

Anno CLXXI

2008

GIORNALE
DELLA
ACCADEMIA DI MEDICINA
DI TORINO

Comitato di Redazione

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

Direttore Responsabile

Giovanni Carlo Isaia

ACCADEMIA DI MEDICINA DI TORINO

Ufficio di Presidenza

<i>Presidente:</i>	Nicola Riccardino
<i>Vice Presidente:</i>	Alberto Angeli
<i>Segretario:</i>	Giovanni Carlo Isaia
<i>Amministratore:</i>	Paolo Arese
<i>Bibliotecario:</i>	Alessandro Bargoni
<i>Consiglieri:</i>	Teresa Cammarota Carlo de Sanctis
<i>Past President:</i>	Giuseppe Poli

SOMMARIO

PARTE I

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

Elenco Soci 11

PARTE II

Sedute Accademia di Medicina, anno 2008 27

PARTE III

Comunicazioni

Nicola Riccardino

**Relazione del Presidente alla seduta inaugurale
dell'Accademia Anno 2008/2009** 33

Roberto Mutani
Commemorazione del socio Bruno Bergamasco 41

Michele Lanotte, Leonardo Lopiano
**Neuromodulazione nei disordini del movimento:
dieci anni di esperienza a Torino** 45

Gastone Marotti
**Modalità di trasmissione dei segnali meccanici e metabolici
tra le cellule ossee** 55

Alberto Angeli
**L'ipercortisolismo nell'anziano:
conseguenza o causa di deterioramento cerebrale?** 68

*Mario Boccadoro, Valeria Magarotto, Sara Bringham, Patrizia Falco,
Federica Cavallo, Alessandra Larocca, Francesca Gay,
Mariella Genuardi, Barbara Lupo, Antonio Palumbo*
**Il trattamento del mieloma multiplo di nuova diagnosi
nel paziente anziano** 88

Antonio Palumbo
I nuovi farmaci 102

Beatrice Culla, Luisa Brussino, Caterina Bucca
Asma bronchiale: aspetti fisiopatologici e clinici 107

Carlo Gulotta, Riccardo Pellegrino
I complessi meccanismi dell'iperresponsività bronchiale 120

Andrea Benso, Barbara Lucatello, Fabio Broglio, Ezio Ghigo
**Ghrelin: dalla secrezione somatotropa alla prospettiva
di un ormone pleiotropo ad attività metabolica** 128

*Alessandro Comandone, Oscar Bertetto, Antonella Boglione,
Lavinia Bianco, Giovannino Ciccone*
I Tumori Rari (TR): aspetti organizzativi, clinici e di ricerca 142

Alice Chiarle
Tesi di Laurea premiata dalla Fondazione Cavalieri Ottolenghi
in collaborazione con l'Accademia di Medicina di Torino
**Il disturbo ossessivo-compulsivo ad esordio precoce:
forme familiari e forme autoimmuni** 156

Simone Tomasi, Alessandro Ducati, Alessandro Vercelli
Tesi di Laurea premiata dalla Fondazione Cavalieri Ottolenghi
in collaborazione con l'Accademia di Medicina di Torino
**La neurogenesi dopo ischemia cerebrale:
aspetti morfologici e profilo temporale** 170

Stefania Di Bella, Giovanni Carlo Isaia
Tesi di Laurea premiata dalla Fondazione per l'Osteoporosi Piemonte
in collaborazione con l'Accademia di Medicina di Torino
Basi cellulari del meccanismo d'azione del risedronato 186

Enrica Capelletto

Premio “Giampiero Gaidano”

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

**Studio di fase III in pazienti con carcinoma polmonare non a piccole
cellule metastatico, trattati con due cicli di Cisplatino e Gemcitabina
e successivamente randomizzati a ricevere tre ulteriori cicli
della stessa combinazione o gemcitabina in monochemioterapia** 200

**MEDICI PIEMONTESI NEI PAESI IN VIA DI SVILUPPO:
ESEMPI DI SOLIDARIETÀ, FORMAZIONE E PROFESSIONALITÀ**

Guido Gasparri

Presentazione 217

Celestina Dominelli

Prefazione 218

Giuseppe Meo

**L’impegno del CCM: costruire servizi essenziali a favore
delle comunità geografiche più svantaggiate e remote** 222

Giorgio Olivero

La formazione “leva” della cooperazione 224

Giuseppe Benedetto

**Se la missione sanitaria diventa la speranza più importante
per un popolo provato da una guerra lunga e devastante** 226

Riccardo Durando

**Quando la forza di volontà di un gruppo di dottori
e tecnici si trasforma nel motore di un’organizzazione
specializzata nelle cure ai dimenticati** 228

Stefano Enrico

**Il sorriso dei malati è il miglior compenso: ogni viaggio
è unico e porta con sé la scoperta di genti e luoghi diversi** 230

*Roberto Pacifici, Valentina Paganin,
Patrizia D'Amelio, Giovanni Carlo Isaia*
L'osteimmunologia: relazione fra il sistema immune e l'osso 232

Marco Massobrio, Manuela Puopolo
**Terapia ormonale sostitutiva e rischio oncologico
I tumori ginecologici e del colon-retto** 249

Piero Sismondi, Nicoletta Biglia, Valentina Elisabetta Bounous
Terapia ormonale sostitutiva e carcinoma della mammella 255

Romeo Canini, Alberto Bazzocchi, Giuseppe Battista
Dall'imaging anatomico al molecolare 266

Patrizia Presbitero, Veronica Lisignoli
**L'interventistica cardiologica nella prevenzione e nel trattamento
dello stroke ischemico** 277

PARTE IV

Tesi di Laurea candidate per il Premio Fondazione Ferrero Onlus Anno Accademico 2007/2008	291
Tesi di Laurea vincitrice del Premio Fondazione Ferrero Onlus Anno Accademico 2007/2008	292
Tesi di Laurea candidate per il Premio in Memoria del Dott. Italo Arneodo Anno Accademico 2007/2008	293
Tesi di Laurea vincitrici del Premio in Memoria del Dott. Italo Arneodo Anno Accademico 2007/2008	296
Tesi di Laurea candidate per il Premio Fondazione per l'Osteoporosi Piemonte Anno Accademico 2007/2008	297
Tesi di Laurea vincitrice del Premio Fondazione per l'Osteoporosi Piemonte Anno Accademico 2007/2008	298
Sito web dell'Accademia di Medicina di Torino	299
Norme redazionali per la pubblicazione sul "Giornale dell'Accademia di Medicina di Torino"	301
Indice degli Autori	303

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

1911-1913	Bonaventura Graziadei	1956-1957	Giacomo Mottura
1913-1919	Valentino Oliva	1957-1962	Carlo Chiaudano
1919-1921	Antonio Carle	1962-1967	Achille Mario Dogliotti
1921-1923	Ferdinando Battistini	1967-1969	Pier Carlo Borsotti
1923-1926	Giuseppe Vicarelli	1969-1971	Giulio Cesare Dogliotti
1926-1928	Camillo Negro	1971-1976	Giorgio Cavallo
1928-1930	Ignazio Dionisio	1976-1979	Alfredo Lucca
1930-1932	Stefano Balp	1979-1986	Guido Filogamo
1932-1934	Ferruccio Vanzetti	1986-1990	Rino Colombo
1934-1938	Vitige Tirelli	1990-1994	Angelo Carbonara
1938-1940	Luigi Bobbio	1994-1998	Adriano Vitelli
1940-1942	Ottorino Uffreduzzi	1998-2002	Mario Umberto Dianzani
1942-1949	Carlo Gamna	2002-2004	Renato Cirillo
1949-1950	Luigi Ferrio	2004-2008	Giuseppe Poli
1952-1956	Pio Bastai		
1956	Stefano Perrier		

ACCADEMIA DI MEDICINA DI TORINO*Via Po, 18 - 10123 Torino**Telefono 011.817.92.98 - Fax 011.817.92.98**www.accademiadimedicina.unito.it***ELENCO SOCI (AL 22 OTTOBRE 2009)****Soci Ordinari** (in ordine di anzianità di nomina)**Francesco Morino***Professore di Clinica Chirurgica
dell'Università di Torino
(31 Maggio 1968)***Luigi Ravizza***Professore Onorario di Clinica Psichiatrica
dell'Università di Torino
(14 Dicembre 1977)***Bruno Demichelis***Professore di Clinica Odontostomatologica
dell'Università di Torino
(14 Giugno 1974)***Alberto Angeli***Professore Ordinario di Medicina Interna
dell'Università di Torino
(3 Luglio 1979)***Davide Schiffer***Professore Emerito di Neurologia
dell'Università di Torino
(14 Giugno 1974)***Gian Paolo Busca***Professore di Clinica Otorinolaringoiatrica
dell'Università di Torino
(3 Luglio 1979)***Alberto Sartoris***Professore di Clinica Otorinolaringoiatrica
dell'Università di Torino
(30 Giugno 1977)***Onofrio Campobasso***Primario Emerito di Anatomia Patologica
Ospedale Maria Vittoria di Torino
(3 Luglio 1979)***Giovanni Bussolati***Professore Ordinario di Anatomia e Istologia
Patologica dell'Università di Torino
(14 Dicembre 1977)***Giorgio Emanuelli***Professore Emerito di Medicina Interna
dell'Università di Torino
(3 Luglio 1979)***Giuseppe Piccoli***Professore Onorario di Nefrologia
dell'Università di Torino
(14 Dicembre 1977)***Paolo Gallinaro***Professore Ordinario di Clinica Ortopedica
dell'Università di Torino
(3 Luglio 1979)*

Giuseppe Heer

*Primario Emerito di Oculistica
Ospedale Maria Vittoria di Torino
(3 Luglio 1979)*

Gian Franco Pagano

*Professore Emerito di Medicina Interna
dell'Università di Torino
(3 Luglio 1979)*

Nicola Riccardino

*Primario Emerito Laboratorio di Analisi
Chimiche e Microbiologiche
Ospedale Mauriziano di Torino
(3 Luglio 1979)*

Luigi Sena

*Professore Ordinario di Patologia Clinica
dell'Università di Torino
(3 Luglio 1979)*

Remo Modica

*Professore Emerito di Chirurgia
Maxillo-Facciale dell'Università di Torino
(13 Febbraio 1981)*

Giacomo Giacobini

*Professore Ordinario di Anatomia Umana
Normale dell'Università di Torino
(20 Maggio 1983)*

Giorgio Palestro

*Professore Ordinario di Anatomia e Istologia
Patologica dell'Università di Torino
(20 Maggio 1983)*

Benedetto Terracini

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

Mario Rizzetto

*Professore Ordinario di Gastroenterologia
dell'Università di Torino
(26 Maggio 1989)*

Franco Balzola

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

Alessandro Calciati

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

Paolo Comoglio

*Professore Ordinario di Istologia
dell'Università di Torino
(26 Gennaio 1990)*

Guido Forni

*Professore Ordinario di Immunologia
dell'Università di Torino
(26 Gennaio 1990)*

Giovanni Losano

*Professore Ordinario di Fisiologia Umana
dell'Università di Torino
(26 Gennaio 1990)*

Marco Massobrio

*Professore Ordinario di Clinica Ostetrica e
Ginecologica dell'Università di Torino
(30 Novembre 1990)*

Antonio Solini

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

Francesco Di Carlo

*Professore Ordinario di Farmacologia
dell'Università di Torino
(20 Dicembre 1991)*

Federico Grignolo

*Professore Ordinario di Clinica Oculistica
dell'Università di Torino
(20 Dicembre 1991)*

Alberto Piazza

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

Mario Pippione

*Professore Ordinario di Clinica
Dermatologica dell'Università di Torino*
(18 Dicembre 1992)

Giuseppe Poli

*Professore Ordinario di Patologia Generale
dell'Università di Torino*
(18 Dicembre 1992)

Giuseppe Segoloni

*Professore Ordinario di Nefrologia
dell'Università di Torino*
(18 Dicembre 1992)

Italo Faraldi

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

Pier Giorgio Montarolo

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

Giulio Preti

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

Antonio Robecchi

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

Emanuele Albano

*Professore Ordinario di Patologia Generale
dell'Università del Piemonte Orientale
di Novara*
(16 Dicembre 1994)

Mario Boccadoro

*Professore Ordinario di Ematologia
dell'Università di Torino*
(16 Dicembre 1994)

Pietro Bracco

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

Paolo Cavallo Perin

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

Mario Maritano

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

Antonio Mussa

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

Giovanni Muto

*Primario Divisione di Urologia
Ospedale Giovanni Bosco di Torino*
(16 Dicembre 1994)

Magda Passatore

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

Francesco Gorgerino

*Primario Emerito
di Anestesia e Rianimazione
Ospedale Martini di Torino*
(15 Dicembre 1995)

Alessandro Negro Ponzi

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

Giovanni Baduini

*Consulente di Cardiologia Interventistica
Torino
(13 Dicembre 1996)*

Cesare Bumma

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

Giovanni Carlo Isaia

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

Alessandro Tizzani

*Professore Ordinario di Urologia
dell'Università di Torino
(13 Dicembre 1996)*

Ilario Viano

*Professore Ordinario di Chemioterapia
dell'Università del Piemonte Orientale
di Novara
(13 Dicembre 1996)*

Mario Campogrande

*Già Primario di Ostetricia e Ginecologia
Ospedale Sant'Anna di Torino
(12 Dicembre 1997)*

Dario Fontana

*Professore Ordinario di Urologia
dell'Università di Torino
(12 Dicembre 1997)*

Piero Sismondi

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

Maria Luisa Soranzo

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

Mario Nano

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

Luigi Santoro

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

Paolo Arese

*Professore Ordinario di Biochimica
dell'Università di Torino
(10 Dicembre 1999)*

Mario Eandi

*Professore Ordinario di Farmacologia
dell'Università di Torino
(10 Dicembre 1999)*

Gianruggero Fronda

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

Federico Ponzio

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

Paolo Rossi

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

Maria Grazia Bernengo

*Professore Ordinario di Dermatologia
dell'Università di Torino
(15 Dicembre 2000)*

Dario Cantino

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

Lorenzo Capussotti

*Primario di Chirurgia Generale
Ospedale Mauriziano di Torino
(15 Dicembre 2000)*

Angelo Pera

*Già Primario di Gastroenterologia
Ospedale Mauriziano di Torino
(15 Dicembre 2000)*

Gabriele Fontana

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

Giovanni Gandini

*Professore Ordinario di Radiologia
dell'Università di Torino
(14 Dicembre 2001)*

Elsa Margaria

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

Lorenzo Silengo

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

Amalia Bosia

*Professore Ordinario di Biochimica
dell'Università di Torino
(13 Dicembre 2002)*

Sergio Coverlizza

*Primario di Anatomia Patologica
Ospedale Giovanni Bosco di Torino
(13 Dicembre 2002)*

Vittorio Modena

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

Giuseppe Saglio

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

Federico Bussolino

*Professore Ordinario di Biochimica
dell'Università di Torino
(12 Dicembre 2003)*

Carlo de Sanctis

*Primario Emerito di Endocrinologia Pediatrica
Ospedale Infantile Regina Margherita di Torino
(12 Dicembre 2003)*

Roberto Fantozzi

*Professore Ordinario di Farmacologia
dell'Università di Torino
(12 Dicembre 2003)*

Cesare Fava

*Professore Ordinario di Radiologia
dell'Università di Torino
(12 Dicembre 2003)*

Marcello Nobili

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

Roberto Rigardetto

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

Mauro Salizzoni

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

Filippo Bogetto

*Professore Ordinario di Psichiatria
dell'Università di Torino
(17 Dicembre 2004)*

Piero Borasio

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

Umberto Dianzani

*Professore Ordinario di Immunologia
dell'Università del Piemonte Orientale
di Novara
(17 Dicembre 2004)*

Pietro Greco Lucchina

*Già Primario di Cardiologia
Ospedale San Luigi Gonzaga di Orbassano
(17 Dicembre 2004)*

Augusta Palmò

*Primario di Dietetica e Nutrizione
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino
(17 Dicembre 2004)*

Marco Vito Ranieri

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

Maurizio Stella

*Primario Centro Grandi Ustionati
Banca della Cute - Ospedale CTO di Torino
(17 Dicembre 2004)*

Giampaolo Trevi

*Professore Ordinario di Malattie
dell'Apparato Cardiovascolare
dell'Università di Torino
(17 Dicembre 2004)*

Teresa Cammarota

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

Ezio Ghigo

*Professore Ordinario di Endocrinologia
dell'Università di Torino
(16 Dicembre 2005)*

Luigi Dogliotti

*Professore Ordinario di Oncologia
dell'Università di Torino
(15 Dicembre 2006)*

Franco Merletti

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

Mario Morino

*Professore Ordinario di Chirurgia
dell'Università di Torino
(15 Dicembre 2006)*

Roberto Mutani

*Professore Ordinario di Neurologia
dell'Università di Torino
(15 Dicembre 2006)*

Patrizia Presbitero

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

Mauro Rinaldi

*Professore Straordinario di Chirurgia
Cardiaca dell'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 Ordinario di Patologia Generale
dell'Università del Piemonte Orientale
di Novara
(14 Dicembre 2007)*

Alessandro Maria Gaetini

*Professore Ordinario di Chirurgia Generale
dell'Università di Torino*

(14 Dicembre 2007)

Guido Monga

*Professore Ordinario di Anatomia Patologica
dell'Università del Piemonte Orientale
di Novara*

(14 Dicembre 2007)

Umberto Ricardi

*Professore Straordinario
di Diagnostica per Immagini e Radioterapia
dell'Università di Torino*

(14 Dicembre 2007)

Dario Roccatello

*Professore Ordinario di Patologia Clinica
dell'Università di Torino*

(14 Dicembre 2007)

Mariella Trovati

*Professore Ordinario di Medicina Interna
dell'Università di Torino*

(14 Dicembre 2007)

Maria Consuelo Valentini

*Primario di Neuroradiologia
Ospedale CTO di Torino*

(14 Dicembre 2007)

Antonio Bertolotto

*Dirigente Medico S.S.I.D.
Struttura Dipartimentale Sclerosi Multipla
Ospedale San Luigi Gonzaga di Orbassano*

(12 Dicembre 2008)

Giovanni Camussi

*Professore Ordinario di Nefrologia
dell'Università di Torino*

(12 Dicembre 2008)

Stefano Carossa

*Professore Ordinario di
Malattie Odontostomatologiche
dell'Università di Torino*

(12 Dicembre 2008)

Claudio Fabris

*Professore Ordinario di Pediatria
dell'Università di Torino*

(12 Dicembre 2008)

Giovanni Succo

*Primario di Otorinolaringoiatria
Ospedale Martini di Torino*

(12 Dicembre 2008)

Soci Onorari Nazionali

Bruno Zanobio

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

Rita Levi Montalcini

*CNR, Roma
(11 Dicembre 1981)*

Ludovico Giulio

*Professore di Fisiologia
dell'Università di Torino
(9 Dicembre 1988)*

Ernesto Quagliariello

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

Elio Guido Rondanelli

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

Francesco De Matteis

*Professore di Tossicologia
dell'Università di Torino
(17 Dicembre 1993)*

Lucio Di Guglielmo

*Professore di Radiologia
dell'Università di Pavia
(16 Dicembre 1994)*

Arturo Falaschi

*Libero Docente presso l'Università di Pavia
Direttore Generale dell'ICGEB
(15 Dicembre 1995)*

Ludovico Dalla Palma

*Direttore Istituto di Radiologia
dell'Università di Trieste
(12 Dicembre 1997)*

Gian Gastone Neri Serneri

*Già Professore di Clinica Medica
dell'Università di Firenze
(11 Dicembre 1998)*

Umberto Marinari

*Professore Ordinario di Patologia Generale
dell'Università di Genova
(15 Dicembre 2000)*

Beniamino Tesauro

*Professore di Chirurgia Generale
dell'Università di Napoli Federico II
(15 Dicembre 2000)*

Rinaldo Bertolino

*Professore Ordinario di Diritto Canonico
dell'Università di Torino
(13 Dicembre 2002)*

Adelfio Elio Cardinale

*Professore Ordinario di Radiologia
dell'Università di Palermo
(13 Dicembre 2002)*

Mario Umberto Dianzani

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

Lorenzo Moretta

*Professore Ordinario di Patologia Generale
e di Fisiopatologia dell'Università di Genova
(14 Dicembre 2007)*

Aldo Fasolo

*Professore Ordinario di Biologia dello
Sviluppo dell'Università di Torino
(12 Dicembre 2008)*

Ezio Giacobini

*Docente delle Università di
Ginevra e Springfield (Illinois)
(12 Dicembre 2008)*

Soci Onorari Esteri

Renato Dulbecco

Milano

(11 Dicembre 1981)

Ronald J. Linden

Londra

(20 Dicembre 1991)

Gian Franco Bottazzo

Londra

(10 Febbraio 1984)

Robert C. Gallo

Bethesda

(17 Dicembre 1993)

Ralph John M.C.H. Nicholls

F.R.C.S., Londra

(18 Marzo 1988)

Alberto Boveris

Buenos Aires

(12 Dicembre 1997)

Liberato J.A. Di Dio

Toledo, Ohio

(9 Dicembre 1988)

Salvador Moncada

Londra

(11 Dicembre 1998)

Hans Konrad Müller Hermelink

Würzburg

(26 Maggio 1989)

Luc Montagnier

Paris

(16 Dicembre 2005)

Anatoly V. Pokrovsky

Mosca

(26 Maggio 1989)

Josè Viña

Valencia

(14 Dicembre 2007)

Soci Corrispondenti Nazionali

Giuseppe Maria Pontieri

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

Carlo Grassi

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

Ferruccio Mandler

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

Marco Galloni

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

Fulvia Vignotto

*Professore a Contratto
Scuola di Specializzazione in Oncologia
dell'Università di Torino
(18 Dicembre 1992)*

Alessandro Bargoni

*Professore Aggregato di Storia della
Medicina dell'Università di Torino
(17 Dicembre 1993)*

Giovanni Ceriotti

*Già Professore Incaricato di Chimica
Clinica dell'Università di Padova
(16 Dicembre 1994)*

Roberto Frairia

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

Donatella Gattullo

*Professore Associato di Fisiologia
dell'Università di Torino
(16 Dicembre 1994)*

Oskar Schindler

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

Luigi Spandrio

*Già Professore Ordinario di Biochimica
Clinica dell'Università di Brescia
(16 Dicembre 1994)*

Andrea Ballabio

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

Giuseppe Boccuzzi

*Primario di Endocrinologia Oncologica
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino
(15 Dicembre 1995)*

Marcello Garavoglia

*Professore Ordinario
di Chirurgia Generale dell'Università
del Piemonte Orientale di Novara
(15 Dicembre 1995)*

Guido Gasparri

*Professore Ordinario
di Chirurgia Generale
dell'Università di Torino
(15 Dicembre 1995)*

Giorgio M. Innocenti

*Professore Emerito di Neuroscienze del
Karolinska Institutet di Stoccolma
(15 Dicembre 1995)*

Francesco Scaroina

*Primario di Medicina
Ospedale San Giovanni Bosco di Torino
(11 Dicembre 1998)*

Ottavio Davini

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

Oscar Bertetto

*Direttore ARESS Piemonte
Torino
(13 Dicembre 2002)*

Alberto Biglino

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

Giancarlo Cortese

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

Paolo Pera

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

Anna Sapino

*Professore Ordinario di Anatomia
Patologica dell'Università di Torino
(12 Dicembre 2008)*

Soci Corrispondenti Esteri**Jean Lenegre**

*Parigi
(25 Marzo 1960)*

Soldano Ferrone

*New York
(20 Maggio 1983)*

Jean Pierre Changeux

*Parigi
(14 Giugno 1974)*

Neville A. Marsh

*Londra
(30 Novembre 1990)*

René Couteaux

*Parigi
(14 Giugno 1974)*

Nicolass Westerhof

*Amsterdam
(18 Dicembre 1992)*

Danilo Baggiolini

*Basel
(20 Maggio 1983)*

Soci Emeriti

Bruno Boles Carenini

*Professore Emerito di Clinica Oculistica
dell'Università di Torino*
Socio Emerito dal 23 Maggio 2006

Paolo Calderini

*Primario Emerito di Chirurgia Generale
Ospedale S. Giovanni, Antica Sede di Torino*
Socio Emerito dal 23 Maggio 2007

Guido Filogamo

*Professore Emerito di Anatomia Umana
Normale dell'Università di Torino*
Socio Emerito dal 23 Maggio 2006

Napoleone Massaioli

*Professore di Chirurgia Generale
dell'Università di Torino*
Socio Emerito dal 23 Maggio 2007

Giuliano Maggi

*Professore Emerito di Chirurgia Toracica
dell'Università di Torino*
Socio Emerito dal 23 Maggio 2006

Mario Portigliatti Barbos

*Professore di Scienze Medico-Forensi
dell'Università di Torino*
Socio Emerito dal 23 Maggio 2007

Gian Michele Molinatti

*Professore Emerito di Clinica Medica
dell'Università di Torino*
Socio Emerito dal 23 Maggio 2006

Salvatore Rocca Rossetti

*Professore Emerito di Urologia
dell'Università di Torino*
Socio Emerito dal 23 Maggio 2007

Angelo Emilio Paletto

*Professore Emerito di Patologia Speciale
Chirurgica dell'Università di Torino*
Socio Emerito dal 23 Maggio 2006

Gian Luca Sannazzari

*Professore Emerito di Radiologia
dell'Università di Torino*
Socio Emerito dal 23 Maggio 2007

Simone Teich-Alasia

*Primario Emerito di Chirurgia Plastica
Ospedale CTO di Torino*
Socio Emerito dal 23 Maggio 2006

Giorgio Verme

*Primario Emerito di Gastroenterologia
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino*
Socio Emerito dal 23 Maggio 2007

Felice Gavosto

*Professore Emerito di Clinica Medica
dell'Università di Torino*
Socio Emerito dal 30 Ottobre 2006

Renato Cirillo

*Primario Emerito di Radiologia
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino*
Socio Emerito dal 18 Giugno 2008

Enrico Genazzani

*Professore Emerito di Farmacologia
dell'Università di Torino*
Socio Emerito dal 30 Ottobre 2006

Edmondo Comino

*Primario Emerito di Radiologia
Ospedale Giovanni Bosco di Torino*
Socio Emerito dal 18 Giugno 2008

Enrico Madon

*Professore Onorario di Clinica Pediatrica
dell'Università di Torino*
Socio Emerito dal 18 Giugno 2008

Alessandro Pileri

*Professore Emerito di Ematologia
dell'Università di Torino*
Socio Emerito dal 18 Giugno 2008

Giorgio Agati

*Primario Emerito di Radiologia
Ospedale Regina Maria Adelaide
di Torino*
Socio Emerito dal 23 Gennaio 2009

Pier Giuseppe De Filippi

*Primario Emerito di Medicina Nucleare
A.O.U. San Giovanni Battista di Torino*
Socio Emerito dal 23 Gennaio 2009

Eugenio Meda

*Professore Emerito di Fisiologia Generale
dell'Università di Torino*
Socio Emerito dal 23 Gennaio 2009

Pier Luigi Baima Bollone

*Professore Ordinario di Medicina Legale
e delle Assicurazioni
dell'Università di Torino*
Socio Emerito dal 23 Giugno 2009

Soci Benemeriti

Ing. Enzo Brusasco
(16 Dicembre 2005)

Dott. Piero Sola
(16 Dicembre 2005)

Ing. Walter Ceresa
(16 Dicembre 2005)

Soci già Ordinari

Giampaolo Ambroggio

*Già Primario di Chirurgia Plastica Generale
Ospedale CTO di Torino*

Nicoletta Ansaldo

*Professore di Clinica Pediatrica
dell'Università di Torino*

Giovanni Astaldi

*Primario Emerito
Ospedale Maggiore di Tortona*

Luigi Bucciante

*Professore Emerito di Anatomia Umana
dell'Università di Padova*

Giorgio Cortesina

*Professore Ordinario
di Clinica Otorinolaringoiatrica
dell'Università di Torino*

Massimo Crepet

*Professore Emerito di Clinica delle Malattie
del Lavoro dell'Università di Padova*

Mario Dellepiane

*Primario di Chirurgia Generale Adulti
Ospedale Koelliker di Torino*

Ferdinando Dianzani

*Professore Emerito di Microbiologia
dell'Università di Roma*

Livia Di Cagno

*Professore Emerito di Neuropsichiatria
Infantile dell'Università di Torino*

Enrico Geuna

*Primario Emerito Neurochirurgia
Ospedale Maggiore di Novara*

Paolo Gioannini

*Professore Emerito di Clinica delle Malattie
Infettive dell'Università di Torino*

Felice Grattarola

*Primario Emerito di Neurologia
Astanteria Martini di Torino*

Raoul Hahn

*Primario Emerito di Otorinolaringoiatria
Ospedale di Rivoli*

Giano Magri

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

Giorgio Mangiarotti

*Professore Ordinario di Biologia e
Zoologia Generale dell'Università di Torino*

Angela Moiraghi Ruggenini

*Professore Emerito di Igiene
dell'Università di Torino*

Mario Morea

*Professore di Cardiocirurgia
dell'Università di Torino*

Walter Neri

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

Giovanni Pisani

*Primario Emerito di Radiologia
Ospedale Maggiore di Novara*

Ernesto Pozzi

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

Luigi Resegotti

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

Giovanni Sesia

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

Piergiorgio Strata

*Professore Ordinario di Fisiologia Umana
dell'Università di Torino*

Regis Triolo

*Primario Emerito di Medicina
Ospedale Martini di Torino*

Gian Carlo Ugazio

*Professore di Patologia Generale
dell'Università di Torino*

Gian Carlo Vanini

*Professore di Igiene
dell'Università Cattolica di Roma*

Pierino Zardini

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

Sedute dell'Accademia di Medicina – Anno 2008

18 Gennaio **Intraoperative radiotherapy:
precision for cancer control**
Relatore: Felipe CALVO
Presentato dal Socio: Gianluca SANNAZZARI

29 Gennaio **Commemorazione del Socio
Bruno BERGAMASCO**
di Roberto MUTANI

**Neuromodulazione nei disordini del movimento:
10 anni di esperienza a Torino**
*Relatori: Lorenzo LOPIANO
e Michele LANOTTE*
Presentati dal Socio: Roberto MUTANI

8 Febbraio **La biomeccanica dell'osso**
*Relatori: Pasquale Mario CALDERALE
e Gastone MAROTTI*

*Moderatori: Angelo Raffaele MEO
e Giovanni Carlo ISAIA*

in collaborazione con l'Accademia delle Scienze di Torino

22 Febbraio **L'ipercortisolismo nell'anziano: conseguenza o causa dell'invecchiamento cerebrale?**

Relatore: Alberto ANGELI

14 Marzo **Il mieloma oggi**

Relatore: Mario BOCCADORO

I nuovi farmaci

Relatore: Antonio PALUMBO

Moderatore: Alessandro PILERI

31 Marzo **La glico-ossidazione come meccanismo molecolare di invecchiamento**

Relatore: Patrizio ODETTI

Presentato dal Socio: Giuseppe POLI

11 Aprile **Asma bronchiale: aspetti fisiopatologici e clinici**

Relatori: Caterina BUCCA e Carlo GULOTTA

Presentati dal Socio: Alberto ANGELI

Seduta in ricordo del Prof. Lorenzo GARBAGNI

21 Aprile **Commemorazione del Socio
Pietro RASTEL BOGIN**

di Guido FILOGAMO

La ghrelina, un nuovo ormone gastrico

Relatore: Ezio GHIGO

9 Maggio **I tumori rari: aspetti organizzativi, clinici e di ricerca**

*Relatori: Oscar BERTETTO
e Alessandro COMANDONE*

21 Maggio **Pneumopatie infiltrative diffuse:
diagnostica per immagini e terapia**

*Relatori: Carlo ALBERA
e Giancarlo CORTESE*

6 Giugno **I rifiuti urbani: un problema multidisciplinare**

*Relatori: Alberto BIGLINO, Cesare BOFFA
e Romualdo CONTI*

*in collaborazione con l'Accademia delle Scienze
e l'Accademia di Agricoltura di Torino*

18 Giugno **Esperienze di medici piemontesi
in Medio Oriente ed Africa**

Relatori:

Elisabetta CERUTTI: CAMBOGIA

Giuseppe D'AGOSTINO: AFGHANISTAN

Giuseppe BENEDETTO: IRAK

Stefano ENRICO: SUDAN

Giorgio OLIVERO: KENIA

Riccardo DURANDO: MADAGASCAR

Riflessioni e Conclusioni: Giuseppe MEO

Presentati dal Socio: Guido GASPARRI

- 3 Ottobre* **L'osteimmunologia:
relazione fra il sistema immune e l'osso**
Relatore: Roberto PACIFICI
Presentato dal Socio: Giovanni Carlo ISAILA
- 17 Ottobre* **Terapia ormonale sostitutiva e rischio oncologico**
Relatori: Marco MASSOBRIO e Piero SISMONDI
- 14 Novembre* **Seduta inaugurale dell'Anno Accademico 2008/2009**
Relazione del Presidente: Nicola RICCARDINO
- Malattia di Alzheimer.
Diagnosi precoce per un trattamento precoce**
Relatore: Ezio GIACOBINI
Presentato dal Socio: Giuseppe POLI
- 21 Novembre* **Dall'imaging anatomico all'imaging molecolare**
Relatore: Romeo CANINI
Presentato dal Socio: Edmondo COMINO
- 2 Dicembre* **L'interventistica cardiologica nel trattamento
e nella prevenzione dello stroke ischemico**
Relatore: Patrizia PRESBITERO

Sedute Private

22 Febbraio **Approvazione rendiconto consuntivo 2007
e bilancio di previsione 2008**

12 Dicembre **Elezione di nuovi Soci
dell'Accademia di Medicina di Torino**

Sedute Straordinarie

14 Maggio

**Presentazione delle Tesi di Laurea premiate
con il contributo della
Fondazione Cavalieri Ottolenghi**

Alice CHI RLE e Simone TOMASI

Presentati dai Relatori:

Filippo BOGETTO,

Alessandro DUCATI e Alessandro VERCELLI

**Presentazione della Tesi di Laurea premiata
con il contributo della
Fondazione per l'Osteoporosi Piemonte**

Stefania DI BELLA

Presentata dal Socio:

Giovanni Carlo ISAIA

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

Enrica CAPELLETTO

Presentata dal Relatore:

Giorgio SCAGLIOTTI

**RELAZIONE DEL PRESIDENTE
ALLA SEDUTA INAUGURALE DELL'ACCADEMIA
ANNO 2008-2009**

*A*utorità, gentili Signore e Signori, cari Colleghi,
a nome del Consiglio di Presidenza dell'Accademia e mio personale
porgo a tutti i presenti un cordiale saluto di benvenuto a questa cerimonia
inaugurale.

*Cerimonia dal sapore antico e nel contempo attuale alla quale la presenza
di illustre personalità conferisce un significato particolare.*

*Vi ringrazio di essere qui con noi oggi a testimoniare la stima per la nostra
istituzione e l'interesse per le nostre attività.*

*Con uno sguardo al passato nel quale proprio in queste mura grandi
maestri hanno scritto la storia della medicina, non è possibile ricordarli tutti,
mi limito a menzionare i premi Nobel che in questi ultimi anni hanno tenuto in
questa Aula le loro lezioni magistrali: Renato Dulbecco, Rita Levi Montalcini,
Luc Montagnier e come Giano Bifronte con un occhio all'oggi e al domani,
come è tradizione riferirò brevemente sulle attività svolte nel corrente anno e
sui programmi che ci proponiamo di effettuare nel 2009.*

*Tradizione instaurata dai Presidenti degli ultimi anni con i quali ho avuto
l'onore di collaborare e di condividere i loro programmi: i compianti Rino
Colombo, Angelo Carbonara e Adriano Vitelli e successivamente Mario
Umberto Dianzani, Renato Cirillo e Giuseppe Poli. Con le loro capacità e
con il loro impegno hanno dato un impulso nuovo alla vita dell'Accademia,
ne hanno tenuto alto il prestigio: li ringrazio per i molti insegnamenti che mi
hanno dato e per avermi trasmesso l'attaccamento alla nostra Associazione.*

*Nell'anno in corso sono state tenute 2 sedute private, 1 straordinaria e 17
ordinarie e inoltre un buon numero di incontri.*

*Gli argomenti trattati, moderni e attuali, hanno richiamato un buon
pubblico, costituito non solo da soci, e hanno dato luogo come consuetudine
a interventi e discussioni.*

Nelle due sedute private del 12 dicembre 2007 e del 22 febbraio 2008 si sono tenute le elezioni per la nomina del Presidente, del Vice Presidente e di nuovi Soci e per l'approvazione del Rendiconto Consuntivo 2007 e del Bilancio di Previsione 2008.

Nella seduta straordinaria del 14 maggio 2008 sono state presentate le tesi di Laurea in Neuroscienze premiate dalla Fondazione Cavalieri Ottolenghi: Dr.ssa Alice Chiarle relatore Filippo Bogetto e Dr. Simone Tomasi relatori Alessandro Ducati e Alessandro Vercelli.

Nella stessa seduta è stata presentata la tesi premiata dalla Fondazione Ferrero della Dr.ssa Enrica Cappelletto, relatore Giovanni Scagliotti, premio dedicato alla memoria del Prof. Giampiero Gaidano.

Inoltre, è stata presentata la ricerca della Dr.ssa Stefania Di Bella sulle malattie metaboliche dell'osso, relatore Giancarlo Isaia, premiata dalla Fondazione per l'Osteoporosi Piemonte.

Le sedute pubbliche a cadenza bimestrale hanno trattato argomenti molto attuali.

- 9 novembre 2007 lettura inaugurale dell'anno accademico 2007/2008 tenuta dal Socio Onorario Alberto Boveris, presentato da Giuseppe Poli: "Advances in the understanding of the aging process".*
- 20 novembre 2007 "La grande obesità: aggiornamento clinico-patogenetico e trattamento chirurgico" di Augusta Palmò e Mauro Toppino.*
- 3 dicembre 2007 "Diabete mellito: malattia o sindrome?" di Gianfranco Pagano.*
- 18 gennaio 2008 "Intraoperative radiotherapy: precision for cancer controllo" di Felipe Calvo presentato da Gianluca Sannazzari.*
- 29 gennaio 2008 "Neuromodulazione nei disordini del movimento: 10 anni di esperienza a Torino" di Lorenzo Lopiano e Michele Lanotte presentati da Roberto Mutani.*
- 8 febbraio 2008 Seduta in collaborazione con l'Accademia delle Scienze: "La biomeccanica dell'osso" di Pasquale Mario Calderale e Gastone Marotti moderatori Angelo Raffaele Meo e Giancarlo Isaia.*
- 22 febbraio 2008 "L'ipercortisolismo nell'anziano: conseguenza o causa dell'invecchiamento cerebrale?" di Alberto Angeli.*

- 14 marzo 2008 *“Il mieloma oggi” di Mario Boccardo e “I nuovi farmaci” di Antonio Palombo moderatore Alessandro Pileri.*
- 31 marzo 2008 *“La glico-ossidazione come meccanismo molecolare di invecchiamento” di Patrizio Odetti presentato da Giuseppe Poli.*
- 11 aprile 2008 *“Asma bronchiale: aspetti fisiopatologici e clinici” di Caterina Bucca e Carlo Gulotta presentati da Alberto Angeli.*
- 21 aprile 2008 *“La ghrelina, un nuovo ormone gastrico” di Ezio Ghigo.*
- 9 maggio 2008 *“I tumori rari: aspetti organizzativi, clinici e di ricerca” di Oscar Bertetto e Alessandro Comandone.*
- 21 maggio 2008 *Pneumopatie infiltrative diffuse: diagnostica per immagini e terapia” di Carlo Albera e Giancarlo Cortese.*
- 6 giugno 2008 *Seduta in collaborazione con Accademia delle Scienze e Accademia di Agricoltura di Torino “I rifiuti urbani: un problema multidisciplinare” di Alberto Biglino, Cesare Boffa e Romualdo Conti. Moderatori: Renata Allio, Raffaele Meo e Nicola Riccardino.*
- 18 giugno 2008 *“Esperienze di medici piemontesi in Medio Oriente ed Africa” di Elisabetta Cerutti, Giuseppe D’Agostino, Giuseppe Benedetto, Stefano Enrico, Giorgio Olivero, Riccardo Durando. Riflessioni e conclusioni di Giuseppe Meo. Presentati da Guido Gasparri.*
- 3 ottobre 2008 *“L’osteoinmunologia: relazione fra il sistema immune e l’osso” di Roberto Pacifici presentato da Giancarlo Isaia.*
- 17 ottobre 2008 *“Terapia ormonale sostitutiva e rischio oncologico” di Marco Massobrio e Piero Sismondi.*

Oltre alle sedute ordinarie appena ricordate svariati incontri sempre su argomenti medici sono stati ospiti della nostra sede:

- 18 dicembre 2007 *è stato presentato il volume: “Alessandro Riberi. Un mito della medicina torinese dell’800” del nostro Socio Onorario Mario Umberto Dianzani che ha riscosso grande interesse e il 20 settembre 2008 il volume è stato ripresentato, con una suggestiva cerimonia, a Stroppo paese natio di Alessandro Riberi.*

- 11 gennaio 2008 *“L’italian malaria network” rapporto del primo anno di attività” Coordinatore Paolo Arese.*
- 18 aprile 2008 *“La valutazione economica in sanità” Coordinatore Franco Merletti.*
- 5 giugno 2008 *“Grandi ustionati: il futuro inizia a 40 anni: Prospettive nella prevenzione, nella clinica e nella ricerca” Coordinatore Simone Teich Alasia. Intervento di M.U. Dianzani.*
- 19 giugno 2008 *“18 Corso teorico-pratico sulle malattie metaboliche dell’osso” Direttore Giancarlo Isaia.*
- 7 ottobre 2008 *in collaborazione con la Scuola di Dottorato di medicina sperimentale dell’Università di Torino si è tenuta la lezione magistrale del prestigioso cardiologo Attilio Maseri President Heart Care Foundation “Orientamenti attuali della ricerca in cardiologia” presentato da Giuseppe Poli e Giampaolo Trevi.*
- 23 ottobre 2008 *presentazione del volume: “Gente di Croce Rossa – memorie e diari di guerra” presentato da Giovanni Villari. Moderatore: Nicola Riccardino.*

Le sedute ordinarie e gli incontri hanno registrato la presenza di un pubblico attento e interessato che ha posto domande e fatto interventi.

A seguito delle elezioni avvenute il 12 dicembre 2007 sono stati nominati:

Soci Ordinari:

Dr. Alessandro Comandone
Dr. Felicino Debernardi
Prof.ssa Irma Dianzani
Prof. Alessandro Maria Gaetini
Prof. Guido Monga
Prof. Umberto Ricardi
Prof. Dario Roccatello
Prof.ssa Mariella Trovati
Dr.ssa Maria Consuelo Valentini

Socio Corrispondente:

Dr. Paolo Pera

Soci Onorari:

Lorenzo Moretta

Josè Vina

*Il Consiglio di Presidenza ha nominato **Soci Emeriti**:*

Prof. Renato Cirillo

Prof. Edmondo Comino

Prof. Enrico Madon

Prof. Alessandro Pileri

Rallegramenti specie ai nuovi soci che arricchiscono il nostro patrimonio culturale e che mi auguro contribuiscano attivamente alla vita della nostra Accademia.

Grazie alla generosità delle Fondazione Ferrero e Famiglia Arneodo anche per questo anno accademico siamo stati in grado di premiare tre tesi di Laurea giudicate meritorie. In realtà le tesi inviate erano tutte degne di essere premiate, abbiamo dovuto scegliere tra 19 tesi tutte con 110 e lode. La scelta non è stata facile. Sono risultate vincitrici le tesi:

- per la Fondazione Ferrero, in memoria del Prof. Giampiero Gaidano, del Dr. Marco Ravazzoli relatore il Prof. Giancarlo Isaia;*
- per i due Premi alla memoria del Dr. Italo Arneodo sono risultati vincitori il Dr. Franco Panero relatore Prof. Paolo Cavallo Perin e la Dr.ssa Maria Teresa Ricci relatrice la Prof.ssa Barbara Pasini.*

Siamo particolarmente lieti di poter annunciare che per diversi anni saremo in grado, grazie alla sensibilità dei nostri mecenati di continuare questa bella tradizione. Con consuetudine i premiati esporranno le loro tesi in una seduta straordinaria del prossimo anno.

È stato pubblicato il 170° volume del: “Giornale dell’Accademia di Medicina di Torino” con il contributo del Ministero per i Beni e le Attività Culturali”.

Dopo tante notizie positive una nota negativa e triste, alla presenza dei familiari sono stati commemorati i Soci:

Adriano Vitelli da Giuseppe Poli e Francesco Scaroina il 3 dicembre 2007

Bruno Bergamasco da Roberto Mutani il 29 gennaio 2008

Lorenzo Garbagni da Caterina Bucca e Carlo Gulotta l’11 aprile 2008

Pietro Rastel Bogin da Guido Filogamo il 21 aprile 2008.

Sono inoltre deceduti i Soci:

Mario Banche

Luigi Campi

Alessandro Cesare Levi

Germano Ferraris

Giano Magri

Li ricordiamo tutti con affetto e rimpianto e rinnoviamo ai familiari il nostro cordoglio.

Prima di cedere la parola al Past President Giuseppe Poli per la presentazione del prestigioso relatore consentitemi di fare un rapido accenno al programma delle prossime sedute:

21 novembre 2008 “Dall’imaging anatomico all’imaging molecolare” di Roberto Canini presentato da Edmondo Comino.

2 dicembre 2008 “L’interventistica cardiologica nel trattamento e nella prevenzione dello stroke ischemico” di Patrizia Presbitero.

12 dicembre 2008 Seduta privata dedicata alle elezioni di nuovi Soci.

Il calendario delle sedute del 2009 è in via di completamento. Anticipo soltanto che il centenario della morte di Cesare Lombroso, mitica figura del secolo scorso e già Presidente di questa Accademia sarà celebrato in modo solenne e adeguato, una commissione di esperti: Baima Bollone, Giacobini e Bargoni stanno predisponendo il programma e si hanno notizie che il Museo Lombroso verrà riaperto nel 2009.

Termino la mia relazione con i ringraziamenti non formali ma sentiti e veramente pieni di riconoscenza, in primis il Consiglio di presidenza: al past President Giuseppe Poli artefice della convenzione con l’Università e di molte importanti iniziative, guida preziosa, al Vice Presidente Alberto Angeli promotore e curatore dei programmi, punto solido di riferimento per la sua grande cultura, a Giancarlo Isaia instancabile segretario generale che con il suo attivismo e le sue innovazioni ha dato una impronta moderna alla gestione della nostra associazione, a Paolo Arese attento oculato amministratore delle nostre magre finanze, ad Alessandro Bargoni bibliotecario sempre alle prese con problemi di personale e di attrezzature, a Teresa Cammarota e Carlo de Sanctis consiglieri preziosi, alla nostra insostituibile segretaria, che ha fatto

dell'Accademia la sua seconda casa. A questi personaggi si deve la maggior parte dei risultati di questo anno grazie: grazie di cuore, grazie del vostro supporto e della vostra amicizia.

Doverosi e calorosi ringraziamenti all'Università, al Rettore Pelizzetti e ai suoi collaboratori per averci dato un valido aiuto e una luce per il futuro, al Ministero per i Beni e le Attività Culturali, alla Regione Piemonte, alla Provincia, al Comune di Torino, alla Compagnia di San Paolo, alla Fondazione CRT, alla Fondazione Ferrero, alla Famiglia Arneodo, a tutti i Professionisti che ci hanno assistiti, a tutti i presenti che testimoniano la considerazione per il nostro operato, con commozione dichiaro ufficialmente aperto l'anno accademico 2008/2009 163° dalla fondazione di Re Carlo Alberto.

Nicola Riccardino

**COMMEMORAZIONE DEL SOCIO
BRUNO BERGAMASCO**

Signor Presidente e Cari Colleghi,

quando il Prof. Poli mi ha chiesto di commemorare in questa Accademia il Prof. Bruno Bergamasco, dopo un'iniziale esitazione ho accettato di buon grado vista la grande stima che avevo nei Suoi confronti e l'amicizia che ci legava da più di 40 anni. Di buon grado quindi, conscio però della impossibilità di delineare in pochi minuti i tratti salienti della Sua figura. Ho dovuto pertanto fare delle scelte e mi scuso in anticipo delle lacune.



Commemorare vuol dire “ricordare insieme” e, quindi, ho pensato che la cosa migliore fosse quella di ricordare ciò che legava Bruno Bergamasco agli altri nella vita accademica, sociale, professionale e familiare. Non è stato difficile, visto che uno dei tratti distintivi di Bruno era proprio la capacità di istituire legami forti con gli altri, ed è l'intensità di questi legami che ce ne fa avvertire così dolorosamente la mancanza.

Bruno Bergamasco è stato ricercatore attento ed appassionato, allievo della Scuola neurologica torinese ad impronta neurofisiologica clinica, Scuola rappresentata dal nostro comune Maestro, Prof. Lodovico Bergamini, e che ha espresso ricercatori notissimi quali Fuortes, Terzuolo e Ajmone Marsan.

Dal Maestro Bruno Bergamasco assorbì le grandi doti cliniche grazie all'acuta capacità di osservazione, al rigore metodologico ed all'ampia cultura sia neurologica che psichiatrica che Lo portò al conseguimento della Libera Docenza in Clinica delle Malattie Nervose e Mentali.

Al mio ingresso al I anno di specialità venni affidato dal Prof. Bergamini allo specializzando dell'ultimo anno Bruno Bergamasco. Non solo devo a Lui i miei primi lavori scientifici ma ebbi anche ampiamente modo di apprezzare la capacità di Bruno di creare un legame importante con i Suoi collaboratori, attraverso il coinvolgimento, la guida, il prendersi cura, il genuino interesse verso le loro persone. Fu quello un periodo di intensa e fruttuosa attività di ricerca clinica, periodo che impose il nome di Bergamasco quale studioso emergente nella Neurofisiologia Clinica.

Il principale frutto di tale attività fu la monografia “Cortical Evoked Potentials” in Neurologia, pubblicata nel 1967 negli Stati Uniti. Ma voglio anche ricordare una serie di lavori degli anni '60, ancora ampiamente citati in letteratura e che concernono la diagnosi e la prognosi del coma, degli stati confusionali e di disturbi del sonno associati all'epilessia.

A ricordo di quel periodo così intenso Bruno Bergamasco ha sempre tenuto appesa nel suo studio una fotografia che rappresenta noi due, gli allievi, a fianco del Maestro nel corso del Congresso Europeo sulle patologie del sonno, svoltosi a Bologna nel 1967. Ora tengo nel mio studio la stessa fotografia, quale simbolico passaggio di testimone nella continuità della Scuola di origine.

Le grandi capacità di Neurofisiologo Clinico hanno portato Bruno Bergamasco alla Presidenza della Società Italiana di Neurofisiologia Clinica nel periodo 1986-88. Le spiccate doti cliniche, didattiche e di ricerca, insieme con il costante e meritato sostegno del Maestro, lo hanno portato a vincere il concorso di Ordinario di Neurologia nel 1980 e a dirigere la I Clinica Neurologica nel 1988, succedendo così al prof. Bergamini.



Negli ultimi dieci anni i multiformi interessi culturali hanno portato Bruno Bergamasco ad affrontare problematiche inerenti i disturbi del movimento ed, in particolare, le malattie extrapiramidali ed il morbo di Parkinson. Ne è nato, grazie alla collaborazione preziosa ed essenziale con i neurochirurghi ed alle capacità organizzative e di formazione degli allievi proprie di Bruno Bergamasco, un gruppo di ricerca clinica che è diventato leader in Italia ed in Europa nel porre le basi neurofisiologiche per un approccio neurochirurgico moderno alla terapia del morbo di Parkinson avanzato, mediante stimolazione cerebrale profonda.

I principali collaboratori di Bruno Bergamasco sono stati il Suo allievo diretto Prof. Leonardo Lopiano, ordinario di Neurologia, ed il prof. Michele Lanotte, associato di Neurochirurgia ed allievo nel corso degli anni dei Professori Pagni, Dalle Ore, Faccani e Ducati. Saranno proprio loro, appropriatamente, a svolgere la successiva relazione scientifica.

Il ruolo e l'importanza di questo gruppo di ricerca clinica hanno avuto pieno riconoscimento con l'elezione di Bruno Bergamasco alla Presidenza della Lega Italiana Morbo di Parkinson e Malattie Extrapiramidali nel periodo 1999-2001. Concludo con breve accenno alla figura umana di Bruno

Bergamasco. Aveva una dote rara, l'unione di autorevolezza, generosità, lealtà e grande capacità di amicizia.

L'autorevolezza l'ha dimostrata nella guida della Neurologia accademica nazionale quale Presidente del Collegio dei professori Ordinari e nella guida del Dipartimento di Neuroscienze dell'Università di Torino, ma non solo. Era la figura principale di riferimento della Neurologia Piemontese come ben sanno i tanti Neurologi che sono presenti in questa sala ed hanno voluto, e li ringrazio, partecipare con affetto alla commemorazione di questa sera.

Autorevolezza e generosità Bruno Bergamasco ha sempre dimostrato nell'aiuto intelligente, nei consigli disinteressati dei quali è sempre stato prodigo. Ne ho avuto esperienza personale diretta, ne hanno avuto esperienza quotidiana i Suoi allievi.

Infine la Sua grande capacità di affetto e di amicizia alla base della ricchezza delle sue relazioni interpersonali. Lo sa per prima la Sua famiglia da Lore sempre ricordata, Ebe che lo ha accompagnato in questi anni e nei giorni della malattia, i figli Lucy e Lucio ed i numerosi ed amatissimi nipoti. Lo sanno coloro, ed io sono fra questi, che hanno avuto il prezioso dono della Sua amicizia, lo sanno i Suoi allievi verso molti dei quali il rapporto Maestro-allievo si è arricchito e vivificato di amicizia.

Voglio concludere ricordando Bruno Bergamasco nell'ambiente che forse era da Lui il più amato ed il più sentito come genuino, vero, quello della Sua casa di campagna, la Vigna, sulle colline del Roero. Alla Vigna, circondato dalla Sua famiglia, amava ricevere con semplicità gli amici, e molti di noi, questa sera, ricordano le domeniche passate in giardino a chiacchierare. Ogni tanto il discorso si faceva più serio, esistenziale, ed emergeva allora la grande cultura umanistica e filosofica attraverso la quale Bruno sapeva andare con schiettezza alla radice dei problemi e delle vicende umane.

Così lo voglio ricordare, sereno gentiluomo di campagna del vecchio Piemonte, profondamente laico ed insieme profondamente affettivo.

Roberto Mutani

NEUROMODULAZIONE NEI DISORDINI DEL MOVIMENTO: DIECI ANNI DI ESPERIENZA A TORINO

Michele Lanotte¹, Leonardo Lopiano²

¹ Clinica Neurochirurgica

Dipartimento di Neuroscienze - Università degli Studi di Torino

² Clinica Neurologica

Dipartimento di Neuroscienze - Università degli Studi di Torino

Key words: *Deep Brain Stimulation / Stimolazione cerebrale profonda*
Movement disorders / Disordini del movimento
Parkinson disease / Malattia di Parkinson
Subthalamic nucleus / Nucleo subtalamico

Abstract:

Deep Brain Stimulation (DBS) is an established treatment for symptoms in advanced parkinsonian patients. DBS electrodes are surgically implanted into specific nuclei of the basal ganglia; wires are then tunneled underneath the skin to an implantable pulse generator that is placed in the upper chest, similar to a cardiac pacemaker.

DBS electrode implantation causes fewer permanent neurological adverse effects compared with lesioning, because much less brain tissue is destroyed. Bilateral stimulation can also be safely performed with a lower risk of cognitive adverse effects commonly seen with bilateral thalamic and pallidal lesioning. With DBS, stimulation parameters can be finely adjusted to maximize beneficial results and minimize adverse effects caused by current spread to adjacent structures. Moreover the hardware can be removed at anytime.

Targets in the motor portion of subthalamic nucleus or globus pallidus internus are currently preferred for DBS in Parkinson disease (PD). DBS of the subthalamic nucleus significantly improves motor performance, activities of daily living and quality of life in advanced PD, with sustained long-term benefits. Low incidence of permanent adverse effects is reported in literature. Cell replacement therapies are still in an experimental stage.

Riassunto:

La stimolazione cerebrale profonda (Deep Brain Stimulation, DBS) è una terapia efficace per il trattamento della fase avanzata della malattia di Parkinson (MP). La stimolazione avviene mediante un elettrodo posizionato a

permanenza nel nucleo cerebrale target, connesso ad un generatore di impulsi allocato a livello sottocutaneo in regione sottoclaveare.

La DBS presenta, rispetto alle procedure ablative stereotassiche, una serie di vantaggi: non determina una lesione a livello del parenchima cerebrale; consente un impianto bilaterale con una relativa sicurezza; è una metodica modulabile (i parametri di stimolazione possono essere modificati dopo l'intervento per migliorare l'efficacia, ridurre gli effetti collaterali, ed adattare la stimolazione al decorso della malattia), reversibile e non preclude la possibilità di un successivo impiego di terapie che richiedano l'integrità funzionale dei circuiti dei gangli della base. Il nucleo subtalamico (NST) e la parte interna del globo pallido (GPi) sono i target utilizzati per il trattamento della fase avanzata della MP.

L'efficacia della DBS del NST nel ridurre i sintomi cardinali della MP e nel migliorare la qualità di vita dei pazienti è ormai abbastanza ben definita e sembra mantenersi nel tempo.

L'incidenza di effetti collaterali è modesta.

I risultati del trapianto a livello dello striato di aggregati di cellule dopaminergiche prelevate dal globo carotideo o di cellule epiteliali pigmentate retiniche umane sono ancora preliminari.

La stimolazione cerebrale profonda (Deep Brain Stimulation, DBS) è considerata una terapia efficace per il trattamento della fase avanzata della malattia di Parkinson (MP)⁽¹⁵⁾. La tecnica fu introdotta da Benabid a Grenoble alla fine degli anni '80⁽³⁾ come alternativa alle procedure di lesione stereotassica. La DBS si basa sull'osservazione che la stimolazione elettrica ad alta frequenza è in grado di mimare l'effetto di una lesione senza distruggere il tessuto cerebrale. La stimolazione cronica avviene mediante un elettrodo posizionato a permanenza nel nucleo cerebrale target, connesso ad un generatore di impulsi allocato a livello sottocutaneo in regione sottoclaveare. I parametri di stimolazione possono essere modificati variando la configurazione degli elettrodi, l'intensità di stimolazione, la durata e la frequenza degli impulsi elettrici⁽²⁵⁾.

La DBS presenta diversi vantaggi rispetto alle procedure lesionali:

- a) consente un impianto bilaterale con una relativa sicurezza;
- b) i parametri di stimolazione possono essere modificati dopo l'intervento per migliorare l'efficacia, ridurre gli effetti collaterali ed adattare la stimolazione al decorso della malattia;
- c) è reversibile e non preclude la possibilità di un successivo impiego di terapie che richiedano l'integrità funzionale dei circuiti dei gangli della base.

I candidati alla DBS sono pazienti parkinsoniani affetti da grave tremore non responsivo alle terapie farmacologiche oppure da complicanze a lungo termine della terapia con levodopa (fluttuazioni motorie e discinesie). La stimolazione del nucleo ventrale intermedio del talamo (Vim) determina una netta riduzione del tremore agli arti controlaterali, ma non provoca un miglioramento significativo degli altri sintomi cardinali della MP. Il nucleo subtalamico (NST) e la parte interna del globo pallido (GPi) sono i target utilizzati per il trattamento della fase avanzata della MP. La stimolazione del NST è generalmente considerata più efficace rispetto alla stimolazione del GPi in quanto l'effetto anti-acinetico appare più consistente, consente la riduzione post-operatoria dei farmaci antiparkinsoniani e richiede una minore energia di stimolazione. Tuttavia, non vi sono al momento studi clinici comparativi con una potenza sufficiente tale da permettere di definire in modo conclusivo l'efficacia di un target rispetto all'altro⁽²⁾.

La stimolazione cerebrale profonda del nucleo subtalamico

Si calcola che fino al 2006 oltre 20.000 pazienti parkinsoniani siano stati trattati con la stimolazione del NST. L'efficacia della DBS del NST nel ridurre

i sintomi cardinali della MP è ormai ben definita e una recente revisione sistematica ha identificato 34 articoli pubblicati dal 1993 al 2004, in cui venivano riportati i dati di 921 pazienti⁽¹⁰⁾. La riduzione media del punteggio della Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) parte II (attività della vita quotidiana) e III (sezione motoria) nella condizione di stimolazione in assenza di terapia farmacologica (stim-on/med-off), paragonata alla condizione med-off preoperatoria, è risultata rispettivamente del 50% e del 52%. La riduzione media del dosaggio equivalente di levodopa dopo l'intervento è risultata del 55,9%, la riduzione media delle discinesie è risultata del 61,9% mentre la riduzione media del tempo trascorso in "off" è risultata del 68,2%.

Un maggior valore del punteggio UPDRS sezione III in condizioni "off" (corrispondente ad una sintomatologia più grave) ed una migliore risposta alla levodopa nella valutazione basale pre-chirurgica, sono i fattori predittivi più importanti di un miglioramento significativo dopo l'intervento. Gli Autori concludono che la DBS del NST ha sicuramente effetti positivi sui sintomi motori della MP e sulle attività della vita quotidiana dei pazienti in fase avanzata.

La DBS del NST è una terapia sintomatica che viene proposta quando il rapporto rischio/beneficio è favorevole per il paziente e quando produce un più efficace controllo dei sintomi della malattia rispetto alla miglior terapia farmacologica. Un recente studio randomizzato multicentrico ha paragonato la stimolazione del NST con la terapia medica ottimizzata per un periodo di 6 mesi⁽⁷⁾. Lo studio riguarda 156 pazienti affetti da MP in fase avanzata assegnati in modo casuale alla DBS bilaterale del NST in combinazione con la terapia medica oppure esclusivamente alla terapia medica. L'outcome primario dello studio era la modificazione della qualità della vita dopo 6 mesi. Il valore del Parkinson's Disease Questionnaire-39 (PDQ-39) risultava $41,8 \pm 13,9$ su 100 alla valutazione basale e $31,8 \pm 16,3$ dopo 6 mesi nel gruppo di pazienti sottoposti a DBS, e $40,2 \pm 14,5$ nel gruppo sottoposto a sola terapia medica. Questo corrisponde ad un miglioramento di circa il 25% nel gruppo della neurostimolazione rispetto a nessuna variazione nel gruppo trattato farmacologicamente.

Lo studio dimostra che il beneficio sintomatico della DBS è superiore ai potenziali effetti negativi della chirurgia sulla disabilità e sulla qualità della vita. È attualmente oggetto di discussione se gli effetti negativi dell'intervento rilevati in alcuni pazienti a livello delle funzioni cognitive, del tono dell'umore e delle alterazioni comportamentali siano correlati all'intervento, alla stimolazione, al decorso della malattia, alla terapia farmacologica o a possibili errori di selezione. Gli effetti avversi di tipo neuropsichiatrico sono

potenzialmente in grado di annullare i benefici motori ottenuti dalla DBS in quanto la depressione ha un impatto maggiore sulla qualità della vita di quanto non abbiano i sintomi motori stessi⁽⁵⁾. Lo studio tuttavia non ha evidenziato un aumento del rischio di complicanze cognitive o neuropsichiatriche nel gruppo sottoposto a neurostimolazione.

Due recenti ricerche confermano che il miglioramento post-operatorio è mantenuto anche a distanza di 5 anni dall'intervento^(11,27). La MP tuttavia progredisce come evidenziato dal modesto ma significativo peggioramento del punteggio motorio in fase "on", in particolare dei sintomi assiali⁽³²⁾: eloquio, freezing della marcia, instabilità posturale. Il decadimento cognitivo, l'apatia e la sindrome disesecutiva frontale rappresentano ulteriori problemi nella gestione a lungo termine dei pazienti trattati con DBS^(4,27).

Selezione dei pazienti

L'entità del miglioramento dei sintomi motori in "off" dopo somministrazione di una dose sovramassimale di levodopa è il principale fattore predittivo del beneficio motorio ottenibile con la DBS del NST. Altro importante fattore è l'età del paziente al momento dell'intervento: i pazienti oltre i 70 anni sembrano avere un maggior rischio di successivo decadimento cognitivo. Nella casistica di Russmann i sintomi assiali (deambulazione ed equilibrio) peggiorano nei pazienti anziani dopo l'intervento e sono causa di ricovero nel 25% dei casi⁽²⁶⁾.

Nella selezione è importante un'attenta valutazione neuropsicologica, psicologica ed eventualmente psichiatrica per escludere pazienti affetti da depressione, apatia, decadimento cognitivo. Queste valutazioni sono rilevanti se si considera che nel postoperatorio talvolta alcuni pazienti non sono soddisfatti, nonostante un risultato motorio ottimale e l'assenza di complicanze⁽¹⁾.

Schupbach⁽²⁸⁾ ha analizzato i fattori di stress psico-sociale dopo l'intervento in 29 pazienti i quali presentavano un netto miglioramento dei sintomi motori e della capacità di svolgere autonomamente le attività della vita quotidiana. L'adattamento sociale misurato con una apposita scala non migliorava dopo la DBS del NST: 19 pazienti esprimevano una sensazione di estraneità ed alienazione dalla propria persona con difficoltà ad adattarsi al nuovo ruolo ed a definire nuovi obiettivi per la loro vita dopo il miglioramento dei sintomi motori. Solo 9 dei 16 pazienti che ancora lavoravano prima dell'intervento ritornarono alla loro attività professionale. Cinque pazienti preferivano occuparsi di attività piacevoli invece che tornare al lavoro, mentre gli altri non si sentivano in grado di lavorare nonostante il significativo miglioramento clinico.

Lo studio dimostra che la DBS è una terapia con profondo impatto sulla vita del paziente e che è importante sviluppare programmi multidisciplinari per il suo reinserimento sociale⁽²²⁾.

Attualmente l'intervento di DBS del NST viene generalmente proposto per il trattamento della fase avanzata della MP. La bassa incidenza di complicanze e l'elevato impatto della DBS del NST sulla qualità della vita potrebbero giustificare l'intervento in uno stadio meno avanzato di malattia, per prevenire l'inevitabile declino della qualità di vita e della partecipazione sociale.

In uno studio pilota⁽²⁹⁾ sono stati randomizzati 20 pazienti con breve durata di malattia: un gruppo è stato trattato con la terapia chirurgica precoce, mentre l'altro è stato trattato con la terapia medica per un periodo di 18 mesi. La qualità della vita migliorava significativamente (24%) nel "gruppo chirurgico" mentre non variava nell'altro gruppo. Gli effetti avversi erano lievi e transitori, e la morbilità psichiatrica e l'ansia miglioravano nei pazienti operati.

Questo studio pilota eseguito su una casistica limitata suggerisce che la DBS potrebbe essere presa in considerazione, in pazienti selezionati, alla fine del periodo di "luna di miele" della terapia farmacologica, quando le prime complicanze motorie cominciano a manifestarsi.

Altri target per il trattamento della MP?

Le attuali conoscenze della MP riconoscono l'anomalo incremento di attività neuronale del NST con conseguente inibizione dei circuiti motori talamo-corticali da parte del GPi⁽⁶⁾. La stimolazione ad alta frequenza del NST o del GPi è efficace poichè riduce l'inibizione da parte dei nuclei della base del talamo ventro-laterale e delle sue aree di proiezione corticale⁽¹⁴⁾. Recentemente è stato ipotizzato un ruolo importante del nucleo peduncolopontino (PPN) nella fisiopatologia dei sintomi motori della MP, in particolare dell'acinesia, dei disturbi della deambulazione e dell'instabilità posturale. Il PPN appartiene alla sostanza reticolare mesencefalica implicata nella locomozione e presenta numerose connessioni con i gangli della base e con altre regioni pontine e bulbari⁽²⁰⁾. Due recenti studi^(16,23) hanno dimostrato la possibilità di eseguire la DBS a livello del PPN nei pazienti affetti da MP. Il target è situato lateralmente alla decussazione del peduncolo cerebellare superiore a livello del collicolo inferiore. La stimolazione a bassa frequenza del PPN determina un miglioramento pari al 57% dei sintomi motori della MP⁽²³⁾; tuttavia, una valutazione comparativa in cieco tra stimolazione del PPN e del NST in 6 pazienti con elettrodi posizionati in entrambi i targets⁽³⁰⁾ ha dimostrato che la stimolazione del solo PPN è significativamente meno efficace della DBS

del NST (32% rispetto a 54% di miglioramento dei sintomi motori). La stimolazione combinata di PPN e NST non migliorava il punteggio globale, ma produceva un significativo effetto additivo sull'equilibrio e sulla marcia, con un miglioramento delle attività della vita quotidiana. Questi risultati incoraggianti suggeriscono la necessità di uno studio con follow-up più lungo e numeri più ampi per dimostrare se la stimolazione combinata NST-PPN possa davvero controllare i sintomi assiali resistenti al trattamento con levodopa e la loro eventuale progressione.

Uno studio recente suggerisce che la zona rostrale della zona incerta possa essere un target migliore del NST per i sintomi cardinali della MP⁽²⁴⁾. L'area della regione subtalamica dorsomediale rispetto al NST contiene le fibre pallidofugali e la zona incerta, le cui funzioni nell'ambito dei circuiti dei gangli della base e talamo-corticali non sono ancora ben definite⁽¹³⁾.

Oltre la DBS

Due studi controllati hanno dimostrato la scarsa efficacia dei trapianti di cellule mesencefaliche fetali rispetto ad un gruppo di controllo^(8,19).

Recentemente due studi pilota hanno valutato l'efficacia del trapianto di altri tipi cellulari. L'autotrapianto a livello dello striato di aggregati di cellule dopaminergiche prelevate dal glomo carotideo ha prodotto un modesto beneficio clinico (23% di riduzione del punteggio motorio dopo 6 mesi) in 13 pazienti affetti da MP in fase avanzata. Nessuno dei pazienti ha tuttavia sviluppato discinesie in fase "off"⁽¹⁸⁾. È stato iniziato uno studio in doppio cieco multicentrico per valutare l'efficacia del trapianto intraputaminale di cellule epiteliali pigmentate retiniche umane. Tali cellule producono levodopa, possono essere isolate post-mortem dai tessuti dell'occhio umano e successivamente essere trapiantate a livello cerebrale⁽³¹⁾.

Nonostante i risultati favorevoli della somministrazione intraputaminale di fattore neurotrofico derivato da cellule gliali (GDNF) in studi in aperto^(9,21), un recente studio controllato randomizzato⁽¹²⁾ non è riuscito a dimostrare la superiorità dell'infusione di GDNF rispetto al placebo in 34 pazienti affetti da MP. Appare pertanto necessario eseguire studi controllati con placebo per valutare l'efficacia di terapie chirurgiche per il trattamento della MP. L'entità dell'effetto placebo nelle procedure invasive per la terapia della MP non deve essere sottostimata in quanto è in grado di influenzare il giudizio dei pazienti e le valutazioni dei medici⁽¹⁷⁾.

BIBLIOGRAFIA

1. Agid Y., Schupbach M., Gargiulo M., Mallet L., Houeto J.L., Behar C., Maltete D., Mesnage V., Welke M.L.: *Neurosurgery in Parkinson's disease: the doctor is happy, the patient less so?* J. Neural. Transm. Suppl. 70, 409-414, 2006.
2. Anderson V.C., Burchiel K.J., Hogarth P., Favre J., Hammerstad J.P.: *Pallidal vs subthalamic nucleus deep brain stimulation in Parkinson disease.* Arch. Neurol. 62, 554-560, 2005.
3. Benabid A.L., Pollak P., Seigneuret E., Hoffmann D., Gay E., Perret J.: *Chronic VIM thalamic stimulation in Parkinson's disease, essential tremor and extra-pyramidal dyskinesias.* Acta Neurochir. Suppl. (Wien) 58, 39-44, 1993.
4. Castelli L., Lanotte M., Zibetti M., Caglio M., Rizzi L., Ducati A., Bergamasco B., Lopiano L.: *Apathy and verbal fluency in STN-stimulated PD patients. An observational follow-up study.* J. Neurol. 254, 1238-1243, 2007.
5. Committee GPsDSS: *Factors impacting on quality of life in Parkinson's disease: results from an international survey.* Mov. Disord. 17, 60-67, 2002.
6. DeLong M.R.: *Primate models of movement disorders of basal ganglia origin.* Trends Neurosci. 13, 281-285, 1990.
7. Deuschl G., Schade-Brittinger C., Krack P., Volkmann J., Schafer H., Botzel K., Daniels C., Deutschlander A., Dillmann U., Eisner W., Gruber D., Hamel W., Herzog J., Hilker R., Klebe S., Kloss M., Koy J., Krause M., Kupsch A., Lorenz D., Lorenzl S., Mehdorn H.M., Moringlane J.R., Oertel W., Pinsker M.O., Reichmann H., Reuss A., Schneider G.H., Schnitzler A., Steude U., Sturm V., Timmermann L., Tronnier V., Trottenberg T., Wojtecki L., Wolf E., Poewe W., Voges J., *German Parkinson Study Group, Neurostimulation Section.* N. Engl. J. Med. 355, 896-908, 2006.
8. Freed C.R., Greene P.E., Breeze R.E., Tsai W.Y., DuMouchel W., Kao R., Dillon S., Winfield H., Culver S., Trojanowski J.Q., Eidelberg D., Fahn S.: *Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease.* N. Engl. J. Med. 344, 710-719, 2001.
9. Gill S.S., Patel N.K., Hotton G.R., O'Sullivan K., McCarter R., Bunnage M., Brooks D.J., Svendsen C.N., Heywood P.: *Direct brain infusion of glial cell line derived neurotrophic factor in Parkinson disease.* Nat. Med. 9, 589-595, 2003.
10. Kleiner-Fisman G., Herzog J., Fisman D.N., Tamma F., Lyons K.E., Pahwa R., Lang A.E., Deuschl G.: *Subthalamic nucleus deep brain stimulation: summary and meta-analysis of outcomes.* Mov. Disord. 21 (Suppl 14), S290-S304, 2006.
11. Krack P., Batir A., Van Blercom N., Chabardes S., Fraix V., Ardouin C., Koudsie A., Limousin P.D., Benazzouz A., LeBas J.F., Benabid A.L., Pollak P.: *Five-year follow-up of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease.* N. Engl. J. Med. 349, 1925-1934, 2003.
12. Lang A.E., Gill S., Patel N.K., Lozano A., Nutt J.G., Penn R., Brooks D.J., Hotton G., Moro E., Heywood P., Brodsky M.A., Burchiel K., Kelly P., Dalvi A., Scott B., Stacy M., Turner D., Wooten V.G., Elias W.J., Laws E.R., Dhawan V., Stoessl A.J., Matcham J., Coffey R.J., Traub M.: *Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease.* Ann. Neurol. 59, 459-466, 2006.
13. Lanotte M., Rizzone M., Bergamasco B., Faccani G., Melcarne A., Lopiano L.: *Deep Brain Stimulation of the subthalamic nucleus: anatomical, neurophysiological, and outcome correlations with the effects of stimulation.* J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 72, 53-58, 2002.

14. Limousin P, Greene J, Pollak P, Rothwell J, Benabid A.L., Frackowiak R.: *Changes in cerebral activity pattern due to subthalamic nucleus or internal pallidum stimulation in Parkinson's disease*. Ann. Neurol. 42, 283-291, 1997.
15. Lopiano L., Rizzone M., Bergamasco B., Tavella A., Torre E., Perozzo P, Valentini M.C., Lanotte M.: *Deep Brain Stimulation of the subthalamic nucleus: clinical effectiveness and safety*. Neurology 56, 552-554, 2001.
16. Mazzone P, Lozano A., Stanzione P, Galati S., Scarnati E., Peppe A., Stefani A.: *Implantation of human pedunculopontine nucleus: a safe and clinically relevant target in Parkinson's disease*. Neuroreport 16, 1877-1881, 2005.
17. McRae C., Cherin E., Yamazaki T.G., Diem G., Vo A.H., Russell D., Ellgring J.H, Fahn S., Greene P., Dillon S., Winfield H., Bjugstad K.B., Freed C.R.: *Effects of perceived treatment on quality of life and medical outcomes in a double-blind placebo surgery trial*. Arch. Gen. Psychiatry 61, 412-420, 2004.
18. Mínguez-Castellanos A., Escamilla-Sevilla F., Hotton G.R., Toledo-Aral J.J., Ortega-Moreno A., Méndez-Ferrer S., Martín-Linares J.M., Katati M.J., Mir P, Villadiego J, Meersmans M., Pérez-García M., Brooks D.J., Arjona V, Lopez-Barneo J.: *Carotid body autotransplantation in Parkinson disease: a clinical and PET study*. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 78, 825-831, 2007.
19. Olanow C.W., Goetz C.G., Kordower J.H., Stoessl A.J., Sossi V, Brin M.F., Shannon K.M., Nauert G.M., Perl D.P., Godbold J., Freeman T.B.: *A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease*. Ann. Neurol. 54, 403-414, 2003.
20. Pahapill P.A., Lozano A.M.: *The pedunculopontine nucleus and Parkinson's disease*. Brain 123, 1767-1783, 2000.
21. Patel N.K., Bunnage M., Plaha P, Svendsen C.N., Heywood P, Gill S.S.: *Intrapatamenal infusion of glial cell line derived neurotrophic factor in PD: a two-year outcome study*. Ann. Neurol. 57, 298-302, 2005.
22. Perozzo P, Rizzone M., Bergamasco B., Castelli L., Lanotte M., Tavella A., Torre E., Lopiano L.: *Deep Brain Stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease: comparison of pre- and postoperative neuropsychological evaluation*. J. Neurol. Sci. 192, 9-15, 2001.
23. Plaha P, Gill S.S.: *Bilateral deep brain stimulation of the pedunculopontine nucleus for Parkinson's disease*. Neuroreport 16, 1883-1887, 2005.
24. Plaha P, Ben-Shlomo Y., Patel N.K., Gill S.S.: *Stimulation of the caudal zona incerta is superior to stimulation of the subthalamic nucleus in improving contralateral parkinsonism*. Brain 129, 1732-1747, 2006.
25. Rizzone M., Lanotte M., Bergamasco B., Tavella A., Torre E., Faccani G., Melcarne A., Lopiano L.: *Deep Brain Stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease: effects of variation in stimulation parameters*. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 71, 215-219, 2001.
26. Russmann H., Ghika J, Villemure J.G., Robert B., Bogousslavsky J., Burkhard P.R., Vingerhoets F.J.: *Subthalamic nucleus deep brain stimulation in Parkinson disease patients over age 70 years*. Neurology 63, 1952-1954, 2004.
27. Schupbach W.M., Chastan N., Welter M.L., Houeto J.L., Mesnage V, Bonnet A.M., Czernecki V, Maltete D., Hartmann A., Mallet L., Pidoux B., Dormont D., Navarro S., Cornu P, Mallet

- A., Agid Y.: *Stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease: a 5 year follow up*. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 76, 1640-1644 2005.
28. Schupbach M., Gargiulo M., Welter M.L., Mallet L., Béhar C., Houeto J.L., Maltete D., Mesnage V., Agid Y.: *Neurosurgery in Parkinson disease: a distressed mind in a repaired body?* Neurology 66, 1811-1816, 2006.
29. Schupbach W.M., Maltete D., Houeto J.L., du Montcel S.T., Mallet L., Welter M.L., Gargiulo M., Béhar C., Bonnet A.M., Czernecki V., Pidoux B., Navarro S., Dormont D., Cornu P., Agid Y.: *Neurosurgery at an earlier stage of Parkinson disease: a randomized, controlled trial*. Neurology 68, 267-271, 2007.
30. Stefani A., Lozano A.M., Peppe A., Stanzione P., Galati S., Tropepi D., Pierantozzi M., Brusa L., Scarnati E., Mazzone P.: *Bilateral deep brain stimulation of the pedunculopontine and subthalamic nuclei in severe Parkinson's disease*. Brain 130, 1596-1607, 2007.
31. Stover N.P., Bakay R.A., Subramanian T., Raiser C.D., Cornfeldt M.L., Schweikert A.W., Allen R.C., Watts R.L.: *Intrastriatal implantation of human retinal pigment epithelial cells attached to microcarriers in advanced Parkinson disease*. Arch. Neurol. 62, 1833-1837, 2005.
32. Zibetti M., Torre E., Cinquepalmi A., Rosso M., Ducati A., Bergamasco B., Lanotte M., Lopiano L.: *Motor and non-motor symptom follow-up in parkinsonian patients after Deep Brain Stimulation of the subthalamic nucleus*. Eur. Neurol. 58, 218-223, 2007.

MODALITÀ DI TRASMISSIONE DEI SEGNALI MECCANICI E METABOLICI TRA LE CELLULE OSSEE

Gastone Marotti

Dipartimento di Anatomia e Istologia
Policlinico - Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia

Key words: *Osteogenic cells / Cellule osteogeniche*
 Growth factors / Fattori di crescita
 Cytokines / Citochine
 Mechanical stress / Sollecitazioni meccaniche

Abstract:

As appears from the literature, the majority of bone researchers consider osteoblasts and osteoclasts the only very important bony cells. In the present report we provide evidence, based on personal morphofunctional investigations, that such a view is incorrect and misleading. Indeed osteoblasts and osteoclasts undoubtedly are the only bone forming and bone reabsorbing cells, but they are transient cells, thus they cannot be the first to be involved in sensing both mechanical and non-mechanical agents which control bone modeling and remodeling processes. Briefly, according to our view, osteoblasts and osteoclasts represent the *arms of a worker*; the actual *operation center* is constituted by the cells of the osteogenic lineage in the resting state. Such a resting phase is characterized by osteocytes, bone lining cells and stromal cells, all connected in a functional syncytium by gap junctions, which extends from the bone to the vessels. We named this syncytium the *Bone Basic Cellular System (BBCS)*, because it represents the only permanent cellular background capable first of sensing mechanical strains and biochemical factors and then of triggering and driving both processes of bone formation and bone resorption. As shown by our studies, signalling throughout *BBCS* can occur by *volume transmission (VT)* and/or *wiring transmission (WT)*. *VT* corresponds to the routes followed by soluble substances (hormones, cytokines etc.), whereas *WT* represents the diffusion of ionic currents along the cytoplasmic processes in a neuron-like manner. It is likely that non-mechanical agents first affect stromal cells and diffuse by *VT* to reach the other cells of *BBCS*, whereas mechanical agents are first sensed by osteocytes and then issued throughout *BBCS* by *WT*.

Riassunto:

Risulta dalla letteratura che la maggior parte dei ricercatori ritiene che gli osteoblasti e gli osteoclasti siano le più importanti cellule ossee. In questa relazione si forniranno prove, basate su indagini morfofunzionali personali, che questa veduta è fuorviante. Invero gli osteoblasti e gli osteoclasti sono le sole cellule ossee che depongono e, rispettivamente, riassorbono l'osso; ma va rilevato che sono cellule transitorie e, pertanto, non possono essere le prime a percepire gli agenti meccanici e non-meccanici che controllano i processi di modellamento e rimodellamento dell'osso. In sintesi, secondo la nostra veduta, gli osteoblasti e gli osteoclasti rappresentano le *braccia di un lavoratore*, il vero *centro operativo* è costituito dalle cellule della linea osteogenica nella fase di riposo. Questa fase è caratterizzata dagli osteociti, dalle cellule di rivestimento e dalle cellule stromali, tutte collegate tra loro in un sincizio funzionale. Tale sistema sinciziale si estende ininterrottamente dagli osteociti fino all'endotelio, passando attraverso le cellule di rivestimento e le cellule stromali. Questo sincizio è stato da noi denominato il *Sistema Cellulare Osseo di Base (Bone Basic Cellular System-BBCS)*, dal momento che costituisce l'unico substrato cellulare permanente capace di percepire sia le deformazioni meccaniche sia i fattori biochimici e, quindi, attivare e modulare entrambi i processi di deposizione e di riassorbimento osseo. Come dimostrato dai nostri studi, la trasmissione dei segnali attraverso il *BBCS* può avvenire mediante *trasmissione per diffusione (volume transmission-VT)* e/o *trasmissione per contatto (wiring transmission-WT)*. La *VT* corrisponde alla via seguita dalle sostanze solubili (ormoni, citochine ecc.), mentre la *WT* rappresenta la propagazione di correnti ioniche lungo i processi citoplasmatici in modo similneuronale. È assai probabile che gli agenti non-meccanici agiscano prima sulle cellule stromali e si diffondano per *VT* alle altre cellule del *BBCS*, mentre gli agenti meccanici siano dapprima percepiti dagli osteociti e si propagano attraverso il *BBCS* per *WT*.

INTRODUZIONE

È noto che le cellule ossee sotto il controllo di una costellazione di agenti meccanici (*peso corporeo, forza di gravità, tono e forza muscolare*) e di fattori umorali (*ormoni, vitamine, citochine, fattori di crescita*) regolano l'omeostasi ossea e partecipano al mantenimento dell'omeostasi fosfocalcica, mediante tre processi: accrescimento, modellamento e rimodellamento osseo.

L'accrescimento e il modellamento osseo sono esclusivamente devoluti alla regolazione dell'omeostasi ossea, vale a dire all'adeguamento della forma e della massa dei segmenti scheletrici alle esigenze meccaniche attuali. Il rimodellamento osseo partecipa alla regolazione sia dell'omeostasi ossea sia dell'omeostasi scheletrica, migliorando la struttura microscopica dell'osso in risposta alle esigenze meccaniche e, rispettivamente, liberando ioni calcio e fosfato durante la fase di riassorbimento della matrice ossea.

La teoria del "meccanostato", proposta da Frost^(3,4) alcuni anni fa, ha alquanto razionalizzato i processi di modellamento e rimodellamento osseo e che cosa comportano nei segmenti scheletrici a livello macroscopico. Tuttavia i fenomeni che si attuano a livello cellulare sono tuttora assai sconosciuti. Non si sa, per esempio:

- a) come gli agenti meccanici e i fattori umorali interagiscono sull'attività delle cellule ossee;
- b) quale sia il meccanismo di trasduzione delle deformazioni meccaniche in segnali biologici; a questo riguardo la letteratura recente attribuisce all'osteocita la funzione di sensore meccanico ma, come si discuterà appresso, tutte le cellule del sistema osteogenico risultano verosimilmente affette dalle deformazioni che l'osso subisce in relazione al carico meccanico;
- c) in quale modo gli osteociti trasmettono gli stimoli meccanici alle altre cellule ossee e come interagiscono con queste.

Nel tentativo di contribuire a risolvere queste problematiche stiamo conducendo, da oltre un trentennio, una serie di indagini morfofunzionali sulle cellule della linea osteogenica. Qui di seguito riassumerò i principali risultati ottenuti e ne discuterò il possibile significato funzionale.

Le cellule della linea osteogenica: aspetti morfologici e funzionali

Nei primi anni 70, abbiamo dimostrato che la diminuzione esponenziale della velocità di apposizione ossea, riscontrata con la triplice marcatura con fluorocromi durante la costruzione degli osteoni^(8,9,11) dipende dalla riduzione

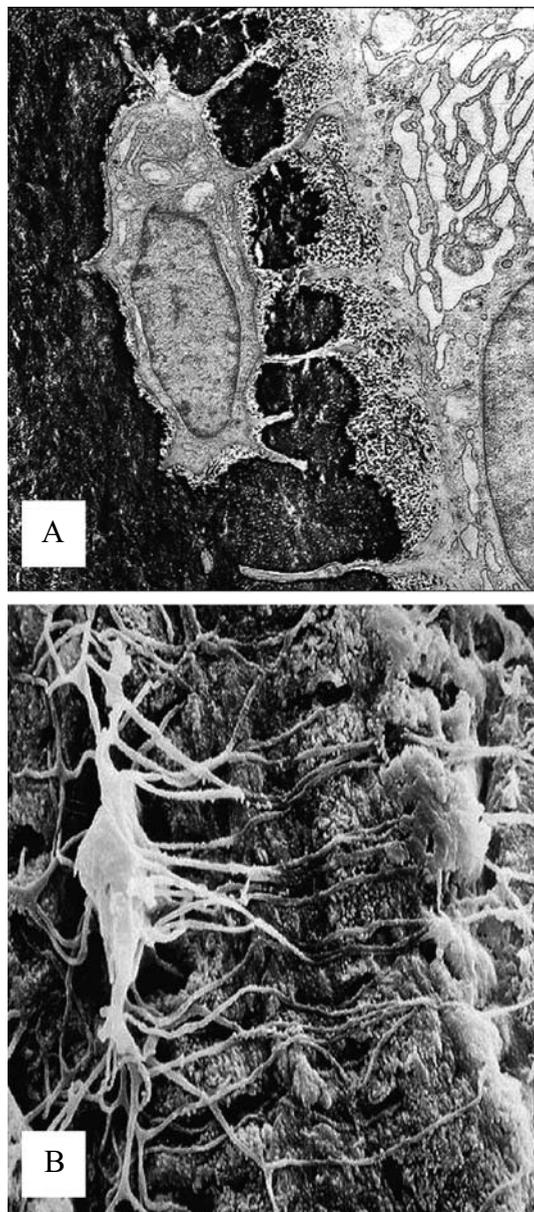


Figura 1. Microfotografie elettroniche a trasmissione TEM (A=9.000x) e a scansione SEM (B=3.000x) che dimostrano l'asimmetria dell'arborizzazione dendritica dell'osteocita. I dendriti vascolari che si irradiano verso la superficie dell'osso (a destra) sono più numerosi e più lunghi dei dendriti minerali diretti verso il versante opposto. In A, è parzialmente visibile un osteoblasta contattato dai dendriti vascolari dell'osteocita.

della dimensione degli osteoblasti e dal loro progressivo appiattimento. All'inizio della formazione dell'osteone, quando la velocità è elevata, gli osteoblasti sono voluminosi e prismatici, mentre alla fine, quando la velocità è bassa, essi divengono piccoli e piatti⁽⁹⁾.

Dal momento che questi fatti vennero riscontrati anche nell'osso trabecolare, se ne concluse che la velocità alla quale l'osso viene depositato dipende dal rapporto tra *volume* degli osteoblasti e loro *territorio di secrezione*⁽⁹⁾.

Durante l'edificazione dell'osteone, riscontrammo che anche gli osteociti diminuiscono di taglia parallelamente al decremento della dimensione degli osteoblasti e alla riduzione della velocità di apposizione ossea. Ne discende che la dimensione degli osteociti dipende da quella degli osteoblasti dai quali si differenziano⁽⁹⁾. Il significato funzionale di questo fatto è tuttora da stabilire. Tuttavia abbiamo riscontrato, in osteoni umani, che la diminuzione della taglia degli osteociti dalla linea cementante verso il canale haversiano è seguita da un assottigliamento delle *lamelle lasse* (dove si situano gli osteociti) e, conseguentemente, da una diminuzione della distanza tra le *lamelle dense* (prive di osteociti), il cui spessore non varia significativamente nell'ambito della parete osteonica. Dal punto di vista meccanico, questo fatto comporta un aumento delle fibre collagene lungo la superficie del canale haversiano, dove il carico meccanico raggiunge i valori più elevati⁽¹⁾.

In anni più recenti, abbiamo dimostrato con la microscopia elettronica a trasmissione (TEM) e a scansione (SEM) che l'arborizzazione degli osteociti è fortemente asimmetrica per quanto attiene sia al numero che alla lunghezza dei processi citoplasmatici (Figura 1). I *dendriti vascolari* (quelli diretti verso le superfici vascolari dell'osso) sono più numerosi⁽¹⁵⁾ e molto più lunghi dei *dendriti minerali* (quelli che si irradiano verso la superficie opposta)^(18,20,21). Gli osteociti sono, dunque, cellule morfologicamente polarizzate verso le superfici dell'osso dove vengono in contatto con gli osteoblasti o le cellule di rivestimento (le cosiddette *bone lining cells* che tappezzano le superfici inattive dell'osso), a seconda che la superficie ossea sia in accrescimento oppure in riposo.

Risultò, inoltre, che il numero di dendriti vascolari in contatto con ciascun osteoblasta è inversamente proporzionale alla taglia dell'osteoblasta, cioè alla sua attività osteoproduttiva. Questo fatto ci ha indotto a ipotizzare un possibile effetto inibitore degli osteociti sugli osteoblasti⁽¹²⁾.

In una successiva serie di indagini al TEM, abbiamo osservato che anche le cellule stromali associate all'osso sono elementi dendritici, i quali costituiscono una rete citoplasmatica continua che dalle cellule endoteliali si estende fino alle cellule di rivestimento o agli osteoblasti (Figura 2)⁽¹⁷⁾. Dal momento che

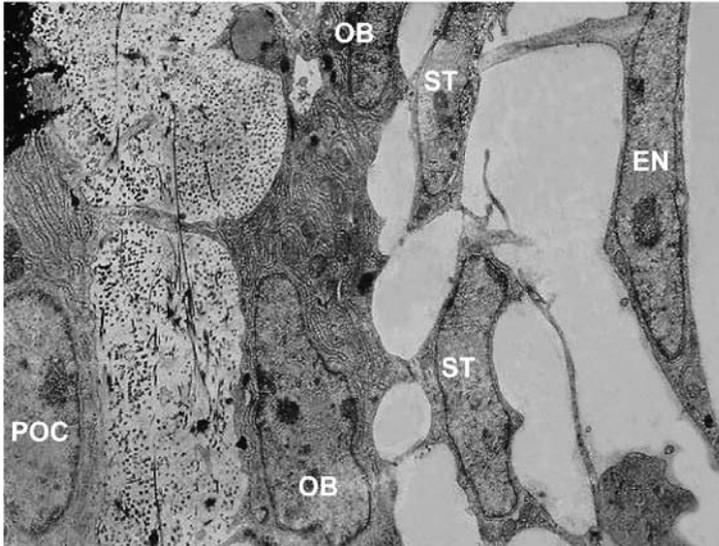


Figura 2. Si dimostra la rete citoplasmatica continua costituita dalle cellule della linea osteogenica (POC = osteocita, OB = osteoblasti, ST = cellule stromali, EN = cellula endoteliale). Trattasi di una superficie ossea in corso di deposizione, per cui nella rete sono compresi degli osteoblasti anziché le cellule di rivestimento. (TEM 16,500x).

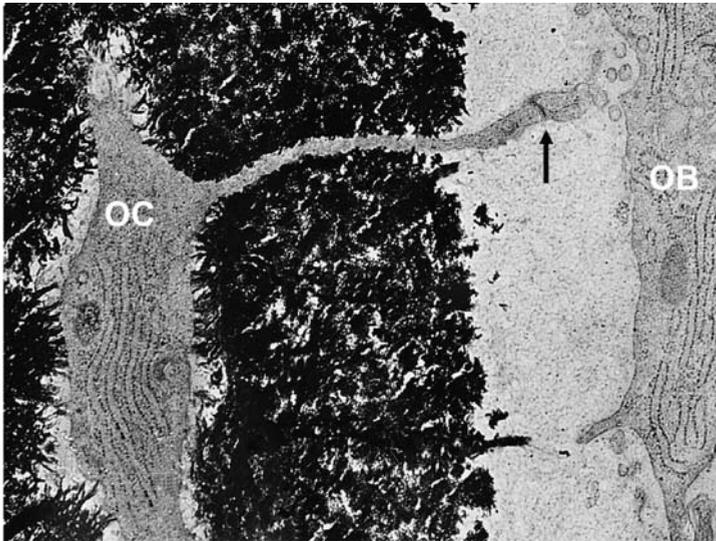


Figura 3. Si dimostra il dendrite vascolare di un osteocita (OC) in contatto, tramite una gap junction (freccia), con un breve processo citoplasmatico di un osteoblasta (OB). (TEM 20.000x).

giunzioni cellulari tipo “gap” (attualmente ritenute sinapsi elettriche, quando attive) sono state riscontrate tra tutte le cellule della linea osteogenica, appare assai verosimile che esse siano collegate tra loro in un sincizio funzionale (Figura 3).

Sulla base di questi dati morfologici, abbiamo postulato che la trasmissione dei segnali tra le cellule del sistema osteogenico possa attuarsi mediante due meccanismi: *trasmissione per diffusione* (*volume transmission, VT*) di sostanze solubili nel volume del liquido interstiziale extra- e intra-osseo e *trasmissione per contatto* (*wiring transmission, WT*) attraverso le *gap junctions*.

I termini *WT* e *VT* sono stati recentemente usati per definire i due tipi di trasmissione di segnali nel sistema nervoso centrale: la *WT* avviene tramite le sinapsi della rete neuronale, mentre la *VT* si attua per diffusione nei liquidi encefalici di neuropeptidi, neurotrasmettitori, ormoni.

Il concetto di *trasmissione per diffusione* (*VT*) non è nuovo nell’osso, dato che corrisponde alle ben note vie endocrina, paracrina e autocrina con cui ormoni, vitamine, citochine e fattori di crescita raggiungono le cellule ossee. La novità della nostra ipotesi consiste nell’aver posto in evidenza che le cellule del sistema osteogenico potrebbero comunicare reciprocamente e modulare la propria attività anche mediante *trasmissione per contatto* (*WT*) in modo simil-neuronale^(10,13,14). Invero esistono alcune somiglianze tra osteociti e neuroni: i prolungamenti minerali degli osteociti rassomigliano ai dendriti dei neuroni, essendo brevi, grossi e con organuli, mentre i prolungamenti vascolari osteocitari sono più lunghi, sottili e non contengono organuli, come gli assoni. È stato inoltre osservato che gli osteociti producono tipici neurotrasmettitori come il glutammato⁽²⁴⁾ e l’ossido nitrico⁽²⁵⁾.

Le due modalità di trasmissione, *VT* e *WT*, benché funzionalmente diverse sono altamente complementari. La *VT* dovrebbe ovviamente coinvolgere estese regioni dello scheletro, o persino tutto lo scheletro, in relazione a fattori umorali che regolano il metabolismo minerale. La *WT* parrebbe più partecipare alla modulazione locale delle cellule ossee, verosimilmente in relazione a stimoli di natura soprattutto meccanica.

Desidero sottolineare che la *WT* è ormai qualcosa di più di una semplice ipotesi di lavoro; recentemente, infatti, abbiamo dimostrato che essa realmente si attua lungo la rete citoplasmatica osteocitaria nell’osso corticale di rana⁽²³⁾ e di ratto⁽²²⁾.

Ossa metatarsali dei succitati animali, collocate in una camera sperimentale, in condizioni *ex vivo*, vennero sottoposte mediante uno stimolatore meccanico a carichi assiali pulsanti variando i parametri di sollecitazione: carico e frequenza. Un foro di 200 μm venne in precedenza praticato attraverso la

corticale dei metatarsi saggiati, e le correnti ioniche che attraversavano il foro furono misurate con una sonda vibrante bidimensionale.

Risultò. *Prima del carico*: si registrò un segnale di 15.5 ± 4.6 micronA/cm² per l'osso vivo, nessun segnale per l'osso morto (cioè con osteociti morti).

Dopo un carico di 5g at 1Herz:

- a) l'osso morto, pure, emette una corrente ionica, ma l'osso vivo emette una corrente 4 volte più elevata;
- b) lo schema temporale di decadimento della corrente nell'osso morto tende linearmente a 0 entro 70'; nell'osso vivo decresce esponenzialmente raggiungendo i valori basali entro 15' ma, dopo, persiste costante nel tempo.

Aumentando il carico da 0.7 a 12g, lasciando fissa la frequenza a 1Hz, la corrente aumenta con l'aumentare dei carichi solo fino a 8g, pur tuttavia con carichi superiori agli 8g la corrente persiste più a lungo nel tempo. Aumentando la frequenza da statica a 2Hz, con carico fissato a 5g, si sono riscontrati gli stessi risultati ottenuti aumentando i carichi a frequenza costante. Il carico statico non induce alcuna corrente. In sintesi, questi dati indicano che:

- 1) le deformazioni dell'osso generano nel sistema lacuno-canalicolare osteocitario un potenziale di flusso ionico che attiva gli osteociti i quali, a loro volta, aumentano e mantengono costante la corrente basale;
- 2) gli osteociti sono capaci di sommare la quantità di energia che ricevono.

Il fatto che l'effetto prodotto sulla corrente basale dagli osteociti sia persistente nel tempo suggerisce l'ipotesi che, sotto carichi pulsanti fisiologici, essi possano svolgere *in vivo* un'attività inibitrice sulle altre cellule del sistema osteogenico e, conseguentemente, sul rimodellamento osseo. Sarebbe, infatti, un non-senso biologico ritenere che uno stimolo persistente svolgesse un'azione attivante.

DISCUSSIONE

Le nostre indagini morfologiche hanno dimostrato che il sistema cellulare osteogenico (cellule stromali, osteoblasti o cellule di rivestimento, osteociti) costituiscono un sincizio funzionale i cui elementi di forma diversa giocano ruoli diversi e contraggono rapporti differenti con il microambiente circostante. La rete citoplasmatica, costituita dalle cellule stromali di forma stellata, è immersa nel liquido interstiziale (LEC) e si estende dall'endotelio vascolare fino alle cellule che tappezzano la superficie ossea: osteoblasti o cellule di rivestimento. Gli osteociti presentano un'arborizzazione dendritica fortemente

asimmetrica, polarizzata verso gli osteoblasti o le cellule di rivestimento, e sono contenuti all'interno di microcavità ossee (lacune, canalicoli) dove circolano i liquidi del compartimento fluido dell'osso, i quali hanno una composizione diversa dal LEC in cui sono immerse le cellule stromali. Gli osteoblasti e le cellule di rivestimento formano lamine cellulari (Figura 4) interposte tra due reti di dendriti: dal versante vascolare vengono in contatto con i processi delle cellule stromali, mentre, dal versante osseo, sono in contatto con i dendriti vascolari degli osteociti. Osteoblasti e cellule di rivestimento, inoltre, separano il compartimento fluido dell'osso dal LEC perivascolare.

A nostro avviso, uno dei più grossi errori commessi dalla maggior parte dei ricercatori, particolarmente dai biologi molecolari, è stato quello di considerare l'osso solo nelle fasi attive di formazione e/o di riassorbimento, per cui l'attenzione delle loro ricerche è stata rivolta quasi esclusivamente agli osteoblasti e agli osteoclasti. Si deve, tuttavia, avere ben presente che gli osteoblasti e gli osteoclasti sono cellule transitorie; essi costituiscono le *braccia di un lavoratore*. Se si intende scoprire qual è il *centro operativo*, per comprendere come i processi di deposizione e di riassorbimento osseo sono attivati e modulati, si devono focalizzare le ricerche sui fenomeni che avvengono nel sistema cellulare osseo a partire dalla fase di riposo.



Figura 4. Microfotografia elettronica a scansione (SEM = 325x) che dimostra una trabecola ossea completamente tappezzata da una lamina di cellule di rivestimento (bone lining cells).

Secondo le nostre indagini morfologiche, la fase di riposo è caratterizzata dagli osteociti, dalle cellule di rivestimento e dalle cellule stromali, tutto collegate in un sincizio funzionale, che si estende dall'osso alle cellule endoteliali. Questo sincizio è stato da noi denominato il *Sistema Cellulare Osseo di Base* (*Bone Basic Cellular System-BBCS*), dal momento che costituisce l'unico substrato cellulare permanente capace di percepire sia le deformazioni meccaniche sia i fattori biochimici e, quindi, attivare e modulare entrambi i processi di deposizione e di riassorbimento osseo, cioè la differenziazione e l'attività degli osteoblasti e degli osteoclasti (Figura 5). È verosimile che gli agenti meccanici siano dapprima percepiti dagli osteociti e, in seconda istanza, probabilmente anche dalle altre cellule del sistema osteogenico, mentre gli agenti non-meccanici dovrebbero prima agire sulle cellule stromali e, quindi,

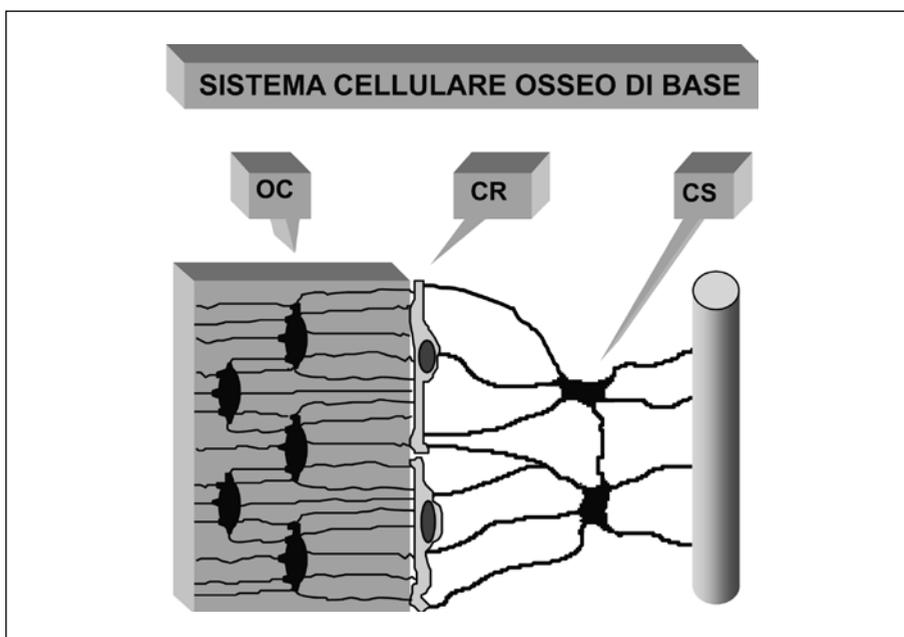


Figura 5. Disegno schematico del sistema cellulare osteogenico nella fase di riposo (*Sistema Cellulare Osseo di Base* – *Bone Basic Cellular System-BBCS*). Da sinistra a destra sono raffigurati gli osteociti (OC), le cellule di rivestimento delle superfici inattive dell'osso o bone lining cells (CR), le cellule stromali (CS) e un capillare sanguigno. Si ritiene che questa rete di cellule, congiunte tra di loro da sinapsi elettriche (gap junctions), sia in grado di percepire gli stimoli sia meccanici che metabolici e, in relazione a questi, di avviare mediante trasmissione per contatto (wiring transmission) e/o per diffusione (volume transmission) i processi di deposizione e di riassorbimento osseo.

diffondere nel volume dei fluidi per raggiungere le cellule di rivestimento e infine gli osteociti attraverso il loro sistema lacuno-canalicolare. I seguenti fatti sostengono la nostra veduta che il BBCS costituisce il “Centro Operativo dell’Osso”:

- a) il sovraccarico e lo scarico meccanico dei segmenti scheletrici inducono aumento e, rispettivamente, diminuzione della massa ossea anche nello scheletro adulto, nel quale gli osteoblasti e gli osteoclasti sono presenti in scarsa quantità o addirittura assenti, mentre è sicuramente presente il BBCS, il che suggerisce che è l’unico che possa intervenire nell’attivare sia la formazione che il riassorbimento osseo;
- b) il riassorbimento osseo venne riscontrato in regioni meno soggette al carico meccanico nelle osteoporosi biochimiche^(2,7), mentre nelle osteoporosi da disuso si distribuisce uniformemente nei segmenti scheletrici^(2,6), il che indica che l’azione degli osteoclasti è attivata e guidata da segnali locali che non possono che essere emessi dal BBCS.

Per quanto attiene agli osteoclasti, essi sono cellule libere che non entrano mai nella costituzione della rete cellulare osteogenica; al contrario, appare verosimile che essi dovrebbero distruggere le cellule stromali e le cellule di rivestimento, prima di riassorbire la matrice ossea e gli osteociti. Pertanto, in senso stretto, gli osteoclasti non appartengono alle cellule ossee. Essi appaiono, invece, *lavoratori* specializzati nella distruzione dell’osso e, quando la loro attività viene richiesta, il BBCS non solo ne induce la differenziazione, probabilmente mediante la secrezione di specifiche citochine (RANKL) ma li guida anche nella sede dove devono lavorare e per quanto tempo devono anche lavorare⁽¹⁹⁾. Gli osteoclasti sono pure sotto il controllo di fattori sistemici derivati dal sangue, mentre non dovrebbero essere in grado di percepire le deformazioni meccaniche in quanto cellule libere.

In conclusione, secondo la nostra veduta tutti i processi di formazione e di riassorbimento dell’osso, che avvengono in risposta ad agenti meccanici e non-meccanici, sono attivati, modulati e bloccati dal BBCS. Questo risulterebbe, dunque, il vero “Centro Operativo dell’Osso” in grado di percepire le deformazioni meccaniche e i fattori biochimici e, in ogni momento, dopo aver combinato i due tipi di stimoli emettere per *wiring transmission* e/o per *volume transmission* i segnali che attivano e modulano i processi sia di deposizione sia di riassorbimento osseo. Questa veduta che attribuisce una funzione determinante alle cellule della linea osteogenica nel controllo della formazione e del riassorbimento osseo è suffragata da dati della biologia molecolare. È stato scoperto che le cellule osteogeniche producono il ligando del *Receptor*

Activator of NF- κ B (RANKL) che interagisce con il suo recettore, RANK, sui precursori emopoietici che promuovono la differenziazione e l'attività degli osteoclasti. Per converso, le cellule osteogeniche producono un'altra proteina, *osteoprotegerina* (OPG) che si lega al RANKL limitandone l'attività e, quindi, il riassorbimento osseo^(5,16).

BIBLIOGRAFIA

1. Ardizzoni A., Muglia M.A., Marotti G.: *Osteocyte size and lamellar thickness in human secondary osteons: preliminary data*. Bone 25, 167, 1999.
2. Bagi C.M., Miller S.C.: *Comparison of osteopenic changes in cancellous bone induced by ovariectomy and/or immobilization in adult rats*. Anat. Rec. 239, 243-254, 1994.
3. Frost H.M.: *Bone "mass" and the "mechanostat": A proposal*. Anat. Rec. 219, 1-9, 1987.
4. Frost H.M.: *Introduction to a new skeletal physiology*. Vols I, II: Pajaro Group, Pueblo (CO), 1995
5. Hofbauer L.C., Kuhne C.A., Viereck V: *The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases*. J. Musculoskel. Neuron. Interact. 4, 268-275, 2004.
6. Lozupone E., Favia A.: *Density of trabecular framework and osteogenic activity in the spongiosa of long bones subjected to drastic changes in mechanical loading*. Anat. Anz. 152, 245-261, 1982.
7. Lozupone E., Favia A.: *Distribution of resorption processes in the compacta and spongiosa of bones from lactating rats fed a low-calcium diet*. Bone 9, 215-224, 1988.
8. Manson J.D., Waters N.E.: *Maturation rate of osteon of the cat*. Nature Lond. 200, 489-490, 1963.
9. Marotti G.: *Decrement in volume of osteoblasts during osteon formation and its effect on the size of the corresponding osteocytes*. In: "Bone histomorphometry" Meunier P.J. Ed, Armour Montagu, Levallois, 385-397, 1976.
10. Marotti G.: *The structure of bone tissues and the cellular control of their deposition*. Italian J. Anat. Embryol. 101, 25-79, 1996.
11. Marotti G., Camosso M.E.: *Quantitative analysis of osteonic bone dynamics in the various periods of life*. "Les Tissus Calcifiés", G Milhaud, Owen M, Blackwood HJJ Eds, SEDES, Paris, 423-427, 1968.

12. Marotti G., Ferretti M., Muglia M.A., Palumbo C., Palazzini S.: *A quantitative evaluation of osteoblast-osteocyte relationships on growing endosteal surface of rabbit tibiae*. Bone 13, 363-368 1992.
13. Marotti G., Palazzini S., Palumbo C.: *Evidence of a twofold regulation of osteoblast activity: "Volume transmission" and "Wiring transmission"*. Calcif. Tissue Int. 53, 440, 1993.
14. Marotti G., Palazzini S., Palumbo C., Ferretti M.: *Ultrastructural evidence of the existence of a dendritic network throughout the cells of the osteogenic lineage: the novel concept of wiring- and volume-transmission in bone*. Bone 19, 151, 1996.
15. Marotti G., Remaggi F., Zaffè D.: *Quantitative investigation on osteocyte canaliculi in human compact and spongy bone*. Bone 6, 335-337, 1985.
16. Martin T.J.: *Parine regulation of osteoclast formation and activity: Milestones in discovery*. J. Musculoskel. Neuron. Interact. 4, 243-253, 2004.
17. Palazzini S., Palumbo C., Ferretti M., Marotti G.: *Stromal cell structure and relationships in perimedullary spaces of chick embryo shaft bones*. Anat. Embryol. 197, 349-357, 1998.
18. Palumbo C.: *A three-dimensional ultrastructural study of osteoid-osteocytes in the tibia of chick embryos*. Cell Tissue Res. 246, 125-131, 1986.
19. Palumbo C., Ferretti M., Ardizzoni A., Zaffè D., Marotti G.: *Osteocyte-osteoclast morphological relationships and the putative role of osteocytes in bone remodeling*. J. Musculoskel. Neuron. Interact. 1, 327-332, 2001.
20. Palumbo C., Palazzini S., Marotti G.: *Morphological study of intercellular junctions during osteocyte differentiation*. Bone 11, 401-406, 1990.
21. Palumbo C., Palazzini S., Zaffè D., Marotti G.: *Osteocyte differentiation in the tibia of newborn rabbit: an ultrastructural study of the formation of cytoplasmic processes*. Acta Anat. 137, 350-358, 1990.
22. Rubinacci A., Covini M., Bisogni C., Villa I., Galli M., Palumbo C., Ferretti M., Muglia M.A., Marotti G.: *Bone as an ion exchange system: evidence for a link between mechanotransduction and metabolic needs*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 282, 851-864, 2002.
23. Rubinacci A., Villa I., Dondi Benelli F., Borgo E., Ferretti M., Palumbo C., Marotti G.: *Osteocyte-bone lining cell system at the origin of steady ionic current in amphibian bone*. Calc. Tissue Int. 63, 331-339, 1998.
24. Skerry T.M.: *Signalling pathways activated during functional adaptation of the skeleton to mechanical loading suggest a role for excitatory amino acid glutamate*. 1st International Workshop on Musculoskeletal Interactions, I.S.M.N.I., Santorini Greece, 20, 1999.
25. Zaman G., Pitsillides A.A., Rawlinson S.C.F., Suswillo R.F.L., Mosley J.R., Cheng M.Z., Platts L.A.M., Hukkanen M., Polak J.M., Lanyon L.E.: *Mechanical strain stimulates nitric oxide production by rapid activation of endothelial nitric oxide synthase in osteocytes*. J. Bone Miner. Res. 14, 1123-1131, 1999.

L'IPERCORTISOLISMO NELL'ANZIANO: CONSEGUENZA O CAUSA DI DETERIORAMENTO CEREBRALE?

Alberto Angeli

Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche
Facoltà di Medicina e Chirurgia San Luigi Gonzaga
Università degli Studi di Torino
Azienda Ospedaliero Universitaria San Luigi di Orbassano

Key words: *Glucocorticoids / Glicocorticoidi*
Hypercortisolism / Ipercortisolismo
Feed-back / Feed-back
11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase / 11 β -Idrossisteroidedeidrogenasi
Aging / Invecchiamento
Cellular sensitivity / Sensibilità cellulare
Cognitive impairment / Deterioramento cognitivo

Abstract:

A substantial body of evidence supports the view that aging is associated with hyperactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and enhanced sensitivity of target cells to glucocorticoids (GC). Among those cells, neurons of the limbic system are credited of an important role for processes of memory and affective behaviour. In the face of cellular and molecular mechanisms accounting for genomic hypersensitivity, hippocampal neurons involved in the central control of HPA axis show reduced response to the negative feed-back of cortisol which is mainly mediated by the mineralocorticoid (MR) receptor. As a result, a vicious circle hypercortisolism-neurotoxicity gains importance. Subclinical hypercortisolism in aged individuals with comorbidities and/or specific risk factors is an accelerating condition for chronic degenerative diseases, in turn associated with psycho-cognitive decline.

Riassunto:

Vi sono molte evidenze che nell'età avanzata aumentino sia l'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) sia la sensibilità di cellule bersaglio dei glicocorticoidi (GC). Fra le cellule in questione, vi sono neuroni del sistema limbico importanti per memoria e comportamento psico-affettivo. A fronte di questo aumento di sensibilità per effetti genomici di GC, in strutture limbiche

di primaria importanza per il controllo dell'asse HPA (ippocampo) viene meno l'effetto di *feed-back* negativo del cortisolo mediato principalmente dai recettori per i mineralocorticoidi (MR). Il risultato è l'*up-resetting* del sistema HPA e ipercortisolismo subclinico. Si attua così un circolo vizioso ipercortisolismo-neurotossicità che in soggetti di età avanzata, con comorbidità e fattori di rischio specifici, accelera malattie degenerative croniche, a loro volta associate con deterioramento psico-cognitivo.

INTRODUZIONE

Da quasi mezzo secolo, e con più convincenti evidenze negli ultimi vent'anni, si è affermato il concetto che l'invecchiamento, e in particolare quello cerebrale, si accompagna ad un aumento di attività del cosiddetto asse ipotalamo-ipofisi-surrene. Com'è noto, questo fondamentale sistema di informazione endocrina opera come un sofisticato impianto di traduzione-amplificazione di segnali. Semplificando molto la straordinaria complessità funzionale della stazione centrale del sistema, che è l'ipotalamo, possiamo dire che *input* nervosi provenienti da varie aree encefaliche (soprattutto dal sistema limbico) e anche dall'interno stesso dell'ipotalamo vengono tradotti da neuroni specializzati dei nuclei paraventricolari in segnali ormonali, destinati alle cellule ACTH-secernenti dell'ipofisi anteriore. Due sono i fondamentali segnali in gioco: il *corticotrophin releasing hormone* (CRH) e la vasopressina. Entrambi sono liberati nel circolo portale ipotalamo-ipofisario in concentrazioni infinitesimali. Agiscono in modo complementare, e anche sinergico. In funzione di un complesso gioco di regolazione dei loro recettori e dei segnali intracellulari indotti, ora l'uno ora l'altro rappresentano il più importante *drive* ipotalamico per la secrezione di ACTH. A livello dell'ipofisi, questa secrezione può essere vista come una prima amplificazione dei segnali endocrini ricevuti; uno specifico programma di clivaggio del precursore pro-opiomelanocortina (POMC) consente la sintesi e la liberazione in circolo di una quantità di ormone che supera di almeno dieci volte la quantità di peptide ipotalamico in arrivo. A livello delle ghiandole surrenali, in particolare a livello della cosiddetta zona fascicolata, sopravviene infine, in risposta allo stimolo specifico dell'ACTH, un ulteriore, imponente processo di amplificazione (sino a 10.000 volte); sono così messe a disposizione dell'intero organismo adeguate quantità dell'ormone glicocorticoide più importante, che nella specie umana e nei mammiferi ad attività diurna è il cortisolo, e nei roditori di laboratorio ad attività notturna è il corticosterone⁽³⁾.

Focalizziamo ora il discorso sulla fisiologia umana e sulla clinica dei nostri pazienti anziani (sempre più numerosi e sempre più complessi), nonché sul deterioramento psico-cognitivo e comportamentale che caratterizza una crescente fascia di popolazione nella parte più avanzata (anche estrema) della vita. Aumento di attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene significa in questi casi ipercortisolismo ovvero aumentata disponibilità di cortisolo, o meglio, come vedremo, aumentata azione glicocorticoide. Come sempre in medicina le cose si sono rivelate con il tempo assai più complicate di quanto inizialmente poteva sembrare, dopo gli iniziali pionieristici lavori scientifici e, in particolare, dopo i risultati ottenuti in modelli animali.

Ben presto, ad esempio, fu chiaro che a fronte di livelli di cortisolo circolante più elevati in soggetti di età avanzata rispetto a una controparte di età giovane (soprattutto in certe ore della giornata), i livelli degli ormoni androgeni surrenalici (rappresentati dal deidroepiandrosterone, DHEA, e dal suo estere solfato a lunga emivita, DHEAS) erano invece ridotti. Anche la produzione di questi ormoni è notoriamente ACTH-dipendente; il comportamento divergente delle due linee steroidogenetiche, glicocorticoide e androgenica, ha subito posto dubbi sul ruolo di *primum movens* attribuito al complesso ipotalamo-ipofisario CRH/ACTH secernente nella genesi dell'ipercortisolismo. Com'è intuitivo, il vertiginoso progresso delle neuroscienze, dell'endocrinologia e dell'immunologia, con la diffusione a macchia d'olio delle tecniche di biologia molecolare, ha magari risolto alcuni dei precedenti dubbi, ma ne ha proposto altri. Lo scenario fisiopatologico si è progressivamente fatto più ampio, e il ruolo di nuovi attori si è reso evidente. Il sistema neuroendocrino a più stazioni gerarchicamente collegate e controllate di meccanismi di *feed-back* negativo (classica impostazione concettuale) è divenuto sistema neuroendocrino-immunologico, con ulteriori meccanismi di controllo, mediati da citochine coinvolte nella differenziazione e funzione di cellule gliali non meno che di cellule immuni^(5,6,14,27,61).

Ma c'è di più. Quasi una rivoluzione culturale per l'endocrinologia clinica. Si tratta di questo: l'attenzione di molti studiosi e clinici si è progressivamente spostata dai meccanismi patogenetici responsabili di alterata *produzione* ormonale ai meccanismi patogenetici responsabili di alterata *azione* ormonale. Viene sempre più valorizzato il microambiente tissutale e cellulare, che è bersaglio dei segnali endocrini, ma anche di altrettanto importanti segnali paracrini e autocrini. In breve, cresce la consapevolezza che gli effetti ormonali su un determinato bersaglio dipendano non solo dalla quantità di molecole attive che possono raggiungere gli specifici recettori in un definito arco temporale, ma lo è anche dalla capacità di risposta cellulare in quell'arco temporale. Questa capacità di risposta, in altri termini la sensibilità al segnale, è di regola condizionata da numerose variabili, intra- ed extracellulari (ambientali).

Una conseguenza clinica di indubbio significato pratico riguarda la limitata informazione sull'effettiva attività endocrina, che in non poche circostanze possiamo desumere dai livelli ormonali circolanti. Ovviamente, non ci si riferisce qui a livelli chiaramente elevati o ridotti rispetto alla cosiddetta fascia di normalità, sempre piuttosto ampia. È allora evidente che la quantità recepita di segnale e la conseguente risposta cellulare sono eccessive o, per contro, insufficienti. Anche questa regola ha le sue eccezioni; la più importante riguarda le sindromi da resistenza ormonale, nelle quali vien meno l'interazione con

gli specifici recettori e i livelli aumentati di ormone circolante testimoniano l'inefficace azione a livello degli organi bersaglio⁽¹¹⁾. Pertinente al tema della presente relazione, peraltro, è il discorso sui livelli apparentemente normali o, meglio, sui livelli ancora compresi nella fascia di riferimento normale fornita dal laboratorio. In queste circostanza, si può entrare in una “zona grigia” di moderato, inapparente (“subclinico”) eccesso o difetto di azione specifica in funzione di variazioni della sensibilità cellulare.

È il caso emblematico del cortisolo, prodotto finale dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. Sono numerosi i fattori che possono modificare la sensibilità ai glicocorticoidi (cortisolo endogeno e derivati corticoidi di vastissimo uso clinico); ipercortisolismo subclinico (di difficile riconoscimento ma pericoloso!) può sopravvenire nell'età avanzata, così come in alcune altre condizioni, anche a fronte di livelli cortisolemici apparentemente normali e di un programma di secrezione da parte dei surreni grossolanamente comparabile a quello delle età precedenti.

Determinanti della sensibilità cellulare ai glicocorticoidi

La fondamentale azione biologica del cortisolo (e degli analoghi sintetici suoi derivati) è quella di modulare l'espressione di geni che nel loro *promoter* hanno sequenze definite *Glucocorticoid Responsive Elements* (GRE). I geni in questione sono moltissimi. Gli effetti ormonali indotti, di aumentata o ridotta espressione genica, sono noti come effetti genomici. Vi sono anche effetti non genomici. Questi sono rapidi, manifestandosi nell'arco di pochi minuti, o addirittura in meno di un minuto, laddove gli effetti genomici necessitano di almeno un paio d'ore per rendersi evidenti. Negli anni più recenti, gli effetti non genomici, ritenuti fisiologicamente meno significativi ma farmacologicamente rilevanti in quanto prerogativa soprattutto di dosi elevate di glicocorticoidi somministrate acutamente (boli steroidei), hanno ricevuto crescente attenzione. Riguardano variazioni rapide di caratteristiche fisico-chimiche della membrana cellulare e di altre membrane intracellulari, e altrettanto rapide variazioni di flussi ionici trans-membrana^(12,56).

Ritornando agli effetti genomici, vera essenza dell'attività glicocorticoide, il modello interpretativo classico prevede l'ingresso nella cellula bersaglio del cortisolo cosiddetto libero, non veicolato dalle proteine di trasporto plasmatiche, la sua interazione con specifici recettori, la traslocazione nel nucleo dei complessi ormone-recettore, infine, l'interazione di questi complessi con i GRE. Vi sono molte possibili varianti della sequenza sopra delineata, che condizionano il risultato finale. La risposta cellulare al segnale ormonale può

Determinanti della sensibilità cellulare all'azione genomica dei glicocorticoidi
11 β -idrossisteroidedeidrogenasi di tipo 1 e 2 (11 β -OHSD1; 11 β -OHSD2)
Recettori di tipo I e II (recettore per i mineralocorticoidi, MR; recettore per i glicocorticoidi, GR)
Isoforme recettoriali e varianti dei siti leganti (GR α ; GR β ; GR γ ; omodimeri/ eterodimeri)
Co-attivatori e co-repressori dell'interazione con i <i>Glucocorticoid Responsive Elements</i> (GRE)
Modificazioni post-traslazionali dei recettori (acetilazione; metilazione; fosforilazione; sumoilazione)
Interazioni precedenti e/o successive alla traslocazione nel nucleo dei complessi ormone-recettore (altri recettori; proteine regolatrici; fattori di trascrizione: <i>protein-protein interactions</i>)

Tabella I.

Impatto patogenetico dell'ipercortisolismo subclinico nell'anziano
Immunosenescenza (susceptibilità a infezioni; malattie autoimmuni; ridotta immunosorveglianza per neoplasie)
Ipertensione arteriosa, progressione aterosclerotica (trombofilia; eventi cardiovascolari)
Ridotta sensibilità insulinica, aumento di adiposità viscerale, diabete di tipo II
Osteoporosi, miopatia, sarcopenia (rischio di cadute e fratture)
Alterazioni del sonno (riduzione e frammentazione; sbilanciamento notturno simpatico/parasimpatico)
Depressione, deterioramento psico-cognitivo e comportamentale

Tabella II.

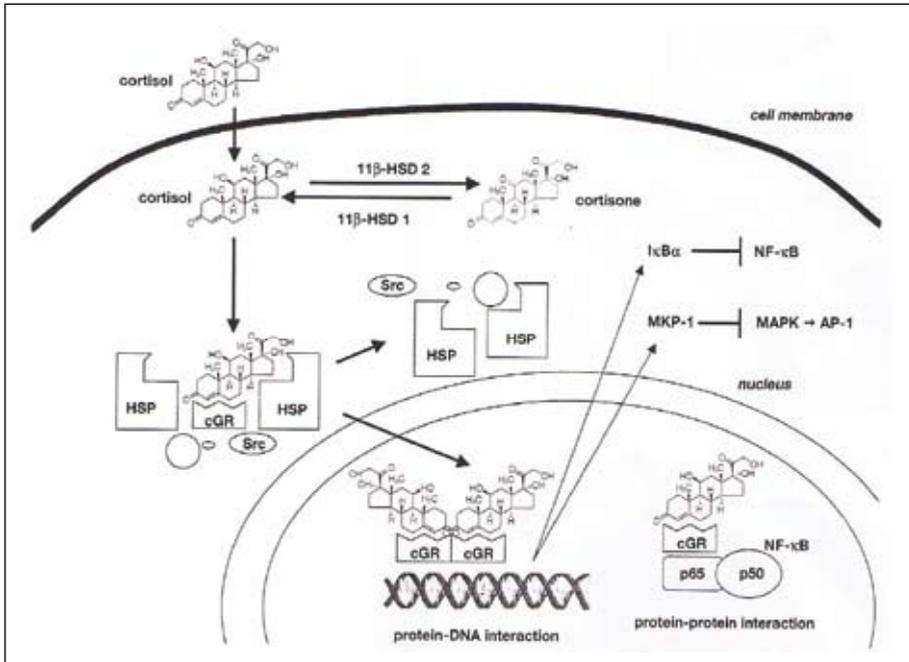


Figura 1. Schema illustrativo dell'azione genomica dei glicocorticoidi.

11β-HSD: 11β-idrossisteroideidrogenasi;

cGR: recettore per i glicocorticoidi a localizzazione citoplasmatica;

HSP: heat shock protein;

MKP: mitogen-activated protein kinase phosphatase;

NF-κB: nuclear factor κB; AP-1: activator-protein-1.

così essere diversa in cellule diverse, e anche per la stessa cellula in momenti funzionali diversi.

L'interazione con i recettori è un passaggio-chiave⁽³¹⁾. Vi sono due fondamentali tipi di recettore per il cortisolo. Sono della stessa famiglia, ma chiaramente diversi, e sono codificati da geni distinti. Ciascuno di essi, inoltre, viene espresso in isoforme funzionalmente non uguali, in funzione di possibili varianti nei processi trascrizionali e traslazionali. Solo negli anni più recenti, l'endocrinologia molecolare ci ha reso partecipi di questa eterogeneità^(30,39). Concentriamo ora l'attenzione sui due tipi fondamentali, poiché è singolare la loro fisiopatologia.

Il recettore di tipo I è più comunemente noto come recettore per i mineralocorticoidi (*mineralocorticoid receptor*, MR). In effetti, questo recettore media l'azione del più potente ormone mineralocorticoido, che è

l'aldosterone⁽²⁸⁾. Che c'entra, allora, il cortisolo, che è ormone glicocorticoide? Il cortisolo ha per MR la stessa alta affinità dell'aldosterone; a buon diritto, quindi, MR può essere definito anche un recettore per i glicocorticoidi. Poiché il recettore è evidentemente espresso nelle cellule bersaglio dell'azione mineralocorticoide (esempio tipico, le cellule del tubulo distale renale), e il cortisolo libero circolante è 100 volte superiore all'aldosterone, se non vi fosse un meccanismo protettivo che in queste cellule “blocca” il cortisolo, l'aldosterone non avrebbe spazio per esplicare la sua azione. Il meccanismo è un'attività enzimatica, che trasforma il cortisolo attivo in cortisone inattivo (l'ossidrilico in posizione 11 della molecola steroidea è trasformato in chetone per azione ossidativa). L'enzima responsabile è l'11 β -idrossisteroidedrogenasi di tipo 2 (11 β -OHD2). La presenza o meno dell'enzima, e la sua maggiore o minore efficienza condizionano l'attività glicocorticoide nelle cellule che esprimono MR. Oltre a quelle programmate ad essere bersaglio dell'azione mineralocorticoide, le cellule in questione si trovano in vari organi e apparati, ad esempio nell'apparato cardiovascolare (nel cuore come nelle pareti vascolari), e nel sistema nervoso centrale, proprio in aree coinvolte nella regolazione del sistema ipotalamo-ipofisi-surrene^(10,16,34). È stato ipotizzato in modo convincente che in questi particolari neuroni, MR siano mediatori importanti dell'effetto fisiologico di *feed-back* negativo del cortisolo sulla secrezione di ACTH^(4,5).

Il recettore per i glicocorticoidi di tipo II è noto come recettore per i glicocorticoidi *tout court* (*glucocorticoid receptor*, GR). Naturalmente, il cortisolo ha alta affinità per GR (anche se apparentemente inferiore all'analoga affinità per MR). Affinità più alta dell'ormone endogeno hanno i derivati corticoidi utilizzati in clinica, e in particolare i derivati fluorurati come triamcinolone, betametasona e, più di tutti, desametasona. L'attività glicocorticoide mediata da effetti genomici è per questi derivati, che per contro hanno scarsa o minima affinità per MR, nettamente superiore – a parità di concentrazione – a quella del cortisolo (non è così per gli effetti non genomici!).

GR è molecola complessa, ubiquitaria, espressa pressoché in ogni cellula. Quantitativamente e qualitativamente (isoforme) l'espressione varia in funzione del grado di differenziazione in linee cellulari specializzate provenienti da precursori multipotenti (ad esempio, *stem cells* mesenchimali o emopoietiche), e anche in funzione del microambiente tissutale. Nel controllo dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, anche neuroni e cellule ipofisarie che esprimono GR (MR può essere co-espresso oppure no) sono implicati nel mediare il *feed-back* negativo dei glicocorticoidi^(16,34). Le regioni *promoter* di

geni responsabili della sintesi di CRH, vasopressina, POMC, e di specifici enzimi di clivaggio coinvolti nella produzione di ACTH, contengono GRE inibitori dei relativi programmi genomici. Nelle cellule in questione, il risultato finale dell'interazione ormone-GR-GRE è la riduzione di specifici mRNA.

Come per MR, anche per GR l'interazione con il proprio ligando (cortisolo o altri glicocorticoidi) è condizionata dalla disponibilità intracellulare di molecole attive. Entra in scena e gioca un ruolo importante un altro enzima, che è la controparte dell' 11β -OHSD2, la cui attività abbiamo visto essere critica per la corretta interazione aldosterone-MR. Si tratta della 11β -idrossisteroidedeidrogenasi di tipo 1 (11β -OHSD1), che catalizza la reazione reduttasica di segno opposto rispetto al tipo 2, cioè l'inserimento di un ossidrilico nella posizione 11 della molecola steroidea al posto di un chetone. Dal cortisone inattivo, nelle cellule che hanno attività 11β -OHSD1 si genera quindi cortisolo attivo, di pronta disponibilità per GR (analogamente, dal prednisone inattivo si genera prednisolone attivo)⁽⁵⁸⁾.

Emerge, da quanto sin qui detto, la grande duttilità di risposta all'azione glicocorticoide. L'eterogeneità dei recettori e l'oscillante bilancio del sistema enzimatico 11β -OHSD1/ 11β -OHSD2 sono variabili che rendono ragione di osservazioni ben note ai clinici⁽³⁶⁾. E cioè: sintomi e segni che testimoniano effetti diversi, o addirittura divergenti (nel senso di ipersensibilità oppure resistenza), quali possono osservarsi in soggetti che hanno livelli ormonali simili o che assumono analoghe dosi di corticoidi⁽⁵²⁾. Ma vi è di più: sia l'espressione recettoriale, e quindi il potenziale numero di complessi ormone-recettore traslocabili al nucleo, sia soprattutto l'attività enzimatica pre-recettoriale 11β -OHSD sono modulabili e possono variare in condizioni fisiologiche e patologiche^(53,58). È importante tutto ciò per l'invecchiamento, per la sensibilità ai glicocorticoidi nell'anziano, per l'attività riassetata verso l'alto (*up-regulated*) dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene nell'età più avanzata? Certamente sì, se diamo credito alle evidenze della recente letteratura. Due aspetti vanno focalizzati in quest'ottica. Il primo riguarda l'aumento di GR in cellule bersaglio dei glicocorticoidi esposte a citochine infiammatorie, fra le quali è di specifico interesse l'interleukina-6 (IL-6)^(6,7). Nell'anziano, in particolare nell'anziano con malattia vasosclerotica in progressione, esiste un generale stato infiammatorio, e i livelli circolanti di IL-6 sono spesso aumentati, anche di molto^(23,62). Il secondo aspetto riguarda l'attività 11β -OHSD1, che genera cortisolo attivo all'interno delle cellule; essa pure risulta innalzata dalle stesse citochine^(19,20). Ancora, questa attività è ritenuta proporzionale all'età, con l'enzima costituzionalmente più espresso e anche più inducibile nella sua azione reduttasica, per quanto si può inferire

dai risultati ottenuti in cellule recuperate da animali sperimentali e da soggetti umani anziani⁽¹²⁾.

In sintesi, è plausibile che con il progredire dell'età vi siano nelle cellule bersaglio dei glicocorticoidi condizioni microambientali che facilitano i loro effetti genomici. L'osservazione clinica lo conferma. Vediamo spesso nei pazienti anziani effetti anti-infiammatori subito evidenti dopo l'inizio di una terapia corticoide; l'altra faccia della medaglia è che sono altrettanto appariscenti gli effetti indesiderati.

È ovvio che stiamo semplificando un discorso che sarebbe molto lungo e intricato. Le variabili che modulano l'attività glicocorticoide vanno ben oltre i due tipi di recettore e i due tipi di 11 β OHSD (Tabella I). L'endocrinologia molecolare è affascinante, ma dobbiamo passar oltre. Il lettore interessato può riferirsi non più alla bibliografia riportata (come si usava sino a pochi anni or sono) ma ai motori di ricerca e alle banche-dati dell'informatica scientifica, inserendo le opportune parole-chiave.

Basti qui ricordare le interazioni fra i complessi ormone-GR e altri recettori nucleari o fattori di trascrizione nucleare (co-attivatori e co-repressori); le isoforme di GR e le tante possibili combinazioni interagenti con gli specifici ligandi; le modificazioni post-traslazionali della complessa molecola recettoriale che sempre più vengono valorizzate nel controllo del cosiddetto *signalling* al nucleo^(20,30). L'elenco è lungo: acetilazione, metilazione, fosforilazione, sumoilazione. Quest'ultimo termine indica l'aggiunta di un peptide di circa 100 aminoacidi che condiziona la vita di GR e di cui ancora poco sappiamo, il cosiddetto SUMO-1 (*small ubiquitin-related modifier-1*)^(21,40).

Il programma di secrezione surrenalica nell'età avanzata

Abbiamo visto come ipercortisolismo subclinico o, meglio, aumentati effetti genomici dei glicocorticoidi in specifiche cellule bersaglio, possano sopravvenire nell'anziano indipendentemente dai livelli di cortisolemia, in ragione di ipersensibilità cellulare. Ma è anche possibile, e invero frequente, che nell'età più avanzata siano elevate le concentrazioni di cortisolo libero extracellulare, e quindi aumenti la quantità di ormone che entra nel compartimento cellulare. Quando coesistono entrambe le condizioni, è intuitivo come le manifestazioni cliniche dell'eccessivo segnale ormonale siano più evidenti^(24,25).

La classe medica non è consapevole di questa patogenesi per molte derive funzionali, e relativi sintomi e segni, che sono anodini e vengono

interpretati come espressione del danno vascolare e di un generico, ineludibile deterioramento energetico e metabolico. Com'è regola dell'endocrinologia geriatrica, anche per l'eccesso di cortisolo sono molto sfumate o addirittura mancano del tutto le manifestazioni fenotipiche che caratterizzano la sindrome di Cushing nelle età precedenti, quali, ad esempio, *facies* lunare e rubizza, gibbo adiposo cervicale, vistosa sproporzione fra tronco globoso e arti smilzi per ipotrofia muscolare, strie rubre addominali, cute assottigliata e marezzata per chiazze emorragiche. Ma vale la spesa considerare la Tabella II. Vi sono elencati problemi di evidente rilevanza clinica, per i quali l'ipercortisolismo subclinico è fattore concausale o aggravante⁽¹³⁾.

L'aumento delle concentrazioni extracellulari di cortisolo, desumibile anche dalla cortisolemia (ma è infida la relazione!), può riconoscere cause diverse dall'immissione in circolo da parte delle ghiandole surrenali. Nell'anziano vi possono essere: riduzione del generale volume di distribuzione ormonale; riduzione dei processi catabolici della molecola steroidea; ipoalbuminemia e interferenze farmacologiche che modificano le complesse interazioni fra quota libera e quota veicolata dalle proteine, con relativo aumento della prima.

Ma in molti casi è il programma secretorio surrenalico a spostarsi verso l'alto. Questo programma è geneticamente determinato, ma è sottoposto a complessi meccanismi di modulazione, che lo rendono molto duttile⁽⁵⁵⁾. Vi è un'ampia variabilità interindividuale, e anche nello stesso individuo, in risposta alle mutevoli esigenze dell'organismo (basti citare le condizioni di stress)^(3,54).

Non è facile documentare un incremento di grado minore della produzione surrenalica di cortisolo. Se la fascia di riferimento normale per la cortisolemia misurata al mattino è 5-20 µg/dL, e il programma secretorio di quel particolare soggetto è "calibrato" su 10 µg/dL, il passaggio a 15 µg/dL significa aumento del 50% e quello a 20 µg/dL (ancora nella fascia di cosiddetta normalità) significa che dallo stabilimento di produzione esce il doppio di prodotto finito rispetto allo standard precedente^(3,6). Come ragionare, allora? È essenziale l'interpretazione critica dei dati di laboratorio, diretta emanazione delle conoscenze di fisiopatologia. Focalizziamo brevemente ciò che è pertinente all'ipercortisolismo che qui interessa.

Le ghiandole surrenali hanno una complessa anatomia vascolare. L'aspetto più importante riguarda il collegamento fra le due porzioni ghiandolari, corticale e midollare, che sono del tutto diverse per derivazione embriologica, architettura strutturale e significato funzionale. A livello della cosiddetta giunzione cortico-midollare, dove è localizzata la zona reticolare produttrice di androgeni, si configura un vero e proprio circolo portale che unisce i capillari della sovrastante zona fascicolata (produttrice di glicocorticoidi)

con quelli della midollare produttrice di catecolamine. La corrente ematica è prevalentemente centripeta, e drena cortisolo verso le cellule cromaffini (il cortisolo stimola l'attività della feniletanolamina-N-metiltransferasi, enzima essenziale per la sintesi di adrenalina). Ma è facile l'inversione del flusso, per la presenza di manicotti di fibre muscolari lisce, ancorati a setti fibrosi della midollare, che consentono alle vene surrenaliche costrizioni mediate dalle alte concentrazioni di catecolamine presenti nel microambiente⁽¹⁸⁾. Il flusso centrifugo porta alla zona reticolare neuropeptidi prodotti dalle cellule cromaffini, importanti attivatori della sintesi di steroidi androgeni a 17 atomi di carbonio⁽⁵⁾. Nell'età avanzata, il venire meno dei recettori adrenergici mediatori della venocostrizione di cui sopra, insieme a un riaggiustamento del microcircolo della corticale sono causa di progressiva espansione della zona fascicolata e di un aumento della produzione di glicocorticoidi a scapito di quella di androgeni⁽⁶⁵⁾. Si discute molto del ruolo di ulteriori meccanismi paracrini, che coinvolgono anche le numerose cellule immunitarie presenti nelle ghiandole surrenali, ma il risultato finale è questo^(4,14,61). L'aumento delle cellule produttrici di cortisolo fa sì che si formino micronoduli e anche macronoduli iperplastici, bene documentati da rilievi autoptici ormai storici. Non stupisce, fra l'altro, che nei cosiddetti incidentalomi surrenalici responsabili di ipercortisolismo subclinico (adenomi secernenti cortisolo reperiti occasionalmente in corso di esami di *imaging* addominale), il livelli di DHEA-S circolante, che riflettono l'attività della zona reticolare interna ma anche il "furto" vascolare dell'adenoma, siamo di regola bassi^(3,7,9).

Va però detto che le modificazioni funzionali della rete vascolare surrenalica, in primo luogo del circolo portale cortico-midollare, non sono certo sufficienti a spiegare l'ipercortisolismo. Sono i segnali a cascata dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene a mantenere alta l'attività produttiva della zona fascicolata. Risultano meno efficienti, rispetto alle età precedenti, i meccanismi di autocontrollo, segnatamente l'effetto di *feed-back* negativo del cortisolo⁽⁶²⁾. Il risultato è il venire meno di quello che è stato definito un "saggio equilibrio", cioè una equilibrata, duttile, adeguata risposta alle esigenze dell'organismo, sia in condizioni di vita normale sia in corso di stress⁽⁴⁾. Nel primo caso, avremo ripercussioni sul ritmo circadiano di funzionamento dell'asse, in breve un alterato programma cronobiologico. Nel secondo caso, avremo risposte inappropriate ed eccessive a stimoli stressanti di varia natura, fisici o emozionali.

I due terzi circa della produzione giornaliera di ACTH e cortisolo sono normalmente concentrati nelle 8 ore successive alla mezzanotte. Se si misurano i livelli plasmatici di questi ormoni con campionamenti ravvicinati

nel corso delle 24 ore, si osservano picchi di secrezione sparsi nel corso della giornata (secrezione episodica con brevi intervalli di quiescenza). I picchi sono chiaramente di maggiore ampiezza e frequenza nelle prime ore del mattino. I livelli massimi di cortisolo circolante (cosiddetta acrofase circadiana) si rilevano a breve distanza dal risveglio. Nelle ore successive, diminuiscono progressivamente, sino ai valori minimi delle ore serali e notturne che precedono la mezzanotte. Geneticamente, la specie umana è programmata per l'attività diurna e il riposo notturno. Si può quindi dire che l'attività ritmico-circadiana dell'intero asse ipotalamo-ipofisi-surrene sia organizzata per fornire all'organismo maggiori quantità di cortisolo nelle ore iniziali della fase di attività. È ormai acquisito il concetto del cortisolo quale fondamentale "sincronizzatore" endogeno di molte funzioni metaboliche, immunologiche, cardiovascolari e neuro-psichiche che sono diversamente operative di giorno e di notte⁽²⁾. Com'è intuitivo, il ritmo circadiano della produzione di cortisolo è legato all'alternanza luce/buio e all'alternanza sonno/veglia. Il collegamento con le fasi del sonno è bidirezionale; vi è un fisiologico *feed-back* notturno dell'ormone che non riguarda solo i centri encefalici coinvolti nel controllo della secrezione di ACTH ma si estende anche ai circuiti nervosi che regolano il complesso programma del sonno^(22,61). Basta questa affermazione per far capire come nell'età senile vi siano le condizioni per un gioco al rimbalzo dagli importanti risvolti clinici: alterato programma di sonno e di correlati segnali ormonali (e immunologici) reciprocamente interferenti e progressivamente devianti dall'originale programma genetico.

In che modo viene meno il freno fisiologico cioè il *feed-back* del cortisolo, se è questo un punto nodale? Ancora una volta, dobbiamo semplificare un discorso complesso. Il *feed-back* glicocorticoide coinvolge strutture diverse: l'ipofisi anteriore, con le cellule ACTH-secernenti; l'ipotalamo, con il nucleo paraventricolare e i neuroni CRH e vasopressina secernenti, ma anche con altri nuclei, come quelli soprachiasmatici che sono una sorta di metronomo per i ritmi circadiani⁽³⁷⁾; diverse aree encefaliche, e in particolare stazioni del sistema limbico, come amigdala e ippocampo. Coinvolge meccanismi molecolari diversi: restando agli effetti genomici, prevede l'attivazioni di entrambi i tipi recettoriali che sono variamente espressi nelle cellule bersaglio, MR, GR o entrambi⁽¹⁶⁾. Non solo. L'impatto su specifici circuiti (ad es., quelli limbici) o specifici segnali (ad es., CRH) è variabile in ragione del momento temporale (onda di attivazione circadiana verso fase di ripiegamento pomeridiano-serale), del gradiente di aumento del segnale (pendenza e altezza raggiunta del picco secretorio), del precedente stato funzionale del sistema (stress intercorrenti), di altri

eventi modulatori (assunzione di nutrienti o farmaci) e, ancora, della peculiarità molecolare del glicocorticoide attivo (cortisolo endogeno verso derivati terapeuticamente attivi)^(3,6,61).

A fronte di tali e tante variabili, va detto che il *feed-back* “farmacologico”, valutato nella pratica clinica quotidiana con il test di soppressione desametonica (*dexamethisone suppression test*, DST), non è estrapolabile al *feed-back* “fisiologico” del cortisolo che aumentando nelle prime ore del mattino regola ampiezza e forma dell’oscillazione circadiana^(1,4,6). Il primo è prevalentemente mediato da GR, il secondo da MR; il primo ha come obiettivi privilegiati ipotalamo e ipofisi, il secondo le stazioni del sistema limbico (ippocampo!); il primo ha come interlocutori un’ampia popolazione di neuroni e pituiciti, il secondo deve fare i conti con una popolazione ridotta di neuroni esprimenti MR e sostanzialmente privi di 11 β -OHSD2 inattivante l’ormone^(34,48,57). Nell’età avanzata, questi neuroni ancora diminuiscono di numero ed efficienza; il sistema limbico, fra l’altro tipicamente coinvolto in reazioni emotivo-comportamentali quali paura, irritazione, aggressività, autoisolamento, non invia più adeguati segnali di freno alla centrale ipotalamica (nuclei paraventricolari), e il programma circadiano dell’intero asse ipotalamo-ipofisi-surrene prende una pericolosa deriva.

È anche intuitivo come i due tipi di *feed-back*, qui differenziati in modo semplicistico (si ritrovano in letteratura anche i termini di *fast feed-back* e *delayed feed-back*), in realtà siano interconnessi e interdipendenti. Pertanto, la minor efficienza dell’uno si ripercuote sulla minor efficienza dell’altro. Lo spostamento “in alto” (*up-resetting*) dell’intero sistema ipotalamo-ipofisi-surrene è ormai documentato da molti studi focalizzati sul deterioramento senile dell’ippocampo e di altre aree limbiche negli animali sperimentali, e anche da molti studi su soggetti umani^(24,44,50,51,59). Di ovvio interesse è l’apparente parallelismo fra deterioramento psico-cognitivo (demenza senile) e ipercortisolismo. Lo spostamento “in alto” sopra ricordato è più marcato negli anziani dementi⁽²⁵⁾.

Effetti neurotossici dell’ipercortisolismo: danni cognitivi e comportamentali

L’endocrinologia clinica ha da tempo richiamato l’attenzione sui potenziali effetti psichici dell’eccesso di glicocorticoidi, sia endogeni (sindrome di Cushing) sia esogeni (terapia con derivati corticoidi). Sintomi e segni di pertinenza psichiatrica sono presenti nella metà circa dei pazienti cushingiani⁽⁸⁾. Eccitazione, insonnia, labilità emotivo-affettiva sono di

comune riscontro dopo somministrazione di dosi medio-alte di corticoidi. L'impatto "tossico" su varie aree encefaliche, in modo particolare su quelle limbiche, è testimoniato, oltreché da numerosi studi sperimentali, anche dalla dipendenza, con tanto di sindrome da astinenza, dal farmaco-droga corticoide, che presentano non pochi pazienti in trattamento cronico^(5,6,35).

Negli anni più recenti, è stato valorizzato il ruolo dell'ippocampo non soltanto nelle reazioni emozionali tradizionalmente coinvolgenti il sistema limbico, o nella modulazione dell'ipotalamo "endocrino" (come già abbiamo visto), ma anche nei processi di memorizzazione spaziale e temporale, e in quelli di comunicazione interpersonale⁽⁴²⁾. La riduzione numerica e funzionale di neuroni ippocampali è uno degli effetti encefalici più comuni negli animali di laboratorio trattati a lungo con corticosteroidi, ma è anche bene evidente con le attuali tecniche di imaging cerebrale in soggetti dementi e, ancor prima, nei pazienti diagnosticati con *mild cognitive impairment* (MCI)^(25,42,46,47,64). Nell'anziano vasosclerotico che ha progressivo deterioramento psico-cognitivo, sono frequenti manifestazioni depressive e di instabilità comportamentale, che hanno somiglianza con quelle indotte dall'eccesso di glicocorticoidi. In questi casi, è molto frequente rilevare l'alterata risposta al DST, che è interpretata come segno di inadeguato *feed-back* e di *up-resetting* dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene^(1,4,63). Se a questo si aggiunge un'aumentata attività 11 β -OHSD1 nei neuroni che esprimono GR (aumenta ulteriormente la disponibilità di cortisolo attivo intracellulare)⁽⁶⁶⁾, il passo concettuale è breve. L'ipercortisolismo, anche se subclinico e di difficile riconoscimento, è potenzialmente neurotossico e può essere importante il suo impatto a più livelli sul deterioramento encefalico^(41,49).

Non certo in tutti gli anziani. Il discorso non è da generalizzare. Ma in quelli più sensibili all'azione glicocorticoide, in funzione dei tanti determinanti che condizionano gli effetti genomici, probabilmente è così. Ed ecco i tentativi di utilizzare in questi pazienti difficili e senza reali possibilità terapeutiche farmaci antiglicocorticoidi come il mifepristone. I risultati dei primi studi in questo senso sono stati abbastanza deludenti, ma la selezione dei pazienti da trattare è stata magari inadeguata (ipercortisolismo insufficientemente documentato)⁽¹⁵⁾.

Considerazioni conclusive

In un articolo pubblicato qualche anno or sono, alle soglie del nuovo millennio, uno studioso carismatico della neuroendocrinologia come Bruce

S. McEwen scriveva, a proposito delle relazioni fra aumentata produzione di glicocorticoidi e deterioramento psico-cognitivo nell'età avanzata, che si trattava di tipica *chicken-and-egg question*⁽⁴³⁾. 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⁽⁵¹⁾. Sappiamo che non è così, e che il vissuto di stress emozionali, con le sequele di depressione e di alterazioni comportamentali bene descritte nei cosiddetti *stress disorders*, impatta sul sistema limbico umano in modo tutt'affatto particolare^(17,26,54,60).

Ma, a distanza di circa 10 anni da quell'articolo, restano valide non poche considerazioni. La prima è che non valga la spesa sapere se è venuto prima l'uovo o la gallina. Nel cervello senile, e in modo particolare nel cervello di chi ha subito in precedenza una serie di *stress* (meglio sarebbe dire *distress*) con rapidi aumenti della cortisolemia, si instaura un circolo vizioso di progressiva neurotossicità^(32,33). Le conseguenze possono essere diverse da caso a caso; la variabilità individuale dipende da molti fattori. Un punto che andrà meglio chiarito nel prossimo futuro riguarda gli effetti ormonali non genomici. Il cortisolo può interferire negativamente sulle proprietà di membrana e di conseguenza sull'ingresso neuronale del glucosio (*impairment* metabolico) e sul traffico transmembrana di Ca^{2+} (*impairment* sull'eccitabilità e sulle dinamiche neurotrasmettitoriali). Anche per questo, i risultati dei tentativi terapeutici con antiglicocorticoidi che ostacolano gli effetti genomici possono essere deludenti^(43,45).

E alla fine un messaggio pratico, che riprende, alla luce delle nuove conoscenze, il buon senso e l'osservazione clinica (e l'esperienza!) che vengono di lontano. Poiché il sistema limbico, bersaglio dei glicocorticoidi e a sua volta controllore dell'attività ipotalamo-ipofisi-surrenalica, è implicato nei processi mnemonici non meno che emozionali (vissuto personale di stress psico-ambientali), una vita "attiva" intellettualmente ed affettivamente lo mantiene in allenamento e gli consente quella *plasticity* di risposte che secondo Bruce S. McEwen (e, molto più modestamente, il sottoscritto) contrasta meglio di tanti farmaci ogni "pessimistico" declino^(38,43). Nulla di nuovo, ma chiaramente una sfida positiva per chi non ha paura dell'avanzare dell'età.

BIBLIOGRAFIA

1. Alexopoulos G.S., Young R.C., Kocsis J.H., Brockner N., Buller T.A., Stokes P.E.: *Dexamethasone suppression test in geriatric depression*. Biol. Psychiatry 42, 1195-1204, 1984.
2. Angeli A.: *I sistemi funzionali circadiani: fisiopatologia ed implicazioni cliniche*. Sem. Med. Int. 17, 167-184. 1998.
3. Angeli A, Gatti G, Orlandi F: *Corticale del surrene*. In "Manuale di Endocrinologia", 373-490, Masson, Milano, 1992.
4. Angeli A, Masera R.G., Magri F, Ferrari E.: *The adrenal cortex in physiological and pathological aging: issues of clinical relevance*. J. Endocrinol. Invest. 22, 13-18, 1999.
5. Angeli A., Masera R.G., Staurengi A.: *Iposurrenalismi*. In "Atti del 98° Congresso della Società Italiana di Medicina Interna", 1-84, Luigi Pozzi, Roma, 1997.
6. Angeli A., Masera R.G., Orlandi F, Terzolo M.: *Sindromi da eccesso di glicocorticoidi*. In "Atti del 95° Congresso della Società Italiana di Medicina Interna", 253-452, Luigi Pozzi, Roma, 1994.
7. Angeli A., Terzolo M.: *Adrenal incidentaloma. A modern disease with old complications*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 87, 4869-4871, 2002.
8. Bourdeau I., Bard C., Forget H., Boulanger Y., Cohen H., Lacroix A.: *Cognitive function and cerebral assessment in patients who have Cushing's syndrome*. Endocrinol. Metab. Clinics North Am. 34, 357-369, 2005.
9. Bovio S., Reimondo G., Daffara F, Allasino B., Angeli A., Terzolo M.: *La sindrome di Cushing subclinica nei pazienti con incidentaloma surrenalico*. Rec. Prog. Med. 97, 6-15, 2006.
10. Buckley T.M., Muller B.C., Schatzberg A.F.: *The acute effects of a mineralocorticoid receptor (MR) agonist on nocturnal hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activity in healthy controls*. Psychoneuroendocrinology 32, 859-864, 2007.
11. Charmandari E, Kino T, Ichijo T, Chrolis G.P.: *Generalized glucocorticoid resistance: clinical aspects, molecular mechanisms, and implications of a rare genetic disorder*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 93, 1563-1572, 2008.
12. Cooper M.S., Rabbitt E.H., Goddard P.E., Bartlett W.A., Hewison M., Stewart P.M.: *Osteoblastic 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity increases with age and glucocorticoid exposure*. J. Bone Miner. Res. 17, 979-986, 2002.
13. Coryell W., Fiedorowicz J., Zimmermann M., Young E.: *HPA axis hyperactivity and mortality in psychotic depressive illness: preliminary results*. Psychoneuroendocrinology 33, 654-658, 2008.
14. Deak T: *Immune cells and cytokine circuits: toward a working model for understanding direct immune-to-adrenal communication pathways*. Endocrinology 149, 1433-1435, 2008.
15. De Battista C, Belanoff J: *The use of mifepristone in the treatment of neuropsychiatric disorders*. Trends Endocrinol. Metab. 17, 117-121, 2006.
16. De Kloet E.R., Azmitia E.C., Landfield P.W.: *Brain corticosteroid receptors. Studies on the mechanism, function, and neurotoxicity of corticosteroid action*. The New York Academy of Sciences, New York, pp. 499, 1994.
17. De Kloet E.R., Oitzl M.S., Joels M.: *Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys?* Trends Neurosci 22, 422-426, 1999.

18. Dobbie J.W., Symington T.: *The human adrenal gland with special reference to the vasculature*. J. Endocrinol. 34, 479-489, 1986.
19. Dovio A., Masera R.G., Sartori M.L., Racca S., Angeli A.: *Autocrine up-regulation of glucocorticoid receptors by interleukin-6 in human osteoblast-like cells*. Calcif. Tissue Int. 69, 293-298, 2001.
20. Dovio A., Micossi I., Bianco L., Angeli A.: *Determinants of glucocorticoid action in the bone microenvironment*. J. Endocrinol. Invest. 31(Suppl. to n°7): 7-15, 2008.
21. Duma D., Jewell C.M., Cidlowski J.A.: *Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 102, 11-21, 2006.
22. Dunn A.J., Swiergiel A.H.: *The role of corticotropin-releasing factor and noradrenaline in stress-related responses, and the inter-relationships between the two systems*. Eur. J. Pharmacol. 583, 186-193, 2008.
23. Ershler W.B., Keller E.T.: *Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty*. Ann. Rev. Med. 51, 245-270, 2000.
24. Ferrari E., Cravello L., Muzzoni B., Casarotti D., Paitro M., Solerte S.B., Fioravanti M., Cuzzoni G., Pontiggia B., Magri F.: *Age-related changes of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: pathophysiological correlates*. Eur. J. Endocrinol. 144, 319-329, 2001.
25. Ferrari E., Magri F.: *Role of neuroendocrine pathways in cognitive decline during aging*. Ageing Res. Rev. 7, 225-233, 2008.
26. Ferrari E., Mirani M., Barilli L., Falvo F., Solerte S.B., Cravello L., Pini L., Magri F.: *Cognitive and effective disorders in the elderly: a neuroendocrine study*. Arch. Gerontol. Geriatr. 9, 171-182, 2004.
27. Frank M.G., Wieseler-Frank J.L., Watkins L.R., Maier S.F.: *Microglia serve as a neuroimmune substrate for stress-induced potentiation of CNS pro-inflammatory cytokine responses*. Brain Behav. Immun. 21, 47-59, 2006.
28. Funder J.W., Mihailidou A.S.: *Aldosterone and mineralcorticoid receptors. Clinical studies and basic biology*. Molec. Cell. Endocrinol. 301, 2-6, 2009.
29. Funder J.W., Pearce P., Smith R., Smith A.I.: *Mineralcorticoid action: target-tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated*. Science 242, 58-85, 1988.
30. Gross K.L., Lu N.Z., Cidlowski J.A.: *Molecular mechanisms regulating glucocorticoid sensitivity and resistance*. Molec. Cell. Endocrinol. 300, 7-16, 2009.
31. Heitzer M.D., Wolf I.M., Sanchez E.R., Witchel S.F., De Franco D.B.: *Glucocorticoid receptor physiology*. Rev. Endocr. Metab. Disord. 8, 321-330, 2007.
32. Hellhammer J., Schlotz W., Stone A.A.: *Allostatic load, perceived stress, and health: a prospective study in two age groups*. Ann. NY Acad. Sci. 1032, 8-13, 2004.
33. Herman J.P., Cullman W.E.: *Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis*. Trends Neurosci. 20, 78-84, 1997.
34. Holmes M.C., Yau J.L., Kotelevtsev Y., Mullins J.J., Seckl J.R.: *11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the brain: two enzymes, two roles*. Ann. NY Acad. Sci. 1007, 357-366, 2003.

35. Hopkins R.L., Leinung M.C.: *Exogenous Cushing's syndrome and glucocorticoid withdrawal*. *Endocrinol. Metab. North Am.* 34, 371-384, 2005.
36. Jang C., Obeyesekere V.R., Dilley R.J., Krozowski Z., Inker W.J., Alford F.P.: *Altered activity of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in skeletal muscle confers metabolic protection in subjects with type 2 diabetes*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 3314-3320, 2007.
37. Karatsoreos I.N., Silver R.: *The neuroendocrinology of the suprachiasmatic nucleus as a conductor of body time in mammals*. *Endocrinology* 148, 5640-5647, 2007.
38. Kenyon C.: *The plasticity of aging: insights from long-lived mutants*. *Cell* 120, 449-460, 2005.
39. Kino T.: *Tissue glucocorticoid sensitivity: beyond stochastic regulation of the diverse actions of glucocorticoids*. *Horm. Metab. Res.* 39, 420-424, 2007.
40. Lu N.Z., Cidlowski J.A.: *Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity*. *Trends Cell. Biol.* 16, 301-307, 2006.
41. Mantella R.C., Butters M.A., Amico J.A., Mazundar S., Rollman B.L., Begley A.E., Reynolds C.F., Lenze E.J.: *Salivary cortisol is associated with diagnosis and severity of late-life generalized anxiety disorder*. *Psychoneuroendocrinology* 33, 773-781, 2008.
42. McEwen B.S.: *Stress and the aging hippocampus*. *Front. Neuroendocrinol.* 20, 49-70, 1999.
43. McEwen B.S., De Leon M.J., Lupien S.J., Meaney M.J.: *Corticosteroids, the aging brain and cognition*. *Trends Endocrinol. Metab.* 10, 92-96, 1999.
44. Mizoguchi K., Ikeda R., Shoji H., Maruyama W., Tabira T.: *Aging attenuates glucocorticoid feedback in rat brain*. *Neuroscience* 159, 259-270, 2009.
45. Murphy B.E.P.: *Antiglucocorticoid therapies in major depression: a review*. *Psychoneuroendocrinology* 22(Suppl 1): 125-132, 1997.
46. O'Brien J.T., Lloyd A., McKeith I.: *A longitudinal study of hippocampal volume, cortisol levels, and cognition in older depressed subjects*. *Am. J. Psychiatry* 161, 2081-2090, 2004.
47. O'Hara R., Achröder C.M., Mahadevan R., Schtzberg A.F., Lindley S., Fox S., Weiner M., Kraemer H.C., Noda A., Lin X., Gray H.L., Hallmayer J.F.: *Serotonin transporter polymorphism, memory and hippocampal volume in the elderly: association and interaction with cortisol*. *Mol. Psychiatry* 12, 544-555, 2007.
48. Otte C., Yassouridis A., Jahn H., Maass P., Strober N., Wiedemann K., Kellner M.: *Mineralcorticoid-mediated inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in aged humans*. *J. Gerontol.* 58, 900-905, 2003.
49. Purnell J.Q., Brandon D.D., Lorne M.I., Loriaux D.L., Samuels M.H.: *Association of 24-hour cortisol production rates, cortisol-binding globulin, and plasma free cortisol levels with body composition, leptin levels, and aging in adult men and women*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 281-287, 2004.
50. Sapolsky R., Krey L., McEwen B.S.: *The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis*. *Endocr. Rev.*; 7, 284-301, 1986
51. Sapolsky R.: *Stress, the aging brain and the mechanisms of neuron death*. MIT Press, Cambridge, MA, U.S.A., pp. 423, 1992.
52. Schäcke H., Docke W.D., Asadullah K.: *Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids*. *Pharmacol. Ther.* 96, 23-43, 2002.

53. Seckl J.R.: *11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the brain: a novel regulator of glucocorticoid action?* Front. Neuroendocrinol. 18, 49-99, 1997.
54. Serman T.E., Robbins R.J.: *Aging and hypothalamic-pituitary-adrenal response to challenge in humans.* Endocr. Rev. 15, 233-249, 1994.
55. Segar T.M., Kasekow J.W., Welge J.A., Herman J.P.: *Heterogeneity of neuroendocrine stress responses in aging rat strain.* Physiol. Behav. 96, 6-11, 2009.
56. Stellato C.: *Post-transcriptional and non-genomic effects of glucocorticoids.* Proc. Am. Thorac. Soc. 1, 255-263, 2004.
57. Stranahan A.M., Arumugan T.V., Cutler R.G., Lee K., Egan J.M., Mattson M.P.: *Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons.* Nature Neurosci. 11, 309-317, 2008.
58. Tomlinson J.W., Walker E.A., Bujaska I.J., Draper N., Lavery G.G., Cooper M.S., Hewison M., Stewart P.M.: *11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response.* Endocr. Rev. 25, 831-866, 2004.
59. Topic B., Oitzl M.S., Meijer O.C., Huston J.P., De Souza Silva M.A.: *Differential susceptibility of extinction-induced despair and age-dependent alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and neurochemical parameters.* Neuropsychobiology 58, 138-153, 2008.
60. Tsigos C., Chrousos G.P.: *Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress.* J. Psychosom. Res. 53, 865-871, 2002.
61. Turnbull A.V., Rivier C.L.: *Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action.* Physiol. Rev. 79, 1-71, 1999.
62. Walston J.D., Matteini A.M., Nievergelt C., Lange L.A., Fallin D.M., Barzilai N., Zir E., Pawlikowska L., Kwok P., Cummings S.R., Kooperberg C., Lacroix A., Tracy R.P., Atzmon G., Lange E.M., Reiner A.P.: *Inflammation and stress-related candidate genes, plasma interleukin-6 levels, and longevity in older adults.* Exp. Gerontol. 44, 350-355, 2009.
63. Wilkinson C.W., Peskind E.R., Raskind M.A.: *Decreased hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitivity to cortisol feed-back inhibition in human aging.* Neuroendocrinology 65, 79-90, 1997.
64. Wolf O.T., Convit A., Thorn E., De Leon M.J.: *Salivary cortisol day profiles in elderly mild cognitive impairment.* Psychoneuroendocrinology 27, 777-789, 2002.
65. Yen S.S.C., Laughlin G.A.: *Aging and the adrenal cortex.* Experim. Gerontol. 33, 897-910, 1998.
66. Yu L., Romero D.G., Gomez-Sanchez C.E., Gomez-Sanchez E.P.: *Steroidogenic enzyme gene expression in the human brain.* Molec. Cellul. Endocrinol. 190, 9-17, 2002.

IL TRATTAMENTO DEL MIELOMA MULTIPLO DI NUOVA DIAGNOSI NEL PAZIENTE ANZIANO

*Mario Boccadoro, Valeria Magarotto, Sara Bringhen, Patrizia Falco,
Federica Cavallo, Alessandra Larocca, Francesca Gay, Mariella Genuardi,
Barbara Lupo, Antonio Palumbo*

Divisione di Ematologia - Università degli Studi di Torino
A.O.U. San Giovanni Battista - Torino

Key words: *Multiple myeloma / Mieloma multiplo
Thalidomide / Talidomide
Bortezomib / Bortezomib
Lenalidomide / Lenalidomide
Autologous stem cell / Trapianto di cellule
transplantation (ASCT) staminali autologhe*

Abstract:

Multiple myeloma is an incurable malignant disorder characterized by the proliferation of a single clone of plasma cells derived from B cells in the bone marrow. It accounts for approximately 10% of hematological malignancies and the frequency increases with age. At present about 65% of patients are older than 65 years. Since the beginning of 2000's, the association of Melphalan and Prednisone (MP) represented the standard of care for elderly or unfit patients, with a response rate (RR) of about 50%, rare complete remission (CR) and a lifespan of 2-3 years. The introduction of novel agent like, Thalidomide, Lenalidomide and Bortezomib led to an encouraging increment in RR, together with an high rate of CR, a prolongation of period free from disease (DFS) and of overall survival (OS). The introduction of the autologous stem cell transplantation (ASCT) has further increased the opportunity of prolonging the DFS and OS, even in elderly fit patients.

Riassunto:

Il mieloma multiplo è una neoplasia ematologica che colpisce prevalentemente gli anziani (età superiore ai 65 anni). Fino a pochi anni fa, la terapia alla diagnosi prevedeva l'associazione di Melphalan e Prednisone (MP), che garantiva una percentuale di risposte non superiore al 50% e una sopravvivenza mediana di 2-3 anni. Con l'introduzione di farmaci quali la Talidomide, il Bortezomib e la Lenalidomide, si è potuto incrementare l'efficacia dei trattamenti, con un prolungamento della sopravvivenza e una buona qualità di vita per il paziente, soprattutto per quello anziano. Le tossicità sono facilmente gestibili, con opportune profilassi anti-infettive e anti-trombotiche ed, eventualmente la riduzione del dosaggio del farmaco, senza, per altro, compromettere l'efficacia. Recenti studi hanno, inoltre, dimostrato la possibilità di estendere il trapianto di cellule staminali autologhe ai pazienti di 65-70 anni, con un buon performance status.

IL MIELOMA MULTIPLO

Il mieloma multiplo (MM) rappresenta il 10% delle neoplasie ematologiche. È tipico dell'anziano, con un picco di diagnosi tra i 65 e i 75 anni⁽²⁸⁾. Attualmente è una patologia curabile, ma non guaribile, anche se, grazie agli sforzi continui della ricerca, è stato possibile prolungare la sopravvivenza e migliorare la qualità di vita dei pazienti. L'approccio al paziente con nuova diagnosi di mieloma deve tenere in considerazione una serie di fattori, tra i quali l'età. Per il paziente giovane, il trapianto di cellule staminali autologhe o eterologhe è la terapia di scelta. L'anziano è più facilmente affetto da comorbidità che complicano la scelta della terapia, che va iniziata solo nel MM sintomatico, come definito nella Tabella I.

Criteria Diagnostici per definire sintomatico il mieloma (necessaria compresenza di tutte e 3 le condizioni)
Presenza di componente monoclonale nel siero/urine
Infiltrazione midollare di plasmacellule > 10%
Evidenza di danno d'organo (CRAB: Ca sierico > 10,5 mg/dl, Creatinina > 2 mg/dl, Hb < 10 g/l o ridotta di 2 g rispetto valori soliti del paziente, lesioni litiche o osteoporosi, infezioni ricorrenti)

Tabella I. Criteria usati per definire il mieloma multiplo sintomatico, necessitante di un trattamento. I tre criteri devono essere contemporaneamente presenti per poter iniziare una terapia.

La stadiazione del MM si avvale di un nuovo metodo, l'International Staging System (ISS) che affianca e completa la tradizionale classificazione di Durie-Salmon⁽⁹⁾ (vedi Tabella II).

Nel mieloma si sono evidenziate anomalie genetiche, la cui scoperta ha accresciuto l'importanza di esami diagnostici come la FISH o l'analisi del cariotipo. Le alterazioni cromosomiche hanno un valore prognostico e potrebbero influenzare la scelta della terapia⁽³⁰⁾. L'Intergroupe Francophone du Myelome ha di recente pubblicato i risultati di uno studio, che ha dimostrato come la delezione del cromosoma 13, la traslocazione (4;14), la delezione del cromosoma 17 e la mancanza di iperdiploidia sono le alterazioni cromosomiche che influenzano negativamente la prognosi⁽⁴⁾.

Stadio	Criteri	Sopravvivenza Mediana (mesi)
I	B2 microglobulina < 3.5mg/l e albumina ≥ 3.5 g/dl	62
II	B2 < 3.5 mg/dl e albumina < 3.5 mg/dl o 3.5 < B2 > 5.5 senza valutare Albumina	44
III	B2 microglobulina ≥ 5.5 mg/l	29

Tabella II. Stadiazione del mieloma multiplo secondo il sistema ISS, che va a sostituirsi alla tradizionale classificazione di Durie-Salmon.

Trattamento convenzionale

Il paziente non eleggibile al trapianto di cellule staminali, viene trattato con chemioterapici singoli o in associazione. Corticosteroidi e il Melphalan hanno rappresentato per lungo tempo il trattamento di riferimento. Il *Desametasone*, usato singolarmente e ad alte dosi è particolarmente attivo nell'induzione della risposta nel paziente non trattato precedentemente, permettendo di raggiungere una risposta del 60%. La tossicità, soprattutto infezioni, problemi gastrointestinali, diabete e irritabilità, è il problema principale⁽¹⁾. Il *Desametasone* può essere associato al *Melphalan (MD)*. Uno studio ha comparato MP vs MD, evidenziando la presenza di una percentuale più alta di remissioni complete (CR) nel gruppo trattato con MD⁽¹⁰⁾. L'associazione di *Melphalan + Prednisone (MP)* induce una risposta nel 40-60% dei pazienti, con un'incidenza di CR inferiore al 5%. Altre combinazioni polichemioterapiche non incrementano i risultati ottenuti con MP⁽¹⁴⁾. Facon e collaboratori hanno dimostrato che i regimi contenenti Melphalan (MP o MD) garantiscono un tasso di risposta (RR) maggiore e intervallo libero da progressione (PFS) più lungo (circa 22 mesi) rispetto a quelli a base di solo Desametasone (15 mesi). I regimi contenenti Desametasone hanno tossicità prevalentemente non ematologiche (infezioni piogeniche, emorragie, perforazioni intestinali, diabete e disturbi psichici), mentre regimi a base di Melphalan hanno tossicità prevalentemente ematologiche, anche se transienti.

Tapianto autologo

Il trapianto di cellule staminali autologhe (ASCT) è considerato superiore alla chemioterapia convenzionale, in termini di percentuale di CR, intervallo

libero da malattia (EFS) e sopravvivenza globale (OS). La conferma è venuta da due studi, l'IFM90 del gruppo francese e il Myeloma VII Trial del gruppo inglese^(3,5). Il trapianto è la terapia di elezione nel paziente giovane, può essere esteso a pazienti con più di 65 anni? È stato condotto uno studio randomizzato multicentrico, per valutare la possibilità di estendere il trapianto autologo anche ai pazienti anziani, previa riduzione del regime di condizionamento⁽¹⁸⁾. I pazienti, di età compresa tra i 50 e i 70 anni, sono stati assegnati random al tipo di trattamento: MP o Melphalan 100mg/mq (MEL100)+ASCT. Le CR sono salite dal 6% con MP, a 25 % con MEL100; l'EFS è di 15,6 mesi dopo MP e 28 mesi dopo MEL100; l'OS a tre anni è pari al 62% con MP e del 77% dopo MEL100. Nel sottogruppo di pazienti con un'età pari a 65-70 anni sono stati osservati risultati simili. L'OS passa da 37,3 mesi con MP, a 58 mesi dopo MEL100. Il MEL100, alla diagnosi, costituisce un regime più efficace della chemioterapia convenzionale, rappresentando una valida alternativa per i pazienti di un'età compresa tra i 65 e i 70 anni. In uno studio retrospettivo case-matched sono state confrontate due differenti dosi di Melphalan (MEL 200 vs MEL 100), per valutare se la riduzione della dose compromettesse l'efficacia. Novanta pazienti, di età compresa tra i 55 e i 73 anni, sono stati sottoposti a procedura trapiantologica, previo condizionamento con MEL100⁽²¹⁾. I risultati sono stati confrontati con un gruppo di controllo di 90 pazienti, sottoposti a MEL200. Dallo studio è risultato che il MEL 200 è superiore al MEL 100 in termini di EFS (42 mesi vs 32 mesi), ma non si sono riportate sostanziali differenze in termini di OS (75 mesi vs 67 mesi). Il tasso di risposta è pari al 35% di CR nel MEL100 e il 48% del MEL200, con un incremento del tasso, dopo il secondo autotrapianto, in entrambi i gruppi. Il regime di condizionamento ad intensità ridotta MEL100 sembrerebbe meno tossico (ridotto tasso di infezioni, trombocitopenia, neutropenia e ospedalizzazione) e leggermente meno efficace rispetto al MEL 200, nonostante non ci siano grandi differenze in termini di OS. Quest'ultimo offre la possibilità di un EFS più prolungato, durante il quale non è richiesta terapia e può essere considerato il regime standard per i pazienti giovani, in buone condizioni cliniche. Il MEL100 rappresenta una efficace alternativa per i pazienti anziani o in condizioni di salute non ottimali.

Talidomide

Una svolta epocale in campo terapeutico si è avuta con la riscoperta della Talidomide. Ritirata dal mercato negli anni sessanta, perché teratogena, si è dimostrata essere un potente agente ad azione immunomodulante e inibente l'angiogenesi. La talidomide, che agisce sia sulla cellula mielomatosa, che sul

microambiente midollare⁽¹²⁾. Il farmaco è efficace sia nel mieloma recidivante/refrattario, sia in quello di nuova diagnosi⁽³²⁾, somministrato come singolo agente o in associazione ad altri chemioterapici⁽²³⁾. Date le premesse, uno studio nazionale, multicentrico e randomizzato, ha confrontato l'associazione Melphalan, Prednisone e Talidomide (MPT) con il vecchio Melphalan e Prednisone (MP) al fine di verificare la possibilità che la Talidomide apportasse dei vantaggi⁽¹⁶⁾. I pazienti randomizzati per lo studio erano tutti affetti da MM di nuova diagnosi, con un'età superiore ai 65 anni o senza indicazione al trapianto autologo (Tabella II). Nel braccio MPT si sono ottenute il 76% di risposte parziali (PR) (inclusendo CR = 15,5% e il 60,4% di PR), mentre nel braccio MP si sono ottenute il 47,6% di PR (inclusendo 2,4% di CR e il 45,2% di PR). Il tasso di sopravvivenza a tre anni è stato pari all'80% per MPT e 64% per MP. L'EFS a due anni è stato del 27% per MP e 54% per MPT. Dopo un follow-up mediano di circa 17,6 mesi, il tasso di sopravvivenza a tre anni è stato pari all'80% per MPT e 64% per MP. L'EFS a due anni è stato del 27% per MP e 54% per MPT. Dopo un follow-up più lungo (circa 38 mesi), in realtà non si è osservata una sostanziale differenza in termini di sopravvivenza globale tra i due bracci (45.0 vs 47.6), mentre resta alto il tasso di risposte, soprattutto quelle complete e l'intervallo libero da progressione. Tra le possibili cause, un elevato numero di pazienti passati al trattamento con MPT o ad altri regimi contenenti Lenalidomide o Bortezomib, dopo essere recidivati da MP. Nonchè, una certa resistenza alle terapie successive, nei pazienti trattati con MPT. Il tasso di eventi avversi di grado 3-4 (secondo CTC) è stato pari al 48% con il ciclo MPT e del 25% con il ciclo MP. I pazienti trattati secondo schema MPT hanno avuto una tossicità maggiore, prevalentemente di natura tromboembolica (ridottasi con l'introduzione di una profilassi eparinica), neurologica ed ematologica. È recentemente emerso che la talidomide annulla il significato prognostico negativo della β 2-microglobulina⁽¹⁷⁾. È stata per tanto condotta un'analisi basata sui valori di β 2-microglobulina (cut off 3,5 mg/L). Nei pazienti inseriti nel braccio MPT, non si sono osservate differenze in termini di OS tra i pazienti con valori alti o bassi di β 2-microglobulina, con un OS valutato a 18 mesi pari al 80% nei primi e 84% nei secondi ($p = 0.67$); nei pazienti tratti solo con MP, a 18 mesi, l'OS era pari a 71% nei pazienti con alta β 2-microglobulina e dell'86% in quelli con un basso dosaggio di questo parametro ($p = 0.01$). Sembra quindi che MPT cancelli il significato prognostico negativo della β 2-microglobulina, mentre il vecchio schema MP risulta meno efficace nei pazienti con alti livelli di β 2-microglobulina. L'aggiunta della Talidomide ha permesso di migliorare il tasso di risposta e l'event-free survival, dell'ormai consolidato schema MP,

facendo dell'MPT il trattamento standard per il paziente anziano con nuova diagnosi di mieloma. In uno studio francese di fase III, sono stati confrontati tre regimi terapeutici alla diagnosi: MP, MPT e MEL100 seguito da ASCT⁽⁷⁾. I pazienti trattati con MPT o MEL100 hanno ottenuto un'elevata percentuale di PR, rispetto a MP (81%, 73% e 40% rispettivamente). PFS e OS sono più elevati nei pazienti trattati con MPT rispetto agli altri due trattamenti. MPT è associato a un'elevata percentuale di tossicità ematologiche (neutropenia e trombocitopenia), tromboemboliche (prevalentemente nei primi 4-6 mesi di trattamento), cardiologiche e neuropatiche. Anche il lavoro condotto da Facon e collaboratori conferma il ruolo di MPT come terapia standard nei pazienti anziani.

Lenalidomide

L'esigenza di migliorare lo spettro d'azione della talidomide e di ridurre il più possibile le eventuali tossicità, ha portato alla formulazione e sperimentazione degli analoghi della talidomide o IMiDs (immunomodulatory drugs). La Lenalidomide è uno di questi composti. Agisce in maniera analoga alla Talidomide⁽²⁾, ma la tossicità è prevalentemente ematologica, mentre la neuropatia è rara. Le trombosi venose profonde si osservano soprattutto nelle terapie di associazione. Il ricorso a profilassi con Aspirina sembra ridurre l'incidenza⁽²⁰⁾. La Lenalidomide è stata valutata nel MM recidivante/refrattario, con ottimi risultati sia in termini di percentuali di risposta, che di EFS⁽²⁶⁾. Attualmente sono in corso studi di fase II/III che stanno valutando la combinazione Lenalidomide + Desametasone per il mieloma alla diagnosi⁽²²⁻³¹⁾. Di recente uno studio di fase I/II ha valutato la tollerabilità e la tossicità dell'associazione MPR (Melphalan, Prednisone e Lenalidomide) in MM alla diagnosi⁽¹⁹⁾. I partecipanti sono stati inseriti in 4 diversi dose-level, con 5 o 10 mg di Lenalidomide, associati a 0.18 o 0.25 mg/kg di Melphalan (Tabella III). Per tutti i pazienti è stata prevista profilassi antibiotica a base di Ciprofloxacina e profilassi antitrombotica a base di Aspirina. Alla MTD (massima dose tollerata = 10 mg di Lenalidomide associata a 0.18 mg/kg di Melphalan) il 47.6% dei pazienti ha registrato una CR o VGPR, mentre una PR è stata registrata nell'81% dei pazienti. La risposta migliore si è avuta dopo un tempo mediano di 4 mesi. EFS ad un anno è stato del 92.3%, maggiore rispetto al controllo storico con MPT, pari al 78%. Anche l'OS a un anno è aumentata ed è pari al 100% nei pazienti MPR, contro l'87.4% nei pazienti MPT. Alla MTD la tossicità principale è stata di natura ematologica. Tra le tossicità non-ematologiche ricordiamo quelle di natura infettiva, cutanea e tromboembolica.

Non si è riscontrata tossicità di carattere neuropatico. Nella valutazione dei fattori prognostici Si è rilevato che i pazienti trattati secondo schema MPR e portatori di un'anomalia citogenetica (delezione cromosoma 13 o t(4;14) non hanno mostrato differenze statisticamente significative in termini di EFS. Al contrario, livelli elevati di $\beta 2$ microglobulina sono predittivi di un EFS più breve in pazienti ricevanti MPR.

Bortezomib

Il proteasoma è un complesso multienzimatico, presente in tutte le cellule eucarioti, deputato alla degradazione dell'80% delle proteine intracellulari⁽⁶⁾. È essenziale per il funzionamento dei meccanismi molecolari che sottostanno alla crescita, apoptosi, angiogenesi e metastatizzazione delle cellule neoplastiche⁽³³⁾. Studi condotti in vitro, hanno identificato nel Bortezomib il più potente inibitore del proteasoma⁽²⁵⁾. Due studi di fase II, il CREST e il SUMMIT^(24,11) hanno evidenziato l'efficacia del farmaco in casi di MM recidivante/refrattario. Uno studio di fase III, l'APEX ha confrontato il Bortezomib con il Desametasone in MM plurirecidivati, confermando la superiorità del nuovo farmaco in termini di risposte OS e EFS⁽²⁷⁾. La FDA americana e l'EMA hanno approvato l'uso terapeutico del Bortezomib per il trattamento del Mieloma Multiplo recidivante/refrattario. In uno studio di fase I/II, Mateos e collaboratori hanno associato il Bortezomib a MP (VMP) e hanno valutato l'efficacia di questa nuova combinazione nei mielomi alla diagnosi⁽¹³⁾. Tutti i partecipanti allo studio avevano un'età non inferiore ai 65 anni, con mieloma di nuova diagnosi, non precedentemente trattato e non candidabili alle alte dosi (Tabella III). Dopo il primo ciclo, il tasso di risposta globale è stato del 70%, con un 6% di CR e un 62% di PR. Dopo una mediana di 7 cicli, il tasso di risposta globale è stato dell'89%, con un 32% di CR e un 45% di PR. In un gruppo di controllo storico trattato con MP il tasso di risposta globale, dopo 6 cicli, è stata del 42%, nessuna CR immunofissazione negativa, solo 3% CR immunofissazione positive e un 39% di risposte parziali. Dopo un follow-up di circa 16 mesi, il PFS era pari al 91%, con un EFS del 83%. Se confrontiamo questi risultati con quelli ottenuti, dopo uno stesso periodo di follow-up, nel gruppo di controllo storico del MP, possiamo notare che: l'OS è passato dal 66% con MP al 90% con VMP, l'EFS è passato dal 51% con MP al 83% con VMP e che il PFS è passato dal 66% con MP al 91% con VMP. Lo studio ha poi valutato se le anomalie cromosomiche potessero influire sulle risposte al VMP. Sui 13 pazienti in cui erano presenti queste alterazioni, non si sono notate sostanziali differenze in termini di PFS e EFS. Per quanto

concerne la tossicità, spiccano quelle ematologica, neurologica e infettiva. I primi 2 cicli sono quelli in cui questo tipo di complicanze si presenta con maggior frequenza. Come si poteva prevedere, i pazienti più anziani, ossia con più di 75 anni, sono stati i più colpiti. Lo schema VMP è efficace e ben tollerato, con tossicità gestibili mediante riduzione delle dosi dei farmaci. Si ottiene un'elevata percentuale di risposte complete immunofissazione negative, importante parametro di sopravvivenza. La risposta è precoce e tende a crescere nei cicli successivi. Il Bortezomib permette, inoltre, di superare la prognosi negativa legata alla delezione del gene del retinoblastoma e alle traslocazioni (4;14) e (14;16). Uno studio di fase I/II ha voluto verificare l'efficacia e la tossicità di una nuova combinazione, includente Melphalan, Prednisone, Talidomide e Bortezomib nei pazienti con mieloma multiplo recidivato/refrattario⁽¹⁵⁾. I risultati sono stati soddisfacenti, con un 43% di CR e VGPR, compreso un 36% di CR immunofissazione-negativa per i pazienti che hanno ricevuto il trattamento in seconda linea. Il PFS a un anno è stato pari al 61%, con l'84% dei pazienti vivi ad un anno dall'inizio dello studio. Le risposte si sono presentate rapidamente, con il 32% dei pazienti che hanno ricevuto la migliore risposta dopo tre cicli di trattamento. La risposta tende a migliorare con i cicli successivi. La tossicità è contenuta, prevalentemente ematologica e infettiva. Non si sono registrati casi di neuropatia periferica di grado 4 e solo un 3% di grado 3, tra l'altro in pazienti con una precedente neuropatia. Nonostante l'assenza di profilassi, non si sono registrati casi di trombosi venose profonde. Lo studio, sebbene preliminare, ha dimostrato la possibilità di sfruttare Talidomide e Bortezomib in associazione, anche nei pazienti con mieloma recidivante/refrattario. Recentemente uno studio di fase III, ha dimostrato che la combinazione VMP è più efficace del convenzionale MP nel trattamento del MM alla diagnosi nel paziente anziano⁽²⁹⁾.

CONCLUSIONI

Negli ultimi dieci anni, i nuovi farmaci stanno cambiando la terapia del mieloma multiplo, in particolar modo degli anziani. L'introduzione di Talidomide, Bortezomib e Lenalidomide ha permesso di ottenere risultati importanti in termini di tasso di risposta, intervallo libero da malattia e sopravvivenza globale. La possibilità di sottoporre a trapianto anche i pazienti con più di 65 anni, mediante riduzione del regime di condizionamento, ha esteso la coorte di pazienti ai quali è possibile offrire una delle alternative terapeutiche più vantaggiose. Per i pazienti anziani non candidabili al trapianto, sono attualmente disponibili diverse combinazioni, che usano i

Terapia	Schema del trattamento	Tossicità
<p>MPT (6 cicli mensili) M = Melphalan P = Prednisone T = Talidomide</p>	<p>Induzione: M = 4 mg/mq per OS (1-7) + P = 40 mg/mq per OS (1-7) + T = 100 mg/die (fino a recidiva)</p> <p>Mantenimento: T = 100 mg/die (fino a recidiva)</p> <p>Terapia di supporto: Enoxaparina 40 mg SC per tutta la durata del trattamento</p>	<p>Attenzione alla neuropatia periferica, alle TVP (profilassi con Enoxaparina) e infezioni</p>
<p>MPR (9 cicli di 4 settimane) M = Melphalan P = Prednisone R = Revlimid (Lenalidomide)</p>	<p>Induzione: M = 0.18 opp 0.25 mg/kg per OS (1-4) + P = 2 mg/kg per OS (1-4) + R = 5 o 10 mg per OS (per 21 gg)</p> <p>Mantenimento: R = 10 mg/die (per 21 gg intervallati da 1 settimana di pausa)</p> <p>Terapia di supporto: Ciprofloxacina e Aspirina</p>	<p>Neutropenia Trombocitopenia TVP (profilassi con aspirina) Infezioni</p>
<p>VMP Induzione (4 cicli di 6 settimane) + mantenimento (5 cicli di 5 settimane) V = Velcade (Bortezomib) M = Melphalan P = Prednisone</p>	<p>Induzione: M = 9 mg/mq per OS (1-4) + P = 60 mg/mq per OS (1-4) + V = 1.0 o 1.3 mg/mq EV (1, 4, 8, 15, 22, 25, 29, 32)</p> <p>Mantenimento: M = 9 mg/mq per OS (1-4) + P = 60 mg/mq per OS (1-4) + V = 1.0 o 1.3 mg/mq EV (1, 8, 15, 22)</p>	<p>Trombocitopenia Neutropenia Infezioni Neuropatia periferica</p>

Tabella III. Nuove terapie per i non candidati a ABMT.

Associazioni della terapia tradizionale MP con i farmaci di nuova generazione.

Nella tabella sono indicate anche le principali tossicità riscontrate con questo tipo di cicli.

farmaci di nuova generazione associati a MP, inducendo risposte cliniche e durata di remissione molto simili a quelli indotti dal trapianto autologo. *MPT* è ormai considerato la terapia standard nel paziente con mieloma multiplo alla diagnosi, anziano e non candidabile alle terapie ad alte dosi. *MPR* e *VMP* hanno evidenziato risultati di grande interesse, da confermare in futuro con studi randomizzati.

BIBLIOGRAFIA

1. Alexanian R., Dimopoulos M.A., Delasalle K., Barlogie B.: *Primary dexametason treatment for multiple myeloma*. Blood, 80, 887-890, 1992.
2. Anderson K., Prince H.M.: *Lenalidomide and thalidomide: an evolving paradigm in the management of multiple myeloma*. Semin Hematol, 42, S3-8, 2005.
3. Attal M., Harousseau J.L., Stoppa A.M., Sotto J.J., Fuzibet J.G., Rossi J.F., Casassus P., Maisonneuve H., Facon T., Ifrah N., Payen C., Bataille R.: *A prospective randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma*. Intergroup Français du Myelome. N Engl J Med, 335, 91-97, 1996.
4. Avet-Loiseau H., Attal M., Moreau P., Charbonnel C., Garban F., Hulin C., Leyvraz S., Michallet M., Yakoub-Agha I., Garderet L., Marit G., Michaux L., Voillat L., Renaud M., Grosbois B., Guillem G., Benboubker L., Monconduit M., Thieblemont C., Casassus P., Caillot D., Stoppa A.M., Sotto J.J., Wetterwald M., Dumontet C., Fuzibet J.G., Azais I., Dorvaux V., Zandecki M., Bataille R., Minvielle S., Harousseau J.L., Facon T., Mathiot C.: *Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroup Français du Myelome*. Blood, 109, 3489-3495, 2007.
5. Child J.A., Morgan G.J., Davies F.E., Owen R.G., Bell S.E., Hawkins K., Brown J., Drayson M.T., Selby P.J.: *High dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma*. N Engl J Med, 348, 1875-1883, 2003.
6. Ciechanover A., Orian A., Schwartz A.L.: *Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction*. Bioessays, 22, 442-451, 2000.

7. Facon T., Mary J.Y., Hulin C., Benboubker L., Attal M., Pegourie B., Renaud M., Harousseau J.L., Guillemin G., Chateaux C., Dib M., Voillat L., Maisonneuve H., Troncy J., Dorvaux V., Monconduit M., Martin C., Casassus P., Jaubert J., Jardel H., Doyen C., Kolb B., Anglaret B., Grosbois B., Yakoub-Agha I., Mathiot C., Avet-Loiseau H.: *Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial*. Lancet, 370, 1209-1218, 2007.
8. Facon T., Mary J.Y., Pégourie B., Attal M., Renaud M., Sadoun A., Voillat L., Dorvaux V., Hulin C., Lepeu G., Harousseau J.L., Eschard J.P., Ferrant A., Blanc M., Maloisel F., Orfeuvre H., Rossi J.F., Azaïs I., Monconduit M., Collet P., Anglaret B., Yakoub-Agha I., Wetterwald M., Eghbali H., Vekemans M.C., Maisonneuve H., Troncy J., Grosbois B., Doyen C., Thyss A., Jaubert J., Casassus P., Thielemans B., Bataille R.: *Dexamethasone-based regimens versus Melphalan-prednisone for elderly multiple myeloma patients ineligible for high-dose therapy*. Blood, 107, 1292-1298, 2006.
9. Greipp P.R., San Miguel J., Durie B.G., Crowley J.J., Barlogie B., Bladé J., Boccadoro M., Child J.A., Avet-Loiseau H., Kyle R.A., Lahuerta J.J., Ludwig H., Morgan G., Powles R., Shimizu K., Shustik C., Sonneveld P., Tosi P., Turesson I., Westin J.: *International Staging System for Multiple Myeloma*. J Clin Oncol, 23, 3412-3420, 2005.
10. Hernández J.M., García-Sanz R., Golvano E., Bladé J., Fernandez-Calvo J., Trujillo J., Soler J.A., Gardella S., Carbonell F., Mateo G., San Miguel J.F.: *Randomized comparison of dexamethasone combined with melphalan versus Melphalan with prednisone in the treatment of elderly patients with multiple myeloma*. Br J Haematol, 127, 159-164, 2004.
11. Jagannath S., Barlogie B., Berenson J., Siegel D., Irwin D., Richardson P.G., Niesvizky R., Alexanian R., Limentani S.A., Alsina M., Adams J., Kauffman M., Esseltine D.L., Schenkein D.P., Anderson K.C.: *A phase II study of two doses of Bortezomib in relapsed or refractory myeloma*. Br J Haematol, 127, 165-172, 2004.
12. Kumar S., Rajkumar S.V.: *Thalidomide and lenalidomide in the treatment of multiple myeloma*. Eur J Cancer, 42, 1612-1622, 2006.
13. Mateos M.V., Hernández J.M., Hernández M.T., Gutiérrez N.C., Palomera L., Fuertes M., Díaz-Mediavilla J., Lahuerta J.J., de la Rubia J., Terol M.J., Sureda A., Bargay J., Ribas P., de Arriba F., Alegre A., Oriol A., Carrera D., García-Laraña J., García-Sanz R., Bladé J., Prósper F., Mateo G., Esseltine D.L., van de Velde H., San Miguel J.F.: *Bortezomib plus Melphalan and prednisone in elderly untreated patients with multiple myeloma: results of a multicenter phase I/2 study*. Blood, 108, 2165-2172, 2006.
14. *Myeloma trialist collaborative group: Combination of chemotherapy versus melphalan plus prednisolone as treatment for multiple myeloma: an overview of 6633 patients from 27 randomized trials*. J Clin Oncol, 16, 3832-3842, 1998.
15. Palumbo A., Ambrosini M.T., Benevolo G., Pugno P., Pescosta N., Callea V., Cangialosi C., Caravita T., Morabito F., Musto P., Bringhen S., Falco P., Avonto I., Cavallo F., Boccadoro M.: *Bortezomib, Melphalan, Prednisone and Thalidomide for relapsed multiple myeloma*. Blood, 109, 2767-2772, 2007.
16. Palumbo A., Bringhen S., Liberati A.M., Caravita T., Falcone A., Callea V., Montanaro M., Ria R., Capaldi A., Zambello R., Benevolo G., Derudas D., Dore F., Cavallo F., Gay F., Falco P., Ciccone G., Musto P., Cavo M., Boccadoro M.: *Oral Melphalan, Prednisone and Thalidomide in elderly patients with multiple myeloma: update results of a randomized controlled trial*. Blood, 112, 3107-3114, 2008.

17. Palumbo A, Bringhen S., Falco P, Cavallo F, Ambrosini M.T., Avonto I., Gay F., Caravita T., Bruno B., Boccadoro M.: *Time to first progression but not B2-microglobulin predicts outcome in myeloma patients who receive thalidomide as salvage therapy.* Cancer, 110, 824-829, 2007.
18. Palumbo A., Bringhen S., Petrucci M.T., Musto P, Rossini F, Nunzi M., Lauta V.M., Bergonzi C., Barbui A., Caravita T., Capaldi A., Pregno P, Guglielmelli T, Grasso M., Callea V, Bertola A., Cavallo F, Falco P, Rus C., Massaia M., Mandelli F, Carella A.M., Pogliani E., Liberati A.M., Dammacco F, Ciccone G., Boccadoro M.: *Intermediate dose Melphalan improves survival of myeloma patients aged 50 to 70: results of a randomized controlled trial.* Blood, 104, 3052-3057, 2004.
19. Palumbo A., Falco P, Corradini P, Falcone A., Di Raimondo F, Giuliani N., Crippa C., Ciccone G., Omedè P, Ambrosini M.T., Gay F, Bringhen S., Musto P, Foà R., Knight R., Zeldis J.B., Boccadoro M., Petrucci M.T: *Melphalan, prednisone, and lenalidomide treatment for newly diagnosed myeloma: a report from the GIMEMA-Italian Multiple Myeloma Network.* J Clin Oncol, 25, 4459-4465, 2007.
20. Palumbo A., Rus C., Zeldis J.B., Rodeghiero F, Boccadoro M.: *Enoxaparin or aspirin for the prevention of recurrent thromboembolism in newly diagnosed myeloma patients treated with Melphalan, prednisone plus thalidomide or lenalidomide.* J Thromb Haemost, 4,1-4, 2006.
21. Palumbo A., Bringhen S., Bertola A., Cavallo F, Falco P, Massaia M., Bruno B., Rus C., Barbui A., Caravita T., Musto P, Pescosta N., Rossini F, Vignetti M., Boccadoro M.: *Multiple myeloma: comparison of two dose-intensive Melphalan regimens (100 vs 200mg/mq).* Leukemia, 18, 133-138, 2004.
22. *Protocol ECOG-E4A03. Lenalidomide and dexamethasone with or without thalidomide in treating patients with multiple myeloma.* <http://www.cancer.gov/search/Viewclinicaltrials.aspx>
23. Rajkumar S.V., Blood E., Vesole D., Fonseca R., Greipp P.R: *Phase III clinical trial of talidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone alone in newly diagnosed multiple myeloma: a clinical trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group.* J Clin Oncol, 24, 431-436, 2006.
24. Richardson P.G., Barlogie B., Berenson J., Singhal S., Jagannath S., Irwin D., Rajkumar S.V., Srkalovic G., Alsina M., Alexanian R., Siegel D., Orlovski R.Z., Kuter D., Limentani S.A., Lee S., Hideshima T., Esseltine D.L., Kauffman M., Adams J., Schenkein D.P., Anderson K.C.: *A phase II study of Bortezomib in relapsed/refractory myeloma.* N Engl J Med, 348, 2609-2617, 2003.
25. Richardson P.G., Hideshima T., Anderson K.C.: *Bortezomib a novel, first in class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancer.* Cancer control, 10, 361-369, 2003.
26. Richardson P.G., Jagannath S., Schlossman R: *A multi-center randomized., phase II study to evaluate the efficacy and safety of 2 CDC-5013 dose regimen when used alone or in combination with dexamethasone for the treatment of relapsed or refractory multiple myeloma.* Blood, 2003; 102: 235, abstract 2003.
27. Richardson P.G., Sonneveld P, Schuster M.W, Irwin D., Stadtmauer E.A., Facon T, Harousseau J.L., Ben-Yehuda D, Lonial S., Goldschmidt H., Reece D., San-Miguel J.F, Bladé J., Boccadoro M., Cavenagh J., Dalton W.S, Boral A.L, Esseltine D.L, Porter J.B, Schenkein D., Anderson K.C: *Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma.* N Eng J Med, 352, 2487-2498, 2005.

28. Ries L.A.G., Eisner M.P., Kosary C.L.: *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2000*. National Cancer Institute. Available at: http://seer.cancer.gov//csr/1975_2001.
29. San Miguel J.F, Schlag R, Khuageva N.K, Dimopoulos M.A, Shpilberg O, Kropff M, Spicka I, Petrucci M.T, Palumbo A., Samoiloa O.S, Dmoszynska A., Abdulkadyrov K.M., Schots R., Jiang B, Mateos M.V, Anderson K.C, Esseltine D.L, Liu K, Cakana A, van de Velde H, Richardson P.G.: *Bortezomib plus Melphalan and Prednisone for initial treatment of multiple myeloma*. N Engl J Med, 359, 906-917, 2008.
30. Schilling G., Dierlamm J., Hossfeld D.K.: *Prognostic impact of cytogenetic aberrations in patients with multiple myeloma or monoclonal gammopathy of unknown significance*. Hematol Oncol, 23. 102-107, 2005.
31. *SWOG: phase III randomized study of dexamethasone with or without CC-5013 in patients with newly diagnosed multiple myeloma*. http://multiplemyeloma.org/clinical_trials/ctm/4.04.144.html.
32. Tosi P., Zamagni E., Cellini C., Ronconi S., Patriarca F., Ballerini F., Musto P., Di Raimondo F., Ledda A., Lauria F., Masini L., Gobbi M., Vacca A., Ria R., Cangini D, Tura S, Baccarani M, Cavo M.: *Salvage therapy with talidomide in patients with advanced relapsed/refractory multiple myeloma*. Haematologica, 87, 408-414, 2002.
33. Voorhees P.M., Dees E.C, O'Neil B., Orlowski R.Z.: *The proteasome as target for cancer therapy*. Clin Cancer Res, 9, 6316-6325, 2003.

I NUOVI FARMACI

Antonio Palumbo

Divisione di Ematologia-Università degli Studi di Torino
Azienda Ospedaliero-Universitaria San Giovanni Battista-Torino

Key words: *Multiple myeloma / Mieloma multiplo*
 Talidomide / Talidomide
 Lenalidomide / Lenalidomide
 Bortezomib / Bortezomib

Abstract:

Recently new drugs have been introduced in the treatment of multiple myeloma, such as thalidomide, lenalidomide and bortezomib. These drugs have been tested in combination with more effective chemotherapy regimens, in particular with the combination melphalan and prednisone. Preliminary results are quite exciting. The new combinations induced a very high percentage of complete and partial response quite similar to those obtained with autologous transplant. Randomized studies have shown a significant increase in disease free survival and overall survival. Future studies will define if these new combinations with old chemotherapy and new drugs will replace autologous transplant in the treatment of multiple myeloma.

Riassunto:

Negli ultimi anni nuovi farmaci sono diventati disponibili per il trattamento del mieloma multiplo, tra questi la talidomide, la lenalidomide e il velcade. Questi farmaci sono stati testati in combinazione con le modalità di trattamento più efficaci, in particolare la combinazione melphalan e prednisone. I primi risultati sono brillanti. Queste combinazioni hanno permesso di ottenere percentuali di risposte complete e risposte parziali simili a quelle ottenute con il trapianto autologo. Studi randomizzati hanno dimostrato che l'aumento della risposta induce anche un aumento della durata della remissione e della sopravvivenza. Studi futuri dovranno confermare se le nuove combinazioni terapeutiche che associano chemioterapia ai nuovi farmaci saranno in grado di sostituire il trapianto autologo nel trattamento del mieloma multiplo.

Talidomide

Recentemente l'impiego della talidomide ha aperto nuove prospettive terapeutiche⁽⁷⁾. Numerosi gruppi cooperatori stanno valutando quale ruolo debba avere la talidomide nel trattamento del MM. Oltre all'associazione talidomide desametasone, numerose associazioni talidomide + chemioterapia + cortisonici sono in corso di valutazione. Tali associazioni hanno consentito di raggiungere risposte cliniche mai osservate in precedenza con le terapie convenzionali. In particolare, le associazioni talidomide melfalan (TM), melfalan-prednisone-talidomide (MPT)⁽³⁾, talidomide-adriamicina-desametasone (TAD) e ciclofosfamide-talidomide-desametasone (CTD) hanno evidenziato una probabilità di risposta parziale intorno all'80% ed un'incidenza di risposte complete intorno al 10-30%. Se questo netto incremento di risposte si tradurrà in un significativo prolungamento della durata di remissione e della sopravvivenza è oggetto di valutazione. Queste associazioni hanno altresì evidenziato l'insorgenza di nuove tossicità, in particolare un'importante incidenza di trombosi venose profonde che richiede profilassi eparinica e che, per motivi ancora non chiari, risulta essere ancor più elevata nei pazienti alla diagnosi rispetto a quelli in recidiva. La neuropatia è il secondo effetto collaterale indotto dalla talidomide, che peraltro non presenta tossicità ematologica di rilievo. Fondamentale è ricordare la teratogenicità della talidomide e il rischio che ne deriva dall'assunzione di questo farmaco da parte di donne fertili. La dimostrazione che la concentrazione di talidomide nello sperma umano è identica a quella che si riscontra nel siero potrebbe indicare un ruolo anche per il partner maschile nell'indurre malformazioni fetali.

Revlimid

Analogo della talidomide, possiede un importante vantaggio che è rappresentato dall'assenza di teratogenicità e sporadica neurotossicità. Al contrario della talidomide presenta tossicità ematologica. Il revlimid ha indotto una risposta clinica in circa il 30% dei pazienti affetti da MM in fase avanzata. Diversi studi clinici hanno evidenziato una buona risposta clinica all'associazione revlimid-cortisonici. Numerosi studi sono attualmente in corso al fine di valutare l'efficacia clinica di questo farmaco in combinazione con cortisonici e/o chemioterapici⁽⁴⁾.

Bortezomib

L'inibitore del proteasoma PS-341 appartiene ad una nuova classe di agenti con un'importantissima attività anti-mieloma. In uno studio di fase II,

L'efficacia di questo farmaco è stata valutata in pazienti pluritrattati e in fase avanzatissima di malattia. Il bortezomib ha indotto risposta clinica in circa il 30% dei pazienti, con risposta completa in circa il 10% dei casi⁽⁶⁾. In uno studio randomizzato, il bortezomib è stato confrontato con il trattamento con desametasone ad alte dosi ed è risultato significativamente superiore. L'analisi ad interim ha portato ad interruzione dello studio per manifesta superiorità del bortezomib rispetto al desametasone e non eticità nel prosieguo del protocollo randomizzato. Il bortezomib è stato ormai autorizzato all'immissione in commercio sia in Europa sia negli USA. Numerosi studi stanno valutando l'associazione bortezomib-cortisonici e/o chemioterapici⁽⁵⁾ e l'efficacia del bortezomib nel trattamento di induzione alla diagnosi. Il trattamento con bortezomib alla diagnosi ha indotto una risposta clinica nel 75% dei casi; l'incidenza di remissioni complete è stata del 33%. Nel paziente refrattario è stata valutata l'associazione bortezomib-talidomide, che ha indotto una percentuale di remissioni complete pari a il 25%. Il farmaco risulta essere particolarmente attivo in questa condizione. I principali effetti collaterali sono rappresentati da trombocitopenia e neuropatia. La trombocitopenia ha una durata molto breve. La trombocitopenia grave si verifica solo nel 10% dei pazienti. La neuropatia è principalmente sensoriale e regredisce in oltre il 70% dei pazienti dopo sospensione del farmaco. Un altro aspetto è rappresentato dall'associazione bortezomib-doxorubicina. Questa associazione ha indotto una percentuale di remissioni complete di circa il 30%.

Conclusioni

Per i pazienti affetti da MM, la probabilità di una vera guarigione, intesa come completa eradicazione della malattia, è bassa. D'altro canto, una quota sempre maggiore di pazienti trattati con trapianto autologo sopravvive oltre i 10 anni⁽¹⁾. Vi è un consenso generale sul fatto che il raggiungimento di un maggior numero di remissioni complete sia il principale obiettivo da prevedere al fine di indurre una remissione di malattia sempre più lunga. La possibilità di applicare questo approccio in pazienti di età pari o inferiore a 75 anni con dosi intermedie di melfalan ha ampliato significativamente il numero di pazienti che possono beneficiare dei trattamenti trapiantologici. Questi rimangono i trattamenti di scelta per i soggetti affetti da MM alla diagnosi. La scoperta di nuovi farmaci potrebbe presto cambiare la strategia terapeutica in questa patologia. A tutt'oggi, il trattamento chemioterapico convenzionale è riservato ai pazienti anziani che non sono candidabili ai regimi trapiantologici. Numerosi studi stanno valutando l'associazione nuovi farmaci-chemioterapia standard.

È tuttavia necessario attendere l'esito di tali studi prima di introdurre queste nuove associazioni nel trattamento standard del paziente anziano. Il trapianto allogenico rappresenta una speranza per il futuro specialmente oggi che nuovi regimi di condizionamento hanno reso meno tossico questo approccio⁽²⁾. L'applicazione sistematica della citogenetica e della genetica molecolare, in particolare del "gene expression profiling", consentirà una più precisa classificazione del MM ed una più dettagliata definizione della prognosi di ogni singolo paziente e darà l'opportunità al curante di effettuare trattamenti diversificati a seconda dell'indirizzo prognostico.

BIBLIOGRAFIA

1. Barlogie B., Shaughnessy J., Tricot G., Jacobson J., Zangari M., Anaissie E., Walker R., Crowley J.: *Treatment of multiple myeloma*. Blood. 103, 20-32, 2004.
2. Bruno B., Rotta M., Patriarca F., Mordini N., Allione B., Carnevale-Schianca F., Giaccone L., Sorasio R., Omede P., Baldi I., Bringhen S., Massaia M., Aglietta M., Levis A., Gallamini A., Fanin R., Palumbo A., Storb R., Ciccone G., Boccadoro M.: *A comparison of allografting with autografting for newly diagnosed myeloma*. N Engl J Med. 356, 1110-1120, 2007.
3. Palumbo A., Bringhen S., Caravita T., Merla E., Capparella V., Callea V., Cangialosi C., Grasso M., Rossini F., Galli M., Catalano L., Zamagni E., Petrucci M.T., De Stefano V., Ceccarelli M., Ambrosini M.T., Avonto I., Falco P., Ciccone G., Liberati A.M., Musto P., Boccadoro M.: *Italian Multiple Myeloma Network, GIMEMA: Oral melphalan and prednisone chemotherapy plus thalidomide compared with melphalan and prednisone alone in elderly patients with multiple myeloma: randomised controlled trial*. Lancet. 367, 825-831, 2006.
4. Palumbo A., Falco P., Corradini P., Falcone A., Di Raimondo F., Giuliani N., Crippa C., Ciccone G., Omede P., Ambrosini M.T., Gay F., Bringhen S., Musto P., Foa R., Knight R., Zeldis J.B., Boccadoro M., Petrucci M.T.: *Melphalan, Prednisone, and Lenalidomide Treatment for Newly Diagnosed Myeloma: A Report From the GIMEMA Italian Multiple Myeloma Network*. J Clin Oncol. 25, 4459-4465, 2007.
5. Palumbo A., Ambrosini M.T., Benevolo G., Pregno P., Pescosta N., Callea V., Cangialosi C., Caravita T., Morabito F., Musto P., Bringhen S., Falco P., Avonto I., Cavallo F., Boccadoro M.: *Bortezomib, melphalan, prednisone and thalidomide for relapsed multiple myeloma*. Blood. 109, 2767-2772, 2007.

6. Richardson P.G., Barlogie B., Berenson J., Singhal S., Jagannath S., Irwin D., Rajkumar S.V., Srkalovic G., Alsina M., Alexanian R., Siegel D., Orłowski R.Z., Kuter D., Limentani S.A., Lee S., Hideshima T., Esseltine D.L., Kauffman M., Adams J., Schenkein D.P., Anderson K.C: *A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma*. N Engl J Med. 348, 2609-2617, 2003.
7. Singhal S., Mehta J., Desikan R., Ayers D., Roberson P., Eddlemon P., Munshi N., Anaissie E., Wilson C., Dhodapkar M., Zeddis J., Barlogie B: *Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma*. N Engl J Med. 341, 1565-1571, 1999.

ASMA BRONCHIALE: ASPETTI FISIOPATOLOGICI E CLINICI

Beatrice Culla, Luisa Brussino, Caterina Bucca

Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana
Università degli Studi di Torino

Key words: *Asthma / Asma*
 Airway inflammation / Infiammazione delle vie aeree
 Bronchial hyperresponsiveness / Iperreattività bronchiale
 Extrathoracic airway / Iperreattività delle vie aeree
 hyperresponsiveness extratoraciche
 Corticosteroid treatment / Terapia corticosteroidea

Abstract:

Asthma is a multifactorial variable disease, including different phenotypes all leading to the same symptoms, that is wheezing, dyspnea and chest tightness. Symptoms are sustained by persistent airway inflammation, and by the consequent bronchial wall remodelling. The mechanisms underlying asthmatic inflammation are complex, involving at least 12 types of inflammatory cells and over 100 humoral mediators. Most asthmatic patients are atopic (extrinsic asthma), but a few patients are non-atopic (intrinsic asthma) and show tendency toward a more severe form of the disease. Approximately 5% of patients have severe asthma that is difficult to control with maximal inhaled therapy and for whom new therapeutic approaches are needed.

In the assessment of a patient with asthma-like symptoms, one has to bear in mind that several conditions may mimic bronchial asthma, such as cardiac asthma, chronic bronchitis, pulmonary embolism, obliterans bronchiolitis, cystic fibrosis, hypersensitivity pneumonitis, gastroesophageal reflux disease, and variable extrathoracic airway obstruction, typical of vocal cord dysfunction (VCD). We found that VCD may be diagnosed by histamine inhalation challenge, on the basis of a progressive decrease of inspiratory airflow rates (EAHR), in contrast with asthma that is characterized by a progressive decrease of expiratory airflow rates. By this test, we found that EAHR is frequently sustained by inflammatory diseases of the upper airways, and may trigger reflex bronchospasm and asthma-like symptoms.

A exhaustive pathophysiologic analysis of patients with asthmatic symptoms is crucial for an appropriate clinical and therapeutical assessment.

Riassunto:

L'asma è una malattia multifattoriale eterogenea, che comprende differenti fenotipi che si manifestano con gli stessi sintomi, ovvero: sibili respiratori, tosse, dispnea e costrizione toracica. I sintomi sono l'espressione dell'infiammazione persistente e del conseguente rimodellamento delle vie aeree. I meccanismi responsabili dell'infiammazione asmatica sono complessi, coinvolgendo almeno 12 tipi di cellule infiammatorie e più di 100 mediatori umorali. La maggior parte dei pazienti asmatici sono atopici (asma estrinseca) e una minoranza sono non atopici (asma intrinseca). Questi ultimi tendono ad avere una forma più grave di malattia. Circa il 5% dei pazienti ha un'asma grave, che è difficile da tener sotto controllo anche con dosi massimali di terapia inalatoria; per questi pazienti sono necessari nuovi approcci terapeutici.

Nella valutazione di un paziente con sintomi asmatici, si deve tener presente che varie condizioni possono simulare l'asma bronchiale, quali l'asma cardiaca, la bronchite cronica, l'embolia polmonare, la bronchiolite obliterante, la fibrosi cistica, la polmonite da ipersensibilità, il reflusso gastroesofageo e infine l'ostruzione variabile delle vie aeree extratoraciche, caratteristica della disfunzione delle corde vocali (VCD). Abbiamo osservato che la VCD può essere diagnosticata mediante test di provocazione con istamina, sulla base di una progressiva riduzione dei flussi inspiratori (EAHR), a differenza dell'asma che è caratterizzata da una riduzione dei flussi espiratori. Con questo test, abbiamo verificato che la EAHR è spesso sostenuta da patologie infiammatorie delle vie aeree superiori, può causare broncospasmo riflesso e sintomi asmatiformi.

Un approfondito studio fisiopatologico del paziente con sintomatologia asmatica è fondamentale per un corretto inquadramento clinico e terapeutico.

L'asma è una malattia multifattoriale eterogenea, che comprende differenti fenotipi che si manifestano con gli stessi sintomi, ovvero: sibili respiratori, tosse, dispnea e costrizione toracica. Questi sintomi, che un tempo si consideravano unicamente dovuti al broncospasmo e all'ipersecrezione bronchiale, oggi sono considerati l'espressione dell'infiammazione persistente e del rimodellamento delle vie aeree.

Il concetto di infiammazione è entrato a far parte della definizione di asma, riportata nelle linee guida della “*Global Initiative for asthma (GINA)*”(9) (Tabella I).

Definizione di asma nel documento GINA (edizione 2006)
<p>L'asma è una malattia infiammatoria cronica delle vie aeree caratterizzata da:</p> <ul style="list-style-type: none"> – Infiltrazione di cellule infiammatorie, rilascio di mediatori e rimodellamento strutturale delle vie aeree – Episodi ricorrenti di dispnea, respiro sibilante, tosse e senso di costrizione toracica – Ostruzione bronchiale (di solito reversibile spontaneamente o dopo trattamento farmacologico) – Iperreattività bronchiale

Tabella I. Definizione dell'asma secondo le linee della *Global Initiative for Asthma*.

L'elemento clinico fondamentale dell'asma è l'ostruzione bronchiale, che ha carattere accessionale e reversibile. Alla base dell'ostruzione c'è l'infiammazione delle vie aeree, che consiste nell'infiltrazione della parete bronchiale da parte di cellule infiammatorie, in particolare granulociti eosinofili e mastociti, nel rilascio di mediatori infiammatori, e nel rimodellamento strutturale delle vie aeree. Quest'ultimo è caratterizzato da ipertrofia/ipertrofia della muscolatura liscia e da fibrosi sub-epiteliale.

È ampiamente riconosciuto un substrato genetico complesso della malattia.

I meccanismi responsabili dell'infiammazione asmatica⁽²⁾ sono complessi, coinvolgendo almeno 12 tipi di cellule infiammatorie e più di 100 mediatori umorali.

Tra le varie cellule i linfociti T, CD4+ (helper), polarizzati verso il tipo Th2, hanno un ruolo fondamentale nell'orchestrare la risposta infiammatoria

allergica, attraverso la produzione di citochine specifiche, quali IL-4 e IL-13. Queste due citochine agiscono sia direttamente sulle cellule muscolari lisce ed epiteliali bronchiali, inducendo iperreattività delle vie aeree, sia esercitando la loro azione helper sui linfociti B, inducendoli a produrre immunoglobuline E (IgE), gli anticorpi responsabili delle sindromi allergiche. Si tratta di una risposta immunitaria a peptidi (allergeni) derivati da molecole proteiche processate da cellule dendritiche e presentati in associazione con molecole HLA di classe II. Tale tipo di risposta è caratteristico dell'asma estrinseca, così definita per la possibilità di identificarne una causa esogena, che agisce attraverso un meccanismo mediato da anticorpi della classe delle IgE.

Alla produzione di IgE contribuiscono altri tipi di cellule, coinvolte nell'infiammazione asmatica, quali mastociti e basofili, che interagiscono sui linfociti B sempre tramite la produzione di citochine interleuchine (IL-4, IL-13 e IL-18) e molecole di adesione. I mastociti producono anche citochine in grado di indurre infiammazione, quali IL-1 e TNF (Tumour Necrosis Factor) – α , e di attivare la produzione di cellule infiammatorie, quali GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor), e IL-5, in grado di stimolare la proliferazione e l'attivazione dei granulociti eosinofili, di aumentarne la sopravvivenza e favorirne la degranolazione. Gli eosinofili hanno un ruolo cruciale nella patogenesi dell'asma allergico. Essi sono un'importante fonte di leucotrieni, mediatori della contrazione della muscolatura liscia bronchiale e dell'aumento della permeabilità vascolare. La Proteina Basica Maggiore, contenuta nei loro granuli, è in grado di danneggiare direttamente l'epitelio bronchiale e di favorire la degranolazione dei basofili e dei mastociti. La concentrazione degli eosinofili nella mucosa bronchiale è mediata dall'espressione di molecole di adesione sulla superficie cellulare. Tali molecole permettono agli eosinofili di uscire dai vasi e raggiungere l'interstizio, grazie all'intervento di particolari citochine capaci di attrarre elementi cellulari, dette chemochine (es. eotassina e RANTES)⁽¹²⁾.

Per ragioni di spazio, non tratteremo delle altre cellule coinvolte nella patogenesi o nella modulazione del'asma, quali le cellule NK (Natural Killer), i linfociti Th-17 e i linfociti T regolatori⁽²⁾.

I meccanismi che conducono al broncospasmo nell'asma allergica sono schematizzati nella Figura 1. Le IgE specifiche, sintetizzate in risposta ad allergeni ambientali, si fissano al recettore Fc ϵ RI sulla membrana delle mastociti (e dei basofili), che si trovano sulla superficie mucosa del naso e dei bronchi. L'esposizione ad allergeni specifici innesca, entro pochi minuti, la liberazione di mediatori (istamina, leucotrieni, prostaglandine, ecc), che stimolano vasi, nervi e ghiandole, causando la classica sintomatologia

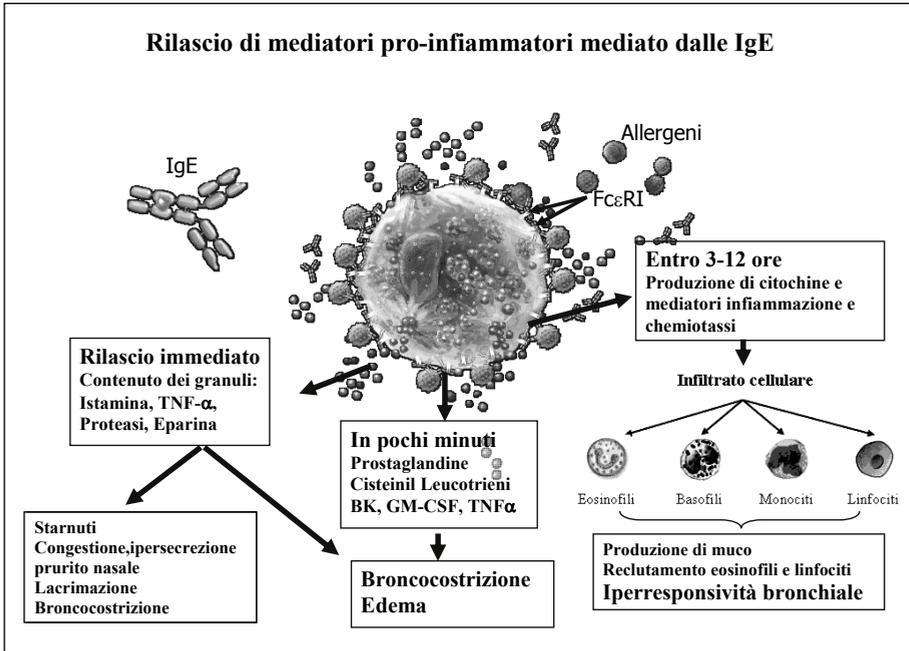


Figura 1. Patogenesi del broncospasmo nell'asma allergica.

ritica. La risposta immediata è seguita da una risposta tardiva a 3-12 ore, caratterizzata dalla comparsa di cellule infiammatorie, richiamate da fattori chemiotattici, che contribuiscono all'ulteriore rilascio di mediatori e alla persistenza dei sintomi.

Se l'infiammazione allergica gioca un ruolo importante della fisiopatologia dell'asma, essa non basta da sola a giustificare la complessità della malattia. Altri fattori sia esogeni che endogeni sono coinvolti.

Esiste infatti una forma di asma, definita intrinseca, per la quale non è possibile identificare una causa esogena (familiarità allergica assente, test allergologici negativi). L'asma intrinseca in genere esordisce clinicamente in età più avanzata, ed è spesso associata a infezione virale delle prime vie aeree.

Si suppone che responsabili di tale tipo di asma siano le cellule NKT che non riconoscono i peptidi sulle pareti delle cellule presentanti l'antigene, bensì i glicopeptidi di membrana.

La complessità dell'asma è attestata anche dalla variabile risposta alla terapia con corticosteroidi che, per l'ampio spettro di attività antinfiammatoria, sono considerati il caposaldo terapeutico della malattia, sia per via sistemica che

per via inalatoria. I corticosteroidi sopprimono l'infiammazione inducendo il reclutamento dell'enzima nucleare istone deacetilasi 2 (HDAC2), iperespresso nei soggetti asmatici, che induce l'attivazione dei geni dell'infiammazione attraverso la loro deacetilazione. Purtroppo, esistono condizioni di resistenza a tali farmaci, quali l'asma grave, l'asma nei fumatori, l'asma scatenata da infezioni virali. Si suppone che in tali condizioni, la resistenza ai corticosteroidi dipenda proprio da ridotta attività della HDAC2⁽¹⁾.

Un altro elemento che gioca un ruolo fondamentale nella fisiopatologia dell'asma è l'epitelio bronchiale, innanzitutto per la sua funzione di barriera verso la penetrazione di sostanze esogene^(14,16,18). Tale funzione viene persa quando l'epitelio viene danneggiato dalle proteasi associate a inquinanti, allergeni, microbi. Altre importanti attività delle cellule epiteliali consistono nell'espressione di molti tipi di recettori, come i TLR (Toll-like receptors) e i PAR (protease-activated receptors) che riconoscono allergeni, inquinanti e microbi. L'attivazione di tali cellule esita nella produzione di chemochine e citochine che attraggono le cellule dendritiche che a loro volta attivano i linfociti T, innescando la cascata infiammatoria dell'asma.

L'epitelio riveste un ruolo importante nei meccanismi di riparazione delle vie aeree. Questa attività dipende dall'interazione con le sottostanti cellule mesenchimali (fibroblasti): fibroblasti ed epitelio costituiscono l'unità di trofismo epitelio mesenchimale (EMTU)⁽¹²⁾, unità molto importante nel determinare le caratteristiche fisiopatologiche dell'asma. Molti fattori ambientali, oltre agli allergeni, interagiscono con la EMTU, quali virus, fumo di sigarette, inquinanti, per iniziare il danno tissutale e le risposte riparative aberranti che determinano infine il rimodellamento delle vie aeree⁽²⁰⁾.

Il rimodellamento consiste in un insieme di anomalie mediate dalla liberazione di fattori di crescita, quali EGF (epidermal growth factor), TGF-[alfa] e [beta], KGF (keratinocyte growth factor), FGFs (fibroblast growth factors), IGFs (insulin-like growth factors) e VEGFs (vascular endothelial growth factors). I fattori di crescita profibrogeni (inclusi i membri della famiglia del fattore di crescita epidermica, dei fibroblasti e del TGF-b) agiscono sulle cellule mesenchimali primitive per convertirle in miofibroblasti. Queste cellule stromali mostrano un'elevata capacità di sintetizzare nuova matrice extracellulare (ECM) e generare potenti mitogeni e fattori di differenziazione per le cellule muscolari lisce, con conseguente sviluppo di iperplasia del muscolo liscio. Le conseguenze sono: metaplasia delle cellule epiteliali e delle cellule goblet, che incrementano la secrezione di muco, aumentato spessore dell'epitelio, fibrosi con eccessivo deposito di ECM nella membrane basale,

angiogenesi e aumentato spessore del muscolo liscio, conseguente a iperplasia delle cellule muscolari e dei miofibroblasti.

Rimodellamento bronchiale
<ul style="list-style-type: none"> – Deposito di proteine e collagene della matrice extracellulare – Reclutamento, attivazione di fibroblasti e miofibroblasti – Iperplasia delle cellule del muscolo liscio – Iperplasia delle goblet cells e delle ghiandole sottomucose – Angiogenesi

Tabella II. Caratteristiche del rimodellamento bronchiale nell'asma.

La trasformazione della parete compromette le caratteristiche fisiologiche dei bronchi e la risposta alla terapia corticosteroidica.

Finchè l'EMTU interagisce con cellule e mediatori associati con l'infiammazione tipo TH2, l'asma è sensibile ai corticosteroidi⁽¹¹⁾

Quando l'EMTU assume un ruolo più attivo nel produrre rimodellamento, l'ostruzione delle vie aeree diviene via via più refrattaria ai corticosteroidi⁽³⁾ e si dissocia dai fattori ambientali (es. allergeni) importanti negli stadi più precoci della malattia.

Con il progredire del rimodellamento, cambia anche la presentazione clinica dell'asma che, da un quadro di ostruzione reversibile delle vie aeree passa a uno stadio di ostruzione fissa, dovuta alla maggior componente fibrotica della parete bronchiale. In questo stadio della malattia, i corticosteroidi inalatori, anche ad alte dosi, non risultano più efficaci, e la reversibilità dell'ostruzione con broncodilatatori si riduce progressivamente a causa del deposito di matrice, del ridotto accesso alle vie aeree degli aerosol inalati e della presenza nel lume di muco e detriti cellulari. Questo stadio grave della malattia è presente in circa il 10 % della popolazione asmatica.

Nella Figura 2, è riportata la sequenza delle spirometrie nel corso di 10 anni, di una paziente seguita presso il nostro ambulatorio, che ha sviluppato progressivo rimodellamento delle vie aeree, nonostante terapia cronica con corticosteroidi inalatori. Oltre alla riduzione dei volumi e dei flussi aerei, anche la risposta al broncodilatatore si è progressivamente ridotta.

L'ispessimento delle pareti bronchiali è stato dimostrato in vivo, mediante TC spirale, da un'interessante studio sulla parete bronchiale dei pazienti

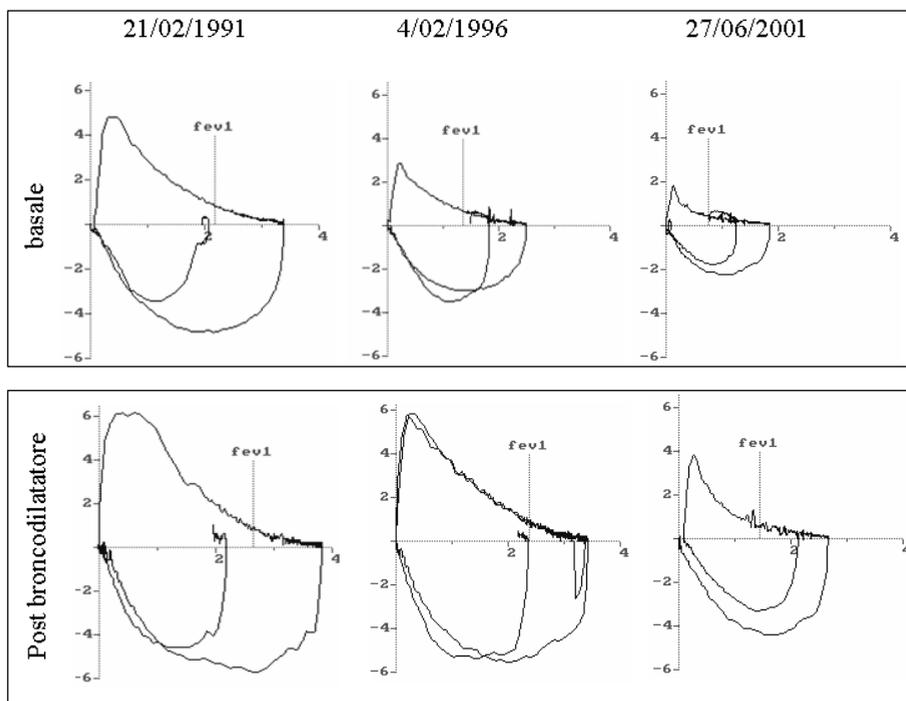


Figura 2. Progressivo peggioramento della spirometria (pannello superiore) e della risposta al broncodilatatore (pannello inferiore) nel corso di 10 anni, di una paziente asmatica che ha sviluppato un rimodellamento delle vie aeree, nonostante terapia cronica con corticosteroidi inalatori.

asmatici; lo spessore della parete bronchiale è risultato correlato alla durata e alla gravità della malattia e al grado di ostruzione delle vie aeree⁽¹⁷⁾.

In base a quanto detto finora, emerge la complessità dell'asma, soprattutto quella severa, con le possibili ricadute sulle strategie terapeutiche. A questo proposito vorremmo riportare la considerazione di Steven Holgate⁽¹⁰⁾, uno dei più illustri "opinion leader" nell'asmologia: "purtroppo, nonostante l'enorme incremento delle nostre conoscenze dei meccanismi immunologici coinvolti nell'asma sia allergica che intrinseca, è sconcertante che queste conoscenze non si siano tradotte in nuovi trattamenti, alternativi ai corticosteroidi". Tra le nuove terapie per l'asma, molte ancora in fase sperimentale, l'unica che abbia dimostrato un'efficacia nel ridurre le riacutizzazioni nell'asma grave è risultata quella con omalizumab, l'anticorpo anti IgE⁽¹³⁾. Il suo uso è stato approvato solo nell'asma sostenuta da allergeni perenni.

Attualmente, l'unico trattamento innovativo è la somministrazione dell'anticorpo anti-IgE omalizumab, approvato dall'AIFA nel 2006, per la terapia dell'asma grave persistente, non controllata dalla terapia tradizionale con corticosteroidi inalatori e β 2-agonisti a lunga durata d'azione.

Vista l'eterogeneità dell'asma, molte proposte classificative sono state avanzate al fine di riconoscere differenti fenotipi che possano migliorare l'approccio alla malattia^(8,15,21), basati sulla gravità, l'età di esordio, il tipo di stimolo, o il tipo di infiammazione. Tutti queste proposte sono valide, ma l'approccio ottimale dovrebbe aiutare a delineare i meccanismi fisiopatologici operanti nel singolo paziente.

La classificazione dell'asma basata sul tipo di infiammazione distingue:

- fenotipo eosinofilo a inizio precoce, con buona risposta ai corticosteroidi. È stato osservato che una strategia terapeutica basata sulla riduzione degli eosinofili nell'escreato era efficace nel ridurre le riacutizzazioni della malattia. Esiste però un sottogruppo di pazienti nei quali l'eosinofilia non risponde ai corticosteroidi; si tratta spesso di pazienti con asma a insorgenza tardiva e con intolleranza all'aspirina, per i quali si può ipotizzare un fenotipo differente da quello eosinofilo classico testè descritto.
- fenotipo neutrofilo, prevalentemente non allergico, più frequente nelle donne di mezza età. Può essere associato al fumo di sigarette, all'esposizione a inquinanti a basso peso molecolare, e all'obesità. È più frequente nei pazienti con asma grave e con ostruzione irreversibile, ma è meno soggetto a gravi riacutizzazioni
- fenotipo paucigranulocitario. È una condizione poco delineata: non è chiaro se sia un reale fenotipo. Risponde scarsamente ai corticosteroidi

Nel delineare i fenotipi dell'asma, è bene ricordare le caratteristiche fondamentali della malattia⁽⁹⁾, riportate nella sua definizione (Tabella I).

Varie sono le condizioni che possono essere confuse o simulare l'asma bronchiale, quali l'asma cardiaca, la bronchite cronica, l'embolia polmonare, la bronchiolite obliterante, la fibrosi cistica, la polmonite da ipersensibilità, il reflusso gastroesofageo e infine l'ostruzione variabile delle vie aeree extratoraciche. Questa condizione, anche denominata disfunzione delle corde vocali (VCD), consiste in una adduzione paradossa intermittente delle corde vocali, prevalentemente durante inspirazione ma talora in espirazione, che causa dispnea di grado variabile da lieve disagio a grave ambascia respiratoria. La dispnea talvolta è così intensa da richiedere intubazione o tracheotomia.

La diagnosi differenziale con l'asma si basa sulle caratteristiche degli attacchi dispnoici che nella VCD sono in genere di breve durata (pochi minuti)

e autolimitantisi, causano senso di costrizione in gola, soprattutto in fase inspiratoria, tendono a peggiorare con l'iperventilazione e generano stridore e tosse abbaiante. Nell'asma, invece, le crisi di broncospasmo non si risolvono mai entro pochi minuti, sono associate a senso di costrizione toracica e generano sibili espiratori.

Abbiamo precedentemente osservato che le due condizioni sono associate a differenti caratteristiche fisiopatologiche che si possono evidenziare mediante test di provocazione con inalazione di istamina. Nei soggetti con VCD si osserva una progressiva riduzione dei flussi inspiratori massimali, suggestiva di iperresponsività delle vie aeree extratoraciche (EAHR). Mediante laringoscopia a fibre ottiche abbiamo potuto verificare che la caduta dei flussi inspiratori indotta dall'inalazione di istamina corrisponde alla riduzione dell'area glottica⁽⁵⁾. Alla base della EAHR spesso sono presenti malattie infiammatorie delle vie aeree superiori, quali rinosinusite, faringite e laringite. Nell'asma, a differenza della VCD, l'inalazione di istamina produce una progressiva riduzione dei flussi espiratori, espressione di broncocostrizione. Tale risposta denota iperresponsività bronchiale (BHR), caratteristica fondamentale dell'asma. Sebbene VCD e asma riconoscano caratteristiche cliniche e patogenetiche differenti, esse possono coesistere nello stesso individuo.

Abbiamo sottoposto a test con istamina un'ampia casistica di pazienti con sintomi simil asmatici (respiro sibilante, tosse, dispnea) che non avevano ancora ricevuto una diagnosi specifica per valutare se era possibile identificare la provenienza dei sintomi⁽⁴⁾. I risultati del test sono riportati nella Figura 3. L'istamina non ha evocato alcuna risposta nel 25% dei casi, ha prodotto una riduzione isolata dei flussi inspiratori (ostruzione delle vie aeree extratoraciche) nel 24%, una riduzione isolata dei flussi espiratori (ostruzione bronchiale) nell'11%, e un'ostruzione combinata dei bronchi e delle vie aeree extratoraciche nel 40% dei casi. Questi risultati indicano che, in circa un quarto dei soggetti, l'unica anomalia responsabile dei sintomi asmatici era la disfunzione delle vie aeree extratoraciche.

Abbiamo successivamente verificato⁽⁶⁾ che la EAHR è molto frequente nei soggetti non asmatici con sinusite cronica riacutizzata e che in questi soggetti può causare un'iperresponsività bronchiale, del tutto simile a quella osservata nei soggetti asmatici, ma che regredisce con il solo trattamento della sinusite. Studiando il rapporto struttura-funzione⁽¹⁹⁾, abbiamo osservato che alla base della EAHR nella sinusite c'è il danno dell'epitelio rinofaringeo e che l'associazione con la BHR è caratterizzata da proliferazione delle fibre nervose nella sottomucosa e dalla presenza di eosinofili nel lavaggio nasale.

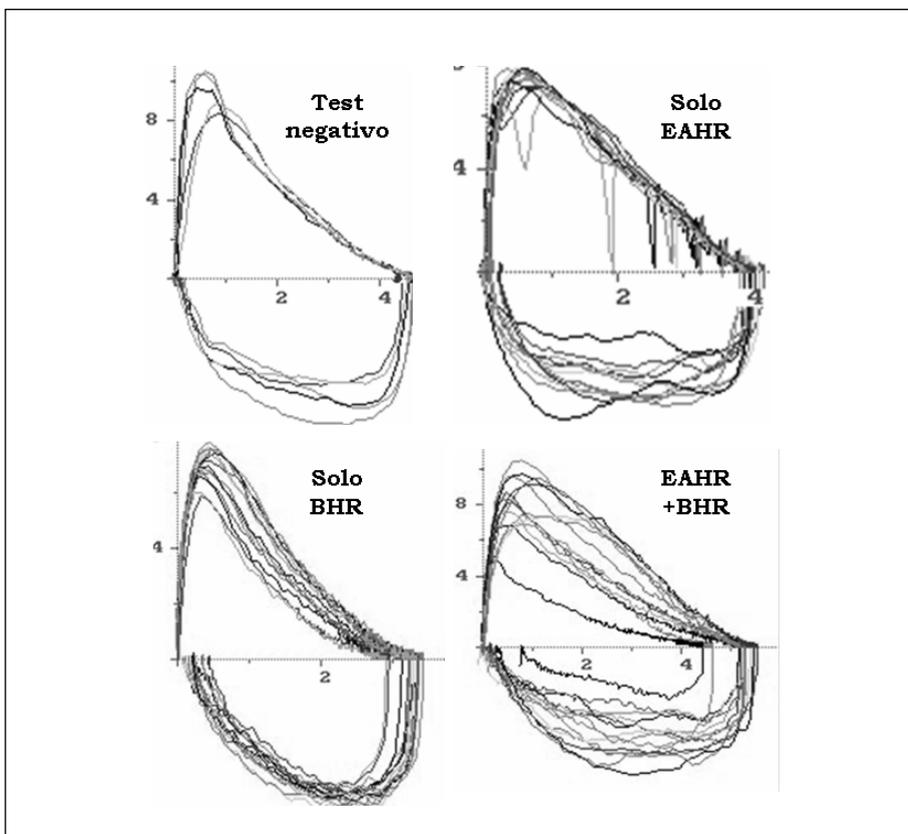


Figura 3. Tipi di risposta al test di provocazione con istamina nei pazienti con sintomi asmaticiformi che non hanno ancora ricevuto una diagnosi specifica. L'istamina non ha evocato alcuna risposta nel 25% dei casi, ha prodotto una riduzione isolata dei flussi inspiratori (ostruzione delle vie aeree extratoraciche) nel 24%, una riduzione isolata dei flussi espiratori (ostruzione bronchiale) nell'11%, e un'ostruzione combinata dei bronchi e delle vie aeree extratoraciche nel 40% dei casi.

Infine, riportiamo il caso singolare di un giovane di 18 anni inviato al nostro ambulatorio con la diagnosi di asma grave con frequenti accessi al pronto soccorso (circa 20 in 2 anni)⁽⁷⁾, nel quale gli attacchi dispnoici corrispondevano a episodi di angioedema dell'ugola scatenati dall'assunzione di alcuni alimenti. Le crisi regredirono con l'uvulectomia: l'esame istologico rivelò un cospicuo infiltrato di eosinofili.

L'asma è tra le più frequenti malattie croniche mondiali: si stima che circa 300 milioni di persone ne siano affette. A fronte delle sempre crescenti

conoscenze sui meccanismi patogenetici, la terapia dell'asma, soprattutto dell'asma grave, deve ancora essere sviluppata.

Un approfondito studio fisiopatologico del paziente asmatico è fondamentale per un corretto inquadramento clinico e terapeutico.

BIBLIOGRAFIA

1. Adcock I.M., Barnes P.J.: *Molecular mechanisms of corticosteroid resistance*. Chest 134, 394-401, 2008.
2. Barnes P.J.: *Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. Nat. Rev. Immunol. 8, 183-192, 2008.
3. Beckett P.A., Howarth P.H.: *Pharmacotherapy and airway remodelling in asthma?* Thorax. 58, 163-74, 2003.
4. Bucca C., Rolla G., Brussino L., De Rose V., Bugiani M.: *Are asthma-like symptoms due to bronchial or extrathoracic airway dysfunction?* Lancet 346, 791-795, 1995.
5. Bucca C., Rolla G., Scappaticci E., Baldi S., Caria E., Oliva A.: *Histamine hyperresponsiveness of the extrathoracic airway in patients with asthmatic symptoms*. Allergy 46, 147-153, 1991.
6. Bucca C., Rolla G., Scappaticci E., Chiampo F., Bugiani M., Magnano M., D'Alberto M.: *Extrathoracic and intrathoracic airway responsiveness in sinusitis*. J. Allergy Clin. Immunol. 95, 52-59, 1995.
7. Bucca C.B., Brussino L., Cavalot A., Cicolin A., Cortesina G., Baron P., Pagano M., Rolla G.: *Histamine inhalation challenge in recurrent uvula angioedema*. J. Allergy Clin. Immunol. 112, 799-802, 2003.
8. Fabbri L.M., Romagnoli M., Corbetta L., Casoni G., Busljetic K., Turato G., Ligabue G., Ciaccia A., Saetta M., Papi A.: *Differences in airway inflammation in patients with fixed airflow obstruction due to asthma or chronic obstructive pulmonary disease*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 167, 418-424, 2003.
9. *Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. NHLBI/WHO Workshop Report. GINA2002*, Report No. 02-3659. National Institute of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute, Bethesda, 2002.
10. Holgate S.T., Holloway J., Wilson S., Howarth P.H., Haitchi H.M., Babu S., Davies D.E.: *Understanding the pathophysiology of severe asthma to generate new therapeutic opportunities*. J. Allergy Clin. Immunol. 117, 496-506, 2006.

11. Holgate S.T., Polosa R.: *Treatment strategies for allergy and asthma. Nature reviews. Immunology*, 8, 218-230, 2008.
12. Holgate S.T.: *Epithelium dysfunction in asthma. J. Allergy Clin. Immunol.* 120, 1233-1244, 2007.
13. Humbert M., Beasley R., Ayres J., Slavin R., Hébert J., Bousquet J., Beeh K.M., Ramos S., Canonica G.W., Hedgcock S., Fox H., Blogg M., Surrey K.: *Benefits of omalizumab as add-on therapy in patients with severe persistent asthma who are inadequately controlled despite best available therapy (GINA 2002 step 4 treatment): INNOVATE. Allergy* 60, 309-316, 2005.
14. Janssen-Heininger Y.M., Poynter M.E., Aesif S.W., Pantano C., Ather J.L., Reynaert N.L., Ckless K., Anathy V., van der Velden J., Irvin C.G., van der Vliet A.: *Nuclear factor kappaB, airway epithelium, and asthma: avenues for redox control. Proc. Am. Thorac. Soc.* 6, 249-255, 2009.
15. King C.S., Moores L.K.: *Clinical Asthma Syndromes and Important Asthma Mimics. Respir. Care* 53, 568-580, 2008.
16. Lordan J.L., Bucchieri F., Richter A., Konstantinidis A., Holloway J.W., Thornber M., Puddicombe S.M., Buchanan D., Wilson S.J., Djukanovic R., Holgate S.T., Davies D.E.: *Cooperative effects of Th2 cytokines and allergen on normal and asthmatic bronchial epithelial cells. J. Immunol.* 1, 169, 407-414, 2002.
17. Niimi A., Matsumoto H., Amitani R., Nakano Y., Mishima M., Minakuchi M., Nishimura K., Itoh H., Izumi T.: *Airway wall thickness in asthma assessed by computed tomography. Relation to clinical indices. Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162, 1518-1523, 2000.
18. Reynaert N.L., Ckless K., Anathy V., van der Velden J., Irvin C.G., van der Vliet A.: *Nuclear Factor kB, Airway Epithelium, and Asthma. Avenues for Redox Control. Proc. Am. Thorac. Soc.* 6, 249-255, 2009.
19. Rolla G., Colagrande P., Scappaticci E., Bottomicca F., Magnano M., Brussino L., Dutto L., Bucca C.: *Damage of the pharyngeal mucosa and hyperresponsiveness of airway in sinusitis. J. Allergy Clin. Immunol.* 100, 52-57, 1997.
20. Takizawa H.: *Novel strategies for the treatment of asthma. Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* 1, 13-19, 2007.
21. Wenzel S.E.: *Eosinophils in Asthma - Closing the Loop or Opening the Door? N. Engl. J. Med.* 360, 1026-1028, 2009.

I COMPLESSI MECCANISMI DELL'IPERRESPONSIVITÀ BRONCHIALE

Carlo Gulotta¹, Riccardo Pellegrino²

¹ SCDO Malattie dell'Apparato Respiratorio ad indirizzo Fisiopatologico, Dipartimento di Fisiopatologia Cardiorespiratoria, AOU San Luigi Gonzaga - Orbassano

¹ SSD Allergologia e Fisiopatologia Respiratoria; ASO Santa Croce e Carle - Cuneo

Key words: *Asthma / Asma*
 Airway hyperresponsiveness / Iperresponsività bronchiale
 Methacoline / Metacolina
 Airway smooth muscle / Muscolo liscio bronchiale
 Forced oscillation / Tecnica delle
 technique oscillazioni forzate

Abstract:

Airway hyperresponsiveness is defined as an exaggerated airway narrowing in response to a variety of chemical and physical stimuli that have little or no effects in healthy subjects. *In vivo* it is documented by a leftward and upward shift of the dose-response curve to constrictor agents such as methacoline. The observation that exaggerated airway narrowing in asthma is associated with airway inflammation and remodelling of airway structure has led in the past decades to the notion that airway inflammation was the causal pathophysiological mechanism of asthma. This concept has been recently questioned as many findings indicate that the primary functional abnormality in asthma cannot simply be explained on the basis of specific inflammatory pathways without invoking a primary involvement of airway smooth muscle (ASM). In parallel with this developments, many studies have improved current understanding of ASM in terms of its structural plasticity, functional dynamics and interaction with its local environment both within and outside the airway wall. In the present review we will explore the mechanisms of ASM activation with a special focus on the geometric factor determining the magnitude of reduction in airway calibre *in vivo*. In addition, we will consider the effects of ventilation and lung volumes on the response of the airways constrictor agents. At last, we will present the aim of our ongoing study on analysis of the temporal trend of airway resistance with the use of the forced oscillation technique in collaboration with the Bioengineering Department of the Politecnico of Milan. This is a new means to track the most important functional feature of asthma, *i.e.*, fluctuation of bronchial tone over time.

Riassunto

L'iperresponsività bronchiale è definita come una precoce ed eccessiva ostruzione delle vie aeree in risposta a diversi stimoli chimici o fisici che hanno uno scarso o addirittura nessun effetto nei soggetti sani ed è documentabile *in vivo* da uno spostamento a sinistra e verso l'alto della curva dose risposta ad agenti costrittori come la metacolina. È stato osservato che tale caratteristica dell'asma è associata ad infiammazione e *remodeling* del muscolo liscio bronchiale. Questo ha portato in passato ad una visione secondo cui il muscolo liscio bronchiale era soltanto un effettore che rispondeva ad una causa primaria da riconoscersi nell'infiammazione. Questo assunto è stato recentemente rivisto poiché molti studi hanno indicato che il muscolo liscio bronchiale gioca un ruolo eziologico a sé nella patogenesi dell'asma. Questo articolo analizza il muscolo liscio bronchiale sotto vari punti di vista: meccanismi di attivazione, capacità di generare forza, fattori geometrici in grado di influenzare il calibro delle vie aeree *in vivo*. Dopo una disamina del ruolo del carico interno ed esterno vengono presi in esame gli studi più recenti sull'iperresponsività bronchiale *in vivo*, e degli effetti della ventilazione e dei cambi di volume polmonare su di essa. In questo contesto si inserisce lo studio che il nostro Dipartimento ha intrapreso con il Dipartimento di Bioingegneria del Politecnico di Milano sull'analisi della variabilità delle resistenze respiratorie come indice della più tipica delle caratteristiche funzionali della malattia, la fluttuazione temporale del calibro bronchiale.

INTRODUZIONE

L'iperresponsività bronchiale è definita come una precoce ed eccessiva risposta ostruttiva delle vie aeree a diversi stimoli fisici o chimici come la metacolina, che hanno uno scarso o addirittura nessun effetto nei soggetti sani ed è documentabile *in vivo* da uno spostamento a sinistra e verso l'alto della curva dose-risposta ad agenti costrittori^(34,35).

Ad associare per la prima volta tale fenomeno alla patologia asmatica fu Curry nel 1947⁽⁶⁾; egli infatti osservò che l'effetto broncocostrittore dell'acetilmetilcolina e dell'istamina somministrata per via inalatoria era molto superiore negli asmatici che nei non asmatici. Tiffeneau nel 1957⁽³¹⁾ introdusse il concetto di dose soglia per valutare la risposta al broncocostrittore e, di fatto, pose le basi per l'attuale test alla metacolina.

Tale test consiste nel far inalare un agente broncocostrittore a dosi crescenti fino a raggiungere una certa risposta (caduta del volume espiratorio forzato nel 1° secondo (FEV₁) del 20% del valore di base). Uno spostamento a sinistra della curva dose-risposta alla metacolina è indice di ipersensibilità delle vie aeree all'agente broncoattivo, mentre uno spostamento verso l'alto della stessa è un indice di esagerata risposta massimale. L'aumentata sensibilità delle vie aeree all'agente costrittore non è un'esclusiva dell'asma perché può anche essere presente in altre patologie come la rinite cronica, le bronchiectasie, la broncopneumopatia cronica ostruttiva, alcune cardiopatie ed infine condizioni associate a riduzione dei volumi operativi del polmone come l'obesità, la gravidanza, la posizione supina, le malattie neuromuscolari ed altre. Al contrario, l'esagerata costrizione delle vie aeree è un *marker* specifico della malattia asmatica⁽⁵⁾. Dal punto di vista pratico è molto semplice misurare il grado di sensibilità delle vie aeree all'agente broncocostrittore dallo spostamento a sinistra della curva dose-risposta, mentre è praticamente impossibile misurare la risposta massimale perché le dosi di metacolina somministrate sarebbero troppo elevate e potenzialmente letali per il paziente.

Esistono due metodi proposti per tentare una stima della risposta esagerata. Il primo è la misura del volume residuo, un indice di chiusura delle vie aeree, in corso del test alla metacolina. Un suo aumento dimostrerebbe la presenza di risposta massimale ad una certa dose inalata di un agente broncocostrittore⁽¹²⁾. Un altro metodo è quello di misurare la risposta all'inspirio profondo durante test di metacolina: una sua riduzione è correlato alla presenza di esagerata costrizione bronchiale⁽²⁵⁾. Entrambi i metodi sono comunque surrogati del fenomeno specifico dell'asma e non facili da applicare nella maggior parte dei pazienti. Dunque, limitandosi alla misura della sensibilità delle vie aeree ad un agente broncocostrittore, il test alla metacolina non può mostrare tutta

la sua potenzialità ed è sempre da considerare un test artificioso sia per la sostanza non naturale che viene somministrata al paziente, sia per la natura delle manovre respiratorie, entrambe caratteristiche ben lontane dal respiro tranquillo⁽¹⁰⁾. Inoltre, la metacolina non può essere somministrata a pazienti con ostruzione delle vie aeree se il volume espiratorio forzato nel 1° secondo (FEV_1) è troppo ridotto. È per questo motivo che il nostro Dipartimento dell'Ospedale San Luigi Gonzaga di Orbassano, insieme al Dipartimento di Bioingegneria del Politecnico di Milano, all'Ospedale Carle di Cuneo, all'Antree University Hospital di Liverpool, al De Bakey Veteran Hospital di Houston e al St. Elizabeth Medical Center di Boston hanno intrapreso uno studio che si propone di misurare a domicilio la più tipica delle caratteristiche funzionali dell'asma: la fluttuazione del tono bronchiale. Il metodo si basa sulla misura delle resistenze delle vie aeree in soggetti asmatici e sani in un periodo di tempo di 1 anno per poter costruire un modello di analisi dell'andamento della malattia nel tempo e predire il peggioramento della funzione respiratoria. La tecnica si basa sul principio che un'oscillazione trasmessa da un generatore d'onda alla bocca durante respiro tranquillo può disturbare il sistema respiratorio secondo quelle che sono le sue componenti meccaniche statiche e dinamiche (Figura 1). Il rapporto tra la differenza di pressione e flusso delle singole oscillazioni ad una frequenza di circa 5 Hz è una misura dell'impedenza del sistema durante quel singolo respiro. Il test

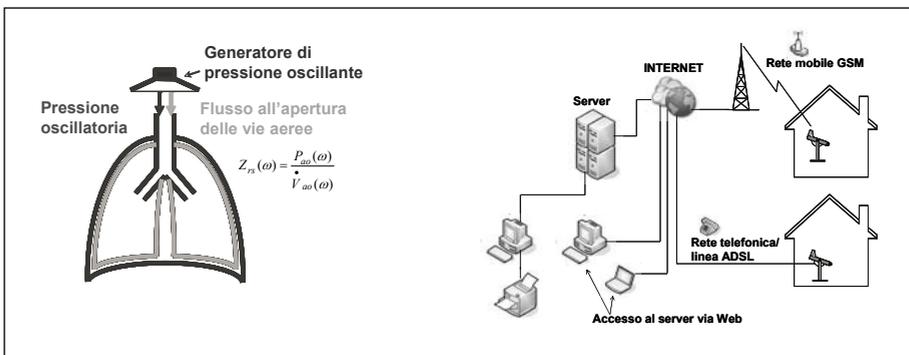


Figura 1. Metodo delle oscillazioni forzate con monitoraggio domiciliare. Un'onda pressoria oscillante a frequenza di circa 5 Hz è prodotta da un generatore mentre il soggetto respira in modo tranquillo. Il rapporto tra differenze di pressione e flusso durante la singola oscillazione rappresenta impedenza del sistema ad ogni istante del respiro, permettendo così di misurare le variazioni di resistenza e reattanza tra un respiro tidal e l'altro. Il segnale viene sottoposto ad una prima analisi matematica a domicilio e poi trasmesso via Web o rete mobile ad un centro di raccolta dati dove viene valutato dal medico.

può misurare con alta sensibilità le differenze di resistenza tra un respiro e l'altro. Utilizzata a domicilio, questa tecnica dimostra tutta la sua capacità "sul campo" di misurare la variabilità spontanea del tono bronchiale. I primi risultati sono previsti per il 2010.

Nelle ultime decadi sono stati pubblicati numerosi studi sul possibile ruolo delle cellule infiammatorie e dei loro mediatori chimici⁽⁸⁾ sulla reattività bronchiale. Tuttavia, ad oggi, nessuno di questi studi è riuscito a spiegare esaurientemente come l'infiammazione delle vie aeree si traduca in un'ostruzione delle vie aeree, che è l'aspetto caratterizzante la patologia e la sintomatologia asmatica⁽⁵⁾. Come sottolineato in una recente *Review*, numerose sono le alterazioni intrinseche della parete bronchiale e del muscolo liscio che possono giustificare gran parte dell'aumento della reattività delle vie aeree nell'asma bronchiale⁽⁵⁾. Insieme a disfunzioni a carico dei recettori β_2 e M2⁽²⁸⁾ sono state dimostrate numerose altre caratteristiche tipiche dell'asma. Una di queste è la capacità della cellula muscolare di generare un eccesso di forza sia a causa di fenomeni di ipertrofia ed iperplasia del miocita⁽¹⁸⁾ sia per motivi funzionali, come la comparsa di risposte miogeniche allo *stretching*^(21,26) o ancora per incrementata produzione di citochine proinfiammatorie a partire dal muscolo liscio stesso^(14,15). Addirittura, secondo studi recenti, l'iperreattività delle vie aeree e la facilità all'ostruzione nell'asma potrebbero avere origine all'interno del muscolo liscio bronchiale stesso a causa di un deficit di una proteina regolatoria (*CCAAT/enhancer binding protein- α* , *C/EBP α*)⁽²⁾. La mancanza di questa favorirebbe un aumento della massa muscolare, un aumento della velocità di contrazione del miocita ed un aumento di produzione di citochine e chemochine che, una volta permeate nell'ambiente circostante il muscolo stesso, potrebbero a loro volta contribuire ad aumentare lo stimolo chimico sul muscolo liscio. Se confermata, questa ipotesi potrebbe rivoluzionare le nostre conoscenze in termini di patogenesi dell'asma dando una spiegazione al ruolo del muscolo liscio e dell'infiammazione della parete bronchiale ed aprire nuovi orizzonti nella cura della malattia.

Inoltre, studi *in vitro* sull'accorciamento del muscolo liscio^(29,30) hanno evidenziato che, se stimolato, esso può raggiungere un accorciamento tale addirittura da ostruire completamente le vie aeree. Questo non avviene *in vivo* nel soggetto sano e non obeso per la presenza di strutture anatomiche non contrattili (carico interno e carico esterno) capaci di contrastare l'accorciamento del muscolo liscio^(20,23). Il carico interno è rappresentato dalla rigidità della parete bronchiale stessa e dei suoi tessuti, in modo particolare dalla cartilagine⁽²³⁾. Anche l'ispessimento della membrana basale, riscontrato nell'asma, può rappresentare un carico interno che limita l'accorciamento

del muscolo liscio^(17,18,19), anche se è altresì evidente che nell'aumento dello spessore della parete bronchiale esso contribuisce a ridurre il calibro delle vie aeree fino alla chiusura completa se si supera una certa soglia^(3,4,30,33). Il carico elastico esterno, offerto dalla pressione elastica, costituisce un altro importante ostacolo all'accorciamento del muscolo. Una dimostrazione di questo sta nel fatto che la riduzione del volume polmonare e dunque della pressione elastica del polmone, si associa ad una più marcata risposta delle vie aeree agli stimoli broncocostrittori^(7,17,27). Ciò spiegherebbe perché la reattività delle vie aeree è aumentata nell'obesità⁽¹³⁾, nell'enfisema⁽¹¹⁾, nello scompenso cardiaco⁽¹⁾, in posizione supina⁽²²⁾, in gravidanza e nelle malattie della parete toracica⁽⁵⁾. Già nel 1987 Ding⁽⁷⁾ osservò che respirando a bassi volumi la reattività delle vie aeree aumentava. Più recentemente, uno studio condotto nel nostro laboratorio ha dimostrato che non solo la reattività delle vie aeree aumenta riducendo il volume polmonare con una fasciatura stretta attorno al torace, ma anche l'effetto broncodilatatore dell'inspirazione profonda viene perso in modo simile a quanto avviene nell'asma bronchiale⁽³²⁾. Questo dato costituisce un'importante conferma del diverso effetto dell'inspirazione profonda osservato negli asmatici rispetto ai non asmatici: durante una broncodilatazione indotta in soggetti normali, infatti, l'inspirazione profonda è seguita da un aumento del calibro delle vie aeree che dura per qualche minuto a causa dell'importante aumento dell'isteresi bronchiale, conseguente all'inspirazione stessa⁽⁹⁾.

In conclusione, nuovi dati portano alla rivoluzionaria ipotesi che è il muscolo liscio delle vie aeree più che l'infiammazione della parete bronchiale a giocare il ruolo centrale e primario dell'asma bronchiale. Una maggior conoscenza dei meccanismi che ne regolano l'attività intrinseca insieme ai fattori meccanici e biochimici esterni ad esso non potrà che aiutare a confermare l'ipotesi e chiarirne definitivamente il ruolo, ponendo così le basi per nuovi approcci diagnostici, di *follow up* e terapeutici.

BIBLIOGRAFIA

1. Agostoni P.G., Pellegrino R., Conca C., Rodarte J.R., Brusasco V.: *Exercise hyperpnea in chronic heart failure: relationships to lung stiffness and expiratory flow limitation*. J. Appl. Physiol. 92: 1409-1416, 2002.
2. Borger P, Tamm M., Black J.L., Roth M.: *Asthma: is it due to an abnormal airway smooth muscle cell?* Am. J. Respir. Crit. Care Med. 174: 367-372, 2006.
3. Brown R.H., Zerhouni E.A., Mitzner W.: *Airway edema potentiates airway reactivity*. J. Appl. Physiol. 79: 1242-1248, 1995.
4. Brusasco V., Crimi E., Barisione G., Spanevello A., Rodarte J.R., Pellegrino R.: *Airway responsiveness to methacholine: effects of deep inhalations and airway inflammation*. J. Appl. Physiol. 87: 567-573, 1999.
5. Brusasco V., Pellegrino R.: *Airway Hyperresponsiveness: From Molecules to Bedside Invited. Review: Complexity of factors modulating airway narrowing in vivo: relevance to assessment of airway hyperresponsiveness*. J. Appl. Physiol. 795: 1305-1313, 2003.
6. Curry J.J.: *Comparative action of acetyl-methylcholine and histamine on the respiratory tract in normals, patients with hay fever, and subjects with bronchial asthma*. J. Clin. Invest. 26: 430-438, 1947.
7. Ding D.J., Martin J.A., Macklem P.T.: *Effect of lung volume on maximal methacholine-induced bronchoconstriction in normal humans*. J. Appl. Physiol. 62: 1324-1330, 1987.
8. Drazen J.M.: *Chemical mediators of immediate hypersensitivity reactions*. In "Handbook of Physiology". Vol. III - "The Respiratory System", 711-718, Oxford University Press, 1986.
9. Fredberg J.J., Inouye D., Miller B., Nathan M., Jafari S., Raboudi S.H., Butler J.P., Shore S.A.: *Airway smooth muscle, tidal stretches, and the dynamically determined contractile states*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 156: 1752-1759, 1997.
10. Frey U., Brodbeck T., Majumdar A., Taylor D.R., Town G.I., Silverman M., Suki B.: *Risk of severe asthma episodes predicted from fluctuation analysis of airway function*. Nature 438: 667-670, 2005.
11. Gelb A.F., Zamel N.: *Unsuspected pseudophysiological emphysema in chronic persistent asthma*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 162: 1778-1782, 2000.
12. Gibbons W.J., Sharma A., Loughheed D., and Macklem P.T.: *Detection of excessive bronchoconstriction in asthma*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 153: 582-589, 1996.
13. Jenkins S.C., Moxam J.: *The effects of mild obesity on lung function*. Respir. Med. 85: 309-311, 1991.
14. John M., Au B.C., Jose P.J., Lim S., Saunders M.A., Barnes P.J., Mitchell J.A., Belvisi M.G., Chung K.F.: *Expression and release of interleukin-8 by human airway smooth muscle cells: inhibition by Th2 cytokines and corticosteroids*. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 18: 84-90, 1998.
15. Johnson S.R., Knox A.J.: *Synthetic functions of airway smooth muscle in asthma*. Trends Pharmacol. Sci. 18: 288-292, 1997.
16. Lambert R.K., Codd S.L., Alley M.R., Pack R.J.: *Physical determinants of bronchial mucosal folding*. J. Appl. Physiol. 77: 1206-1216, 1994.
17. Lambert R.K., Paré P.D.: *Lung parenchymal shear modulus, airway wall remodeling, and bronchial hyperresponsiveness*. J. Appl. Physiol. 83: 140-147, 1997.

18. Lambert R.K., Wiggs B.R., Kuwano K., Hogg J.C., Paré P.D.: *Functional significance of increased airway smooth muscle in asthma and COPD*. J. Appl. Physiol. 74: 2771-2781, 1993.
19. Lambert R.K.: *Role of bronchial basement membrane in airway collapse*. J. Appl. Physiol. 71: 666-673, 1991.
20. Macklem P.T.: *Bronchial hyporesponsiveness*. Chest 91: S189-S191, 1987.
21. Marthan R., Woolcock A.J.: *Is a myogenic response involved in deep inspiration-induced bronchoconstriction in asthmatics?* Am. Rev. Respir. Dis. 140: 1354-1358, 1989.
22. Meinero M., Coletta G., Dutto L., Milanese M., Nova G., Sciolla A., Pellegrino R., Brusasco V.: *Mechanical response to methacholine and deep breath in supine posture in men*. J. Appl. Physiol. 102: 269-275, 2007.
23. Moreno R.H., Hogg J.C., and Paré P.D.: *Mechanics of airway narrowing*. Am. Rev. Respir. Dis. 133: 1171-1180, 1986.
24. Moreno R.H., Paré P.D.: *Intravenous papain-induced cartilage softening decreases preload of tracheal smooth muscle*. J. Appl. Physiol. 66: 1694-1698, 1989.
25. Pellegrino R., Violante B., and Brusasco V.: *Maximal bronchoconstriction in humans: relationship to deep inhalation and airway sensitivity*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 153: 115-121, 1996.
26. Pellegrino R., Violante B., Crimi E., Brusasco V.: *Time course and calcium dependence of sustained bronchoconstriction induced by deep inhalation in asthma*. Am. Rev. Respir. Dis. 144: 1262-1266, 1991.
27. Que C.L., Kenion C.M., Olivenstein R., Macklem P.T., Maksym G.N.: *Homeokinesis and short-term variability of human airway caliber*. J. Appl. Physiol. 91: 1131-1141, 2001.
28. Song P., Milanese M., Crimi E., Rehder K., Brusasco V.: *Allergen challenge of passively sensitized human bronchi alters M2 and β_2 receptor function*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 155: 1230-1234, 1997.
29. Stephens N.L., Hoppin F.G. Jr: *Mechanical properties of airway smooth muscle*. In "Handbook of Physiology". Vol. III- "The Respiratory System". Oxford University Press, 263-276, 1986.
30. Stephens N.L., Li W., Wang Y., Ma X.: *The contractile apparatus of airway smooth muscle. Biophysics and biochemistry*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 158: S80-S94, 1998.
31. Tiffeneau R.: *Examen pulmonaire de l'asthmatique*. In "Deductions Diagnostiques, Prognostiques et Thérapeutiques". Masson, Paris, 1957.
32. Torchio R., Gulotta C., Ciacco C., Perboni A., Guglielmo M., Crosa F., Zerbini M., Brusasco V., Hyatt R.E., Pellegrino R.: *Effects of chest wall strapping on mechanical response to methacholine in humans*. J. Appl. Physiol. 101: 430-438, 2006.
33. Wiggs B.R., Bosken C., Paré P.D., James A., Hogg J.C.: *A model of airway narrowing in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease*. Am. Rev. Respir. Dis. 145: 1251-1258, 1992.
32. Woolcock A.J. and Permutt S.: *Bronchial responsiveness*. In "Handbook of Physiology". Vol. III- "The Respiratory System". Oxford University Press, 727-736, 1986.
33. Woolcock A.J., Salome C.M., Yan K.: *The shape of the dose-response curve to histamine in asthmatic and normal subjects*. Am. Rev. Respir. Dis. 130: 71-75, 1984.

**GHRELIN: DALLA SECREZIONE SOMATOTROPA
ALLA PROSPETTIVA DI UN ORMONE PLEIOTROPO
AD ATTIVITÀ METABOLICA**

Andrea Benso, Barbara Lucatello, Fabio Broglio, Ezio Ghigo

Divisione di Endocrinologia, Diabetologia e Malattie del Metabolismo
Dipartimento di Medicina Interna - Università degli Studi di Torino

Key words: *Ghrelin / Ghrelin*
 Obestatin / Obestatina
 Glucose metabolism / Metabolismo glicidico
 Energy metabolism / Metabolismo energetico
 Feeding behaviour / Comportamento alimentare

Abstract:

Since its discovery in 1999, ghrelin attracted a considerable scientific interest for pleiotropic actions consistent with widespread expression of both the peptide itself and of its receptor. In particular, ghrelin progressively emerged as an important metabolic hormone, with relevant modulatory actions on glucose metabolism and feeding behavior. These results opened the perspective of synthetic ghrelin agonists or antagonists theoretically useful in the treatment of conditions of impaired glucose metabolism as well as of cachexia or obesity. However, taking into account the wide spectrum of ghrelin actions, a deeper knowledge on ghrelin physiology is mandatory before thinking at potential therapeutic clinical perspectives.

Riassunto:

Fin dalla sua scoperta nel 1999, ghrelin ha suscitato un grande interesse scientifico in virtù della sua ubiquità e di quella del suo recettore, in accordo con le potenziali molteplici funzioni fisiologiche di tale peptide. In particolare, le evidenze più recenti ne suggeriscono un importante ruolo metabolico, considerando il suo peculiare effetto oressante e sul metabolismo glico-insulinemico. Pertanto, il nuovo sogno in termini di prospettive cliniche è rappresentato dalla possibilità che analoghi dei prodotti derivati dal gene ghrelin, agendo come agonisti o antagonisti, siano potenziali strumenti per il trattamento delle condizioni cliniche di alterata tolleranza glicidica, oltre che in situazione di cachessia o obesità. Tuttavia, l'ampio spettro delle azioni di

ghrelin richiede una conoscenza sistematica della sua fisiologia prima di poter speculare in merito a potenziali prospettive terapeutiche di malattie in cui il ruolo di ghrelin, se c'è, è ancora assai poco chiaro.

INTRODUZIONE

Ghrelin, peptide di 28 aminoacidi principalmente prodotto dallo stomaco, è stato scoperto nel 1999 quale ligando naturale del cosiddetto recettore di tipo 1a dei GH Secretagoghi (GHS-R1a), fino ad allora orfano^(12,21,24). In realtà la storia di ghrelin inizia ben prima del suo isolamento, nell'ambito di studi su molecole sintetiche non naturali, i GH Secretagoghi (GHS), progressivamente sviluppate a partire dagli anni '70 al fine di disporre di una potenziale terapia per via orale in grado di sostituire la terapia parenterale con ormone della crescita per la cura dei soggetti deficitari di GH e/o come trattamento anabolizzante anti-invecchiamento^(5,12,24). Tuttavia, i GHS sintetici non si dimostrarono efficaci nel trattamento del deficit di GH e rimane ancora oggi da dimostrare in modo chiaro la loro utilità come agenti anabolici^(7,12,24).

Con il progredire degli studi, ghrelin ha però ben presto dimostrato di non essere solo un GH secretagogo ma di possedere anche numerosi altri effetti biologici, sia endocrini sia non-endocrini, in accordo con l'ampia diffusione di espressione, così come quella del GHSR1a, sia a livello del sistema nervoso centrale sia anche di svariati tessuti periferici^(7,13,15,24).

Sebbene originariamente l'interesse per ghrelin sia stato principalmente rivolto ai suoi effetti neuroendocrini centrali (ancora oggi rappresenta il più potente stimolo della secrezione di GH), è andata man mano crescendo, in particolare, l'attenzione per il suo potenziale ruolo di regolatore del bilancio energetico, essendo in grado di modulare l'appetito a livello centrale, così come il metabolismo gluco-lipidico periferico^(4,5,17,26).

Tale scenario si è recentemente arricchito ulteriormente dalla scoperta che il gene di ghrelin può dare origine a diverse altre molecole biologicamente attive. In particolare, ghrelin non-acilato e obestatina, molecole i cui recettori specifici non sono ancora stati identificati ma dotate di azioni biologiche in apparenza, almeno in parte, opposte a quelle di ghrelin stesso^(5,18,20,24,27).

Struttura e principali siti di sintesi di ghrelin

Il gene di ghrelin, localizzato sul cromosoma 3p25-26, è in grado di generare, attraverso processi di splicing alternativo e/o estese modificazioni post-traduzionali, numerose molecole, fra le quali ghrelin octanoilato e ghrelin non-acilato^(12,13,24). La distribuzione tissutale di queste due forme appare simile e si caratterizza per la massima concentrazione a livello dello stomaco. Infatti, le cellule che sintetizzano e secernono ghrelin sono state identificate essere le cellule tipo X/A, che sono principalmente presenti a livello della mucosa ossintica nel fondo gastrico e che sono responsabili della produzione di circa

2/3 dei livelli circolanti di ghrelin. Tuttavia, ghrelin è anche espresso, sebbene in minor misura, anche in numerosissimi altri tessuti, quali, ad esempio, ipotalamo, ipofisi, surreni, tiroide, mammella, ovaie, placenta, testicoli, prostata, fegato, vescica, pancreas, tessuto cardiovascolare, muscolo scheletrico^(12,13,24).

Sebbene la maggior parte degli effetti biologici di ghrelin a oggi noti sia dovuta all'azione della molecola acilata, mediante il legame e l'attivazione del GHSR1a^(12,13,15,21,24), la preponderante forma di ghrelin circolante (~ 80-90%) è quella non-acilata, incapace di legare e attivare il GHSR1a^(12,13,15,24), e quindi, originariamente, ritenuta priva di attività biologica, ma tuttavia oggi chiaramente dimostrata come biologicamente attiva verosimilmente attraverso l'attivazione di recettori ad oggi non identificati⁽¹⁵⁾.

Recentemente è stato inoltre identificato, mediante tecniche di genomica comparativa, un nuovo peptide di 23 aminoacidi, derivato dall'estremità C-terminale del pro-ghrelin e chiamato obestatina, sulla base del suo potenziale effetto soppressivo sull'appetito^(9,10,22).

Sebbene sia ancora limitato il numero di studi relativi alla sua espressione tissutale, obestatina sembra essere espressa nelle cellule della mucosa gastrica, nel plesso mioenterico, nel pancreas in epoca perinatale e nelle cellule di Leyding del testicolo di ratto^(9,10,22).

Regolazione della secrezione di ghrelin nell'uomo

I fattori che regolano l'espressione dei vari peptidi derivati dal gene ghrelin rimangono a oggi largamente sconosciuti. I livelli circolanti di ghrelin sono associati negativamente con l'indice di massa corporea; infatti, sono aumentati nell'anoressia e nella cachessia, ridotti nell'obesità e normalizzati al raggiungimento del peso ideale^(3,13,24). Unica eccezione al tal riguardo è rappresentata dalla sindrome di Prader-Willi, in cui l'obesità è associata con ipersecrezione di ghrelin^(3,13,24).

A supporto dell'ipotesi che la secrezione di ghrelin sia principalmente regolata da segnali metabolici vi è l'evidenza che i livelli circolanti di ghrelin sono aumentati dalla restrizione energetica e dalla riduzione dell'assunzione del cibo^(3,13,24). Al contrario, il digiuno, non sembra influenzare i livelli di obestatina sui quali appaiono controversi gli effetti dell'assunzione di cibo^(9,10,20).

La secrezione di ghrelin è ridotta sia dal carico orale o endovenoso di glucosio, sia durante clamp euglicemico-iperinsulinemico, sia anche dopo ipoglicemia insulino-indotta. L'effetto inibitorio sulla secrezione di ghrelin della sovraesposizione all'insulina è in accordo con la forte associazione negativa tra i livelli ghrelin e di insulina^(3,13,24).

L'infusione costante endovenosa di lipidi non influenza i livelli plasmatici di ghrelin mentre la somministrazione orale di grassi è stata dimostrata determinarne sia un aumento sia una diminuzione, sebbene meno marcata rispetto a quella osservata dopo ingestione di glucosio^(3,13,24).

La secrezione di ghrelin risulta inibita dall'attivazione dei recettori per la somatostatina. Infatti, la somministrazione di somatostatina nativa, del suo analogo naturale cortistatina o di un analogo sintetico come octreotide induce una marcata riduzione dei livelli circolanti di ghrelin, in misura ancora maggiore di quanto osservato dopo somministrazione di glucosio o insulina⁽²⁾. Ghrelin, a sua volta, aumenta i livelli circolanti di somatostatina, suggerendo l'esistenza di un legame a feedback tra i due peptidi⁽²⁾.

La secrezione di ghrelin appare inoltre essere sottoposta anche a controllo colinergico. Infatti i livelli di ghrelin sono stimolati e inibiti, rispettivamente, da agonisti e antagonisti colinergici muscarinici^(3,13,24). Tale dato concorda con l'evidenza che l'aumento dei livelli di ghrelin indotto dalla deprivazione di cibo non si osserva in condizioni di vagotomia sottodiaframmatica e appare considerevolmente ridotto da atropina nei ratti^(3,13,24).

Inoltre, anche altri fattori sono stati dimostrati in grado di modulare l'espressione e/o la secrezione di ghrelin (ad es. PYY3-36, oxintomodulina, urocortina, ormoni tiroidei e steroidi gonadici)^(3,13,24) e sono state descritte condizioni di iposecrezione (es. dopo gastrectomia o bypass gastrico, obesità, ipertiroidismo) e di ipersecrezione di ghrelin (anoressia, cachessia, malnutrizione, diabete mellito tipo 1, sindrome di Prader-Willi), fra cui i ghrelinomi (per lo più carcinoidi gastrointestinali), sebbene resti ancora da chiarire se esistano, e quali siano, le conseguenze cliniche di un'alterata secrezione di ghrelin^(3,13,24).

Recettori dei prodotti derivati dal gene ghrelin

Il recettore di ghrelin più conosciuto, il GHSR1, possiede due varianti, derivate dal *processing* alternativo del pre-mRNA dello stesso gene, chiamate tipo 1a e tipo 1b^(12,15,21). Analogamente al GHSR1a, il GHSR1b ha un'estesa espressione tissutale ma, diversamente dal GHSR1a, non è in grado di legare ghrelin né i GHS sintetici e non è dunque chiaro se sia un recettore funzionante^(12,15,21).

Il GHSR1a è fortemente espresso a livello ipotalamico e ipofisario, in accordo con le rilevanti azioni di ghrelin sull'ipofisi anteriore così come con la sua influenza sul controllo dell'appetito, dell'introito alimentare e del bilancio energetico^(12,15). È interessante rilevare come l'espressione del GHSR1a sia

stata anche dimostrata in aree del sistema nervoso centrale note per influenzare i ritmi biologici, l'umore, la memoria e l'apprendimento^(12,15).

Inoltre, molteplici organi periferici, come stomaco, intestino, pancreas, tiroide, gonadi, surrene, rene, cuore e vasi sanguigni, così come diversi tumori e linee cellulari, esprimono il GHS-R1a^(12,15), di nuovo in accordo con i numerosi effetti biologici di ghrelin.

Vi è un crescente numero di evidenze che suggeriscono che il GHSR1a non sia l'unico recettore funzionante ma piuttosto un membro di un'ampia famiglia di recettori. Infatti, per esempio, è stato dimostrato che ghrelin lega ed è biologicamente attivo su alcune linee cellulari prive del GHSR1a⁽¹⁵⁾. Sulla base di studi di legame e funzionali la lista dei potenziali recettori è in continua crescita e include: recettori per ghrelin non-acilato, recettori per ghrelin acilato diversi dal GHSR1a, recettori comuni a ghrelin acilato e non-acilato con effetto analogo o contrario in risposta al legame dei due ligandi, recettori capaci di legare in modo specifico GHS sintetici peptidici (quale il CD36 a livello coronarico)⁽¹⁵⁾.

Ghrelin non-acilato non lega per definizione il GHSR1a, dal momento che l'acilazione in serina 3 è essenziale a tal fine. Poiché tuttavia anche tale forma è dotata di rilevanti effetti biologici, questi devono essere mediati da un altro recettore, ad oggi non ancora isolato, ma la cui esistenza è fortemente suggerita dagli studi di binding^(12,15).

Obestatina è stata riportata originariamente quale ligando endogeno del recettore orfano GPR39, che peraltro condivide un certo grado di omologia con il GHSR1a. Studi successivi, tuttavia, non sono stati in grado di confermare tale ipotesi^(9,10,27).

Azioni biologiche dei prodotti derivati dal gene ghrelin

Secrezione di GH

Ghrelin, come i GHS sintetici, possiede un effetto GH-liberatore potente e dose-dipendente, che subisce marcate variazioni in base all'età ed è sesso-indipendente^(3,7,13,24). Tale azione di ghrelin sembra essere mediata in gran parte dal suo legame con il GHSR1a a livello ipofisario^(3,7,13,24). Tuttavia, ghrelin necessita anche della piena attività dei neuroni secernenti GHRH per esprimere pienamente il proprio effetto GH-liberatore^(3,7,13,24). Inoltre, ghrelin agisce verosimilmente anche come antagonista funzionale della somatostatina sia a livello ipofisario sia a livello ipotalamico; infatti la risposta di GH a ghrelin è parzialmente refrattaria alla somatostatina esogena^(2,3,7,13,24). Inoltre, la risposta di GH a ghrelin è anche parzialmente refrattaria ad altri fattori

che sono noti per influenzare la secrezione somatotropa, come glucosio, FFA, arginina, agonisti e antagonisti colinergici, IGF-I e il GH stesso^(3,7,13,24).

Ghrelin riveste verosimilmente un importante ruolo nella risposta di GH al digiuno e alla restrizione energetica; l'iper- e l'iposecrezione di GH, che caratterizzano rispettivamente l'anoressia e l'obesità, potrebbero riflettere l'iper- e l'iposecrezione di ghrelin, dimostrate in tali condizioni cliniche^(3,7,13,17,24). Tuttavia, non è stato mai dimostrato un legame a feedback tra la secrezione di GH e ghrelin e, peraltro, ghrelin non sembra contribuire alla risposta di GH alla maggior parte degli stimoli farmacologici^(3,7,13,24).

Ghrelin non-acilato non influenza la secrezione somatotropa e la maggior parte degli studi relativi a obestatina sembrerebbero escludere un suo ruolo nella secrezione di GH^(3,7,9,10,13,18,24).

Attività oressante e regolazione del peso corporeo

Numerosi studio hanno dimostrato che ghrelin interviene nella regolazione dell'appetito e del peso corporeo. La secrezione di ghrelin subisce marcate variazioni nel corso della giornata e l'evidenza che il digiuno a breve termine determina un rialzo pre-prandiale dei suoi livelli circolanti e che l'infusione di tale peptide stimoli l'appetito e determini un incremento dell'introito calorico ha portato a ipotizzare che ghrelin possa rappresentare un importante fattore per l'inizio del pasto^(3,7,13,17,24).

L'azione oressante di ghrelin è indipendente dall'attività GH-liberatrice e sembra essere mediata attraverso la circolazione sistemica o dall'attivazione di afferenze vagali, che modulano, in particolare, la funzione del nucleo arcuato ipotalamico. A tale livello vengono attivati i neuroni "oressanti" contenenti il neuropeptide-Y e il peptide agouti-correlato, mentre vengono inibiti i neuroni "anoressanti" contenenti POMC e CART. Sui medesimi neuroni, ma con azione opposta, agisce anche leptina, a suggerire che ghrelin e leptina potrebbero avere un ruolo complementare nella regolazione centrale del bilancio energetico^(3,7,13,17,24).

Oltre a tale effetto oressante, ghrelin modula anche la regolazione del peso corporeo a lungo termine. Come già accennato, ghrelin risponde a cambiamenti del peso corporeo: i suoi livelli circolanti aumentano dopo calo ponderale e diminuiscono in seguito a incremento ponderale^(3,7,13,17,24). La somministrazione a lungo termine di ghrelin favorisce l'aumento di peso, non solo stimolando l'introito alimentare, ma influenzando anche altri aspetti dell'omeostasi energetica. Infatti, ghrelin aumenta la preferenza per i grassi nella dieta e favorisce direttamente l'adipogenesi^(3,7,13,17,24). Ghrelin,

inoltre, inibisce la lipolisi, l'apoptosi adipocitaria, il dispendio energetico e l'attivazione nervosa simpatica, la temperatura corporea, la produzione di citochine pro-infiammatorie e l'attività locomotoria^(3,7,13,17,24).

A seconda del modello sperimentale, ghrelin non-acilato è stato dimostrato capace di inibire o stimolare l'introito alimentare^(3,7,13,17,24), per quanto la maggior parte delle evidenze suggeriscano un'associazione negativa fra ghrelin non-acilato e introito alimentare^(3,7,13,17,24).

Ancora molto controverso è, invece, l'eventuale azione di obestatina sull'assunzione di cibo. Infatti, alcuni studi suggeriscono che obestatina possa inibire l'introito calorico e l'aumento ponderale, mentre altri autori non hanno evidenziato alcun effetto in tal senso^(9,10,18).

Metabolismo glucidico

Numerose sono le evidenze sperimentali che suggeriscono un'implicazione di ghrelin nella regolazione del metabolismo glucidico, attraverso la modulazione della sensibilità dei neuroni glucosio-sensibili nel cervello, della secrezione e dell'azione insulinica e della produzione epatica di glucosio^(3,7,13,17,24).

Recentemente, è stato dimostrato che ghrelin è in grado di inibire l'attività dei neuroni glucosio-sensibili nel complesso vagale dorsale di ratto^(3,7,13,17,24).

In base alle condizioni sperimentali, è stato inoltre dimostrato che ghrelin è capace sia di inibire sia di stimolare la secrezione di insulina. Tuttavia, la maggior parte dei risultati disponibili suggerisce un'associazione negativa fra i livelli sistemici di ghrelin e di insulina, con ghrelin capace di inibire la secrezione insulinica sia in vivo sia in vitro nell'animale e nell'uomo^(3,7,13,17,24). Tale effetto potrebbe essere mediato dal GHSR1a, chiaramente espresso nel pancreas endocrino⁽¹⁵⁾.

Inoltre, ghrelin potrebbe modulare anche alcuni effetti periferici dell'insulina. Infatti, ghrelin è capace di attenuare la soppressione della produzione epatica di glucosio insulino-indotta, mentre potenzia l'azione dell'insulina sulla disponibilità di glucosio nei topi, inibisce la secrezione adipocitaria di adiponectina, peptide insulino-sensibilizzante, e stimola la secrezione di ormoni contro-regolatori, quali GH, cortisolo, epinefrina e glucagone^(3,7,13,17,24).

La somministrazione acuta di ghrelin nell'uomo determina un incremento dei livelli plasmatici di glucosio e amplifica l'effetto iperglicemizzante di arginina. Tale effetto iperglicemizzante potrebbe, almeno in parte, essere anche dovuto a un'azione diretta epatocitaria, dove è già stato dimostrato essere in grado di modulare la sintesi di glicogeno e la gluconeogenesi, stimolando la produzione epatica di glucosio^(3,7,13,17,24).

Sorprendentemente anche ghrelin non-acilato, nonostante la sua incapacità di legare il GHSR 1a, è in grado di modulare il metabolismo glucidico^(3,7,13,17,24). Infatti, è stato dimostrato che ghrelin non-acilato abolisce l'effetto di ghrelin acilato sulla secrezione insulinica da insule pancreatiche isolate di topo e di ratto. Inoltre, attenua la capacità dell'insulina di inibire la produzione endogena di glucosio, ma non modifica la disponibilità di glucosio. Peraltro, ghrelin non acilato inibisce l'output di glucosio da epatociti primari e contrasta l'effetto stimolatorio di ghrelin sul rilascio di glucosio^(3,7,13,17,24).

Ancora non univoci sono invece i dati relativi agli effetti di obestatina sulla secrezione di insulina^(9,10).

Metabolismo lipidico

Ghrelin appare essere implicato anche nella regolazione del metabolismo lipidico, in virtù dei suoi effetti a livello epatico, del muscolo scheletrico e del tessuto adiposo^(3,7,13,17,24).

Nel fegato, ghrelin induce pattern di espressione genica di tipo lipogenico e aumenta il contenuto di trigliceridi, mentre esercita nel contempo un'azione anti-lipolitica^(3,7,13,17,24).

Nel muscolo scheletrico, a livello del gastrocnemio, ghrelin invece riduce il contenuto di trigliceridi e potenzia l'attività degli enzimi ossidativi mitocondriali^(3,7,13,17,24).

Dunque ghrelin sembra favorire l'accumulo di trigliceridi a livello epatico rispetto al muscolo e stimolare la lipogenesi negli adipociti differenziati^(3,7,13,17,24).

Riproduzione

A oggi, l'espressione di ghrelin e del suo recettore è stata documentata in numerosi organi riproduttivi^(6,23), suggerendone un ruolo nella regolazione della fisiologia della riproduzione, almeno in parte, in maniera paracrina-autocrina sia a livello centrale che periferico^(6,23).

Le evidenze disponibili supportano l'ipotesi che ghrelin eserciti una marcata azione inibitoria sull'asse gonadico a livello centrale ipotalamico, essendo in grado di ridurre le concentrazioni ematiche di LH, diminuendone la frequenza pulsatile secretoria sia nell'animale sia nell'uomo^(6,23). Nell'insieme, tali evidenze potrebbero dunque suggerire che ghrelin, insieme con leptina, svolga un ruolo nello spegnimento dell'asse gonadico che, insieme all'amplificazione delle funzioni somatotrope e corticotrope, avviene durante la privazione di cibo.

Ancora scarsi sono i dati relativi agli effetti di ghrelin non-acilato e di obestatina sulla funzione riproduttiva.

Funzioni gastro-intestinali

Gli effetti di ghrelin sembrano coinvolgere molti aspetti della funzionalità gastro-intestinale, inclusi la secrezione esocrina, la protezione epiteliale e la motilità.

I dati relativi agli effetti di ghrelin sulla secrezione acida gastrica non sono univoci^(13,24), suggerendo la possibilità che agisca sia attraverso vie di stimolo sia di inibizione a seconda del modello sperimentale utilizzato^(13,24). L'azione stimolatoria di ghrelin sulla secrezione gastrica potrebbe essere importante nel preparare lo stomaco per la fase digestiva. Inoltre, ghrelin è in grado di stimolare la secrezione proteica pancreaticata attraverso meccanismi centrali^(13,24).

In diversi modelli è stato dimostrato un effetto gastroprotettivo di ghrelin, capace di stimolare la proliferazione cellulare e la differenziazione dell'epitelio gastro-intestinale^(13,24).

Non sorprendentemente, considerata l'analogia strutturale di ghrelin con motilina^(13,24), è stato inoltre dimostrato che ghrelin accelera lo svuotamento gastrico e, verosimilmente, la motilità colica. Tali effetti procinetici sono apparentemente mediati dal sistema colinergico, attraverso meccanismi centrali e probabilmente tramite il plesso mioenterico^(13,24).

Ghrelin non-acilato non sembra influenzare la secrezione gastrica mentre potrebbe inibirne lo svuotamento^(13,24).

È stato dimostrato che obestatina stimola la secrezione esocrina pancreaticata mentre i dati relativi ai suoi effetti sulla motilità gastro-intestinale sono molto controversi^(9,10).

Effetti cardiovascolari

Sono molto numerosi gli studi che dimostrano che ghrelin possiede un ampio spettro di azioni cardiovascolari, in accordo con l'estesa diffusione di differenti sottotipi recettoriali per i GHS a livello dei tessuti cardiovascolari, nonché con i già noti effetti a tale livello dei GHS sintetici^(1,11,14,15,16).

Relativamente alla macrocircolazione, gli effetti vasoattivi di ghrelin dipendono dal territorio vascolare. A livello sistemico, ghrelin possiede un effetto vasodilatante endotelio-indipendente, accompagnato dalla riduzione della pressione arteriosa media^(1,11,14,15,16). D'altra parte, in modelli animali,

ghrelin incrementa la pressione di perfusione coronarica e migliora la funzionalità endoteliale^(1,14,15,16).

Ghrelin inoltre migliora le *performances* cardiache in soggetti normali e anche in pazienti con cardiomiopatia dilatativa^(1,11,14,15,16). Una significativa *up-regulation* di ghrelin e dei recettori per i GHS è stata riscontrata nelle coronarie aterosclerotiche e nel miocardio ventricolare di pazienti con cardiomiopatia ischemica o dilatativa^(1,11,14,15,16).

In modelli animali, ghrelin non-acilato, ancor più della forma acilata, è stato dimostrato ridurre la tensione sviluppata a bassa frequenza dei muscoli papillari cardiaci, in cui sono stati identificati recettori per ghrelin capaci di riconoscerlo indipendentemente dalla sua acilazione^(1,11,14,15,16).

Inoltre, sia la forma acilata sia quella non-acilata di ghrelin, analogamente ai GHS sintetici, esercitano un effetto antiapoptotico a livello cardiovascolare, verosimilmente attraverso l'interazione con un recettore dei GHS non di tipo 1a⁽¹⁵⁾.

Altri effetti biologici

Attività PRL- e ACTH-liberatrice. Ghrelin è dotato di un effetto di stimolo sulla secrezione di PRL, sesso- ed età-indipendente, verosimilmente mediato sia da un'azione diretta sulle cellule somatomammotrope sia da effetti indiretti ipotalamici^(7,13,24). Inoltre, ghrelin possiede, in acuto, una rilevante azione stimolatoria sull'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, mentre la somministrazione prolungata di GHS non sembra determinare un'iperfunzione di tale asse^(7,13,24). L'attività ACTH-liberatrice di ghrelin in condizioni fisiologiche sembra dipendere totalmente da meccanismi mediati dal sistema nervoso centrale^(7,13,24), mentre in pazienti affetti da malattia di Cushing ACTH-dipendente e in alcuni casi di sindrome di Cushing ectopico, l'effetto di stimolo di ghrelin sulla secrezione corticotropa è apparso sorprendentemente più spiccato e maggiore di quello osservato dopo hCRH, riflettendo una verosimile azione diretta sulle tumorali in cui sono espressi sia ghrelin sia il GHSR⁽⁸⁾.

Modulazione della proliferazione cellulare

Numerosi studi supportano il potenziale ruolo autocrino/paracrino di ghrelin, sia nella forma acilata sia in quella non-acilata, nella regolazione di proliferazione, apoptosi e differenziazione di differenti linee cellulari normali e neoplastiche, attraverso meccanismi sia mediati sia non mediati dal GHSR1a^(15,19).

Influenza su sonno e memoria

In accordo con le evidenze relative ai GHS sintetici è stato dimostrato che ghrelin promuove il sonno a onde lente nell'uomo^(7,13,24). Inoltre, la somministrazione di ghrelin nell'ippocampo, nell'amigdala e nel nucleo dorsale del rafe aumenta il mantenimento della memoria nei ratti, in modo chiaro e dose dipendente^(7,13,24).

Immunomodulazione

Recenti studi suggeriscono che ghrelin possa giocare un ruolo nell'innescare la risposta immunitaria e nel suo controllo, in accordo con la sua capacità di modulare la proliferazione e l'attivazione di cellule immunitarie e la secrezione di citochine proinfiammatorie^(7,13,24).

Metabolismo osseo

Molto recente è l'evidenza di un'azione stimolatoria diretta sulla formazione ossea di ghrelin in accordo con la presenza del GHSR1a a livello degli osteoblasti primari^(14,15,25).

Prospettive cliniche e conclusioni generali

Fin dalla sua scoperta nel 1999, ghrelin ha suscitato un grande interesse scientifico in virtù della sua ubiquità e di quella del suo recettore, in accordo con le potenziali molteplici funzioni fisiologiche di tale peptide.

In particolare, le evidenze più recenti ne suggeriscono un importante ruolo metabolico, considerando il suo peculiare effetto oressante e sul metabolismo glico-insulinemico. Infatti, topi knockout per ghrelin e per il GHSR, sebbene fenotipicamente non differenti dai topi wild-type, in condizioni di restrizione calorica, mostrano una riduzione dei livelli glicemici, un'aumentata secrezione insulinica glucosio-indotta e un incremento della sensibilità insulinica periferica, suggerendo dunque una compromissione del mantenimento dell'omeostasi glucidica. Tali dati supportano dunque l'ipotesi che la primaria azione di ghrelin, quantomeno nel topo, sia quella di modulatore della tolleranza glicidica e della sensibilità insulinica.

Pertanto, il nuovo sogno in termini di prospettive cliniche è rappresentato dalla possibilità che analoghi dei prodotti derivati dal gene ghrelin, agendo come agonisti o antagonisti, siano potenziali strumenti per il trattamento delle condizioni cliniche di alterata tolleranza glicidica, oltre che in situazione di cachessia o obesità.

Tuttavia, l'ampio spettro delle azioni di ghrelin richiede una conoscenza sistematica della sua fisiologia prima di poter speculare in merito a potenziali prospettive terapeutiche di malattie in cui il ruolo di ghrelin, se c'è, è ancora assai poco chiaro.

BIBLIOGRAFIA

1. Benso A., Broglio F., Marafetti L., Lucatello B., Seardo M.A., Granata R., Martina V., Papotti M., Muccioli G., Ghigo E.: *Ghrelin and synthetic growth hormone secretagogues are cardioactive molecules with identities and differences*. Semin Vasc Med. 4, 107-114, 2004.
2. Broglio F., Papotti M., Muccioli G., Ghigo E.: *Brain-gut communication: cortistatin, somatostatin and ghrelin*. Trends Endocrinol Metab. 18, 246-251, 2007.
3. Broglio F., Prodham F., Riganti F., Muccioli G., Ghigo E.: *Ghrelin: from somatotrope secretion to new perspectives in the regulation of peripheral metabolic functions*. Front Horm Res. 35, 102-114, 2006.
4. Chen C.Y., Fujimiya M., Asakawa A., Chang F.Y., Cheng J.T., Lee S.D., Inui A.: *At the cutting edge: ghrelin gene products in food intake and gut motility*. Neuroendocrinology. 89, 9-17, 2009.
5. Deghenghi R., Broglio F., Papotti M., Muccioli G., Ghigo E.: *Targeting the ghrelin receptor: orally active GHS and cortistatin analogs*. Endocrine. 22, 13-18, 2003.
6. García MC., López M., Alvarez C.V., Casanueva F., Tena-Sempere M., Diéguez C.: *Role of ghrelin in reproduction*. Reproduction. 133, 531-540, 2007.
7. Ghigo E., Broglio F., Arvat E., Maccario M., Papotti M., Muccioli G.: *Ghrelin: more than a natural GH secretagogue and/or an orexigenic factor*. Clin Endocrinol (Oxf). 62, 1-17, 2005.
8. Giordano R., Picu A., Broglio F., Bonelli L., Baldi M., Berardelli R., Ghigo E., Arvat E.: *Ghrelin, hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis and Cushing's syndrome*. Pituitary. 7, 243-248, 2004.
9. Gourcerol G., St-Pierre D.H., Taché Y.: *Lack of obestatin effects on food intake: should obestatin be renamed ghrelin-associated peptide (GAP)?* Regul Pept. 141, 1-7, 2007.
10. Gourcerol G., Taché Y.: *Obestatin-a ghrelin-associated peptide that does not hold its promise to suppress food intake and motility*. Neurogastroenterol Motil. 19, 161-165, 2007.

11. Isgaard J., Barlund A., Johansson I.: *Cardiovascular effects of ghrelin and growth hormone secretagogues*. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 8:133-137, 2008.
12. Kojima M., Hosoda H., Matsuo H., Kangawa, K.: *Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor*. *Trends Endocrinol Metab*. 12, 118–122, 2001.
13. Korbonits M., Goldstone A.P., Gueorguiev M., Grossman A.B.: *Ghrelin – a hormone with multiple functions*. *Front Neuroendocrinol* 25, 27–68, 2004.
14. Leite-Moreira A.F., Rocha-Sousa A., Henriques-Coelho T.: *Cardiac, skeletal, and smooth muscle regulation by ghrelin*. *Vitam Horm*. 77, 207-238, 2008.
15. Muccioli G., Baragli A., Granata R., Papotti M., Ghigo E.: *Heterogeneity of ghrelin/growth hormone secretagogue receptors. Toward the understanding of the molecular identity of novel ghrelin/GHS receptors*. *Neuroendocrinology*. 86, 147-164, 2007.
16. Nagaya N., Kangawa K.: *Ghrelin., a novel growth hormone releasing peptide, in the treatment of chronic heart failure*. *Regulatory Peptides* 114, 71–77, 2003.
17. Nogueiras R., Tschöp M.H., Zigman J.M.: *Central nervous system regulation of energy metabolism: ghrelin versus leptin*. *Ann NY Acad Sci*. 1126, 14-19, 2008.
18. Pan W., Tu H., Kastin A.J.: *Differential BBB interactions of three ingestive peptides: obestatin, ghrelin, and adiponectin*. *Peptides*. 27, 911-916, 2006.
19. Papotti M., Ghe C., Volante M., Muccioli G.: *Ghrelin and tumors*. In "Ghrelin (More Than Simply a Natural GH Secretagogue and/or an Orexigenic Factor)" Kluwer Academic., Boston, 143-164, 2004.
20. Ren A.J., Guo Z.F., Wang Y.K., Lin L., Zheng X., Yuan W.J.: *Obestatin, obesity and diabetes*. *Peptides*. 30, 439-444, 2009.
21. Smith R.G., Leonard R., Bailey A.R., Palyha O., Feighner S., Tan C., McKee K.K., Pong S.S., Griffin P., Howard A.: *Growth hormone secretagogue receptor family members and ligands*. *Endocrine*, 14, 9–14, 2001.
22. Soares J.B., Leite-Moreira A.F.: *Ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin: three pieces of the same puzzle*. *Peptides*. 29, 1255-1270, 2008.
23. Tena-Sempere M.: *Ghrelin as a pleiotropic modulator of gonadal function and reproduction*. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 4, 666-674, 2008.
24. van der Lely A.J., Tschöp M., Heiman M.L., Ghigo E.: *Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin*. *Endocr Rev*. 25, 426-457, 2004.
25. van der Velde M., Delhanty P., van der Eerden B., van der Lely A.J., van Leeuwen J.: *Ghrelin and bone*. *Vitam Horm*. 77, 239-258, 2008.
26. Wiedmer P., Nogueiras R., Broglio F., D'Alessio D., Tschöp M.H.: *Ghrelin., obesity and diabetes*. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 3, 705-712, 2007.
27. Zhang J.V., Ren P.G., Avsian-Kretchmer O., Luo C.W., Rauch R., Klein C., Hsueh A.J.: *Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene., opposes ghrelin's effects on food intake*. *Science*. 310, 996-999, 2005.

**I TUMORI RARI (TR):
ASPETTI ORGANIZZATIVI, CLINICI E DI RICERCA**

*Alessandro Comandone¹, Oscar Bertetto², Antonella Boglione¹,
Lavinia Bianco¹, Giovannino Ciccone³*

¹ S.C. Oncologia Ospedale Gradenigo - Torino

² ARESS Regione Piemonte

³ Epidemiologia clinica e valutativa - ASO Molinette

Key words: *Rare Tumours / Tumori rari*
 Research / Ricerca
 Clinical Governance / Assistenza
 Evidence Based Medicine / Medicina Basate sull'Evidenza

Abstract:

It is assumed that Rare Tumours (RT) are an heterogeneous number of different cancers which incidence is below 2-3 cases/100.000 inhabitants/year.

The models of Assistance, Research and Statistics used in common cancers do not fit the needs of RT.

As a consequence of the rarity, it is difficult to plan and conduct Randomized Clinical Trials and the level of recommendation in Evidence Based Medicine is far from the optimal range.

At last the rarity of those neoplasm determines low interest from Public and Private organizations to sponsor basic science and clinical researches.

However, in the last years an increasing amount of interest about RT is getting on: Pharmaceutical Industries investing in drug discovery and development for uncommon tumors are granted with economical support. The media are more involved to spread the culture of RT. These advances lead to some scientific improvement: in some RT we know the ethiopathogenetic origin of the disease: asbestos in mesothelioma, DES in vaginal tumors, pesticides in soft tissues sarcomas.

In many uncommon tumors the genetic defects which can lead to pathogenesis of cancer are well known: translocation t(11-18) in Ewing sarcomas, abl-bcr gene fusion in CML are two of the most striking examples.

At last on some RT the improvement of Clinical research has lead to important results in increase the cure and overall survival: testis tumors, osteosarcomas and GIST are concrete examples.

In conclusion RT, even among many difficulties, can represent a fertile field of investigation and improvement in Clinical management.

Riassunto:

I Tumori Rari (TR) rappresentano un gruppo eterogeneo di neoplasie caratterizzate da una incidenza di 2-3 casi /100.000 abitanti.

Raggruppati in un unico capitolo i TR rappresentano il 12-15% del totale di tumori, ma presi singolarmente il loro manifestarsi è evento poco comune nella pratica clinica quotidiana.

Questa rarità determina incertezza nella pianificazione dell'assistenza, nello sviluppo della ricerca di base e clinica e disinteresse da parte degli sponsor pubblici e privati nel sostenere tali ricerche.

Tutte queste debolezze si ripercuotono inevitabilmente sul trattamento del paziente: l'incertezza determina scarsa expertise e aumento delle possibilità di errore nella terapia.

Pertanto molti pazienti sono obbligati ad una forzosa migrazione sanitaria alla ricerca di un buono standard di cura.

Anche nella ricerca vi sono specificità di modelli per i TR: i modelli statistici utili nei Tumori frequenti non si addicono alle neoplasie a bassa incidenza e assai frequentemente i livelli di evidenza e i gradi di raccomandazione sono di basso grado.

Infine la rarità degli eventi rende poco appetibili i TR nell'attrarre capitali per sostenere la ricerca clinica e di base.

Ma nell'ultimo decennio qualcosa sta cambiando. Una migliore organizzazione di rete assistenziale, l'approccio multidisciplinare accompagnato da migliorate conoscenze derivate dalla Ricerca Traslazionale hanno permesso dei miglioramenti tangibili nel campo dei TR.

Anche la legislazione USA e Europea sui farmaci orfani e sulle Malattie Rare ha permesso un concorrere di finanziamenti ad hoc sull'argomento.

Questo ha condotto ad un aumento delle conoscenze eziopatogenetiche di alcuni TR: il rapporto asbesto-mesoteliomi, DES-tumori vaginali e pesticidi-sarcomi è ormai ben conosciuto.

Anche le alterazioni geniche che possono spiegare l'insorgenza di alcuni tipi di tumore sono conosciute nei sarcomi e in alcune leucemie. Tutto questo ha condotto ad un miglioramento delle possibilità di cura e di guarigione di alcuni TR. Tumori del testicolo, osteosarcoma e GIST sono gli esempi più conosciuti.

Negli ultimi dieci anni si è registrato un crescente interesse per le neoplasie a bassa incidenza, definite comunemente Tumori Rari (TR)^(29,20). Sotto questa denominazione vengono raggruppate neoplasie estremamente diverse tra di loro per istologia, presentazione clinica, sede di insorgenza, prognosi e terapia. Si assume in generale che un tumore sia definito raro quando la sua incidenza annua non superi i 2-3 casi ogni 100.000 abitanti⁽²⁹⁾.

A partire dal 1998 è previsto in Italia uno speciale registro per le Malattie Rare intese come patologie aventi nella maggior parte una causa genetica e la cui classificazione si basa non sulla incidenza come nei casi dei TR (incidenza = nuovi casi per anno) ma sulle prevalenze annue (prevalenza = casi già registrati + nuovi casi anno)⁽¹⁷⁾.

La definizione di Malattie Rare viene riservata alle patologie con prevalenza < 50 casi/100.000 abitanti.

Se tale concetto venisse traslato al campo dell'Oncologia si definirebbero rari tumori quali il carcinoma dello stomaco, del pancreas e della vescica che invece sono a tutti gli effetti delle neoplasie ad elevata incidenza.

Presi globalmente in numero aggregato i TR rappresentano il 12-15% delle neoplasie, ma in tale aggregazione si comprendono molte neoplasie diverse, alcune delle quali assolutamente eccezionali con una incidenza < 0,2/100.000 abitanti⁽⁶⁾.

Va comunque fatta ancora chiarezza su che cosa intendiamo come TR: esiste infatti una rarità assoluta di un tumore in qualunque Nazione del Mondo, quale può essere l'adenocarcinoma delle ghiandole surrenali.

Vi può essere una rarità geografica: alcune neoplasie sono rare in determinati Paesi e frequenti in Altri. A tal riguardo gli esempi abbondano: il carcinoma del rinofaringe è raro in Italia e nelle Nazioni Occidentali, ma rappresenta la seconda causa di morte nella Zona Asiatica che va dall'Iran alla Cina^(6,30).

Per contro il Carcinoma del colon è la prima neoplasia aggregando uomini e donne in Occidente, ma è molto infrequente nell'Africa Equatoriale.

Vi sono poi rarità relative all'Istotipo e non alla sede anatomica. Alcuni esempi sono rappresentati dal carcinoma della mammella ad istotipo adenoideocistico e il carcinoma polmonare bronchiolo alveolare o il carcinoma della prostata a piccole cellule⁽⁸⁾.

Anche queste forme pongono delle difficoltà nella diagnosi e nel tipo di trattamento da proporre e, generalmente, vanno tenute distinte dalle forme più frequenti che colpiscono lo stesso organo.

Tutte le particolarità che abbiamo cercato di riassumere in questa parte introduttiva creano delle grosse difficoltà nella classificazione internazionale

dei TR, a tal punto che ad oggi la OMS non ha ancora stilato un elenco ufficiale di tali neoplasie.

Nella Tabella I presentiamo un possibile elenco di neoplasie definite rare secondo il Working Group dell'ESMO (European Society for Medical Oncology).

Elenco di Neoplasie Rare	
Sarcomi dei tessuti molli	Tumori delle vie biliari
Sarcomi dell'osso	Carcinoma della pelvi renale
Mesotelioma maligno	Carcinoma degli ureteri
Carcinoma dell'ano	Carcinoma dell'uretra
Timoma	Carcinoma del pene
Carcinoma mammella maschile	Tumori del testicolo
Ca midollare tiroideo	Ca della vagina
Ca indifferenziato della tiroide	Ca della vulva
Ca del corticosurrene	Ca delle tube
Ca del pancreas endocrino	GIST
Feocromocitoma	Cilindroma
Tumori neuroendocrini	T. desmoplastico a piccole cellule
Malattie del trofoblasto	Tumore di Merkel
Tumori degli annessi cutanei	Desmoide

Tabella I.

Come appare evidente, le neoplasie rare sono entità molto variabili per sede di insorgenza e per Area Specialistica coinvolta: vi sono infatti tumori dell'Apparato Muscolo Scheletrico, dell'area Ginecologica, dell'Apparato Respiratorio, Gastroenterico e del SNC. Ne discende che non può esserci un Esperto Globale di TR, dotato di conoscenze tali, da poter affrontare da solo con disinvoltura la fase diagnostica e terapeutica di tutte queste neoplasie. Al contrario, se già una multidisciplinarietà è fondamentale nei Tumori Frequenti, è imprescindibile nei Tumori a bassa incidenza, coinvolgendo le figure professionali che siano dotate di expertise in quella neoplasia.

Perché dunque parliamo di expertise e non di esperienza?

L'utilizzo della parola inglese ci permette di quantificare numericamente il dato generico della esperienza.

Quest'ultima infatti ha una valenza squisitamente soggettiva, non numerabile con certezza. Un Clinico può autodefinirsi esperto nel trattamento chirurgico dei GIST perché crede di trasporre le sue esperienze di chirurgo sui carcinomi dell'apparato gastroenterico in questa forma rara di sarcoma, commettendo in tale modo un errore di presunzione. Infatti i GIST hanno un approccio chirurgico completamente diverso dai tumori epiteliali.

Expertise è invece definito il numero annuo di uno specifico tipo di tumore trattato da un Clinico o da una Istituzione. Questo sottintende che l'approccio non sia determinato dalla casualità dell'evento, ma dalla concentrazione dei casi distribuiti nel tempo⁽¹⁾.

Ma perché dunque i TR costituiscono un problema specifico nell'ambito dell'Oncologia?

Possiamo sostanzialmente riconoscere tre diverse tematiche che rendono precipuo l'approccio ai TR

- 1) Organizzazione sanitaria e assistenza
- 2) Ricerca e programmazione sanitaria
- 3) Diffusione della conoscenza e dell'expertise

Vediamo singolarmente i temi sopra elencati e le soluzioni che possono essere proposte.

1) Organizzazione sanitaria e assistenza nei TR

In molte neoplasie a bassa incidenza vi è la cronica mancanza di studi clinici controllati che validino atteggiamenti terapeutici, nati più dall'opinione personale che dalla Medicina Basata sulle Evidenze. Mancano inoltre in molti TR delle Linee Guida approvate che indirizzino i comportamenti dei Clinici. Ne deriva una ampia variabilità nei comportamenti da parte dei Clinici⁽¹⁰⁾.

Ne discende un evidente impatto negativo sui pazienti che, oltre a dovere affrontare la difficile esperienza di una malattia neoplastica, hanno la netta sensazione di trovarsi soli di fronte al tumore, non sufficientemente supportati dal proprio Medico o dall'Oncologo a cui hanno fatto riferimento.

In molte occasioni le incertezze dei Clinici vengono lette come segno di incompetenza e di approssimazione.

Le conseguenze più comuni sono rappresentate dalla ricerca di una soluzione da parte del Malato, priva di indirizzo logico, con consultazioni inappropriate di siti Internet, con deformazione della reale situazione ed elaborazione del tutto personalizzata della realtà.

L'evento finale è rappresentato, nel migliore dei casi, dalla migrazione sanitaria in struttura posta lontana dalla zona di residenza, peraltro dotata di buona expertise o, nel peggiore dei casi, il rivolgersi a dubbi personaggi del sottobosco della Sanità, pronti a sfruttare il bisogno di aiuto del Paziente e della sua Famiglia.

In sintesi, il manifestarsi di un TR determina nel Malato e nei Familiari un profondo sconvolgimento dell'esistenza che si manifesta in modo più acuto rispetto ai Pazienti affetti da Tumori più comuni⁽⁴⁾.

Numerose sono le soluzioni prospettate o già poste in atto per affrontare il problema della mancanza di expertise:

- a) costituzione di reti collaborative nazionali e sovranazionali che raccolgano i casi di TR, ne condividano le scelte operative e i percorsi in modo da indirizzare il Paziente verso Centri sicuramente esperti⁽²⁰⁾;
- b) creazione di un Gruppo di Valutazione all'interno di ogni Regione che possa definire il miglior percorso per il Paziente affetto da TR. Questo viene aiutato nella scelta nell'ambito della stessa area di residenza o al di fuori di essa per ottenere il migliore livello di cura;
- c) diffusione tra i Clinici della cultura sui TR con redazione e pubblicazione di Linee Guida ad hoc o implementazione di Linee Guida già esistenti e adattamento delle medesime alla realtà locale.
- d) pubblicizzare tra i Medici di Medicina Generale e la Popolazione le iniziative organizzative poste in essere relativamente ai punti (a) e (b) in modo da evitare iniziative personali poco efficaci e mosse più dalla emotività che dalla reale conoscenza del problema.

Nella Regione Piemonte già esistono alcune di queste soluzioni pratiche che affrontano le problematiche dei TR:

- un gruppo interdisciplinare per la diagnosi e lo studio dei TR che ha redatto le Linee Guida per il trattamento dei sarcomi dei tessuti molli delle estremità e del retroperitoneo;
- l'adesione di alcuni Centri Oncologici alla Rete Nazionale sui Tumori Rari che ha sede presso l'Istituto Nazionale dei Tumori di Milano;
- l'applicazione di protocolli Nazionali ed Europei soprattutto di terapia medica in alcuni TR: sarcomi, mesoteliomi, tumori neuroendocrini^(13,12,14,19).

2) La Ricerca nei Tumori Rari

L'incertezza che abbiamo descritto nel capitolo dell'Assistenza deriva dalla mancanza di una ricerca di base e clinica soddisfacente ed armonica nei TR.

Il problema, anche in questo caso, nasce dalla bassa incidenza di queste neoplasie che rende molto difficile sviluppare studi della portata e della significatività di quelli condotti sui Tumori Frequenti.

Anzi, ampliando la tematica, possiamo affermare che i modelli statistici validi per i Tumori Frequenti non si adattano alla situazione dei Tumori rari⁽¹⁾.

Le evidenze di letteratura in questi casi nascono prevalentemente da Case Report o da raccolte di pochi casi di una determinata neoplasia o da revisioni di letteratura dei casi precedentemente pubblicati.

Pochi sono gli studi di Fase III comparativi e randomizzati e ancora meno numerose le metanalisi completate sugli argomenti dei TR^(28,25).

Ne discende che le evidenze sono deboli e i gradi di raccomandazione che dovrebbero accompagnare una procedura siano di basso livello con un elevato grado di incertezza.

Il consenso che si applica, più che derivante dalla Medicina Basata sulle Evidenze⁽²⁷⁾ si limita ad un consenso tra Esperti in materia, con scelte condivise dalla totalità o, almeno, dalla maggioranza⁽¹²⁾.

Il consenso è ovviamente aperto a nuove evidenze ed acquisizioni pubblicate e va aggiornato assai frequentemente.

Gli Esperti coinvolti non devono appartenere ad una sola disciplina, ma devono provenire da tutte le Specialità coinvolte nella cura di uno specifico TR.

In questo modo, anche senza un valido supporto statistico, una scelta terapeutica può essere indirizzata dalle migliori evidenze scientifiche disponibili, e consolidata dall'esperienza del clinico e dalla condivisione del paziente⁽¹⁾.

I problemi statistici nei TR sono dovute agli stessi problemi già definiti per giustificare l'incertezza nell'Assistenza:

- bassa incidenza della malattia
- storia naturale poco conosciuta
- prognosi molto variabile da caso a caso
- elevata dispersione geografica
- elevata variabilità clinica

A questi si aggiungono fattori pesantemente condizionanti di tipo organizzativo:

- scarsa fattibilità di studi clinici randomizzati
- mancanza di studi ad hoc per ogni singolo TR

- impossibilità a rispondere ad ogni quesito relativo ad un TR con uno studio specifico (ad esempio utilità di una terapia adiuvante dopo metastasectomia polmonare in sarcomi)
- scarso interesse dei Clinici a partecipare a studi sui TR, non vedendone una ricaduta pratica in tempi brevi
- scarsa capacità di collaborazione tra Centri che concentrano i tumori rari e realtà sanitarie periferiche

Si sono comunque prospettate delle soluzioni statistiche e metodologiche anche negli studi sui TR, per giungere ai risultati in modo rapido ed efficace.

Talune di queste soluzioni sono così riassumibili:

- accettazione dei margini di incertezza statistica maggiori rispetto ai Tumori Frequenti (valori di $p = 0,10$; IC 80%; uso di end point precoci).
- maggiore integrazione tra Assistenza e Ricerca
- creazione di network di collaborazione nazionali ed internazionali
- creazione di registri di patologia
- studi di outcome precoci per validare una nuova terapia, seguiti da studi postregistratori obbligatoriamente lunghi, per validare i risultati⁽¹⁾
- uso di metodi moderni e accreditati nella produzione di Linee Guida⁽⁷⁾
- utilizzo di metodi statistici alternativi quali metodi Baiesiani, disegni sequenziali, disegni adattivi⁽¹⁾.

3) Introduzione di nuovi farmaci e di nuove terapie e ricerca di finanziamenti ad hoc per i TR

I TR, a causa della bassa incidenza, attraggono assai poco l'attenzione della Case Farmaceutiche e delle Istituzioni Pubbliche e Private che finanzino la ricerca di base e clinica.

Per migliorare questa situazione ed incrementare gli investimenti in questo campo la Food & Drug Administration (FDA) medical care ha coniato il termine Orphan Drug fin dal gennaio 1983.

Per farmaco Orphan si intende un prodotto rivolto specificatamente ad una patologia rara.

Per incentivare la ricerca in tal senso l'Amministrazione Pubblica Statunitense finanzia gli studi e, qualora venga scoperto un farmaco utile in una patologia infrequente, questo viene parzialmente detassato e il brevetto esclusivo mantenuto per oltre 10 anni⁽¹⁵⁾.

Inoltre nei TR la politica della FDA è di favorire l'uso razionale, seppur non evidence based, di farmaci già in uso in altre patologie, e traslati nei TR secondo l'uso definito off label.

In Europa l'EMA è molto più rigida nell'adottare queste regole, nel timore di abusi irrazionali e di off label incoerenti o francamente dolosi^(3,11,18).

Un esempio di off label razionalmente trasferito da una patologia rara ad un'altra con enorme successo è quello rappresentato da Imatinib, farmaco a bersaglio molecolare ideato per la traslocazione bcr-abl della Leucemia Mieloide Cronica e trasposto con successo sulla mutazione di kit nei GIST⁽²¹⁾.

Analoghi tentativi in altri TR, ma non supportati da una sufficiente base teorica sono andati inevitabilmente incontro al fallimento.

L'orientamento attuale è dunque di favorire la ricerca farmacologica nei TR, offrendo alle case farmaceutiche degli incentivi economici e snellendo le pratiche per giungere ad una più rapida sperimentazione di nuovi farmaci, sempre nel rispetto delle regole imposte dalla Dichiarazione dei Helsinki.

A fronte delle difficoltà elencate, vi è un crescente interesse culturale e sociale attorno alla tematica dei TR, sia nel mondo scientifico che nell'opinione pubblica.

Sia sufficiente pensare a quale risonanza abbia avuto sui Media Nazionali il problema del Mesotelioma nella città di Casale Monferrato o tra i lavoratori della cantieristica navale di Monfalcone, per comprendere come il clima stia cambiando.

Inoltre, proprio per la sua rarità, il TR attrae l'attenzione del ricercatore e del clinico, che viene spinto ad approfondire le sue conoscenze sull'argomento, soprattutto quando debba affrontare le problematiche di diagnosi e di cura in prima persona.

Vi son poi alcune specificità epidemiologiche: alcuni TR, proprio a causa della loro eccezionalità, hanno fatto sorgere delle ipotesi di correlazione eziopatogenetica, poi verificata come reale nel successivo follow up della popolazione.

Gli esempi più noti sono rappresentati dalla correlazione tra Asbesto e Mesotelioma; tra lavorazione del Cloruro di Vinile e Angiosarcomi epatici; tra esposizione durante la gravidanza a diestilbestrolo e insorgenza nel feto e nella neonata di carcinomi vaginali; nell'esposizione a pesticidi ed insorgenza di sarcomi di tessuti molli⁽²²⁾. Il TR evidenzia dunque più rapidamente una correlazione di possibile causa/effetto: bastano pochi casi in eccesso rispetto all'attesa per ipotizzare un rapporto di correlazione.

Nei Tumori Frequenti gli eventi, più diluiti, sarebbero meno evidenti⁽²²⁾.

Un secondo esempio è rappresentato dalla precoce conoscenza in alcuni TR di anomalie cromosomiche alla base della patogenesi del tumore.

L'esempio più famoso, anche perché scoperto nel lontano 1961, è il c.d. Cromosoma Filadelfia nella Leucemia Mieloide Cronica, anche se la comprensione di che cosa significasse questa traslocazione giunse solo 20 anni dopo⁽⁵⁾.

In molti sarcomi si sono evidenziate anomalie cromosomiche clonali con dimostrazione di geni di fusione coinvolti come riassunto nella Tabella II.

Tumore	Geni di Fusione Coinvolti	Anomalia cromosomica Clonale
Adenoma Pleomorfo gh. Salivari	CTNNB1-PLAG	t (3;8) (p21;q12)
Carcinoma Renale	HRCA1	t/del (3p11.2-q21)
Disgerminoma	?	i (12p)
Leiomioma uterino	HMGIC-RAD51B	t (12;14) (q14-15;q23-24)
Lipoma	HMGIC-LHFP	t (12;13) (13-15;q12)
Liposarcoma mixoide	DDIT3-CHOP-FUS	t (12;16) (q13;p11)
Meningioma	?	-22/22q-
Rabdomiosarcoma alveolare	PAX3-FKHR	t (2;13) (q37;q14) o t (1;13) (p13;p14)
Retinoblastoma	RB1	13q-
Sarcoma a cell. chiare	ATF1-EWS	t (12;22) (q13;q12 o 13)
Sarcoma di Ewing	FLI-EWS	t (11;22) (q24;q12)
Sarcoma sinoviale	SSX1-2-4-SYT	t (X;18) (p11;q11)
Tumore endoadd. desmoplastico a cellule rotonde	WT1-EWS	t (11;22) (p13;q12)
Tumore di Wilms	WT1	del 11(p13)

Tabella II.

Molte di queste anomalie non hanno ancora condotto ad una comprensione scientifica della patogenesi, né ad una ricaduta pratica sulla terapia, ma costituiscono un marker fondamentale per la diagnosi di certezza di uno specifico tipo di tumore⁽²³⁾.

Anche la letteratura prodotta negli ultimi anni quale esito di ricerche ben condotte sui TR è in costante aumento qualitativo e quantitativo.

Ricordiamo le due metanalisi sul trattamento adiuvante dei sarcomi dei tessuti molli^(28,25), gli studi di fase 3 sui GIST metastatici e sulla loro terapia adiuvante^(2,31,8) e molti illuminati studi di fase 2 che, pur non avendo braccio di controllo, hanno fatto sorgere ipotesi concrete per nuove terapie, cambiando la storia naturale del tumore e soprattutto il destino del Paziente.

A tal proposito ricordiamo la terapia combinata nel carcinoma epiteliale dell'ano⁽²⁴⁾ e il ruolo della CT con Cisplatino nei tumori del testicolo non seminomatosi⁽⁹⁾.

A seguito di tali studi e di una migliore comprensione della storia naturale dei TR è stato possibile a livello Nazionale e Internazionale redigere delle Linee Guida come prezioso ausilio per la pratica clinica quotidiana.

Nella Tabella III sono riportate alcune di queste LG con il dettaglio dell'anno di produzione.

	NCNN (USA)	ESMO (EU)	AIOM (IT)
Sarcomi tessuti molli	2009	2009	2008
Osteosarcoma	2009	2009	–
Tumori neuroendocrini	2009	2009	–
Tumori testicolo	2009	2009	2007
GIST	2009	2009	2008

Tabella III.

Purtroppo in altre patologie non si è ancora raggiunto un sufficiente consenso per redigere tali Linee Guida.

Ciò che appare per molti versi sorprendente è il fatto che la terapia di alcuni TR conduce a migliori risultati sulla sopravvivenza rispetto ad alcuni Tumori Frequenti.

Dai dati Eurocare⁽³⁰⁾ si evince infatti come alcuni TR abbiano un indice di guarigione o di sopravvivenza nettamente superiore alla media di molti altri tumori.

Tumore del testicolo	95%
Tumore germinale ovaio	92%
Tumore di Wilms	82%
Condrosarcoma	80%
Tiroide	78,7%
Linfoma di Hodgkin	78,7%
Osteosarcoma	70%

Tabella IV.

Nella Tabella IV si riportano le sopravvivenze a 5 anni di alcuni tipi di Neoplasia a bassa incidenza, con buona prognosi.

A fare da contraltare vi sono situazioni purtroppo ancora molto negative quali ad esempio i tumori a piccole cellule extrapolmonari che dalla diagnosi permettono una sopravvivenza non superiore a 6 mesi, o il cordoma che pur avendo una prognosi meno rapidamente infausta non ha ad oggi un trattamento che possa modificare la pur lenta ma inesorabile progressione⁽²⁶⁾.

Anche questi ultimi dati confermano come il campo dei TR non sia univoco ma vada considerato un mosaico di patologie a prognosi e possibilità di cura molto diverse.

In conclusione possiamo però affermare che gli aspetti di ricerca, terapeutici e di assistenza che si vanno profilando nei TR stanno diventando meno oscuri di un tempo.

La volontà di condividere i casi, di discuterli, di unire le forze in Gruppi ed Associazioni sia da parte dei Sanitari che dei Pazienti⁽¹⁶⁾ ha permesso importanti progressi nella conoscenza e nella cura in alcune di queste neoplasie.

Occorre comunque ampliare ancora la collaborazione, favorendo l'apertura di protocolli che coinvolgano realtà Nazionali, o meglio Internazionali.

Solo in questo modo e con un adeguato supporto da parte delle Istituzioni, si potrà permettere al Cittadino affetto da un TR di godere degli stessi diritti degli Altri Malati di Tumore e di poter utilizzare al meglio i mezzi terapeutici e le risorse messe a sua disposizione.

BIBLIOGRAFIA

1. Behera M., Kumar A., Soares H.P., Sokol L., Djulbegovic B.: *Evidence-based medicine for rare diseases: implications for data interpretation and clinical trial design*. Cancer Control. 14,160-166, 2007.
2. Blanke C.D., Demetri G.D., von Mehren M.: *Long-term results from a randomized phase II trial of standard- versus higher-dose imatinib mesylate for patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing KIT*. J Clin Oncol. 26, 620-625, 2008.
3. Casali P.G.: *Executive Committee of ESMO. The off-label use of drugs in oncology: a position paper by the European Society for Medical Oncology (ESMO)*. Ann Oncol. 18,1923-1925, 2007.
4. Comandone A., Boglione A., Lombardi I., Chiadò Cutin S., Ingui M.: *Psychological support during chemotherapy in patients with sarcomas. 8th National Congresso of Medical Oncology 18-21 November 2006, Milan, Annals of Oncology 17 (S11), 2006, Abstract G11*.
5. Comandone A., Boglione A.: *Terapia dei GIST in fase avanzata. In "GIST Tumori Stromali Gastrointestinali", II edizione*. Ed Società Editrice Universo, 2009 Roma.
6. Curado M.P., Edwards B., Shin H.R., Storm H., Ferlay J., Heanue M. and Boyle P.: *Cancer Incidence in Five Continents, Vol. IX IARC Scientific Publications No. 160, 2007 Lyon, IARC*.
7. De Palma R., Liberati A., Ciccone G., Bandieri E., Belfiglio M., Ceccarelli M., Leoni M., Longo G., Magrini N., Marangolo M., Roila F.: *Programma Ricerca e Innovazione Emilia Romagna Oncology Research Group. Developing clinical recommendations for breast, colorectal, and lung cancer adjuvant treatments using the GRADE system: a study from the Programma Ricerca e Innovazione Emilia Romagna Oncology Research Group*. J Clin Oncol. 26,1033-1039, 2008.
8. Dematteo R.P., Ballman K.V., Antonescu C.R., Maki R.G., Pisters P.W., Demetri G.D., Blackstein M.E., Blanke C.D., von Mehren M., Brennan M.F., Patel S., McCarter M.D., Polikoff J.A., Tan B.R., Owzar K.; *American College of Surgeons Oncology Group (ACOSOG) Intergroup Adjuvant GIST Study Team. Adjuvant imatinib mesylate after resection of localised, primary gastrointestinal stromal tumour: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. Lancet. 373, 1097-1104, 2009.
9. Einhorn L.H., Williams S.D., Mandelbaum I., Donohue J.P.: *Surgical resection in disseminated testicular cancer following chemotherapeutic cytoreduction*. Cancer; 48, 904, 1981.
10. Grilli R., Taroni F.: *Governo clinico. Governo delle organizzazioni sanitarie e qualità dell'assistenza*. Ed. Il Pensiero Scientifico Editore, 2004 Roma.
11. http://www.agenziafarmaco.it/INFO_SPER_RIC/sectionf&cf.html
12. <http://www.aiom.it> (Linee Guida)
13. <http://www.cpo.it/lineeguida.htm>
14. <http://www.esmo.org/research/esmo-clinical-recommendations.html>
15. <http://www.fda.gov/ForIndustry/DevelopingProductsforRareDiseasesConditions/Overview/ucm119477.htm>
16. <http://www.gistonline.it>
17. http://www.ministerosalute.it/imgs/C_17_normativa_194_allegato.pdf

18. <http://www.parlamento.it/leggi/980941.htm>
19. <http://www.reteoncologica.it/>
20. <https://eonc.istitutotumori.mi.it/RTR/>
21. Joensuu H., Roberts P.J., Sarlomo-Rikala M., Andersson L.C., Tervahartiala P., Tuveson D., Silberman S., Capdeville R., Dimitrijevic S., Druker B., Demetri G.D.: *Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor*. N Engl J Med. 344,1052-1056, 2001.
22. La Vecchia C.: *I tumori rari: alcuni concetti epidemiologici*. In: *Tumori rari. Attualità e progetti*. Ed. Il Pensiero Scientifico Editore, 2003 Roma.
23. Ladanyi Antonescu C.R., Dal Cin P.: *Cytogenetic and molecular genetic pathology of soft tissue tumors*. In *Soft Tissue Tumors, Fifth Edition*, Ed Mosby Elsevier, 2008.
24. Nigro N.D., Vaitkevicius V.K., Considine B.: *Combined therapy for cancer of the anal canal: a preliminary report*. Dis Colon Rectum, 17, 354,1974.
25. Pervaiz N., Colterjohn N., Farrokhyar F., Tozer R., Figueredo A., Ghert M.: *A systematic meta-analysis of randomized controlled trials of adjuvant chemotherapy for localized resectable soft-tissue sarcoma*. Cancer. 113, 573-581, 2008.
26. Raghavan D., Brecher M.L., Johnson D.H., Meropol N.J., Moots P.L., Rose P.G., Mayer I.A.: *Textbook of Uncommon Cancer*, 3rd Edition. Wiley, 2006.
27. Sackett E.: *Evidence based medicine: what it is and what it isn't*. BMJ. 312, 71-72, 1996.
28. Sarcoma Meta-analysis Collaboration: *Adjuvant chemotherapy for localised resectable soft-tissue sarcoma of adults: meta-analysis of individual data*. Lancet. 350, 1647-1654, 1997.
29. Scopsi L., Frontini L., Clemente C.: *Tumori rari. Attualità e progetti*. Ed. Il Pensiero Scientifico Editore, 2003 Roma.
30. Verdecchia A., Francisci S., Brenner H., Gatta G., Micheli A., Mangone L.: *Recent cancer survival in Europe: a 2000-02 period analysis of EURO CARE-4 data*. Lancet Oncology 8,784-796, 2007.
31. Verweij J., Casali P.G., Zalcberg J.: *Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial*. Lancet. 364, 1127-1134, 2004.

IL DISTURBO OSSESSIVO-COMPULSIVO AD ESORDIO PRECOCE: FORME FAMILIARI E FORME AUTOIMMUNI

Tesi di Laurea premiata dalla Fondazione Cavalieri Ottolenghi
in collaborazione con l'Accademia di Medicina di Torino

Alice Chiarle

Servizio per i Disturbi Depressivi e d'Ansia - Dipartimento di Neuroscienze
Università degli Studi di Torino

Key words: *Obsessive-Compulsive / Disturbo
Disorder Ossessivo-Compulsivo
Early-onset / Esordio precoce
Familiarity/ Familiarità
Anti-central Nervous / Anticorpi anti-sistema
system antibodies nervoso centrale
PANDAS / PANDAS*

Abstract:

Early-onset Obsessive-Compulsive Disorder: familial and autoimmune subtypes

This experimental study concerns the results of an analysis made on a sample of subjects with Obsessive-Compulsive Disorder (OCD) referred to the Mood and Anxiety Disorders Unit, Department of Neuroscience, University of Turin.

Aim of the study: to evaluate the clinical features of early-onset OCD, such as specific symptoms, comorbidity, familiarity and some markers of autoimmunity.

Materials and methods: 148 subjects with principal diagnosis of OCD consecutively referred to the Mood and Anxiety Disorders Unit in the last three years were recruited for our clinical and familial trial; all the subjects referred to the same Unit in the last year were recruited for the immunological study (n = 64). A semi-structured interview and specific psychometric rating scales were used to collect data. The 64 sera were tested in the Neuropathology Unit, Department of Neuroscience, University of Turin.

Results: 33 of the 148 patients had an early-onset OCD (onset of symptoms \leq 10 years); 69 of them had a late-onset OCD (\geq 17 years); the remaining 46 subjects, with an onset of the symptoms during the adolescence, have been excluded from the statistical analysis in order to eliminate the confounding bias. Early-onset OCD patients were more frequently men and with higher mean educational levels; in these subjects the onset of the disorder was more frequently insidious and its course chronic; the most frequent symptoms were religious obsessions and counting and repetition

compulsions; there were a higher comorbidity with Bipolar I Disorder and a more frequent familiarity for OCD. Out of 64 OCD patients, 4 resulted positive for anti-brain antibodies and 3 of them had an early-onset OCD.

Riassunto:

Il Disturbo Ossessivo-Compulsivo ad esordio precoce: forme familiari e forme autoimmuni.

Lo studio sperimentale di questa tesi presenta i risultati di un'analisi condotta su una casistica di pazienti affetti da Disturbo Ossessivo-Compulsivo (DOC) afferiti presso il Servizio per i Disturbi Depressivi e d'Ansia del Dipartimento di Neuroscienze dell'Università di Torino.

Scopo dello studio: valutare le caratteristiche del DOC ad esordio precoce, con particolare riferimento agli aspetti sintomatologici specifici e di comorbidità, alla familiarità e ad alcuni indici autoimmunitari.

Materiali e metodi: 148 pazienti con diagnosi principale di DOC consecutivamente afferiti al Servizio per i Disturbi Depressivi e d'Ansia negli ultimi tre anni sono stati considerati per lo studio clinico e di familiarità; per la parte immunologica sono stati valutati tutti i pazienti afferiti al Servizio nell'ultimo anno (n = 64). Tutti i soggetti sono stati esaminati mediante un'intervista clinica semistrutturata e con scale psicometriche specifiche; il siero dei 64 pazienti testati è stato esaminato presso il Laboratorio di Neuropatologia del Dipartimento di Neuroscienze dell'Università di Torino.

Risultati: dei 148 pazienti reclutati, 33 avevano avuto un esordio del disturbo prima o all'età di 10 anni e 69 dai 17 anni in poi; i rimanenti 46 soggetti, esorditi nell'adolescenza, sono stati esclusi dall'analisi dei dati al fine di ridurre i fattori di confondimento. I pazienti con esordio precoce erano più frequentemente di sesso maschile, avevano più elevata scolarità ed erano più frequentemente single; in tale gruppo di soggetti l'esordio era più frequentemente insidioso ed il decorso cronico; le ossessioni religiose e i rituali di conteggio e di ripetizione erano i sintomi più frequenti; il Disturbo Bipolare di Tipo I risultava significativamente associato in comorbidità e si riscontrava una tendenza ad una maggiore familiarità per DOC. Infine, 4 pazienti su 64 erano positivi per auto-anticorpi anti-sistema nervoso centrale, di cui il 75% apparteneva al gruppo *early-onset*.

Il Disturbo Ossessivo-Compulsivo ad esordio precoce: definizione, epidemiologia e clinica

Fino a pochi anni fa il Disturbo Ossessivo-Compulsivo ad esordio in età pediatrica e nella fanciullezza era sostanzialmente misconosciuto, nonostante le descrizioni classiche riportassero che la maggioranza dei pazienti ossessivo-compulsivi adulti avesse presentato l'esordio del quadro clinico nell'infanzia o nell'adolescenza. È negli ultimi quindici anni che la ricerca è andata ad indagare le diverse caratteristiche del DOC ad esordio precoce, interpretandone le peculiarità ora come tipiche della fase di sviluppo del bambino affetto da questo disturbo, ora come a tal punto specifiche da delinearne un sottotipo distinto.

In molti studi presenti in letteratura l'età soglia che distingue l'esordio precoce da quello tardivo è stata considerata di 15 anni^(19,26), 17⁽¹⁵⁾ o 18^(2,22,35), mentre altri due lavori hanno scelto di eliminare dal campione i soggetti il cui disturbo era esordito durante gli anni dell'adolescenza, per evitare di includere pazienti le cui caratteristiche potessero presentare aspetti comuni ai soggetti con esordio sia precoce che tardivo. In particolare, Do Rosario-Campos e collaboratori⁽¹³⁾ hanno deciso di escludere tutti i soggetti il cui DOC era esordito fra gli 11 e i 17 anni.

Per quanto riguarda l'epidemiologia delle forme di Disturbo Ossessivo-Compulsivo ad esordio in età pediatrica, non sono molti gli studi condotti su campioni di bambini in età prepubere: nonostante il loro esiguo numero, essi sono tuttavia rilevanti sia per l'ampiezza del campione indagato sia per la loro distribuzione su aree geografiche diverse (Stati Uniti, Gran Bretagna e Svizzera). La prevalenza punto del DOC riscontrata in tali studi è pressoché identica: dello 0,17%, 0,25% e 0,21%, rispettivamente nei lavori di Costello *et al.*⁽¹¹⁾; Steinhausen *et al.*⁽³⁶⁾; ed Heyman *et al.*⁽²⁰⁾.

È inoltre del 1973 il primo rilievo – da parte di Adams e collaboratori⁽¹⁾ – di una netta preponderanza del sesso maschile nel DOC esordito in età precoce, mentre nel 1989 Swedo e colleghi hanno documentato un rapporto di 2:1 tra maschi e femmine, ed un'età d'esordio anticipata nei maschi (9 anni) rispetto alle femmine (11 anni)⁽³⁷⁾. Sono tuttavia gli studi condotti su adulti esorditi precocemente *versus* tardivamente gli unici che possano dirci in che misura la maggior prevalenza del sesso maschile nei bambini si mantenga effettivamente nell'adulto: tre fra questi lavori hanno rilevato un'aumentata frequenza del sesso maschile^(15,22,42), nonostante altri tre^(13,26,35) non abbiano confermato tale dato.

Per quanto riguarda le caratteristiche sintomatologiche specifiche del DOC ad esordio precoce, secondo i dati attualmente disponibili risulta che:

i bambini presentano un elevato numero di ossessioni e di compulsioni; rispetto agli adolescenti i bambini riportano un numero di compulsioni superiore alle ossessioni; le ossessioni sono frequentemente accompagnate da pensiero magico, incentrato sul timore di un evento catastrofico in ambito familiare (solitamente la morte di un genitore); le ossessioni più frequenti sono di contaminazione, sessuali e somatiche, mentre le compulsioni più frequentemente riportate sono quelle di lavaggio, di ripetizione, di controllo e di ordine; nei bambini con DOC sembra ci sia una maggiore frequenza di ossessioni e compulsioni atipiche, le quali potrebbero essere indicative di una stretta relazione fra Disturbo Ossessivo-Compulsivo e Sindrome di Tourette da un punto di vista psicopatologico comune. Inoltre, benché i sintomi tendano ad avere un decorso fluttuante, essi sono persistenti nella maggioranza dei pazienti e il loro contenuto cambia frequentemente nel tempo⁽³¹⁾; la presenza di scarso *insight* è più frequente nei bambini (18%) rispetto agli adolescenti (6%) ed agli adulti (6%), come evidenziato da Geller e collaboratori⁽¹⁶⁾; ed è infine presente un importante coinvolgimento dei genitori nei rituali dei bambini, soprattutto in termini di continua rassicurazione, la cui richiesta può essere vista come una vera e propria compulsione di controllo verbale.

Degno di nota è un accenno alla comorbidità tra il DOC ad esordio precoce e alcuni disturbi neurologici: fra gli studi condotti su adulti con DOC ad esordio precoce versus tardivo, infatti, quasi tutti hanno evidenziato un'elevata comorbidità del DOC *early-onset* con i disturbi da tic, indipendentemente dal *cut-off* utilizzato per definirne l'età d'esordio^(13,19,22,26). Inoltre alcuni Autori hanno osservato una più alta frequenza dei cosiddetti *soft neurological signs* in pazienti pediatriche affetti da Disturbo Ossessivo-Compulsivo^(21,32,37,38).

Il Disturbo Ossessivo-Compulsivo ad esordio precoce: le forme familiari

Numerose evidenze cliniche e sperimentali mettono in risalto gli aspetti biologici del DOC, tra cui l'esistenza di una componente familiare e dunque di fattori geneticamente trasmissibili.

L'intuizione che un'età d'esordio precoce dei sintomi ossessivo-compulsivi nei probandi fosse fortemente associata con una più elevata frequenza del disturbo nelle famiglie è stata avanzata per la prima volta nel 1992 nello studio di Bellodi e colleghi: il rischio di DOC era del 3,4% nei parenti dei probandi, ma saliva all'8,8% nei parenti dei probandi con un'età inferiore ai 14 anni⁽⁴⁾. Similmente, Pauls e collaboratori⁽³⁰⁾ – intervistando i familiari di primo grado di 100 adulti con DOC (esorditi sia precocemente sia tardivamente) e confrontandoli con i parenti di primo grado di 33

controlli sani – hanno rilevato tassi significativamente più alti di DOC e di Sindrome OC Sottosoglia fra i parenti dei probandi con DOC esorditi prima dei 10 anni d'età. In un ampio studio familiare condotto esclusivamente su bambini con DOC, Do Rosario-Campos e colleghi hanno rilevato tassi di DOC del 22,7% nei 325 parenti di primo grado dei probandi affetti – contro lo 0,9% nei parenti dei controlli sani. È interessante notare che questo lavoro, che riporta i tassi di DOC nelle famiglie più alti in letteratura, è anche lo studio controllato condotto su soggetti più giovani, con il 95% dei probandi di età inferiore agli 11 anni: gli Autori hanno dunque ipotizzato che il DOC pediatrico potesse costituire un sottotipo specifico trasmesso geneticamente⁽¹⁴⁾. Molto interessanti sono anche i risultati dello studio più recente di Chabane e colleghi⁽¹⁰⁾, che – attuando una selezione del campione simile a quella utilizzata negli studi “*early- vs late-onset*”, ha studiato la familiarità per DOC e disturbi da tic in un campione costituito da 108 probandi adulti con DOC ad esordio precoce (< 16 anni) e da 36 con DOC ad esordio tardivo (≥ 16 anni), e i loro parenti di primo grado. I 199 parenti di primo grado dei probandi con DOC ad esordio precoce erano affetti a loro volta da DOC nel 16,1% dei casi, contro il 2,9% dei parenti dei casi ad esordio tardivo, la cui prevalenza del DOC non si discostava da quella della popolazione generale.

Il Disturbo Ossessivo-Compulsivo ad esordio precoce: le forme autoimmuni

È stato proposto che vi sia un'ipotesi autoimmune alla base di un sottotipo specifico di Disturbo Ossessivo-Compulsivo (DOC) con esordio in età pediatrica: l'acronimo PANDAS (*Paediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders Associated with Streptococcal infections*) è stato coniato nel 1994 da parte di Swedo e collaboratori⁽³⁹⁾ per indicare una sindrome di natura autoimmune legata ad infezione streptococcica di gruppo A, caratterizzata da un'insorgenza tipicamente acuta nel corso dell'età prepubere (3-12 anni), da un decorso di tipo episodico, dall'associazione temporale fra l'esacerbazione dei sintomi ossessivo-compulsivi e l'infezione batterica ed infine dalla presenza di anomalie neurologiche associate (i cosiddetti *soft neurological signs*)⁽⁴¹⁾. L'ipotesi patogenetica sottesa coinvolgerebbe un fenomeno di reazione crociata tra gli antigeni di superficie dello streptococco β-emolitico ed alcuni epitopi dei gangli della base, secondo un meccanismo di mimetismo molecolare^(23,29,40).

L'ipotesi autoimmune nel Disturbo Ossessivo-Compulsivo è stata studiata prevalentemente su campioni di bambini: sebbene in uno studio non siano state

rilevate differenze statisticamente significative⁽³⁴⁾, in numerosi lavori presenti in letteratura si è riscontrata una quota elevata di auto-anticorpi diretti contro il sistema nervoso centrale (SNC) o, specificatamente, verso i gangli della base, in soggetti con DOC ad esordio precoce, con PANDAS ed in giovani pazienti affetti da Sindrome di Gilles de la Tourette^(24,27,28,33). Soltanto due studi sono andati invece ad indagare l'ipotesi autoimmune in campioni di pazienti ossessivo-compulsivi adulti. Black e collaboratori⁽⁵⁾ hanno analizzato il siero di 13 soggetti adulti affetti da DOC alla ricerca di indici di autoimmunità aspecifici e neurologici, quali anticorpi diretti verso alcune strutture del sistema nervoso centrale (anticorpi anti-corteccia, anti-cellule di Purkinje ed anti-recettore per l'acetilcolina), senza riscontrare differenze statisticamente significative. Morer e colleghi⁽²⁷⁾ hanno invece messo a confronto 40 soggetti affetti da DOC, suddivisi per età d'esordio del disturbo (precoce, entro gli 11 anni, e tardivo, oltre gli 11) con 14 controlli aventi altre diagnosi psichiatriche: l'esordio in età precoce del DOC era associato ad elevati valori del titolo anti-streptolisinico (ASLO) e ad una maggior frequenza di disturbi da tic e di faringiti ricorrenti in epoca prepubere, suggerendo la specificità di tale sottotipo di pazienti con comparsa della sintomatologia ossessivo-compulsiva durante l'infanzia.

STUDIO SPERIMENTALE: CONFRONTO TRA DISTURBO OSSESSIVO-COMPULSIVO *EARLY-ONSET* E DISTURBO OSSESSIVO-COMPULSIVO *LATE-ONSET*

Introduzione

Benché non sia al momento completamente nota l'eziopatogenesi del DOC, l'ipotesi più accreditata è che alla base di questa psicopatologia vi sia una genesi multifattoriale, in cui concorrono fattori biologici, psicologici e sociali. Secondo gli studi più recenti, le forme del disturbo ad esordio precoce sarebbero quelle in cui hanno maggior peso le variabili biologiche; oppure, tra le forme ad esordio precoce, vi sarebbe una più elevata percentuale di casi ad eziologia esclusivamente biologica.

Sono essenzialmente due i fattori biologici che vengono considerati nella genesi del DOC e per ognuno esistono degli importanti lavori sperimentali a supporto:

- a) fattori genetici (familiarità per il Disturbo Ossessivo-Compulsivo e/o per disturbi affini, quali i Disturbi Ossessivi-Compulsivi Subclinici e i disturbi da tic);

b) fattori immunologici (reazione autoimmunitaria secondaria ad infezione streptococcica, come avviene nella sindrome PANDAS).

Naturalmente i due fattori possono o coesistere come variabili indipendenti o essere correlati nel senso di una generica predisposizione all'autoimmunità dovuta alla familiarità per il disturbo.

Scopo dello studio

Lo scopo del presente studio sperimentale è di valutare le caratteristiche del Disturbo Ossessivo-Compulsivo ad esordio precoce, con particolare riferimento agli aspetti sintomatologici specifici e di comorbidità, alla familiarità e ad alcuni indici autoimmunitari.

Materiali e metodi

Tutti i pazienti con diagnosi principale di Disturbo Ossessivo-Compulsivo (secondo i criteri diagnostici del DSM-IV TR), consecutivamente afferiti al Servizio per i Disturbi Depressivi e d'Ansia del Dipartimento di Neuroscienze dell'Università di Torino negli ultimi tre anni, sono stati considerati per la prima parte di questo studio (studio clinico e di familiarità). Per la parte immunologica sono stati valutati invece tutti i pazienti afferiti al Servizio nell'ultimo anno.

I soggetti in studio avevano un'età compresa tra 18 e 65 anni; un punteggio ≥ 16 alla *Yale-Brown Obsessive-Compulsive Scale* (Y-BOCS); e una durata del DOC di almeno un anno. Inoltre, tutti i soggetti hanno espresso il proprio consenso informato a partecipare allo studio in oggetto, dopo completa informazione riguardo alle finalità e alle procedure della ricerca. Criteri di esclusione sono stati considerati la comorbidità con i disturbi psicotici; il ritardo mentale; e la presenza di disturbi mentali organici.

Tutti i soggetti ammessi a questo studio sono stati esaminati mediante un'intervista semistrutturata da noi sviluppata e utilizzata in lavori precedenti^(2,3,6,7,8,9,25), volta alla rilevazione dei seguenti parametri: dati demografici; valutazione diagnostica; dati clinici sintomatologici e di familiarità.

Il siero dei pazienti testati per le indagini immunologiche è stato esaminato nel Laboratorio di Neuropatologia del Dipartimento di Neuroscienze dell'Università di Torino, centro di riferimento per la detenzione di anticorpi contro il Sistema Nervoso per il Piemonte e la Valle d'Aosta. Gli anticorpi anti-Sistema Nervoso Centrale (anti-SNC) sono stati ricercati facendo

interagire il siero dei pazienti con preparati di encefalo di ratto: a tal fine si è prelevato e sierato il sangue di ogni paziente, ed il siero è stato conservato a -80°C fino al suo utilizzo. L'encefalo di ratto è stato ottenuto sacrificando ratti *Wistar* adulti, anestetizzati per mezzo di somministrazione intraperitoneale di ketamina (100 mg/kg) in aggiunta a xylazina (5 mg/kg) o diazepam (2,5 mg/kg), in accordo con le Linee Guida dell'Istituto Superiore di Sanità e le Leggi Italiane per l'Uso e la Gestione degli Animali da Esperimento (DL 116/92), approvate dal Ministero della Salute e dal Comitato Etico dell'Università degli Studi di Torino. Si è proceduto dunque a perfusione endocardica con paraformaldeide al 4%, al fine di preservare al meglio i diversi siti antigenici. Si sono così ottenute sezioni di gangli della base, di corteccia cerebrale e di cervelletto dello spessore di 10-30 μm . Le sezioni, flottanti o su supporto, sono state quindi incubate con concentrazioni decrescenti (1:100 - 1:1000) di siero dei pazienti, *overnight* a 4°C . Gli anticorpi sono stati svelati con metodo *Avidin-Biotin Complex* (ABC), complessato con Perossidasi e sviluppato con Diaminobenzidina (DAB).

Il confronto statistico tra i pazienti con DOC ad esordio precoce e tardivo è stato condotto sulla base del metodo più rigoroso proposto dalla letteratura sull'argomento⁽¹³⁾: sono stati considerati da un lato i pazienti con esordio dei sintomi ossessivo-compulsivi databile entro i 10 anni di età (*early-onset*) e, dall'altro, i pazienti con esordio dei sintomi ossessivo-compulsivi databile a partire dai 17 anni d'età (*late-onset*). I pazienti con esordio dei sintomi compreso nella fascia di età intermedia non sono stati considerati per l'analisi statistica, al fine di ridurre i fattori di confondimento.

Risultati

Dei 148 pazienti con DOC reclutati, 33 (22,3%) avevano avuto un esordio del disturbo prima o all'età di 10 anni (esordio precoce o *early-onset*), 69 (46,6%) dai 17 anni in poi (esordio tardivo o *late-onset*); i rimanenti 46 soggetti (31,1%), esorditi nell'adolescenza, sono stati dunque esclusi dall'analisi dei dati.

L'età al momento dell'intervista era minore nei soggetti con esordio precoce dei sintomi O-C rispetto a quelli con esordio tardivo (31,8 anni vs 38,1); l'età di esordio dei sintomi e del disturbo era significativamente più precoce nel gruppo *early-onset*: i O-C erano esorditi a 7,7 anni e il disturbo a 16,8 nei soggetti *early-onset*, mentre a 24,5 e 27,5 nei *late-onset*.

I soggetti con esordio precoce erano di sesso maschile nel 54,5% dei casi contro il 34,8% nel gruppo con esordio tardivo; tale differenza aveva un *trend*

di significatività. Altre variabili socio-demografiche quali scolarità e stato civile apparivano differenti nei due gruppi: i soggetti *early-onset* avevano più elevata scolarità ed erano più frequentemente single della controparte *late-onset*.

Per quanto riguarda le caratteristiche cliniche, l'esordio era più frequentemente insidioso nel DOC ad esordio precoce rispetto all'esordio tardivo (81,8% vs 60,9%); ed il decorso più cronico (93,9% vs 78,3%). Le ossessioni religiose erano più frequenti nei soggetti *early-onset* (45,5% vs 21,7%), così come i rituali di conteggio (33,3% vs 15,9%) e di ripetizione (66,7% vs 36,2%). La gravità dei sintomi, misurata attraverso il punteggio totale di Y-BOCS, era sovrapponibile nei due gruppi (*early-onset*: 26,2; *late-onset*: 25,3); tuttavia emergeva un *trend* di significatività per un più elevato sottopunteggio di compulsioni nel DOC ad esordio precoce. Per quanto riguarda la comorbidità *lifetime* di Asse I, unicamente il Disturbo Bipolare di Tipo I risultava associato al gruppo con esordio precoce (6,1% vs 0%). Pur avendo riscontrato una tendenza ad una maggiore familiarità per Disturbo Ossessivo-Compulsivo nelle forme *early-onset*, il dato non è risultato statisticamente significativo.

Per quanto concerne poi l'indagine sui correlati immunologici, il numero di soggetti riscontrati positivi alla presenza di anticorpi anti-SNC è risultato non elevato: 4 pazienti positivi su 64 soggetti testati (6,25%). Tale dato è tuttavia quello atteso, dal momento che l'ipotesi autoimmunitaria spiegherebbe, secondo i dati sinora pubblicati in letteratura, fino 10% dei casi di DOC ad esordio precoce: in una popolazione di pazienti DOC adulti tale stima è quindi destinata ad essere inferiore. È però degno di nota il fatto che sia stata riscontrata una positività alla presenza di anticorpi anti-SNC in 3 pazienti del gruppo *early-onset* (15%), mentre la stessa positività è stata riscontrata in un solo caso tra i *late-onset* (3,7%). È inoltre interessante analizzare i dati da altri due punti di osservazione:

1. considerando tutti i soggetti positivi alla presenza di anticorpi anti-SNC, il 75% è rappresentato da pazienti *early-onset*;
2. la positività per anticorpi anti-SNC è stata riscontrata unicamente in soggetti con anamnesi familiare negativa per Disturbo Ossessivo-Compulsivo.

Discussione e conclusioni

Lo scopo del presente studio era di verificare se gli adulti con DOC esordito in età prepubere differissero da quelli esorditi in età adulta in termini di caratteristiche sintomatologiche, di familiarità e di assetto immunologico.

Il campione totale di pazienti analizzati (n = 148) è apparso rappresentativo di una tipica popolazione adulta di pazienti DOC. Per l'analisi delle eventuali differenze fra DOC ad esordio precoce e tardivo, i pazienti i cui sintomi erano esorditi fra gli 11 e i 16 anni sono stati esclusi dallo studio (circa il 32% del campione) al fine di ridurre al massimo i fattori di confondimento.

Nel gruppo ad esordio precoce abbiamo riscontrato un *trend* di significatività riguardo alla maggiore prevalenza del sesso maschile. Do Rosario-Campos e colleghi⁽¹³⁾, che hanno utilizzato gli stessi criteri di *cut-off* da noi impiegati, non hanno riscontrato alcuna differenza di genere. D'altra parte altri studi che hanno utilizzato diversi *cut-off* hanno riportato un'associazione fra esordio precoce del DOC e sesso maschile^(15,16,22,42), per cui è difficile trarre conclusioni univoche.

I nostri dati confermano pertanto che – benché il DOC infantile sia prevalente nei maschi – le forme che proseguono in età adulta sono ugualmente distribuite nei due sessi.

La proporzione significativamente più alta di single nei soggetti con DOC ad esordio precoce potrebbe definire un sottotipo del disturbo a maggiore gravità. Un'altra spiegazione possibile del fenomeno, unitamente al rilievo di una scolarità più elevata - sempre nel gruppo con esordio precoce -, è che questi dati demografici riflettano un *trend* della popolazione italiana: anche nella popolazione generale infatti i giovani adulti sono più single e più scolarizzati; la differenza di età dei due gruppi al momento dell'intervista potrebbe quindi essere un fattore determinante nella comparsa di queste differenze, indipendentemente dalla diagnosi di DOC.

Nel gruppo ad esordio prepubere abbiamo poi riscontrato con più elevata frequenza un esordio insidioso ed un decorso cronico rispetto a coloro che erano esorditi in età giovane adulta. Questo risultato contribuisce all'ipotesi che il DOC ad esordio precoce sia un sottotipo specifico caratterizzato da maggiore gravità.

Per quanto riguarda i sintomi ossessivo-compulsivi, nessuna differenza è stata riscontrata nei due gruppi – ad eccezione di una più elevata frequenza di ossessioni religiose, rituali di ripetizione e di conteggio nei pazienti con esordio precoce dei sintomi. Questi dati sono in accordo con quelli riportati in altri studi retrospettivi condotti sugli adulti^(13,22). In accordo agli stessi Autori^(13,15,22) sono stati rilevati punteggi di Y-BOCS significativamente più elevati nel gruppo con esordio precoce, dato anch'esso indice di maggior gravità complessiva in questo sottotipo; inoltre, come Fontenelle e collaboratori⁽¹⁵⁾, anche noi abbiamo riscontrato un più elevato sottopunteggio di compulsioni associato all'esordio precoce, benché non raggiungesse la significatività statistica in rapporto ai soggetti con esordio tardivo.

La comorbidità di Asse I nel nostro campione non sembrava differire in relazione all'età d'esordio, tranne che per quanto riguarda il Disturbo Bipolare di Tipo I, presenti in due pazienti con esordio prepubere contro nessuno esordito in età adulta. Si ritiene che fattori genetici abbiano grande importanza nel Disturbo Bipolare, caratteristica che condividono con il DOC ad esordio prepubere^(14,17,18,30); studi ulteriori devono chiarire se esiste una vulnerabilità comune ai due disturbi, verosimilmente associata ad una più precoce età d'esordio. Globalmente considerati, i nostri risultati depongono per la presenza di uno specifico sottotipo di DOC ad esordio prepubere, diverso dal DOC esordito in età adulta per alcune caratteristiche socio-demografiche e cliniche che sembrano suggerirne una maggiore gravità.

Per quanto riguarda la familiarità, il nostro studio rileva una maggior presenza di familiarità positiva nei parenti dei pazienti *early-onset* sia per i disturbi psichici in generale che, soprattutto, per il DOC; tale risultato non raggiunge però la significatività statistica. Questo dato non confermerebbe pertanto la netta tendenza familiare delle forme di DOC ad esordio precoce, segnalando invece la necessità di una maggior cautela nell'affermazione di tale dato e, dunque, l'esigenza di ulteriori verifiche.

Seppure ancora limitati e pertanto preliminari, appaiono interessanti i risultati emersi dalle indagini immunologiche: una certa percentuale di soggetti con DOC presenta positività agli anticorpi anti-SNC (circa il 6%), e questa positività sembra essere soprattutto peculiare dei pazienti *early-onset*. Inoltre, i soggetti positivi alla reazione immunologica sono tutti pazienti con familiarità negativa per DOC: tale dato andrà naturalmente confermato su una casistica più numerosa, controllandone la specificità nei confronti di altri disturbi psichiatrici.

Un'ipotesi prematura, e forse azzardata, potrebbe però portare a supporre che esistano forme di DOC ad eziologia biologica (autoimmunitaria), di tipo sporadico e non familiare. Si segnala che questi primi casi sinora accertati sono anche pazienti affetti da DOC severo ed altamente resistente alle terapie farmacologiche antiossessive tradizionali.

BIBLIOGRAFIA

1. Adams P.L.: *Obsessive children*. Ed. Brunner/Mazel., New York, 1973.
2. Albert U., Picco C., Maina G., Bogetto F.: *Fenomenologia del paziente con disturbo ossessivo-compulsivo ad esordio precoce e ad esordio in età adulta*. Epidemiol. Psychiatr. Soc. 11, 116-126, 2002.
3. Albert U., Maina G., Forner F., Bogetto F.: *DSM-IV obsessive-compulsive disorder (OCD): prevalence in patients with anxiety disorders and in healthy comparison subjects*. Compr. Psychiatr. 45, 325-332, 2004.
4. Bellodi L., Sciuto G., Diaferia G., Ronchi P., Smeraldi E.: *Psychiatric disorders in the families of patients with obsessive-compulsive disorder*. Psychiatry Res. 42, 111-120, 1992.
5. Black J.L., Lamke G.T., Walikonis J.E.: *Serologic survey of adult patients with obsessive-compulsive disorder for neuron-specific and other autoantibodies*. Psychiatr. Res. 81, 371-380, 1998.
6. Bogetto F., Barzegà G., Bellino S., Maina G., Ravizza L.: *Obsessive-compulsive disorder and personality dimension: a study report*. Eur. J. Psychiatr. 11, 156-161, 1997.
7. Bogetto F., Maina G., Ferro G., Carbone M., Gandolfo S.: *Psychiatric comorbidity in patients with burning mouth syndrome*. Psychosom. Med. 60, 378-385, 1998.
8. Bogetto F., Venturello S., Albert U., Maina G., Ravizza L.: *Gender-related clinical differences in obsessive compulsive disorder*. Eur. J. Psychiatr. 14, 343-441, 1999.
9. Bogetto F., Albert U., Maina G.: *Sertraline treatment of obsessive-compulsive disorder: efficacy and tolerability of a rapid titration regimen*. Eur. Neuropsychopharmacol. 12, 181-186, 2002.
10. Chabane N., Delorme R., Millet B., Mouren M.C., Leboyer M., Pauls D.: *Early-onset obsessive-compulsive disorder: a subgroup with a specific clinical and familial pattern?* J. Child Psychol. Psychiatr. 46, 881-887, 2005.
11. Costello E.J., Angold A., Burns B.J., Stangl D.K., Tweed D.L., Erkanli A., Worthman C.M.: *The Great Smoky Mountains Study of Youth. Goals, design, method, and the prevalence of DSM-III-R disorders*. Arch. Gen. Psychiatr. 63, 1129-1136, 1996.
12. Dale R.C., Heyman I., Giovannoni G., Church A.W.: *Incidence of anti-brain antibodies in children with obsessive-compulsive disorder*. Br. J. Psychiatr. 187, 314-319, 2005.
13. Do Rosario-Campos M.C., Leckman J.F., Mercadante M.T., Shavitt R.G., Prado H.S., Sada P., Zamignani D., Miguel E.C.: *Adults with early-onset obsessive-compulsive disorder*. Am. J. Psychiatr. 158, 1899-1903, 2001.
14. Do Rosario-Campos M.C., Leckman J.F., Curi M., Quatrano S., Katsovitch L., Miguel E.C., Pauls D.L.: *A family study of early-onset obsessive-compulsive disorder*. Am. J. Med. Genet. Neuropsychiat. Genet. 136B: 92-97. 2005.
15. Fontenelle L.F., Mendlowicz M.V., Marques C., Versiani M.: *Early- and late-onset obsessive-compulsive disorder in adult patients: an exploratory clinical and therapeutic study*. J. Psychiatr. Res. 37: 127-133. 2003.
16. Geller D.A., Biederman J., Faraone S., Agranat A., Craddock K., Hagermoser L., Kim G., Frazier J., Coffey B.J.: *Developmental aspects of obsessive-compulsive disorder: findings in children, adolescents and adults*. J. Nerv. Ment. Dis. 189: 471-477. 2001.

17. Hanna G.L., Fischer D.J., Chadha K.R., Himle J.A., Van Etten M.: *Familial and sporadic subtypes of early-onset obsessive-compulsive disorder*. Biol. Psychiatr. 57, 895-900, 2005.
18. Hanna G.L., Himle J.A., Curtis G.C., Gillespie B.W.: *A family study of obsessive-compulsive disorder with pediatric probands*. Am. J. Med. Genet. Neuropsychiat. Genet. 134, 13-19, 2005.
19. Hemmings S.M., Kinnear C.J., Lochner C., Niehaus D.J., Knowles J.A., Moolman-Smook J.C., Corfield V.A., Stein D.J.: *Early- versus late-onset obsessive-compulsive disorder: investigating genetic and clinical correlates*. Psychiatr. Res. 128, 175-182, 2004.
20. Heyman I., Fombonne E., Simmons H., Ford T., Meltzer H., Goodman R.: *Prevalence of obsessive-compulsive disorder in the British nationwide survey of child mental health*. Br. J. Psychiatr. 179, 324-329, 2001.
21. Hollander E., Greenwald S., Neville D., Johnson J., Hornig C.D., Weissman M.M.: *Uncomplicated and comorbid obsessive-compulsive disorder in an epidemiologic sample*. Depress. Anx. 4, 111-119, 1996.
22. Jaysooria T.S., Janardhan Reddy Y.C., Srinath S.: *Is juvenile obsessive-compulsive disorder a developmental subtype of the disorder? Findings from an Indian study*. Eur. Chil. Adolesc. Psychiatr. 12, 290-297, 2003.
23. Kirvan C.A., Swedo S.E., Kurahara D., Cunningham M.W.: *Streptococcal mimicry and antibody-mediated cell signaling in the pathogenesis of Sydenham's chorea*. Autoimmun. 39, 21-29, 2006.
24. Kiessling L.S., Marcotte A.C., Culpepper L.: *Antineuronal antibodies: tics and obsessive-compulsive symptoms*. J. Dev. Behav. Pediatr. 15, 421-425, 1994.
25. Maina G., Albert U., Salvi V., Bogetto F.: *Weight gain during long-term treatment of obsessive-compulsive disorder: a prospective comparison of serotonin reuptake inhibitors*. J. Clin. Psychiatr. 65, 1365-1371, 2004.
26. Millet B., Kochman F., Gallarda T., Krebs M.O., Demonfaucon F., Barrot I., Bourdel M.C., Olié J.P., Loo H., Hantouche E.G.: *Phenomenological and comorbid features associated in obsessive-compulsive disorder: influence of age of onset*. J. Affect. Disord. 79, 241-246, 2004.
27. Morer A., Viñas O., Lázaro L., Calvo R., Andrés S., Bosch J., Gastó C., Massana J., Castro J.: *Subtyping obsessive-compulsive disorder: clinical and immunological findings in child and adult onset*. J. Psychiatr. Res. 40, 207-213, 2006.
28. Murphy T.K., Goodman W.K., Fudge M.W., Williams R.C Jr., Ayoub E.M., Dalal M., Lewis M.H., Zabriskie J.B.: *B lymphocyte antigen D8/17: a peripheral marker for childhood-onset obsessive-compulsive disorder and Tourette's syndrome?* Am. J. Psychiatr. 154, 402-407, 1997.
29. Murphy T.K., Goodman W.K., Ayoub E.M., Voeller K.K.: *On Defining Sydenham's Chorea: Where Do We Draw the Line?* Biol. Psychiatr. 47, 851-857, 2000.
30. Pauls D.L., Alsobrook J.P. 2nd., Goodman W., Rasmussen S., Leckman J.F.: *A family study of obsessive-compulsive disorder*. Am. J. Psychiatr. 152, 76-84, 1995.
31. Rettew D.C., Swedo S.E., Leonard H.L., Lenane M.C., Rapoport J.L.: *Obsessions and compulsions across time in 79 children and adolescents with obsessive-compulsive disorder*. J. Am. Acad. Chil. Adolesc. Psychiatr. 31, 1050-1056, 1992.

32. Shaffer D., Schonfeld I., O'Connor P.A., Stokman C., Trautman P., Shafer S., Ng S.: *Neurological soft signs: their relationship to psychiatric disorder and intelligence in childhood and adolescence*. Arch. Gen. Psychiatr. 42, 342-351, 1985.
33. Singer H.S., Loiselle C.R., Lee O., Minzer K., Swedo S., Grus F.H.: *Anti-basal ganglia antibodies in PANDAS*. Mov. Disord. 19, 406-415, 2004.
34. Singer H.S., Hong J.J., Yoon D.Y., Williams P.N.: *Serum autoantibodies do not differentiate PANDAS and Tourette syndrome from controls*. Neurol. 65, 1701-1707, 2005.
35. Sobin C., Blundell M.L., Karayiorgou M.: *Phenotypic differences in early- and late-onset obsessive-compulsive disorder*. Compr. Psychiatr. 41, 373-379, 2000.
36. Steinhausen H.C., Metzke C.W., Meier M., Kannenberg R.: *Prevalence of child and adolescent psychiatric disorders: the Zurich Epidemiological Study*. Acta. Psychiatr. Scand. 98, 262-271, 1998.
37. Swedo S.E., Pietrini P., Leonard H.L., Schapiro M.B., Rettew D.C., Goldberger E.L., Rapoport S.I., Rapoport J.L., Grady C.L.: *Cerebral glucose metabolism in childhood-onset obsessive-compulsive disorder*. Arch. Gen. Psychiatr. 46, 518-523, 1989.
38. Swedo S.E., Leonard H.L., Schapiro M.B., Casey B.J., Mannheim G.B., Lenane M.C., Rettew D.C.: *Sydenham's chorea: physical and psychological symptoms of St. Vitus dance*. Pediatr. 91, 706-713, 1993.
39. Swedo S.E.: *Sydenham's chorea. A model for childhood autoimmune neuropsychiatric disorders*. JAMA. 272, 1788-1791, 1994.
40. Swedo S.E., Leonard H.L., Mittleman B.B., Allen A.J., Rapoport J.L., Dow S.P., Kanter M.E., Chapman F., Zabriskie J.: *Identification of children with PANDAS by a marker associated with rheumatic fever*. Am. J. Psychiatr. 154, 110-112, 1997.
41. Swedo S.E., Leonard H.L., Garvey M., Mittleman B., Allen A.J., Perlmutter S., Lougee L., Dow S., Zamkoff J., Dubbert B.K.: *Pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections: clinical descriptions of the first 50 cases*. Am. J. Psychiatr. 155, 264-271, 1998.
42. Tükel R., Ertekin E., Batmaz S., Alyanak F., Sözen A., Aslantas B., Atli H., Ozyildirim I.: *Influence of age at onset on clinical features in obsessive-compulsive disorder*. Depress. Anxiet. 00, 1-6, 2005.

LA NEUROGENESI DOPO ISCHEMIA CEREBRALE: ASPETTI MORFOLOGICI E PROFILO TEMPORALE

Tesi di Laurea premiata dalla Fondazione Cavalieri Ottolenghi
in collaborazione con l'Accademia di Medicina di Torino

Simone Tomasi¹, Alessandro Ducati², Alessandro Vercelli¹

¹ Dipartimento di Anatomia, Farmacologia e Medicina Legale
Università degli Studi di Torino

² Dipartimento di Neuroscienze
Università degli Studi di Torino

Key words: *Cerebral ischemia / Ischemia cerebrale*
 Proliferation / Proliferazione
 Differentiation / Differenziamento
 Astrocytes / Astrociti
 Regeneration / Rigenerazione

Abstract:

Neurogenesis is a physiological event occurring during the whole lifetime; it gives origin to neural cells with the capability to integrate into existing neural networks. Several events, both physiological (i.e. age) or pathological (such as brain diseases), may trigger neurogenesis. Cerebral ischemia, Parkinson's disease or seizure may cause irreversible brain damage and severe cognitive impairment, due to neuronal cell loss. Mechanisms of brain recovery are yet poorly understood; many Authors, however, have recently focused their attention on neurogenesis, since newborn cells may help brain recovery and drive plastic responses within the affected brain. We compared morphological features and temporal profile of neurogenesis in basal conditions and after brain injury (ischemia or subarachnoid haemorrhage, SAH) in C57BL6J mice. Cerebral ischemia was induced through middle cerebral artery permanent occlusion; autologous blood was injected into cisterna magna to mimic SAH. Sham-operated mice (i.e. mice undergoing surgery without vessel occlusion nor blood injection) were used as controls. Following surgical procedures, mice were daily injected intraperitoneally with a proliferative marker (5'-bromo-2'-deoxy-uridine) to evaluate and compare neurogenesis under such different experimental conditions. Quantitative and morphological analysis (three dimensional reconstruction of the whole brain, region analysis and mapping and stereological counts) were then performed on collected brain slices, showing that, after cerebral ischemia, proliferative response

was much more intense than in control or SAH animals; neurogenesis was markedly triggered one week after cerebral ischemia along the affected areas, while 24 hours after ischemia only hippocampal regions showed proliferative activity. SAH did not trigger neurogenesis; based on immunohistochemical analysis, proliferating cells were found to have a predominant glial phenotype.

Riassunto:

La neurogenesi è un processo fisiologico che consiste nella produzione di nuove cellule nervose in grado di integrarsi nei circuiti nervosi esistenti. Tale evento si realizza in misura differente in risposta a stimoli fisiologici (età) o patologici (vari tipi di *noxae*). La perdita di popolazioni neuronali, quale si verifica in numerose condizioni cliniche, come l'ischemia cerebrale, la malattia di Parkinson o l'epilessia, esita nella comparsa di deficit neurologici per lo più irreversibili, stante la scarsa capacità del sistema nervoso centrale di operare processi di riparazione al danno. Vivo interesse è cresciuto negli ultimi anni attorno allo studio dei meccanismi alla base della neurogenesi, per verificare la possibilità che le cellule neogenerate possano sostituire i neuroni danneggiati e ripristinare la funzionalità dei relativi circuiti nervosi. In questo lavoro è stata studiata l'entità ed il profilo temporale della risposta neurogenetica nel topo in risposta a eventi lesivi distinti (l'ictus e l'emorragia subaracnoidea, ESA) o in condizioni standard. L'ischemia cerebrale e l'emorragia subaracnoidea sono state indotte sperimentalmente come descritto in letteratura. A ciascun animale è stato poi somministrato, per i 7 giorni successivi, un marker proliferativo (5'-bromo-2'-desossi-uridina), al fine di confrontare l'entità della neurogenesi nelle varie condizioni sperimentali. Sono state successivamente eseguite analisi quantitative (mappe tridimensionali e conte stereologiche) sulle sezioni di tessuto cerebrale ottenute dopo sacrificio degli animali, che hanno confermato alcuni dati presenti in letteratura: intensa risposta proliferativa a 7 giorni da ischemia, ma risposta lieve a 24 ore e per lo più a livello ippocampale; minor risposta proliferativa in seguito ad emorragia; predominante fenotipo gliale nelle cellule proliferanti.

Introduzione

La neurogenesi è un processo fisiologico, che inizia nell'embrione e dura tutta la vita, attenuandosi nell'età avanzata, caratterizzato dalla produzione di cellule nervose funzionali^(12,26). La scarsa capacità da parte del Sistema Nervoso Centrale di riparare il danno condiziona l'esito clinico di numerose affezioni neurologiche degenerative, traumatiche o vascolari. La neurogenesi costituisce un nuovo orizzonte terapeutico per ripristinare la rete neuronale compromessa, consentendo un recupero neurologico. La divisione cellulare dei precursori può originare due cellule figlie che rimangono entrambe nel compartimento staminale (divisione simmetrica) oppure una cellula che si differenzia e un'altra staminale (divisione asimmetrica)⁽⁵⁾. In condizioni fisiologiche la neurogenesi si verifica nella zona sottoventricolare dei ventricoli laterali (SVZ) e nella

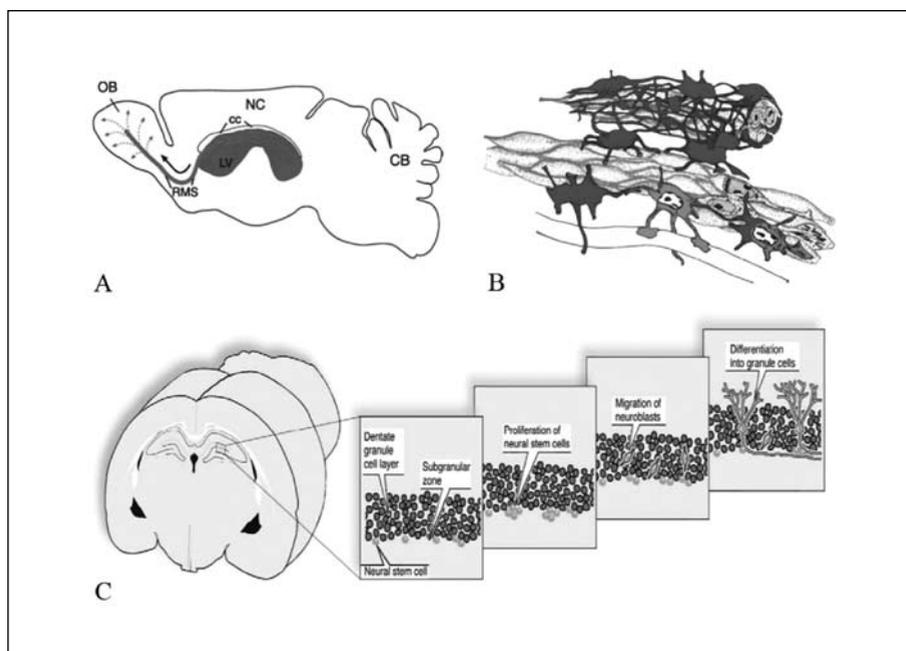


Figura 1.

A: rappresentazione schematica della migrazione cellulare dal ventricolo laterale (LV) al bulbo olfattivo (OB) attraverso RMS (modificato da Altman et al. 1969)⁽¹⁾.

B: migrazione a catena con formazione di manicotto gliale (modificato da Wichterle et al. 1997)^(3,4).

C: rigenerazione e sostituzione delle cellule dello strato granulare del DG (modificato da Kokaia and Lindvall, 2003)⁽¹⁷⁾.

zona sottogranulare del giro dentato dell'ippocampo (DG)^(17,19). I neuroni originati nella SVZ realizzano una migrazione a catena per raggiungere, attraverso la via migratoria rostrale (*rostral migratory stream*, RMS), il bulbo olfattivo, dove maturano in interneuroni (Figure 1A-1B)^(1,16). Quelli generati a livello del DG, al contrario, si integrano a livello locale, a livello dello strato granulare (Figura 1C)⁽²⁾. La neurogenesi sembra stimolata in risposta ad insulto ischemico, sia in modelli di ischemia globale⁽¹⁵⁾ che focale^(13,30). 7-11 giorni dopo ischemia la proliferazione (misurata attraverso il marker 5'-bromo-2'-desossi-uridina, BrdU) aumenta a livello di SVZ omolateralmente alla lesione, e si mantiene per due settimane per poi decrescere linearmente nel tempo⁽²⁹⁾. Le cellule proliferanti mostrano inizialmente fenotipo gliale. 30 giorni dopo insulto ischemico compare anche una sottopopolazione di cellule con fenotipo neuronale, positive al marker neuronale NeuN; la contemporanea espressione di doublecortina (DCX), nestina e molecole di adesione suggerisce l'acquisizione di un fenotipo migratorio; tale migrazione avviene, in direzione delle regioni ischemiche, corticali e striatali, come osservato nei roditori, ma non nei primati^(15,27), nei quali buona parte delle cellule proliferanti muore.

MATERIALI E METODI

Procedure chirurgiche

Lo studio è stato su condotto su topi maschi adulti della linea C57BL6J di peso compreso tra 22 e 30 grammi. Gli animali sono stati randomicamente assegnati ad uno dei gruppi seguenti:

- a) animali con ischemia ($n = 7$), di cui tre sacrificati a 24 ore e quattro ad una settimana;
- b) animali con emorragia subaracnoidea (ESA) ($n = 4$);
- c) controlli ($n = 4$).

Gli animali sono stati anestetizzati con isoflurano (al 3% per l'induzione e all'1,75% per il mantenimento) in una miscela di O₂ e N₂O al 50% (Harvard Apparatus).

L'ischemia è stata indotta secondo Renolleau⁽²¹⁾, con alcune modifiche. In breve, dopo incisione mediana della cute del cranio, è sezionato il muscolo temporale di sinistra a livello del suo capo d'inserzione superiore, esponendo la squama dell'osso temporale. A questo livello si riconosce in trasparenza l'arteria cerebrale media. Si esegue una craniotomia tra cavità orbitaria e meato acustico; l'arteria viene isolata e coagulata tramite cauterizzatore monopolare.

Successivamente, dopo incisione mediana a livello della trachea, viene esposta l'arteria carotide comune di sinistra e viene posizionato un clamp microvascolare per ostruire il vaso; l'occlusione è mantenuta per 90 minuti, al termine dei quali il clamp viene rimosso, la ferita suturata e l'animale viene riportato in gabbia. L'ESA è stata indotta secondo Solomon⁽²⁵⁾. 50-100 µl di sangue prelevati dalla vena femorale e successivamente diluiti con un uguale volume di soluzione fisiologica vengono iniettati nella cisterna magna, attraverso la membrana atloccipitale. Il gruppo di controllo è stato sottoposto alla medesima procedura chirurgica descritta per l'induzione dell'ischemia (ivi compresa craniotomia), ma senza occlusione delle arterie (*sham operated*).

Protocollo di somministrazione di BrdU

Al termine delle procedure chirurgiche, e per i 7 giorni successivi, ciascun animale ha ricevuto un'iniezione intraperitoneale quotidiana di BrdU ad un dosaggio di 100 mg/kg.

Allestimento delle sezioni e colorazione

Una settimana dopo l'intervento, gli animali sono stati sacrificati e perfusi per via cardiaca con tampone di perfusione (tampone fosfato 0,1 M pH 7,4) e fissati con soluzione di Carnoy. I cervelli prelevati sono stati poi inclusi in paraffina, tagliati al microtomo in sezioni di 10 µm di spessore ed infine colorati con cresil violetto (tecnica di Nissl) per la valutazione istologica dei tessuti e dei segni di sofferenza cellulare (picnosi, corpi apoptotici, edema). L'analisi immunohistochimica con anticorpo anti-BrdU (1:100, DAKO A/S, Denmark) mette in evidenza le cellule che avevano incorporato il marcatore nella fase S del ciclo cellulare. L'anticorpo anti-GFAP è stato utilizzato per la marcatura della popolazione gliale (1:50, DAKO A/S).

Analisi quantitativa

Lo studio quantitativo della distribuzione delle cellule BrdU-positivo sulle sezioni è stato condotto con un microscopio Nikon Eclipse E600 dotato di un tavolino traslatore motorizzato interfacciato ad un computer; sono stati usati diversi software per la creazione di mappe bi- e tridimensionali e per l'indagine stereologica (NeuroLucida, Neuroexplorer, StereoInvestigator, Microbrightfield Inc., VT). Dopo aver visualizzato le sezioni sullo schermo, se ne tracciano i contorni e si delimitano le zone di interesse a basso ingrandimento (10x); vengono

identificate l'area di lesione (distinguendo tra core e penombra ischemica), l'ippocampo omo- e controlaterale. All'interno di ciascun campo si procede quindi alla conta delle cellule positive a un ingrandimento progressivamente maggiore (40x, 60x, 100x). Si ottengono così mappe bi-tridimensionali della distribuzione della marcatura lungo l'asse antero-posteriore dell'encefalo. La conta stereologica consente una quantificazione più precisa del numero delle cellule positive utilizzando la tecnica del frazionatore ottico, che utilizza una sonda tridimensionale per il conteggio dei nuclei (dissettore ottico) applicata ad uno schema di campionamento sistematico (frazionatore).

RISULTATI

Valutazione istopatologica

Negli animali ischemici, a 24 ore da lesione ($n = 3$), si rileva un'importante componente edematosa, il tessuto appare rigonfio e la cellularità diminuita, soprattutto negli strati più superficiali della corteccia (Figura 2B). Si distinguono, nel contesto delle aree infartuali, due regioni: il *core ischemico*, sottoposto ad un grado di ipossia molto severa, in cui si verifica necrosi precoce e diffusa, e la *penombra*, che circonda a bulbo di cipolla il core, dove il quadro di ipossia risulta almeno inizialmente meno severo e le cellule non muoiono subito ma vanno incontro ad una progressiva sofferenza eccitotossica fino all'induzione dell'apoptosi. Il *core ischemico* mostra un gran numero di neuroni sofferenti, di dimensioni irregolari e con evidente nucleo picnotico. Sono presenti lacune tissutali in conseguenza di importanti fenomeni di necrosi. A livello dell'ippocampo, omolateralmente alla lesione, è presente un quadro meno severo, i fenomeni necrotici sono ridotti, ma si osservano numerose cellule con nuclei picnotici intercalate tra i vari strati (Figura 2A). Una settimana dopo la lesione ($n = 4$) l'architettura tissutale è largamente sovvertita, sono evidenti diffusi fenomeni di necrosi che conferiscono al tessuto un aspetto irregolare e lacunoso; la componente edematosa è minore che a 24 ore e limitata alle porzioni più centrali del core necrotico; le cellule appaiono coartate e con un nucleo piccolo ed intensamente colorato (Figura 2D). Nell'ippocampo omolaterale la necrosi è limitata; a livello del DG è apprezzabile un marcato depauperamento cellulare (Figura 2C). Gli animali con ESA mostrano tipicamente la presenza di ematomi adesi alla superficie corticale; la colorazione di Nissl evidenzia infiltrati emorragici nelle regioni posteriori dell'encefalo, a livello del cervelletto. Non si osservano segni di sofferenza cellulare a livello corticale o ippocampale.

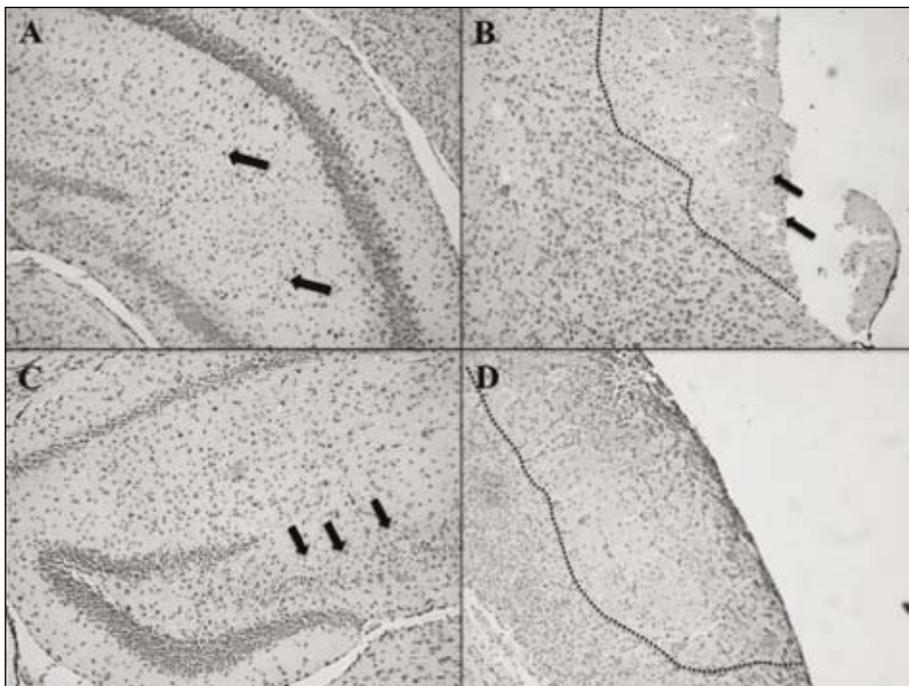


Figura 2.

- A: ippocampo omolaterale a 24 ore da ischemia. Si apprezzano pochi fenomeni necrotici, ma numerose cellule picnotiche intercalate nei vari strati (freccie nere).*
- B: corteccia ischemica a 24 ore da lesione. Nell'area ischemica (tratteggiata) predomina la necrosi ed il tessuto appare rigonfio come conseguenza dell'edema. Nel core ischemico sono presenti piccole cellule picnotiche (freccie nere) intensamente marcate.*
- C: ippocampo ipsilaterale una settimana dopo ischemia. La necrosi interessa il DG, ove la cellularità risulta fortemente diminuita (freccie nere).*
- D: corteccia ischemica ad una settimana da lesione. La componente edematosa è meno evidente; il core della lesione (area tratteggiata) è visibilmente meno marcato a causa della diffusa necrosi.*

Immunoistochimica

I topi con lesione ischemica mostrano diffusa positività all'anticorpo anti-BrdU, soprattutto ad una settimana da lesione. Le cellule BrdU-positive sono prevalentemente localizzate a livello delle regioni ischemiche (Figura 3A), hanno forma grossolanamente rotonda o irregolarmente allungata ed esibiscono la marcatura a livello nucleare, mentre il citoplasma è tipicamente poco marcato; altre cellule mostrano una marcatura nucleare di aspetto granulare. A livello corticale la positività a BrdU si distribuisce sia a livello temporo-parietale

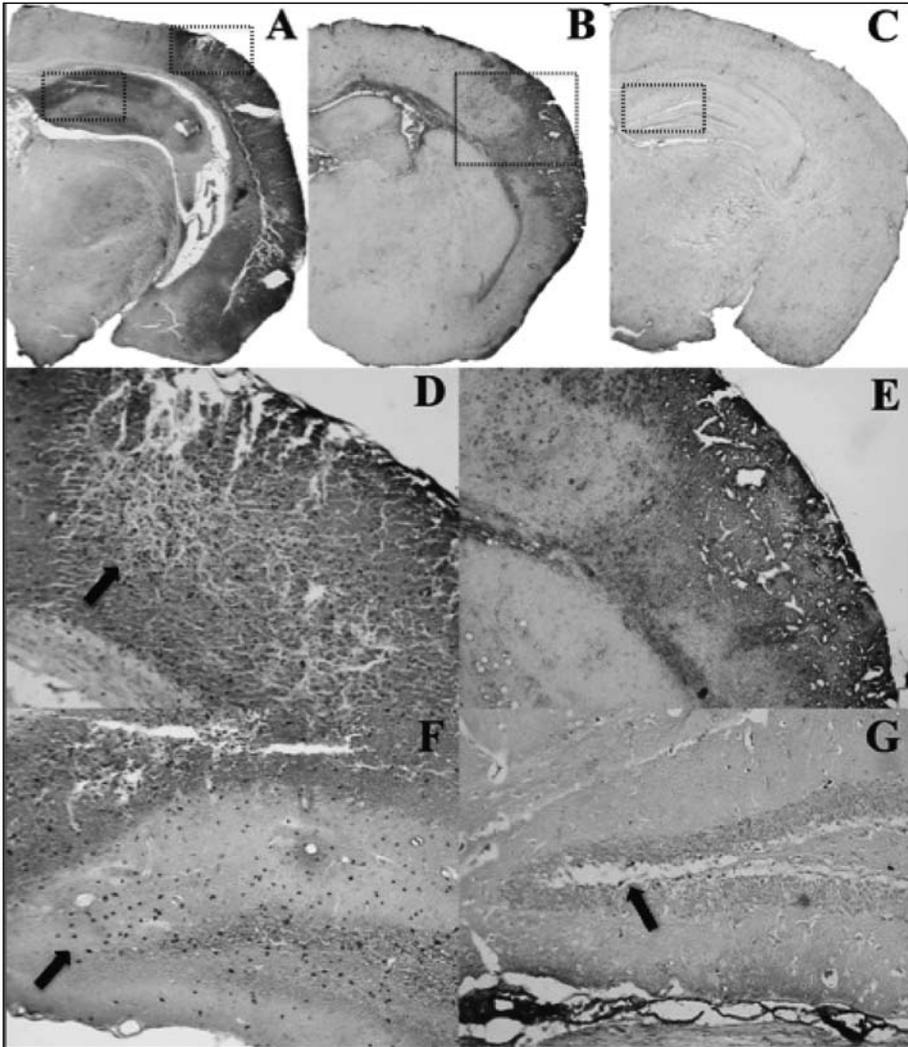


Figura 3. Immunoistochimica anti-BrdU. In A, B e C viene mostrata la marcatura anticorpale (1x) rispettivamente nell'encefalo ad una settimana da ischemia, a 24 ore da ischemia e a 24 ore da ESA. D-F: particolari (4x) dell'encefalo ad una settimana da ischemia (aree tratteggiate in A): nella corteccia (D) e nell'ippocampo ipsilaterale (F) si trovano numerose cellule marcate (freccie nere). Nella corteccia a 24 ore da lesione la densità delle cellule BrdU-positive è nettamente minore (area tratteggiata in B, 2x). G: rare cellule marcate (freccia nera) si ritrovano a 24 ore da ESA a livello ippocampale (area tratteggiata in C, 4x).

sia più caudalmente in corrispondenza della corteccia piriforme ed entorinale laterale, con predilezione per le aree di corteccia necrotica. Le cellule marcate

si distribuiscono uniformemente nei vari strati corticali, con maggior densità nelle aree del core necrotico, più blanda a livello delle regioni peri-infartuali (Figura 3D). Anche nell'ippocampo si rivela una netta positività, specialmente in CA2 e CA3 e nel DG, ove si reperiscono numerose cellule marcate nello strato granulare (Figura 3F). A 24 ore da ischemia, invece, la positività a BrdU è meno marcata; predomina a livello corticale, anche se la densità delle cellule positive è nettamente inferiore rispetto a quanto visto a una settimana (Figura 3B). Il gruppo di animali con ESA non mostra positività specifica; si rilevano rare cellule disperse a livello ippocampale (Figura 3C e 3G). La positività per GFAP è stata riscontrata negli animali ischemici sia a 24 ore sia ad una settimana. Le cellule marcate sono concentrate prevalentemente nelle regioni peri-infartuali, demarcando in modo netto l'area di ischemia e costituendo attorno ad essa un vallo di cellule con significato reattivo (astrocitosi). Tale reperto risulta più evidente ad una settimana che a 24 ore (Figura 4).

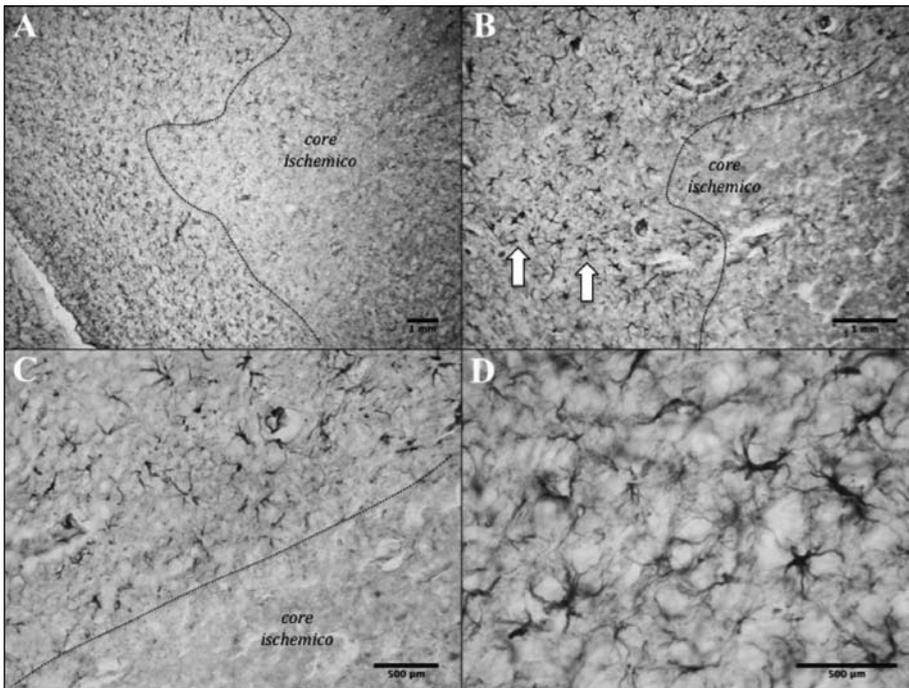


Figura 4. Immunistochemica anti-GFAP. In A (10x), B (20x) e C (40x) si apprezza la distribuzione peri-infartuale degli astrociti marcati, con tipico aspetto stellato (D, 60x), che si dispongono a palizzata circondando il core necrotico (freccie bianche in B).

Analisi quantitative

Nel confronto tra gli animali ischemici a una settimana e quelli a 24 ore emergono alcune differenze quantitative (Figura 5): nel gruppo ad una settimana la densità di cellule nel core ischemico è stata di circa $2466 \pm 123,3$ cell/mm³ contro $941 \pm 47,05$ cell/mm³; nella penombra ischemica è stato stimato un numero di $1789 \pm 89,45$ cell/mm³ contro 400 ± 80 cell/mm³; nell'ippocampo omolaterale alla lesione si sono stimate $2222 \pm 111,1$ cell/mm³ a una settimana e $1166 \pm 58,3$ a 24 ore. Ad una settimana dunque la maggior parte delle cellule proliferanti si concentra nel core ischemico e nell'ippocampo ipsilaterale; nelle sezioni a 24 ore invece la maggior parte delle cellule proliferanti è a livello ippocampale. Nelle sezioni di ESA e di controllo non si osservano differenze di rilievo nella densità delle cellule BrdU-positive, né nel confronto tra un ippocampo e l'altro all'interno della stessa sezione né nel confronto tra animali di controllo e con ESA. In questi ultimi si sono contate 166 cell/mm³ nell'ippocampo di sinistra e $249 \pm 12,45$ cell/mm³ nell'ippocampo di destra. Nel gruppo di controllo sono state contate $307 \pm 15,35$ cell/mm³ nell'ippocampo di sinistra e $230 \pm 11,5$ cell/mm³ nell'ippocampo di destra (Figura 6, Tabella I).

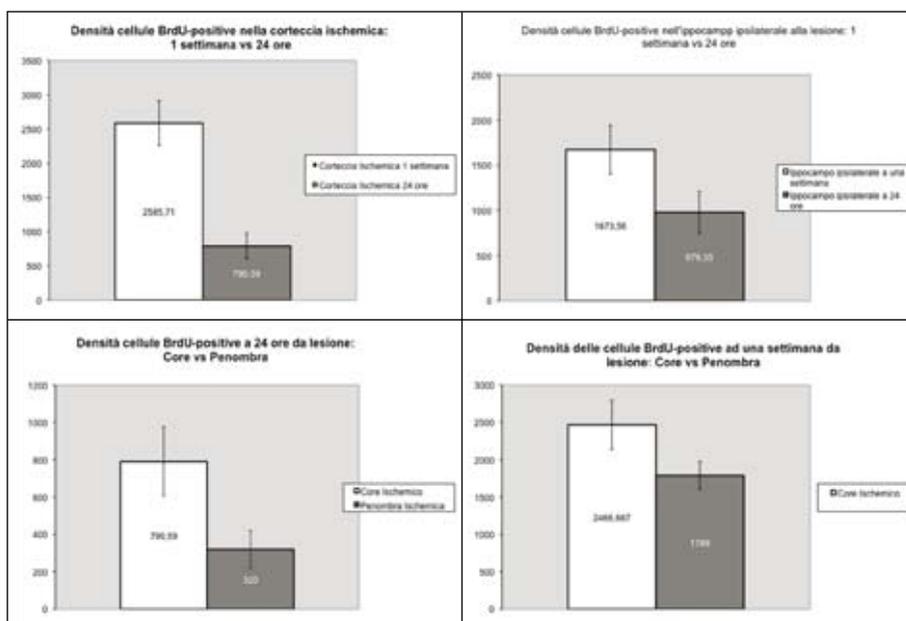


Figura 5. Risultati delle conte stereologiche

GRUPPO	area di interesse	n° siti di campionamento	n° totale	area (mm²)	volume (mm³)	densità superficiale (cell/mm²)	densità volumetrica (cell/mm³)
ischemia 1 settimana	core ischemico	54	74	3,010	0,030	24,585	2466,667
	penombra	38	34	1,900	0,019	17,895	1789,474
	ippocampo ipsi	18	20	0,993	0,009	20,141	2222,222
	ippocampo contro	20	8	1,194	0,011	6,700	727,273
	core ischemico	32	16	1,705	0,017	9,384	941,176
	penombra	28	6	1,587	0,015	3,781	400,000
ischemia 24 ore	ippocampo ipsi	13	7	0,635	0,006	11,024	1166,667
	ippocampo contro	15	3	0,700	0,007	4,286	428,571
	ippocampo sx	33	3	1,840	0,018	1,630	166,667
ESA	ippocampo dx	39	5	2,082	0,020	2,402	250,000
	ippocampo sx	24	4	1,328	0,013	3,012	307,692
controlli	ippocampo dx	25	3	1,398	0,013	2,146	230,769

Tabella 1. Risultati delle conte cellulari con analisi stereologica.

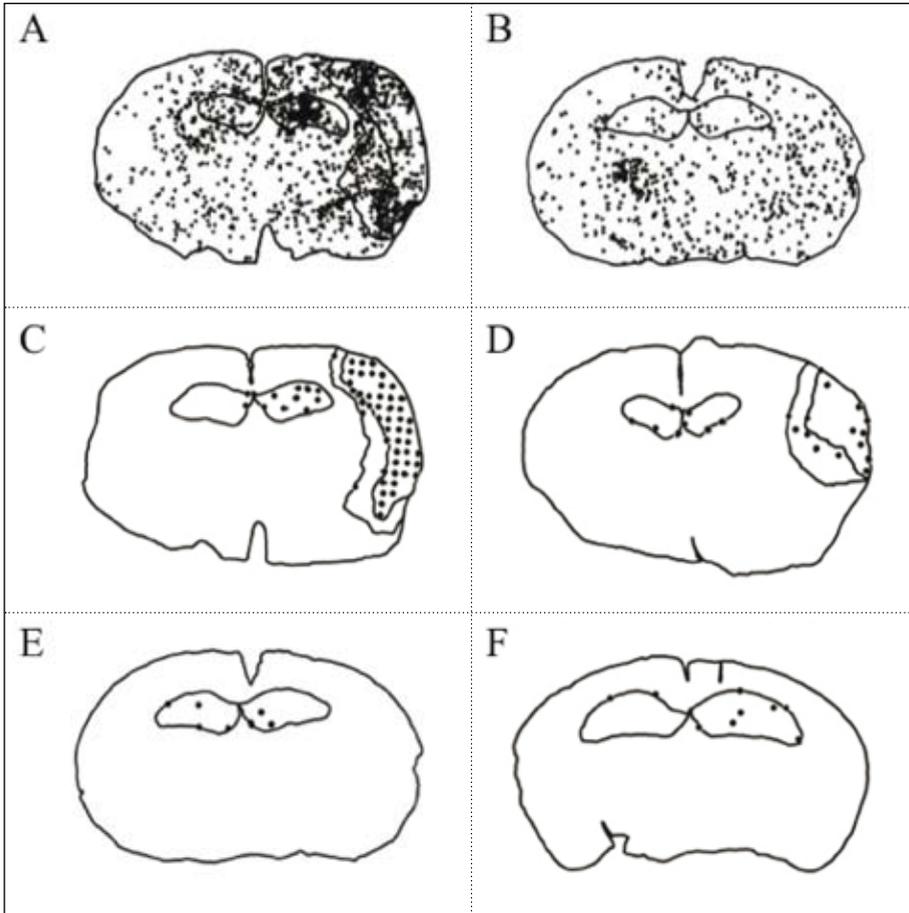


Figura 6.

A-B: mappa di distribuzione della positività a BrdU su encefalo ischemico a una settimana (A) o su encefalo di controllo (B). Sono tracciati i profili ippocampali e la regione ischemica (core-penombra).

C-F: conte stereologiche su tessuto ischemico a una settimana (C) o a 24 ore da ischemia (D), dopo ESA (E) o nel controllo (F). Ciascun punto rappresenta un'area di campionamento a livello della quale sono state contate una o più cellule.

DISCUSSIONE

L'obiettivo del presente lavoro è l'analisi della neurogenesi in condizioni patologiche. Numerose osservazioni riferiscono, al riguardo, un'attivazione del processo a fronte di stimoli lesivi di varia natura^(13,15). In particolare sono state

considerate tre condizioni: l'ischemia cerebrale, l'emorragia subaracnoidea e le condizioni normali di controllo. La possibilità che l'aumentata produzione di precursori neurali possa contribuire al recupero funzionale è, però, al momento stata dimostrata solo in modelli murini e non nei primati^(14,27). In corso di ipossia acuta si verifica un'improvvisa compromissione dell'equilibrio energetico con perdita del potenziale di membrana e rilascio di neurotrasmettitori eccitatori nello spazio sinaptico (*eccitotossicità*)⁽¹⁸⁾. Altri fenomeni che si verificano a livello nucleare, citoplasmatico (attivazione di enzimi proteolitici, produzione di radicali liberi, perossidazione lipidica delle membrane) e mitocondriale⁽⁶⁾, le depolarizzazioni peri-infartuali, l'infiammazione e l'apoptosi causano ulteriore estensione del danno^(9,10,22). Anche in corso di ESA il meccanismo del danno è legato ad una riduzione del flusso ematico, in presenza di vasospasmo⁽⁴⁾. Nel presente lavoro non sono state osservate aree di sofferenza ischemica nei topi sottoposti ad ESA, il che suggerisce che non vi siano stati episodi di vasospasmo nelle 24 ore successive ad emorragia.

La neurogenesisi si articola in tre fasi: proliferazione, migrazione e differenziazione. La fase proliferativa può essere valutata attraverso la marcatura delle cellule con BrdU; tale marker viene incorporato dalle cellule in fase S⁽²⁾, ma anche, seppure in misura inferiore, dalle cellule che stanno operando meccanismi di riparazione del danno⁽⁷⁾ o sintesi di DNA mitocondriale⁽²⁰⁾. Fenomeni migratori delle cellule proliferanti sono stati descritti 24-72 ore dall'ischemia, al termine delle quali cellule BrdU- e GFAP-positive sono state rilevate nella penombra ischemica, suggerendo una contemporanea differenziazione in senso gliale⁽¹¹⁾. Sebbene in questo lavoro non sia stato studiato il profilo migratorio delle cellule marcate attraverso analisi cronologicamente seriate della reattività ai diversi anticorpi, si può comunque ipotizzare che fenomeni migratori di questo tipo si siano almeno in parte realizzati. La reattività a BrdU sia nell'ippocampo sia nella corteccia è maggiore a una settimana che a 24 ore da lesione, dato questo in sintonia con altre osservazioni che descrivono nell'ippocampo un picco di proliferazione cellulare a 8-10 giorni dalla lesione, con cellule di dimensioni inferiori rispetto ai neuroni maturi, organizzate in gruppi, prevalentemente a livello nella zona sottogranulare⁽³⁾. La contemporanea espressione di altri marker (DCX, CNPasi, NeuN, nestina) è stata descritta a partire da due settimane dopo la lesione, suggerendo che prima di questo termine il processo differenziativo non abbia inizio; in questo lavoro, pertanto, si sono potute studiare nel dettaglio le caratteristiche della sola fase proliferativa. In risposta a vari tipi di *noxae*, diversi tipi cellulari divengono proliferanti: astrociti, microglia, precursori oligodendrocitari, cellule endoteliali. Circa l'80% delle

cellule proliferanti esprime solo BrdU nella prima settimana, suggerendo come tali cellule siano ancora immature e non in grado di esprimere marker differenziativi⁽³⁾. A livello corticale ed ippocampale la presenza di cellule proliferanti è per lo più indicativa di attivazione microgliale ed astrocitaria⁽¹⁵⁾; la diffusa positività a GFAP osservata ad una settimana da ischemia conferma questa ipotesi. Nell'ippocampo, ove è minore la componente necrotica e meno intensa la marcatura di GFAP, si può immaginare una più lieve reazione gliale; le cellule BrdU-positive a questo livello potrebbero derivare, almeno in parte, dal compartimento staminale sottogranulare.

Negli animali con ESA non si sono osservate a 24 ore variazioni di rilievo nel numero e nella localizzazione delle cellule positive: la necrosi e i meccanismi di fagocitosi potrebbero essere meno spiccati, e questo renderebbe più debole il reclutamento di cellule reattive.

A 24 ore dalla lesione si osservano cellule BrdU-positive nel *core* necrotico, in maggior parte GFAP-negative: la proliferazione nel core potrebbe essere ascrivita ad attivazione di cellule microgliali, che operano processi di fagocitosi dei detriti cellulari presenti nel core. Ad una settimana da lesione si può invece individuare una localizzazione simile della positività a BrdU e GFAP, soprattutto a livello della *penombra*, che indicherebbe proliferazione astrocitaria reattiva che circonda e limita l'area lesionale (cicatrice gliale).

I due elementi che più sembrano condizionare la rigenerazione cellulare sono la presenza di un microambiente sfavorevole in seguito a lesione (variazione di pH, ossidazione, infiammazione) e la presenza di tessuto reattivo. Il microambiente ostile peraltro indurrebbe negli astrociti la riespressione di proteine embrionarie, in grado di favorire la sopravvivenza in tali condizioni. Esiste la possibilità che la riespressione di un marker embrionario indichi una fase di sdifferenziamento verso un tipo cellulare pluripotente, da cui possano derivare nuovi precursori neurali, in grado di re-integrarsi nei circuiti nervosi⁽⁸⁾. D'altro canto è stato dimostrato come astrociti reattivi immaturi possano guidare la rigenerazione⁽²⁴⁾. Recentemente è stato proposto che cellule staminali ematopoietiche siano in grado di ridurre i processi degenerativi anche a distanza, quando cioè si localizzano, come riportato, nella milza, attraverso la modulazione delle risposte immunologiche (rilascio di citochine, attivazione macrofagica e linfocitaria)⁽²³⁾.

In conclusione, lo studio della neurogenesi in condizioni patologiche permette di ipotizzare meccanismi differenti di riparazione del danno (integrazione locale di elementi immaturi, azione immunomodulatoria) da parte di cellule neoformate. In questa prospettiva risulta di grande interesse la comprensione dei meccanismi molecolari alla base, per pianificare delle strategie terapeutiche efficaci.

BIBLIOGRAFIA

1. Altman J.: *Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb.* J. Comp. Neurol. 137, 433-457, 1969.
2. Altman J., Das G.D.: *Postnatal neurogenesis in the guinea-pig.* Nature 214, 1098-1101, 1967.
3. Bartley J., Soltan T., Wimborne H., Kim S., Martin-Studdard A., Hess D., Hill W., Waller J., Carroll J.: *BrdU-positive cells in the neonatal mouse hippocampus following hypoxic-ischemic brain injury.* BMC Neurosci. 6, 15, 2005.
4. Bederson J.B., Germano I.M., Guarino L.: *Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat.* Stroke 26, 1086-1091, discussion 1091-1082, 1995.
5. Chenn A., McConnell S.K.: *Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis.* Cell 82, 631-641, 1995.
6. Dirnagl U., Iadecola C., Moskowitz M.A.: *Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view.* Trends in Neurosciences 22, 391-397, 1999.
7. Dolbeare F.: *Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part III. Proliferation in normal, injured and diseased tissue, growth factors, differentiation, DNA replication sites and in situ hybridization.* Histochem. J. 28, 531-575, 1996.
8. Duggal N., Schmidt-Kastner R., Hakim A.M.: *Nestin expression in reactive astrocytes following focal cerebral ischemia in rats.* Brain Res. 768, 1-9, 1997.
9. Green D.R., Reed J.C.: *Mitochondria and apoptosis.* Science 281, 1309-1312, 1998.
10. Hossmann K.A.: *Periinfarct depolarizations.* Cerebrovasc Brain Metab Rev 8, 195-208, 1996.
11. Jin K., Sun Y., Xie L., Peel A., Mao X.O., Bateur S., Greenberg D.A.: *Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum.* Mol. Cell Neurosci. 24, 171-189, 2003.
12. Johansson C.B., Momma S., Clarke D.L., Risling M., Lendahl U., Frisen J.: *Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system.* Cell 96, 25-34, 1999.
13. Kee N.J., Preston E., Wojtowicz J.M.: *Enhanced neurogenesis after transient global ischemia in the dentate gyrus of the rat.* Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung Expérimentation cérébrale 136, 313-320, 2001.
14. Kokaia Z., Lindvall O.: *Neurogenesis after ischaemic brain insults.* Current Opinion in Neurobiology 13, 127-132, 2003.
15. Liu J., Solway K., Messing R.O., Sharp F.R.: *Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils.* J Neurosci 18, 7768-7778, 1998.
16. Lois C., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A.: *Chain migration of neuronal precursors.* Science 271, 978-981, 1996.
17. Luskin M.B.: *Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone.* Neuron 11, 173-189, 1993.
18. Martin R.L., Lloyd H.G., Cowan A.I.: *The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death?* Trends Neurosci. 17, 251-257, 1994.

19. Morshead C.M., Reynolds B.A., Craig C.G., McBurney M.W., Staines W.A., Morassutti D., Weiss S., van der Kooy D.: *Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells*. Neuron. 13, 1071-1082,1994.
20. Pforte C., Henrich-Noack P., Baldauf K., Reymann K.G.: *Increase in proliferation and gliogenesis but decrease of early neurogenesis in the rat forebrain shortly after transient global ischemia*. Neuroscience 136, 1133-1146, 2005.
21. Renolleau S., Aggoun-Zouaoui D., Ben-Ari Y., Charriaut-Marlangue C.: *A model of transient unilateral focal ischemia with reperfusion in the P7 neonatal rat: morphological changes indicative of apoptosis*. Stroke 29, 1454-1460, discussion 1461, 1998.
22. Rothwell N.J., Hopkins S.J.: *Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action*. Trends Neurosci 18, 130-136, 1995.
23. Schwarting S., Litwak S., Hao W., Bahr M., Weise J., Neumann H.: *Hematopoietic stem cells reduce postischemic inflammation and ameliorate ischemic brain injury*. Stroke 39, 2867-2875, 2008.
24. Silver J., Miller J.: *Regeneration beyond the glial scar*. Nat. Rev. Neurosci. 5, 146-156, 2004.
25. Solomon R.A., Antunes J.L., Chen R.Y., Bland L., Chien S.: *Decrease in cerebral blood flow in rats after experimental subarachnoid hemorrhage: a new animal model*. Stroke 16, 58-64, 1985.
26. Song H.J., Stevens C.F., Gage F.H.: *Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons*. Nat. Neurosci. 5, 438-445, 2002.
27. Tonchev A.B., Yamashima T., Sawamoto K., Okano H.: *Enhanced proliferation of progenitor cells in the subventricular zone and limited neuronal production in the striatum and neocortex of adult macaque monkeys after global cerebral ischemia*. J. Neurosci. Res. 81, 776-788, 2005.
28. Wichterle H., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A.: *Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration*. Neuron 18, 779-791, 1997.
29. Zhang R.L., Zhang Z.G., Chopp M.: *Neurogenesis in the adult ischemic brain: generation, migration, survival, and restorative therapy*. Neuroscientist 11, 408-416, 2005.
30. Zhang R.L., Zhang Z.G., Zhang L., Chopp M.: *Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia*. Neuroscience 105, 33-41, 2001.

BASI CELLULARI DEL MECCANISMO D'AZIONE DEL RISEDRONATO

Tesi di Laurea premiata dalla Fondazione per l'Osteoporosi Piemonte
in collaborazione con l'Accademia di Medicina di Torino

Stefania Di Bella, Giovanni Carlo Isaia

Dipartimento Discipline Medico-Chirurgiche - Sezione Geriatria
AOU San Giovanni Battista - Torino

Key words: *Precursori osteoclasti*
Osteoclastogenesi
Risedronato
Citochine
Pro osteoclastogeniche

Abstract:

This work studies the effect of oral risedronate on osteoclast precursors, osteoclast formation, and cytokine production in 25 osteoporotic women. Risedronate is effective in reducing the number of osteoclast precursors, their formation, vitality, and activity and the level of RANKL and TNF-alpha in cultures.

Introduction: Bisphosphonates inhibit bone resorption by acting against osteoclasts. Some in vitro studies suggest that they induce osteoclast apoptosis; others suggest that they exert an effect on the production of pro-osteoclastogenic cytokines. The effect of risedronate on osteoclastogenesis by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in postmenopausal osteoporosis has not been previously studied. This paper examined the influence of risedronate on the formation of osteoclast precursors and cytokine production within the compass of osteoclastogenesis in osteoporosis.

Materials and Methods: This study was conducted on 25 patients treated with risedronate 5 mg/d. The following parameters were assessed: changes in bone turnover, circulating osteoclast precursors, formation of osteoclasts in PBMC cultures, their activity and vitality, and variations in the production of pro-osteoclastogenic cytokines before and after therapy.

Results: After 3 months of risedronate, there was a significant reduction in the number and degree of differentiation of osteoclast precursors, osteoclast formation, vitality and activity, and in the level of RANKL and TNF in cultures.

Conclusion: Our data show that risedronate is effective in lowering the number of circulating osteoclast precursors, their formation, vitality, and activity in cultures,

and in reducing the level of pro-osteoclastogenic cytokines in culture supernatants and in serum.

Riassunto:

Questo lavoro studia l'effetto del risedronato somministrato per os sui precursori degli osteoclasti, sull'osteoclastogenesi e sulla produzione di citochine in 25 donne osteoporotiche. Il risedronato è in grado di ridurre il numero dei precursori degli osteoclasti, la loro formazione, vitalità e attività e i livelli di RANKL e TNF α in vitro.

Introduzione: I bisfosfonati inibiscono il riassorbimento osseo inibendo gli osteoclasti. Alcuni studi in vitro dimostrano la loro capacità di indurre apoptosi degli osteoclasti, altri ipotizzano il loro effetto sulla produzione delle citochine pro osteoclastogeniche. L'effetto del risedronato sui precursori degli osteoclasti (PBMC) nell'ostroporosi postmenopausale non sono mai stati studiati. Questo lavoro ha preso in considerazione l'effetto del risedronato sui precursori degli osteoclasti e sulla produzione citochinica.

Materiali e Metodi: Lo studio è stato condotto su 25 donne osteoporotiche trattate con risedronato 5 mg/die. Sono stati presi in considerazione i seguenti parametri: turnover osseo, precursori circolanti degli osteoclasti, formazione di osteoclasti, attività e vitalità degli osteoclasti, variazioni dei livelli di citochine prima e dopo la terapia.

Risultati: Dopo 3 mesi di terapia con risedronato si è assistito ad una riduzione significativa del numero e del grado di differenziazione dei precursori degli osteoclasti, della formazione, vitalità e attività degli osteoclasti in coltura, dei livelli di RANKL e TNF in coltura.

Conclusioni: I nostri dati mostrano che risedronato è efficace nel ridurre il numero dei precursori circolanti degli osteoclasti, la loro formazione, attività e vitalità e livelli di citochine pro osteoclastogeniche nei surnatanti.

Introduzione

L'osteoporosi postmenopausale è una patologia scheletrica sistemica caratterizzata da una riduzione della densità minerale ossea (BMD) e da un deterioramento microarchitetturale del tessuto osseo con conseguente fragilità ossea e suscettibilità alle fratture. ((1984) "National Institute of Health Consensus Conference").

La causa prevalente dell'osteoporosi postmenopausale è la carenza estrogenica. Questa determina l'attivazione di nuove unità di rimodellamento e uno squilibrio tra neoformazione e riassorbimento osseo attuato dall'unità multicellulare di base (BMU) formata da osteoblasti, osteociti, osteoclasti e matrice extracellulare.

Attualmente si ritiene che il ruolo protettivo esercitato dagli estrogeni sul tessuto osseo sia legato alla loro capacità di ridurre la formazione degli osteoclasti, aumentarne i fenomeni apoptotici e diminuirne la attività riassorbitiva⁽¹³⁾ e che quindi la carenza estrogenica sia coinvolta nella regolazione dei processi di osteoclastogenesi, tuttavia rimangono ancora punti oscuri nell'esatto meccanismo d'azione di questi ormoni a livello osteoclastico. Soprattutto interessante sembra essere l'ipotesi secondo la quale gli estrogeni agiscano indirettamente sugli osteoclasti attraverso una regolazione del sistema immunitario ed, in particolare, dei linfociti T⁽¹⁶⁾.

Gli osteoclasti sono cellule plurinucleate formatesi dalla fusione di cellule della linea monocito-macrofagica, in particolare essi derivano dalla frazione CD 14 positiva delle cellule mononucleate circolanti nel sangue periferico (PBMC)⁽²⁵⁾.

Sono stati identificati numerosi fattori implicati nella differenziazione, maturazione e attivazione degli osteoclasti. In particolare, RANK e OPG (osteoprotegerina) sembrano essere i componenti essenziali nella regolazione della formazione, fusione, sopravvivenza, attivazione e apoptosi degli osteoclasti⁽¹⁴⁾.

La differenziazione dei monociti precursori del midollo in osteoclasti maturi si ritiene sia sostenuta soprattutto da M-CSF (Macrophages Colony Stimulating Factor) che agisce principalmente aumentando le dimensioni del pool di pre-osteoclasti presenti nel midollo osseo e inducendo la cellule multipotenti della linea macrofagica alla proliferazione e alla trasformazione in precursori degli osteoclasti.

In presenza di M-CSF, il legame del RANKL (RANK ligando) prodotto dagli osteoblasti al recettore RANK (Receptor Activator of Nuclear factor-kB) sui precursori ne induce la differenziazione in osteoclasti immaturi non fusi. OPG (osteoprotegerina) blocca questo effetto neutralizzando il RANKL. Essa

funge da recettore inattivante per RANKL e per sRANKL, caratterizzandosi così come un inibitore dell'osteoclastogenesi e dell'attività osteoclastica e come un promotore dell'apoptosi degli osteoclasti. La sopravvivenza e la fusione degli osteoclasti sono stimulate ancora da RANKL: questo processo, che porta alla formazione di osteoclasti multinucleati, è a sua volta modulato da citochine come IL1, TNF α (Tumor Necrosis Factor α), e IL-6 e inibito da OPG. Successivamente gli osteoclasti sono attivati da RANKL, IL-1, TNF α , e IL-6 ed acquisiscono la capacità di riassorbire il tessuto osseo. Anche tale processo è inibito da OPG. Infine, gli osteoclasti maturi vanno incontro ad apoptosi con un processo mediato da OPG e inibito da RANKL⁽¹²⁾.

Numerosi studi hanno attribuito alle interleuchine 1 (IL1), 6 (IL6) e TNF α il ruolo di citochine proosteoclastogeniche tramite la modulazione dell'espressione di RANK, RANKL e OPG^(13,16).

Tra i fattori che incrementano l'espressione di mRNA di RANKL negli osteoblasti, oltre a TNF α e IL1, sono riconosciuti IL6, IL11, oncostatina, PGE₂, ormoni steroidei, desametasone e 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25-(OH)₂D₃]. Inoltre l'espressione del gene di RANKL è incrementata da PTH e da immunosoppressori⁽¹²⁾.

Un nostro recente studio⁽⁴⁾ ha per la prima volta dimostrato come sia possibile ottenere osteoclasti in colture di PBMC in misura significativamente maggiore nelle pazienti osteoporotiche rispetto ai controlli sani in postmenopausa e come tale osteoclastogenesi spontanea dipenda dall'aumentata produzione in coltura di citochine proosteoclastogeniche come RANKL e TNF, maggiore nelle colture delle pazienti rispetto a quelle dei controlli.

Molte delle citochine sopracitate sono anche mediatori critici dei processi di flogosi acuta e cronica ed è noto da tempo che diverse patologie caratterizzate da una condizione di cronica infiammazione anche localizzata (es. artrite reumatoide, IBD, connettivopatie) si accompagnano ad uno stato di diffusa demineralizzazione ossea^(10,19). Esistono in letteratura numerosi studi, condotti su modelli animali, che dimostrano la partecipazione dei linfociti T nella regolazione del turnover osseo in condizioni fisiologiche e patologiche. In particolare è stato evidenziato il ruolo dei linfociti T nella perdita di osso indotta dalla carenza estrogenica⁽³⁾. L'espansione del pool di linfociti T produttori TNF α indotta dalla carenza estrogenica è il risultato di una complessa regolazione che coinvolge il timo ed il midollo osseo⁽²⁷⁾.

Perifericamente gli estrogeni sono in grado di prevenire l'attivazione dei linfociti agendo sulla presentazione dell'antigene e inibendo la produzione di IL7 e IFN γ . Il risultato netto di questa regolazione è la diminuzione del numero di cellule T produttori TNF α .

Esistono diversi studi che confermano l'azione diretta dei bisfosfonati sugli osteoclasti. In particolare sembra che possano causare morte apoptotica degli osteoclasti di topo e coniglio in vitro e in vivo^(1,8,18,26). D'altro canto studi condotti in vitro su osteoclasti umani e di ratto hanno mostrato che l'inibizione del riassorbimento osseo da parte di alendronato, pamidronato ed etidronato non era associata a tossicità cellulare, né ad una diminuzione del numero degli osteoclasti, ma ad alterazioni cellulari che determinavano una incapacità nel riassorbimento osseo come la perdita dell'orletto a spazzola sulla membrana o alterazioni citoscheletriche⁽²¹⁾. Anche alterazioni a carico del metabolismo degli osteoclasti potrebbero inibire indirettamente i processi necessari per il riassorbimento come il rilascio di enzimi lisosomali o l'acidificazione del microambiente⁽¹¹⁾.

Alcuni studi hanno, invece, indagato il ruolo dei bisfosfonati nell'inibire la differenziazione degli osteoclasti dai precursori. Sembra, infatti, che a basse concentrazioni possano prevenire il reclutamento, la differenziazione e la fusione dei precursori degli osteoclasti e che la potenza dei bisfosfonati in questo tipo di meccanismo di azione rifletta la potenza antiriassorbitiva (maggiore per il risedronato, minore per pamidronato, neridronato, clodronato ed etidronato)⁽⁷⁾.

Obiettivi dello studio

Nella prima parte dello studio ci siamo occupati di studiare il meccanismo dell'osteoclastogenesi spontanea in vitro ponendo particolare attenzione al ruolo dell'eventuale aumentato output midollare di precursori differenziati in senso osteoclastico e della produzione di citochine proosteoclastogeniche, analizzare il ruolo di RANKL, OPG e TNF α nel determinare l'osteoclastogenesi *in vitro*, valutare il ruolo della carenza estrogenica postmenopausale sulla produzione di citochine proosteoclastogeniche, sull'output midollare di precursori differenziati e sulla formazione di osteoclasti in coltura, valutare la relazione tra osteoclastogenesi *in vitro* e caratteristiche cliniche delle pazienti (densità minerale ossea e markers del turnover osseo), valutare la produzione di TNF α dai PBMC e di analizzare il ruolo dei linfociti nell'indurre la formazione di osteoclasti a partire da monociti CD14+ in vitro.

La seconda parte del nostro studio si è occupata di individuare i possibili meccanismi di azione del risedronato valutando l'osteoclastogenesi, la presenza di precursori circolanti e la produzione di citochine dopo 3 mesi di assunzione in vivo di risedronato 5 mg/die nelle pazienti osteoporotiche senza l'aggiunta di calcio e vitamina D.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Nello studio sono state incluse 25 donne affette da osteoporosi postmenopausale e 23 donne in postmenopausa non osteoporotiche confrontabili con le pazienti per età e BMI (Body Mass Index).

Inoltre sono state incluse 7 donne volontarie in età premenopausale che non assumevano contraccettivi orali.

Separazione e colture cellulari

I PBMC sono stati ottenuti da sangue intero attraverso l'utilizzo del Ficoll-Paque. Sono state allestite colture sia in assenza di fattori di crescita che in presenza di M-CSF e RANKL. Il surnatante dai pozzetti non contenenti i fattori di crescita è stato raccolto a 3 e 6 giorni di coltura, inoltre è stato effettuato un pool di surnatante che rappresenta l'intero periodo di coltura per il dosaggio di RANKL, OPG e TNF α .

Formazione ed attività degli osteoclasti

Per valutare la formazione di osteoclasti al 21° giorno di coltura le cellule sono state fissate e colorate per rilevare la presenza della fosfatasi acida tartrato resistente (TRAP), inoltre le cellule sono state colorate con metodo immunostochimico per il recettore della vitronectina (VNR) altro marker osteoclastico. Per determinare l'estensione della superficie di riassorbimento dopo rimozione delle cellule è stato utilizzato un software di analisi di immagine da noi brevettato e costruito in collaborazione con il Politecnico di Torino.

Test di vitalità cellulare

Per escludere che eventuali differenze nel numero di osteoclasti nei pazienti prima e dopo terapia e tra pazienti e controlli fossero legate ad una diversa vitalità cellulare è stato eseguito il test di vitalità cellulare con il 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT).

Analisi dei precursori

I precursori osteoclastici circolanti a livello periferico sono stati individuati con tecnica citofluorimetrica utilizzando un citofluorimetro FACS Calibur flow

cytometer eseguendo una citofluorimetria a tre colori con i seguenti anticorpi coniugati: CD51/61-FITC (vitronectina), CD14-PE (marker specifico che identifica i monociti), CD11b-APC (identifica, oltre ai precursori degli osteoclasti, anche i granulociti e i precursori dei macrofagi) ed i corrispondenti controlli isotipici.

La doppia positività per il CD14 ed il CD11b identifica il precursore osteoclastico ad uno stadio precoce di differenziazione mentre la positività per tutti e tre anticorpi (cellule triple positive) identifica il precursore osteoclastico altamente differenziato⁽²⁴⁾; il CD 51/61, infatti corrisponde al recettore per la vitronectina, marker degli osteoclasti. I dati sono stati espressi come percentuale e numero assoluto di cellule ed anche come intensità di fluorescenza la quale rappresenta il numero il livello di differenziazione dei precursori verso gli osteoclasti.

Produzione di TNF α in circolo

Per analizzare la produzione di TNF α da parte dei PBMC in condizioni simili a quelle osservate in vivo abbiamo utilizzato un metodo di colorazione intracellulare in fluorimetria che consente di misurare l'espressione della citochina all'interno della cellula e, usato in combinazione con anticorpi marcati di antigeni di superficie, consente di individuare il fenotipo della cellula che la produce.

Per la colorazione di superficie abbiamo usato i seguenti anticorpi: CD3 PerCp, CD19 FITC, CD14 APC ed i corrispettivi controlli isotipici. Dopo la fissazione della marcatura di superficie e la permeabilizzazione abbiamo effettuato la colorazione intracitoplasmatica con Anti-Hu-TNF α PE. L'espressione degli antigeni di membrana e della citochina intracitoplasmatica è stata analizzata dopo acquisizione con citofluorimetro FACS.

Co-culture cellulari

Per chiarire il ruolo dei linfociti nella differenziazione e attivazione degli osteoclasti in vitro abbiamo condotto un esperimento su PBMC ottenute da un pool di pazienti ponendo in coltura i monociti da soli oppure insieme a linfociti T o B; le popolazioni cellulari sono state separate mediante un sorting di tipo magnetico.

SECONDA PARTE

A tutte le pazienti incluse nello studio è stata somministrata terapia con risedronato 5 mg/die, senza l'aggiunta di calcio e vitamina D per tre mesi; dopo

tale periodo le pazienti sono state richiamate al Centro per una rivalutazione dei markers di turnover osseo, per l'estrazione e coltura dei PBMC da sangue periferico, per valutare l'entità dell'attività riassorbitiva degli osteoclasti, la vitalità cellulare e la presenza di precursori circolanti e per il dosaggio di TNF α , RANKL e OPG nei surnatanti delle colture. Al fine di escludere che eventuali variazioni nell'osteoclastogenesi *in vitro* fossero legate ad una variabilità spontanea, anche i controlli sani, che non avevano ricevuto alcun tipo di terapia, sono stati richiamati al Centro e sottoposti agli stessi esami.

RISULTATI

A completamento del nostro precedente lavoro, in cui per la prima volta sono state poste in correlazione le caratteristiche cliniche delle pazienti osteoporotiche con l'osteoclastogenesi ottenuta *in vitro* senza l'aggiunta di fattori proosteoclastogenetici, nella prima parte del nostro studio abbiamo valutato il ruolo dei precursori osteoclastogenici e della produzione endogena di citochine proosteoclastogeniche nell'osteoclastogenesi spontanea da colture di PBMC di donne affette da osteoporosi postmenopausale, di controlli sani in postmenopausa e di soggetti in premenopausa.

L'analisi dei marcatori di superficie cellulare con tecnica citofluorimetrica ci ha permesso di evidenziare una maggiore espressione del CD14 e del CD11b nei monociti delle pazienti osteoporotiche rispetto ai controlli, segno di una maggiore differenziazione di queste cellule in senso pre-osteoclastico. Anche la percentuale dei tripli positivi (CD14+, CD11b+ e CD51/61+) era tendenzialmente maggiore nelle pazienti rispetto ai controlli, sebbene la differenza non fosse statisticamente significativa.

I soggetti sani in premenopausa rispetto ai controlli in postmenopausa mostravano una maggiore espressione del CD14 sui monociti circolanti, che correlava inversamente con l'età facendo supporre, quindi, una possibile maggiore reattività del sistema immunitario in età giovanile.

I precursori degli osteoclasti sono direttamente correlati sia ai livelli di TNF α , RANKL ed OPG dosati nel surnatante, sia al numero di osteoclasti formati in coltura. I dati ottenuti nelle pazienti in premenopausa ci fanno supporre che il primo driver dell'osteoclastogenesi sia il maggior numero di precursori circolanti che necessita di interagire con le citochine proosteoclastogeniche; infatti, in premenopausa, a fronte di elevati livelli di TNF α e RANKL, non si osserva osteoclastogenesi spontanea.

Per valutare il ruolo dei linfociti nell'indurre l'osteoclastogenesi *in vitro* abbiamo allestito delle coculture di monociti e linfociti T e B. Sebbene

l'esperimento sia stato condotto utilizzando un pool di PBMC di un numero limitato di pazienti, abbiamo evidenziato un aumento dell'osteoclastogenesi nei pozzetti in cui i monociti CD14+ sono stati piastrati con i linfociti T. Questo conferma i dati già presenti in letteratura sul ruolo dei linfociti T nella differenziazione degli osteoclasti, tuttavia per confermare tali dati sarebbe utile condurre questo esperimento su un numero maggiore di pazienti.

Inoltre, è stato recentemente dimostrato come il TNF α e IL-1 α aggiunti in coltura siano fattori di stimolo efficace alla formazione di osteoclasti in vitro: queste due citochine derivano in maggior parte dagli stessi monociti e dai macrofagi ed inoltre i linfociti T producono diverse citochine pleiotropiche⁽⁹⁾, molte delle quali sono capaci di regolare la formazione e la funzionalità degli osteoclasti. Pertanto è chiaro come l'utilizzo di PBMC non frazionati consenta di cocoltivare preosteoclasti e linfociti e, quindi, di ottenere osteoclastogenesi supportata dalla produzione citochinica dei linfociti T attivati. A questo proposito abbiamo condotto un esperimento in citofluorimetria per valutare la produzione di TNF α da parte dei PBMC. In particolare, nelle pazienti osteoporotiche abbiamo evidenziato, rispetto ai controlli, un aumento significativo delle cellule CD14+ e delle cellule CD3+ circolanti produttori TNF α . Questo conferma anche nell'uomo il ruolo di TNF α come citochina proosteoclastogenetica e ci permette di escludere che la produzione di TNF α in coltura dipenda da un'attivazione delle cellule T in vitro essendo aumentata la produzione anche a livello del sangue periferico.

I dati dimostrano un aumento di più del doppio nelle colture cellulari delle pazienti rispetto ai controlli delle citochine proosteoclastogeniche misurate (TNF α e RANKL) e possono chiaramente rendere ragione dell'aumentata osteoclastogenesi nelle pazienti osteoporotiche rispetto ai controlli.

Per quanto attiene alla sensibilità dei precursori degli osteoclasti all'1,25-OH vitamina D₃, abbiamo dimostrato una significativa riduzione del numero di osteoclasti formati aggiungendo al mezzo di coltura 1,25-OH vitamina D [10⁻⁸ M], sia nei pazienti che nei controlli che sembrerebbero, quindi, comportarsi nello stesso modo nei confronti della 1,25-OH vitamina D₃; abbiamo osservato invece un netto aumento dell'attività osteoclastica dopo l'aggiunta al terreno di coltura del metabolita attivo della vitamina D.

Per quanto riguarda la possibile relazione tra osteoclastogenesi e parametri clinici è interessante notare come vi sia una correlazione inversa tra numero di osteoclasti formati e BMD, oltre ad una correlazione diretta tra numero di osteoclasti formati e livelli di TNF α e di RANKL; questi dati confermano la stretta relazione tra osteoclastogenesi, produzione endogena di citochine e caratteristiche cliniche della paziente osteoporotica. Il livello di citochine

proosteoclastogeniche prodotte dai PBMC (TNF e RANKL) risulta essere inversamente correlato alla BMD sia a livello della colonna vertebrale che a livello del collo femorale; inoltre, i dati dimostrano una correlazione tra crosslinks (indici di riassorbimento osseo) e RANKL ed OPG rispettivamente diretta ed inversa. Questi dati confermano ulteriormente il ruolo svolto dal TNF α , dal RANKL e dall'OPG prodotti in coltura nel determinismo della perdita di massa ossea che si determina nell'osteoporosi postmenopausale attraverso un aumento dell'osteoclastogenesi e dell'attività osteoclastica.

È interessante notare come il RANKL ed i precursori degli osteoclasti siano predittori diretti dell'osteoclastogenesi, mentre l'OPG sia un predittore inverso. Questo riflette l'importanza del sistema di modulazione dell'osteoclastogenesi rappresentato da RANKL e OPG: mentre il primo induce la differenziazione osteoclastica, OPG ne è un potente inibitore.

Nella seconda parte dello studio abbiamo analizzato osteoclastogenesi, attività osteoclastica, precursori e produzione di citochine dopo terapia con risedronato 5 mg/die per 3 mesi.

Gli effetti in vivo della terapia con bisfosfonati sulla formazione di osteoclasti in colture di PBMC e sulla produzione di citochine non sono ancora chiari^(2,5,6,8,15,17,20,22,23). L'obiettivo del nostro lavoro è stato quello di valutare l'effetto del risedronato sull'osteoclastogenesi in vitro e di determinare i possibili meccanismi d'azione di questo farmaco a livello cellulare. A tale scopo abbiamo preso in considerazione, come possibili siti di azione del risedronato, i precursori circolanti degli osteoclasti, l'attività e la vitalità delle cellule formatesi in coltura e la produzione di citochine nei surantanti delle colture stesse. Non esistono ancora spiegazioni esaustive sugli effetti del risedronato sulla presenza di preosteoclasti circolanti e sulla produzione citochinica sebbene ci siano in letteratura dati sull'induzione dell'apoptosi degli osteoclasti in vitro ed in vivo da parte dei bisfosfonati e sugli effetti nei confronti dei precursori^(1,8,26). I nostri dati mostrano che il risedronato inibisce la formazione di osteoclasti in colture di PBMC di pazienti affette da osteoporosi postmenopausale, sia in assenza (osteoclastogenesi spontanea) che in presenza (osteoclastogenesi indotta) di fattori di crescita, già dopo soli 3 mesi di terapia. La riduzione della formazione di osteoclasti è accompagnata da una riduzione dei markers di metabolismo osseo. Nei controlli, richiamati a distanza di tre mesi, non abbiamo riscontrato differenze significative nel numero degli osteoclasti, nella loro attività, vitalità, nei precursori circolanti e nella produzione di citochine nel mezzo di coltura: abbiamo così escluso la possibile variabilità spontanea di questi parametri.

Il test di vitalità cellulare dopo terapia ha dimostrato una riduzione della vita media dei PBMC in coltura sia in presenza che in assenza di fattori di crescita:

questo potrebbe contribuire alla riduzione del numero di osteoclasti formati. Come suggerito dalla letteratura⁽²⁶⁾ gli effetti sulla vita media delle cellule, anche senza aggiunta di bisfosfonati in coltura, sono da attribuire o ad una riduzione del numero di cellule capaci di indurre osteoclastogenesi in vitro o all'induzione di un pattern proapoptotico nei precursori; anche la riduzione dei livelli di citochine potrebbe contribuire alla riduzione della vitalità cellulare. Secondo la nostra opinione il risedronato potrebbe avere un effetto diretto sulla produzione di citochine: infatti dopo terapia la vita media dei PBMC in coltura è risultata essere maggiore in presenza di fattori di crescita. Questo suggerisce che la riduzione in vitro della produzione di citochine sia uno dei determinanti della riduzione della formazione di osteoclasti indotta dalla terapia con risedronato.

I nostri dati indicano che il risedronato inibisce la formazione in vitro di osteoclasti non solo agendo sulla vitalità cellulare e sulla produzione citochinica ma anche attraverso la riduzione del numero e del grado di differenziazione dei precursori osteoclastici. Il risedronato infatti riduce in modo significativo il numero di precursori CD14+,CD11b+ e CD51/61+ (cellule triple positive) senza alterare il numero dei monociti (CD14+), dei granulociti e dei precursori dei macrofagi (CD14+ e CD11b+). Questo dimostra una specificità d'azione del risedronato sui precursori degli osteoclasti ma non sulle altre cellule della linea granulocito-macrofagica.

Sono emersi dati molto interessanti sulla capacità riassorbitiva degli osteoclasti dopo terapia come mostrato dall'analisi dell'erosione della matrice in vitro. Il trattamento con risedronato, infatti, riduce la percentuale della matrice riassorbita: questo sembra dipendere sia dalla riduzione della formazione di osteoclasti sia dalla riduzione della capacità di ogni singola cellula di riassorbire matrice come mostra la minore dimensione dei pits dopo trattamento.

CONCLUSIONI

In conclusione il presente studio dimostra che:

1. l'osteoclastogenesi spontanea è maggiore nelle pazienti affette da osteoporosi postmenopausale rispetto a controlli sani.
2. l'osteoclastogenesi aumenta dopo la menopausa in misura maggiore nei soggetti osteoporotici rispetto ai soggetti di controllo.
3. l'osteoclastogenesi dipende sia dai precursori degli osteoclasti presenti nel sangue circolante che sono maggiori nelle pazienti osteoporotiche rispetto ai controlli, sia dall'aumento della produzione citochinica.

4. non c'è differenza significativa nella sensibilità dei PBMC alla 1,25-OH vitamina D₃ nelle pazienti osteoporotiche rispetto a controlli sani ed alle pazienti in premenopausa *in vitro*, la vitamina D si comporta come inibitore del numero di osteoclasti formati, ma promotore della loro attività.
5. la vitamina D in coltura agisce riducendo la produzione di TNF α e di OPG senza modificare i livelli di RANKL.
6. i livelli di TNF α e RANKL sono significativamente maggiori nei pazienti rispetto ai controlli e sono inversamente correlati con la densità minerale ossea.
7. l'OPG è correlata direttamente all'età anagrafica dei soggetti, è un predittore inverso dell'osteoclastogenesi e diretto della densità minerale ossea sebbene non possa essere utilizzata come parametro discriminante tra pazienti e controlli.
8. nelle pazienti affette da osteoporosi postmenopausale è presente un numero maggiore di cellule CD3⁺ e CD14⁺ circolanti produttori TNF α rispetto ai controlli sia a livello basale che dopo stimolo.
9. l'osteoclastogenesi spontanea è sostenuta *in vitro* dalla presenza di linfociti T.
10. il risedronato è in grado di ridurre l'osteoclastogenesi in colture di PBMC di donne osteoporotiche riducendo il numero di precursori circolanti (senza alterare il numero di monociti macrofagi e granulociti), il numero, l'attività e la vitalità degli osteoclasti in coltura e la produzione di citochine proosteoclastogeniche.

BIBLIOGRAFIA

1. Benford H.L., McGowan N.W., Helfrich M.H., Nuttall M.E., Rogers M.J.: *Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts in vitro*. Bone 28, 465-473, 2001.
2. Breuil V., Cosman F., Stein L., Hobert W., Nieves J., Shen V., Lindsay R., Dempster D.W.: *Human osteoclast formation and activity in vitro: effects of alendronate*. J. Bone Miner. Res. 13, 1721-1729, 1998.
3. Cenci S., Weitzmann M.N., Roggia C., Namba N., Novack D., Woodring J., Pacifici R.: *Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha*. J. Clin. Invest. 106: 1229-1237, 2000.
4. D'Amelio P., Grimaldi A., Pescarmona G.P., Tamone C., Roato I., Isaia G.C.: *Spontaneous osteoclast formation from peripheral blood mononuclear cells in postmenopausal osteoporosis*. FASEB J. 19, 410-422, 2005.
5. Gur A., Denli A., Cevik R., Nas K., Karakoc M., Sarac A.J.: *The effects of alendronate and calcitonin on cytokines in postmenopausal osteoporosis: a 6-month randomized and controlled study*. Yonsei Med. J. 44:, 99-109, 2003.
6. Hewitt R.E., Lissina A., Green A.E., Slay E.S., Price D.A., Sewell A.K.: *The bisphosphonate acute phase response: rapid and copious production of proinflammatory cytokines by peripheral blood T cells in response to aminobisphosphonates is inhibited by statins*. Clin. Exp. Immunol. 139, 101-111, 2005.
7. Hughes D.E., Wright K.R., Uy H.L., Sasaki A., Yoneda T., Roodman G.D., Mundy G.R., Boyce B.F.: *Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo*. J. Bone Miner. Res. 10, 1478-1487, 1995.
8. Hughes D.E., McDonald B.R., Russel R.G.G., Gowen M.: *Inhibition of osteoclast-like cell formation by bisphosphonates in long-term cultures of human bone marrow*. J. Clin. Invest. 83, 1930-1935, 1989.
9. Kimble R.B., Bain S., Pacifici R.: *The functional block of TNF but not of IL-6 prevents bone loss in ovariectomized mice*. J. Bone Miner. Res. 12, 935-941, 1997.
10. Kong Y.Y., Penninger J.M.: *Molecular control of bone remodeling and osteoporosis*. Exp. Gerontol. 35, 947-956, 2000.
11. Lerner U.H., Larsson A.: *Effects of four bisphosphonates on bone resorption., lysosomal enzyme release, protein synthesis and mitotic activities in mouse calvarial bones in vitro*. Bone 17, 98-107, 1987.
12. Lorenz C., Hofbauer L.C., Heufelder A.E.: *The Role of Receptor Activator of Nuclear Factor-kB Ligand and Osteoprotegerin in the Pathogenesis and Treatment of Metabolic Bone Diseases*. J. Clin. End. & Metab. 85, 2355-2363, 2000.
13. Haynes B.F., Sempowski G.D., Wells A.F., Hale L.P.: *The human thymus during aging*. Immunol. Res. 22, 253-261, 2000.
14. Massey H.M., Flanagan A.M.: *Human osteoclast derive from CD14-positive monocytes*. Br. J. Haem. 106, 167-170, 1999.
15. Mossetti G., Rendina D., De Filippo G., Viceconti R., Di Domenico G., Cioffi M., Postiglione L., Nunziata V.: *Interleukin-6 and osteoprotegerin systems in Paget's disease of bone: relationship to risedronate treatment*. Bone 36, 549-554, 2005.

16. Pacifici R.: *Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis*. J. Bone Miner. Res. 11, 1043-1051, 1996.
17. Papadaki H.A., Tsatsanis C., Christoforidou A., Malliaraki N., Psyllaki M., Pontikoglou C., Miliaki M., Margioris A.N., Eliopoulos G.D.: *Alendronate reduces serum TNFalpha and IL-1beta, increases neutrophil counts, and improves bone mineral density and bone metabolism indices in patients with chronic idiopathic neutropenia (CIN)-associated osteopenia/osteoporosis*. J. Bone Miner. Metab. 22, 577-587, 2004.
18. Rogers M.J, Gordon S., Benford H.L., Coxon F.P., Luckman S.P., Monkkonen J., Frith J.C.: *Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates*. Cancer 88, 2961-2978, 2000.
19. Romas E., Gillespie M.T., Martin T.J.: *Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis*. Bone 30, 340-346, 2002.
20. Santini D., Fratto ME., Vincenzi B., La Cesa A., Dianzani C., Tonini G.: *Bisphosphonate effects in cancer and inflammatory diseases: in vitro and in vivo modulation of cytokine activities*. BioDrugs 18, 269-278, 2004.
21. Sato M., Grasser W.: *Effects of bisphosphonates on isolated rat osteoclasts are examined by reflected light microscopy*. J. Bone Miner. Res. 5, 31-40, 1990.
22. Sauty A., Pecherstorfer M., Zimmer-Roth I., Fioroni P., Juillerat L., Markert M., Ludwig H., Leuenberger P., Burckhardt P., Thiebaud D.: *Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels after bisphosphonates treatment in vitro and in patients with malignancy*. Bone 18, 133-139, 1996.
23. Schweitzer D.H., Oostendorp-van de Ruit M., Van der Pluijm G., Lowik C.W., Papapoulos S.E.: *Interleukin-6 and the acute phase response during treatment of patients with Paget's disease with the nitrogen-containing bisphosphonate dimethylaminohydroxypropylidene bisphosphonate*. J. Bone Miner. Res. 10, 956-962, 1995.
24. Shalhoub V., Elliott G., Chiu L., Manoukian R., Kelley M., Hawkins N., Davy E., Shimamoto G., Beck J., Kaufman S.A., Van G., Scully S., Qi M., Grisanti M., Dunstan C., Boyle W.J., Lacey D.L.: *Characterization of osteoclast precursors in human blood*. Br. J. Haematol. 111, 501-512, 2000.
25. Shih C., Bernard G.W.: *Peripheral blood mononuclear cells develop into multinucleated osteoclasts in tissue culture*. Anat. Rec. 245, 41-45, 1996.
26. Wang X.M., Yu S.F., Yang Z.P.: *Apoptosis of osteoclast-like cells induced by alendronate is related to Fas gene expression*. Chin. J. Dent. Res. 3, 26-32, 2000.
27. Weitzmann N.M., Pacifici R.: *Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale*. J. Clin. Invest. 116, 1186-1194, 2006.

**STUDIO DI FASE III IN PAZIENTI CON CARCINOMA
POLMONARE NON A PICCOLE CELLULE METASTATICO,
TRATTATI CON DUE CICLI DI CISPLATINO E GEMCITABINA
E SUCCESSIVAMENTE RANDOMIZZATI A RICEVERE TRE
ULTERIORI CICLI DELLA STESSA COMBINAZIONE
O GEMCITABINA IN MONOCHEMIOTERAPIA**

Premio “Giampiero Gaidano”

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

Enrica Capelletto

Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche - Università degli Studi di Torino
AUO San Luigi Gonzaga - Orbassano (TO)

Key words: *Non-small cell / Carcinoma polmonare
lung cancer non a piccole cellule
Metastatic disease / Malattia Metastatica
Chemotherapy / Chemioterapia
Cisplatin / Cisplatino
Gemcitabine / Gemcitabina*

Abstract:

Background: In stage IV Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) therapeutic guidelines recommend 4 courses of chemotherapy with 2 additional courses in responsive patients. This randomized phase III study investigated if in responsive and stable disease stage IV patients after 2 courses of cisplatin-gemcitabine, single agent gemcitabine (experimental arm) was not inferior in terms of overall survival to cisplatin-gemcitabine (standard arm), both regimens administered for a maximum of three courses.

Patients and methods: The non-inferiority was defined as an increase in the Hazard Ratio (HR) of death ≤ 1.33 in the experimental arm as compared to the standard arm with a power of 80%. From January 2001 to February 2004, 340 patients were registered and 250 were randomised, 125 in each arm. Patients were stratified by performance status and centre. Cisplatin was administered day 2 at 75 mg/m², and Gemcitabine days 1 & 8 at 1250 mg/m². Treatments were administered every three weeks unless residual toxicity.

Results: Response rate after 2 courses was 29%. At the time of the survival analysis, 113 patients in the experimental and 111 in the standard arm were died. The one-year progression-free survival was 13% in both arms. One-year survival was 52% in the standard and 42% in the experimental arm for an HR of 1.21 (95% CI 0.93-1.58). The only variable associated with survival was performance status. Post-progression survival was in favour of the standard arm (HR 1.30, 95% CI 0.99-1.70). Grade 3-4 toxicity was less relevant in the experimental arm and quality of life as assessed by Lung Cancer Symptom Score was comparable in the 2 arms.

Conclusion: In responsive and stable disease patients with stage IV NSCLC a non statistically superiority in overall survival for the standard approach of 3 courses of cisplatin-gemcitabine was observed when compared to gemcitabine alone.

Riassunto:

Background: Secondo le linee guida, la terapia del carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) in IV stadio prevede 4 cicli chemioterapici seguiti da ulteriori 2 cicli nei pazienti responsivi. Tale studio randomizzato di fase III ha valutato se nei pazienti con malattia stabile o in risposta dopo 2 cicli di cisplatino-gemcitabina, la sola gemcitabina (braccio sperimentale) non fosse inferiore in termini di sopravvivenza complessiva alla terapia standard (cisplatino-gemcitabina), entrambi i regimi somministrati per un massimo di tre cicli.

Pazienti e metodi: La non inferiorità è stata definita da un incremento dell'Hazard Ratio (HR) della mortalità ≤ 1.33 nel braccio sperimentale con una potenza del test pari all'80%. Dal Gennaio 2001 al Febbraio 2004, 340 pazienti sono stati arruolati e 250 randomizzati, 125 per ogni braccio dello studio. I pazienti sono stati stratificati per performance status e centro. Il Cisplatino è stato somministrato secondo lo schema 75 mg/m², giorno 2, la Gemcitabina secondo lo schema 1250 mg/m², giorni 1 & 8 ogni tre settimane, salvo tossicità residua.

Risultati: La risposta complessiva dopo 2 cicli è stata del 29%. All'analisi dei dati erano deceduti 113 pazienti nel braccio sperimentale e 111 nel braccio di controllo. La sopravvivenza libera da malattia è stata del 13% in entrambi i bracci, mentre la sopravvivenza complessiva ad un anno del 52% nel braccio di controllo e del 42% in quello sperimentale con un HR di 1.21 (IC 95% 0.93-1.58). La sopravvivenza complessiva dopo progressione di malattia si è dimostrata in favore del braccio di controllo (HR 1.30, IC 95% 0.99-1.70). La tossicità di grado 3-4 è risultata di minor entità nel

braccio sperimentale, mentre la qualità di vita dei pazienti sovrapponibile in entrambi i bracci dello studio.

Conclusioni: Nei pazienti affetti da NSCLC in IV stadio, con malattia stabile o in risposta, una superiorità non statisticamente significativa in termini di sopravvivenza complessiva è stata osservata nel braccio di controllo, trattato con 3 cicli di cisplatino-gemcitabina, quando confrontato con l'impiego della sola gemcitabina.

Introduzione

Il carcinoma del polmone non a piccole cellule (NSCLC) rappresenta la principale causa di morte per cancro e approssimativamente dal 30% al 40% dei casi di nuova diagnosi si presentano con malattia localmente avanzata o in fase metastatica⁽⁵⁾. Per i pazienti con buon performance status e senza un significativo calo ponderale alla diagnosi, la chemioterapia basata sul cisplatino rimane ad oggi la pietra miliare del trattamento⁽¹¹⁾, sebbene il vantaggio in termini di sopravvivenza sia limitato⁽⁹⁾ e spesso gravato da un'importante tossicità.

I dati disponibili per il NSCLC localmente avanzato non resecabile e metastatico indicano come la migliore risposta al trattamento chemioterapico si osservi per lo più dopo 2-3 cicli, mentre in alcuni studi che sfruttano una modalità di trattamento combinato, per NSCLC in stadio IIIB, la chemioterapia, come trattamento di induzione o concomitante alla radioterapia toracica, è stata somministrata soltanto per due cicli^(3,2). Inoltre, in considerazione del ruolo prevalentemente palliativo della chemioterapia nella gestione dello stadio IV, il problema relativo alla durata ottimale del trattamento dei pazienti non in progressione di malattia dovrebbe essere valutato attentamente, in relazione al problema della tossicità e della qualità della vita.

Recentemente, due studi randomizzati condotti su pazienti con NSCLC in stadio avanzato hanno dimostrato che il prolungamento della chemioterapia oltre 3-4 cicli non offre alcun beneficio clinico aggiuntivo, ma aumenta solamente il grado di tossicità; questi dati concordano con un'analisi retrospettiva condotta, precedentemente, sulla base degli studi di fase II^(13,14,6). I risultati di questi studi hanno portato nel 2003 alla stesura delle linee guida ASCO (American Society of Clinical Oncology) circa la raccomandazione terapeutica di limitare a quattro il numero di cicli di terapia nei pazienti in stadio IV responsivi e a non più di quattro nei pazienti in stadio III non resecabile. In uno studio recentemente pubblicato è stato dimostrato che non esistono differenze in termini di miglioramento dei sintomi, tasso di risposta, tempo alla progressione, sopravvivenza mediana e sopravvivenza ad un anno tra 3 e 6 cicli di polichemioterapia⁽¹³⁾.

In considerazione del fatto che, indipendentemente dalla risposta raggiunta, il problema comune a tutti i pazienti in stadio IV è la precoce ripresa di malattia, può essere di interesse scientifico la ricerca di una "terapia di mantenimento" con la quale sia possibile prolungare il "tempo libero da malattia" senza troppo incidere sulla qualità di vita del paziente.

La Gemcitabina non ha solamente mostrato attività terapeutica come singolo agente chemioterapico nel trattamento del NSCLC in stadio avanzato^(10,8),

ma è anche un farmaco di riferimento nella terapia del paziente anziano⁽⁴⁾, presenta una buona tollerabilità ed è generalmente impiegata in associazione al Cisplatino nella terapia del NSCLC in stadio avanzato^(7,12).

Questo studio di fase III è stato condotto in pazienti con malattia in IV stadio in risposta o stabile dopo 2 cicli di cisplatino e gemcitabina e successivamente randomizzati a ricevere tre ulteriori cicli della stessa combinazione chemioterapica o la sola gemcitabina. L'obiettivo primario dello studio, disegnato come studio di non inferiorità, era la sopravvivenza complessiva.

PAZIENTI E METODI

Pazienti includibili nello studio

I pazienti includibili nello studio dovevano avere diagnosi citologica o istologica di NSCLC, con malattia clinicamente in stadio IV, età compresa tra 18 anni e 75 anni, Performance Status pari a 0-2, secondo i criteri ECOG. Non dovevano essere stati precedentemente sottoposti a precedente trattamento chemioterapico, immunoterapia o radioterapia. I pazienti già sottoposti a trattamento chirurgico che soddisfacevano gli altri criteri di inclusione sono stati invece inclusi nello studio. Era inoltre necessaria una lesione misurabile unidimensionalmente ed una aspettativa di vita di almeno 12 settimane, un profilo ematologico favorevole (leucociti $\geq 3.5 \times 10^9/l$, neutrofili $\geq 2 \times 10^9/l$, piastrine $\geq 100 \times 10^9/l$, emoglobina ≥ 10 g/dl), la capacità da parte del paziente di leggere e redigere autonomamente il "Lung Cancer Symptom Score" (Figura 1) e la firma del consenso informato. Sono stati esclusi dallo studio i pazienti con infezione attiva, metastasi cerebrale sintomatica, tale da richiedere una terapia steroidea o un trattamento radiante d'urgenza, funzione d'organo inadeguata o altra importante patologia sistemica concomitante, incompatibile con lo studio. Le donne in corso di gravidanza ed allattamento sono state escluse dallo studio.

Tempi e criteri di somministrazione della terapia

Tutti i pazienti arruolati nello studio sono stati sottoposti a due cicli chemioterapici secondo lo schema Cisplatino, somministrato al giorno 2 alla dose di 75 mg/m^2 , e Gemcitabina, somministrata ai giorni 1 & 8 alla dose di 1250 mg/m^2 ogni 21 giorni. Una valutazione della risposta di malattia è stata effettuata dopo il secondo ciclo ed alla fine del trattamento. Al termine del secondo ciclo chemioterapico, in caso di malattia stabile o in risposta

oggettiva sulla base dei criteri RECIST di valutazione della risposta i pazienti venivano successivamente randomizzati a ricevere tre ulteriori cicli della stessa combinazione chemioterapica (braccio di controllo) o mono-Gemcitabina allo stesso dosaggio (braccio sperimentale).

I pazienti in progressione sospendevano il trattamento ed uscivano dallo studio.

La sospensione della chemioterapia era prevista per completamento del protocollo, progressione della malattia, tossicità prolungata o considerata inaccettabile da parte del paziente e/o del medico sperimentatore o per decisione del paziente.

Considerazioni statistiche

Lo studio è stato disegnato come uno studio randomizzato comparativo di non inferiorità, volto a valutare se il regime sperimentale possa essere utilizzato in luogo del regime standard, in ragione della sua minore tossicità e di un'efficacia che sul piano clinico possa essere considerata simile. Si assume cioè come ipotesi nulla che il regime sperimentale sia associato ad una sopravvivenza inferiore a quella del regime standard, e si considera come differenza clinica minima di interesse clinico (sufficiente cioè a giustificare l'utilizzo della terapia standard) una riduzione proporzionale del tasso di mortalità del 25% (Hazard Ratio Standard/Sperimentale = 0.75), corrispondente ad una riduzione della probabilità di sopravvivenza ad un anno dal 33%, dato riportato in letteratura per la terapia standard, al 23% con la terapia sperimentale.

Per rifiutare con una potenza dell'80% questa ipotesi nulla, al livello di significatività del 5% (a 1 coda), sotto l'ipotesi alternativa che i due trattamenti abbiano un effetto identico sulla sopravvivenza (Hazard Ratio = 1), è stato necessario inserire nello studio 154 pazienti all'anno per due anni, ed assicurare un ulteriore follow-up di due anni.

Le caratteristiche dei pazienti nei due bracci di trattamento sono state studiate con il test del χ^2 . Il tasso di risposta e la sopravvivenza sono stati calcolati a partire dalla data della prima somministrazione e le curve di sopravvivenza disegnate con il metodo di Kaplan Meier e messe a confronto con il log-rank test.

Valutazione della risposta

La valutazione della risposta è stata effettuata mediante esame TC con m.d.c. (torace, cranio ed addome superiore) dopo 2 cicli ed a fine trattamento.

SCALA DEI SINTOMI

Siete pregati di fare un segno lungo la linea per indicare l'entità del singolo sintomo **NEL CORSO DELLE ULTIME 24 ORE:**

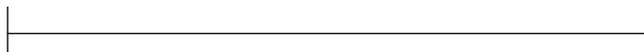
1. Com'è il suo appetito?

Ottimo Assente



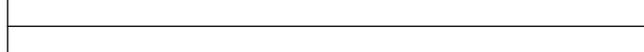
2. Come si può definire il suo livello di stanchezza?

Nulla Massimo



3. Quanto tossisce?

Per nulla Tantissimo



4. Quanto le manca il fiato?

Per nulla Tantissimo



5. Quanto sangue ha visto nel catarro?

Per nulla Tantissimo



6. Come si può definire il suo livello di dolore?

Nulla Massimo



7. Come ritiene siano i sintomi legati alla sua malattia polmonare?

Non ne ho nessuno Non potrebbero essere peggio di così



8. Quanto la sua malattia interferisce con le sue attività quotidiane?

In nessun modo In maniera tale da non poter fare nulla



9. Come valuterebbe la sua qualità di vita ad oggi?

Ottima Pessima



Figura 1. "Lung Cancer Symptom Score".

I pazienti che non praticavano la ristadiazione strumentale sono stati considerati non valutabili per la risposta. La valutazione della risposta è stata effettuata secondo i criteri WHO⁽¹⁵⁾. Con risposta completa (RC) si intende la completa scomparsa di tutte le lesioni misurabili, documentata da almeno due valutazioni a distanza di un minimo di 4 settimane. La risposta parziale (RP) è la riduzione di almeno il 30% della somma dei diametri maggiori delle lesioni misurabili (senza comparsa di nuove lesioni), documentata da almeno due valutazioni a distanza di un minimo di 4 settimane. Per malattia stabile (MS) si intende la riduzione delle lesioni misurabili non sufficiente per una risposta parziale o aumento delle stesse non sufficiente per una progressione di malattia, in assenza di comparsa di nuove lesioni. La progressione (P) è l'aumento superiore al 20% o più della somma dei diametri maggiori delle lesioni preesistenti e/o comparsa di nuove lesioni.

Lung Cancer Symptom Score

La qualità di vita dei pazienti arruolati nello studio è stata valutata tramite il "Lung Cancer Symptom Score" (Figura 1), questionario impiegato nello studio della sfera psico-fisica del paziente affetto da carcinoma polmonare. Tale questionario è stato fornito dallo sperimentatore al paziente al baseline e prima di ogni ciclo chemioterapico.

RISULTATI

Pazienti registrati

Dal Gennaio 2001 al Febbraio 2004, sono stati arruolati 340 pazienti in 41 centri Italiani. L'età media dei pazienti arruolati nello studio era di 62 anni, il 78% era di sesso maschile e il 94% aveva un performance status di 0 o 1.

Dopo la somministrazione di due cicli della combinazione gemcitabina/cisplatino il tasso di risposta era: 1% risposta completa, 28% risposta parziale, 47% malattia stabile, 17% progressione di malattia e 7% risposta non valutabile. Al momento della valutazione della risposta dopo due cicli chemioterapici, 25 pazienti non erano valutabili a causa del precoce ritiro dallo studio per decisione del paziente (10 casi), violazione del protocollo (1 caso), tossicità inaccettabile (5 casi), peggioramento dei sintomi (6 casi) o per decesso dopo l'inclusione all'interno dello studio (3 casi).

A Maggio 2006 dei 340 pazienti registrati, 311 erano deceduti e 335 progrediti.

Pazienti randomizzati

250 pazienti (il 73% della popolazione arruolata per lo studio) sono stati successivamente randomizzati (Figura 2). La randomizzazione ha assegnato più pazienti con risposta parziale al braccio di controllo (52 casi) rispetto a quelli del braccio sperimentale (41 casi). Sono stati inoltre randomizzati 26 pazienti con metastasi cerebrali.

Tra i pazienti randomizzati la distribuzione del tasso di risposta, dopo due cicli di chemioterapia di induzione, era: 2% risposta completa, 31% risposta parziale, 67% malattia stabile, nel braccio sperimentale; 0% risposta completa, 42% risposta parziale, 58% malattia stabile, nel braccio di controllo ($p = 0,08$). Va ricordato che,

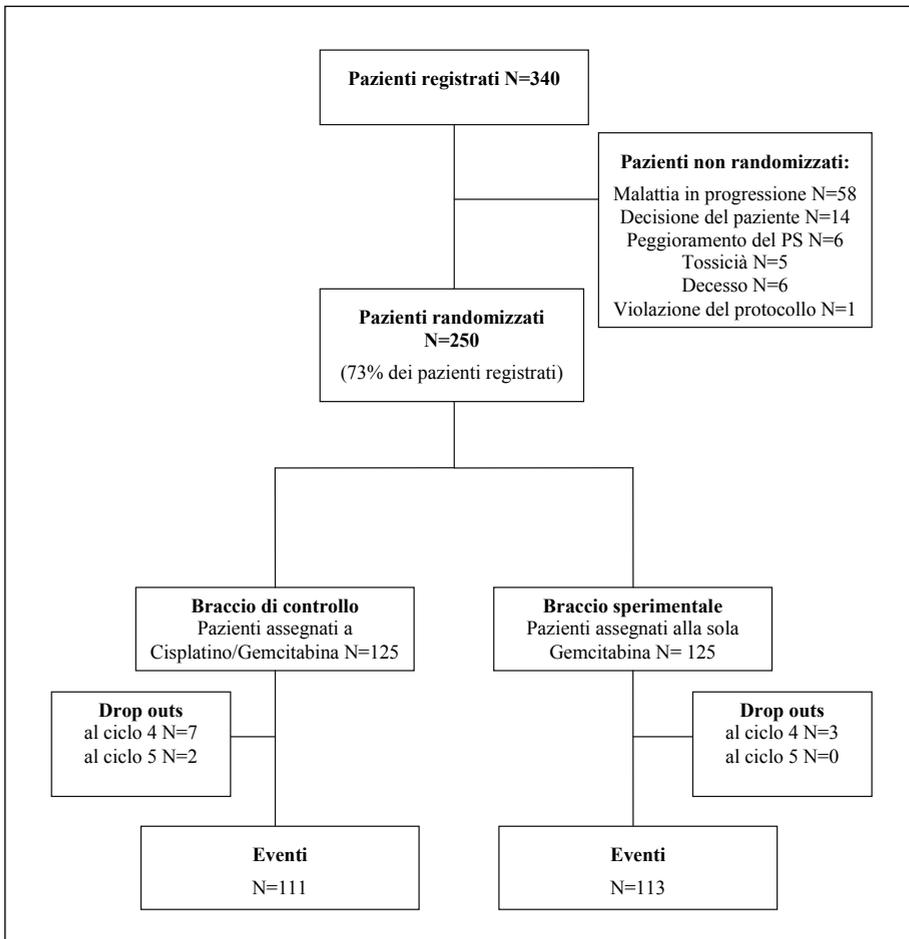


Figura 2. Disegno dello studio.

nel braccio di controllo, rispetto al braccio sperimentale, c'era un maggior numero di pazienti con più di una sede metastatica (51% verso 41%) e con metastasi cerebrali (14% verso 6%), sebbene nessuna differenza tra i due bracci dello studio fosse statisticamente significativa. In ogni caso, il tasso di risposta dopo due cicli chemioterapici non presentava differenze significative, nonostante il numero delle sedi metastatiche e la presenza o meno di metastasi cerebrali.

Alla fine del quinto ciclo, quando è stata effettuata una nuova valutazione del tasso di risposta, si aveva: nel braccio sperimentale, 0% risposta completa, 14,5% risposta parziale, 62,5% malattia stabile, 23% progressione di malattia; nel braccio di controllo, 1% risposta completa, 26% risposta parziale, 49% malattia stabile, 24% progressione di malattia ($p = 0,06$). Il tasso medio di risposta oggettiva era del 21%, indipendentemente dal numero di sedi metastatiche ($p = 0,84$). I pazienti responsivi al trattamento erano il 26% nel gruppo con metastasi cerebrali e il 20% in quello senza metastasi cerebrali ($p = 0,41$).

Sopravvivenza complessiva e libera da malattia

Al momento della valutazione, 224 pazienti erano deceduti, 113 nel braccio sperimentale e 111 nel braccio di controllo. Il tasso di sopravvivenza complessiva

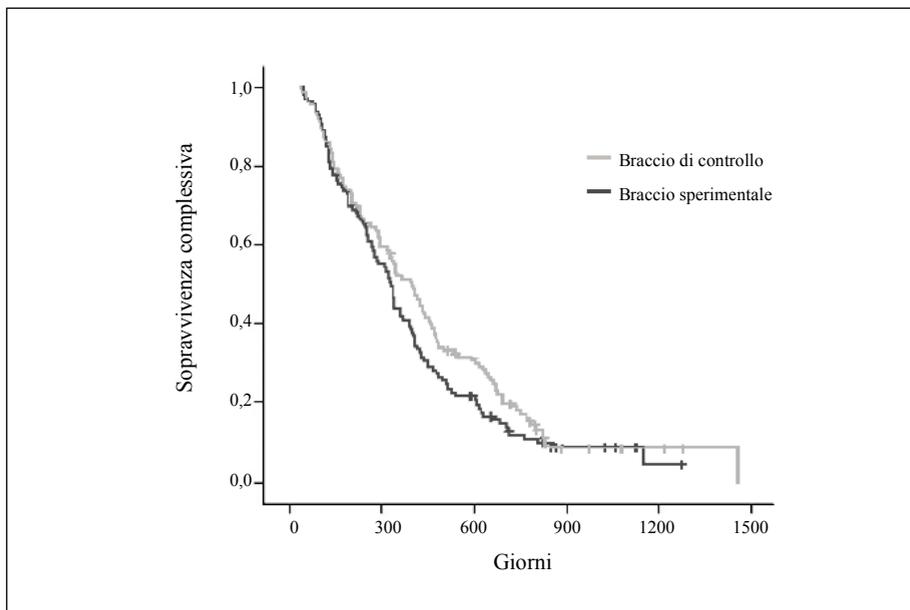


Figura 3. Tasso di sopravvivenza complessiva nei due bracci dello studio.

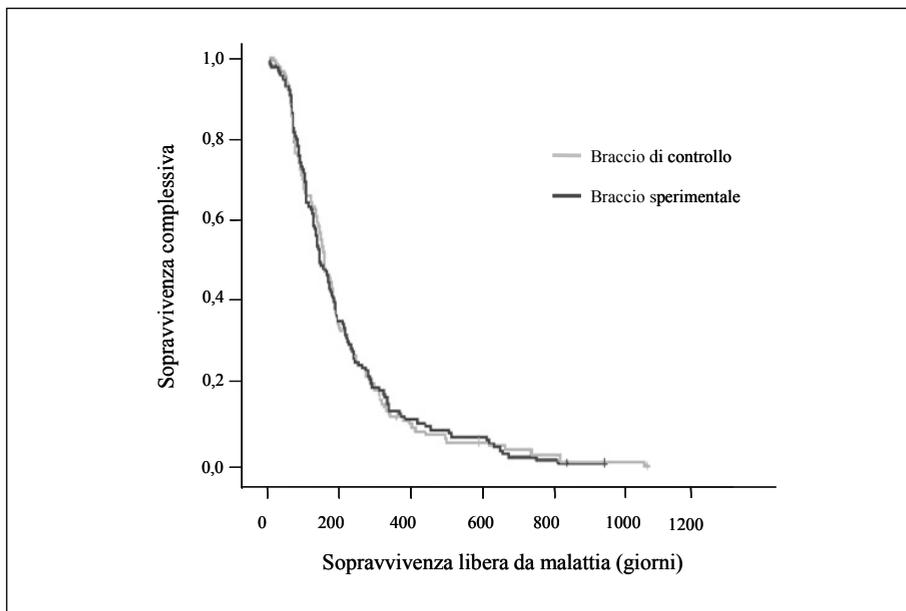


Figura 4. Tasso di sopravvivenza libera da malattia nei due bracci dello studio.

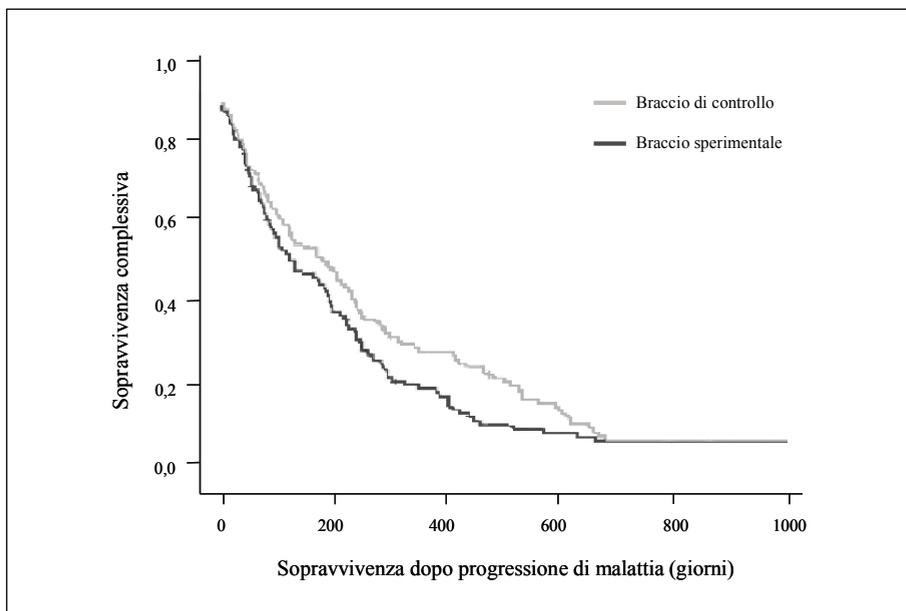


Figura 5. Tasso di sopravvivenza dopo progressione di malattia nei due bracci dello studio.

ad un anno era del 52% nel braccio di controllo e del 42% nel braccio sperimentale con un Hazard Ratio di 1,21 (IC 95%: 0,93-1,58) (Figura 3). Di conseguenza, non era possibile rifiutare l'ipotesi nulla di un incremento del 33% del rischio di morte nel braccio sperimentale. La sopravvivenza libera da malattia ad un anno era del 13% in entrambi i bracci (HR = 1,00, IC 95%: 0,77-1,28) (Figura 4).

All'analisi multivariata, l'unica variabile prognosticamente significativa, associata alla sopravvivenza, era il performance status. La risposta obiettiva dopo due cicli terapeutici, invece, non si è dimostrata un fattore prognostico indipendente ($p = 0,47$). Dopo la correzione per il performance status, l'Hazard Ratio per il braccio sperimentale era 1,26 (IC 95%: 0,96-1,64).

Il tasso di sopravvivenza, dopo progressione di malattia, era maggiore nel braccio di controllo rispetto a quello sperimentale e la differenza vicina alla significatività statistica (HR = 1,30, IC 95%: 0,99-1,70, $p = 0,051$) (Figura 5).

Tossicità

I profili di tossicità sono illustrati in Tabella I e Tabella II. In generale, la tossicità si è dimostrata lieve e con un miglior profilo nel braccio sperimentale, in termini di tossicità ematologica e non ematologica. Non si sono verificati decessi correlati al trattamento chemioterapico.

TOSSICITÀ	Fase di induzione Cisplatino/ Gemcitabina		Fase di randomizzazione			
	g 1-2	g 3-4	Cisplatino/ Gemcitabina		Gemcitabina	
			g 1-2	g 3-4	g 1-2	g 3-4
Neutropenia	23%	22%	23%	31%	27%	12%
Leucopenia	38%	9% (g 4 =1%)	40%	14%	28%	5%
Trombocitopenia	27%	15%	31%	19%	17%	5%
Anemia	40%	1% (g 3)	67%	8% (g 3)	52%	2% (g 3)
Neutropenia febbrile	> 1%	0%	0%	0%	0%	0%

Tabella I. Tossicità ematologica.

TOSSICITÀ	Fase di induzione Cisplatino/ Gemcitabina		Fase di randomizzazione			
	g 1-2	g 3-4	Cisplatino/ Gemcitabina		Gemcitabina	
			g 1-2	g 3-4	g 1-2	g 3-4
Nausea e Vomito	44%	5%	41%	8%	24%	2% (g 3)
Stipsi	18%	1%	2%	0%	8%	2% (g 3)
Tossicità renale	3%	1%	6% (g 1)	0%	3% (g 1)	0%
Dispnea	13%	1%	12%	4%	13%	2%
Mucosite	9%	0%	10%	0%	2% (g 1)	0%
Neuropatia periferica	2%	0%	11% (g 1)	0%	8%	0%
Astenia	36%	3%	48%	8% (g 3)	28%	2%

Tabella II. Tossicità non ematologica.

Qualità di vita

I dati riguardanti la qualità di vita sono stati ottenuti nel 71% dei pazienti registrati e, al terzo ciclo di trattamento, nel 61% dei pazienti randomizzati. I dati forniti dai questionari hanno mostrato una certa tendenza al miglioramento dei sintomi legati alla malattia di base (tosse, dispnea, emottisi) in entrambi i bracci dello studio, senza differenze significative, mentre i sintomi costituzionali, come la fatica, sono rimasti complessivamente invariati. La valutazione della qualità di vita complessiva dei pazienti arruolati ha indicato come questa non si sia deteriorata durante il trattamento chemioterapico, senza alcuna differenza tra i due bracci dello studio.

DISCUSSIONE

Le linee guida internazionali, per il trattamento del NSCLC in stadio IV, consigliano una durata del regime chemioterapico non superiore ai quattro

cicli, con la possibilità di somministrare due ulteriori cicli nei pazienti responsivi⁽¹¹⁾. Nonostante le doppiette chemioterapiche di nuova generazione, non contenenti platino, siano considerate oggi una valida opzione terapeutica agli schemi classici a due farmaci, contenenti un derivato del platino, questi ultimi si confermano essere la pietra miliare nel trattamento dei pazienti affetti da carcinoma polmonare non a piccole cellule in stadio IV con buon performance status al momento della diagnosi. Nella pratica clinica quotidiana, alcuni oncologi usano sostituire il cisplatino con il carboplatino, per il timore dell'elevato grado di tossicità non ematologica, specie di tipo gastro-intestinale e neurologica, correlato alla terapia e per la difficoltà di somministrazione del cisplatino in regime ambulatoriale, che comporta un lungo tempo di infusione. Tuttavia, una recente meta-analisi⁽¹⁾ mostra un'inferiorità, statisticamente significativa, nel grado di attività anti-tumorale dei regimi terapeutici contenenti il carboplatino.

Il presente studio randomizzato è stato condotto nel contesto della Rete Oncologica Italiana, comprendente diverse unità ospedaliere pubbliche, con indirizzo specifico in oncologia toracica. Il suo obiettivo è valutare, nei pazienti affetti da NSCLC in stadio IV, responsivi o con malattia stabile dopo due cicli di cisplatino/gemcitabina, se il trattamento con la sola gemcitabina possa fornire risultati soddisfacenti se confrontato con lo schema terapeutico classico, basato sulla ulteriore somministrazione di tre cicli della stessa combinazione chemioterapica (cisplatino/gemcitabina).

Il tasso di risposta obiettiva dopo due cicli di cisplatino/gemcitabina è stato del 29%. Questa percentuale è piuttosto vicina a quella precedentemente dimostrata, per la stessa doppietta chemioterapica, in un altro studio clinico randomizzato condotto in Italia⁽¹²⁾.

La randomizzazione dopo due cicli chemioterapici ha incluso solo i pazienti con risposta obiettiva o malattia stabile, escludendo all'incirca il 15% - 20% dei pazienti, con precoce progressione di malattia. I dati definitivi dello studio indicano che, nonostante il tasso di sopravvivenza libera da malattia fosse del 13% in entrambi i bracci, nel braccio sperimentale si osservava una ridotta sopravvivenza, così che l'ipotesi nulla della sua inferiorità rispetto al braccio di controllo non può essere rifiutata. A questo proposito, un'apparente limitazione dello studio risiede nel fatto che solo 250 pazienti siano stati randomizzati, rispetto alla previsione di 308 pazienti randomizzabili, così come si definiva nel disegno dello studio. Tuttavia, il numero di eventi richiesti dal disegno originale dello studio (N = 220) per ottenere una potenza del test pari all'80% è stato raggiunto e, di conseguenza, lo studio detiene piena potenza nel determinare la non inferiorità.

La differenza osservata in termini di sopravvivenza complessiva tra i due bracci dello studio contrasta con l'uguale sopravvivenza libera da malattia e ciò è da attribuirsi interamente ad una differente sopravvivenza dopo la progressione di malattia. L'analisi dei dati di sopravvivenza, dopo progressione di malattia, mostra addirittura una tale differenza a favore del braccio di controllo da avvicinarsi al valore limite di Hazard Ratio per determinarne la superiorità.

Una possibile spiegazione dell'aumentata sopravvivenza nel braccio di controllo potrebbe essere lo squilibrio osservatosi nella percentuale di pazienti responsivi collocati nei due bracci dello studio. Tuttavia, quando considerata in un modello di analisi multivariata, quale il modello di Cox, la risposta al trattamento terapeutico dopo due cicli non può essere considerata come un fattore prognostico indipendente di sopravvivenza.

Un'altra spiegazione che deve essere considerata è la possibile inferiorità anti-tumorale della gemcitabina, utilizzata come singolo agente chemioterapico, rispetto alla combinazione di cisplatino/gemcitabina. A discapito di questa ipotesi vi sono tuttavia il simile tasso di progressione al termine del quinto ciclo e la mancanza di differenza in termini di sopravvivenza libera da malattia tra i due bracci dello studio.

I dati relativi alla seconda e terza linea chemioterapica non sono stati registrati, così che il diverso trattamento dopo la progressione di malattia potrebbe essere una possibile, anche se improbabile, spiegazione per il diverso tasso di sopravvivenza osservatosi dopo progressione di malattia. In alternativa, si potrebbe pensare che un'esposizione più prolungata al cisplatino possa eliminare una maggiore percentuale di cloni neoplastici chemio-sensibili oppure possa rendere la neoplasia meno aggressiva, anche dopo la sospensione del trattamento.

Per quanto riguarda il profilo di tossicità nei due bracci dello studio, non vi è stata evidenza di alcun tipo di tossicità cumulativa o di un peggioramento del profilo di tossicità nel braccio trattato con cinque cicli di cisplatino/gemcitabina.

Nei pazienti affetti da carcinoma polmonare, il "Lung Cancer Symptom Score" si è dimostrato un metodo di valutazione dei sintomi correlati alla malattia di base semplice, attendibile e clinicamente adeguato. In entrambi i bracci dello studio, il trattamento chemioterapico ha condotto, in un elevato numero di pazienti, ad un rapido ed evidente miglioramento dei sintomi legati alla patologia neoplastica, anche se non statisticamente significativo.

In conclusione, lo studio non è riuscito a sostenere l'ipotesi che un approccio tradizionale, basato sulla somministrazione di due cicli chemioterapici contenenti un composto del platino, seguito da tre ulteriori cicli di sola

gemcitabina possa essere considerato clinicamente equivalente (non inferiore) rispetto al regime terapeutico standard. Nonostante l'uguale sopravvivenza libera da malattia, una superiorità non statisticamente significativa in termini di sopravvivenza complessiva è stata osservata nel braccio di controllo, trattato con cinque cicli di cisplatino/gemcitabina, sia nel corso dell'analisi a singola variabile che nel corso di quella multivariata. Basandosi quindi sui risultati di questo studio clinico randomizzato, l'impiego sperimentale di due cicli di cisplatino/gemcitabina seguiti da ulteriori tre cicli di gemcitabina come singolo agente chemioterapico non è raccomandato e questo approccio dovrebbe essere riservato solo ai pazienti con scarsa tollerabilità nei confronti dei composti del platino, specie per quel che riguarda la tossicità non ematologica.

BIBLIOGRAFIA

1. Ardizzoni A., Tiseo M., Boni C.: *CISCA (cisplatin vs. carboplatin) meta-analysis: an individual patient data meta-analysis comparing cisplatin versus carboplatin based chemotherapy in front line treatment of advanced non-small cell lung cancer*. Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 24, 366s, 2006.
2. Belani C.P., Wang W., Johnson D.H., Wagner H., Schiller J., Veeder M., Mehta M.: *Phase III study of the Eastern Cooperative Group (ECOG 2597): induction chemotherapy followed by either standard thoracic radiotherapy or hyperfractionated accelerated radiotherapy for patients with unresectable stage III A and B non-small cell lung cancer*. J. Clin. Oncol. 23, 3760-3767, 2005.
3. Dillman R.O., Seagren S.L., Herndon J., Eaton W.L. Jr, Green M.R.: *Improved survival in stage III non-small cell lung cancer: seven years follow-up of CALGB 8433*. J. Natl. Cancer. Inst. 88, 1210-1215, 1996.
4. Gridelli C., Perrone F., Gallo C., Cigolari S., Rossi A., Piantedosi F., Barbera S., Ferrà F., Piazza E., Rosetti F., Clerici M., Bertetto O., Robbiati S.F., Frontini L., Sacco C., Castiglione F., Favaretto A., Novello S., Migliorino M.R., Gasparini G., Galetta D., Iaffaioli R.V., Gebbia V.: *MILES Investigators: Chemotherapy for elderly patients with advanced non-small cell lung cancer: the Multicenter Italian Lung Cancer in the Elderly Study (MILES) phase III randomised trial*. J. Natl. Cancer Inst. 95, 362-372, 2003.

5. Jemal A., Murray T., Ward E., Samuels A., Tiwari R.C., Ghafoor A., Feuer E.J., Thun M.: *Cancer Statistics*. CA Cancer J. Clin .55, 10-30, 2005.
6. Larsen H., Sorensen J.B., Nielsen A.L., Dombernowsky P., Hansen H.H.: *Evaluation of the optimal duration of chemotherapy in phase II trials for inoperable non-small cell lung cancer (NSCLC)*. Ann. Oncol. 6, 993-997, 1995.
7. Le Chevalier T., Scagliotti G., Natale R., Danson S., Rosell R., Stahel R., Thomas P., Rudd R.M., Vansteenkiste J., Thatcher N., Manegold C., Pujol J.L., van Zandwijk N., Gridelli C., van Meerbeeck J.P., Crino L., Brown A., Fitzgerald P., Aristides M., Schiller J.H.: *Efficacy of gemcitabine plus platinum chemotherapy compared with other platinum containing regimens in advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of survival outcomes*. Lung Cancer 47, 69-80, 2005.
8. Manegold C., Bergman B., Chemaissani A., Dornoff W., Drings P., Kellokumpu-Lehtinen P., Liippo K., Mattson K., van Pawel J., Ricci S., Sederholm C., Stahel R.A., Wagenius G., van Walree N., ten Bokkel-Huinink W.: *Single-agent gemcitabine versus cisplatin-etoposide: early results of a randomised phase II study in locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer*. Ann. Oncol. 8, 525-529, 1997.
9. Non-Small Cell Lung Cancer Collaborative Group: *Chemotherapy in non-small cell lung cancer: A meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomized clinical trials*. BMJ 311, 899-909, 2005.
10. Perng R.P., Chen Y.M., Ming-Liu J., Tsai C.M., Lin W.C., Yang K.Y., Whang-Peng J.: *Gemcitabine versus the combination of cisplatin and etoposide in patients with inoperable non-small cell lung cancer in a phase II randomized study*. J. Clin. Oncol. 15, 2097-2102, 1997.
11. Pfister D.G., Johnson D.H., Azzoli C.G., Sause W., Smith T.J., Baker S. Jr, Olak J., Stover D., Strawn J.R.: *American society of clinical oncology treatment of unresectable non-small cell lung cancer guideline: update 2003*. J. Clin. Oncol. 22, 330-353, 2004.
12. Scagliotti G.V., De Marinis F., Rinaldi M., Crinò L., Gridelli C., Ricci S., Matano E., Boni C., Marangolo M., Failla G., Altavilla G., Adamo V., Ceribelli A., Clerici M., Di Costanzo F., Frontini L., Tonato M.: *Italian Lung Cancer Project Phase III randomized trial comparing three platinum-based doublets in advanced non-small-cell lung cancer*. J. Clin. Oncol. Nov. 1, 20, 4285-4291, 2002.
13. Smith I.E., O'Brien M.E.R., Talbot D.C., Nicolson M.C., Mansi J.L., Hickish T.F., Norton A., Ashley S.: *Duration of chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a randomized trial of three versus six courses of mitomycin, vinblastine and cisplatin*. J. Clin. Oncol. 19, 1336-1343, 2001.
14. Socinski M., Schell M., Peterman A., Bakri K., Yates S., Gitten R., Unger P., Lee J., Lee J.H., Tynan M., Moore M., Kies M.S.: *Phase III trial comparing a defined duration of therapy versus continuous therapy followed by second-line therapy in advanced stage IIIB/IV Non-Small-Cell Lung Cancer*. J. Clin. Oncol. 20, 1335-1343, 2002.
15. World Health Organization: *The WHO Handbook for Reporting Results of Cancer Treatment*. World Health Organization Geneva, Switzerland, 48, 1979.

MEDICI PIEMONTESI NEI PAESI IN VIA DI SVILUPPO: ESEMPI DI SOLIDARIETÀ, FORMAZIONE E PROFESSIONALITÀ

PRESENTAZIONE

Guido Gasparri

SCDU Chirurgia Generale III ed esofagea
AOU San Giovanni Battista - Torino

Nel 2007, quando ero Direttore della SCDU dell'AOU San Luigi di Orbassano, un mio collaboratore, il dott. Stefano Enrico mi chiese l'autorizzazione ad assentarsi per un mese dal reparto per recarsi a lavorare in un Ospedale del Madagascar. Mi chiese anche di aiutarlo a prendere confidenza con parti cesarei indirizzandolo in Clinica Ostetrica perché avrebbe potuto essere una esperienza che poteva tornargli utile. Accondiscesi ben volentieri ed al suo ritorno feci una riunione ristretta con tutti i collaboratori perché potesse illustrarci ciò che aveva visto e fatto. Ne rimasi talmente colpito che pensai di organizzare degli incontri prima alla Società Piemontese di Chirurgia e quindi all'Accademia di Medicina di Torino coinvolgendo anche altri medici e chirurghi che sapevo aver affrontato esperienze analoghe. L'iniziativa ebbe successo tanto che una giornalista del Sole 24 ore, Celestina Dominelli, mi chiese di invitare i partecipanti alla riunione a preparare un breve scritto sulla loro esperienza, cosa che feci con grande piacere. Ed ora grazie proprio alla disponibilità della redazione del Sole 24 ore Sanità (che ha acconsentito alla riproduzione del servizio) quegli articoli pubblicati sul numero del 4-10 novembre 2008, sono offerti alla lettura dei soci dell'Accademia di Medicina.

La prefazione è di Celestina Dominelli e seguono gli articoli di Meo, Olivero, Benedetto, Durando ed Enrico.

MEDICI PIEMONTESI NEI PAESI IN VIA DI SVILUPPO: ESEMPI DI SOLIDARIETÀ, FORMAZIONE E PROFESSIONALITÀ

PREFAZIONE

Celestina Dominelli

(il Sole 24 ore Sanità, 4-10 novembre 2008)

Lo spunto l'ha offerto Guido Gasparri, direttore della III Chirurgia generale universitaria ed esofagea dell'AOU Molinette - S. Giovanni Battista di Torino e socio dell'Accademia di Medicina di Torino. E i membri dell'Accademia, istituita da Carlo Alberto con regio biglietto nel 1842 e oggi presieduta da Nicola Riccardino, hanno subito accolto la proposta. Così, il 18 giugno scorso, l'istituzione torinese ha aperto le porte a una seduta pubblica tutta dedicata alle esperienze di medici piemontesi in Medio Oriente e Africa. «Ci è sembrato il modo migliore – spiega il segretario generale dell'Accademia, Giancarlo Isaia – per inaugurare un nuovo filone socio-economico che ci consentirà di intercettare un pubblico più ampio».

Per un giorno, dunque, l'Aula magna dell'Università di Torino è diventata il palcoscenico ideale per raccontare le esperienze di dottori piemontesi impegnati in aree difficili. Quelle che presentiamo in queste due pagine sono alcune delle storie raccolte dall'Accademia e accomunate da un unico, fondamentale, filo rosso: la passione per il proprio lavoro di tutti i protagonisti. Che raccontano nei vari contributi la loro personalissima declinazione dell'assistenza oltreconfine. Fatta non solo di cure, prevenzione e interventi chirurgici, spesso realizzati in condizioni proibitive, ma anche di sostegno tecnico e specialistico. Che cerca di portare in quelle terre, dal Burundi al Guatemala, dall'Irak al Sudan, la speranza di un destino diverso e migliore. I camici bianchi che si confessano in queste pagine descrivono realtà complesse di popoli prostrati da guerre intestine, di enormi difficoltà logistiche superate grazie all'entusiasmo di operatori e volontari, dell'esperienza che spesso deve supplire all'assenza di strumentazioni. Ma i contributi qui presentati aprono una finestra anche sulla frastagliata realtà delle organizzazioni piemontesi non governative che operano da anni nei Paesi in via di sviluppo. Come il Ccm, il Comitato di collaborazione medica, nato a Torino nel 1968, che nel 1972 ha ottenuto dal ministero degli Affari esteri l'idoneità per la gestione di programmi di cooperazione nei Pvs. L'organizzazione è attualmente presente

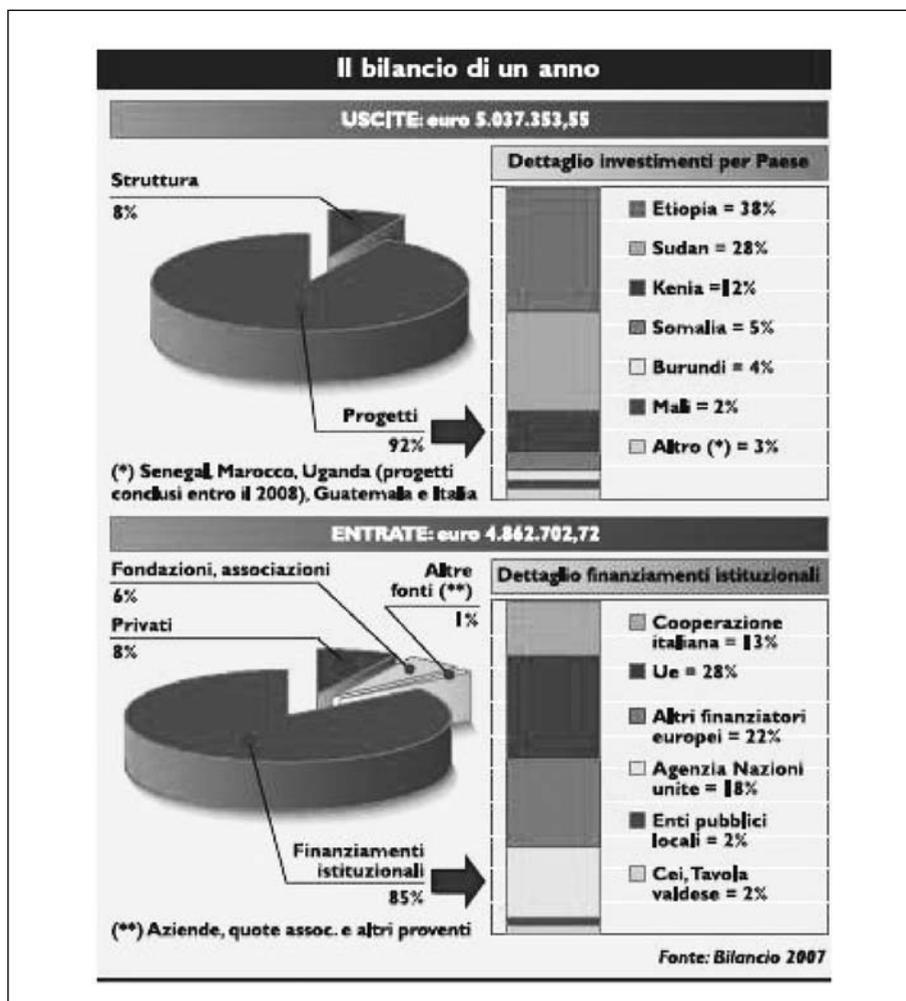
in Burundi, Guatemala, Kenya, Mali, Somalia e Sud Sudan, con 21 progetti sviluppati attraverso il contributo di 300 operatori tra medici, infermieri, tecnici e amministrativi. I numeri del Ccm sono assai interessanti: in un anno, nei sette ospedali e nei 95 centri di salute in cui il comitato opera, sono stati vaccinati 52mila bambini e sono state effettuate 300mila visite ambulatoriali, 2.500 operazioni chirurgiche e 25mila analisi di laboratorio. Ma il Ccm non è l'unica realtà piemontese attiva al di fuori dei confini nazionali. Da una missione di medici piemontesi in Africa è nata infatti nell'ottobre 2005 la Onlus Anemon, che si muove grazie al contributo dei soci fondatori e alle elargizioni di quanti vogliono sostenere i piani dell'organizzazione. Che, accanto ai programmi di sostegno sanitario, cerca di sviluppare anche un'adeguata assistenza tecnica e specialistica. Incentivando poi i donatori a visitare le strutture realizzate da Anemon nel tentativo di creare un turismo solidale che supporti queste realtà. La medicina piemontese oltreconfine ruota però anche attorno a convenzioni ad hoc. Come quella siglata dall'Università di Torino e dal Nazareth Hospital di Nairobi. Che getta luce su un altro elemento strategico del lavoro dei dottori che hanno scelto di partire. Perché la loro esperienza non si esaurisce solo nell'assistenza a chi ha bisogno di cure. Ma passa anche necessariamente, come confermano i racconti ospitati in queste pagine, attraverso programmi di educazione continua. Quello che tecnicamente i dottori definiscono "training on the job": lavorare sì, ma trasmettendo contemporaneamente a medici e infermieri locali tutte le conoscenze necessarie a renderli autonomi. Affinché il personale del luogo sia in grado di replicare poi determinate procedure. Così le partnership con gli ospedali africani o di altre aree diventano l'occasione per lanciare master ad hoc o programmi di formazione per medici&Co. C'è infine un altro, e non meno importante, trait d'union che lega queste storie. Ed è il patrimonio umano che ogni medico porta con sé al suo ritorno. E che rappresenta il migliore compenso per le fatiche e le enormi difficoltà connesse a ogni esperienza. In una delle sue presentazioni, il Ccm ricorda un'affermazione esemplare di Amartya Sen, l'economista indiano, Nobel per l'Economia nel 1998: «Un buon mondo è quello in cui gli sforzi di ciascuno sono indirizzati verso ciò che ha scelto, e non verso ciò che è stato determinato dalla lotteria del destino». Un destino che i dottori piemontesi, presentati in queste pagine, stanno cercando ogni giorno, nel loro piccolo, di cambiare.

I numeri del comitato di collaborazione medica

- In Burundi, Etiopia, Guatemala, Kenya, Mali, Somalia e Sud Sudan il Ccm è attualmente presente con 21 progetti supportati da circa 300 persone tra

medici, infermieri, tecnici e amministrativi di cui 21 in ruoli apicali, 270 in ruoli qualificati e ausiliari

- In un anno nei 7 ospedali e 95 centri di salute primaria in cui il Ccm opera sono stati vaccinati 52.000 bambini e sono state effettuate oltre 300mila visite ambulatoriali, 2.500 operazioni chirurgiche e 25mila analisi di laboratorio
- In 1 anno inoltre il Ccm ha beneficiato di missioni volontarie compiute da 46 persone, medici e tecnici, che in media hanno operato nei Paesi a basso reddito per oltre 30 giorni



- Per la sede di Torino tre persone hanno lavorato volontariamente in ruoli di coordinamento a tempo pieno per 240 giorni annui ciascuno. Altre 25 persone hanno offerto la loro collaborazione a vario titolo per oltre 5mila ore totali
- L'organizzazione si è avvalsa inoltre della collaborazione di 6 volontari del servizio civile, 4 impegnati nel lavoro di sensibilizzazione in Italia, 2 nell'aiuto alla gestione dei progetti in Africa.

**MEDICI PIEMONTESI NEI PAESI IN VIA DI SVILUPPO:
ESEMPI DI SOLIDARIETÀ, FORMAZIONE E PROFESSIONALITÀ**

**L'IMPEGNO DEL CCM:
COSTRUIRE SERVIZI ESSENZIALI A FAVORE DELLE
COMUNITÀ GEOGRAFICHE PIÙ SVANTAGGIATE E REMOTE**

Giuseppe Meo

Consulente chirurgo Comitato di collaborazione medica (Ccm)

Il Comitato collaborazione medica (Ccm) è un organismo non governativo di volontariato internazionale e di cooperazione allo sviluppo che, da 40 anni, attua interventi sanitari in alcuni Pvs. Si tratta di programmi territoriali di medicina “primaria”, curativa e preventiva, di medicina “secondaria” centrata su ospedali rurali ovvero di medicina “terziaria” o specialistica (ostetricia, pediatria e chirurgia di base, controllo di malattie endemiche e di epidemie). Il Ccm con queste tre tipologie di azioni cerca di portare servizi medici essenziali alle comunità più svantaggiate e remote. È una scelta di campo: stare con l’umanità diseredata, quella che vive al di sotto di ogni definizione di dignità umana. Disegnare insieme progetti, collaborare nel realizzarne alcuni frammenti, in una rete semplice di rapporti personali con le comunità. Poi cerchiamo prioritariamente di far crescere il nostro personale, promuovendo l’istruzione scolastica e professionale “sul lavoro”. Un terzo principio operativo è la scelta di una tecnologia povera per dare dignità alla povertà materiale locale. Il cuore della nostra azione è il lavoro medico sul campo, lo stare vicino alla gente, gli atti concreti del curare, la condivisione, anche se limitata nel tempo, delle tribolazioni e dei pericoli che loro vivono ogni giorno. Questa prossimità ci assimila e ci dà capacità di ascolto, che poi diventa rispetto della dignità delle persone. Siamo di fronte al più grande genocidio della storia umana. Un campo di sterminio permanente. Nessuna calamità naturale, nessuna guerra, nessuna pandemia ha mai mietuto tante vittime quante la fame e la povertà nei Paesi in via di sviluppo (Pvs). Non possiamo fingere di non sapere. Il direttore di Lancet, Richard Norton, ha detto recentemente: «Bambini e donne stanno morendo perché coloro che hanno il potere di prevenire quelle morti hanno scelto di non agire. Questa indifferenza è il tradimento della nostra speranza in una società più giusta. Come operatori sanitari non dobbiamo accettare questa mancanza di rispetto della vita umana». Milioni di crocifissi viventi

oppongono la loro sofferenza ai nostri progressi medici. Che cosa fare di fronte a questo martirologio infinito? La compassione non è sufficiente. Tuttavia, perché dovremmo aiutare queste persone straniere e lontane? La risposta è “l’imperativo categorico”, l’appello evangelico e universale al soccorso dell’altro. È la meraviglia dell’alterità, dell’estraneità. È l’altro, lo straniero, il lontano, il prossimo del buon samaritano, che ci interpella. Ha bisogno di noi, come noi inconsciamente abbiamo bisogno di lui. Perché per ignorare questa povertà silenziosa, dovremmo rimuoverla. Il dramma della povertà risulta così grande che nulla di utile pare fattibile. Il compito di sradicare la povertà, prima causa della tragedia sanitaria dei Pvs, potrà derivare soltanto da una azione politica internazionale. Nulla di radicale è fattibile dal singolo o da gruppi. Quindi una solidarietà generalizzata è sterile. Nessuna solidarietà può essere universale. Attenzione, però: questo corrisponde esattamente alla impossibilità ad avere per amici tutti gli uomini. Ma avere per amici, oltre alle persone vicine, altre lontane e avere una seconda patria elettiva, lontana, significa dare concretezza alla solidarietà e, nello stesso tempo, ampliare il proprio universo. Avere una sola cultura è meno ricco che avere più culture. Avere molteplici fedeltà, conoscere lingue e costumi arricchisce il proprio patrimonio di conoscenze. Sono amico dell’uomo soltanto quando ne aiuto qualcuno. La solidarietà seria è un’azione che deve essere portata là dove serve, focalizzata in aree geografiche e sfere di relazioni umane circoscritte. Allora fare volontariato in Africa vuole dire andare a soccorrere l’Altro, il nostro prossimo lontano, là dove lui vive.

**MEDICI PIEMONTESI NEI PAESI IN VIA DI SVILUPPO:
ESEMPI DI SOLIDARIETÀ, FORMAZIONE E PROFESSIONALITÀ**

LA FORMAZIONE “LEVA” DELLA COOPERAZIONE

Giorgio Olivero

Professore Associato di Chirurgia
Dipartimento Discipline Medico-Chirurgiche - Università degli Studi di Torino

Dal 2000 è in vigore una convenzione tra l'Università di Torino e il Nazareth Hospital, situato in una splendida posizione a 1.850 metri di altitudine, circondato dalle colline del caffè e del tè a Nord-ovest di Nairobi. A pochi chilometri di distanza sorgono due grossi centri agricoli: Banana Hill, cresciuta in maniera vorticoso e disordinata, in cui la disoccupazione raggiunge il 70% e Limuru, caratterizzata da sentieri in terra rossa battuta e situata sulle prime pendici della Rift Valley. Kibera e Koroghocho, le grandi baraccopoli di Nairobi sono lontane. Non lontane sono le problematiche degli slum. Miseria, stato di salute precario (l'Africa è un continente malato: il 30% della popolazione è affetto da Aids, tubercolosi e malaria), elevata mortalità, delinquenza imperversano anche nel paesaggio paradisiaco intorno al Nazareth Hospital. Numerose sono le aggressioni notturne lungo la strada che dall'ospedale scende verso Nairobi. Non infrequente è l'accesso in Ps di pazienti feriti da colpi di machete, in seguito a car-jacking. L'ospedale, fondato nel 1964 dalle suore della Consolata, è attualmente amministrato da una congregazione di suore indiane ed è dotato di 180 letti e di un centro per la prevenzione e il trattamento dei malati di Aids, considerato il migliore del Kenya. Il complesso operatorio include un ambulatorio di endoscopia che si avvale di strumenti forniti dall'Università di Torino, una sala per piccoli interventi, la “day surgery” e due sale principali, una con 2 letti, per far fronte a un'eventuale urgenza, in genere un cesareo, durante la normale seduta operatoria. Le camere operatorie non sono oscurate, per consentire un po' di illuminazione in caso di blackout energetico. L'ospedale è fornito di generatore che si attiva qualche minuto dopo la scomparsa della corrente. Capita non infrequentemente di dovere condurre un intervento chirurgico con la sola luce solare o, di notte, con una torcia elettrica puntata sul campo da un infermiere. Non ci sono anestesisti, ma tre tecnici di anestesia, molto esperti e abituati a operare in condizioni ben diverse da quelle a cui siamo abituati. Non

essendo disponibili monitor, il paziente durante l'intervento viene controllato in base a semplici rilievi clinici. Ogni anno vengono eseguiti 1.500 interventi "maggiori", tra cui circa 650 cesarei. In ambulatorio afferiscono in media 160 pazienti al giorno e sono prenotati gli interventi chirurgici di elezione, ma molto spesso il paziente non si presenta nel giorno stabilito, perché non riesce a reperire i pochi soldi richiesti per il ricovero. Il pronto soccorso è attivo 24 ore su 24. Anche di notte è possibile eseguire radiografie. L'unico tecnico dell'ospedale vive nel compound ed è reperibile 365 giorni all'anno.

L'insegnamento e l'addestramento devono costituire un obiettivo prioritario di un progetto di cooperazione, al fine di innescare un processo di autosviluppo, che consenta l'autonomizzazione professionale di medici, tecnici e infermieri che operano nei Paesi in via di sviluppo. Nell'ambito della convenzione, è stato elaborato un sistema didattico "hub and spoke", nel quale il Nazareth Hospital funge da centro propulsivo e provvede alle esigenze formative degli ospedali periferici. Il progetto è interamente finanziato da Comdata, azienda torinese, che ha costruito, all'interno del compound, un training center, fornito delle attrezzature più moderne, un college che ospita 96 allievi e un centro congressi.

Nel 2006 è stato avviato un master in Infermieristica, rivolto a 40 allievi, provenienti da tutto il Kenya e successivamente il Nursing council ha approvato l'istituzione di una scuola per infermieri. È evidente l'importanza di fornire professionalità qualificata agli infermieri in un Paese nel quale, per i proibitivi costi di iscrizione all'Università, i medici sono pochissimi. Il progetto include anche programmi di educazione continua, rivolti ai medici e agli infermieri dell'ospedale, "training on the job" per chirurghi e ginecologi, addestrati da docenti universitari kenioti e italiani, corsi intensivi teorico-pratici sulle urgenze mediche, chirurgiche e traumatologiche, basati sulle linee guida internazionali e rivolti a personale sanitario di dispensari e ospedali rurali e stage formativi di chirurgia tropicale per specializzandi italiani, stimolati a utilizzare e affinare le conoscenze cliniche, a causa della carenza di mezzi diagnostici sofisticati.

Il mese scorso abbiamo inaugurato l'unità di terapia intensiva, con 4 posti-letto, collegata al blocco operatorio. La rianimazione consente di superare la principale criticità dell'ospedale: il trattamento dei pazienti con problemi chirurgici complessi che non potevano essere operati per l'impossibilità di garantire un adeguato monitoraggio post-operatorio.

**MEDICI PIEMONTESI NEI PAESI IN VIA DI SVILUPPO:
ESEMPI DI SOLIDARIETÀ, FORMAZIONE E PROFESSIONALITÀ**

**SE LA MISSIONE SANITARIA DIVENTA LA SPERANZA
PIÙ IMPORTANTE PER UN POPOLO
PROVATO DA UNA GUERRA LUNGA E DEVASTANTE**

Giuseppe Benedetto

AOU San Giovanni Battista - Torino

Nei mesi di gennaio e febbraio del 2004 ho preso parte, con la Croce Rossa Militare Italiana, a una missione a Baghdad (Iraq) per un periodo di 45 giorni. Il nostro contingente (VIII) era composto da 35 persone: 5 medici, 11 infermieri, 2 tecnici sanitari, 1 biologo, 6 amministrativi e 10 addetti ai servizi. L'obiettivo della missione era quello di offrire assistenza sanitaria assolutamente gratuita alla popolazione irachena che ne faceva richiesta. La Cri era ospitata presso un ospedale relativamente moderno (11 piani), ubicato nella parte della città di libero accesso alla popolazione locale, esternamente alle basi delle truppe americane, in un'area ricca di strutture sanitarie ("Medical City"), di cui utilizzavamo un piano e un seminterrato. Oltre a 5 camere di degenza (20 posti letto) potevamo disporre di una sala operatoria, di ambulatori, di sale per le visite e medicazioni, di un laboratorio, di una sala radiologica, di alcuni locali per l'amministrazione e di locali di servizio per il personale (cucina, refettorio, dormitorio). Le strutture sanitarie locali funzionavano regolarmente, secondo le loro abitudini: un misto tra assistenza pubblica e privata.

Nelle altre strutture dello stesso ospedale si svolgeva normale attività assistenziale e operavano vari reparti specialistici. La Cri aveva assunto e stipendiava personale iracheno (medici, infermieri, ausiliari, traduttori e personale della sicurezza) che collabora alla gestione dell'ospedale.

I motivi che spingevano la popolazione irachena a rivolgersi al nostro centro di assistenza erano in parte legati a fattori economici e in parte legati al trattamento di patologie che richiedevano un grosso impegno medico-assistenziale (ustioni, interventi chirurgici) o terapie complesse con l'eventuale possibilità del trasferimento in Italia per un certo periodo (malformazioni, neoplasie).

L'attività assistenziale si svolgeva dalle 8,30 alle 18,00 circa. Dopo tale orario la popolazione, per motivi di sicurezza, rientrava nelle proprie abitazioni

o ritornava nelle zone da cui proveniva, così come il personale sanitario locale. Una delle principali attività era rappresentata dall'assistenza e dal trattamento dei pazienti ustionati che, per gravità ed estensioni delle lesioni richiedevano uno sforzo veramente notevole, sia per quanto riguarda il materiale sanitario sia per il tempo e il personale impiegato.

Altre attività erano:

- la sala operatoria con interventi di chirurgia plastica (innesti di cute, correzione, exeresi) e di chirurgia generale (laparotomia esplorativa, appendicectomie, plastica di ernie e laparoceli, rimozione corpi estranei, exeresi di lipomi e neoformazioni);
- gli ambulatori specialistici;
- la costituzione di una commissione che valutava casi clinici da proporre per un eventuale trasferimento temporaneo in Italia per il loro trattamento.

Il personale sanitario locale si è sempre dimostrato molto ben disposto verso di noi, attraverso una pazienza e un impegno costanti. Ho avuto modo di collaborare, in particolare, con un collega chirurgo con il quale è nata una solida amicizia. I pazienti sono sempre stati "pazienti", spesso sopportando lunghe attese, fiduciosi nell'operato del personale sanitario e disposti ad accettare le soluzioni proposte. Credo che questa mia esperienza possa essere riassunta con due considerazioni.

Innanzitutto non credo che la nostra missione abbia sostanzialmente migliorato la qualità assistenziale del popolo iracheno, ma penso sia stato importante essere presenti per dare una speranza e un aiuto a questo popolo provato da una guerra che ha dovuto subire. D'altro canto chiunque di noi partecipi a una missione di questo tipo si arricchisce di una grande esperienza, umana e personale più che tecnico-sanitaria, che lo accompagnerà per tutto il resto della propria vita.

**MEDICI PIEMONTESI NEI PAESI IN VIA DI SVILUPPO:
ESEMPI DI SOLIDARIETÀ, FORMAZIONE E PROFESSIONALITÀ**

**QUANDO LA FORZA DI VOLONTÀ DI UN GRUPPO
DI DOTTORI E TECNICI SI TRASFORMA NEL MOTORE
DI UN'ORGANIZZAZIONE SPECIALIZZATA
NELLE CURE AI DIMENTICATI**

Riccardo Durando

Vice-presidente Anemon Onlus
SOC Chirurgia Generale - Ospedale di Casale Monferrato

All'inizio del 2000 fui contattato dai Frati Cappuccini piemontesi per un aiuto professionale nella realizzazione di un ospedale in una loro missione in Africa. Quell'occasione ha permesso il formarsi di un gruppo molto affiatato di tecnici, medici e semplici volontari. L'esperienza maturata non poteva andare dispersa e quindi, terminata la realizzazione e l'avviamento del primo progetto, ci siamo dati una veste giuridica in Anemon. La onlus non ha costi di struttura organizzativa fissa (sede, segreteria ecc.), i soci fondatori mettono a disposizione le proprie risorse logistiche professionali. L'attività è svolta esclusivamente da volontari senza alcuna retribuzione o rimborso spese ed effettuata nel tempo libero. I fondi derivano da elargizioni liberali da parte di persone che conoscono il nostro lavoro e il nostro modus operandi. I nostri progetti hanno sempre un referente locale italiano, che per noi è garanzia della corretta destinazione finale degli aiuti e dei rapporti con le autorità locali. Normalmente è un religioso ma non siamo legati da scelte politiche o religiose. In questi Paesi è importante l'assistenza medica, ma senza un'adeguata assistenza tecnica specialistica e di manutenzione gli sforzi sarebbero vanificati ed è per questo che Anemon è nata con un gruppo di tecnici, ingegneri, tecnici di gas medicali, che curano e sviluppano questi aspetti.

In Madagascar abbiamo raccolto l'invito di un padre gesuita missionario nel Sud-est del Paese per aiutarlo nella conduzione di un piccolo ospedale. In collaborazione con altri gruppi coordiniamo l'invio di medici specialisti, fornitura di materiale e attrezzature e progetti di intervento tecnico. Per quanto riguarda la ristrutturazione sono stati effettuati dei primi interventi urgenti sugli impianti elettrici e dei gas medicali per la sicurezza dei malati e degli operatori. Il secondo punto che svilupperemo quest'anno sarà fornire

dell'acqua potabile e incrementare la potenza elettrica. In ultimo interverremo sul miglioramento del blocco operatorio e nella diagnostica sempre nell'ottica di fornire strumenti idonei, di facile manutenzione adeguati alla realtà locale.

Queste attività sono coperte attraverso il volontariato puro e, come è intuibile, il Madagascar è particolarmente impegnativo a causa della distanza e della difficoltà a trovare tecnici e personale sanitario disposto a dedicare tre, quattro settimane delle proprie ferie per un lavoro tutt'altro che riposante. Si lavora anche 12 ore al giorno con temperature molto elevate, quasi sempre in urgenza su patologie che ci portano a intervenire anche su casi che da noi, ormai, si vedono solo sui testi di medicina. La diagnostica non è supportata dalla tecnologia a cui siamo abituati in Italia e il medico deve usare tutta la sua esperienza e il buon senso. Nonostante tutto continuiamo ad avere adesioni ai progetti, e i volontari, che rientrano con grande entusiasmo da questa piccola dignitosa realtà, trasmettono la voglia di andare o di dare un contributo. Negli ultimi due anni si sono alternati una cinquantina di medici specialisti piemontesi e della Valle d'Aosta: chirurghi, anestesisti, ginecologi, oculisti, dentisti... accompagnati da strumentisti, capo sala, volontari ecc., che in ogni missione hanno dato un contributo per la formazione del personale locale.

**MEDICI PIEMONTESI NEI PAESI IN VIA DI SVILUPPO:
ESEMPI DI SOLIDARIETÀ, FORMAZIONE E PROFESSIONALITÀ**

**IL SORRISO DEI MALATI È IL MIGLIOR COMPENSO:
OGNI VIAGGIO È UNICO E PORTA CON SÉ LA SCOPERTA
DI GENTI E LUOGHI DIVERSI**

Stefano Enrico

AOU San Luigi Gonzaga - Orbassano (To)

La mia esperienza di chirurgia nei Pvs nasce nel 1997. Era da tempo che ci pensavo, ma in maniera astratta. Poi vidi il filmato di un amico e collega che era stato in Sudan, rimasi colpito dal suo racconto e decisi di contattare il Ccm (Comitato di collaborazione medica) di Torino per avere maggiori informazioni. Fu questione di un mese e partii anch'io, dedicandovi un mese di ferie (il primo...). Le aspettative erano tante, sia per me sia per il mio lavoro. Per la prima volta si poneva il problema di lavorare non solo in un ambiente difficile, se non decisamente ostile (il Sudan meridionale era allora in guerra con il governo di Karthoum, quella guerra dimenticata dal mondo occidentale che in circa 25 anni fece qualche milione di vittime), ma anche senza gli strumenti e le agevolazioni presenti in una nostra sala operatoria. Da un lato il fascino del viaggio, il vedere un Paese con gli occhi di chi ci vive, lo stesso vivere delle loro poche cose era uno stimolo ad affrontare questa esperienza. Dall'altro c'erano le aspettative dei pazienti, di gente lontana che riponeva infinite speranze nella nostra medicina, nel nostro intervento. Infine c'era il mettere alla prova quanto avevo faticosamente imparato negli anni di lavoro in condizioni estreme, nonchè l'essere responsabile, stavolta in prima e unica persona, di successi e possibili insuccessi. E questo è ancora adesso, ogni volta, anche dopo diverse missioni in differenti Paesi. La prima difficoltà e impegno è sempre nel pianificare la missione: si verifica il materiale, si cerca di recuperare quello che manca, si pianifica il più possibile l'attività, si pensa agli imprevisti, si mette insieme una équipe di lavoro che dovrà funzionare a dovere a migliaia di chilometri da ogni usuale punto di riferimento. E poi il viaggio: ogni volta è unico, irripetibile, tutto da vivere, con la scoperta di genti e luoghi diversi, di modi di vivere così differenti dal nostro e con piccole abitudini

così uguali dappertutto. All'arrivo è sempre una sorpresa, ma il sorriso di una persona che ti aspetta o che rivedi dopo anni ti dice che quello che stai facendo è giusto, e ti ripaga dei disagi e della fatica.

L'attività nei primi giorni è frenetica. L'équipe di lavoro si deve integrare rapidamente con il personale locale, le cui abitudini sono per forza differenti dalle nostre. Essenziali l'inventario del materiale e la preparazione della sala operatoria: spesso il personale non ha esperienza e va aiutato anche in cose elementari. Decine sono i pazienti da visitare, la selezione è difficile e va fatta accuratamente: un errore di valutazione può portare a una difficoltà operatoria non superabile, e l'errore in queste condizioni di lavoro può non essere rimediabile. Nel giro di 2-3 giorni si inizia a operare, ed è fondamentale coinvolgere e insegnare le tecniche, almeno quelle più semplici, al personale locale. "Training on the job" significa lavorare, ma allo stesso tempo insegnare a lavorare, per rendere il più possibile autonomi i pochi medici presenti nelle strutture, almeno nell'affrontare le patologie chirurgiche più semplici e frequenti. Le difficoltà sembrano a volte insormontabili, poi si impara e ci si rende conto che molto si può fare, purchè si sfruttino adeguatamente abilità tecniche, preparazione medica, capacità di pianificare ma anche di improvvisare di fronte all'imprevisto (operare senza elettricità e tutti i conseguenti macchinari cui siamo abituati può sembrare impossibile, ma poi si scopre che non è così). Alle difficoltà tecniche si aggiungono ovviamente quelle personali, dovute alla lontananza da casa, alla mancanza di comunicazioni, semplicemente al vivere in un ambiente ostile (in zona di guerra non è propriamente semplice anche solo fare una passeggiata, e la limitazione della libertà personale è a volte veramente pesante). I giorni passano veloci e lenti allo stesso tempo: il lavoro è tanto e le giornate sembrano non finire mai, ma poi ti rendi conto, quasi con stupore, che il tempo è volato e si avvicina l'ora di partire. Gli interventi diventano più semplici (è buona norma non lasciare possibili complicazioni a chi resta), il tempo libero aumenta un po' e con esso la mente va al lavoro svolto: si apprezzano gli esiti positivi e si valutano le complicità, gli errori e le possibilità di miglioramento, che ci sono sempre. Poi, il giorno della partenza, vedi una donna che hai operato, vedi gli occhi profondi e imperscrutabili di un uomo che guardano dentro di te ed esprimono un giudizio che viene dal tempo: un sorriso o un piccolo cenno con la testa, e tu sai che quello che hai fatto era quello che andava fatto, cresci un po' e sai che ritornerai a quella terra e da quella gente.

L'OSTEOIMMUNOLOGIA: RELAZIONE FRA IL SISTEMA IMMUNE E L'OSSO

*Roberto Pacifici¹, Valentina Paganin²,
Patrizia D'Amelio², Giovanni Carlo Isaia².*

¹ Division of Endocrinology, Metabolism and Lipids
Department of Medicine - Emory University of Atlanta

² Dipartimento di Discipline Medico Chirurgiche - Università degli Studi di Torino

Key words: *Osteoclastogenesis / Osteoclastogenesi*
RANKL / RANKL
T cells/ Linfocita T
Estrogen / Cellule estrogeni
PTH / PTH

Abstract:

Estrogen plays a fundamental role in skeletal growth and bone homeostasis. Estrogens have direct effects on bone cells; recent animal studies have identified additional unexpected regulatory effects of estrogen at the level of the adaptive immune response. Furthermore, a potential role for reactive oxygen species has now been identified in both humans and animals. One major challenge is the integration of a multitude of redundant pathways and cytokines, each apparently capable of playing a relevant role, into the comprehensive model of postmenopausal osteoporosis. Estrogen deficiency leads to an increase in the immune function, which culminates in an increased production of TNF by activated T cells. Increased T cell production of TNF is induced by estrogen deficiency via a complex mechanism mediated by antigen-presenting cells and involving the cytokines IFN- IL-7, and TGF.

Estrogen prevents bone loss by regulating T cell function and immune cell bone interactions.

Also the parathyroid hormone (PTH) play an important role in the bone catabolism by targeting bone marrow (BM) stromal cells (SCs) and their osteoblastic progeny. Here we show that a continuous infusion of PTH that mimics hyperparathyroidism fails to induce osteoclast formation, bone resorption, and cortical bone loss in mice lacking T cells. T cells provide proliferative and survival cues to SCs and sensitize SCs to PTH through CD40 ligand (CD40L), a surface molecule of activated T cells that induce CD40 signaling in SCs. As a result, deletion of T cells or T cell-expressed CD40L blunts the bone catabolic activity of PTH by decreasing bone marrow SC number, the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)/OSTEOPROTEGGERIN (OPG)

ratio, and osteoclastogenic activity. Therefore, T cells play an essential permissive role in hyperparathyroidism as they influence SC proliferation, life span, and function through CD40L. T cell-SC crosstalk pathways may thus provide pharmacological targets for PTH-induced bone disease.

Riassunto:

Gli estrogeni svolgono un ruolo fondamentale nel mantenere l'omeostasi dello scheletro: sia in modo diretto, sia mediante la regolazione del sistema immune. Il legame tra estrogeni ed osso sarebbe uno dei meccanismi alla base dell'osteoporosi postmenopausale, condizione clinica in cui si riscontra una maggiore attività osteoclastogenica e l'attivazione di numerosi pathway citochinici che conducono ad un aumentato riassorbimento osseo. La carenza estrogenica conduce ad un'iperattività del sistema immune e ad un'aumentata produzione di TNF da parte dei linfociti T attivati: il TNF è in grado di aumentare la formazione di osteoclasti (OC) ed il conseguente riassorbimento osseo sia in modo diretto, sia potenziando la sensibilità degli OC verso il fattore osteoclastogenico RANKL. L'aumentata produzione di TNF da parte dei linfociti T, durante il periodo postmenopausale, vede coinvolte le APC (cellule presentanti l'antigene) e diverse citochine quali IFN, IL7 e TGF beta. Gli estrogeni sarebbero in grado di prevenire la perdita di massa ossea regolando la funzione dei linfociti T e la loro interazione con le cellule presenti nel tessuto osseo.

Anche l'ormone paratiroideo (PTH) ha un ruolo importante nel metabolismo osseo: ne promuove il catabolismo agendo sulle cellule stromali (SC) del midollo osseo e sugli osteoblasti (OB). Nel topo privo di linfociti T l'infusione continua di PTH, che mima la condizione clinica dell'iperparatiroidismo, non promuoverebbe la formazione degli osteoclasti(OC) né il riassorbimento osseo corticale.

I linfociti T consentono la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule SC e le sensibilizzano al PTH mediante l'espressione di una molecola di superficie denominata CD40 ligando (CD40 L): nel topo è stato osservato che la perdita dei linfociti T o la mancata espressione del CD40L sono in grado di attenuare l'attività catabolica del PTH per un ridotto numero di SC con riduzione dell'attività osteoclastogenica.

INTRODUZIONE

È noto che alcune condizioni cliniche, associate ad uno stato infiammatorio, quali le infezioni e i disordini autoimmuni, sono associate alla perdita locale e sistemica di massa ossea. Tuttavia solo recentemente è stato riconosciuto il ruolo chiave del sistema immune ed, in particolare, dei linfociti T nella regolazione del metabolismo osseo. Una delle condizioni che si associano più di frequente alla perdita di massa ossea è la carenza estrogenica che si instaura dopo la menopausa: recenti studi sul modello animale ed umano⁽³⁸⁾ hanno messo in evidenza il ruolo degli estrogeni nella regolazione del sistema immune.

La carenza estrogenica sembrerebbe in grado di indurre la produzione da parte dei linfociti T di citochine osteoclastogeniche con aumento della formazione e dell'attività degli osteoclasti (OC), che è responsabile dell'aumentato riassorbimento osseo e, quindi, dell'osteoporosi.

Un altro ormone coinvolto nel metabolismo osseo è l'ormone paratiroideo (PTH): il PTH induce il riassorbimento osseo stimolando la formazione e l'attività degli OC attraverso le cellule stromali del midollo osseo (SC) e gli osteoblasti (OB). Nostri dati recenti suggeriscono che il PTH possa avere un ruolo catabolico mediato dai linfociti T⁽¹¹⁾.

I Linfociti T

I linfociti T originano da cellule staminali ematopoietiche del midollo osseo (BM), da qui migrano nel timo, organo fondamentale per la loro maturazione. Nel timo queste cellule vanno incontro a successive tappe maturative: nelle cellule più immature abbiamo l'espressione del recettore pre-TCR (cellule CD4 e CD8 doppie positive); il passo successivo prevede il riarrangiamento della catena alfa del TCR maturo e nella successiva selezione positiva o negativa (importante per limitare l'autoreattività), dopo la quale sopravvivono cellule naive, CD4 o CD8, che migrano in periferia (fenomeno conosciuto come output timico di cellule T). A partire dalla pubertà il timo va incontro ad atrofia a seguito di modifiche nel microambiente; tuttavia alcuni studi hanno dimostrato che il timo, anche in età avanzata, può riprendere la proliferazione e dare origine a nuovi cloni di cellule T naive⁽¹⁴⁾.

In condizioni fisiologiche contribuiscono a mantenere e rinnovare il pool di cellule T sia l'output timico sia l'espansione clonale periferica dei linfociti: questi due meccanismi possono essere sbilanciati da numerose condizioni morbose (trapianto di midollo, carenza estrogenica) da cui deriva un maggior output timico di cellule T naive e un loro aumento numerico negli organi linfoidi, in periferia⁽¹⁶⁾.

Il timo potrebbe contribuire all'espansione del pool di cellule T che si osserva nella condizione di carenza estrogenica⁽³⁹⁾.

Il midollo osseo ospita cellule T mature con diverse caratteristiche fenotipiche; sia nell'uomo che nel topo le cellule T nel BM rappresentano un 3-8% delle cellule nucleate.

Il BM è l'organo linfoide con il più alto numero di cellule T proliferanti dopo il timo e consente l'attivazione di cellule T naive in risposta a stimoli antigenici, rappresentando una fonte importante di cellule memoria CD4 e CD8.

È stato recentemente dimostrato che l'accumulo di linfociti nel BM sarebbe correlato ad una maggior incidenza di fratture⁽⁸⁾.

Le cellule memoria CD4 e CD8 nel BM verrebbero in contatto con l'antigene, presentato loro dalle cellule dendritiche (DC) residenti nel BM e, in risposta a questa stimolazione antigenica, inizierebbe la produzione delle diverse citochine implicate nell'osteoporosi.

Formazione ed attività degli OC

Gli OC derivano da precursori ematopoietici della linea monocito-macrofagica, la loro proliferazione e sopravvivenza è mediata da fattori solubili e di membrana prodotti dalle SC del BM e dal microambiente (Figura 1).

Tra le citochine richieste per la formazione degli OC sono importanti RANKL e M-CSF, prodotti dalle SC, dagli OB e dalle cellule T attivate.

Il RANKL lega il suo recettore RANK, espresso sulla superficie dei precursori degli OC e negli OC maturi; RANKL è anche in grado di legare l'osteoprotogerina (OPG), un recettore solubile prodotto da numerose cellule ematopoietiche. L'OPG è sequestra il RANKL e previene il suo legame con RANK, agendo quindi come citochina anti-osteoclastogenica^(4,18,22,34,45), M-CSF induce sia la proliferazione dei precursori degli OC che la loro differenziazione; RANKL, invece, non è in grado di agire sulla proliferazione cellulare, ma consente la differenziazione degli OC in forme più mature multinucleate. RANKL è anche capace di attivare OC maturi e stimolare la capacità di tali cellule di riassorbire osso.

Le citochine prodotte dai linfociti T sarebbero responsabili della disregolazione nella formazione degli OC: queste molecole agirebbero, quindi, in senso costimolatorio nel processo d'osteoclastogenesi.

Tra queste troviamo il TNF, in grado di incrementare la formazione degli OC aumentando la produzione di RANKL e M-CSF da parte delle SC e la responsività dei precursori degli OC verso il RANKL^(6,23).

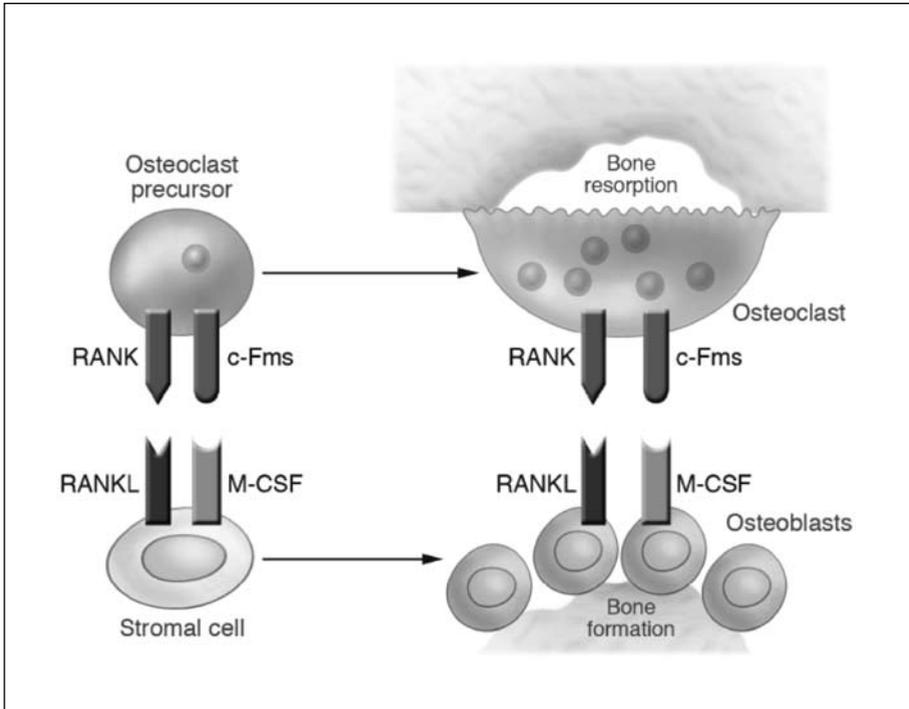


Figura 1. Cellule e citochine responsabili della produzione di OC⁽⁴³⁾.

Il TNF aumenta la responsività al RANKL nei precursori degli OC agendo sulla via di segnale dell'NFkB e dell'AP-1, stimola l'attività degli OC e inibisce l'osteoblastogenesi⁽²⁹⁾, modificando l'equilibrio tra riassorbimento e neoformazione di osso.

L'ovariectomia è in grado di aumentare la produzione di TNF da parte delle cellule T con conseguente aumento degli OC e maggior riassorbimento osseo.

Un'altra citochina molto importante per la formazione degli OC, ed associata alla carenza estrogenica, è IL-7, un potente induttore, *in vivo*, del riassorbimento osso il suo meccanismo d'azione non è ancora completamente noto^(28,40) (Figura 2).

In vivo IL-7 è in grado di stimolare sia la linea linfocitaria B che T, in particolar modo consentirebbe, nel topo, l'espansione delle cellule B (sottopopolazione B220 IGM negative). Non è noto come le cellule B possano essere implicate nel metabolismo osseo, s'ipotizza una loro iper-produzione di RANKL ed un effetto stimolante sulla maturazione degli OC^(25,26).

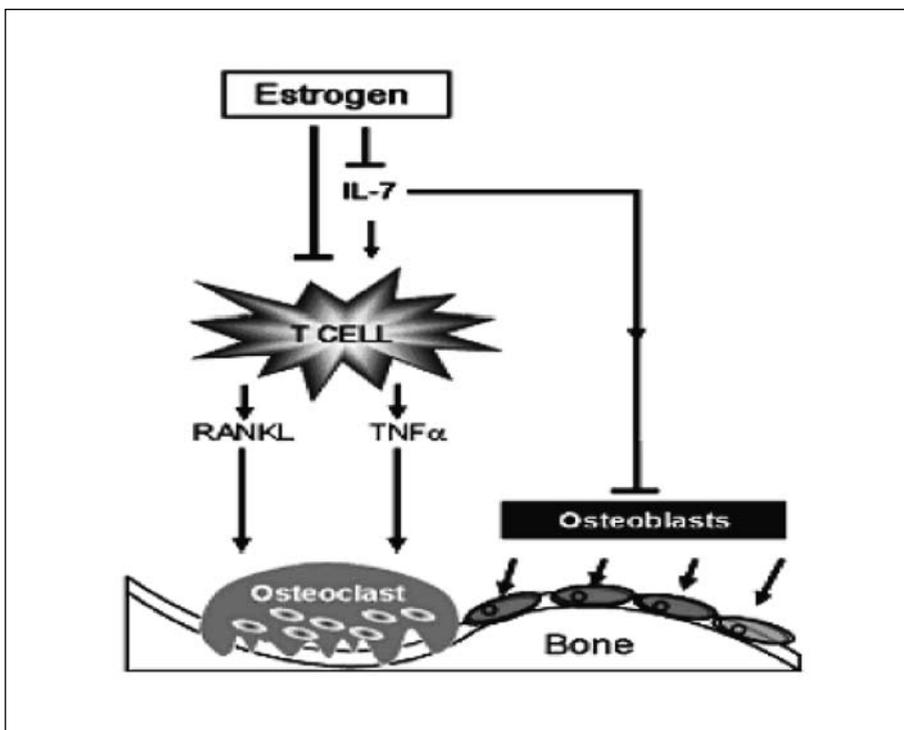


Figura 2. L'aumento di IL-7 indotto dalla carenza di estrogeni comporta una maggiore produzione di RANK-L e TNF alfa da parte delle cellule T con un aumento del numero di OC e una minore formazione di OB⁽³⁵⁾.

Topi IL-7 knock-out mostrano una severa linfopenia mentre topi knock-out per il recettore per IL-7 mostrano un aumento del volume e della densità ossea. Topi transgenici per IL-7 mostrano aree d'osteolisi locale a livello dell'osso corticale ed erosione della superficie ossea. Questi dati suggeriscono che IL-7 potrebbe condurre alla perdita ossea mediante un meccanismo T mediato per un aumento di RANKL e TNF⁽⁷⁾.

Il ruolo di IL-7 nella distruzione ossea, associata alla carenza estrogenica, è evidenziato dal fatto che, se si somministrano anticorpi neutralizzanti, non si realizza la perdita ossea indotta dall'ovariectomia. Inoltre è stato osservato che IL-7 inibisce anche la neoformazione ossea⁽⁴²⁾.

È stato inoltre osservato che la sottopolazione B 220 positiva, che popola il BM ed è in grado di espandersi a seguito della carenza estrogenica. Tale popolazione *in vitro* è in grado di differenziare in OC maturi ed attivi⁽⁴⁰⁾.

IL-7 sarebbe in grado, *in vitro*, di inibire questo processo, mentre *in vivo* possiede capacità pro-osteoclastogeniche⁽²⁶⁾.

Carenza estrogenica e Turn-Over osseo

In menopausa si verifica una fase di accelerata perdita ossea, a cui segue una seconda fase di perdita più lenta nel tempo. Nel rimodellamento osseo è coinvolta l'attività coordinata d'OB e OC all'interno della cosiddetta unità base multicellulare (BMUs). Il processo inizia con l'attivazione di una nuova BMU, gli OC riassorbono l'osso, dopodiché vanno incontro a fenomeni apoptotici, dando inizio alla fase di nuova produzione di osso realizzata dagli OB. Gli effetti biologici indotti dagli estrogeni su organi e tessuti bersaglio sono mediati dall'interazione dell'ormone con un recettore (ER) nucleare di tipo alfa o beta. L'osso e le cellule del sistema immunitario esprimono entrambi i recettori per gli estrogeni, ma l'effetto sull'osso sembra essere mediato dal recettore alfa, presente sugli OB, sugli OC e sugli osteociti, così come sulle SC, sui precursori degli OB e sui linfociti T e B.

La carenza estrogenica comporta l'attivazione di un maggior numero di unità di rimodellamento attivate per unità di tempo: tale fenomeno è dovuto ad un aumento della formazione di OC e ad un loro maggiore reclutamento sulla superficie ossea⁽⁹⁾.

La carenza di estrogeni è anche in grado di prolungare la prima fase di riassorbimento, attraverso una maggiore sopravvivenza degli OC ed una loro ridotta apoptosi. Ne deriva uno squilibrio tra riassorbimento osseo e neoapposizione, con una maggiore apoptosi degli OB e una maggiore produzione di citochine infiammatorie (IL-7 e TNF alfa) che limitano l'attività degli OB^(15,17,20).

Le ricerche sull'osteoporosi post-menopausale mirano a capire quali meccanismi siano responsabili di questa accelerata perdita ossea e come gli estrogeni possano influenzare l'attività degli OC.

È noto che l'osteoclastogenesi indotta dalla carenza estrogenica è mediata dalle citochine. (Figura 3, 4).

Fra queste gioca un ruolo importante il TNF: topi ovariectomizzati e privi del recettore per il TNF non sono soggetti alla perdita ossea e l'utilizzo d'anticorpi anti TNF ha dimostrato, nell'uomo, di prevenire il riassorbimento osseo⁽³³⁾.

L'ovariectomia aumenta i livelli di TNF alfa per una sua aumentata produzione da parte dei linfociti T, tuttavia non è noto se anche l'FSH sia in grado di stimolare direttamente la produzione di TNF da parte dei granulociti

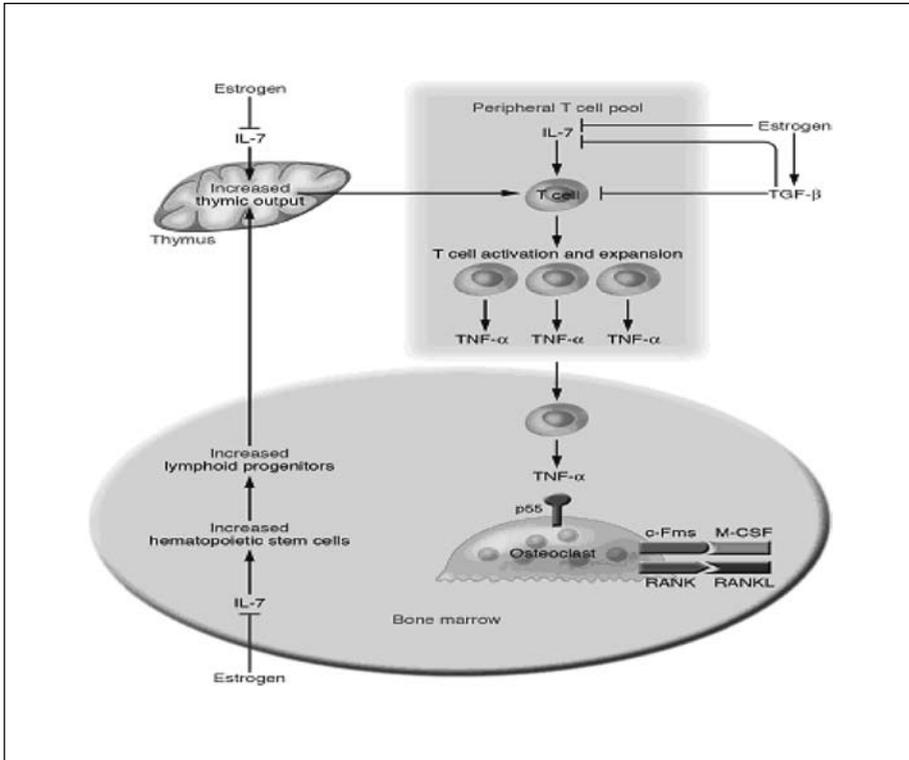


Figura 3. Gli estrogeni sopprimono la produzione di TNF da parte delle cellule T, regolandone la differenziazione e l'attività nel BM, nel timo e negli organi linfoidi periferici. Nel BM gli estrogeni diminuiscono il numero delle SC attraverso un meccanismo mediato da IL7 e regolano l'attivazione delle cellule T⁽⁴³⁾.

del midollo osseo e dei macrofagi. Le cellule T rappresentano la sorgente principale di TNF, direttamente sotto il controllo degli estrogeni, mentre i granulociti e i macrofagi produrrebbero TNF sotto l'azione dell'FSH.

Le cellule T con fenotipo CD3/CD56+ sono quelle maggiormente implicate nella produzione di TNF e un trattamento con gli estrogeni è in grado di diminuire la loro attività e il loro numero⁽¹⁾.

Nel BM l'ovariectomia induce l'attivazione, la proliferazione ed una maggiore sopravvivenza delle cellule T grazie ad un'aumentata presentazione antigenica promossa dai macrofagi e dalle DC. Infatti, la carenza estrogenica, è in grado da un lato di aumentare l'espressione di MHCII e CD 80 nei macrofagi e nelle DC, dall'altro conduce ad un processo di autoreattività delle cellule T verso peptidi self con un aumento del pool di cellule effettrici CD4.

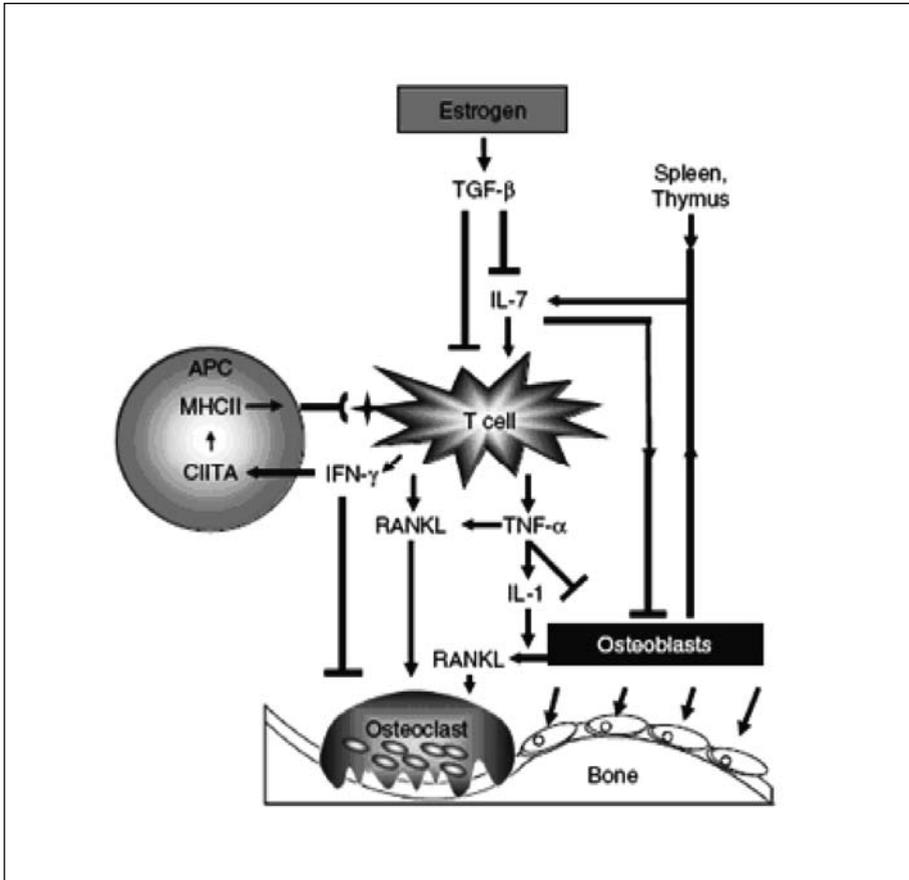


Figura 4. Cellule e citochine rilevanti per il riassorbimento osseo⁽⁴⁴⁾.

L'ovariectomia sarebbe in grado di aumentare la reattività delle APC verso antigeni self piuttosto che stimolare la produzione di nuovi antigeni⁽¹²⁾.

Ne deriva una maggiore reattività delle cellule T verso antigeni endogeni.

Le cellule T autoreattive presentano un TCR diretto contro antigeni non presentati nel timo, ciò conduce ad una mancata selezione negativa nel processo maturativo e la loro proliferazione nei tessuti linfoidi periferici⁽³⁷⁾.

La proliferazione di T autoreattivi, indotta dalla carenza estrogenica, vede implicato il gene CIITA, un fattore di trascrizione per l'MHC di classe II, la cui espressione è regolata dall'IFN gamma⁽⁵⁾ (Figura 5).

Nei topi ovariectomizzati una maggiore produzione d'IFN gamma da parte dei linfociti T conduce ad un'aumentata espressione del CIITA a livello dei

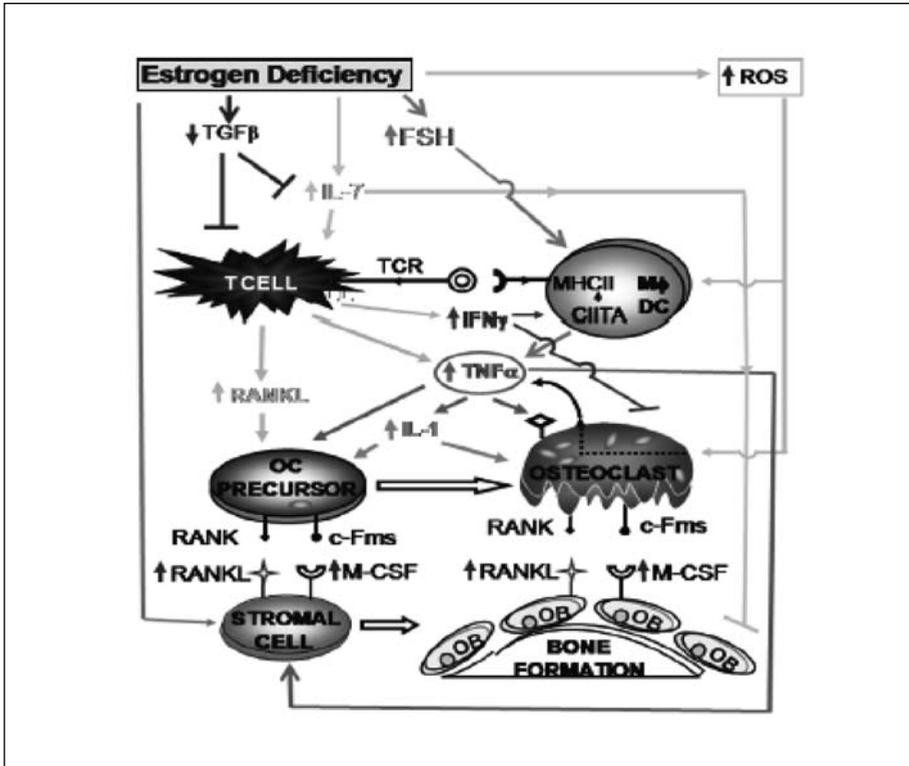


Figura 5. La perdita di osso indotta dagli estrogeni è dovuta sia all'azione diretta di questi sull'osso, sia dell'aumento dell'FSH: quest'ultimo è responsabile di una maggiore produzione di TNF da parte dei macrofagi e dei granulociti. Le cellule T attivate rilasciano IFN gamma che stimola le DC ed i macrofagi a presentare Ag. Infine la carenza estrogenica conduce ad un aumento dei ROS (specie reattive dell'ossigeno), anch'essi implicati nella maggiore presentazione antigenica e nella maggiore produzione di TNF. Tutti questi meccanismi conducono alla produzione di citochina osteoclasto genetica e alla perdita di massa ossea che si osserva in menopausa⁽³²⁾.

macrofagi mentre topi privi del recettore per l'IFN gamma non sviluppano perdita di massa ossea in carenza di estrogeni^(2,4,36).

La carenza estrogenica diminuisce la produzione del TGFβ, un potente repressore dei linfociti T: studi condotti sui topi hanno dimostrato che l'aumento sistemico di tale citochina avrebbe un ruolo protettivo contro la perdita ossea indotta dall'ovariectomia. Tale diminuzione conduce all'aumento dell'interleuchina 7, i cui livelli risultano essere notevolmente aumentati nel topo ovariectomizzato. IL-7 sembrerebbe coinvolta nel maggior output timico di cellule T che si osserverebbe in menopausa, quale sorgente di cellule T autoreattive.

Infine è stato recentemente scoperto che l'azione dei ROS (Specie Reattive dell'ossigeno) potrebbe avere un ruolo importante nella perdita di massa ossea in menopausa: gli estrogeni avrebbero un ruolo protettivo grazie alla produzione di NO (ossido nitrico, molecola che funziona come agente antiossidante)⁽²⁴⁾.

I ROS determinerebbero un danno cellulare a seguito dell'ossidazione di proteine, lipidi e acidi nucleici.

Gli OC sembrerebbero in grado di generare e, a loro volta, attivarsi in presenza dei ROS; le specie reattive dell'ossigeno sarebbero anche in grado di stimolare le DC nella presentazione dell'antigene. Gli antiossidanti, invece, inibiscono la differenziazione delle DC e l'attivazione delle cellule T, sopprimendo l'espressione dell'MHCII e delle altre molecole costimolatorie in risposta all'antigene (Figura 5).

Ruolo del PTH Nell'Osteoclastogenesi

La somministrazione continua di PTH è in grado di incrementare il numero e l'attività degli OC ed il riassorbimento osseo. L'attività biologica del PTH si esplica mediante il legame con il suo recettore (PTH-R) espresso nelle SC del midollo osseo e negli OB. L'effetto catabolico del PTH è, almeno in parte, dovuto ad una maggiore produzione di RANKL e M-CSF, ad una minore produzione d'OPG da parte delle SC e degli OB.

In un recente lavoro⁽¹¹⁾ abbiamo valutato l'ipotesi secondo la quale i linfociti T si comporterebbero come cellule in grado di incrementare la capacità delle SC e degli OB nel supportare l'osteoclastogenesi indotta dal PTH (aumentando la sopravvivenza degli OC e la produzione citochinica) tramite il sistema CD40L/CD40 (Figura 6).

In particolare abbiamo messo in evidenza che i topi nudi, cioè privi di linfociti T, sono protetti dalla perdita di osso indotta dalla somministrazione continua di PTH. Questo suggerisce che i linfociti T hanno una funzione regolatoria nel microambiente midollare e sono implicati nella risposta osteoclastogenica al PTH. Questa risposta è indotta dal legame del PTH al suo recettore sulle SC mentre i linfociti T, attraverso la molecola CD40L, interagiscono con il CD40 espresso sulle SC potenziando la capacità osteoclastogenica.

Il PTH induce l'espressione di CD 40 sulle SC in presenza di linfociti T, ma non aumenta l'attivazione dei T. Inoltre si è dimostrato che il PTH agisce su tutti i linfociti T e non su una sottopopolazione linfocitaria specifica.

Il trapianto di tumori che producono PTH e/o PTHrP in topi nudi stimola il riassorbimento osseo anche in assenza di cellule T nell'ospite^(13,27), questa apparente discrepanza con i dati riportati è spiegabile con il fatto che nei tumori

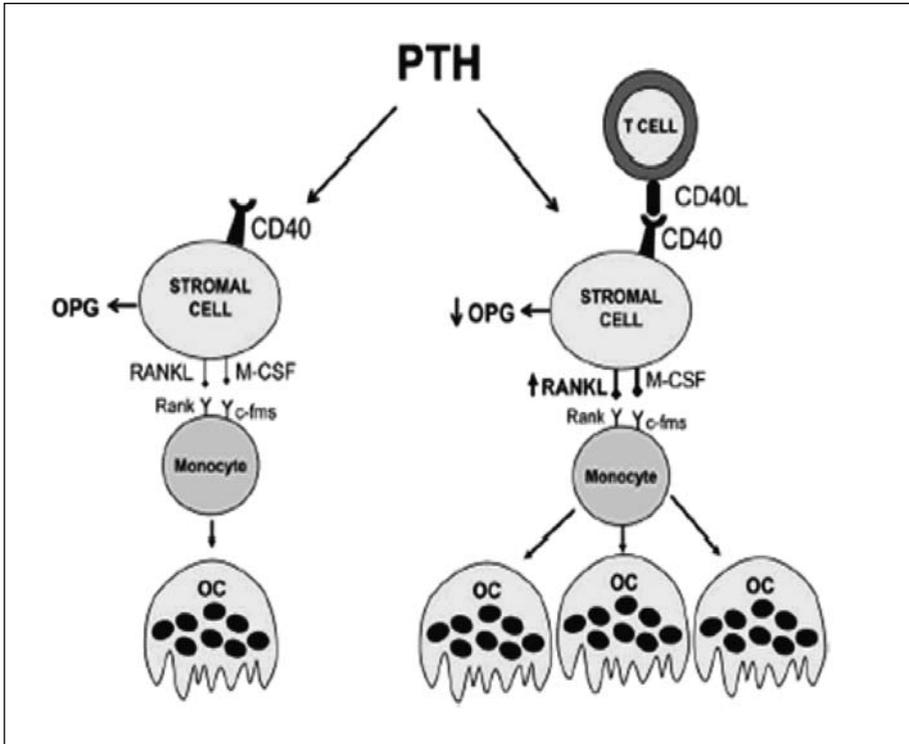


Figura 6. Meccanismo d'azione del PTH

- in assenza di linfociti T (pannello di sinistra) le cellule stromali nel BM sono poche e mostrano una scarsa capacità nel supportare la formazione di OC indotta dal PTH per la diminuita produzione di RANKL ed un' aumentata produzione di OPG
- in presenza del CD40 L espresso dai linfociti T aumenta il pool delle Sc. Il segnale $cd40Lcd40$ incrementa l'attività osteoclasto genetica delle Sc aumentando la loro produzione di RANKL e diminuendo quella dell'OPG. Il risultato è un aumento della capacità del PTH di stimolare la formazione di OC⁽¹¹⁾.

producenti PTH si ha un livello maggiore degli 80 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{die}$, la concentrazione tipicamente raggiunta nell'iperparatiroidismo primitivo; dose che è in grado di stimolare il riassorbimento osseo solo nei topi WT.

A tali concentrazioni di PTH lo stimolo citochinico diretto agli OC (RANKL, OPG) potrebbe derivare da altre sottopopolazioni di cellule del BM che non sono target fisiologici del PTH.

I topi privi di cellule T sembrano possedere una normale risposta anabolica al PTH: questo potrebbe suggerire che le SC, che producono fattori

osteoclastogenici e che supportano la formazione degli OC, non siano le stesse cellule che si differenziano in OB⁽³⁰⁾.

Le SC osteoclastogenetiche esprimono molecole d'adesione (ICAM-1) che sono necessarie per l'adesione ai precursori degli OC⁽⁴¹⁾, mentre gli OB sono ICAM 1-⁽¹⁰⁾. Il BM contiene cellule T memoria attivate che esprimono sulla loro superficie molecole espresse dalle cellule della linea osteoblastogenica⁽³⁾. Fra queste c'è il CD40L, che è in grado di promuovere la sopravvivenza degli OB legandosi con il CD40 espresso dagli OB. Il segnale del CD40L consente la sopravvivenza e la proliferazione delle SC e ne regola la loro funzione aumentando il rapporto RANKL/OPG.

Queste modifiche qualitative e quantitative potrebbero spiegare la riduzione della capacità delle SC di topi privi di cellule T nel supportare, *in vitro*, la formazione di OC.

La molecola CD40 è espressa non solo nelle SC ma anche nei precursori OC della linea monocitica⁽³¹⁾: si potrebbe pensare che l'espressione del CD40L sui linfociti T stimoli la formazione degli OC agendo direttamente sul segnale della loro maturazione.

Questa ipotesi è confutata dall'osservazione che gli anticorpi monoclonali diretti contro il CD40L né il CD40L solubile sono in grado di ostacolare la formazione di OC in colture di monociti e linfociti T stimulate con RANKL e M-CSF.

È stato precedentemente evidenziato che i linfociti Th2 attivati sono in grado di produrre PTH, questo contribuisce a mantenere l'attività anabolica degli OB in condizioni di infiammazione⁽⁴⁶⁾, ma è improbabile che topi carenti di cellule T siano protetti contro l'attività catabolica del PTH per l'assenza delle cellule Th2; infatti i linfociti Th2 attivati mitigano il riassorbimento osseo abbassando il rapporto RANKL/OPG principalmente con meccanismi indipendenti dal PTH.

I linfociti T hanno dimostrato di avere un ruolo centrale nella formazione e stimolazione degli OC nelle condizioni infiammatorie⁽¹⁹⁾ e nella carenza estrogenica⁽⁴⁴⁾ aumentando la produzione di RANKL e di TNF da parte dei linfociti T. Il ruolo chiave dei linfociti T CD4 e CD8 è stato anche osservato nell'iperparatiroidismo, una condizione clinica caratterizzata da una maggiore attività osteoclastogenica con aumentato turn-over e perdita di massa ossea⁽²¹⁾ (Figura 6).

CONCLUSIONI

Numerosi progressi sono stati fatti nel riconoscere il ruolo del sistema immune nello sviluppo dell'osteoporosi.

Secondo quanto osservato i linfociti T avrebbero un ruolo centrale nella formazione degli OC sia in condizioni infiammatorie che in presenza di alterazioni della secrezione ormonale (carenza di estrogeni e iperparatiroidismo).

I linfociti T mediano la perdita ossea indotta dal PTH regolando la funzionalità delle SC attraverso segnali di membrana mentre, nella carenza estrogenica, sarebbe implicata una maggiore secrezione di citochine osteoclastogeniche.

Se quanto dimostrato nell'animale fosse confermato nell'uomo si potrebbe considerare l'osteoporosi come una condizione infiammatoria o persino autoimmune e si potrebbero adottare specifici target terapeutici per contrastare tale la perdita di massa ossea.

BIBLIOGRAFIA

1. Abrahamsen B., Bendtzen K., Beck-Nielsen H.: *Cytokines and T-lymphocyte subsets in healthy post-menopausal women: estrogen retards bone loss without affecting the release of IL-1 or IL-1ra*. Bone 20, 251-258, 1997.
2. Adamski J., Ma Z., Nozell S., Benveniste E.N.: *17beta-Estradiol inhibits class II major histocompatibility complex (MHC) expression: influence on histone modifications and cbp recruitment to the class II MHC promoter*. Mol Endocrinol 18, 1963-1974, 2004.
3. Ahuja S.S., Zhao S., Bellido T., Plotkin L.I., Jimenez F., Bonewald L.F.: *CD40 ligand blocks apoptosis induced by tumor necrosis factor alpha, glucocorticoids, and etoposide in osteoblasts and the osteocyte-like cell line murine long bone osteocyte-Y4*. Endocrinology 144, 1761-1769, 2003.
4. Anderson D.M., Maraskovsky E., Billingsley W.L., Dougall W.C., Tometsko M.E., Roux E.R., Teepe M.C., DuBose R.F., Cosman D., Galibert L.: *A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function*. Nature 390, 175-179, 1997.
5. Boss J.M., Jensen P.E.: *Transcriptional regulation of the MHC class II antigen presentation pathway*. Curr Opin Immunol 15, 105-111, 2003.
6. Cenci S., Weitzmann M.N., Roggia C., Namba N., Novack D., Woodring J., Pacifici R.: *Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha*. J Clin Invest 106, 1229-1237, 2000.

7. D'Amelio P, Grimaldi A., Bernabei P, Pescarmona G.P., Isaia G.: *Immune system and bone metabolism: Does thymectomy influence postmenopausal bone loss in humans?* Bone 39, 658-665, 2006.
8. Effros R.B.: *Replicative senescence of CD8 T cells: effect on human ageing.* Exp Gerontol 39, 517-524, 2004.
9. Eriksen E.F., Langdahl B., Vesterby A., Rungby J., Kassem M.: *Hormone replacement therapy prevents osteoclastic hyperactivity: A histomorphometric study in early postmenopausal women.* J Bone Miner Res 14, 1217-1221, 1999.
10. Everts V., Delaisse J.M., Korper W., Jansen D.C., Tigchelaar-Gutter W., Saftig P., Beertsen W.: *The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation.* J Bone Miner Res 17, 77-90, 2002.
11. Gao Y., Wu X., Terauchi M., Li J.Y., Grassi F., Galley S., Yang X., Weitzmann M.N., Pacifici R.: *T cells potentiate PTH-induced cortical bone loss through CD40L signaling.* Cell Metab 8, 132-145, 2008.
12. Grossman Z., Paul W.E.: *Self-tolerance: context dependent tuning of T cell antigen recognition.* Semin Immunol 12: 197-203; discussion 257-344, 2000.
13. Guise T.A., Chirgwin J.M., Favarato G., Boyce B.F., Mundy G.R.: *Chinese hamster ovarian cells transfected with human parathyroid hormone-related protein cDNA cause hypercalcemia in nude mice.* Lab Invest 67, 477-485, 1992.
14. Haynes B.F., Sempowski G.D., Wells A.F., Hale L.P.: *The human thymus during aging.* Immunol Res 22, 253-261, 2000.
15. Hughes D.E., Dai A., Tiffée J.C., Li H.H., Mundy G.R., Boyce B.F.: *Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta.* Nat Med 2, 1132-1136, 1996.
16. Jamieson B.D., Douek D.C., Killian S., Hultin L.E., Scripture-Adams D.D., Giorgi J.V., Marelli D., Koup R.A., Zack J.A.: *Generation of functional thymocytes in the human adult.* Immunity 10, 569-575, 1999.
17. Jilka R.L., Takahashi K., Munshi M., Williams D.C., Roberson P.K., Manolagas S.C.: *Loss of estrogen upregulates osteoblastogenesis in the murine bone marrow. Evidence for autonomy from factors released during bone resorption.* J Clin Invest 101. 1942-1950, 1998.
18. Khosla S.: *Minireview: the OPG/RANKL/RANK system.* Endocrinology 142, 5050-5055, 2001.
19. Kong Y.Y., Feige U., Sarosi I., Bolon B., Tafuri A., Morony S., Capparelli C., Li J., Elliott R., McCabe S., Wong T., Campagnuolo G., Moran E., Bogoch E.R., Van G., Nguyen L.T., Ohashi P.S., Lacey D.L., Fish E., Boyle W.J., Penninger J.M.: *Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand.* Nature 402, 304-309, 1999.
20. Kousteni S., Bellido T., Plotkin L.I., O'Brien C.A., Bodenner D.L., Han L., Han K., DiGregorio G.B., Katzenellenbogen J.A., Katzenellenbogen B.S., Roberson P.K., Weinstein R.S., Jilka R.L., Manolagas S.C.: *Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity.* Cell 104, 719-730, 2001.
21. Potts, J.: *Primary hyperparathyroidism.* In *Metabolic Bone Diseases. L.V.A.a.* S. Krane, ed. San Diego, Academic Press, 1998.

22. Lacey D.L., Timms E., Tan H.L., Kelley M.J., Dunstan C.R., Burgess T., Elliott R., Colombero A., Elliott G., Scully S., Hsu H., Sullivan J., Hawkins N., Davy E., Capparelli C., Eli A., Qian Y.X., Kaufman S., Sarosi I., Shalhoub V., Senaldi G., Guo J., Delaney J., Boyle W.J.: *Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation.* Cell 93, 165-176, 1998.
23. Lam J, Takeshita S., Barker J.E., Kanagawa O., Ross F.P., Teitelbaum S.L.: *TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand.* J Clin Invest 106, 1481-1488, 2000.
24. Lean J.M., Davies J.T., Fuller K., Jagger C.J, Kirstein B., Partington G.A., Urry Z.L., Chambers T.J.: *A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss.* J Clin Invest 112, 915-923, 2003.
25. Manabe N., Kawaguchi H., Chikuda H., Miyaura C., Inada M., Nagai R., Nabeshima Y., Nakamura K., Sinclair A.M., Scheuermann R.H., Kuro-o M.: *Connection between B lymphocyte and osteoclast differentiation pathways.* J Immunol 167, 2625-2631, 2001
26. Masuzawa T., Miyaura C., Onoe Y., Kusano K., Ohta H., Nozawa S., Suda T.: *Estrogen deficiency stimulates B lymphopoiesis in mouse bone marrow.* J Clin Invest 94, 1090-1097, 1994.
27. Mehdizadeh S., Alaghband-Zadeh J., Gusterson B., Arlot M., Bradbeer J.N., Loveridge N.: *Bone resorption and circulating PTH-like bioactivity in an animal model of hypercalcaemia of malignancy.* Biochem Biophys Res Commun 161, 1166-1171, 1989.
28. Miyaura C., Onoe Y., Inada M., Maki K., Ikuta K., Ito M., Suda T.: *Increased B-lymphopoiesis by interleukin 7 induces bone loss in mice with intact ovarian function: similarity to estrogen deficiency.* Proc Natl Acad Sci U.S.A. 94, 9360-9365, 1997.
29. Nanes M.S.: *Tumor necrosis factor-alpha: molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology.* Gene 321, 1-15, 2003.
30. O'Brien C.A., Jilka R.L., Fu Q., Stewart S., Weinstein R.S., Manolagas S.C.: *IL-6 is not required for parathyroid hormone stimulation of RANKL expression, osteoclast formation, and bone loss in mice.* Am J Physiol Endocrinol Metab 289, E784-793, 2005.
31. O'Sullivan B., Thomas R.: *Recent advances on the role of CD40 and dendritic cells in immunity and tolerance.* Curr Opin Hematol 10, 272-278, 2003.
32. Pacifici R.: *Estrogen deficiency, T cells and bone loss.* Cell Immunol 252, 68-80, 2008.
33. Pfeilschifter J., Koditz R., Pfohl M., Schatz H.: *Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause.* Endocr Rev 23, 90-119, 2002.
34. Rifas L., Arackal S., Weitzmann M.N.: *Inflammatory T cells rapidly induce differentiation of human bone marrow stromal cells into mature osteoblasts.* J Cell Biochem 88, 650-9, 2003.
35. Robbie-Ryan M., Pacifici R., Weitzmann M.N.: *IL-7 drives T cell-mediated bone loss following ovariectomy.* Ann N Y Acad Sci 1068, 348-351, 2006.
36. Roberto G.F.P.: *Ovariectomy increases the formation of t cell niches at the resorption surfaces.* J. Bone Miner. Res Suppl: 20, 2005.
37. Robey E.A., Ramsdell F., Gordon J.W., Mamalaki C., Kioussis D., Youn H.J., Gottlieb P.D., Axel R., Fowlkes B.J.: *A self-reactive T cell population that is not subject to negative selection.* Int Immunol 4, 969-974, 1992.

38. Roggia C., Gao Y., Cenci S., Weitzmann M.N., Toraldo G., Isaia G., Pacifici R.: *Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo*. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 98, 13960-13965 2001.
39. Ryan M.R., Shepherd R., Leavey J.K., Gao Y., Grassi F., Schnell F.J., Qian W.P., Kersh G.J., Weitzmann M.N., Pacifici R.: *An IL-7-dependent rebound in thymic T cell output contributes to the bone loss induced by estrogen deficiency*. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 102, 16735-16740, 2005.
40. Sato T., Shibata T., Ikeda K., Watanabe K.: *Generation of bone-resorbing osteoclasts from B220+ cells: its role in accelerated osteoclastogenesis due to estrogen deficiency*. J Bone Miner Res 16, 2215-2221, 2001.
41. Tanaka Y., Maruo A., Fujii K., Nomi M., Nakamura T., Eto S., Minami Y.: *Intercellular adhesion molecule 1 discriminates functionally different populations of human osteoblasts: characteristic involvement of cell cycle regulators*. J Bone Miner Res 15, 1912-1923, 2000.
42. Toraldo G., Roggia C., Qian W.P., Pacifici R., Weitzmann M.N.: *IL-7 induces bone loss in vivo by induction of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and tumor necrosis factor alpha from T cells*. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 100, 125-130, 2003.
43. Weitzmann M.N., Pacifici R.: *Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale*. J Clin Invest 116, 1186-1194, 2006.
44. Weitzmann M.N., Pacifici R.: *The role of T lymphocytes in bone metabolism*. Immunol Rev 208, 154-168, 2005.
45. Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Yamaguchi K., Kinosaki M., Mochizuki S., Tomoyasu A., Yano K., Goto M., Murakami A., Tsuda E., Morinaga T., Higashio K., Udagawa N., Takahashi N., Suda T.: *Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL*. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 95, 3597-3602, 1998.
46. Young N., Mikhailkevich N., Yan Y., Chen D., Zheng W.P.: *Differential regulation of osteoblast activity by Th cell subsets mediated by parathyroid hormone and IFN-gamma*. J Immunol 175, 8287-8295, 2005.

TERAPIA ORMONALE SOSTITUTIVA E RISCHIO ONCOLOGICO I TUMORI GINECOLOGICI E DEL COLON-RETTO

Marco Massobrio, Manuela Puopolo

Dipartimento di Discipline Ginecologiche ed Ostetriche, Cattedra A
Università degli Studi di Torino

Key words: Cancer / Carcinoma
HRT / HRT
Endometrial / Endometrio
Ovarian / Ovaio
Colo-rectal / Cervice, colon

Abstract:

The evidence concerning a possible positive relationship between HRT use and cancer risk is not so strong.

Unopposed estrogen therapy is known to increase endometrial cancer risk. On the other hand, an appropriate combination of estrogen and progestin does not appear to increase, and may even decrease, this risk. Progestin must be given for 10-12 days or more. The few available studies suggest a protective role of HRT on the risk of cervical cancer, even if it cannot be excluded that this may be due to a higher medical control of women treated.

Studies on HRT and risk of epithelial ovarian cancer have produced conflicting results; a recent metanalysis seems to indicate a small increased risk, but additional studies are required.

Available data suggest a 20% reduced risk of colo-rectal cancer in HRT users.

In cancer survivors, the reticence to prescribe HRT could have biological basis for endometrial cancer, bladder cancer, gastric cancer and meningioma, where we can find estrogen receptors.

Riassunto:

È ancor oggi diffuso il timore del rischio di neoplasia nelle pazienti a cui viene proposta una terapia ormonale sostitutiva, senza che vi siano nella stragrande maggioranza dei casi dei validi dati scientifici a supporto di ciò.

La terapia estrogenica pura ha in effetti chiaramente dimostrato un aumentato rischio di carcinoma endometriale nelle donne utilizzatrici, ma è ormai stato

evidenziato come l'aggiunta del progestinico, somministrato per almeno 10-12 giorni al mese, svolga un sicuro ed efficace effetto protettivo.

Riguardo i tumori della cervice uterina, ed in particolare quelli più comuni di tipo squamoso, sembra oggi possibile ipotizzare un modico effetto protettivo della terapia ormonale sostitutiva.

Per quanto concerne il carcinoma ovarico, una recentissima metanalisi ha evidenziato un modico aumento del rischio, anche se la mancanza di correlazione con la durata del trattamento ormonale potrebbe del resto far sorgere qualche dubbio sulla reale consistenza di un preciso rapporto causa-effetto.

Nell'ambito dei tumori non ginecologici è ben documentata una riduzione di circa il 20% del rischio di insorgenza del carcinoma colo-rettale nelle donne che utilizzano terapia ormonale sostitutiva in menopausa.

Per le donne con anamnesi positiva per neoplasia, qualche riserva rimane circa la prescrizione in caso di pregresso carcinoma dell'endometrio, dello stomaco, della vescica ed in caso di meningioma, tutti tessuti in cui è possibile riscontrare la presenza di recettori per gli estrogeni.

Introduzione

Nell'ultimo decennio, abbiamo assistito oltre che ad un vivace dibattito scientifico, ad una sempre crescente, ma spesso contraddittoria, campagna d'informazione, che ha contribuito a sensibilizzare la popolazione femminile nei confronti dei potenziali rischi della terapia ormonale sostitutiva in menopausa. Tra questi prevale il timore delle neoplasie ginecologiche, che nasce soprattutto da una errata lettura dell'informazione fornita dai mass-media e anche da buona parte della letteratura scientifica.

Il carcinoma dell'endometrio

Sono noti fin dagli anni '50 gli effetti negativi degli estrogeni endogeni ed esogeni sul tessuto endometriale. I fattori di rischio del carcinoma endometriale (obesità, menarca precoce e menopausa tardiva, nulliparità) sono del resto notoriamente associati ad una condizione di iperestrogenismo relativo. Gli estrogeni infatti, stimolando la proliferazione delle cellule endometriali, quando non bilanciati da un adeguato tono progestinico possono aumentare la probabilità di danni al DNA con conseguenti alterazioni del genoma e rischio di proliferazione cellulare incontrollata.

La terapia estrogenica pura ha chiaramente dimostrato un aumentato rischio di carcinoma endometriale nelle donne utilizzatrici, aumento di rischio fino a 5 volte superiore in studi caso-controllo e fino a 2.8 volte superiore in studi di coorte per terapie di durata inferiore ai 5 anni, aumentando in maniera decisa per somministrazioni di durata superiore.

È ormai del resto stato evidenziato come l'aggiunta del progestinico, somministrato per almeno 10-12 giorni al mese, svolga un sicuro ed efficace effetto protettivo⁽⁶⁾. Il progesterone infatti interviene a vari livelli nel negativizzare gli effetti proliferativi degli estrogeni sull'endometrio: a livello recettoriale, determinando una ridotta sintesi ed un aumentato turn-over dei recettori degli estrogeni stessi, ed a livello cellulare, favorendo i processi di differenziazione.

Anche per quanto concerne l'iperplasia endometriale sono stati rilevati chiari vantaggi: il *PEPI (Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions Trial)*⁽⁵⁾, pubblicato nel 1996, ha dimostrato un aumento di rischio di iperplasia endometriale con terapia estrogenica pura, ma non con la terapia combinata.

Riguardo il tipo di formulazione utilizzata, la terapia ormonale sostitutiva combinata continua è stata associata non solo ad un non aumento di rischio

di carcinoma dell'endometrio, ma potrebbe esercitare anche un effetto protettivo.

Tutti i dati riguardano trattamenti di durata inferiore ai 5 anni: in caso di terapie prolungate, infatti, è stato evidenziato un aumento di rischio significativo anche per quanto riguarda l'associazione estro-progestinica^(4,1).

Il carcinoma della cervice uterina

Riguardo i tumori della cervice uterina, ed in particolare quelli più comuni di tipo squamoso, sembra oggi possibile ipotizzare un modico effetto protettivo della terapia ormonale sostitutiva. Uno studio su 645 casi e 749 controlli⁽⁵⁾ ha infatti dimostrato un rischio relativo di insorgenza di carcinoma squamoso della cervice pari a 0.5 in donne utilizzatrici di HRT rispetto alle donne non utilizzatrici. Ciò sembra contrastare con gli ormai conosciuti effetti del progesterone nel favorire l'azione del papillomavirus, principale agente responsabile di tali neoplasie, sulla trasformazione cellulare. Tali dati tuttavia vanno adeguatamente soppesati e valutati considerando lo scarso numero dei lavori pubblicati e soprattutto l'assenza di studi prospettici, che potrebbero forse fornire risultati scientificamente più convincenti.

A differenza del carcinoma squamoso, l'adenocarcinoma della cervice uterina sembra aumentare in corso di terapia estrogenica pura, facendo ipotizzare in questo caso un ruolo eziopatogenetico degli estrogeni simile a quello evidenziato per il carcinoma endometriale.

Il carcinoma dell'ovaio

Le prime metanalisi circa gli effetti dell'HRT sul rischio di carcinoma ovarico non hanno dimostrato risultati concordanti. Al contrario, il *Million Women Study* ha evidenziato un modesto ma significativo aumento di rischio per i tumori epiteliali, in particolare per gli istotipi sierosi, rischio maggiore in caso di terapia estrogenica pura ma evidenziabile anche per quella combinata. Una recentissima metanalisi su 19 studi caso-controllo e 18 studi di coorte ha confermato tale aumento di rischio, che non sembra chiaramente correlato alla durata d'uso, ma potrebbe essere influenzato dallo schema terapeutico e dal tempo intercorso dalla sospensione⁽⁷⁾.

La mancanza di correlazione con la durata del trattamento ormonale potrebbe del resto far sorgere qualche dubbio sulla reale consistenza di un preciso rapporto causa-effetto.

Il carcinoma colo-rettale

Nell'ambito dei tumori non ginecologici è ben documentata una riduzione di circa il 20% del rischio di insorgenza del carcinoma colo-rettale nelle donne che utilizzano terapia ormonale sostitutiva in menopausa. Recettori per l'estradiolo sono presenti in questa parte dell'intestino in condizioni normali, ma sono inattivati in caso di trasformazione tumorale, e gli estrogeni potrebbero svolgere una azione preventiva impedendo l'inattivazione del loro stesso recettore.

HRT nelle pazienti con pregresso tumore

In attesa di dati scientifici convincenti, le riserve circa la prescrizione di terapia ormonale sostitutiva in caso di pregressa neoplasia sussiste solo per quanto concerne i tumori dell'endometrio, dello stomaco, della vescica ed i meningioma, dove l'espressione dei recettori per gli estrogeni potrebbe da un punto di vista biologico comportare un ipotetico aumento rischio di recidiva, per ora ancora non dimostrato⁽²⁾.

BIBLIOGRAFIA

1. Beral V., Bull D., Reeves G., Million Women Study Collaborators: *Endometrial cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study*. Lancet 365, 1543-1551, 2005.
2. Biglia N., Gadducci A., Ponzzone R., Roagna R., Sismondi P.: *Hormone replacement therapy in cancer survivors*. Maturitas 48, 333-346, 2004.
3. *Effects of hormone replacement therapy on endometrial histology in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial*. The Writing Group for the PEPI trial. JAMA 275, 370-375, 2006.
4. Hill D., Weiss N., Beresford S., Voigt L., Daling J.R., Stanford J.L., Self S.: *Continuous combined hormone replacement therapy and risk of endometrial cancer*. Am. J. Obstet. Gynecol. 183, 1456-1461, 2000.

5. Parazzini F., La Vecchia C., Negri E., Franceschi S., Moroni S., Chatenoud L., Bolis G. et al.: *Case-control study of oestrogen replacement therapy and risk of cervical cancer*. *BMJ* 315, 85-88, 1997.
6. Weiderpass E., Adami H., Baron J., Magnusson C., Linden A., Persson I.: *Risk of endometrial cancer following estrogen replacement therapy with and without progestins*. *J. Nat. Cancer Inst.* 91, 1131-1137, 1999.
7. Zhou B., Sun Q., Cong R., Gu H., Tang N., Yang L., Wang B.: *Hormone replacement therapy and ovarian cancer risk: a meta-analysis*. *Gynaecol. Oncol.* 108, 641-651, 2008.

TERAPIA ORMONALE SOSTITUTIVA E CARCINOMA DELLA MAMMELLA

Piero Sismondi, Nicoletta Biglia, Valentina Elisabetta Bounous

Cattedra di Ginecologia Oncologica - Università degli Studi di Torino
Ospedale Mauriziano "Umberto I" di Torino
Istituto per la Ricerca e Cura del Cancro di Candiolo (TO)

Key words: *Menopause / Menopausa*
Hormone replacement / Terapia ormonale
therapy (HRT) sostitutiva
Breast cancer / Carcinoma mammario

Abstract:

The relationship between breast cancer and sex hormones exposure is well known and it often explains the reluctance to the use of hormone replacement therapy (HRT).

Many studies showed no increase in risk of breast cancer after a short period of HRT (less than 5 years), whereas incidence of breast cancer increases with HRT use beyond 5 years, as confirmed by the WHI study, the main long-term RCT (randomized-controlled trial) of the last years. The risk is higher for prolonged use and it is also dependent on the type and schedule of the estrogens and progestogens used.

Available evidence suggests that estrogen replacement therapy, differently from combined estrogen-progestogen therapy, has no impact on breast cancer risk, independently from the duration of use; unfortunately this treatment can be offered only to hysterectomized women.

Cancers diagnosed during HRT appear to be less aggressive (hormone receptor-positive, well differentiated and node-negative) and show a longer overall survival. This is probably also due to earlier diagnosis, as women using HRT generally undergo tighter breast surveillance.

Most of the available randomized studies were done on elderly women (mean age, 63 y) mostly more than 10 years beyond menopause and with a higher number of risk factors than younger women who typically use HRT for menopausal symptoms. New long-term RCTs are needed to assess HRT impact on breast cancer risk in early menopause women.

Riassunto:

Il carcinoma mammario annovera tra i suoi fattori di rischio l'esposizione agli ormoni sessuali; questa nota associazione è spesso responsabile della riluttanza nell'impiego della terapia ormonale sostitutiva.

Gli studi epidemiologici condotti negli ultimi 20 anni hanno dimostrato che l'impiego della terapia ormonale sostitutiva per brevi periodi (< 5 anni), sufficiente nella maggior parte dei casi a superare il periodo dei sintomi menopausali, non determina un aumento della probabilità di sviluppare un carcinoma della mammella, mentre l'assunzione per periodi prolungati incrementa il rischio di questa neoplasia in modo direttamente proporzionale alla durata d'impiego e variabile in relazione ai diversi preparati. L'entità di questo aumento è comunque modesta, come confermato dal principale studio randomizzato e controllato con placebo condotto ad oggi sull'argomento, lo studio WHI (Women' Health Initiative) del 2002.

A differenza delle associazioni estroprogestiniche, l'uso dei soli estrogeni comporta un rischio di tumore mammario uguale o inferiore a quello della popolazione generale, indipendentemente dalla durata d'uso; questo trattamento tuttavia è indicato solo per donne isterectomizzate.

Il carcinoma mammario insorto in corso di terapia ormonale sostitutiva, inoltre, come evidenziato da numerosi studi, presenta una maggior frequenza di carcinomi ad istotipo favorevole (buona differenziazione, positività recettoriale, minor invasione linfonodale) ed ha una sopravvivenza più prolungata. Questo fenomeno è probabilmente imputabile alla precocità della diagnosi per la maggior sorveglianza a cui sono sottoposte le donne in trattamento con HRT.

Gli studi randomizzati finora disponibili sono stati condotti su donne di età più avanzata (età media 63 anni) e con una maggior frequenza di patologie associate rispetto a quelle che fanno normalmente uso di HRT per il controllo dei sintomi in climaterio e in menopausa iniziale.

Nuovi studi sono necessari per ottenere migliori informazioni sull'uso dell'HRT in donne in menopausa precoce o negli anni immediatamente successivi alla menopausa.

Introduzione

Il legame esistente tra ormoni sessuali e tumori della mammella è noto da tempo e confermato in modelli sperimentali e da osservazioni biologiche ed epidemiologiche. La curva di incidenza del carcinoma mammario cresce con l'avanzare dell'età, ma subisce un rallentamento negli anni intorno alla menopausa, in coincidenza con la cessazione della produzione ormonale ovarica. Inoltre, la menopausa tardiva o il menarca precoce, situazioni che si accompagnano ad una prolungata esposizione agli estrogeni endogeni, costituiscono un fattore di rischio per il carcinoma mammario. Il timore che l'assunzione di una terapia ormonale in menopausa (HRT) aumenti il rischio di sviluppare un carcinoma mammario costituisce oggi il motivo principale che spinge le donne a non utilizzare questi preparati o a sospenderli dopo breve tempo e che scoraggia anche molti medici dalla prescrizione della terapia. Gli studi epidemiologici osservazionali pubblicati nel corso degli ultimi venti anni, pur con risultati a volte discordanti, avevano già evidenziato come l'assunzione a lungo termine della HRT fosse associata ad un piccolo aumento del rischio di carcinoma mammario. Questo dato è stato confermato per la prima volta in uno studio randomizzato e controllato con placebo nel 2002, con la pubblicazione dello studio Women' Health Initiative, che confrontava il placebo con uno schema di HRT combinato continuo a dosaggio standard. Sebbene questo studio non avesse fornito alcun dato nuovo riguardo al carcinoma mammario, tuttavia i suoi risultati sono stati ripresi ed amplificati dai media creando un diffuso allarme, sia fra le donne, sia fra i medici che hanno il compito di consigliarle riguardo l'uso della HRT.

Negli ultimi 5 anni non vi sono state variazioni significative delle informazioni riguardo l'associazione fra HRT e carcinoma mammario e la ricerca si è piuttosto concentrata su alcuni aspetti, come l'effetto dei diversi preparati disponibili oppure delle differenti vie di somministrazione, la riduzione del dosaggio e la sorveglianza senologica delle donne in trattamento ormonale.

HRT e carcinoma della mammella - studi epidemiologici

Gli studi epidemiologici condotti negli ultimi venti anni hanno dimostrato in modo sostanzialmente concorde che l'impiego della HRT per pochi anni non modifica la probabilità di sviluppare un carcinoma della mammella, mentre l'assunzione per periodi prolungati, in generale superiori a 5 anni, determina un significativo aumento del rischio, direttamente correlato alla durata d'impiego.

Le informazioni fornite nel 1997 dallo studio collaborativo, che raccoglieva oltre il 90% dei dati epidemiologici allora disponibili⁽⁶⁾, sono state sostanzialmente confermate anche dagli studi più recenti^(15,25,22,4,28) ed in particolare dallo studio Women's Health Initiative pubblicato con grande risonanza fra il 2002 ed il 2004^(27,29). Nello studio collaborativo⁽⁶⁾ la durata del trattamento ed il tempo trascorso dall'ultima assunzione sono cruciali nel determinare l'entità del rischio. L'aumento di rischio per ogni anno di terapia è di 1.023, paragonabile a quello di una donna che non ha mai assunto preparati ormonali per ogni anno di prolungamento naturale dell'attività ovarica (RR = 1.028). Globalmente, l'aumento del rischio per le donne che hanno fatto uso di HRT è di 1.14 ($p = .00001$); il rischio aumenta all'aumentare della durata della terapia e diminuisce progressivamente dopo la cessazione della HRT, sino a ritornare sovrapponibile a quello delle donne mai trattate dopo 5 anni. Nello studio collaborativo il RR per le donne che stavano assumendo la HRT da oltre 5 anni era di 1.35⁽⁶⁾; anche gli studi epidemiologici successivi hanno riscontrato RR variabili da 1 a 2, sebbene con differenze legate allo schema di trattamento ed al tipo di preparati^(15,25,22,4,28,29,27).

Lo studio WHI, il primo grande studio prospettico e controllato con placebo, ha confermato i dati dello studio collaborativo. La prima pubblicazione, relativa al confronto fra le donne trattate con placebo e quelle in trattamento con estrogeni coniugati equini orali (ECE) e medrossiprogesterone acetato (MPA) secondo uno schema combinato continuo, ha evidenziato globalmente un aumento del RR fra le donne in HRT di 1.26⁽²⁹⁾. L'aumento di rischio tuttavia diventa evidente solo dopo un periodo di assunzione superiore a 4 anni; inoltre, se si considerano solo le donne che prima di essere arruolate nel WHI non avevano mai assunto ormoni, il RR non si discosta dall'unità (HR = 1.06; 95% IC 0.81-1.38), mentre sale a 2.13 per le donne che avevano già utilizzato la HT per 5 anni e a 4.6 per una durata di trattamento compresa fra 5 e 10 anni.

Schema di Trattamento

L'argomento oggi più dibattuto è rappresentato proprio dalle possibili differenze di rischio con l'uso di differenti preparati, solo estrogeni oppure estro-progestinici, con diverse vie di somministrazione, dosaggi e caratteristiche metaboliche.

Per quanto riguarda la dose e la via di somministrazione, occorre sottolineare che la maggior parte degli studi epidemiologici si riferiscono all'uso di estrogeni orali, in genere ECE, utilizzati a dosaggi standard o elevati. Non sono

ancora disponibili molti dati sull'uso delle basse dosi (cioè < 0.625 mg/die di ECE o equivalenti), che hanno recentemente dimostrato una buona efficacia sia nel controllo dei sintomi, sia nella prevenzione dell'osteoporosi. Alcune informazioni derivano dallo studio One Million Women (OMW), uno studio osservazione condotto in Inghilterra mediante la distribuzione di questionari sull'uso della HRT alle donne in attesa nei centri di screening mammografico. Con tutti i limiti metodologici insiti in un'indagine di questo tipo, i risultati non sembrano evidenziare una sostanziale differenza di rischio in relazione alla dose di estrogeni utilizzati né alla via di somministrazione. Non sono disponibili tuttavia studi randomizzati che confrontino il placebo con vie di somministrazione alternative degli estrogeni, come quella transdermica, molto diffusa nel nostro paese. Questi preparati hanno una farmacocinetica ed effetti metabolici in parte differenti dagli estrogeni orali e potrebbero, almeno in via teorica, avere un diverso impatto sul rischio di carcinoma mammario⁽³⁾. Una delle indicazioni di ricerca più pressanti raccomandate sia nei precedenti⁽¹⁰⁾ che nel più recente documento di Consenso sulla HRT della North American Menopause Society (NAMS) riguarda proprio questo aspetto⁽²¹⁾.

L'azione dei progestinici sulla mammella non è stata ancora oggi del tutto chiarita, ma tutti i più recenti studi sono concordi nell'attribuire un maggior rischio alle associazioni estro-progestiniche rispetto agli estrogeni da soli⁽²⁰⁾.

In realtà, questo dato era già emerso nello studio collaborativo⁽⁶⁾, dove il RR era 1.15 e 1.53 in coloro che assumevano estro-progestinici rispettivamente da meno di 5 anni e da più di 5 anni, in confronto ad un RR di 0.99 e 1.34 per chi assumeva solo estrogeni.

L'osservazione è stata confermata dai risultati pubblicati nel 2004 del braccio di trattamento con soli estrogeni del WHI, riferito ad oltre 10.000 pazienti, che non evidenziano alcun aumento di rischio di carcinoma mammario rispetto al placebo⁽²⁷⁾. Al contrario, dopo un follow-up medio di 6.8 anni, il R.R. è ridotto, ai limiti della significatività statistica (RR = 0.77; 95% CI 0.59-1.01), con 26 casi su 10.000 persone/anno fra le donne trattate con soli estrogeni e 33 casi per 10.000 persone/anno nel gruppo placebo.

Anche lo studio osservazionale One Million Study⁽¹⁷⁾, pur essendo completamente diverso come impostazione, ha riscontrato un aumento di rischio superiore per le associazioni estroprogestiniche (RR = 2) rispetto ai soli estrogeni, senza differenze sostanziali in relazione allo schema o al tipo di progestinico.

Su questi due ultimi aspetti gli studi più recenti hanno mostrato una grande variabilità di risultati e queste differenze sono state attribuite alle diverse azioni biologiche dei progestinici, ed in particolare alla residua attività androgenica

di alcuni preparati, come i progestinici 19 nor-derivati molto diffusi nel nord Europa⁽²⁶⁾. Nello studio svedese della Magnusson⁽¹⁵⁾ ad esempio, il rischio risulta elevato solo tra le donne trattate con progestinici di derivazione androgenica, con un aumento dell'8% per ogni anno di terapia ed un RR dopo 10 anni di trattamento di 3.41 (95% IC 1.91-6.08); l'aumento del rischio con l'assunzione di progestinici derivati dal progesterone è invece di 0.95 per ogni anno d'uso (95% IC 0.80-1.14).

Il ruolo dei diversi progestinici è stato recentemente sottolineato anche in un ampio studio francese, pubblicato alla fine del 2004 e ripreso con una certa risonanza anche dai media, noto con il nome di E3N-EPIC⁽⁷⁾. È uno studio di coorte condotto su oltre 54.000 donne francesi seguite per una media di 5.8 anni; in questo periodo si sono sviluppati 948 casi di carcinoma mammario. La maggior parte delle donne usava estro-progestinici (83%), con estrogeni principalmente per via transdermica, associati a progesterone micronizzato nel 20% dei casi oppure a progestinici non derivati dal testosterone (58%) come ciproterone acetato, nomegestrolo e MPA. Solo il 10% delle donne aveva usato estrogeni da soli, il 5% una terapia topica vaginale e meno del 5% progestinici di tipo androgenico. Il RR globale di carcinoma mammario è di 1.2 (95% CI 1.1-1.4) rispetto ai controlli non trattati; suddividendo in base al tipo di trattamento l'aumento di rischio è significativo solo per le associazioni che utilizzano progestinici sintetici (RR 1.4; 95% CI 1.2-1.7), mentre gli estrogeni da soli (RR 1.1; 95% CI 0.8-1.6), gli estrogeni vaginali (RR 0.7, 95% CI 0.4-1.2) o gli schemi con progesterone micronizzato (RR 0.9; 95% CI 0.7-1.2) non determinano alcun significativo aumento di rischio. Non emerge inoltre alcuna significativa correlazione con la durata d'uso, con l'eccezione sempre degli EP sintetici dove si evidenzia un trend ai limiti della significatività ($p = 0.07$). Solo per le donne trattate con EP sintetici inoltre il rischio di cancro risulta aumentato dopo soli due anni di terapia (RR 1.6; 95% CI 1.3-2.0). Al contrario, con gli estrogeni transdermici, da soli (RR = 0.3; 95% CI 0.1-0.8) o in associazione con progesterone micronizzato (RR 1.2; 95% CI 0.8-1.7), non emergono significativi aumenti del rischio anche per terapie di durata superiore ai 4 anni. I dati dello studio francese sono stati recentemente rielaborati e confermano che l'uso di associazioni di estrogeni con progesterone micronizzato o con diidroprogesterone non comporta alcun aumento del rischio di carcinoma mammario, mentre con tutti gli altri preparati globalmente considerati il RR è di 1.6.

Una certa confusione vi è in relazione allo schema di trattamento, sequenziale o combinato continuo. Nello studio americano Breast Cancer Detection Demonstration Project, dove la maggior parte delle donne era stata

trattata con MPA in modo sequenziale, l'aumento del rischio è limitato alle donne che hanno utilizzato gli ormoni nei 4 anni precedenti la diagnosi ed è maggiore per gli estrogeni + progestinici (RR = 1.4; 95% CI 1.1-1.8) rispetto ai soli estrogeni (RR = 1.2; 95% CI 1.0-1.4), con un aumento del RR per anno d'uso rispettivamente di 0.01 e di 0.08⁽²⁵⁾. Anche nello studio di Ross⁽²²⁾ l'uso di soli estrogeni, anche per 15 anni, non si associa ad un aumento del rischio di carcinoma (OR 1.06; CI 0.97-1.15), mentre vi è un aumento del rischio nelle donne trattate con progestinici per 5 anni secondo uno schema sequenziale (OR = 1.38; 95% CI = 1.13-1.68), mentre il rischio non si discosta dall'unità per il gruppo in trattamento con HT combinata continua (OR = 1.09; 95% CI = 0.88-1.35). Al contrario, un altro studio condotto sempre negli USA su 1870 casi e 1953 controlli, mostra un aumento di rischio solo per l'uso recente e per oltre 5 anni di schemi combinati continui (OR = 1.54; 95% IC 1.10-2.17); l'uso dei soli estrogeni o di associazioni sequenziali, anche per lunghi periodi, non comporta invece alcun significativo aumento del rischio⁽²⁸⁾. Questo aspetto risulta quindi a tutt'oggi ancora da chiarire⁽²¹⁾.

Prognosi del carcinoma mammario insorto in corso di HRT

I dati del Nurses' Health Study⁽²⁶⁾ hanno mostrato un moderato aumento del rischio di morte per tumore al mammella nelle donne in menopausa che stavano assumendo estrogeni orali o che ne avevano fatto uso in precedenza per 10 anni o più. Anche nello studio Million⁽¹⁷⁾ si osserva un modesto aumento della mortalità per carcinoma mammario fra le donne trattate, ai limiti della significatività. Nello studio WHI braccio soli estrogeni la mortalità per carcinoma mammaria non è differente rispetto a quella del gruppo placebo⁽²⁷⁾.

Sebbene non vi sia completo accordo in letteratura, l'effetto della HRT sulla prognosi del carcinoma mammario sembra essere favorevole. Numerosi studi infatti hanno evidenziato una prognosi migliore per le donne che avevano utilizzato in passato la HRT o che la stavano assumendo al momento della diagnosi di carcinoma mammario rispetto alle donne che non avevano mai assunto ormoni^(12,16,2,11). Questo dato era già emerso nella rianalisi del 1997⁽⁶⁾: i tumori insorti in donne che avevano utilizzato la HRT erano meno frequentemente diffusi ai linfonodi regionali o a distanza rispetto a quelli diagnosticati nei controlli. Non si può escludere che l'effetto favorevole sia in parte legato ad una diagnosi più precoce, in conseguenza della maggiore sorveglianza senologica a cui in genere si sottopongono le donne in trattamento ormonale. Tuttavia, numerosi studi che hanno confrontato le variabili anatomo-

patologiche dei tumori insorti in donne che utilizzavano HRT rispetto alle donne non trattate, hanno osservato una più frequente presenza di carcinomi ben differenziati, con recettori positivi, istotipo favorevole e minor invasione linfonodale fra le donne che avevano assunto estrogeni^(12,16,2,11,19,8,23). Questo suggerisce un effetto biologico selettivo della terapia ormonale sulla crescita di tumori a bassa aggressività. A questo riguardo, uno studio prospettico su 37.105 partecipanti allo Iowa Women Health Study ha dimostrato che l'esposizione alla HRT era associata ad un rischio aumentato di tumori alla mammella con istotipo favorevole⁽⁹⁾. Queste osservazioni non sono tuttavia state confermate in altri studi⁽²⁵⁾. Di rilievo è anche la tendenza ad una più prolungata sopravvivenza dopo tumore alla mammella nelle donne che hanno fatto uso di HRT rispetto a quelle che non ne hanno mai fatto uso⁽²⁴⁾.

Nello studio WHI i tumori diagnosticati fra le donne trattate con HRT tendono ad essere di diametro maggiore e più frequentemente diffusi ai linfonodi ascellari, probabilmente secondo l'autore per una maggiore difficoltà alla diagnosi precoce⁽⁵⁾. È infatti noto che la HRT induce spesso delle modificazioni nel tessuto mammario che possono avere importanti ripercussioni sull'accuratezza della mammografia. L'alterazione più frequente è un aumento, diffuso o focalizzato, della densità radiologica del parenchima mammario^(13,10) che si può osservare precocemente, dopo solo 4 mesi di trattamento ormonale, in una percentuale di casi che varia dal 9% al 70%. È stato dimostrato che la specificità e la sensibilità della mammografia sono più basse tra le donne che assumono estrogeni rispetto alle donne che non li hanno mai usati o che hanno sospeso la terapia, con un rischio relativo di falsi positivi di 1.33 (95% IC 1.15-1.54) e di falsi negativi aumentato di 5 volte (RR = 5.23; 95% IC 1.09-25.02)⁽¹³⁾.

Un altro aspetto interessante è il riscontro in molti studi di una maggiore frequenza di tumori con istotipo lobulare fra le donne che hanno utilizzato la HRT rispetto all'istotipo duttale^(4,14,1). Questo dato può avere importanti implicazioni per la diagnosi precoce; infatti è nota la difficoltà nella diagnosi radiologica di alcuni tumori lobulari ed anche la maggior difficoltà ad ottenere margini di resezione chirurgica indenni in caso di chirurgia conservativa.

Conclusioni

Vi è accordo in letteratura che l'uso della HRT per alcuni anni (< 5 anni), sufficiente nella maggior parte dei casi per superare il periodo dei sintomi menopausali, non modifica in alcun modo il rischio di sviluppare un carcinoma della mammella. Terapie di maggiore durata aumentano il rischio relativo

dell'ordine del 30%; questi dati sono confermati anche nello studio WHI e, riportati a numeri assoluti, sono sostanzialmente tranquillizzanti. L'ultimo position Statement del NAMS, una delle più autorevoli Società Scientifiche che si occupano di menopausa, pubblicato nel marzo 2007, stabilisce che in termini assoluti l'aumento di rischio di carcinoma mammario associato all'uso di HRT può essere definito *raro* e stimabile in 4-6 casi addizionali ogni 10.000 donne all'anno trattate per oltre 5 anni⁽²¹⁾.

Minore sembra essere l'effetto degli estrogeni da soli, anche assunti per lunghi periodi di tempo; anzi nello studio WHI vi sono stati 7 casi in meno di carcinoma mammario ogni 10.000 donne trattate per anno. Questo trattamento tuttavia è riservato alle donne isterectomizzate e non vi sono ancora dati sulla sicurezza endometriale e mammaria dei regimi di HRT attualmente in studio volti a minimizzare l'esposizione al progestinico (schemi long-cycle, IUD medicati al progesterone, estrogeni da soli a basse dosi anche in donne non isterectomizzate, etc...).

È probabile che la HRT acceleri o favorisca in particolare la crescita dei tumori meglio differenziati, ad istotipo favorevole e che mantengono l'espressione dei recettori ormonali. Questo fatto, accompagnato ad una diagnosi in genere più precoce, per la maggiore sorveglianza a cui sono sottoposte le donne in corso di HRT, fa sì che la prognosi dei tumori insorti in corso di trattamento sia in genere considerata migliore rispetto a quella di donne mai trattate.

Negli ultimi anni è aumentato il numero di preparati disponibili per la HRT, come principi attivi, via di somministrazione e schema di trattamento. Tali composti appaiono equivalenti sul controllo della sintomatologia, ma non lo sono del tutto dal punto di vista metabolico e farmacodinamico e potrebbero avere un diverso impatto sul rischio oncologico.

Questi ed altri aspetti contrastanti della HRT di lunga durata potrebbero essere chiariti nei prossimi anni dagli studi prospettici in corso.

Un ultimo aspetto sottolineato anche dal NAMS nel documento più recente riguarda il differente impatto che la HRT può avere su tutti gli aspetti, non solo sul rischio oncologico in relazione all'età di assunzione della HRT. Gli studi randomizzati infatti sono stati condotti su donne di età avanzata (in media 63-67 anni) e non abbiamo informazioni sull'uso in donne in menopausa precoce o negli anni immediatamente successivi alla menopausa, più consoni fra l'altro alla reale pratica clinica in tutti i paesi del mondo⁽²¹⁾.

BIBLIOGRAFIA

1. Biglia N., Mariani L., Sgro L., Mininanni L., Moggio G., Sismondi P.: *Increased incidence of lobular breast cancer in women treated with hormone replacement therapy: implications for diagnosis, surgical and medical treatment.* *Endocr Relat Cancer* 14,549-567, 2007.
2. Bonnier P., Bessenay F., Sasco A.J., Beedassy B., Lejeune C., Romain S., Charpin C., Piana L., Martin P.M.: *Impact of menopausal hormone-replacement therapy on clinical and laboratory characteristics of breast cancer.* *Int J Cancer* 79,278-282, 1998.
3. Campagnoli C., Biglia N., Altare F., Lanza M.G., Lesca L., Cantamessa C., Peris C., Fiorucci G.C., Sismondi P.: *Differential effects of oral conjugated estrogens and transdermal estradiol on insulin-like growth factor 1, growth hormone and sex hormone binding globulin serum levels.* *Gynecol Endocrinol.* 7,251-258, 1993.
4. Chen C.L., Weiss N.S., Newcomb P., Barlow W., White E.: *Hormone replacement therapy in relation to breast cancer.* *JAMA* 287, 734-741, 2002.
5. Chlebowski R.T., Hendrix S.L., Langer R.D., Stefanick M.L., Gass M., Lane D., Rodabough R.J., Gilligan M.A., Cyr M.G., Thomson C.A., Khandekar J., Petrovitch H., McTiernan A.: *Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial.* *JAMA* 289, 3243-3253, 2003,
6. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer: *Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52705 women with breast cancer and 108411 without breast cancer.* *Lancet* 350, 1047-1059, 1997.
7. Fournier A., Berrino F., Riboli E., Avenel V., Clavel-Chapelon F.: *Breast cancer risk in relation to different types of hormone replacement therapy in the E3N-EPIC cohort.* *Int J Cancer* 114, 448-454, 2005.
8. Fowble B., Hanlon A., Freedman G., Patchefsky A., Kessler H., Nicolaou N., Hoffman J., Sigurdson E., Boraas M., Goldstein L.: *Postmenopausal hormone replacement therapy: effect on diagnosis and outcome in early-stage invasive breast cancer treated with conservative surgery and radiation.* *J Clin Oncol.* 17, 1680-1688, 1999,
9. Gapstur S.M., Morrow M., Sellers T.A.: *Hormone replacement therapy and risk of breast cancer with a favorable histology: results of the Iowa Women's Health Study.* *JAMA* 281, 2091-2097, 1999.
10. Greendale G.A., Reboussin B.A., Sie A., Singh H.R., Olson L.K., Gatewood O., Bassett L.W., Wasilaukas C., Bush T., Barrett-Connor E.: *Effects of estrogen and estrogen-progestin on mammographic parenchymal density.* *Ann Intern Med.* 130, 262-269, 1999.
11. Holli K., Isola J., Cuzick J.: *Low biologic aggressiveness in breast cancer in women using hormone replacement therapy.* *J Clin Oncol.* 16, 3115-3120, 1998.
12. Jones C., Ingram D., Mattes E., Hahnel R.: *The effect of hormone replacement therapy on prognostic indices in women with breast cancer.* *Med J Aust.* 161, 106-110, 1994.
13. Laya M.B., Larson E.B., Taplin S.H., White E.: *Effect of estrogen replacement therapy on specificity and sensivity of screening mammography.* *J Natl Cancer Inst.* 88, 643-649, 1996.
14. Li C.I., Weiss N.S., Stanford J.L., Daling J.R.: *Hormone replacement therapy in relation to risk of lobular and ductal breast carcinoma in middle-aged women.* *Cancer* 88, 2570-2577, 2000,

15. Magnusson C., Baron J.A., Correia N., Bergstrom R., Adami H.O., Persson I.: *Breast-cancer risk following long-term oestrogen- and oestrogen-progestin-replacement therapy*. Int J Cancer 81, 339-344, 1999.
16. Magnusson C., Holmberg L., Norden T., Lindgren A., Persson I.: *Prognostic characteristics in breast cancers after hormone replacement therapy*. Breast Cancer Res Treat. 38, 325-334, 1996.
17. Million Women Study Collaborators: *Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study*. Lancet 362, 419-427, 2003.
18. NAMS Report: *Amended report from the NAMS Advisory panel on postmenopausal hormone therapy*. Menopause 10, 6-12, 2003.
19. O'Connor I.F., Shembekar M.V., Shousha S.: *Breast carcinoma developing in patients on hormone replacement therapy: a histological and immunohistological study*. J Clin Pathol. 51, 935-938, 1998.
20. Position Statement of the North American Menopause Society: *Role of progestogen in hormone therapy for postmenopausal women: position statement of the North American Menopause Society*. Menopause 10, 113-132, 2003.
21. Position Statement of the North American Society of Menopause: *Estrogen and progestogen use in peri- and postmenopausal women*. Menopause 14, 1-17, 2007.
22. Ross R.K., Paganini-Hill A., Wan P.C., Pike M.C.: *Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk : estrogens versus estrogen plus progestin*. J Natl Cancer Inst. 92, 328-332, 2000.
23. Sacchini V., Zurrada S., Andreoni G., Luini A., Galimberti V., Veronesi P., Intra M., Viale G., Veronesi U.: *Pathologic and biological prognostic factors of breast cancers in short- and long-term hormone replacement therapy users*. Ann Surg Oncol. 9, 266-271, 2002.
24. Schairer C., Gail M., Byrne C., Rosenberg P.S., Sturgeon S.R., Brinton L.A., Hoover R.N.: *Estrogen replacement therapy and breast cancer survival in a large screening study*. J Natl Cancer Inst. 91, 264-270, 1999.
25. Schairer C., Lubin J., Troisi R., Sturgeon S., Brinton L., Hoover R.: *Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk*. JAMA 283, 485-491, 2000.
26. Schindler A.E., Campagnoli C., Druckmann R., Huber J., Pasqualini J.R., Schweppe K., Thijssen J.H.H.: *Aspects of progestin activity on the breast*. Maturitas; 29, 61-65, 1998.
27. The Women's Health Initiative Steering Committee: *Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy*. JAMA 291, 1701-1712, 2004.
28. Weiss L.K., Burkman R.T., Cushing-Haugen K.L., Voigt L.F., Simon M.S., Norman S.A., Bernstein L., Ursin G., Marchbanks P.A., Strom B.L., Berlin J.A., Weber A.L., Doody D.R., Wingo P.A., McDonald J.A., Malone K.E., Folger S.G., Spirtas R.: *Hormone replacement therapy regimens and breast cancer risk*. Obstet Gynecol. 100, 1148-1158, 2002.
29. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators: *Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. Principal results from the women's health initiative randomized controlled trial*. JAMA 288, 321-333, 2002.

DALL'IMAGING ANATOMICO AL MOLECOLARE

Romeo Canini, Alberto Bazzocchi, Giuseppe Battista

Sezione di Diagnostica per Immagini
Dipartimento Clinico di Scienze Radiologiche e Istocitopatologiche
Università degli Studi di Bologna

Key words: *Molecular Imaging / Imaging Molecolare*

Abstract:

Molecular imaging is a new way to look at pathological processes and disease. This emerging field aims to integrate patient-specific and disease-specific cellular and molecular information with traditional anatomical imaging readouts. The information provided by this imaging may ultimately allow for minimally invasive or noninvasive molecular diagnostic capabilities, better clinical risk stratification, more optimal selection of disease therapy, and improved assessment of treatment efficacy. Molecular imaging in radiology: the latest fad or the new frontier?

Riassunto:

L'Imaging molecolare è un nuovo modo di vedere, identificare, caratterizzare i processi patologici e le malattie, un campo emergente della medicina che mira a integrare le informazioni anatomiche tradizionali con informazioni cellulari e molecolari specifiche per patologia e paziente. Le informazioni derivate da questo imaging offrono potenzialità diagnostiche mini-invasive o del tutto non invasive che conducono a una migliore stratificazione del rischio clinico, a una scelta terapeutica più mirata e ottimizzata, perfezionando anche la valutazione dell'efficacia della terapia. Imaging molecolare in radiologia: l'ultima moda o la nuova frontiera?

La Radiologia ha il privilegio, insolito per una scienza clinica, di essere giovane e a conoscenza della sua data di nascita: 8 novembre 1895. In quella notte d'autunno Wilhelm Conrad Röntgen si propose al caso come una di quelle "menti preparate" di cui parlava il francese Luis Pasteur.

Dalla scoperta dei raggi X a oggi si è assistito a una progressiva e ininterrotta evoluzione della scienza radiologica, da sempre inevitabilmente spinta, stimolata e accompagnata dalle scoperte in campo medico e dall'innovazione tecnologica.

La capacità di evidenziare in maniera non invasiva le alterazioni anatomiche di organi e apparati causate dalle malattie ha imposto questa nuova branca della medicina nell'iter diagnostico, fin dalla sua prima discesa in campo e fino a rendere il suo ruolo sempre più irrinunciabile. In quale procedura di accertamento diagnostico oggi non interviene la radiologia?

La possibilità di applicare forme di energia diverse dai raggi X a scopi diagnostici (oltre alle altre applicazioni che sfruttano radiazioni ionizzanti in medicina nucleare, il fenomeno di risonanza magnetica nell'imaging omonimo, le onde di natura meccanica in ultrasonologia, la fluorescenza nell'imaging ottico) ha rivoluzionato la scienza radiologica e ha stimolato lo sviluppo di metodiche che oggi fanno parte di un panorama ricordato ancora, tradizionalmente e affettuosamente, come Radiologia ma più unanimemente definito e condiviso come Diagnostica per Immagini o "Imaging".

Le intuizioni fisiche alla base delle metodiche di diagnostica per immagini, con tempi e collaborazioni differenti, sono sempre state "accontentate" dallo sviluppo tecnologico e da un ventaglio di possibili applicazioni mediche da esplorare.

Il cardine su cui si è sempre appoggiata la scienza radiologica è il costante paradigma: scoperta di un principio fisico – possibili applicazioni mediche – sviluppo tecnico di una metodica. A queste intuizioni fisiche e al loro sviluppo tecnologico ha contribuito in modo determinante la nascita dell'informatica e il processo di digitalizzazione.

In Tomografia Computerizzata (TC) la tecnologia spirale e multidetettore (16... 64... 256 detettori) ha consentito un'incredibile riduzione dei tempi d'indagine e una risoluzione spaziale sub-millimetrica, illuminando la pianificazione degli interventi chirurgici e i protocolli di pronto soccorso⁽⁵⁾. La tecnologia TC flat-panel, non ancora diffusa nella pratica clinica, consente la scansione dell'intero corpo in un'unica rotazione. Parallelamente lo sviluppo tecnologico in ambito di Risonanza Magnetica (RM) ha permesso l'utilizzo di apparecchiature a campi magnetici sempre più elevati (fino a 7 T e oltre, nei centri di sperimentazione clinica). Attualmente l'alto livello di definizione

anatomica raggiunta dalle metodiche induce a pensare che la moderna diagnostica per immagini permetta quasi un'anatomia patologica in vivo.

L'accuratezza anatomica raggiunta con TC e RM ha completamente esonerato molte delle tecniche radiologiche un tempo utilizzate in fase diagnostica (ad esempio l'angiografia è oggi limitata alle procedure di radiologia interventistica). La TC attualmente consente non solo un'accuratissima visualizzazione delle coronarie e degli esiti di interventi di by-pass e di posizionamento di stent ma anche la caratterizzazione anatomico-morfologica della placca ateromasica e della riepitelizzazione con importanti vantaggi nei confronti della tradizionale coronarografia (che probabilmente passerà presto anch'essa al solo ruolo interventistico). La RM con lo studio dei flussi lenti nelle applicazioni di colangio-RM e di uro-RM permette oggi di studiare rapidamente, accuratamente e in maniera del tutto non invasiva (addirittura senza l'utilizzo di mezzi di contrasto) vie biliari e vie urinarie e, insieme all'ecografia, ha fatto dimenticare da tempo la colangiografia e altre procedure utilizzate in passato nelle fasi diagnostiche.

Il “casus belli”

La possibilità di identificare lesioni sempre più piccole a livello polmonare con la TC ha posto nuovi interrogativi sulle potenzialità di caratterizzazione dell'imaging. Ha senso identificare lesioni sub-millimetriche senza poter esprimere una valida interpretazione sulla loro natura? In determinate situazioni cliniche l'attesa di un'evoluzione dimensionale di un nodulo polmonare è un metodo oggi indicato e utilizzato ma è davvero il nostro goal?

Questo paradigmatico esempio e la conquista di nuove frontiere in campo medico, soprattutto di biologia cellulare e molecolare, hanno stimolato un nuovo approccio diagnostico alle malattie: un approccio molecolare.

L'Imaging Molecolare può essere definito come la caratterizzazione e la misurazione in vivo di processi biologici a livello cellulare e molecolare attraverso metodiche non invasive e ha lo scopo di evidenziare le basi delle alterazioni molecolari delle malattie prima che possano rendersi visibili all'imaging convenzionale gli effetti dei processi patologici.

Questo nuovo punto di vista dell'imaging sta facendo sembrare obsoleta o quantomeno inadeguata anche la definizione moderna di “diagnostica per immagini” e s'inserisce in un contesto più ampio di Medicina Molecolare che coinvolge tutte le fasi della cura del paziente: dalla prevenzione alla terapia. Ad esempio la Farmacogenomica rappresenta uno dei settori in più rapida crescita, dimostrando le potenzialità di progettazione e sintesi di nuovi farmaci basati su

informazioni genetiche e molecolari, specifici rispetto al processo patologico e all'individuo, proiettandoci in un futuro di medicina personalizzata con un'ottimizzazione dell'efficacia e degli effetti collaterali della terapia.

In linea di principio la medicina molecolare consentirebbe di formulare addirittura una diagnosi predittiva di malattia e di intervenire con una terapia geneticamente personalizzata ancor prima che i suddetti disordini determinino l'insorgenza di uno stato patologico clinicamente evidente.

La maggiore attenzione rivolta alla biologia della cellula e la rivoluzione dell'era genomica e dalla post-genomica sono state il motore di questo viraggio verso la caratterizzazione molecolare delle malattie. La diagnostica è in generale il settore maggiormente maturo della medicina molecolare; già da molti anni, metodiche molecolari, soprattutto fondate su acidi nucleici o anticorpi monoclonali e ricombinanti, sono applicate a test genetici, alla microbiologia e alla pratica clinica; il passo che si sta compiendo ora comprende anche l'analisi dei profili trascrizionali e proteici.

Tutto questo ha "ispirato" e accompagnato la diagnostica per immagini, nell'ambito della quale si sta cercando di coniugare le recenti innovazioni scientifiche con le vecchie o le nuove metodiche⁽⁶⁾.

Anatomia, funzione, metabolismo e imaging molecolare

Fin dai tempi dei pionieri della radiologia apparve importante andare oltre la semplice modificazione anatomica causata da un processo patologico e ricercare, documentare e capire la semeiotica dell'alterazione funzionale che ne derivava.

In *radiologia convenzionale*, il radiogramma tradizionale del torace non è solo espressione anatomica ma è anche funzione, per esempio del circolo polmonare. Tuttavia la radiologia convenzionale, pur rimanendo di fondamentale ausilio per la sua disponibilità, versatilità e rapidità di esecuzione dimostra, alla luce del nuovo imaging, importanti limiti nella valutazione diretta della funzione a causa delle condizioni imposte da una semeiotica quasi sempre e solo mediata dall'anatomia.

L'*ultrasonografia*, considerata da molti come il fonendoscopio del terzo millennio, ha sviluppato tecnologie sempre più portatili, "fast" and "easy", che ne vedono una versatile applicazione alla pratica clinica quotidiana. Le apparecchiature di ultima generazione consentono un'eccellente risoluzione spaziale con acquisizione di informazioni di tipo anatomico ma anche funzionale: si pensi alla possibilità di far eseguire al paziente determinati movimenti durante un esame ecografico muscoloscheletrico (è una

possibilità quasi esclusiva dell'ecografia, anche nella moderna diagnostica per immagini⁽²⁾. Le tecniche basate sull'effetto Doppler (spettro Doppler e color-Doppler) consentono inoltre di effettuare un'analisi emodinamica vascolare o di caratterizzare una lesione focale in un parenchima o ancora di valutare, per esempio, l'attività di un'artrite reumatoide o di una malattia infiammatoria e di monitorare gli effetti del trattamento (power-Doppler). Nuove tecniche come l'Elastosonografia mirano invece a un'ulteriore caratterizzazione basata sulle proprietà fisico-elastiche di tessuti e lesioni.

Un fondamentale contributo ai progressi della diagnostica per immagini è stato fornito dalla sintesi, dallo sviluppo e dall'utilizzo dei mezzi di contrasto (mdc), soprattutto endovenosi.

Tutti i **mezzi di contrasto** ideati hanno lo scopo di amplificare le caratteristiche differenze che esistono tra i tessuti sani e tra quelli sani e quelli patologici; in modo particolare essi hanno l'obiettivo di evidenziare quelle differenze che senza il supporto del mdc sarebbero, attraverso le sole proprietà fisiche della metodica, difficilmente identificabili. I mdc hanno caratteristiche fisico-chimiche differenti, dipendenti dalla metodica che supportano: in TC è necessario l'utilizzo di mdc con elementi a elevato numero atomico (alta densità – iodati), in RM lo sviluppo di mdc paramagnetici (chelati di gadolinio), in ultrasonologia la sintesi di mdc che possano offrire un'interazione meccanica utile (microbolle). Esistono mdc con una biodistribuzione quasi esclusivamente intravascolare (le microbolle in ecografia terminano il loro ciclo vitale rompendosi nel letto vascolare – rispetto al passato attualmente possono resistere a sollecitazioni meccaniche maggiori e più prolungate prima di andare incontro a rottura), altri con una prevalente distribuzione intravascolare-interstiziale (i mdc iodati in TC e Gadolinio-DTPA in RM, entrambi escreti per via renale), altri a distribuzione intracellulare (per esempio i mdc in RM a base di Mn-DPDP, a prevalente localizzazione epatocitaria ed escrezione biliare e SPIO – superparamagnetic iron-oxide, a distribuzione reticolo-endoteliale). Le metodiche moderne, grazie a tempi di acquisizione estremamente ridotti, permettono di seguire ogni fase della cinetica dei mdc, consentendo di focalizzarsi su uno studio dinamico con tempi e caratteristiche specifiche della patologia e dell'organo in esame (ad esempio lo studio trifasico del fegato)⁽¹⁰⁾. Si è venuta così a delineare una nuova semeiotica radiologica contrastografica, legata non più solo al dato morfologico ma anche all'aspetto contrastografico. In ultrasonologia la possibilità di analizzare la perfusione delle microbolle in tempo reale (angioecografia perfusionale) ha aggiunto nuovi importanti elementi per la caratterizzazione delle lesioni focali epatiche (ma anche in

altri settori) e per la valutazione delle attuali terapie anti-angiogenetiche. Esistono peraltro numerose applicazioni, tra le quali software in grado di quantificare digitalmente il contrast enhancement delle lesioni. In **TC** si sono potuti formulare validi parametri di predittività sul nodulo polmonare, analizzando la dinamica con cui il wash-in e il wash-out di mdc caratterizzano la malignità. La realizzazione di software dedicati e i ridotti tempi di acquisizione delle TC di ultima generazione hanno permesso lo sviluppo di un'analisi e di una mappatura della perfusione. Le concentrazioni di mdc sono direttamente proporzionali ai suoi valori di attenuazione e identificano nella TC lo strumento più accurato e riproducibile attualmente disponibile per lo studio della perfusione. È stata dimostrata una correlazione tra i parametri studiati in TC perfusione (flusso ematico – Blood Flow, volume ematico – Blood Volume, superficie di permeabilità – Permeability Surface, tempo di transito medio – Mean Transit Time) e il grado di neoangiogenesi, elemento caratteristico nello sviluppo di una neoplasia. In particolare la neoangiogenesi e i tessuti neoplastici sono caratterizzati da elevato Blood Flow, dovuto alla formazione di shunt artero-venosi, che a loro volta costituiscono la base per un ridotto Mean Transit Time; il Blood Volume rappresenta invece la dimensione del letto vascolare, aumentato in corso di neoangiogenesi; una Permeability Surface aumentata indica invece un leakage elevato attraverso i capillari, tipico dei tessuti neoplastici. La **TC perfusion** si configura come un valido ausilio nella caratterizzazione della neoangiogenesi neoplastica con scopi di caratterizzazione diagnostica e di follow-up post-trattamento e con un dimostrato significato prognostico e una provata utilità nella valutazione dell'efficacia delle terapie. L'applicazione della perfusion non è limitata alla sola angiogenesi ma anche a campi come quello dell'ictus ischemico. La possibilità di riconoscere precocemente la presenza di un'area ipossica di penombra, da salvare con una terapia trombolitica, è appannaggio di questa metodica, peraltro facilmente utilizzabile in regime di pronto soccorso a differenza della RM⁽³⁾.

I **mezzi di contrasto di RM** possono essere mdc paramagnetici (con aumento del segnale nelle sequenze T1 pesate ed effetto contrastografico “positivo” – le strutture che captano il mdc risaltano sul panorama anatomico circostante) o mdc superparamagnetici (con abbattimento del segnale nelle sequenze T2 pesate ed effetto contrastografico “negativo” – per esempio SPIO). Lo studio dinamico della vascolarizzazione ha prodotto anche in RM importanti risultati: si pensi ad esempio alla possibilità di caratterizzare un nodulo mammario sospetto attraverso l'analisi delle curve tempo/intensità di segnale che riproducono quantitativamente e graficamente la perfusione del mdc paramagnetico nella lesione. I primi

tentativi di andare oltre una caratterizzazione dinamica vascolare dei tessuti hanno portato alla sintesi di mdc organo-specifici come i mdc a distribuzione reticolo-endoteliale (SPIO), elettivamente captati dalle cellule del sistema reticolo-endoteliale, con nuovi elementi disponibili per la caratterizzazione soprattutto di lesioni focali in campo epatologico⁽⁴⁾. La possibilità di ottenere informazioni sulla composizione tissutale a livello cellulare ha rappresentato un importante passo in avanti nell'evoluzione dell'imaging.

Parallelamente la RM ha sviluppato tecniche in grado di acquisire informazioni metaboliche altamente affidabili. La **spettroscopia di RM** è in grado di rilevare e descrivere graficamente (in spettri) il differente segnale che gli atomi, dopo impulso polarizzante, producono a seconda della molecola a cui sono legati; con questo tipo di analisi è possibile identificare la presenza di molecole o metaboliti all'interno di un volume in esame. Le analisi spettroscopiche di RM più comuni sono la spettroscopia del protone (¹H-MRS) e quella del fosforo (³¹P-MRS). Le principali applicazioni sono a livello cerebrale, cardiaco, senologico e prostatico⁽¹¹⁾. Ad esempio a livello prostatico si individuano e quantificano: colina, poliammine (spermina e spermidina), creatina e fosfocreatina, acido citrico. Conoscendo la concentrazione di questi metaboliti si valuta la funzionalità della ghiandola prostatica e la sua eventuale trasformazione neoplastica. Si sa infatti che un aumento del picco di colina e un decremento del picco di citrato (e creatina) nello spettro sono associati a neoplasia e che esiste una relazione di proporzionalità tra l'entità delle variazioni dei suddetti metaboliti e il grado istologico (Gleason score). L'ottima risoluzione spaziale (0,3 cm³) la configura come un importante strumento di caratterizzazione chimica tissutale.

L'introduzione delle sequenze pesate in diffusione rappresenta un altro esempio di analisi RM diretta verso il metabolico e il molecolare. L'**imaging di diffusione** mappa la diffusione delle molecole d'acqua nei tessuti, caratterizzata dai moti browniani dipendenti dalla temperatura, dalla viscosità del mezzo e dalla struttura istologica. In tali sequenze l'intensità di segnale è tanto minore quanto maggiore è l'entità del fenomeno di diffusione. Ai fini diagnostici la diffusione si dimostra utile nel riconoscimento dell'edema tissutale (ictus) o di condizioni di alta cellularità (tumori). Esiste anche la possibilità di quantificare il fenomeno di diffusione attraverso la misurazione del coefficiente di diffusione apparente (apparent diffusion coefficient - ADC). La diffusione trova spazio soprattutto a livello cerebrale ma sono in fase di studio numerose applicazioni su altri organi⁽⁷⁾.

Tutte le metodiche precedentemente citate costituiscono l'anello di congiunzione con l'imaging metabolico e molecolare in senso "puro": la

tomografia a emissione di positroni (PET). L'imaging molecolare in vivo utilizza oggi gli sviluppi più avanzati delle moderne metodiche di diagnostica per immagini, che si dividono in metodiche nate fundamentalmente anatomico-morfologiche (US, TC, RM) e metodiche concepite e sviluppate, fin dalla loro introduzione, in senso funzionale, metabolico e molecolare (PET e tecniche di medicina nucleare, imaging ottico e applicazioni di RM con spettroscopia o con mdc o sonde mirate).

La **PET** è la metodica di imaging molecolare più diffusamente utilizzata nella pratica clinica attuale e presenta campi di applicazione in oncologia, neurologia e cardiologia⁽⁹⁾. Essa permette una valutazione e quantificazione diretta del metabolismo tissutale. Il radiofarmaco più utilizzato in PET è il ¹⁸F-Fluorodesossiglucosio (FDG) che analizza il metabolismo glucidico ma sono a disposizione taccianti per il metabolismo proteico (¹¹C-Metionina, ¹¹C-Tirosina etc.), dei fosfolipidi di membrana (¹¹C-Colina, ¹¹C-Acetato etc.), di assetto recettoriale (ad esempio ⁶⁸Ga-DOTA-NOC per i recettori della somatostatina), di proliferazione cellulare (¹⁸F-Fluorotimidina) etc. Le potenzialità di studio molecolare e delle differenti vie metaboliche espresse hanno rivoluzionato l'approccio diagnostico e la valutazione della terapia. In campo oncologico la PET è fondamentale in tutti i momenti della diagnosi: identificazione e caratterizzazione, stadiazione, valutazione della risposta alla terapia e follow-up. Con tale metodica è possibile valutare le caratteristiche metaboliche di una lesione e in alcuni casi fornire importanti elementi di predittività sull'aggressività della lesione e sulla prognosi di malattia. I tumori a più alta malignità sono quelli a più bassa differenziazione e a più attivo metabolismo cellulare: la PET offre la possibilità di identificare una lesione ad aumentato metabolismo e di quantificarne l'alterazione attraverso parametri semi-quantitativi come lo standard uptake value (SUV), che consente di esprimere una valutazione di natura e di aggressività della lesione. Il SUV rappresenta quindi un indice prognostico e le lesioni che presentano un SUV elevato sono più probabilmente correlate con un maggior rischio di recidiva, di metastatizzazione e di malignità. Quella che prima era una valutazione dimensionale e morfologica della risposta a un agente chemioterapico (criteri RECIST), alla luce delle nuove potenzialità dell'imaging, risulta oggi inadeguata e insufficiente. La risposta alla terapia di una lesione tumorale non è sempre o immediatamente correlata alla riduzione o alla variazione volumetrica di questa. Naturalmente la PET non è esente da falsi positivi e presenta molti margini di miglioramento in funzione dell'avanzamento tecnico (con cristalli a sempre più elevata risoluzione spaziale) e della sintesi di nuovi radiofarmaci, con l'esplorazione di nuove e sempre più "raffinate"

vie metaboliche. Nonostante l'elevato metabolismo glucidico cerebrale in condizioni fisiologiche, la PET si è dimostrata molto utile anche sul versante neurologico. Si susseguono infatti evidenze in letteratura sugli avanzamenti nel campo delle malattie degenerative e delle demenze. È noto come la PET con FDG sia inadeguata nelle valutazioni cerebrali di tipo oncologico (per le quali si preferiscono analisi che permettano il riconoscimento di una lesione con metabolismo diverso da quello del parenchima che la circonda – ad esempio lo studio del metabolismo proteico della metionina a livello encefalico) ma anche di quanto e come sia utile per una valutazione del metabolismo cerebrale e dei suoi difetti in patologie come il morbo di Alzheimer o il morbo di Parkinson; anche a questo livello l'evoluzione dei radiofarmaci, sempre più specifici e mirati alla patologia (^{11}C -PIB per l'Alzheimer, ^{18}F -Florodopa per il Parkinson), è stata fondamentale nell'avanzamento diagnostico.

L'evoluzione delle tecniche di diagnostica per immagini ha portato anche alla fusione delle differenti tecnologie in metodiche ibride di estrema utilità clinico-diagnostica: la capostipite è la **TC-PET**, apparecchiatura costituita dalla fusione di TC e PET, con indiscutibili vantaggi (in primis di localizzazione spaziale delle lesioni rilevate dalla PET ma anche di contemporanea caratterizzazione anatomo-morfologica – TC e metabolica – PET). Sono da menzionare anche, tra le più recenti innovazioni in questo campo, la costruzione delle prime RM-PET (non ancora entrate in commercio, che potranno offrire un compendio di caratterizzazione imaging-molecolare) e altre applicazioni di “fusion-imaging”, come le applicazioni di navigazione virtuale che permettono di sovrapporre e mettere in parallelo, in tempo reale, l'esame ecografico che si sta effettuando con le immagini precedentemente acquisite sullo stesso paziente in TC o RM, rendendo più agevoli e sicure molte manovre interventistiche eco-guidate. Non è da dimenticare infatti come a tutti gli avanzamenti a livello diagnostico e tecnico siano seguiti importanti conquiste in campo interventistico (procedure eco-TC- o RM-guidate e nuove e sempre più performanti sale angiografiche). Si pensi ad esempio alla possibilità di effettuare una procedura di vertebroplastica TC-guidata, con tecnica fluoro-TC, visualizzando in tempo reale e con una panoramica anatomica ideale come e dove diffonde il cemento mentre viene iniettato nella vertebra collassata (come in una “radioscopia” TC).

L'**Imaging Ottico** (Optical Imaging) è una metodica basata sulla possibilità di rilevare la luce emessa dai corpi tramite il fenomeno della bioluminescenza o quello della fluorescenza. La bioluminescenza è un fenomeno che si basa sulla luciferina ed è pressoché confinato all'utilizzo in ambito pre-clinico. La fluorescenza si basa invece sull'utilizzo dei fluorocromi, molecole che,

se stimulate da luce di una determinata lunghezza d'onda, sono in grado di emettere luce di una lunghezza d'onda differente e rilevabile (le near infrared – NIR sono le più utilizzate per la maggiore penetrazione tissutale). I fluorocromi coniugati con molecole di interesse possono essere utilizzati come traccianti di Optical Imaging. I principali limiti di tale metodica derivano dall'attenuazione tissutale della luce emessa (l'assorbimento aumenta all'aumentare della profondità, con conseguente riduzione delle possibilità di analisi) e dalle difficoltà nel quantificare l'entità dell'assorbimento della radiazione luminosa. Ancora non sono completamente chiare le possibilità e le potenzialità di trasferimento delle tecniche di Optical Imaging nella pratica clinica sull'uomo⁽¹⁾. Risultati positivi sono stati acquisiti nello studio di neoplasie di organi superficiali: mammella, encefalo nel neonato, cute, mucosa colica e della cavità orale.

L'importanza della *ricerca pre-clinica* in campo di imaging molecolare è fondamentale e si sviluppa con sperimentazioni condotte principalmente su animali di piccola taglia, soprattutto topi e ratti (ma anche conigli e primati) e con metodiche spesso dedicate (microTC, microPET, microRM). I campi di ricerca sono numerosissimi ma il motore principale è costituito dall'oncologia, seguito dalla cardiologia: caratterizzazione dei processi neoplastici, sperimentazione di farmaci, trafficking/targeting cellulare, gene/drug delivery etc.

In conclusione il mondo, e in particolare quello della radiologia, assiste oggi a una rivoluzione copernicana che sta conducendo a un imaging sempre più mirato e “personalizzato”. Imaging molecolare in radiologia: l'ultima moda o la nuova frontiera⁽⁸⁾? La risposta sembra evidente.

BIBLIOGRAFIA

1. Bremer C., Ntziachristos V., Weissleder R.: *Optical-based molecular imaging: contrast agents and potential medical applications*. Eur Radiol 13, 231-243, 2003.
2. Bureau N.J., Beauchamp M., Brassard P.: *Dynamic sonography evaluation of shoulder impingement syndrome*. AJR Am J Roentgenol 187,216-220, 2006.
3. Gasparotti R., Grassi M., Mardighian D., Frigerio M., Pavia M., Liserre R., Magoni M., Mascaro L., Padovani A., Pezzini A.: *Perfusion CT in patients with acute ischemic stroke treated with intra-arterial thrombolysis: predictive value of infarct core size on clinical outcome*. AJNR Am J Neuroradiol 2009 Jan [Epub ahead of print].
4. Hanna R.F., Kased N., Kwan S.W., Gamst A.C., Santosa A.C., Hassanein T., Sirlin C.B.: *Double-contrast MRI for accurate staging of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis*. AJR Am J Roentgenol 190,47-57, 2008.
5. Hein P.A., Romano V.C., Lembcke A., May J., Rogalla P.: *Initial experience with a chest pain protocol using 320-slice volume MDCT*. Eur Radiol 2009 Jan [Epub ahead of print].
6. Hoffman J.M., Gambhir S.S.: *Molecular imaging: the vision and opportunity for radiology in the future*. Radiology 244,39-47, 2007.
7. Koh D.M., Collins D.J.: *Diffusion-weighted MRI in the body: applications and challenges in oncology*. AJR Am J Roentgenol 188,1622-1635, 2007.
8. Krestin G.P., Bernsen M.R.: *Molecular imaging in radiology: the latest fad or the new frontier?* Eur Radiol 16,2383-2385, 2006.
9. Mittra E., Quon A.: *Positron emission tomography/computed tomography: the current technology and applications*. Radiol Clin North Am 47,147-160, 2009.
10. Quaia E., Alaimo V., Baratella E., Medeot A., Midiri M., Cova M.A.: *The added diagnostic value of 64-row multidetector CT combined with contrast-enhanced US in the evaluation of hepatocellular nodule vascularity: implications in the diagnosis of malignancy in patients with liver cirrosi*. Eur Radiol 19,651-663, 2009.
11. Testa C., Schiavina R., Lodi R., Salizzoni E., Corti B., Farsad M., Kurhanewicz J., Manferrari F., Brunocilla E., Tonon C., Monetti N., Castellucci P., Fanti S., Coe M., Grigioni W.F., Martorana G., Canini R., Barbiroli B.: *Prostate cancer: sextant localization with MR imaging, MR spectroscopy, and 11C-choline PET/CT*. Radiology 244,797-806, 2007.

L'INTERVENTISTICA CARDIOLOGICA NELLA PREVENZIONE E NEL TRATTAMENTO DELLO STROKE ISCHEMICO

Patrizia Presbitero, Veronica Lisignoli

Unità Operativa di Emodinamica e Cardiologia Interventistica
Istituto Clinico Humanitas Mirasole - Rozzano (MI)

Key words: *Ischemic stroke / Ictus ischemico*
Interventional cardiology / Cardiologia interventistica
Atrial fibrillation / Fibrillazione atriale
Patent foramen ovale / Forame ovale pervio
Carotid atherosclerosis / Aterosclerosi carotidea
Acute ischemic stroke / Ischemia cerebrale acuta

Abstract:

Cerebrovascular disease is a leading cause of death and disability worldwide and is a major contributor to rising healthcare costs. According to the American Stroke Association, 85% of strokes are ischemic. The most common causes of ischemic stroke are represented by: atherosclerotic cerebrovascular disease, cardioembolic and cryptogenic sources. Interventional cardiologists have joined the fight to reduce first-time and recurrent stroke by developing percutaneous techniques to treat obstructive carotid atherosclerosis and atrial fibrillation and to prevent paradoxical embolism resulting from patent foramen ovale and systemic embolization of left atrial appendage thrombus.

The goal of this article is to provide an overview of the role of interventional cardiology in prevention and treatment of ischemic stroke.

Riassunto:

La malattia cerebrovascolare è oggi la più importante causa di morte e disabilità in tutto il mondo occidentale determinando un costo notevole per la salute pubblica. Secondo gli ultimi dati dell'American Stroke Association, l'85% degli eventi cerebrovascolari sono di origine ischemica. Le cause più comuni di ictus ischemico sono rappresentate da: la malattia aterosclerotica cerebrovascolare, le fonti cardioemboliche e l'ictus criptogenico. Negli ultimi anni la cardiologia interventistica attraverso l'implemento delle tecnologie ha sviluppato approcci innovativi per il trattamento della malattia

aterosclerotica carotidea, per la prevenzione dell'embolia paradossa attraverso il forame ovale pervio e del cardioembolismo sistemico di trombi in auricola sinistra.

Il presente articolo illustra le nuove frontiere della cardiologia interventistica nella prevenzione e nel trattamento dello stroke ischemico.

INTRODUZIONE

L'ictus cerebrale è la prima causa di disabilità nel mondo occidentale e la terza causa di morte. Gli episodi ischemici cerebrali ripetuti costituiscono la seconda causa di demenza nella popolazione generale.

Tale dato è destinato ad aumentare in relazione al progressivo invecchiamento della popolazione generale. L'incidenza del primo ictus cerebrale aumenta in modo esponenziale dopo la quinta decade e senza alcuna differenza statisticamente significativa tra i due sessi (Figura 1).

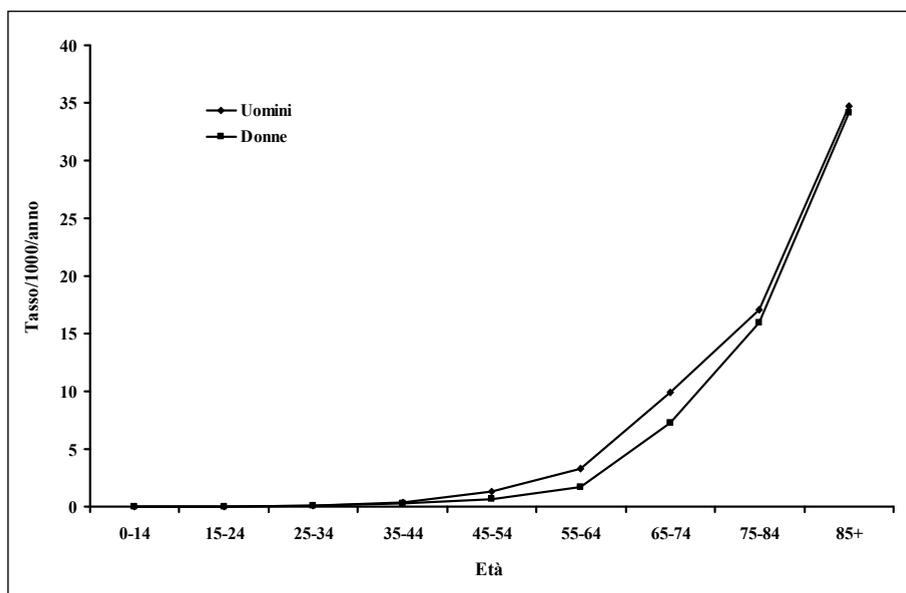


Figura 1. Incidenza del primo ictus (292/100.000) [I dati nazionali di prevalenza e di incidenza sono ricavati soprattutto dallo studio ILSA (Italian Longitudinal Study on Aging)].

La patogenesi della malattia cerebrovascolare si divide in due grandi gruppi: l'ictus ischemico, che è di gran lunga prevalente (85%), e l'ictus emorragico (15%)^(1,16).

Le cause principali di **ictus ischemico** sono rappresentate dalla malattia aterosclerotica cerebrovascolare (20%), dall'embolia (20%), dalle lesioni lacunari (25%) e in un 30% dei casi la causa rimane sconosciuta (ictus criptogenico).

L'**ictus emorragico** è causato in pari misura dall'emorragia subaracnoidea (51%) e dall'emorragia intracranica (49%).

A causare l'ischemia cerebrale è nel 60-80% dei casi un'occlusione tromboembolica dei vasi cerebrali: l'origine può essere l'atrio/auricola sinistri in corso di fibrillazione atriale (FA), placche complicate in sede carotidea, stenosi di vasi intracranici o l'embolia paradossa in presenza di un forame ovale pervio.

Cosa può fare il cardiologo interventista?

La **fibrillazione atriale (FA)** aumenta il rischio di ictus ischemico da 2 a 7 volte rispetto alla popolazione generale: la sua prevalenza (0.4-1%) aumenta con l'aumentare dell'età e con l'invecchiamento della popolazione generale la sua incidenza è destinata ad aumentare (si stima che nella popolazione sopra i 70 anni la prevalenza sia del 10%)⁽⁸⁾ (Figura 2). Inoltre il rischio emorragico correlato alla terapia anticoagulante in corso di FA in assenza di valvulopatie è 1.2% per anno⁽⁷⁾.

Il cardiologo interventista può agire su due fronti: da una parte può prevenire o rallentare la dilatazione atriale sinistra, come conseguenza di una stenosi valvolare mitralica, mediante la procedura di valvuloplastica mitralica percutanea per via anterograda tramite puntura transettale; dall'altra parte oggi ha a disposizione vari dispositivi per la chiusura dell'auricola sinistra che, come dimostrato da studi ecocardiografici, rappresenta la più importante fonte emboligena in corso di FA (70% dei casi). I dispositivi odierni sono in nitinolo

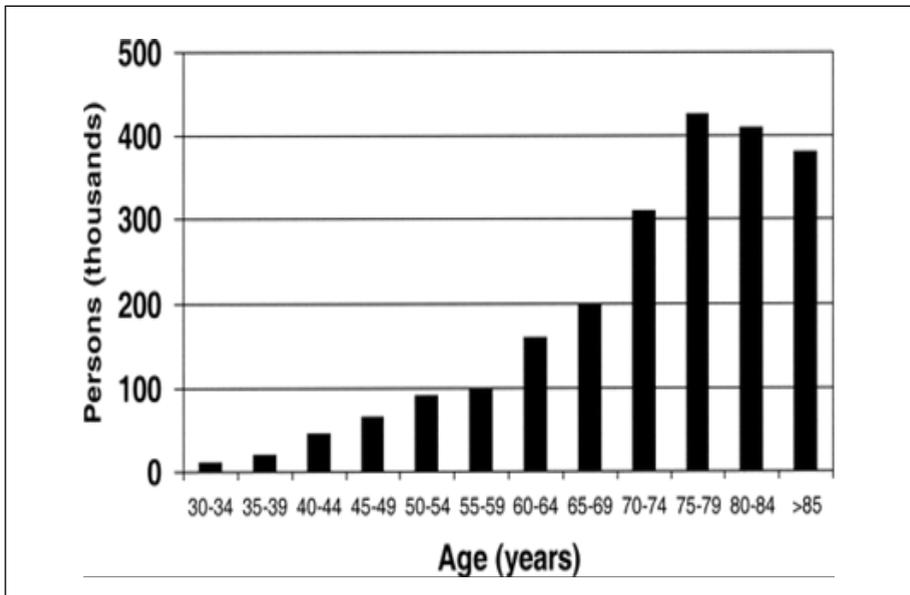


Figura 2. Prevalenza di FA nella popolazione generale in base all'età.

ed autoespandibili e vengono posizionati all'ingresso dell'auricola sinistra dopo averne accuratamente misurate le dimensioni. Uno studio multicentrico, il PROTECT-AF, ha arruolato più di 1000 pazienti con FA e li ha randomizzati a terapia anticoagulante orale con Coumadin o all'impianto con il dispositivo meccanico Watchman: con l'impianto di quest'ultimo si è registrata una riduzione di eventi del 32%, riportando tuttavia una complicanza maggiore nel corso della procedura nel 12% dei casi e una trombosi sul dispositivo nel 3.7% dei casi⁽⁴⁾. Il campo sta rapidamente evolvendo con dispositivi nuovi e più affidabili che potrebbero rappresentare nel futuro una valida alternativa alla terapia anticoagulante orale.

La prevalenza del **forame ovale pervio (FOP)** nella popolazione generale è circa del 25%: un quarto della popolazione sarebbe potenzialmente a rischio di episodi di tromboembolia paradossa (un trombo a cavallo del FOP è stato occasionalmente riportato in studi ecocardiografici o autoptici). Fonti emboligene principali sono la trombosi venosa profonda (10-50%) e la trombosi delle vene del distretto pelvico (20%). Una correlazione epidemiologica tra ictus criptogenico e presenza del FOP, in particolar modo FOP associato ad aneurisma del setto interatriale (ASA: escursione del setto interatriale maggiore di 10 mm) è stata sottolineata da numerosi studi che hanno dimostrato soprattutto che nell'ictus ischemico giovanile (età < 55 anni) l'associazione di FOP e ASA aumenta il rischio di 15 volte rispetto alla popolazione generale^(6,13). Oltre alla presenza di ASA, altre caratteristiche cliniche ed anatomiche aumentano il rischio di ictus criptogenico: l'ampiezza del FOP, il grado di shunt destro-sinistro, la presenza di residui embrionari come la valvola di Eustachio e la rete di Chiari o una lipomatosi del septum secundum^(2,11). Inoltre la presenza di un assetto trombofilico (alterazioni nella cascata della coagulazione sono presenti fino al 35% nella popolazione generale) può aumentare il rischio di embolia paradossa attraverso il FOP o la formazione di trombi all'interno del tunnel tra septum primum e septum secundum⁽¹²⁾.

Nel nostro Istituto dal 2004 al 2007 sono stati trattati per via percutanea 202 pazienti con pervietà del forame ovale: in base alle caratteristiche anatomiche rilevate mediante ecocardiografia transesofagea sono stati impiantati dispositivi diversi in modo tale da ottimizzare la chiusura del FOP, ridurre la presenza di shunt residuo interatriale e prevenire nuovi eventi ischemici cerebrali al follow up. Varianti anatomiche del FOP comprendono:

- 1) FOP semplice o con meccanismo a valvola
- 2) ridondanza del septum primum di vario grado (pseudoaneurismatico, aneurismatico o interamente sbandierante)

- 3) septum primum cribroso
- 4) FOP tunnelizzato (almeno 10 mm di tunnel tra septum primum e secundum)
- 5) septum secundum lipomatoso

Il cardiologo interventista ha a disposizione diversi dispositivi di chiusura che possono adattarsi ad ogni tipo di FOP: dispositivi autocentranti e multifenestrati che permettono di incarcerare meglio un septum primum ridondante, dispositivi che mediante un connecting waist regolabile hanno la possibilità di adattarsi a FOP tunnelizzati o dispositivi a elica che oltre ad avere un più basso contenuto in nichel hanno la possibilità di agganciarsi meglio in caso di assenza o piccolo bordo aortico.

Complicanze periprocedurali maggiori (1.5%) includono eventi ischemici cerebrali transitori (0.6%), distacco del dispositivo (0.3%), versamento pericardico (< 1%) ed embolia polmonare (< 1%). Per quanto riguarda le complicanze minori (7.9%) possiamo includere il sopralivellamento transitorio del tratto ST, aritmie atriali (prevalentemente flutter ed FA transitori), ematomi in sede di cateterismo, formazione di trombi sul dispositivo di chiusura, malposizionamento del dispositivo o incompleta chiusura del difetto⁽⁹⁾. In un caso si è manifestata una HIT (Heparin Induced Thrombocytopenia) con trombosi venosa profonda ed embolia polmonare massiva che ha necessitato dell'impianto di un filtro cavale.

Oltre all'ictus criptogenico, il FOP sembra implicato tra i vari meccanismi alla base dell'emicrania con aura: la presenza di una comunicazione interatriale infatti favorirebbe il passaggio sistemico di sostanze vasoattive sul circolo cerebrale oltrepassando il circolo polmonare che funge normalmente da "filtro". L'unico studio che ha studiato la correlazione tra FOP ed emicrania con aura è il MIST I (Migraine Intervention With STARFlex Technology): da questo trial è emerso che nella metà dei casi sottoposti a chiusura percutanea del FOP si aveva una riduzione sia del numero di episodi mensili che dell'intensità degli attacchi emicranici; nell'altra non vi era nessun miglioramento⁽³⁾.

Sono attualmente in corso numerosi trial randomizzati che metteranno a confronto la chiusura transcateretere del FOP con la terapia medica (RESPECT, CLOSURE I, CARDIA-FOP, PC TRIAL).

In attesa dei risultati di questi studi, attualmente le indicazioni alla chiusura percutanea del FOP sono:

- 1) storia di ictus cerebrale associato a manovra di Valsalva o apnea notturna
- 2) evidenza di trombosi venosa profonda (fino al 57%)

Un'altra fonte di stroke ischemico (circa il 20% dei casi) è rappresentata dall'embolizzazione di trombo o di materiale aterotrombogeno a partenza da **placche carotidiche**, più spesso localizzate a livello della biforcazione tra carotide esterna ed interna. Molto si è detto in questi anni sull'impiego dello stent per dilatare le carotidi come alternativa alla tecnica chirurgica mediante aterectomia al fine di prevenire gli eventi ischemici cerebrali. Nei centri ad alto volume la percentuale di complicanze cerebrali dopo stenting carotideo è nell'ordine del 2-3%, sovrapponibile a quello della chirurgia. I risultati sono andati nettamente migliorando nel corso degli anni (Figura 3) grazie all'impiego di cateteri piccoli e flessibili, di stent a celle strette e dispositivi di protezione cerebrale distale con filtri (Figura 4) che intercettano le particelle che si liberano dall'ateroma quando viene schiacciato dallo stent. Questi ultimi insieme con la protezione prossimale (sistema di interruzione del flusso con inversione del circolo cerebrale) hanno dato il massimo contributo (Figura 5) alla riduzione delle complicanze periprocedurali⁽¹⁹⁾.

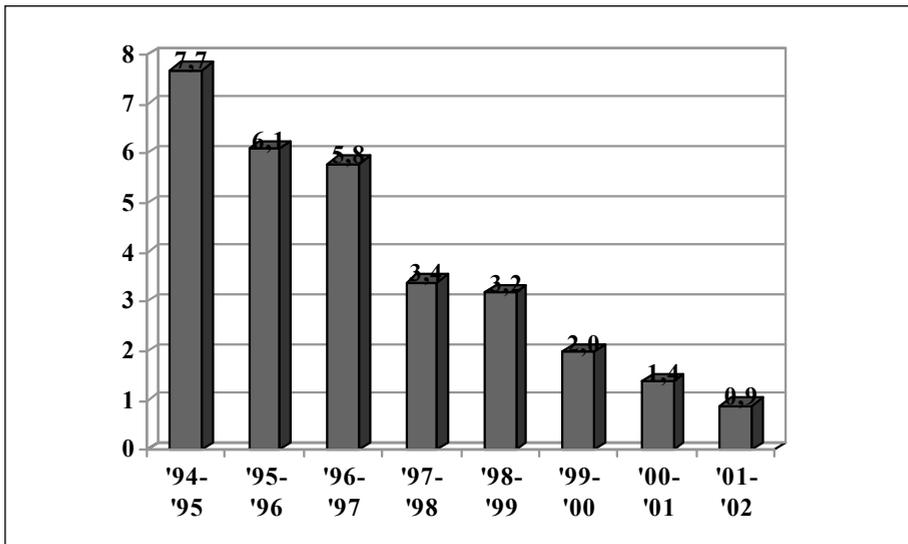


Figura 3. Percentuale di complicanze cerebrali dopo stenting carotideo.

Pochi studi randomizzati sono stati fatti, con risultati contraddittori. Lo studio SAPPHERE del 2004⁽¹⁸⁾ ha randomizzato 334 pazienti con stenosi critica carotidea e caratteristiche ad alto rischio (pregressi infarti cardiaci, diabete mellito, ipertensione, etc.) a stenting carotideo o endoarterectomia chirurgica:

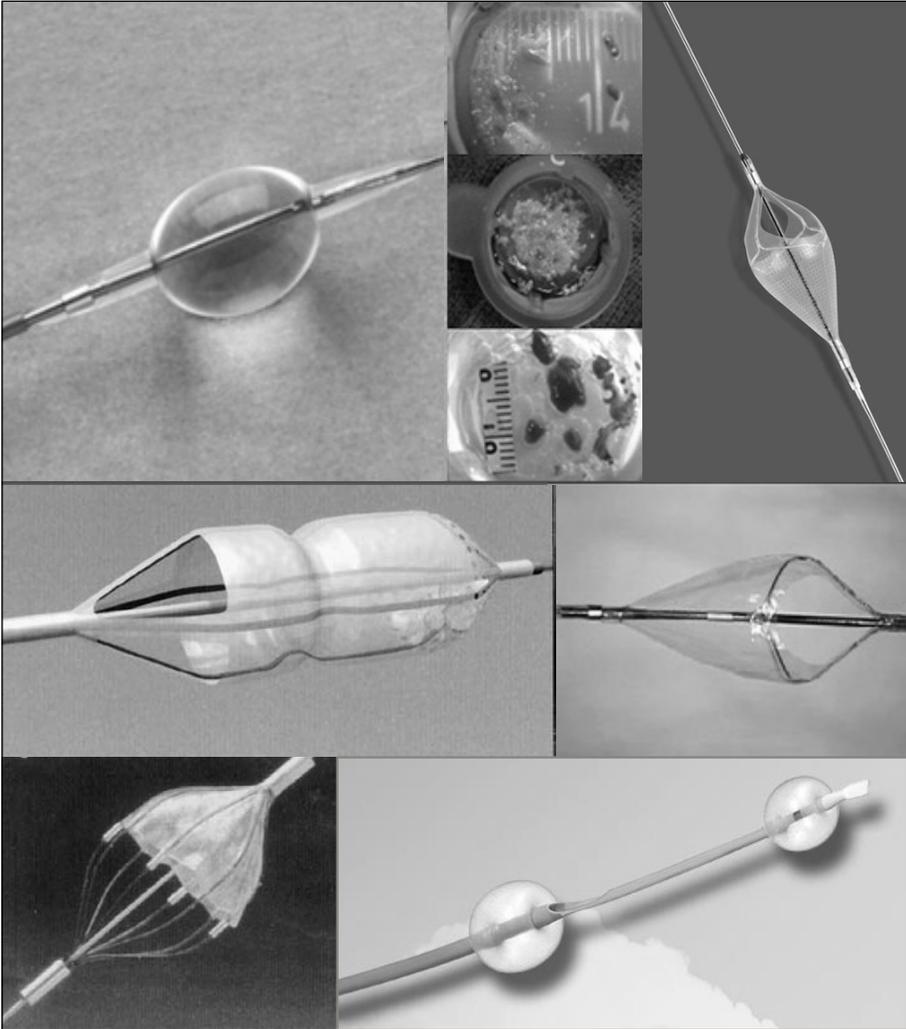


Figura 4. Sistemi di protezione cerebrale distale e prossimale.

a un anno gli endpoint combinati di morte, stroke e infarto erano 10.5% nel gruppo trattato con stent e 20.3% nel gruppo trattato con aterectomia chirurgica (Figura 6).

Al contrario lo SPACE trial ha dimostrato a 30 giorni in 1200 pazienti randomizzati con stenosi carotidea sintomatica, l'incidenza di stroke e morte del 6.34% nel gruppo chirurgico e del 6.84% nel gruppo trattato per via percutanea con stent⁽¹⁷⁾.

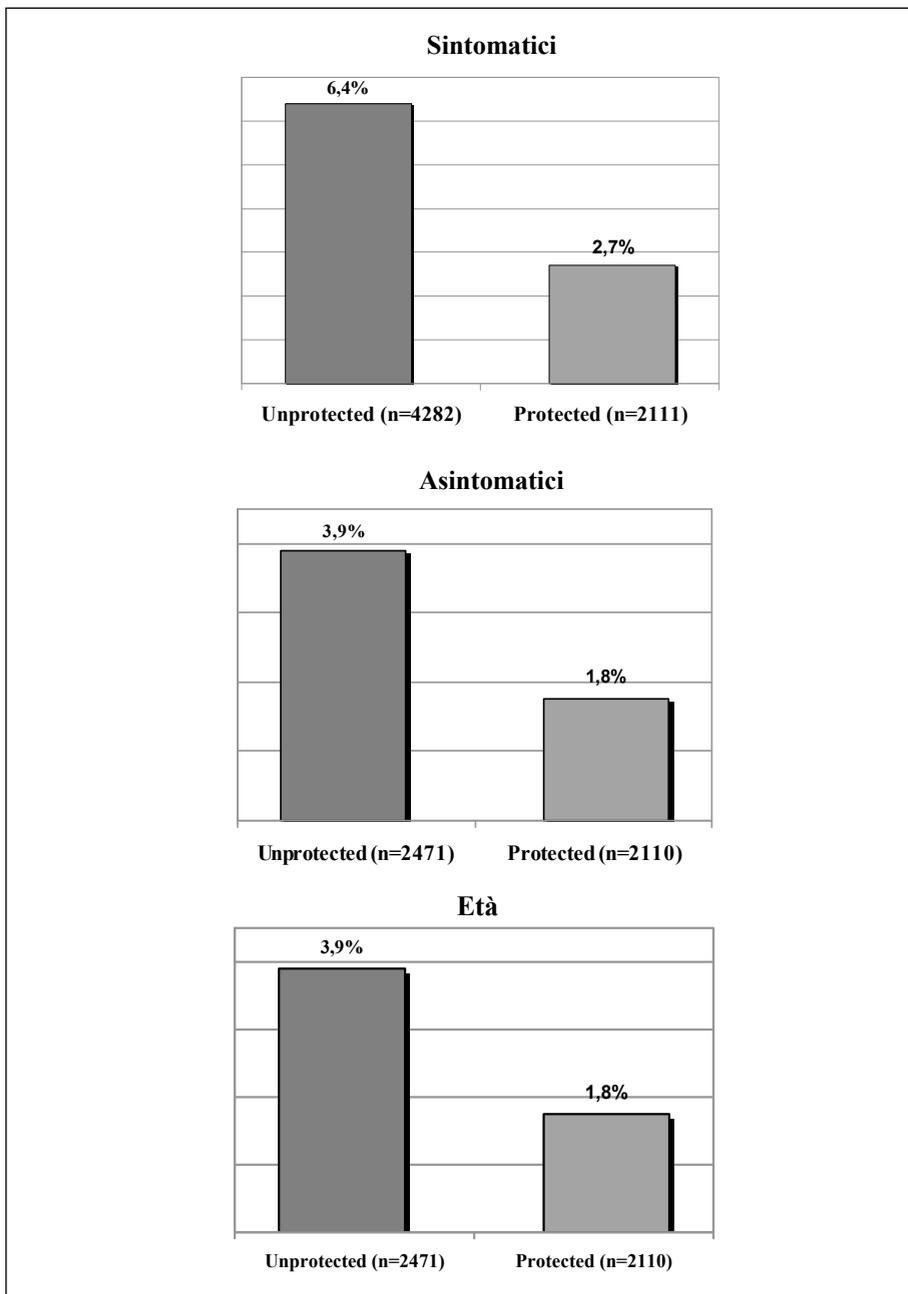


Figura 5. Percentuale di stroke a 30 giorni e morte periprocedurale dopo impianto di stent carotideo con e senza dispositivi di protezione distale in pazienti sintomatici e asintomatici⁽¹³⁾.



Figura 6. Incidenza cumulativa di eventi avversi maggiori (morte, stroke ed infarto miocardico) ad un anno dalla procedura (stenting carotideo vs endoarterectomia chirurgica).

Infine EVA-3S trial con 530 pazienti randomizzati ha mostrato una incidenza di mortalità e stroke a 30 giorni tre volte superiore nei pazienti trattati con stent (da sottolineare che in questo studio agli emodinamisti che praticavano tale procedura era richiesto un training di soli 10 casi)⁽¹⁰⁾. Vi sono molti altri studi in corso, tra questi CREST, ACT1 e ACST 2 in pazienti sintomatici o asintomatici tesi a valutare meglio il ruolo dello stenting carotideo nel trattamento di tali pazienti.

Al momento non vi sono chiare linee guida su quando sia indicato il trattamento con stenting o chirurgia. Si applicano quindi di fronte a una stenosi carotidea per un'eventuale prevenzione di stroke le linee guida utilizzate per l'endoarterectomia carotidea, che sono: trattamento di pazienti con stenosi carotidea sintomatici in centri che abbiano una morbilità e mortalità all'intervento minore del 6% e trattamento di pazienti asintomatici quando il rischio dell'intervento sia inferiore al 3%.

L'ultimo e più recente contributo della cardiologia interventistica al trattamento della malattia cerebrovascolare nello stroke acuto dovuto ad embolia/trombosi delle arterie cerebrali è la ricanalizzazione di vasi occlusi. Questo può avvenire con l'infusione in situ (all'interno del trombo) di trombolitici o inibitori dei recettori piastrinici IIb/IIIa o con disostruzione meccanica mediante strumenti (guide, palloni, stent) del tutto simili a quelli utilizzati nel trattamento endovascolare dell'infarto miocardico acuto⁽¹⁴⁾.

L'esperienza in questo campo è estremamente limitata sia per l'accesso alle cure mediche molto tardivo dei pazienti con ictus, sia per la scarsa disponibilità immediata di strumenti diagnostici per rilevare l'occlusione dell'arteria intracranica (Doppler transcranico, RMN cerebrale) al primo contatto medico, sia infine per la mancanza di laboratori attrezzati ed operatori esperti.

Criteri di inclusione	<ul style="list-style-type: none"> • Deficit neurologico ad esordio acuto attribuibile ad ictus cerebrale • Età compresa fra i 18 e gli 80 anni • È possibile iniziare il trattamento EV entro 3 ore • È possibile iniziare il trattamento IA entro 6 ore • Il paziente può essere randomizzato entro 3 ore • È disponibile un neuroradiologo interventista
Criteri di esclusione	<ul style="list-style-type: none"> • Ictus cerebrale di grave entità, sulla base di valutazioni cliniche (es. NIHSS>25) e/o di adeguate tecniche di imaging • Rapido miglioramento di deficit neurologico minore • Presentazione clinica suggestiva per emorragia subaracnoidea (anche se TC encefalo negativa) • Crisi comiziali all'esordio • Coma all'esordio • Ictus cerebrale nei 3 mesi precedenti • Qualsiasi storia di ictus cerebrale e diabete mellito concomitante • Intervento chirurgico maggiore o trauma grave negli ultimi 3 mesi • Sanguinamento recente o in atto, grave o pericoloso • Diatesi emorragica nota • Pazienti in trattamento con anticoagulanti orali • Somministrazione di eparina entro le 48 ore precedenti ed un valore di aPTT eccedente il normale limite superiore per il laboratorio • Recente (<10 giorni) massaggio cardiaco esterno, parto, o puntura di un vaso sanguigno non comprimibile

Tabella I. Criteri di inclusione ed esclusione dello studio randomizzato italiano SYNTHESES.

Il PRO ACT II è l'unico studio che ha randomizzato 180 pazienti con occlusione della cerebrale media con arrivo entro le 6 ore dall'inizio dei sintomi a terapia conservativa versus trombolisi intrarteriosa e ha dimostrato un beneficio del trattamento endovascolare⁽¹⁵⁾.

Allo stesso modo il MERCI e MultiMERCi trials hanno mostrato che il trattamento endovascolare meccanico con tromboembolectomia nei pazienti con stroke acuto presentatesi entro le 8 ore e l'occlusione di un grosso vaso (carotide terminale, arteria cerebrale media, arterie vertebro-basilari) avevano risultati in termini di recupero funzionale e mortalità a 90 giorni significativamente migliori in confronto a pazienti non trattati invasivamente⁽⁵⁾.

Sono in corso studi randomizzati di confronto, in particolare uno studio italiano, il SYNTHESIS, tra trombolisi sistemica endovenosa e trombolisi intrarteriosa, che potrebbero dare una risposta sulla posizione che dovrà occupare nel futuro l'interventistica nel trattamento acuto della malattia cerebro-vascolare (Tabella 1).

BIBLIOGRAFIA

1. Albers G.W., Easton J.D., Sacco R.L., Teal P.: *Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke*. Chest 114, 683S-698S, 1998.
2. Di Tullio M.R., Sacco R.L., Sciacca R.R., Jin Z., Homma S.: *Patent foramen ovale and the risk of ischemic stroke in a multiethnic population*. JACC 49, 797-802, 2007.
3. Dowson A., Mullen M.J., Peatfield R., Muir K., Khan A.A., Wells C., Lipscombe S.L., Rees T., De Giovanni J.V., Morrison W.L., Hildick-Smith D., Elrington G., Hillis W.S., Malik I.S., Rickards A.: *Migraine Intervention With STARFlex Technology (MIST) Trial: A Prospective, Multicenter, Double-Blind, Sham-Controlled Trial to Evaluate the Effectiveness of Patent Foramen Ovale Closure With STARFlex Septal Repair Implant to Resolve Refractory Migraine Headache*. Circulation 117, 1397-1404, 2008.

4. Fountain R.B., Holmes D.R., Chandrasekaran K., Packer D., Asirvatham S., Van Tassel R., Turi Z.: *The PROTECT AF (WATCHMAN Left Atrial Appendage System for Embolic PROTECTION in Patients with Atrial Fibrillation) trial*. Am. Heart. J. 151, 956-61, 2006.
5. Gobin Y.P., Starkman S., Duckwiler G.R., Grobelny T., Kidwell C.S., Jahan R., Pile-Spellman J., Segal A., Vinuela F., Saver J.L.: *MERCI I: a phase I study of Mechanical Embolus Removal in Cerebral Ischemia*. Stroke 35, 2848-54, 2004.
6. Handke M., Harloff A., Olschewski M., Hetzel A., Geibel A.: *Patent foramen ovale and cryptogenic stroke in older patients*. NEJM 357, 2262-8, 2007.
7. Hart R.G., Halperin J.L.: *Atrial fibrillation and thromboembolism: a decade of progress in stroke prevention*. Ann. Intern. Med. 131, 688-95, 1999.
8. Kannel W.B., Abbott R.D., Savage D.D., McNamara P.M.: *Coronary heart disease and atrial fibrillation: the Framingham Study*. Am. Heart J. 106, 389-96, 1983.
9. Khairy P., O'Donnel C.P., Landzberg M.J.: *Transcatheter closure versus medical therapy of patent foramen ovale and presumed paradoxical thromboemboli. A systematic review*. Ann. Intern. Med. 139, 753-760, 2003.
10. Mas J.L., Chatellier G., Beyssen B., Branchereau A., Moulin T., Becquemin J.P., Larrue V., Lièvre M., Leys D., Bonneville J.F., Watelet J., Pruvo J.P., Albucher J.F., Viguier A., Piquet P., Garnier P., Viader F., Touzé E., Giroud M., Hosseini H., Pillet J.C., Favrole P., Neau J.P., Ducrocq X.: *EVA-3S Investigators. Endarterectomy versus stenting in patients with symptomatic severe carotid stenosis*. NEJM 355, 1660-71, 2006.
11. Meissner I., Khandheria B.K., Heit J.A., Petty G.W., Sheps S.G., Schwartz G.L., Whisnant J.P., Wiebers D.O., Covalt J.L., Petterson T.M., Christianson T.J., Agmon Y.: *Patent foramen ovale: innocent or guilty?* J. Am. Coll. Cardiol. 47, 440-445, 2006.
12. Nendaz M.R., Sarasin F.P., Junod A.F., Bogousslavsky J.: *Preventing stroke recurrence in patients with patent foramen ovale: antithrombotic therapy, foramen closure, or therapeutic abstention? A decision analytic perspective*. Am. Heart J. 135, 532-41, 1998.
13. Overell J.R., Bone I., Lees K.R.: *Interatrial septal abnormalities and stroke: a meta-analysis of case-control studies*. Neurology 55, 1172-9, 2000.
14. Presbitero P., Gasparini G.L., Pagnotta P.: *Intra-arterial thrombolysis for left middle cerebral artery embolic stroke during coronary angiography*. Circulation 113, e64-e66, 2006.
15. Roberts H.C., Dillon W.P., Furlan A.J., Wechsler L.R., Rowley H.A., Fischbein N.J., Higashida R.T., Kase C., Schulz G.A., Lu Y., Firszt C.M.: *Computed tomographic findings in patients undergoing intra-arterial thrombolysis for acute ischemic stroke due to middle cerebral artery occlusion: results from the PROACT II trial*. Stroke 33, 1557-65, 2002.
16. Rosamond W.D., Folsom A.R., Chambless L.E., Wang C.H., McGovern P.G., Howard G., Copper L.S., Shahar E.: *Stroke incidence and survival among middle-aged adults: 9-year follow-up of the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) cohort*. Stroke 30, 736-43, 1999.
17. SPACE Collaborative Group, Ringleb P.A., Allenberg J., Brückmann H., Eckstein H.H., Fraedrich G., Hartmann M., Hennerici M., Jansen O., Klein G., Kunze A., Marx P., Niederkorn K., Schmiedt W., Solymosi L., Stingele R., Zeumer H., Hacke W.: *30 day results from the SPACE trial of stent-protected angioplasty versus carotid endarterectomy in symptomatic patients: a randomised non-inferiority trial*. Lancet 368, 1239-47, 2006.

18. Yadav J.S., Wholey M.H., Kuntz R.E., Fayad P., Katzen B.T., Mishkel G.J., Bajwa T.K., Whitlow P., Strickman N.E., Jaff M.R., Popma J.J., Snead D.B., Cutlip D.E., Firth B.G., Ouriel K.: *Stenting and Angioplasty with Protection in Patients at High Risk for Endarterectomy Investigators. Protected carotid-artery stenting versus endarterectomy in high-risk patients.* NEJM 351, 1493-501, 2004.
19. Wholey M.H., Al-Mubarek N., Wholey M.H.: *Updated review of the global carotid artery stent registry.* Catheter Cardiovasc Interv. 60, 259-66, 2003.

*Tesi di Laurea candidate per il
PREMIO FONDAZIONE FERRERO ONLUS
Anno Accademico 2007/2008*

Candidato: Gilberto CALZOLARI

Relatore: Prof. Alberto ANGELI

Titolo: **Livelli circolanti di osteoprotegerina e RANK ligando solubile quali indicatori di danno vascolare ed osseo nella sclerosi sistemica progressiva**

Candidato: Paolo RIPELLINO

Relatore: Prof. Luca DURELLI

Titolo: **Ruolo dei Linfociti Th 17 nella patogenesi delle ricadute della Sclerosi Multipla. Studio clinico sperimentale**

Tesi di Laurea vincitrice del
PREMIO FONDAZIONE FERRERO ONLUS
Anno Accademico 2007/2008

Candidato: Gilberto CALZOLARI

Relatore: Prof. Alberto ANGELI

Titolo: **Livelli circolanti di osteoprotegerina e RANK ligando
solubile quali indicatori di danno vascolare ed osseo
nella sclerosi sistemica progressiva**

*Tesi di Laurea candidate per il
PREMIO IN MEMORIA DEL DOTT. ITALO ARNEODO
Anno Accademico 2007/2008*

Candidato: Arianna ARDITO

Relatore: Prof. Massimo TERZOLO

Titolo: **Terapia adiuvante con mitotane in pazienti
con carcinoma corticosurrenalico**

Candidato: Melania BARBERIS

Relatore: Prof. Vito Marco RANIERI

Titolo: **Efficacia e sicurezza di un nuovo sistema a basso flusso
veno-venoso di rimozione extracorporea di CO₂
nell'insufficienza respiratoria: prime esperienze italiane
a confronto**

Candidato: Sara BELCASTRO

Relatore: Prof. Gianluca AIMARETTI

Titolo: **Valutazione della sensibilità periferica dell'IGF-I
alla somministrazione esogena di rhGH in età pediatrica:
implicazioni fisio-patologiche**

Candidato: Carlo Maria BERTALOTTI
Relatore: Prof. Vito Marco RANIERI
Titolo: **Analisi della distribuzione regionale dell'iperinflazione tidale in pazienti con Acute Respiratory Distress Syndrome sottoposti a ventilazione protettiva ed a tecniche di rimozione extracorporea di CO₂**

Candidato: Gilberto CALZOLARI
Relatore: Prof. Alberto ANGELI
Titolo: **Livelli circolanti di osteoprotegerina e RANK ligando solubile quali indicatori di danno vascolare ed osseo nella sclerosi sistemica progressiva**

Candidato: Paola GIARDA
Relatore: Prof. Mario PIRISI
Titolo: **Espressione intraepatica di geni interferon-inducibili nel trapianto di fegato: associazione con rigetto acuto e reinfezione HCV**

Candidato: Isabel RESTA
Relatore: Prof. Mario BOCCADORO
Titolo: **Ruolo terapeutico del trapianto autologo e del trapianto allogenico non-mieloablativo di cellule staminali emopoietiche nel mielosa multiplo: stato dell'arte e sviluppi futuri**

Candidato: Paolo RIPELLINO
Relatore: Prof. Luca DURELLI
Titolo: **Ruolo dei Linfociti Th 17 nella patogenesi delle ricadute della Sclerosi Multipla. Studio clinico sperimentale**

Candidato: Antonia ROTOLO
Relatore: Prof. Giuseppe SAGLIO
Titolo: **Efficacia clinica e analisi biologica della terapia con Tipifarnib e Bortezomib nelle Leucemie Acute Mieloidi**

Candidato: Rosita RUPA
Relatore: Prof. Alessandro VERCELLI - Prof. Alessandro DUCATI
Titolo: **Ruolo delle cellule staminali neurali e mesenchimali nella riparazione delle lesioni midollari**

Candidato: Marco ULLA
Relatore: Prof. Corrado TARELLA
Titolo: **Multiple mobilitazioni di progenitori di derivazione osteo-midollare in pazienti con Sclerosi Laterale Amiotrofica: uno studio prospettico multicentrico**

Tesi di Laurea vincitrici del
PREMIO IN MEMORIA DEL DOTT. ITALO ARNEODO
Anno Accademico 2007/2008

Candidato: Isabel RESTA

Relatore: Prof. Mario BOCCADORO

Titolo: **Ruolo terapeutico del trapianto autologo e del trapianto
allogeneico non-mieloablativo di cellule staminali
emopoietiche nel mielosa multiplo:
stato dell'arte e sviluppi futuri**

Candidato: Antonia ROTOLO

Relatore: Prof. Giuseppe SAGLIO

Titolo: **Efficacia clinica e analisi biologica della terapia con
Tipifarnib e Bortezomib nelle Leucemie Acute Mieloidi**

Tesi di Laurea candidate per il
PREMIO FONDAZIONE PER L'OSTEOPOROSI PIEMONTE
Anno Accademico 2007/2008

Candidato: Consuelo BUTTIGLIERO

Relatore: Prof. Alfredo BERRUTI

Titolo: **Ruolo prognostico dei livelli sierici di paratormone
in pazienti con metastasi ossee da carcinoma prostatico,
in trattamento con acido zoledronico**

Candidato: Elena SUMAN

Relatore: Prof. Giovanni Carlo ISAIA

Titolo: **Osteoclastogenesi, osteoblastogenesi e produzione
citochinica nel paziente con osteoporosi severa**

Tesi di Laurea vincitrice del
PREMIO FONDAZIONE PER L'OSTEOPOROSI PIEMONTE
Anno Accademico 2007/2008

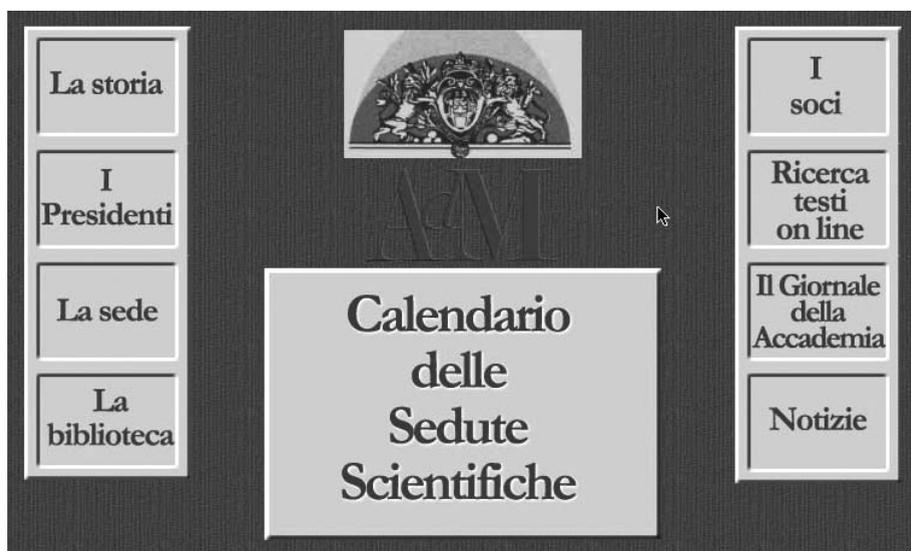
Candidato: Elena SUMAN

Relatore: Prof. Giovanni Carlo ISAIA

Titolo: **Osteoclastogenesi, osteoblastogenesi e produzione
citochinica nel paziente con osteoporosi severa**

SITO WEB
dell'Accademia di Medicina di Torino

www.accademiadimedicina.unito.it



*Norme redazionali per la pubblicazione sul
"Giornale dell'Accademia di Medicina di Torino"*

(in vigore dal 2008)

- a) Il Giornale dell'Accademia di Medicina di Torino pubblica lavori relativi ad argomenti trattati durante le sedute scientifiche, editoriali su invito e, a giudizio del Comitato di Redazione, anche articoli scientifici liberamente inviati da Soci e da non Soci. Se relativi ad argomento trattato durante una seduta scientifica, questi devono essere consegnati al Segretario Generale in occasione della medesima. I lavori, in italiano o in inglese, devono essere trasmessi al Segretario Generale su supporto elettronico in file Word, contenuti in una lunghezza massima di 25.000 battute (spazi inclusi) e corredati da un massimo di 10 tabelle o figure (in bianco e nero). Testi più estesi devono essere autorizzati dal Segretario Generale. Le figure e le tabelle, numerate progressivamente e separatamente con numeri arabi, devono essere richiamate nel testo. Le rispettive didascalie devono essere riportate separatamente su una pagina a parte ed al termine del lavoro.
- b) Nella prima pagina di ogni lavoro devono essere indicati i Nomi (per esteso) ed i Cognomi degli Autori, le relative affiliazioni, l'indirizzo postale e mail dell'Autore principale, 1-5 parole chiave in italiano ed in inglese, un riassunto in italiano ed in inglese, ciascuno di lunghezza non superiore a 2200 caratteri (spazi inclusi).
- c) Nella bibliografia le singole voci devono essere indicate in ordine alfabetico, numerate progressivamente e devono essere redatte secondo le seguenti modalità:
- 1) Citazione di un articolo: Cognome e Iniziale del nome di tutti gli Autori, due punti, Titolo dell'articolo, punto, abbreviazione del Titolo della rivista, anno, punto e virgola, volume, due punti, prima ed ultima pagina.

Esempio:

Williard WC, Hajdu SI, Casper ES, Brennan MF: Comparison of amputation with limb-sparing operations from Adult soft tissue sarcoma of the extremity. *Ann. Surg.* 1992; 215: 269-275.

- 2) Citazione di un intero volume: Cognome e Iniziale del nome di tutti gli Autori, due punti, Titolo del volume, punto, Casa Editrice, anno, Luogo della stampa.

Esempio:

Bianchi P, Verdi S: Le malattie del metabolismo Minerale. Guida pratica alla gestione operativa. Ed. Centro Scientifico Editore, 2000, Torino.

- 3) Citazione di un capitolo di un libro: Cognome e Iniziale del nome di tutti gli Autori, due punti, Titolo del capitolo, punto, "Titolo del volume", anno, due punti, pagina iniziale e finale, Casa Editrice, Luogo della stampa.

Esempio:

Bianchi P, Verdi S., Rossi G.C.: Psychological and Psychopatological aspects of Anorexia in the elderly patients. In "Sedentary life and Nutrition", 1990: 81-88, Raven Press Ed, New York.

Nel testo i riferimenti bibliografici devono essere numerici e riportati in parentesi tonde: se più di uno, devono essere separati da una virgola.

- d) L'Autore deve specificare se desidera gli estratti ed in quale numero. Il relativo costo è a carico del richiedente.

INDICE DEGLI AUTORI

Angeli Alberto	68	Gasparri Guido	217
Battista Giuseppe	266	Gay Francesca	88
Bazzocchi Alberto	266	Genuardi Mariella	88
Benedetto Giuseppe	226	Ghigo Ezio	128
Benso Andrea	128	Gulotta Carlo	120
Bertetto Oscar	142	Isaia Giovanni Carlo	186, 232
Bianco Lavinia	142	Lanotte Michele	45
Biglia Nicoletta	255	Larocca Alessandra	88
Boccardo Mario	88	Lisignoli Veronica	277
Boglione Antonella	142	Lopiano Leonardo	45
Bounous Valentina Elisabetta	255	Lucatello Barbara	128
Bringhen Sara	88	Lupo Barbara	88
Broglio Fabio	128	Magarotto Valeria	88
Brussino Luisa	107	Marotti Gastone	55
Bucca Caterina	107	Massobrio Marco	249
Canini Romeo	266	Meo Giuseppe	222
Capelletto Enrica	200	Mutani Roberto	41
Cavallo Federica	88	Olivero Giorgio	224
Chiarle Alice	156	Pacifici Roberto	232
Ciccione Giovannino	142	Paganin Valentina	232
Comandone Alessandro	142	Palumbo Antonio	88, 102
Culla Beatrice	107	Pellegrino Riccardo	120
D'Amelio Patrizia	232	Presbitero Patrizia	277
Di Bella Stefania	186	Puopolo Manuela	249
Dominelli Celestina	218	Riccardino Nicola	33
Ducati Alessandro	170	Sismondi Piero	255
Durando Riccardo	228	Tomasi Simone	170
Enrico Stefano	230	Vercelli Alessandro	170
Falco Patrizia	88		

Autorizzazione del Tribunale di Torino n. 477
Finito di stampare nel mese di novembre 2009

Stampato da: Tipografia Bodrato s.n.c.
Via Vanchiglia 31 - 10124 Torino - Tel. 011.817.71.44