laringospasmo durante sforzo fisico, probabilmente attraverso le anomalie dell'omeostasi calcica che esso produce. È ipotizzabile che tale effetto possa influenzare negativamente la performance atletica, pertanto, i livelli di vitamina D dovrebbero essere controllati in tutti i soggetti che effettuano attività sportiva.

BIBLIOGRAFIA

1. Helenius IJ, TH, Sarna S, Haahtela T. *Asthma and increased bronchial responsiveness in elite athletes: Atopy and sport event as risk factors.* J Allergy Clin Immunol. 1998; 101: 646-652.
2. Randolph C. *An update on exercise-induced bronchoconstriction with and without asthma.* Curr Allergy Asthma Rep. 2009; 9: 433-438.
3. McFadden ER Jr, Gilbert IA. *Exercise-induced asthma.* N Engl J Med. 1994; 330: 1362-1367.
4. Parsons JP, Mastronarde JG. *Exercise-induced bronchoconstriction in athletes.* Chest. 2005; 128: 3966-3974.
5. Rundell KW, JD. *Exercise-induced bronchospasm in the elite athlete.* Sports Med. 2002; 32: 583-600.
6. Brannan JD, TJ. *The inflammatory basis of exercise-induced bronchoconstriction.* Phys Sportsmed. 2010; 38: 67-73.
7. Anderson SD, Daviskas E. *The mechanism of exercise-induced asthma is...* J Allergy Clin Immunol. 2000; 106: 453-459.
8. McFadden ER Jr, LK, Strohl KP. *Postexertional airway rewarming and thermally induced asthma. New insights into pathophysiology and possible pathogenesis.* J Clin Invest. 1986; 78: 18-25.
9. Røksund OD, MR, Heimdal JH, Olofsson J, Skadberg BT, Halvorsen T. *Exercise induced dyspnea in the young. Larynx as the bottleneck of the airways.* Respir Med. 2009; 103: 1911-1918.
10. Morris MJ, DL, Bean DR, Grbach VX, Morgan JA. *Vocal cord dysfunction in patients with exertional dyspnoea.* Chest. 1999; 116: 1676-1682.
11. Rundell KW, SB. *Inspiratory stridor in elite athletes.* Chest. 2003; 123: 468-474.
12. Thomas PS, GD, Barnes PJ. *Pseudo-steroid resistant asthma.* Thorax. 1999; 54: 352-356.
13. Røksund, OD, RC Maat, JH Heimdal, J Olofsson, BT Skadberg, T Halvorsen. *Exercise induced dyspnea in the young. Larynx as the bottleneck of the airways.* Respiratory Medicine. 2009; 103 (12): 1911-1918.
14. Bucca C, RG, Scappaticci E, Baldi S, Caria E, Oliva A. *Histamine hyperresponsiveness of the extrathoracic airway in patients with asthmatic symptoms.* Allergy. 1991; 46: 147-153.
15. Bucca C, RG, Scappaticci E, Chiampo F, Bugiani M, Magnano M, D'Alberto M. *Extrathoracic and intrathoracic airway responsiveness in sinusitis.* J Allergy Clin Immunol. 1995; 95: 52-59.
16. Bucca C, Brussino L, Fortunato D, Roccati A, Rolla G. *Vocal cord dysfunction and calcium deficiency.* Am J Respir Crit Care Med. 2003; 167: A141.
17. Brehm JM, Celedón JC, Soto-Quiros ME, Avila L, Hunninghake GM, Forno E, Laskey D, Sylvia JS, Hollis BW, Weiss ST, L AA. *Serum vitamin D levels and markers of severity of childhood asthma in Costa Rica.* Am J Respir Crit Care Med. 2009; 179: 765-771.
18. Sandhu MS, CT. *The role of vitamin D in asthma.* Ann Allergy Asthma Immunol. 2010; 105: 191-199.
19. Chinellato I, PM, Sandri M, Peroni DG, Cardinale F, Piacentini GL, Boner AL. *Serum vitamin D levels and exercise-induced bronchoconstriction in children with asthma.* Eur Respir J. 2011; 37: 1366-1370.

20. Anderson S, AG, Magnussen H, Holzer K. *Provocation by eucapnic voluntary hyperpnoea to identify exercise induced bronchoconstriction*. Br J Sports Med. 2001; 35: 344-347.
21. Quanjer PH. *Standardized lung function testing. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests. European Community for Coal and Steel*. Bull Eur Physiopathol Respir. 1983; 19: 1-95.
22. Holick MF. *Vitamin D deficiency*. N Engl J Med. 2007; 357: 266-281.
23. Turcotte H, LJ, Thibault G, Boulet LP. *Prevalence of respiratory symptoms in an athlete population*. Respir Med. 2003; 97: 955-963.
24. Samet JM, TI, Speizer FE. *The relationship between respiratory illness in childhood and chronic air-flow obstruction in adulthood*. Am Rev Respir Dis. 1983; 127: 508-523.
25. Chitano P, MT. *Maturational changes in airway smooth muscle shortening and relaxation. Implications for asthma*. Respir Physiol Neurobiol. 2003; 137: 347-359.
26. Sutherland ER, GE, Jackson LP, Stevens AD, Leung DY. *Vitamin D levels, lung function, and steroid response in adult asthma*. Am J Respir Crit Care Med. 2010; 181: 699-704.
27. Litonjua AA, WS. *Is vitamin D deficiency to blame for the asthma epidemic?* J Allergy Clin Immunol. 2007; 120: 1031-1035.
28. Schwalfenberg G. *Not enough vitamin D: health consequences for Canadians*. Can Fam Physician. 2007; 53: 841-854.

**VALUTAZIONE DELLO STATO DI IMMUNOSOPPRESSIONE
E DEL RECUPERO DEL SISTEMA IMMUNITARIO
DOPO TRATTAMENTO CON ALEMTUZUMAB**

Tesi di Laurea premiata con la Menzione d'Onore
del Consiglio di Presidenza dell'Accademia di Medicina di Torino

*Alessandra Giai Via, Marinella Clerico, Stefania De Mercanti,
Federico Piazza, Luca Durelli*

Divisione Universitaria di Neurologia
Università degli Studi di Torino
Ospedale Universitario San Luigi Gonzaga

Parole chiave: *Alemtuzumab*
Sclerosi multipla
Anticorpi monoclonali
Linfociti Treg
Linfociti T effettori

Key words: *Alemtuzumab*
Multiple sclerosis
Monoclonal antibodies
Regulatory T lymphocytes
Effector T lymphocytes

Riassunto

Introduzione: L'alemtuzumab è un anticorpo monoclonale (mAb) umanizzato anti-CD52, un antigene espresso anche dai linfociti T e B.

Dopo la sua somministrazione si verifica una rapida e prolungata linfopenia seguita da una ricostruzione delle cellule immunitarie. Esso sembra efficace nelle forme precoci di sclerosi multipla (SM): finora si è osservata una riduzione dell'attività di malattia clinica e radiologica.

È importante studiare sia l'equilibrio reciproco delle sottopopolazioni di T helper sia la ricomparsa delle cellule T nel sangue periferico dopo alemtuzumab.

L'obiettivo dello studio è stato analizzare, nel sangue periferico di pazienti affetti da SM remittente-ricidivante (SMRR) e trattati con alemtuzumab, i livelli di RNA messaggero (mRNA) di alcune molecole immunologiche coinvolte nella differenziazione dei linfociti T. I dati si riferiscono ad un follow-up di 12 mesi.

Metodi: Si tratta di uno studio longitudinale multicentrico (Italia ed Europa). I pazienti in studio sono quelli del braccio di trattamento attivo del trial CARE-MSII (affetti da SMRR con ricadute durante la terapia modificante il decorso, a cui viene somministrato l'mAb alla dose di 12 mg/die ev per 5 giorni consecutivi al mese 0 e per 3 giorni consecutivi al mese 12).

Sono stati analizzati i campioni di sangue venoso di 17 pazienti per un anno. Il sangue è raccolto in provette eparinizzate, poi inviate al nostro laboratorio. I livelli di mRNA delle molecole immunologiche sono stati valutati con tecniche molecolari tra cui la PCR real time.

Risultati: Sono stati analizzati i campioni di sangue di 17 pazienti al mese 0, 6 e 12. I risultati statisticamente significativi ($p < 0.05$) riguardano sei molecole immunologiche. I livelli di IL27, IL10, TGF β , FoxP3 aumentano e i livelli di IL23 e del T-bet si riducono al mese 6 e 12.

I 17 pazienti non hanno sviluppato ricadute di malattia né cliniche, né radiologiche.

Conclusioni: A 6 e a 12 mesi si è evidenziato un aumento delle molecole T regolatorie ed una riduzione di quelle relative ai T effettori. Tali dati potrebbero giustificare la diminuita progressione del danno infiammatorio e quindi la mancata comparsa di ricadute cliniche e/o radiologiche.

Abstract

Immune-suppression and immune system reconstitution after alemtuzumab treatment

Introduction: Alemtuzumab is a humanized monoclonal antibody that targets the CD52 antigen present on T and B lymphocytes. As a result of its administration there is a rapid and prolonged lymphopenia. After alemtuzumab therapy immune-cell repopulation takes place. Alemtuzumab is considered to be potentially effective in multiple sclerosis (MS); the efficacy was demonstrated by a reduction of clinical and radiological relapses.

It is important to study the T helper subset balance as well as which newly occurring T cells repopulate peripheral blood, after alemtuzumab treatment.

The study objective was to evaluate the peripheral blood mononuclear cell mRNA level of several immunological molecules involved in T cell subset differentiation. The data collected refer to 12-month follow-up.

Methods: It is a longitudinal multicenter study. Only the alemtuzumab-treated patients participating to the CARE-MSII trial were included in this study. These are patients affected by relapsing-remitting MS who have experienced at least a relapse during disease-modifying therapy. Patients are subjected to i.v. alemtuzumab at a dose of 12 mg/day for 5 consecutive days at month 0 and for 3 consecutive days at month 12. Each patient undergoes a blood sample at 0, 6 and 12 months. The blood is collected in heparinized tubes, then sent to our immunological laboratory. We analyzed venous blood samples from 17 patients for one year follow-up. Analysis of immunological molecules mRNA levels is carried out with molecular biology techniques.

Results: We analyzed 17 blood samples at 0, 6 and 12 months. We evaluated mRNA levels of 20 immunological molecules related to T cell subset differentiation. The statistically significant results ($p < 0.05$) concern the levels of 6 immunological molecules. The levels of IL27, IL10, TGF β , FoxP3 significantly increased and IL23 and T-bet levels significantly decreased at 6 and 12 months. The 17 patients did not develop clinical or radiological relapses.

Conclusions: At 6 and 12 months of follow-up, the study shows an increase of T regulatory-related molecules and a reduction of those T effector-associated. Analyzed patients did not develop any relapses or disease progression.

Introduzione

L'alemtuzumab (Campath®) è un anticorpo monoclonale (mAb) umanizzato diretto contro il CD52, un antigene espresso principalmente sui linfociti T e B, sulle cellule Natural Killer (NK), sulle cellule dendritiche, sui monociti e macrofagi, su alcuni granulociti (ad eccezione dei neutrofilii), sui timociti⁽¹⁾. Il Campath però, non danneggia né le cellule staminali ematopoietiche, né le cellule progenitrici⁽²⁾. In vitro l'alemtuzumab induce la lisi delle cellule che presentano il CD52 per mezzo di meccanismi complemento mediati, anticorpo mediati e per effetto dell'apoptosi. In vivo il suo meccanismo non è del tutto definito, ma a seguito della sua somministrazione si verifica una rapida e prolungata linfopenia. Tale marcata deplezione linfocitaria è accompagnata da una ricostruzione del repertorio delle cellule immunitarie con una ripopolazione precoce dei linfociti B e una ripopolazione tardiva dei linfociti T⁽³⁾.

La terapia con alemtuzumab è ritenuta potenzialmente efficace nella sclerosi multipla (SM); infatti, a seguito di una grave deplezione delle cellule T, la ricostruzione del sistema immunitario potrebbe escludere le cellule T autoreattive dal rinnovato patrimonio di linfociti⁽⁴⁾, rallentando così l'attività di malattia e ritardando l'esordio della disabilità. Sulla base di tali presupposti questo mAb viene utilizzato al *Addenbrooke's Hospital* di Cambridge dal 1991 per il trattamento della SM, anche se non è ancora stato approvato dalla Food and Drug Administration con questa indicazione terapeutica. Dagli studi condotti finora è emersa una grande efficacia del farmaco soprattutto nelle forme precoci di SM in cui si è osservata una riduzione dell'attività di malattia da un punto di vista clinico e radiologico⁽⁵⁾. Inoltre studi recenti hanno evidenziato un aumento dei linfociti T helper (Th) 17 e non dei Th1 durante le ricadute di malattia nei pazienti affetti da tale patologia⁽⁶⁾. È stata altresì dimostrata una riduzione preferenziale dei Th17, piuttosto che dei Th1, e un aumento dei linfociti T regolatori (Treg) (CD4+CD25^{high}FoxP3+) durante la ricostituzione del sistema immunitario successiva ad ablazione immunitaria e a trapianto di midollo osseo autologo nella SM⁽⁷⁾.

Alla luce di questi risultati è importante studiare sia l'equilibrio reciproco delle sottopopolazioni di Th che la ricomparsa delle cellule T nel sangue periferico dopo l'effetto immunosoppressivo indotto dall'alemtuzumab. L'obiettivo del nostro studio è stato quello di analizzare, nel sangue periferico di pazienti affetti da sclerosi multipla remittente recidivante (SMRR) e trattati con alemtuzumab, i livelli di RNA messaggero (mRNA) delle seguenti citochine, chemochine e dei fattori di trascrizione coinvolti nella differenziazione dei sottotipi di linfociti T (IFN γ , TGF β , TNF α , IL1b, IL2,

IL6, IL10, IL12p35, IL17A, IL17F, IL22, IL23, IL26, IL27, CCL11, CCL20, CXCL10, CCR4, CCR6, T-bet, FoxP3, RORC). Confrontando i livelli di mRNA misurati dopo la terapia con quelli misurati prima del trattamento è possibile valutare l'efficacia del farmaco e la sua influenza sull'omeostasi linfocitaria. È importante verificare la presenza di una correlazione tra i risultati ottenuti e il decorso della malattia, prestando attenzione non solo alla comparsa di ricadute (cliniche e/o radiologiche), ma anche all'eventuale manifestazione di complicanze autoimmuni secondarie al trattamento.

Materiali e metodi

È stato organizzato e coordinato uno studio longitudinale, multicentrico che coinvolge diversi Dipartimenti di Neurologia in Italia e in Europa (Divisione Universitaria di Neurologia della Facoltà San Luigi Gonzaga dell'Università degli Studi di Torino, il Centro SM dell'Ospedale Binaghi dell'Università di Cagliari, il Centro SM dell'Ospedale di Gallarate di Varese, il Dipartimento di Neurologia del *Sveti Duh General Hospital* e quello del *Zagreb University Hospital Center*, il Dipartimento di Neurologia del *Centre Hospitalier Universitaire* di Rennes, il Centro SM del *General Hospital* di Praga). I pazienti oggetto di studio sono quelli del braccio di trattamento attivo che hanno partecipato allo studio CAMMS324 Genzyme o CARE-MS II⁽⁸⁾. Sono stati inclusi sia i pazienti randomizzati ad alemtuzumab sia quelli randomizzati all'IFN β -1a, che sono stati inseriti in questo protocollo di studio quando sono stati trattati con alemtuzumab nella fase di estensione del trial. Si tratta di soggetti affetti da SMRR, definita secondo i criteri di Mc Donald⁽⁹⁾, che hanno manifestato ricadute di malattia durante la terapia modificante il decorso; per poter essere arruolati nel CAMMS324, essi dovevano essere stati trattati per più di 6 mesi, nei precedenti 5 anni, con una terapia modificante il decorso, quale il glatiramer acetato o un interferone beta, e dovevano presentare un peggioramento della malattia alla Risonanza Magnetica Nucleare (RMN). Prima della terapia con alemtuzumab i pazienti vengono sottoposti ad un *wash-out* farmacologico dalla terapia immunomodulante, di almeno un mese.

Ai pazienti inclusi viene somministrato l'alemtuzumab, per via endovenosa, alla dose di 12 mg/die per 5 giorni consecutivi al mese 0 (60 mg di dose totale) e per 3 giorni consecutivi al mese 12 (36 mg di dose totale), sotto supervisione medica. Per i primi 3 giorni di trattamento, sia al mese 0 che al mese 12, ogni paziente riceve una premedicazione con 1 g di metilprednisolone e.v. subito prima dell'infusione di Campath.

Ciascun paziente viene sottoposto ad un prelievo ematico prima di iniziare il trattamento e poi a vari intervalli di tempo (6, 12, 18, 24, 36 e 48 mesi) dopo l'inizio della terapia con alemtuzumab. Finora sono stati analizzati i campioni di sangue venoso di 17 pazienti per un follow-up di un anno, le cui caratteristiche demografiche sono riportate nelle Tabelle I e II.

PAZIENTE	DATA DI NASCITA	SESSO	PRECEDENTE TERAPIA IMMUNOMODULANTE	NUMERO DI RECIDIVE NEI DUE ANNI PRECEDENTI
ITALIA (CA)	25/07/1972	F	Rebif 44 µg (IFNβ-1a)	3
ITALIA (CA)	06/10/1979	F	Avonex (IFNβ-1a)	3
ITALIA (VA)	03/04/1984	M	Rebif 22 µg (IFNβ-1a)	2
FRANCIA	06/06/1964	F	Copaxone (glatiramer acetato)	2
CROAZIA	26/03/1984	M	Betaferon (IFNβ-1b)	2
CROAZIA	19/08/1976	M	Betaferon (IFNβ-1b)	2
CROAZIA	08/12/1979	M	Betaferon (IFNβ-1b)	2
CROAZIA	02/12/1978	F	Betaferon (IFNβ-1b)	3
CROAZIA	12/09/1975	F	Betaferon (IFNβ-1b)	3
CROAZIA	21/05/1983	M	Betaferon (IFNβ-1b)	2
CROAZIA	22/04/1980	F	Avonex (IFNβ-1a)	2
CROAZIA	07/05/1961	F	Betaferon (IFNβ-1b)	2
CROAZIA	20/04/1961	F	Betaferon (IFNβ-1b)	2
CROAZIA	07/07/1976	M	Betaferon (IFNβ-1b)	3
CROAZIA	31/07/1964	M	Betaferon (IFNβ-1b)	2
REP. CECA	17/05/1988	F	Rebif 44 µg (IFNβ-1a)	2
REP. CECA	24/06/1983	F	Rebif 44 µg (IFNβ-1a)	2

Tabella I. Caratteristiche cliniche e demografiche basali dei pazienti.

NUMERO PAZIENTI	PERCENTUALE DI DONNE	ETÀ MEDIA ± D.S.	EDSS MEDIO AL BASELINE ± D.S.
17	58.82%	35.3 ± 8.5	2.6 ± 1.3

DONNE		UOMINI	
ETÀ MEDIA ± D.S.	EDSS MEDIO AL BASELINE ± D.S.	ETÀ MEDIA ± D.S.	EDSS MEDIO AL BASELINE ± D.S.
36.9 ± 9.4	2.6 ± 1.2	33 ± 7.1	2.5 ± 1.5

Tabella II. Analisi statistica delle caratteristiche dei pazienti al baseline (D.S.: deviazione standard; EDSS: Expanded Disability Status Scale).

Poiché si tratta di uno studio longitudinale, basato sul confronto tra i dati ottenuti prima e dopo il trattamento, non è necessario un gruppo di controllo: ogni paziente funge da controllo di se stesso. Sono considerati idonei a partecipare a questo studio i pazienti che soddisfano tutti i seguenti criteri:

- Modulo di consenso informato (ICF) firmato dal paziente.
- Età compresa tra 18 e 50 anni al momento della firma dell'ICF.
- Diagnosi di SM secondo i criteri di McDonald e RMN del cranio indicante la presenza di lesioni della sostanza bianca attribuibili alla SM nei 5 anni precedenti lo screening.
- Esordio dei sintomi della SM entro 5 anni dal momento della firma dell'ICF.
- Punteggio Expanded Disability Status Scale (EDSS) (Figure 1 e 2) compreso tra 0.0 e 3.0 (inclusi) al momento dello screening.
- 2 o più attacchi di SM (primo episodio o recidiva) occorsi nei 24 mesi precedenti la data della firma dell'ICF, con almeno 1 attacco nei 12 mesi precedenti, con segni neurologici obiettivi confermati da un medico o un altro operatore sanitario approvato da Genzyme. I segni obiettivi possono essere stati identificati retrospettivamente.
- Stabilità neurologica per i 30 giorni precedenti la data di firma dell'ICF (assenza di recidive).

SISTEMI FUNZIONALI (FS)	punti	SISTEMI FUNZIONALI (FS)	punti
1 - FUNZIONI PIRAMIDALI		Perdita di tutte le forme di sensibilità in uno o due arti; o moderata diminuzione della sensibilità tattile o dolorifica e/o perdita della sensibilità propriocettiva nella maggior parte del corpo, capo escluso	
Normali	0		5
Segni anormali senza deficit funzionali	1	Perdita di ogni tipo di sensibilità in tutto il corpo, capo escluso	
Minimo deficit	2	Non valutabile	9
Lieve o moderata paraparesi o emiparesi; grave monoparesi	3	5 - FUNZIONI RETTALI E VESCICALI	
Grave paraparesi o emiparesi; moderata tetraparesi; monoplegia	4	Normali	0
Paraplegia, emiplegia, o grave tetraparesi	5	Lieve disuria, lieve minzione imperiosa o ritenzione vescicale	1
Tetraplegia	6	Moderata disuria, moderata minzione imperiosa, moderata ritenzione vescicale o moderata stipsi, o saltuaria incontinenza urinaria	2
Non valutabile	9	Frequenti episodi di incontinenza vescicale	3
2 - FUNZIONI CEREBELLARI		Necessità di caterizzazione quasi costante	4
Normali	0	Perdita completa del controllo delle funzioni vescicali	5
Segni anormali deficit funzionali	1	Perdita completa delle funzioni vescicali e rettali	6
Lieve atassia	2	Non valutabile	9
Moderata atassia del tronco degli arti	3	6 - FUNZIONI VISIVE	
Grave atassia di tutti gli arti	4	Normali	0
Incapacità di eseguire movimenti coordinati dovuti all'atassia	5	Scotoma con acuità visiva (corretta con lenti) maggiore di 6/10	1
Non valutabili	9	Occhio più compromesso con scotoma con acuità visiva massima corretta con lenti da 6 a 3 decimi	2
3 - FUNZIONI DEL TRONCO CEREBRALE		Occhio più compromesso con esteso scotoma, o moderata riduzione del campo visivo e massima acuità visiva (corretta con lenti) da 3 decimi a 2 decimi	3
Normali	0	Occhio più compromesso con marcata diminuzione del campo visivo e massima acuità visiva (corretta con lenti) da 2 decimi a 1 decimo; grado 1 associato ad acuità visiva massima dell'occhio meno compromesso di 3 decimi o meno	4
Solo segni clinici	1	Occhio più compromesso con acuità visiva massima (corretta con lenti) minore di 1/10, grado 2 associato ad acuità visiva massima dell'occhio meno compromesso di 3/10 o meno	5
Moderato ristagno o altro lieve deficit	2	Grado 3 associato ad acuità visiva dell'occhio meno compromesso di 3/10 o meno	6
Grave o marcata debolezza della muscolatura estrinseca o moderato deficit degli altri nervi cranici	3	Non valutabile	9
Marcata disartria o altra grave infermità	4	7 - CAPACITÀ IDEATIVE E FUNZIONI CEREBRALI SUPERIORI	
Impossibilità a deglutire o parlare	5	Normali	0
Non valutabile	9	Solo alterazioni dell'umore	1
4 - FUNZIONI SENSITIVE		Lieve diminuzione delle capacità cognitive	2
Normali	0	Moderata diminuzione delle capacità cognitive	3
Sola diminuzione della sensibilità vibratoria in uno dei due arti	1	Marcata diminuzione delle capacità cognitive o delle altre funzioni psichiche superiori	4
Lieve diminuzione della sensibilità tattile o dolorifica o del senso della posizione, e/o moderata diminuzione della sensibilità vibratoria in uno o due arti; o diminuzione della sola sensibilità vibratoria in tre o quattro arti	2	Demenza o grave deficit delle funzioni psichiche superiori	5
Moderata diminuzione della sensibilità tattile o dolorifica o del senso della posizione, e/o perdita della sensibilità vibratoria in uno o due arti; o lieve diminuzione della sensibilità tattile o dolorifica e/o moderata diminuzione di tutte le prove della sensibilità propriocettiva in tre o quattro arti	3	Non valutabile	9
Grave diminuzione della sensibilità tattile o dolorifica o perdita della sensibilità propriocettiva, singolarmente o in associazione, in uno o due arti; o moderata diminuzione della sensibilità tattile o dolorifica e/o grave diminuzione della sensibilità propriocettiva in tre o quattro arti	4		

Figura 1. Valutazione dei sistemi funzionali.

EXPANDED DISABILITY STATUS SCALE (EDSS)	
0.0	Esame obiettivo neurologico della norma (tutte le FS = 0, accettabile FS cerebrale = 1)
1.5	Nessun deficit, minimi segni clinici di più di un FS (più di uno con punteggio 1, tranne punteggio 1 cerebrale)
2.0	Minimo deficit clinico in un FS (uno di grado 2, altri = 0 o 1)
2.5	Minimo deficit in due FS (due di grado 2, altri = 0 o 1)
3.0	Moderato deficit in un FS (uno di grado 3, altri = 0 o 1), o lieve deficit in tre o quattro FS (3 o 4 FS di punteggio 2, i restanti = 0 o 1) anche senza nessun problema di deambulazione
3.5	Cammina ma con un moderato deficit in un FS (uno di punteggio 3) e uno o due FS combinazioni di gradi inferiori che normalmente superano quanto specificato per lo step 4.0
5.5	Cammina senza aiuto o riposo per circa 100 metri; deficit abbastanza grave da non permettere completamente le attività quotidiane; (I tipici FS equivalenti sono un grado 5, gli altri da 0 a 1; combinazioni di gradi inferiori che normalmente superano quanto specificato per lo step 4.0)
6.0	Necessaria per camminare una assistenza costante, intermittente o da un solo lato (bastone, stampelle, o qualsiasi appoggio) percorrendo con o senza riposo 100 metri; (I tipici FS equivalenti sono combinazioni con più gradi FS maggiori di 3)
6.5	Necessario per camminare un aiuto costante bilaterale (bastone, stampelle, o qualsiasi sostegno) percorrendo, con o senza riposo, circa 20 metri (I tipici FS equivalenti sono combinazioni con più gradi FS maggiori di 3)
7.0	Incapace di camminare oltre 5 metri, normalmente costretti sulla sedia a rotelle, la muove da solo e vi si trasferisce da solo; si muove per circa 12 ore sulla sedia a rotelle, (I tipici FS equivalenti sono combinazioni con più di un grado di FS maggiore di 4, molto raramente un grado piramidale 5 da solo)
7.5	Incapace di camminare per più di pochi passi, costretto sulla sedia a rotelle, necessita di aiuto per essere trasferito; la muove da solo ma non può stare tutto il giorno su una sedia a rotelle standard; può necessitare di una sedia motorizzata (I tipici FS equivalenti sono più combinazioni con FS maggiori di 4)
8.0	Essenzialmente costretto sulla sedia o trasportato sulla sedia a rotelle, ma può stare fuori dal letto da solo, mantiene le capacità di svolgere le sue funzioni fisiologiche; generalmente ha l'uso delle braccia; (I tipici FS coinvolti sono eguali a più FS maggiori di 4)
8.5	Costretto a letto per molta parte del giorno; ha un efficace uso del braccio; svolge le sue normali funzioni fisiologiche; (I tipici FS equivalenti sono generalmente maggiori di 4 combinazioni di più FS)
9.0	Paziente allettato completamente incapace di svolgere qualsiasi attività; può comunicare e mangiare; (I tipici FS equivalenti sono combinazioni di gradi maggiori di quattro)
9.5	Paziente allettato completamente incapace di svolgere qualsiasi attività; incapace di comunicare o di mangiare/inghiottire; (> 4)
10	Morte dovuta alla SM

Figura 2. Scala EDSS.

Sono esclusi da questo studio i pazienti che soddisfano almeno uno dei seguenti criteri:

- Partecipazione corrente a un altro studio clinico.
- Esposizione ad azatioprina, cladribina, ciclofosfamide, ciclosporina A, metotrexate o ad ogni altro agente immunosoppressivo diverso da un trattamento sistemico con corticosteroidi.
- Trattamento effettuato con un mAb per qualunque motivo.

- Precedente trattamento con farmaci sperimentali, ovvero farmaci che non sono stati approvati a qualunque dosaggio o per qualunque indicazione.
- Presenza di una forma progressiva di SM.
- Storia di neoplasie, ad eccezione del carcinoma cellulare basale della pelle.
- Ogni disabilità dovuta a traumi o ad altre malattie che, secondo il parere dello Sperimentatore, possa interferire con la valutazione della disabilità dovuta alla SM.
- Precedente reazione di ipersensibilità a prodotti contenenti immunoglobulina.
- Allergia o intolleranza conosciuta all'interferone beta, all'albumina umana o al mannitolo.
- Intolleranza ai boli di corticosteroide.
- Impossibilità a praticarsi o a ricevere iniezioni s.c. praticate dal personale curante.
- Impossibilità a sottoporsi a una RMN con somministrazione di gadolinio.
- Conteggio cellulare CD4+ (CD3+CD4+ assoluto) minore del limite inferiore di normalità (LLN) allo screening.
- Conteggio cellulare CD8+ (CD3+CD8+ assoluto) minore del LLN allo screening.
- Conteggio cellule B (CD19+ assoluto) minore del LLN allo screening.
- Conteggio assoluto dei neutrofilo < LLN allo screening.
- Disturbo emorragico conosciuto (es. disfibrinogenemia, deficit del fattore IX, emofilia, malattia di Von Willebrand, coagulazione intravascolare disseminata, deficit di fibrinogeno o di un fattore della coagulazione).
- Sieropositività al virus dell'immunodeficienza umana.
- Malattia autoimmune significativa, inclusa ma non limitata a citopenia immune, artrite reumatoide, lupus eritematoso sistemico, altri disturbi del tessuto connettivo, vasculite, malattia infiammatoria intestinale, grave psoriasi.
- Presenza di anticorpi anti-recettore dell'ormone tireostimolante (al di sopra del LLN).
- Infezione attiva che lo Sperimentatore consideri sufficientemente grave da precludere la partecipazione allo studio.

- Secondo il parere dello Sperimentatore, presenza di alto rischio di infezione (es. catetere a permanenza, disfagia con aspirazione, ulcera da decubito, storia di una precedente polmonite da aspirazione o infezione ricorrente del tratto urinario).
- Tubercolosi latente, a meno che non sia stata completata una terapia anti-tubercolotica efficace, o tubercolosi attiva.
- Infezione da virus dell'epatite C.
- Infezione passata o presente da epatite B.
- Donna in età fertile con test di gravidanza su siero positivo, in gravidanza o in allattamento.
- Rifiuto di utilizzare un metodo contraccettivo adeguato e affidabile per l'intera durata dello studio (solo per pazienti in età fertile). I metodi contraccettivi affidabili ed efficaci includono: dispositivo intrauterino, contraccezione a base di ormoni, sterilizzazione chirurgica, astinenza o doppio metodo a barriera.
- Disturbo psichiatrico grave non adeguatamente controllato da un trattamento.
- Attacchi epilettici non adeguatamente controllati da un trattamento.
- Grave disturbo sistemico o altra malattia che, secondo il parere dello Sperimentatore, potrebbe compromettere la sicurezza del paziente o interferire con l'interpretazione dei risultati dello studio (es. attuale ulcera peptica o altre condizioni che potrebbero predisporre a un'emorragia).
- Condizioni cliniche, psichiatriche, cognitive o di altro tipo che, secondo il parere dello Sperimentatore, possono compromettere la capacità del paziente di comprendere le informazioni a lui destinate, fornire il proprio consenso informato, rispettare il protocollo di sperimentazione o completare lo studio.
- Conteggio di piastrine confermato minore del LLN dal laboratorio di valutazione allo screening o documentato inferiore a $100.000/\mu\text{L}$ nell'anno precedente, in un campione senza agglutinazione di piastrine.
- Storia precedente di infezioni micotiche invasive.
- Positività al papillomavirus umano ad alto rischio cervicale oppure citologia cervicale anomala diversa dalle cellule squamose atipiche di significato incerto.
- Sieropositività al Trypanosoma cruzi o al virus umano T-linfotropico di tipo I o II (test richiesto nelle sole regioni endemiche).

- Ogni altra malattia o infezione (latente o attiva) che, secondo il parere dello Sperimentatore, potrebbe aggravarsi a causa di un qualunque farmaco dello studio.
- Qualunque valore relativo alla funzionalità epatica o renale di grado 2 o maggiore allo screening, con l’eccezione della iperbilirubinemia dovuta alla sindrome di Gilbert. Consultare la Tabella III, ricavata dai *Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0* (CTCAE) del *National Cancer Institute* (NCI), pubblicata il 9 agosto 2006.

Funzionalità epatica	
Bilirubina	> 1,5 x ULN
SGOT/AST	> 2,5 x ULN
SGPT/ALT	> 2,5 x ULN
Fosfatasi alcalina	> 2,5 x ULN
Funzionalità renale	
Creatinina	> 1,5 x ULN

Tabella III. Valori della funzionalità epatica e renale che escludono dallo studio (ULN = limite superiore alla norma).

I campioni di sangue venoso da analizzare vengono prelevati secondo le seguenti tempistiche: al baseline (prima della prima somministrazione di Campath), al mese 6 dopo l’inizio del trattamento, al mese 12 (subito prima della seconda dose di alemtuzumab) e poi ai mesi 18, 24, 36 e 48 dopo la seconda dose di mAb. Il prelievo ematico deve essere ritardato di 30 giorni se il paziente effettua una terapia corticosteroidea a causa di una ricaduta di malattia o se viene colpito da infezione.

Il sangue viene raccolto in provette eparinizzate (5 provette da 7 ml per paziente) presso i centri partecipanti. Le provette vengono poi inviate, tramite corriere FedEx (altamente specializzato, che assicurava l’arrivo dei campioni

entro 24-48 ore), direttamente al nostro laboratorio, utilizzando contenitori idonei. I centri partecipanti allo studio sono stati informati della necessità di far pervenire i campioni di sangue, al massimo entro 3 giorni dal prelievo, al fine di preservarne il più possibile l'integrità e garantirne l'utilizzo per le analisi immunologiche. I campioni di sangue, una volta raggiunto il nostro laboratorio, vengono analizzati entro 24 ore; nei casi in cui questo non sia possibile (ma anche per poter costituire una banca dati per eventuali ulteriori indagini), le provette vengono congelate in azoto liquido e analizzate in seguito.

Al baseline ciascun paziente, dopo adeguata spiegazione, ha firmato l'ICF alla partecipazione allo studio, che è stato approvato dal Comitato Etico. Poiché sono stati precedentemente segnalati casi di complicanze autoimmuni secondarie al trattamento con alemtuzumab nella sclerosi multipla⁽¹⁰⁾, si è deciso che ogni paziente dovesse essere sottoposto a periodici esami di controllo. Al fine di identificare eventuali alterazioni tiroidee (morbo di Graves e ipotiroidismo autoimmune) viene effettuato un monitoraggio della funzione tiroidea (TSH, T3, T4, anticorpi anti-recettore del TSH) al baseline, poi ogni 2-3 mesi o mensilmente, se un risultato appare alterato, e per almeno 3 anni dopo l'ultima dose di Campath (come indicato nei protocolli degli studi CAMMS323 e CAMMS324). Inoltre per prevenire e/o riconoscere tempestivamente gravi forme di tossicità ematologica, soprattutto la porpora trombocitopenica immune, la conta ematica totale e la conta piastrinica vengono controllate ogni mese e per 3 anni dopo l'ultima dose di farmaco.

Le valutazioni neurologiche vengono effettuate con la scala EDSS (Figure 1 e 2) a intervalli di tempo regolari (baseline, mese 6, 12, 18, 24, 36, 48), insieme alla raccolta dei campioni di sangue. In caso di ricaduta i pazienti vengono sottoposti ad ulteriori visite non previste. I dati clinici di ogni soggetto vengono riportati su apposite schede (CRF, *Clinical Report Form*) compilate dal medico che segue il paziente durante le visite neurologiche previste; le CRF vengono inviate tramite e-mail al nostro centro di studio ogni volta che viene spedito un campione di sangue. Al fine di poter escludere eventuali ricadute radiologiche di malattia si è deciso di far eseguire a ciascun paziente una RMN dell'encefalo e del midollo ogni 6 mesi; in caso di ricaduta i pazienti vengono sottoposti ad ulteriori esami di RMN.

I campioni di sangue vengono raccolti in provette contenenti eparina. L'RNA totale è stato isolato semiautomaticamente con l'uso dell'ABI PRISM 6100 nucleic Acid PrepStation, il quale possiede sia un sistema di vuoto integrato che esegue automaticamente tutte le operazioni a vuoto, sia un reagente/kit RNA monouso (Applied Biosystems, Applera Italia, Monza, Italia). L'RNA

totale viene convertito in cDNA utilizzando un kit di archiviazione del cDNA ad alta capacità (Applied Biosystems) e il cDNA risultante viene amplificato mediante PCR Real Time (*TaqMan*® *low-density arrays* o TLDA, Applied Biosystems 7900HT real-time PCR system), che consente di valutare simultaneamente l'espressione di più cluster genici precedentemente stabiliti. Nel nostro studio sono stati quantificati i livelli di mRNA di 22 molecole immunologiche (IFN γ , TGF β , TNF α , IL1b, IL2, IL6, IL10, IL12p35, IL17A, IL17F, IL22, IL23, IL26, IL27, CCL11, CCL20, CXCL10, CCR4, CCR6, T-bet, FoxP3, RORC).

Le analisi statistiche sono effettuate utilizzando il programma SPSS 14.0 (SPSS, Chicago, IL). Per testare la significatività statistica delle differenze si utilizzano il test del χ^2 o il test di Fisher in caso di variabili dicotomiche, oppure test parametrici o non-parametrici in caso di variabili continue, secondo la distribuzione delle variabili; valori di $p \leq 0.05$ sono considerati statisticamente significativi. I dati dello studio longitudinale vengono valutati con l'analisi della varianza ad una coda per misure ripetute (one-way RM ANOVA). La correzione di Bonferroni per misure ripetute sarà utilizzata quando necessario.

Risultati

Sono stati analizzati i campioni di sangue di 17 pazienti al baseline e al mese 6, mentre al mese 12 soltanto di 15 pazienti, in quanto i due della Repubblica Ceca non hanno ancora raggiunto l'anno di follow-up. A causa di alcuni ritardi nel far pervenire i prelievi ematici e della cattiva conservazione di una parte di questi, non è stato possibile utilizzare tutti i campioni inviati. Infatti al baseline e al mese 6 sono stati analizzati 13 prelievi su 17 e al mese 12 solo 7 su 15.

Delle 22 molecole immunologiche sopra citate, i risultati significativi finora ottenuti riguardano i livelli di IL27, IL23, IL10, TGF β , T-bet e FoxP3.

Mediante PCR Real Time è stato possibile quantificare nei campioni di sangue intero i trascritti di RNA di IL27, IL10, TGF β e FoxP3 al baseline, al mese 6 e al mese 12. I livelli di queste molecole aumentano progressivamente al mese 6 e al mese 12 rispetto al baseline.

Nella Tabella IV sono riportati i valori massimo, minimo e la media in Unità arbitrarie (UA) con deviazione standard dei livelli di IL27, IL10, TGF β , FoxP3, IL23 e T-bet ricavati nei 3 diversi periodi. Il livello di trascritto di RNA di IL27, IL10, TGF β e FoxP3 aumenta in modo statisticamente significativo dal baseline al mese 6 ($p < 0.05$) e dal baseline al mese 12 ($p < 0.05$) (Figura 3).

	Tempo	Valore minimo	Valore massimo	Media \pm d.s.	p-value
IL27	Mese 0 (13 campioni)	100.43	127.18	115.21 \pm 9.04	
	Mese 6 (13 campioni)	0.00	737.37	474.64 \pm 186.91	< 0.05
	Mese 12 (7 campioni)	873.78	1756.64	1175.63 \pm 286.69	< 0.05
IL10	Mese 0 (13 campioni)	41.32	51.75	47.62 \pm 4.42	
	Mese 6 (12 campioni)	0.00	333.77	169.98 \pm 99.26	< 0.05
	Mese 12 (7 campioni)	154.77	624.74	479.18 \pm 158.58	< 0.05
TGFβ	Mese 0 (13 campioni)	26.20	66.59	46.16 \pm 14.97	
	Mese 6 (13 campioni)	171.19	430.33	299.73 \pm 74.54	< 0.05
	Mese 12 (7 campioni)	674.17	1218.00	885.22 \pm 194.31	< 0.05
FoxP3	Mese 0 (13 campioni)	8.48	19.64	12.77 \pm 4.57	
	Mese 6 (13 campioni)	40.15	85.54	58.65 \pm 13.67	< 0.05
	Mese 12 (7 campioni)	123.30	627.00	209.47 \pm 184.36	0.03
IL23	Mese 0 (13 campioni)	311.14	445.27	377.38 \pm 52.63	
	Mese 6 (13 campioni)	0.00	170.00	108.94 \pm 51.30	< 0.05
	Mese 12 (7 campioni)	57.64	95.12	76.77 \pm 14.27	< 0.05
T-bet	Mese 0 (13 campioni)	574.34	939.78	763.98 \pm 135.07	
	Mese 6 (13 campioni)	74.34	179.40	104.83 \pm 27.32	< 0.05
	Mese 12 (7 campioni)	28.02	45.51	37.03 \pm 5.89	< 0.05

Tabella IV. Valori massimo, minimo, media in unità arbitrarie (UA) con deviazione standard e p-value dei livelli di IL27, IL10, TGF β , FoxP3, IL23 e T-bet ricavati nei 3 diversi periodi.

Il livello di trascritto di RNA dell'IL-23 e del T-bet diminuisce invece in maniera statisticamente significativa dal baseline al mese 6 ($p < 0.05$) e dal baseline al mese 12 ($p < 0.05$) (Figura 4).

I 15 pazienti che hanno raggiunto l'anno di follow-up non hanno sviluppato, durante questo periodo, ricadute di malattia né cliniche, né radiologiche.

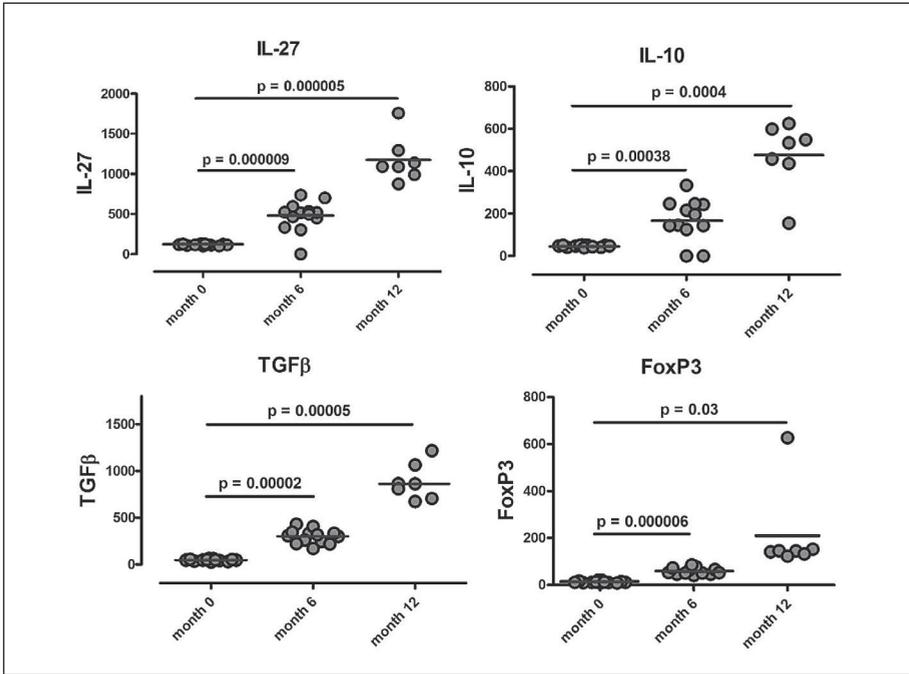


Figura 3. Livelli di IL27, IL10, TGFβ e FoxP3 espressi in Unità arbitrarie (UA) misurati al mese 0, al mese 6 e al mese 12. Si osserva un aumento di IL27, IL10, TGFβ e FoxP3 dal mese 0 al mese 6 (con $p < 0.05$) e dal mese 0 al mese 12 (con $p < 0.05$).

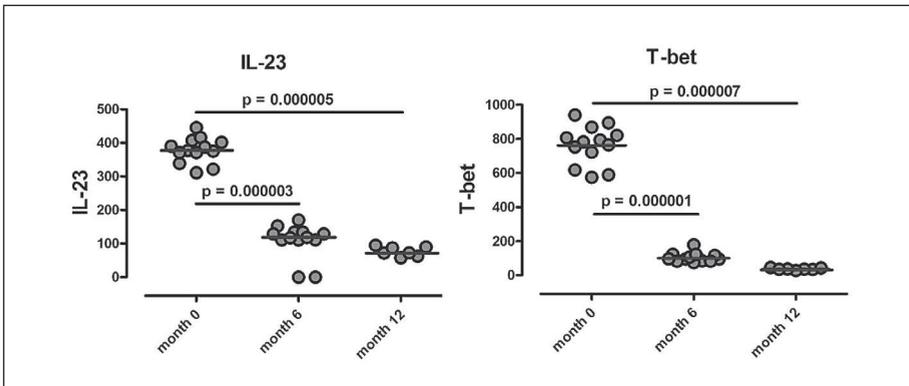


Figura 4. Livelli di IL23 e T-bet espressi in Unità arbitrarie (UA) misurati al mese 0, al mese 6 e al mese 12. Si osserva una riduzione di IL23 e T-bet dal mese 0 al mese 6 (con $p < 0.05$) e dal mese 0 al mese 12 (con $p < 0.05$).

Al fine di valutare l'eventuale progressione della disabilità, i punteggi EDSS dei nostri pazienti riferiti ai mesi 6 e 12 sono stati confrontati con quelli del baseline, riscontrando una differenza minima e non statisticamente significativa. Questo sta ad indicare una complessiva stabilità del quadro clinico neurologico.

Discussione

I dati raccolti dopo un anno di follow-up e prima della somministrazione della seconda dose di alemtuzumab, dimostrano che in seguito al trattamento immunosoppressivo, la ricostituzione del sistema immunitario privilegia la differenziazione delle cellule Treg e riduce notevolmente quella dei linfociti T effettori, soprattutto dei Th17. Infatti, dopo 6 e 12 mesi di follow-up, si riscontra nel sangue dei pazienti trattati un incremento delle molecole immunologiche associate ai Treg (TGF β , IL10, FoxP3), confermando il dato esistente in letteratura⁽¹¹⁾ dell'aumentata espressione dei Treg, successiva alla terapia con il Campath.

La differenziazione dei linfociti T CD4+ naive in Treg (CD4+CD25^{high}FoxP3+) avviene grazie alla presenza di molecole immunoregolatrici, quali il TGF β , l'IL10 e il FoxP3, con l'aiuto di altri fattori (ad esempio l'acido retinoico e l'IL2).

Infatti a livello basale o in assenza di insulti infiammatori, il TGF β prodotto dal sistema immunitario ha la capacità di sopprimere la generazione di cellule T effettrici e di indurre i Treg, contribuendo al mantenimento dell'omeostasi. Al contrario, se sono presenti infezione o infiammazione, l'IL6, prodotta dal sistema immune innato, è in grado di sopprimere la formazione dei Treg e di scatenare una risposta proinfiammatoria principalmente mediata dai Th17.

I linfociti Treg migrano nei tessuti infiammati e inibiscono i Th effettori liberando TGF β e IL10, due citochine soppressorie, entrambe aumentate nella nostra analisi. Questi linfociti esprimono il FoxP3, un fattore di trascrizione critico per il loro sviluppo e la loro funzione; pertanto elevati livelli di FoxP3, come quelli riscontrati, sono indicativi di elevati livelli di Treg circolanti.

Il ridotto sviluppo di cellule T effettrici (soprattutto Th17 e Th1) dopo trattamento con alemtuzumab, nel nostro studio viene dimostrato con un duplice risultato, da un lato l'aumento dell'IL27, dall'altro la diminuzione dei livelli di espressione dell'IL23 e del fattore di trascrizione T-bet.

L'IL27, oltre a favorire l'espressione di T-bet e la successiva formazione dei Th1, è principalmente un regolatore negativo dei Th17. Essa inibisce la loro differenziazione, non tanto favorendo quella dei Th1, ma interferendo

con l'espressione di RORC, uno dei fattori di trascrizione chiave per la generazione dei Th17. È importante sottolineare che anche l'interazione diretta tra FoxP3 e RORC inibisce la differenziazione dei Th17, mentre, in vivo, l'IL27 può ridurre la risposta dei Th17 inducendo la proliferazione di cellule T produttrici IL10^(12,13).

L'IL23 è una citochina cruciale per lo sviluppo dell'infiammazione autoimmunitaria nel sistema nervoso centrale, in quanto fattore indispensabile per la completa differenziazione e per la funzione effettrice dei Th17. Essa stabilizza questi linfociti, senza però partecipare direttamente all'induzione dei T naive in Th17; una sua riduzione non preclude la capacità dei Th17 di produrre elevate concentrazioni di IL-17, ma non consente loro di diventare cellule patogenetiche complete.

Il T-bet è un fattore di trascrizione associato ai linfociti Th1, cellule aventi un ruolo nel danno tissutale grazie alla secrezione di IFN γ . Il T-bet, la cui espressione può essere indotta dall'IFN γ rilasciato dai Th1 maturi, favorisce la differenziazione dei Th1 via STAT4, perché aumenta il numero di recettori dell'IL12 sulla superficie linfocitaria. Inoltre il T-bet inibisce il differenziamento dei Th2 sopprimendo il fattore di trascrizione GATA3.

Associando questi risultati più strettamente molecolari con quelli relativi al decorso clinico della malattia, si osserva come essi siano in pieno accordo tra loro. I pazienti analizzati, visitati con scadenza regolare e valutati clinicamente tramite EDSS, non hanno manifestato, nel periodo compreso tra la prima e la seconda somministrazione di alemtuzumab, recidive cliniche e/o radiologiche, né progressione di malattia. A conferma di ciò vi sono i dati immunologici che rivelano sia un aumento dei livelli circolanti di Treg, sia una diminuita espressione dei linfociti T effettori, soprattutto dei Th17, i principali responsabili delle ricadute di malattia nella sclerosi multipla⁽¹⁴⁾.

In questo primo anno di studio non è stata segnalata dai centri partecipanti la comparsa di casi di gravi complicanze autoimmuni secondarie al trattamento con Campath, quali quelle a carico della tiroide o la porpora trombocitopenica immune.

I dati analizzati finora si riferiscono solo al primo anno di follow-up e, a causa della cattiva conservazione di alcuni prelievi, non è stato possibile ottenere riscontri significativi anche su altre molecole immunologiche, ma i risultati ricavati non solo concordano tra di loro, ma anche con quelli già presenti in letteratura^(7,10,14). Nel proseguire tali analisi immunologiche sarebbe anche interessante valutare la percentuale delle diverse sottopopolazioni linfocitarie T (Th17, Th1, Treg) e le loro risposte funzionali, per comprendere

le modalità e i tempi di ricostituzione del sistema immunitario dopo alemtuzumab nella sclerosi multipla.

Conclusioni

La terapia con alemtuzumab in pazienti affetti da SMRR induce una profonda deplezione linfocitaria, seguita da una graduale ricostituzione del pool di linfociti.

Lo studio dimostra, a 6 e a 12 mesi di follow-up, un aumento delle molecole immunologiche Treg correlate ed una riduzione di quelle associate ai linfociti T effettori. Tali dati potrebbero giustificare la diminuita progressione del danno infiammatorio tipico della malattia e quindi la mancata comparsa di ricadute cliniche e/o radiologiche.

Questi importanti risultati ci spingono a interrogarci su quali siano le dinamiche alla base della ricostruzione del sistema immunitario dopo Campath e di conseguenza sul modo in cui esse influenzano il decorso della patologia.

Soltanto proseguendo le analisi immunologiche e indirizzandole sul tipo di differenziazione linfocitaria sarà possibile capire se, dopo trattamento con alemtuzumab, le cellule T autoreattive possono essere escluse dal rinnovato pool di linfociti, rallentando così l'attività di malattia e l'esordio della disabilità nella sclerosi multipla.

BIBLIOGRAFIA

1. Ratzinger G, Reagan JL, Heller G, Busam KJ, Young JW. *Differential CD52 expression by distinct myeloid dendritic cell subsets: implications for alemtuzumab activity at the level of antigen presentation in allogeneic graft-host interactions in transplantation.* Blood. 2003; 101: 1422-1429.
2. Gilleece MH, Dexter TM. *Effect of Campath-1H antibody on human hematopoietic progenitors in vitro.* Blood. 1993; 82 (3): 807-812.
3. Coles AJ, Cox A, Le Page E, Jones J, Trip SA, Deans J, Seaman S, Miller DH, Hale G, Waldmann H, Compston DA. *The window of therapeutic opportunity in multiple sclerosis: evidence from monoclonal antibody therapy.* J Neurol. 2006; 253: 98-108.
4. Moreau T, Thorpe J, Miller D, Moseley I, Hale G, Waldmann H, Clayton D, Wing M, Scolding N, Compston A. *Preliminary evidence from magnetic brain resonance imaging for reduction in disease activity after lymphocyte depletion in multiple sclerosis.* Lancet. 1994; 344: 298-301.
5. Coles A, Deans J, Compston A. *Campath 1-H treatment of multiple sclerosis: lessons from the bedside for the bench.* Clin Neurol Neurosurg. 2004; 106: 270-274.
6. Durelli L, Conti L, Clerico M, Boselli D, Contessa G, Ripellino P, Ferrero B, Eid P, Novelli F. *T-Helper 17 Cells Expand in Multiple Sclerosis and Are Inhibited by Interferon.* Ann Neurol. 2009; 65: 499-509.
7. Touil. *The dramatic abrogation of inflammatory disease activity in MS patients treated with immune ablation and Autologous haematopoietic stem-cell transplantation (Ahsct) is associated with significant decreases in Th IL-17, but not In Th 1 responses.* Neurology. 2008; 70 (suppl 1): A246.
8. Coles AJ, Twyman CL, Arnold DL, Cohen JA, Confavreux C, Fox EJ, Hartung HP, Havrdova E, Selmaj KW, Weiner HL, Miller T, Fisher E, Sandbrink R, Lake SL, Margolin DH, Oyuela P, Panzara MA, Compston DA; CARE-MS II investigators. *Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy: a randomised controlled phase 3 trial.* Lancet. 2012; 380 (9856): 1829-39.
9. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS. *Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis.* Ann Neurol. 2001; 50 (1): 121-127.
10. CAMMS223 Trial Investigators, Coles AJ, Compston DA, Selmaj KW, Lake SL, Moran S, Margolin DH, Norris K, Tandon PK. *Alemtuzumab vs. interferon beta-1a in early multiple sclerosis.* N Engl J Med. 2008; 359: 1786-1801.
11. Cox AL, Thompson SA, Jones JL, Robertson VH, Hale G, Waldmann H, Compston DA, Coles AJ. *Lymphocyte homeostasis following therapeutic lymphocyte depletion in multiple sclerosis.* Eur J Immunol. 2005; 35 (11): 3332-3342.
12. Awasthi A, Carrier Y, Peron JP, Bettelli E, Kamanaka M, Flavell RA, Kuchroo VK, Oukka M, Weiner HL. *A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells.* Nat Immunol. 2007; 8: 1380-1389.

13. Stumhofer JS, Silver JS, Laurence A, Porrett PM, Harris TH, Turka LA, Ernst M, Saris CJ, O'Shea JJ, Hunter CA. *Interleukins 27 and 6 induce STAT3- mediated T cell production of interleukin 10*. *Nat Immunol*. 2007; 8: 1363-1371.
14. Durelli L, Conti L, Clerico M, Boselli D, Contessa G, Ripellino P, Ferrero B, Eid P, Novelli F. *T-Helper 17 Cells Expand in Multiple Sclerosis and Are Inhibited by Interferon-beta*. *Ann Neurol*. 2009; 65: 499-509.

**IL RUOLO DELL'ECOGRAFIA INTESTINALE
NEL PREDIRE IL RISCHIO DI RECIDIVA POST-OPERATORIA
NELLA MALATTIA DI CROHN**

Tesi di Laurea premiata con la Menzione d'Onore
del Consiglio di Presidenza dell'Accademia di Medicina di Torino

*Davide Giuseppe Ribaldone¹, Teresa Cammarota², Andrea Resegotti³,
Marco Astegiano¹, Mario Rizzetto¹*

¹ Gastroenterologia - U - Dipartimento Medicina Generale e Specialistica
Città della Salute e della Scienza di Torino - Italia

² Radiologia Diagnostica 5 - Dipartimento Diagnostica per Immagini e Radioterapia
Città della Salute e della Scienza di Torino - Italia

³ Chirurgia Generale 7 - Dipartimento Chirurgia Generale e Specialistiche
Città della Salute e della Scienza di Torino - Italia

Parole chiave: *Ecografia intestinale*
Malattia di Crohn
Recidiva post-chirurgica

Key words: *Bowel ultrasonography*
Crohn's disease
Post-surgical recurrence

Riassunto

Nella storia naturale della malattia di Crohn l'80% dei pazienti richiede l'intervento chirurgico, ma la chirurgia non è curativa ed essa recidiva in molti pazienti. Tra i 361 pazienti operati tra il dicembre del '93 e il marzo del 2009 per malattia di Crohn nel reparto di chirurgia generale del professor Fronda dell'ospedale Molinette 196 presentavano le seguenti caratteristiche: malattia di Crohn a localizzazione ileale o ileo-colica; resezione che comprendeva l'ileo con conseguente anastomosi ileo-ileale o ileo-colica. Essi sono stati sottoposti a un follow-up minimo di 2 anni e un'ecografia intestinale nell'arco dei 6 - 24 mesi successivi alla resezione.

Il parametro primario su cui è stata studiata la capacità di predire la recidiva chirurgica è lo spessore di parete in sede dell'anastomosi comprendente il tenue.

Lo spessore normale della parete di questo tratto di intestino è di 3 mm e abbiamo quindi studiato come cambia il rischio relativo di recidiva chirurgica per spessori di parete superiori a 3 mm.

Tra tutti i pazienti il tasso di recidiva chirurgica è risultato essere del 20% ad una distanza media dall'operazione di 6 anni e 6 mesi.

I pazienti che hanno, ad 1 anno dalla resezione chirurgica, uno spessore di parete intestinale a livello della anastomosi > 3 mm hanno un rischio relativo di recidiva chirurgica = 2.1 (I.C. 95% = 1.12 - 3.74) rispetto a chi ha uno spessore uguale a 3 mm.

L'incidenza di futura recidiva chirurgica in chi ha spessore ecografico uguale a 3 mm è del 13%, > 3 mm è del 28%, > 4 mm è del 29.1%, > 5 mm è del 34%, > 6 mm è del 40%.

Proponiamo di aggiungere la positività all'esame ecografico effettuato 1 anno dopo l'intervento chirurgico (spessore di parete intestinale a livello dell'anastomosi > 3 mm) ai fattori predittivi di precoce recidiva dopo resezione ileo-colica già presenti in letteratura.

Abstract

In Crohn's disease natural history about 80% of patients require surgery, which is not curative: unfortunately, the disease recurs in many patients. Among the 361 patients operated between December '93 and March of 2009 for Crohn's disease in the department of General Surgery of prof. Fronda, Molinette hospital, 196 presented the following characteristics: ileal or ileocolonic Crohn's disease; resection with ileo-ileal or ileo-colic anastomosis; a minimum follow-up of 2 years and a bowel ultrasound performed during 6 to 24 months after resection. The primary parameter studied for the ability to predict surgical recurrence is the wall thickness at the anastomosis. The normal thickness of the wall of this part of intestine is 3 mm and we therefore investigated how change the relative risk of surgical recurrence for wall thickness greater than 3 mm. Among all patients, the surgical recurrence rate was found to be 20% at a mean time from the operation of 6 years and 6 months.

Patients who have at 1 year from surgical resection a thickness of the intestinal wall > 3 mm have a relative risk of surgical recurrence = 2.1 (95% CI = 1.12 - 3.74) higher than those with a thickness equal to 3 mm. The incidence of future surgical recurrence in those who have thickness equal to 3 mm is 13%, > 3 mm is 28%, > 4 mm is 29.1%, > 5 mm is 34%, > 6 mm is 40%. We propose to add the bowel wall thickness > 3 mm at ultrasound performed 1 year after surgery to the predictors of early recurrence after resection already present in the literature.

Introduzione

Nella storia naturale della malattia di Crohn circa l'80% dei pazienti richiede l'intervento chirurgico⁽¹⁾.

La chirurgia purtroppo non è curativa e la malattia recidiva in molti pazienti. La recidiva chirurgica (necessità di un nuovo intervento) si verifica nel 15-45% dei pazienti a 3 anni, 26-65% a 10 anni e 33-82% a 15 anni⁽²⁾.

I fattori predittivi di una precoce recidiva dopo una resezione ileocolica sono^(1,3): il fumo⁽⁴⁾, una precedente chirurgia sull'intestino (compresa l'appendicectomia)⁽⁵⁾, presenza di fistole⁽⁶⁾, localizzazione perianale⁽⁷⁾, resezione estesa del piccolo intestino, assenza di trattamento profilattico post-operatorio^(8,9,10).

La malattia di Crohn è un disordine eterogeneo causato da una complessa interazione di microbi, ambiente, sistema immunitario e genetica. Sembra probabile che gli stessi fattori che sono alla base della patogenesi della malattia di Crohn ai suoi primi stadi contribuiscano anche alla recidiva della malattia dopo la resezione intestinale. In più, l'alto tasso di recidiva porta a pensare, ancora di più, che la storia naturale della malattia di Crohn in realtà non cambi dopo la resezione chirurgica.

Nonostante la progressiva diffusione dell'ecografia quale metodica per lo studio degli organi addominali, il suo utilizzo per la valutazione del tubo digerente è stato per molti anni considerato poco idoneo, a causa di fattori limitanti quali la presenza di gas endoluminale e l'incostanza dei reperti morfologici.

Lo spessore medio fisiologico della parete del tratto gastrointestinale varia dai 5 mm dello stomaco ai 3 mm del piccolo intestino e del colon⁽¹¹⁾.

L'esame ecografico dell'intestino viene eseguito preferibilmente con sonda convex da 3.5 MHz e/o lineare da 5 MHz, iniziando abitualmente l'esplorazione a livello della fossa iliaca sinistra, ove è sempre identificabile il sigma a ridosso della parete addominale; quindi si percorre in via retrograda tutta la cornice del colon fino al cieco; si esamina poi la matassa intestinale, avvalendosi del criterio topografico per distinguere le anse digiunali e ileali.

In una recente metanalisi⁽¹²⁾ è risultato che, quando uno spessore > 3 mm della parete intestinale è usato come cut-off di malattia la sensibilità e la specificità dell'ecografia intestinale nel diagnosticare la malattia di Crohn sono rispettivamente dell'88% e del 93%.

L'ecografia intestinale, effettuata 6 mesi o 12 mesi dopo l'intervento chirurgico è paragonabile per sensibilità, specificità, valore predittivo positivo e valore predittivo negativo all'ileocolonscopia nel diagnosticare la recidiva post-chirurgica⁽¹³⁾.

Fermo restando l'estremo interesse che suscita il poter predire l'aggressività futura della malattia, per di più in pazienti già andati incontro a interventi chirurgici per la malattia di Crohn, abbiamo voluto studiare se il risultato dell'ecografia intestinale effettuata 1 anno dopo la resezione sia in grado di predire questo andamento, espresso come rischio relativo di recidiva clinica e di recidiva chirurgica tra coloro che hanno uno spessore di parete intestinale man mano crescente.

Questo si rivelerebbe particolarmente interessante, data la non invasività dell'esame ecografico (e di conseguenza l'elevato tasso di gradimento dei pazienti), sia perché aggiungerebbe un ulteriore fattore predittivo di precoce recidiva dopo resezione ileo-colica oltre a quelli sopra citati, sia perché potrebbe permettere una definizione terapeutica più appropriata.

Finora gli studi riguardo l'utilizzo dell'ecografia intestinale nella malattia di Crohn sono stati effettuati per studiarne la validità nella diagnosi di malattia, delle complicanze addominali, come fattore predittivo di intervento chirurgico in pazienti mai operati⁽¹⁴⁾, nell'individuazione della recidiva post-chirurgica⁽¹⁵⁾, mentre un solo studio è stato effettuato per valutare la sua capacità di predire la recidiva post-chirurgica, ma in pazienti precedentemente sottoposti a un intervento conservativo (stricturoplastica)⁽¹⁶⁾.

Questo ci ha spinto a effettuare uno studio, con ampia casistica e lungo follow-up, per valutare l'utilità dell'ecografia intestinale nel predire un'eventuale futura recidiva clinica o chirurgica in pazienti resecati con l'intervento più frequentemente eseguito (resezione dell'ileo terminale con o senza emicolectomia destra e anastomosi ileo neoterminale - colon) in pazienti affetti dalla localizzazione più frequente della malattia di Crohn (ileo o ileo - colon).

Materiali e metodi

Sono stati selezionati 196 pazienti che rispettavano i seguenti criteri di inclusione: malattia di Crohn dell'ileo o ileo - colon, resezione interessante l'ileo o ileo + colon con anastomosi ileo - colica, essere stati seguiti per un follow-up minimo di 2 anni, aver eseguito un'ecografia intestinale nell'arco dei 6 - 24 mesi seguenti la resezione.

Il parametro primario su cui è stata studiata la capacità di predire la recidiva clinica e chirurgica è lo spessore di parete in sede dell'anastomosi comprendente il tenue.

Lo spessore normale della parete di questo tratto di intestino è di 3 mm⁽¹¹⁾ e abbiamo quindi studiato come cambia il rischio relativo (RR) di recidiva

clinica e di recidiva chirurgica, il tempo che intercorre prima della eventuale recidiva per spessori di parete superiori a 3 mm all'ecografia intestinale effettuata 1 anno dopo l'operazione. Abbiamo calcolato anche il valore predittivo positivo (VPP) dell'ecografia intestinale nel predire la libertà da recidiva chirurgica e clinica, con i relativi valori di sensibilità e specificità a seconda della soglia di spessore di parete scelta.

Gli altri parametri dell'ecografia intestinale che abbiamo analizzato sono: la presenza di segnali vascolari positivi al power doppler, di contrast enhancement, di stenosi del lume, di aspetto pluristratificato della parete intestinale.

La recidiva clinica è stata definita come la necessità di iniziare una terapia steroidea a dosaggio pieno o di introdurre farmaci immunosoppressori o anti-

Maschi/Femmine	115/81
Età media, anni (range)	42 (16 - 82)
Durata della malattia di Crohn, anni (range)	8 (0 - 54)
Fumatori, n (%)	
Si	86 (43.9)
No	110 (56.1)
Precedente intervento chirurgico, n (%)	
Mai	139 (70.9)
1	41 (20.9)
2	14 (7.1)
> 2	2 (1.0)
Ileo resecato (cm)	
< 50	140 (71.4%)
> = 50	56 (28.6%)
Indicazioni alla chirurgia, n (%)	
Stenosi	103 (52.6)
Fistole	54 (27.6)
Non risposta alla terapia medica	34 (17.3)
Perforazione	5 (2.6)

Tabella I. Caratteristiche della popolazione dello studio [n = 196 pazienti con malattia di Crohn].

TNF a causa della riacutizzazione dei sintomi o per riscontro di recidiva al clisma del tenue, alla colonscopia, alla TC o all'entero-RM.

L'analisi statistica è stata effettuata calcolando l'intervallo di confidenza al 95% di tutti i rischi relativi e valutandone la significatività statistica.

Risultati

Le caratteristiche della popolazione del nostro studio sono riportate nella tabella I.

Il follow-up medio è stato di 9 anni e 6 mesi (range: 2 anni e 1 mese - 17 anni e 1 mese).

Il tasso di recidiva chirurgica è risultato essere del 20.4%, ad una distanza media dal precedente intervento chirurgico di 6 anni e 6 mesi (range: 1 anno e 8 mesi - 14 anni e 7 mesi).

Il tasso di recidiva clinica è risultato essere del 40.6%, ad una distanza media dalla resezione chirurgica di 4 anni e 5 mesi (range: 3 mesi - 13 anni e 5 mesi).

Il tasso di recidiva chirurgica e di prima recidiva clinica è visibile in Figura 1.

I pazienti che hanno, a 1 anno dalla resezione chirurgica, uno spessore di parete intestinale a livello della anastomosi > 3 mm hanno un RR di recidiva

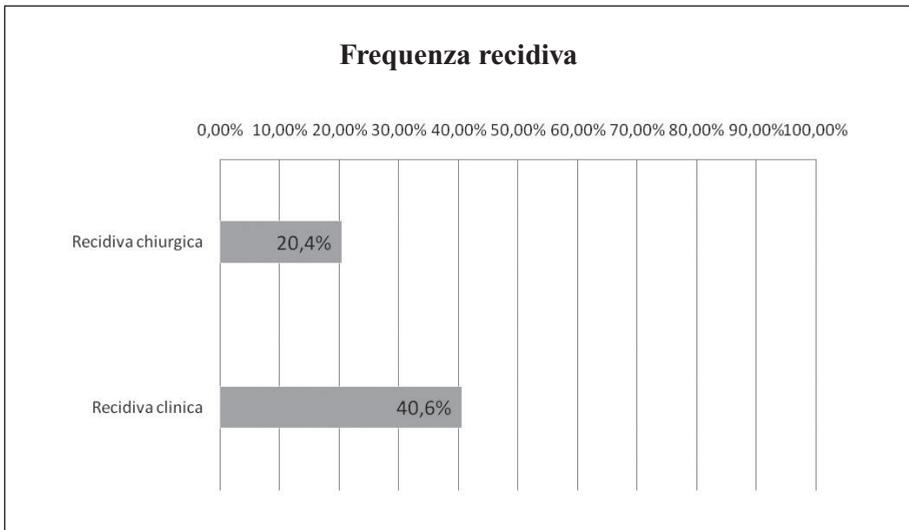


Figura 1. Tasso di recidiva chirurgica e di recidiva clinica.

chirurgica = 2.1 (I.C. 95% = 1.12 ÷ 3.74) rispetto a chi ha uno spessore uguale a 3 mm.

Al salire del valore di spessore di parete sale l'incidenza assoluta di reintervento: 13% tra quelli con spessore fisiologico (3 mm), 28% tra quelli con spessore > 3 mm, 29.1% tra quelli con spessore > 4 mm, 34% tra quelli con spessore > 5 mm, 40% tra quelli con spessore > 6 mm (Figura 2).

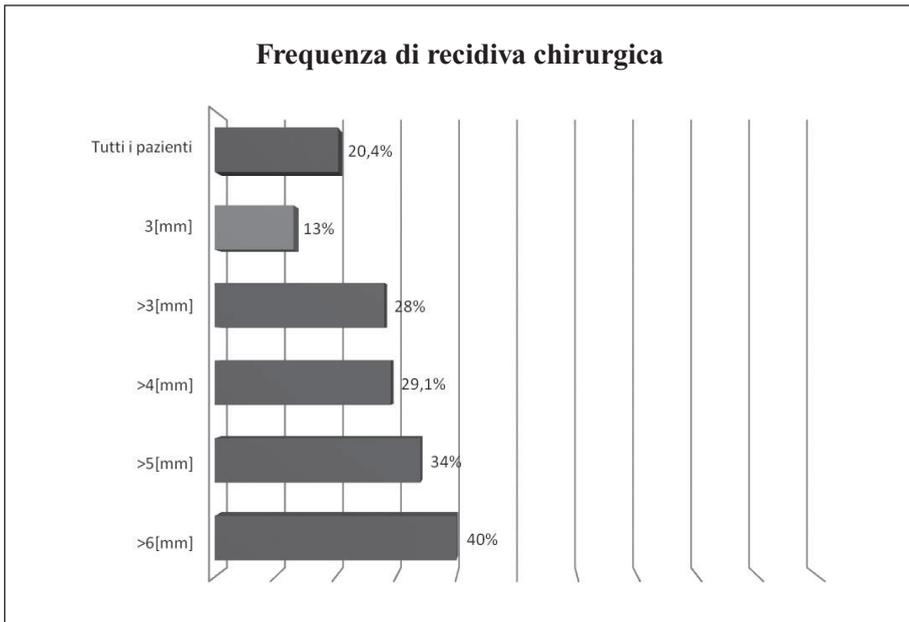


Figura 2. Frequenza di recidiva chirurgica.

I pazienti con spessore ecografico di parete intestinale ad 1 anno dalla resezione uguale a 3 mm non verranno rioperati a distanza di 9 anni e 6 mesi con un VPP dell'87%, una sensibilità del 55% e una specificità del 67.5%.

I pazienti che hanno, ad 1 anno dalla resezione chirurgica, uno spessore di parete intestinale a livello della anastomosi > 3 mm hanno un RR di prima recidiva clinica = 1.8 (I.C.95% = 1.25 ÷ 2.57) rispetto a chi ha uno spessore uguale a 3 mm.

L'incidenza di futura prima recidiva clinica di chi ha spessore uguale a 3 mm è del 29%, > 3 mm è del 52.6%, > 4 mm è del 57%, > 5 mm è del 64%, > 6 mm è del 65.7% (Figura 3).

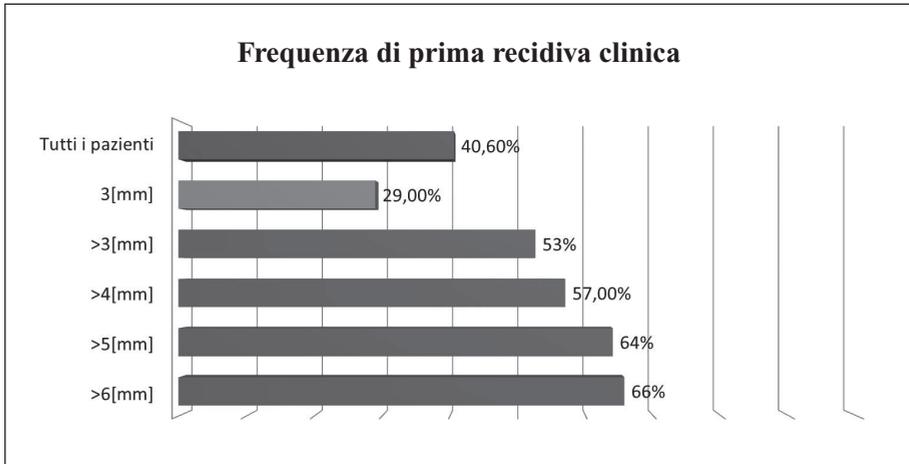


Figura 3. Frequenza di recidiva clinica.

Tra gli 8 pazienti con segnali vascolari positivi al power Doppler all'ecografia intestinale effettuata ad 1 anno dalla resezione, l'incidenza di recidiva chirurgica è risultata essere del 37,5%. L'unico paziente che ha mostrato contrast enhancement positivo all'ecografia intestinale effettuata ad 1 anno dalla resezione è andato incontro a recidiva chirurgica. Tra i 18 pazienti in cui è stata segnalata una stenosi del lume di varia entità all'ecografia intestinale effettuata ad 1 anno dalla resezione, l'incidenza di recidiva chirurgica è

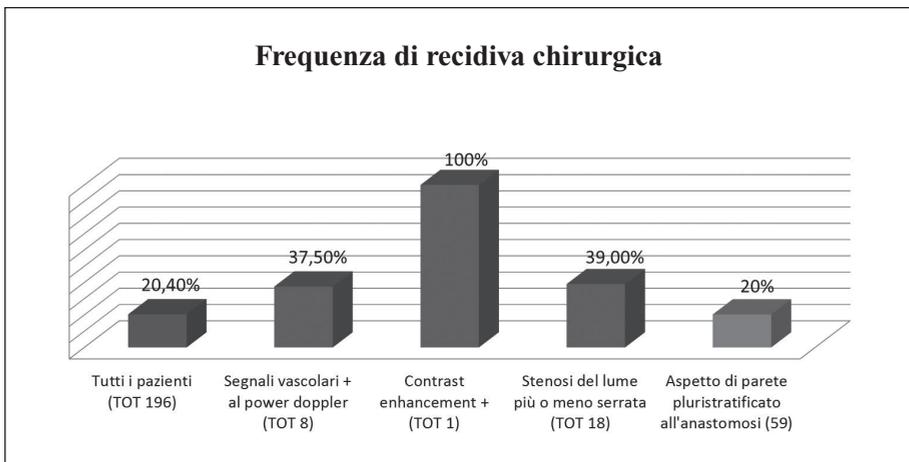


Figura 4. Recidiva chirurgica tra chi ha power Doppler +, contrast enhancement +, stenosi del lume, aspetto di parete pluristratificato.

risultata essere del 39%. Tra i 59 pazienti in cui è esplicitamente segnalato un aspetto pluristratificato della parete intestinale in sede di anastomosi all'ecografia intestinale effettuata ad 1 anno dalla resezione, l'incidenza di recidiva chirurgica è risultata essere del 20.3% (Figura 4).

Conclusioni

Possiamo quindi concludere che avere uno spessore di parete intestinale a livello dell'anastomosi > 3 mm all'ecografia intestinale effettuata 1 anno dopo l'intervento si aggiunge ai fattori predittivi di una precoce recidiva dopo resezione ileo-colica già presenti in letteratura.

Inoltre, in funzione del dato ecografico, appare giustificato ipotizzare una terapia e un follow-up personalizzato per i pazienti: l'incremento dello spessore di parete, con in più magari anche la presenza di segnali vascolari positivi al power Doppler e/o di contrast enhancement positivo potrebbe quindi determinare l'utilizzo di terapie farmacologiche più aggressive (steroidi topici o sistemici, immunosoppressori, farmaci biologici) con l'obiettivo di spegnere il processo infiammatorio. Il miglior controllo terapeutico potrebbe rappresentare un elemento a favore della modificazione dell'andamento di malattia e allungare l'intervallo libero da recidiva medica e chirurgica.

Sull'altro versante, la terapia profilattica nei pazienti che all'ecografia intestinale effettuata 1 anno dopo la resezione hanno uno spessore di parete fisiologico (3[mm]) potrebbe trovare meno indicazione data la tendenza della storia della loro malattia a essere meno aggressiva.

BIBLIOGRAFIA

1. Bernell O, Lapidus A, Hellers G. *Risk factors for surgery and recurrence in 907 patients with primary ileocaecal Crohn's disease.* Br J Surg. 2000; 87: 1697-1701.
2. Rutgeerts P. *Strategies in the prevention of post-operative recurrence in Crohn's disease.* Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2003; 17: 63-73.
3. Welsch T, Hinz U, Loffler T, Muth G, Herfarth C, Schmidt J, Kienle P. *Early re-laparotomy for post-operative complications is a significant risk factor for recurrence after ileocaecal resection for Crohn's disease.* Int J Colorectal Dis. 2007; 22: 1043-1049.
4. Ryan WR, Allan RN, Yamamoto T, Keighley MR. *Crohn's disease patients who quit smoking have a reduced risk of reoperation for recurrence.* Am J Surg. 2004; 187: 219-225.
5. Onali S, Petruzzello C, Calabrese E, Condino G, Zorzi F, Sica GS, Pallone F, Biancone L. *Frequency, pattern, and risk factors of postoperative recurrence of Crohn's disease after resection different from ileo-colonic.* J Gastrointest Surg. 2009; 13: 246-252.
6. Sachar DB, Lemmer E, Ibrahim C, Edden Y, Ullman T, Ciardulo J, Roth E, Greenstein AJ, Bauer JJ. *Recurrence patterns after first resection for stricturing or penetrating Crohn's disease.* Inflamm Bowel Dis. 2009; 15: 1071-1075.
7. Hofer B, Bottger T, Hernandez-Richter T, Seifert JK, Junginger T. *The impact of clinical types of disease manifestation on the risk of early postoperative recurrence in Crohn's disease.* Hepatogastroenterology. 2001; 48: 152-155.
8. Caprilli R, Taddei G, Viscido A. *In favour of prophylactic treatment for post-operative recurrence in Crohn's disease.* Ital J Gastroenterol Hepatol. 1998; 30: 219-225.
9. Breslin NP, Sutherland LR. *The case against routine postoperative therapy for prevention of recurrence in Crohn's disease.* Ital J Gastroenterol Hepatol. 1998; 30: 226-230.
10. McLeod RS, Wolff BG, Steinhart AH, Carryer PW, O'Rourke K, Andrews DF, Blair JE, Cangemi JR, Cohen Z, Cullen JB, Chaytor RG, Greenberg GR, Jaffer NM, Jeejeebhoy KN, MacCarty RL, Ready RL, Weiland LH. *Prophylactic mesalamine treatment decreases postoperative recurrence of Crohn's disease.* Gastroenterology 1995; 109: 404-413.
11. Fleisher AC, Muhletaler CA, James AE jr. *Sonographic assessment of the bowel wall.* AJR. 1981; 136: 887-891.
12. Fraquelli M, Colli A, Casazza G, Paggi S, Colucci A, Massironi S, Duca P, Conte D. *Role of US in detection of Crohn disease: meta-analysis.* Radiology. 2005; 236: 95-101.
13. Biancone L, Calabrese E, Petruzzello C, Onali S, Caruso A, Palmieri G, Sica GS, Pallone F. *Wireless capsule endoscopy and small intestine contrast ultrasonography in recurrence of Crohn's disease.* Inflamm Bowel Dis. 2007; 13: 1256-1265.
14. Rigazio C, Ercole E, Laudi C, Daperno M, Lavagna A, Crocella L, Bertolino F, Viganò L, Sostegni R, Pera A, Rocca R. *Abdominal bowel ultrasound can predict the risk of surgery in Crohn's disease: proposal of an ultrasonographic score.* Scand J Gastroenterol. 2009; 44: 585-593.
15. Pallotta N, Giovannone M, Pezzotti P, Gigliozzi A, Barberani F, Piacentino D, Hassan NA, Vincoli G, Tosoni M, Covotta A, Marcheggiano A, Di Camillo M, Corazziari E. *Ultrasonographic detection and assessment of the severity of Crohn's disease recurrence after ileal resection.* BMC Gastroenterol. 2010; 10: 69.

16. Parente F, Sampietro GM, Molteni M, Greco S, Anderloni A, Sposito C, Danelli PG, Taschieri AM, Gallus S, Bianchi Porro G. *Behaviour of the bowel wall during the first year after surgery is a strong predictor of symptomatic recurrence of Crohn's disease: a prospective study.* Aliment Pharmacol Ther. 2004; 20: 959-968.

Tesi di Laurea vincitrice del
PREMIO FONDAZIONE FERRERO ONLUS
in memoria del Prof. Gianpiero GAIDANO
Anno Accademico 2011/2012

Candidato: Federica PIVARO

Relatore: Prof. Giovanni Carlo ISAIA

Titolo: **Caratteristiche clinico-demografiche
e variabili associate alla degenza protratta
in anziani ricoverati in Unità Mediche Ospedaliere**

Tesi di Laurea vincitrice del
PREMIO IN MEMORIA DEL DOTT. ITALO ARNEODO
Anno Accademico 2011/2012

Candidato: Matteo BIANCO

Relatore: Prof. Fiorenzo GAITA

Titolo: **Valutazione ecocardiografica della risposta
cardiocircolatoria allo sforzo nei pazienti
affetti da sclerosi sistemica**

Tesi di Laurea vincitrice della
MENZIONE D'ONORE
del Consiglio di Presidenza dell'Accademia di Medicina
Anno Accademico 2011/2012

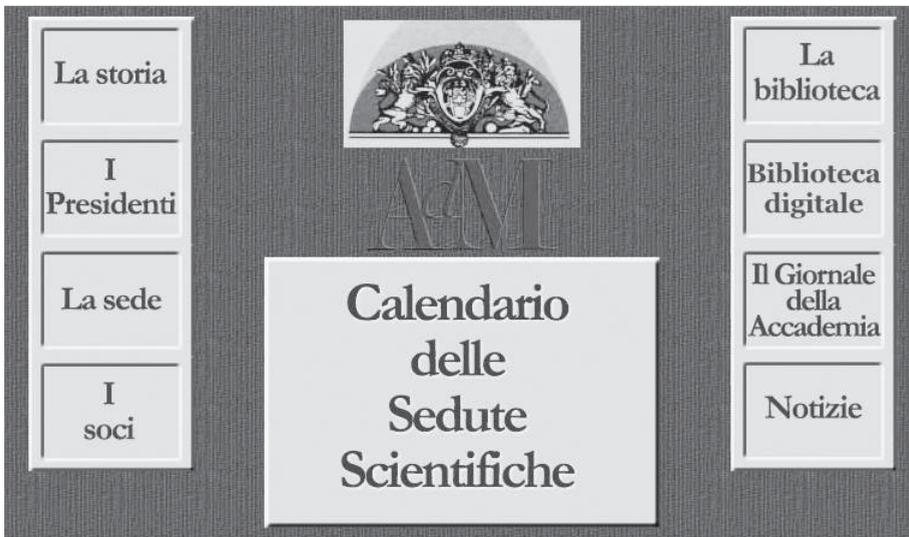
Candidato: Vittoria BASILE

Relatore: Prof. Massimo TERZOLO

Titolo: **Implicazioni cliniche di un approccio farmacogenetico
alla terapia con Mitotane in pazienti
affetti da carcinoma surrenalico**

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 Psychopathological 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

Elisabetta Aldieri	230	Marco Falcone	261
Anna Allavena	103	Maria Teresa Fierro	87
Alberto Angeli	37, 53, 135	Dario Fontana	261
Giuseppe Armocida	204	Giorgia Fornelli	315
Marco Astegiano	380	Claudia Galassi	214
Maria Grazia Bernengo	87	Sara Gallo	162
Fiorella Biasi	72	Vittorio Gallo	292
Filippo Bogetto	271	Giada Gelsomino	230
Cecilia Bracco	103	Vincenzo Gerbi	308
Riccardo Bruna	180	Dario Ghigo	230
Luisa Brussino	344	Ezio Ghigo	280
Caterina Bucca	344	Alessandra Giai Via	359
Teresa Cammarota	380	Angela Gueli	180
Ivana Campia	230	Anna Guermani	247
Caterina Canavese	326	Giuseppe Guida	344
Guido Casalis Cavalchini	103	Pier Luigi Ingrassia	190
Elena Castellano	280	Giancarlo Isaia	315
Carlo Ceruti	261	Joanna Kopecka	230
Alessandro Cignetti	180	Gabriella Leonarduzzi	72
Marinella Clerico	359	Chiara Manieri	280
Sebastiano Colombatto	292	Sebastiano Marra	124
Luca Cordero di Montezemolo	47	Massimiliano Massaia	315
Beatrice Culla	344	Annalisa Mastrapasqua	315
Stefania De Mercanti	359	Franco Merletti	214
Carlo De Sanctis	50	Simona Mondino	315
Francesco Della Corte	190	Sara Monti	326
Cataldo Di Bisceglie	280	Donato Munno	271
Umberto Dianzani	326	Paola Ogliara	103
Carolina Dimas Belisario	230	Barbara Pasini	103
Pier Paolo Donadio	247	Federico Piazza	359
Maria Elena Donadio	247	Martha Leonor Pinzòn-Daza	230
Sophie Doublier	230	Giuseppe Poli	72
Luca Durelli	359	Manuela Polimeni	230
Alessandra Fabbri	80	Massimo Porta	162

Raffaele Potenza	247	Luigi Rolle	261
Marco Quaglia	326	Marco Ruella	180
Pietro Quaglino	87	Carlotta Sacerdote	214
Luca Ragazzoni	190	Paola Savoia	87
Andrea Resegotti	380	Piero Stratta	326
Davide Giuseppe Ribaldone	380	Corrado Tarella	180
Lorenzo Richiardi	214	Marco Tengattini	190
Chiara Riganti	230	Massimiliano Timpano	261
Gaetana Silvia Rigo	204	Davide Varenni	344
Alba Ripoll	190	Alessandra Venesia	292
Mario Rizzetto	380	Francesca Vignolo Lutati	103

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:

Roberto Gallina
Maria Giordano
Laura Leto
Elena Spertino
Margherita Marchetti
Elena Menditto
Paola Porrino
Simonetta Piano

Autorizzazione del Tribunale di Torino n. 477
Finito di stampare nel mese di novembre 2013

Stampato da: Tipografia Bodrato s.n.c.
Via Vanchiglia 31 - 10124 Torino - Tel. 011.817.71.44