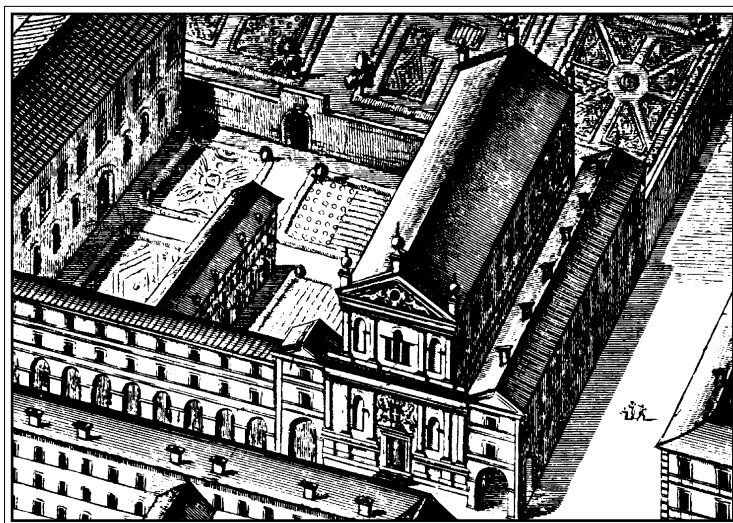




Giornale *della*  
Accademia *di* Medicina  
*di* Torino



In copertina:

*Particolare dell'isola di San Francesco da Paola  
da Theatrum Sabaudiae, Augusta Taurinorum  
(Archivio Storico della Città di Torino)  
Sede dell'Accademia di Medicina di Torino*

Anno CLXX

2007

GIORNALE  
DELLA  
ACCADEMIA DI MEDICINA  
DI TORINO

*Comitato di Redazione*

---

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

*Direttore Responsabile*

---

**Giovanni Carlo Isaia**

# ACCADEMIA DI MEDICINA DI TORINO

## Ufficio di Presidenza

---

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

## *SOMMARIO*

### **PARTE I**

<b>Elenco Soci .....</b>	<b>9</b>
--------------------------	----------

### **PARTE II**

<b>Sedute Accademia di Medicina, anno 2007 .....</b>	<b>25</b>
--	-----------

### **PARTE III**

#### **Comunicazioni**

*Giuseppe Poli*

<b>Relazione del Presidente alla seduta inaugurale dell'Accademia Anno 2007/2008 .....</b>	<b>31</b>
--	-----------

<i>A. Angeli</i> <b>Commemorazione del socio Gianpiero Gaidano</b> .....	37
<i>G. Poli</i> <b>Commemorazione del socio Adriano Vitelli</b> .....	43
<i>F. Scaroina</i> <b>Commemorazione del socio Adriano Vitelli</b> .....	46
<i>M. Aimetti</i> <b>Le malattie parodontali</b> .....	52
<i>E. Berutti, D. Pasqualini</i> <b>Associazione tra la patologia infiammatoria cronica endodontica e parodontale e le coronaropatie: studio clinico e biomolecolare</b> .....	62
<i>S. Carossa, F. Erovigni</i> <b>Edentulismo e sindrome delle apnee ostruttive nel sonno (OSAS)</b> .....	68
<i>G. Gassino</i> <b>Riabilitazione protesica facciale post-chirurgica nei pazienti con severe perdita di sostanza</b> .....	75

<i>P. Destefanis, G. Barbero, G. Giribaldi, G. Mandili, D. Fontana, F. Turrini</i> <b>Ricerca di nuovi markers nel carcinoma uroteliale della vescica mediante un approccio proteomico differenziale</b> .....	83
 <i>M. Marangella</i> <b>Clinica della calcolosi renale</b> .....	97
 <i>G. Vezzoli, T. Arcidiacono, V. Paloschi, A. Terranegra, R. Biasion, L. Soldati</i> <b>Genetica della calcolosi renale</b> .....	117
 <i>R. Rigardetto, M. Gandione, A. Persico</i> <b>Disturbi dello spettro autistico dalla clinica alla genetica</b> .....	125
 <i>A. Perra, G. Simbula, M. Simbula, M. Pibiri, M.A. Kowalik, P. Sulas, G.M. Ledda-Columbano, A. Columbano</i> <b>Triiodotironina: un mitogeno multi-organo con effetti antisteatosici e anti tumorali</b> .....	140
 <i>F. Valfrè, V. Moretti, M.A. Paleari, F. Bellagamba</i> <b>Allergeni negli alimenti primari e trasformati</b> .....	156
 <i>G. Rolla, L. Bommarito, S. Mietta, R. Bergia</i> <b>Alimentazione come causa di malattia. Allergia alimentare</b> .....	171

*C. Borgogna*

Tesi di Laurea premiata dall'Accademia di Medicina di Torino  
con il contributo della Fondazione Cavalieri Ottolenghi

**Trapianto di cellule staminali mesenchimali  
nel midollo spinale in un modello sperimentale  
di sclerosi laterale amiotrofica** ..... 184

*A. Ferrero*

Tesi di Laurea premiata dall'Accademia di Medicina di Torino  
con il contributo della Fondazione Cavalieri Ottolenghi

**Infusione protratta di 5 fluorouracile in associazione  
ad octreotide a lento rilascio in pazienti con neoplasia  
neuroendocrina avanzata non a piccole cellule** ..... 206

*P. D'Amelio, G.C. Isaia*

Premio di Ricerca sulle Malattie Metaboliche dell'osso  
con il contributo della Fondazione per l'Osteoporosi Piemonte

**La fisiopatologia dello scheletro:  
aspetti cellulari, biomeccanici e clinici** ..... 220

*R. Frairia, R. Canaparo, L. Serpe, M.G. Catalano, L. Berta*

**Onde d'urto ad alta energia:  
effetti biologici e nuove prospettive terapeutiche** ..... 235

*G. Gilli*

**Acqua e salute pubblica: un rapporto problematico** ..... 256

*M.E. Allaix, C. Garrone, M. Caldart, R. Rimonda, M. Morino*

**La microchirurgia endoscopica transanale:  
indicazioni e risultati nelle neoplasie del retto** ..... 267



<i>L.M. Pernigotti</i> <b>Torino e l'anziano fragile</b> .....	278
<i>A. Palmo, F. Merlo, S. Avagnina</i> <b>La grande obesità: aggiornamento clinico e patogenetico</b> .....	304
<i>A. Angeli</i> <b>Presentazione del libro "Alessandro Riberi un mito della medicina torinese dell'800"</b> .....	318
<i>A. Vecchione</i> <b>Brevi considerazioni sul Ten. Gen. (Me) Alessandro Riberi</b> .....	321
<i>C.A. Viano</i> <b>Il Riberi di Dianzani</b> .....	333

## **PARTE IV**

Tesi di Laurea candidate per il Premio  
Fondazione Ferrero Onlus  
Anno Accademico 2006/2007 ..... 339

Tesi di Laurea vincitrice del Premio  
Fondazione Ferrero Onlus  
Anno Accademico 2006/2007 ..... 340

Tesi di Laurea candidate per il Premio  
in Memoria del Dott. Italo Arneodo  
Anno Accademico 2006/2007 ..... 341

Tesi di Laurea vincitrici del Premio  
in Memoria del Dott. Italo Arneodo  
Anno Accademico 2006/2007 ..... 345

Sito web dell'Accademia di Medicina di Torino ..... 347

Norme redazionali per la pubblicazione sul  
"Giornale dell'Accademia di Medicina di Torino" ..... 349

Indice degli Autori ..... 351

**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 17 OTTOBRE 2008)****Soci Ordinari** (in ordine di anzianità di nomina)**Eugenio Meda***Professore Emerito di Fisiologia Generale  
dell'Università di Torino  
(11 Dicembre 1959)***Alberto Sartoris***Professore di Clinica Otorinolaringoiatrica  
dell'Università di Torino  
(30 Giugno 1977)***Francesco Morino***Professore di Clinica Chirurgica  
dell'Università di Torino  
(31 Maggio 1968)***Pier Luigi Baima Bollone***Professore Ordinario di Medicina Legale e  
delle Assicurazioni dell'Università di Torino  
(14 Dicembre 1977)***Bruno Demichelis***Professore di Clinica Odontostomatologica  
dell'Università di Torino  
(14 Giugno 1974)***Giovanni Bussolati***Professore Ordinario di Anatomia e Istologia  
Patologica dell'Università di Torino  
(14 Dicembre 1977)***Franco Mollo***Professore Emerito di Anatomia ed Istologia  
Patologica dell'Università di Torino  
(14 Giugno 1974)***Giuseppe Piccoli***Professore Onorario di Nefrologia  
dell'Università di Torino  
(14 Dicembre 1977)***Davide Schiffer***Professore Emerito di Neurologia  
dell'Università di Torino  
(14 Giugno 1974)***Luigi Ravizza***Professore Onorario di Clinica Psichiatrica  
dell'Università di Torino  
(14 Dicembre 1977)***Roberto Pattono***Professore di Anestesiologia e Rianimazione  
dell'Università di Torino  
(30 Giugno 1977)***Alberto Angeli***Professore Ordinario di Medicina Interna  
dell'Università di Torino  
(3 Luglio 1979)*

**Gian Paolo Busca**

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

**Onofrio Campobasso**

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

**Giorgio Emanuelli**

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

**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)

**Pier Giuseppe De Filippi**

*Primario Emerito di Medicina Nucleare*  
*A.O.U. San Giovanni Battista di Torino*  
(18 Dicembre 1992)

**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)*

**Giorgio Agati**

*Primario Emerito di Radiologia  
Ospedale Regina Maria Adelaide di Torino  
(15 Dicembre 1995)*

**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 Saggio**

*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)*

**Valerio Gai**

*Professore Straordinario di Medicina  
d'Urgenza 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**

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

**Augusta Palmo**

*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)*

## 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 Tesaro**

*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)*

## 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)*

## **Soci Corrispondenti Esteri**

**Jean Lenegre**

*Parigi  
(25 Marzo 1960)*

**Jean Pierre Changeux**

*Parigi  
(14 Giugno 1974)*

**René Couteaux**

*Parigi  
(14 Giugno 1974)*

**Danilo Baggiolini**

*Basel  
(20 Maggio 1983)*

**Soldano Ferrone**

*New York  
(20 Maggio 1983)*

**Neville A. Marsh**

*Londra  
(30 Novembre 1990)*

**Nicolass Westerhof**

*Amsterdam  
(18 Dicembre 1992)*

## **Soci già Ordinari**

### **Giampaolo Ambroggio**

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

### **Enrico Geuna**

*Primario Emerito Neurochirurgia  
Ospedale Maggiore di Novara*

### **Nicoletta Ansaldo**

*Professore di Clinica Pediatrica  
dell'Università di Torino*

### **Paolo Gioannini**

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

### **Giovanni Astaldi**

*Primario Emerito  
Ospedale Maggiore di Tortona*

### **Felice Grattarola**

*Primario Emerito di Neurologia  
Astanteria Martini di Torino*

### **Luigi Bucciante**

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

### **Raoul Hahn**

*Primario Emerito di Otorinolaringoiatria  
Ospedale di Rivoli*

### **Giorgio Cortesina**

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

### **Giano Magri**

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

### **Massimo Crepet**

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

### **Giorgio Mangiarotti**

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

### **Mario Dellepiane**

*Primario di Chirurgia Generale Adulti  
Ospedale Koelliker di Torino*

### **Angela Moiraghi Ruggenini**

*Professore Emerito di Igiene  
dell'Università di Torino*

### **Ferdinando Dianzani**

*Professore Emerito di Microbiologia  
dell'Università di Roma*

### **Mario Morea**

*Professore di Cardiocirurgia  
dell'Università di Torino*

### **Livia Di Cagno**

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

### **Walter Neri**

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

### **Francesco Saverio Feruglio**

*Professore di Clinica Medica  
dell'Università di Trieste*

### **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*

**Maria Sandrucci**

*Professore Emerito di Clinica Pediatrica  
dell'Università 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*

## 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

**Soci Benemeriti**

**Ing. Enzo Brusasco**

(16 Dicembre 2005)

**Dott. Piero Sola**

(16 Dicembre 2005)

**Ing. Walter Ceresa**

(16 Dicembre 2005)



*Sedute dell'Accademia di Medicina – Anno 2007*

- 12 Gennaio*      **L'odontoiatria del terzo millennio:  
clinica e ricerca**  
*Relatori: Mario AIMETTI, Elio BERUTTI,  
Stefano CAROSSA, Cesare DEBERNARDI  
e Gianfranco GASSINO*  
*Presentati dal Socio: Giulio PRETI*
- 26 Gennaio*      **L'antrace ed il ruolo delle tossine antrace  
nella patogenesi della malattia**  
*Relatore: Cesare MONTECUCCO*  
*Presentato dal Socio: Giuseppe POLI*
- 9 Febbraio*      **Approccio proteomico per la ricerca di nuovi  
marcatori tumorali (pancreas e tumori urologici)**  
*Relatori: Paolo DESTEFANIS, Dario FONTANA,  
Franco NOVELLI e Franco TURRINI*
- 23 Febbraio*      **Sclerodermia: dalla ricerca di base alla clinica**  
*Relatore: Raffaella SCORZA*  
*Presentato dal Socio: Alberto ANGELI*

9 Marzo

**Genetica e clinica della calcolosi renale**

*Relatori: Martino MARANGELLA e Giuseppe VEZZOLI*

*Presentati dal Socio: Giovanni Carlo ISAIA*

27 Marzo

**Autismo infantile: dalla clinica alla genetica**

*Relatori: Antonio M. PERSICO e Roberto RIGARDETTO*

3 Aprile

**Effetto anti-steatosi e anti-tumore  
dell'ormone tiroideo T3**

*Relatore: Amedeo COLUMBANO*

*Presentato dal Socio: Giuseppe POLI*

26 Aprile

**Alimentazione come causa di malattia**

**Allergeni negli alimenti primari e trasformati**

*Relatore: Franco VALFRÈ*

**Allergia alimentare**

*Relatore: Giovanni ROLLA*

**Danno epatico da alcol**

*Relatore: Mario Umberto DIANZANI*

*Presentati da: Renata ALLIO, Giuseppe POLI  
e Angelo Raffaele MEO*

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

*11 Maggio*

**Cellule Natural Killer: nuovi scenari nella terapia di tumori e leucemie acute**

*Relatore: Lorenzo MORETTA*

*Presentato dal Socio: Umberto DIANZANI*

*21 Maggio*

**Marcatori miocardici**

*Relatori: Piero CAPPELLETTI e Marco CAPUTO*

*Presentati dal Socio: Nicola RICCARDINO*

*8 Giugno*

**Commemorazione del Socio  
Gianpiero GAIDANO**

*di Alberto ANGELI*

**Nuovi approcci terapeutici nel carcinoma della tiroide**

*Relatore: Giuseppe BOCCUZZI*

**Onde d'urto ad alta energia.  
Effetti biologici e nuove prospettive terapeutiche**

*Relatore: Roberto FRAIRIA*

*22 Giugno*

**Sistemi colturali e qualità delle acque**

*Relatore: Carlo GRIGNANI*

*Presentato da: Renata ALLIO*

**Acqua e salute pubblica: un rapporto problematico**

*Relatore: Giorgio GILLI*

*Presentato da: Giuseppe POLI*

*in collaborazione con l'Accademia di Agricoltura di Torino*

*5 Ottobre*      **Attualità in patologia organica e funzionale del retto**

*Relatori: Mario MORINO e Alessandro GAETINI*

*23 Ottobre*      **Vecchi, città e medicina. Torino e l'anziano fragile**

*Relatori: Marco TRABUCCHI  
e Luigi Maria PERNIGOTTI*

*Presentati dal Socio: Giovanni Carlo ISAILA*

*9 Novembre*      **Seduta inaugurale dell'Anno Accademico 2007/2008**

*Relazione del Presidente: Giuseppe POLI*

**Advances in the understanding of the aging process**

*Relatore: Alberto BOVERIS*

*Presentato dal Socio: Giuseppe POLI*

*20 Novembre*      **La grande obesità: aggiornamento clinico-patogenetico  
e trattamento chirurgico**

*Relatori: Augusta PALMO e Mauro TOPPINO*

*3 Dicembre*      **Commemorazione del Socio  
Adriano VITELLI**

*di Giuseppe POLI e Francesco SCAROINA*

**Diabete mellito: malattia o sindrome?**

*Relatore: Gianfranco PAGANO*

*Sedute Private*

23 Febbraio **Approvazione rendiconto consuntivo 2006  
e bilancio di previsione 2007**

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

*Sedute Straordinarie*

30 Maggio **Presentazione delle Tesi di Laurea premiate  
con il contributo della Fondazione Cavalieri Ottolenghi**  
*Cinzia BORGOGNA e Anna FERRERO*

*Presentate dai Relatori:*  
*Alessandro VERCELLI e Luigi DOGLIOTTI*

**Presentazione della Ricerca premiata con il contributo  
della Fondazione per l'Osteoporosi Piemonte**

*Patrizia D'AMELIO*  
*Presentata dal Socio:*  
*Giovanni Carlo ISAIA*

*18 Dicembre*

**Presentazione del volume  
edito dall'Accademia di Medicina  
"Alessandro Riberi  
un mito della medicina torinese dell'800"  
di Mario Umberto Dianzani**

*Relatori: Alberto ANGELI, Alessandro BARGONI,  
Alfredo VECCHIONE e Carlo Augusto VIANO*

*Moderatore: Giuseppe POLI*



**RELAZIONE DEL PRESIDENTE  
ALLA SEDUTA INAUGURALE DELL'ACCADEMIA  
ANNO 2007-2008**

*A*utorità, gentili Signore e Signori, cari Colleghi, cari Soci, unitamente al Presidente vicario ed al Segretario Generale, desidero porgere a tutti Voi un caloroso benvenuto alla cerimonia di apertura del nuovo anno accademico di questa prestigiosa Istituzione culturale e scientifica della nostra Città, della nostra Regione.

*Una cerimonia che vuole sobriamente ricordare le iniziative e l'attività dell'Accademia di Medicina nell'a.a. appena concluso, ma in parallelo sottolinearne le linee programmatiche per il 2007/2008.*

*Per quanto riguarda l'attività editoriale, è fresco di stampa un prezioso trattato del Prof. Mario Umberto Dianzani su Alessandro Riberi, fondatore di questa Accademia. Il volume, la cui pubblicazione è stata resa possibile da un contributo dedicato della Compagnia di San Paolo, illustra in maniera ben documentata i momenti salienti della vita pubblica ma anche privata di questo illustre personaggio dell'Ottocento torinese. La presentazione del libro avverrà in questo mese di novembre, subito seguita dalla sua distribuzione ai Soci ed a tutti gli interessati.*

*Ancora a proposito di pubblicazioni è ora disponibile il Volume 169 degli Atti dell'Accademia, che raccoglie i testi delle conferenze tenutesi nel corso dell'anno 2006.*

*Sono, invece, tuttora in attesa di essere opportunamente pubblicate le conferenze monotematiche su "Diagnosi e trattamento delle malattie cardiovascolari" e "Nuove tecnologie: dalla ricerca di base alla medicina".*

*In quest'ultimo ambito tematico rientrano ben 8 delle 17 conferenze tenutesi in quest'Aula Magna, in seduta pubblica, nell'a.a. 2006/2007, con*

la presentazione aggiornata di patologie quali la calcolosi renale (“Genetica e clinica della calcolosi renale” di Martino Marangella e Giuseppe Vezzosi), l’avvelenamento da antrace (“L’antrace ed il ruolo delle tossine antrace nella patogenesi della malattia” di Cesare Montecucco), la sclerodermia (“Sclerodermia: dalla ricerca di base alla clinica” di Raffaella Scorza), l’autismo infantile (“L’autismo infantile: dalla clinica alla genetica” di Antonio Persico e Roberto Rigardetto), di nuovi indicatori diagnostici di danno miocardico (“I marcatori miocardici” di Piero Cappelletti e Marco Caputo) o di presenza di tumore (“Approccio proteomico per la ricerca di nuovi marcatori tumorali per pancreas e tumori urologici” di Paolo Destefanis, Dario Fontana, Franco Novelli, Franco Turrini), e infine di strategie immunologiche nella terapia delle leucemie acute (“Cellule natural killer: nuovi scenari nella terapia di tumori e leucemie acute” di Lorenzo Moretta) e di farmaci biologici nelle malattie reumatiche (“Farmaci biologici nelle malattie reumatiche” di Vittorio Modena e Carlomaurizio Montecucco). Due conferenze, di cui una tenuta in occasione dell’inaugurazione dell’a.a. scorso, sono state dedicate alla cirrosi epatica (“La cirrosi epatica” di Paolo Gentilini) ed al fegato grasso (“Effetto anti-steatosi ed anti-tumore dell’ormone tiroideo T3” di Amedeo Columbano). Adeguata attenzione è stata prestata ai progressi ed alle prospettive dell’odontoiatria (L’odontoiatria del terzo millennio: clinica e ricerca” di Mario Aimetti, Elio Berruti, Stefano Crossa, Cesare Debernardi, Gianfranco Gassino) e a quelli della chirurgia del colon-retto (“Attualità in patologia organica e funzionale del colon-retto” di Mario Morino e Alessandro Gaetini), e si è iniziato a svolgere, con un appuntamento dedicato all’anziano fragile (“Vecchi, città e medicina: Torino e l’anziano fragile” di Marco Trabucchi e Luigi Maria Pernigotti), l’argomento che sarà il soggetto di una serie di conferenze del nuovo anno accademico, cioè “l’invecchiamento e le patologie età-correlate.”

L’Accademia ha fornito la sede per la realizzazione di alcuni eventi ECM organizzati da Enti esterni su “la sindrome dell’occhio secco” e “la prevenzione delle fratture osteoporotiche non vertebrali” ed ha ospitato il primo convegno multidisciplinare del GISMO: Osteoporosi Forum.

Sono stati commemorati due illustri soci scomparsi recentemente, il Prof. Manlio Pizzetti in una serata dedicata ai reimpianti d’arto (“Reimpianti d’arto: ricostruzioni microchirurgiche complesse in emergenza” di Bruno Battiston e Pierluigi Tos) ed il Prof. Gianpiero Gaidano in una serata in cui i suoi allievi hanno illustrato le nuove terapie del carcinoma della tiroide e gli

*effetti biologici di onde d'urto ad alta energia ("Nuovi approcci terapeutici nel carcinoma della tiroide" di Giuseppe Boccuzzi, "Onde d'urto ad alta energia. Effetti biologici e nuove prospettive terapeutiche" di Roberto Frairia).*

*Da segnalare poi è l'incontro con i vincitori dei Premi conferiti dalla Fondazione Cavalieri Ottolenghi/Università degli Studi di Torino (Dr.ssa Cinzia Borgogna e Dr.ssa Anna Ferrero) e Fondazione per l'osteoporosi Piemonte nell'anno 2006 (Dr.ssa Patrizia D'Amelio), chiamati a presentare, in una seduta straordinaria a loro dedicata, le tesi di laurea e/o le ricerche scientifiche che li hanno messi in evidenza. È con particolare soddisfazione che sottolineo il significativo e costante incremento, in questi ultimi anni, dei Premi istituiti dall'Accademia di Medicina per giovani laureati e ricercatori. In effetti, ai due Enti appena citati, si aggiunge per il triennio 2007-2009 la Fondazione Piera, Pietro e Giovanni Ferrero. È con vivissima gratitudine che mi rivolgo a tali Enti che di fatto rendono possibile il contributo dell'Accademia di Medicina alla valorizzazione e promozione delle Scienze Mediche ed affini dando considerazione e spazio alle nuove leve.*

*Anche per l'anno 2007 l'Accademia ha istituito 2 Premi per Tesi di Laurea in Neuroscienze, indetti dalla Fondazione Cavalieri Ottolenghi, scegliendo tra i numerosi candidati laureatisti con il massimo dei voti e lode nell'a.a. 2005-2006. Sono risultati vincitori la Dr.ssa Alice Chiarle, Medicina e Chirurgia (relatore Filippo Bogetto) con la tesi "Il disturbo ossessivo-compulsivo ad esordio precoce: forme familiari e forme autoimmuni", e il Dr. Simone Tomasi, Medicina e Chirurgia (relatori Alessandro Ducati ed Alessandro Vercelli) con la tesi "Studio della neurogenesi dopo lesione ischemica sperimentale nel topo". La consegna dei premi ai due giovani e promettenti colleghi avverrà al termine di questa mia relazione direttamente da parte del Magnifico Rettore, Presidente della Fondazione Cavalieri Ottolenghi. Sempre nell'anno 2007 la Fondazione per l'Osteoporosi ha voluto indire, tramite l'Accademia di Medicina, un Premio per tesi di Laurea sulle Malattie metaboliche dell'osso. È risultata vincitrice la Dr.ssa Stefania Di Bella, Medicina e Chirurgia (relatore Giovanni Carlo Isaia) con la tesi "Basi cellulari del meccanismo d'azione del risedronato). La Presidente della Fondazione per l'Osteoporosi, Dr.ssa Nicoletta Casiraghi, consegnerà il premio. Infine, come da me anticipato, la Fondazione Piera, Pietro e Giovanni Ferrero ha istituito un premio dedicato alla memoria del Prof. Gianpiero Gaidano, per la miglior tesi di Laurea in Medicina e Chirurgia in tema di malattie correlate all'Invecchiamento. È risultata vincitrice la Dr.ssa Enrica Cappelletto, (relatore Giorgio Scagliotti)*

*con la tesi “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. Consegnerà il premio il Segretario Generale della Fondazione Ferrero, Dr. Mario Strola.*

*Alla presentazione del lavoro scientifico di questi giovani colleghi verrà dedicata una seduta straordinaria da definirsi nell’ambito del programma 2008.*

*Sempre più sostanziale e direi ben consolidata è l’interazione dell’Accademia di Medicina con le altre due accademie torinesi di ambito scientifico, entrambe prestigiose, l’Accademia delle Scienze e l’Accademia di Agricoltura. Ne sono dimostrazione le due conferenze tenute nel 2007 in questa Aula aventi per tema “l’alimentazione come causa di malattia”, con interventi integrati di relatori proposti dalle tre Accademie (“Allergeni negli alimenti primari e trasformati” di Franco Valfrè; “Allergia alimentare” di Giovanni Rolla; “Danno epatico da alcol” di Mario Umberto Dianzani) e “Colture e qualità dell’acqua/Acqua e salute pubblica” in collaborazione con l’Accademia di Agricoltura (“Sistemi colturali e qualità delle acque” di Carlo Grignani; “Acqua e salute pubblica: un rapporto problematico” di Giorgio Gilli). Per l’a.a. che va ad iniziare sono già stati stabiliti altrettanti appuntamenti integrati, con la ferma intenzione di utilizzare tali eventi come traccia e strumento per nuove e più ampie iniziative comuni anche nel campo della ricerca scientifica interdisciplinare.*

*A proposito di collegamenti con altre entità culturali subalpine, l’Accademia di Medicina è stata invitata dall’Assessorato alla Cultura della Città di Torino a partecipare attivamente ad un convegno che si è svolto presso il Polo Museale del Valentino, nel settembre 2007, per celebrare il cinquantesimo anniversario del gemellaggio tra le città di Torino e Chambéry. In tale occasione, l’Assessore alla Cultura ha espressamente richiesto al sottoscritto la partecipazione dell’Accademia di Medicina alla formale inaugurazione della nuova sede del Museo Lombroso, presso il citato Polo del Valentino tramite l’attivazione nell’a.a. 2007/2008 di opportuni eventi e conferenze sul tema.*

*Prosegue in modo senz’altro soddisfacente l’arricchimento di quella che si potrebbe definire la facciata elettronica della nostra Accademia, ormai da tempo anche in versione inglese. Sono infatti già disponibili i testi elettronici di alcuni libri antichi, tra i più rappresentativi, custoditi nella Biblioteca dell’Accademia.*

*Un'altra interazione ancora più sostanziale di quella, pur molto vivace ed in continua crescita, esistente con i visitatori sia reali sia virtuali della nostra Biblioteca, è quella intrattenuta con l'Università degli Studi di Torino. Iniziato propriamente dal Rettore Dianzani, promosso fortemente dal rettore Bertolino, abbiamo ora con il Rettore Pelizzetti il definitivo reinserimento dell'Università degli Studi di Torino nello stabile di Via Po 18, in spazi di proprietà od ottenuti in comodato d'uso dall'Accademia di Medicina. I risultati completi di tale re-insediamento si vedranno nel prossimo futuro, quando io non sarò più presidente, ma io non posso che gioire per i frutti sinora raccolti.*

*Nelle due sedute private dei Soci tenutesi nel corso dell'a.a. 2006/2007, oltre che a discutere ed approvare gli atti amministrativi ed economici, si è proceduto alla nomina dei nuovi Soci. Sono stati nominati Soci ordinari: Luigi Dogliotti, Franco Merletti, Mario Morino, Roberto Mutani, Patrizia Presbitero, Mauro Rinaldi. Sono stati nominati Soci corrispondenti: Alberto Biglino e Giancarlo Cortese. Inoltre, sulla base del rinnovato Statuto dell'Accademia che ora prevede la categoria dei Soci Emeriti, e su indicazione ampia da parte dei Soci, il Comitato di Presidenza ha nominato Emeriti i Soci: Paolo Calderini, Napoleone Massaioli, Mario Portigliatti Barbos, Salvatore Rocca Rossetti, Gian Luca Sannazzari, Giorgio Verme. Al termine di questa mia relazione, porgerò a tutti loro il relativo diploma.*

*Ora, con vivo cordoglio, a nome del Consiglio di Presidenza e dei Soci tutti, desidero ricordare i nostri Soci, deceduti nel corso dell'ultimo anno accademico. I Soci ordinari Lorenzo Garbagni, Bruno Bergamasco, Pietro Rastel Bogin, e i Soci Onorari Rodolfo Amprino, Adriano Vitelli, la cui commemorazione sarà tenuta qui in Accademia nel prossimo dicembre, Michael Ellis De Bakey e Bernard Pulmann.*

*Intendiamo ricordarli tutti sempre, con affetto e stima.*

*Al termine di questa mia relazione, desidero esprimere viva riconoscenza ai numerosi Enti che, con i loro contributi e la loro attività di supporto, hanno reso possibili tutte le iniziative dianzi ricordate: il Ministero per i Beni e le Attività Culturali, l'Università di Torino, la Regione Piemonte, la Compagnia di San Paolo e la Fondazione CRT, la Fondazione Cavalieri Ottolenghi, il Comune di Torino, la Sovrintendenza alle Belle Arti, la Fondazione per l'Osteoporosi, la Fondazione Piera, Pietro e Giovanni Ferrero. Ringrazio anche quest'anno i professionisti che hanno fornito generosamente la loro massima disponibilità in ambito notarile, contabile, legale.*

*Un forte abbraccio ai componenti del Consiglio Direttivo, con sentito riconoscimento per il loro prezioso e costante supporto nella mia fortunata e felice esperienza quadriennale da presidente. Un particolare grazie desidero esprimerlo al Presidente vicario, al Segretario Generale, al Consigliere referente per la Biblioteca, al Socio curatore delle pagine elettroniche, al personale di Segreteria e di Biblioteca.*

*In ultimo, non ultimo, intendo manifestare alla nostra Segretaria generale, Signora Alda Riva, tutta la mia stima e la mia gratitudine per la costante azione di supporto organizzativo alla nostra e molto sua Accademia.*

*Desidero, infine, ringraziare tutti Voi presenti, di cuore, per il Vostro manifestato apprezzamento nei confronti dell'Accademia di Medicina di Torino e dichiaro ufficialmente aperto l'Anno Accademico 2007/2008, centosessantaduesimo dalla fondazione da parte del Re Carlo Alberto.*

*Giuseppe Poli*

## COMMEMORAZIONE DEL SOCIO GIANPIERO GAIDANO

Illustri Soci dell'Accademia, cari colleghi ed amici, signore e signori, e, soprattutto, cara signora Elena, cari GianLuca e Massimo, con commozione ed emozione prendo per primo la parola in questa serata, che vuol essere, innanzitutto, un tributo scientifico a Gianpiero Gaidano, Professore Emerito di Medicina Interna della nostra Università, grande figura, a tutti nota, di clinico e studioso. Il mio compito è quello di condividere con voi un breve, ma intenso ricordo della sua persona, e di focalizzare alcuni tratti salienti della sua vita di medico e scienziato, di accademico, di Maestro. Vedo la sala gremita e so che l'emozione può giocare brutti scherzi. Mi scuso, pertanto, se mi rifarò a quanto ho scritto per il nostro Giornale e non parlerò "a braccio" come faccio di regola.

Ho scelto di usare il termine "ricordo"; mi è più familiare. È semplice e genuino. Non mi ritrovo con "commemorazione", il nostro Presidente e gli amici dell'Ufficio di Presidenza non me ne vogliano. Men che mai con "celebrazione". Vorrei quindi limitarmi a quanto ho vissuto in prima persona quotidianamente insieme a Gianpiero, anche se questa scelta, ovviamente, può lasciare in ombra aspetti della vita e della carriera che riguardano gli anni da lui trascorsi in Via Genova alle Molinette, dove io non c'ero. Cerchiamo allora di restare lontani dalla retorica, di limitare i formalismi, o meglio, gli aspetti formali che pure hanno rilevanza nella vita pubblica di un professore universitario che aveva acquisito cariche istituzionali di grande rilievo. Gianpiero Gaidano sarebbe assolutamente d'accordo. È ovvio che debbano essere ricordati con la dovuta attenzione, per la loro importanza e per il loro significato, i riconoscimenti accademici via via ottenuti. Ma mettiamo in luce l'essenziale. Il messaggio emotivo di questo ricordo, il "core" di questa serata in suo onore, (il termine gli sarebbe piaciuto, era un appassionato studioso di proteine), non può che essere il richiamo, a noi accademici ormai stagionati e ai colleghi più giovani, delle doti umane di

Gianpiero Gaidano. Sono le doti che gli sono valse la stima indiscussa dei colleghi, l'ammirazione degli allievi, l'affetto dei pazienti. Quest'ultimo, in particolare, tutt'affatto straordinario. Lo posso testimoniare in prima persona, avendo visto in questi ultimi mesi alcuni casi che lui da tempo seguiva.

Integrità morale, razionalità critica: due pilastri che reggevano, per così dire, la personalità di Gianpiero Gaidano e che possiamo ritrovare anche nella immagine di lui che ho scelto e che fa da sfondo a questo ricordo. La nostra coscienza critica, dicevamo di lui quando si sgobbava duro nel piccolo laboratorio al San Vito. Anche la sua morte è stata in linea con le sue scelte di vita, di semplicità e *understatement*, ma insieme di difesa rigorosa della propria identità intellettuale, del lavoro, degli impegni presi con se stesso, con i pazienti, con la società civile in cui era chiamato ad operare. Giunta improvvisa, inopinata, dopo una giornata di lavoro intensa. Nella serata precedente, dopo cena, una conferenza-incontro-dibattito alla Fondazione Ferrero di Alba. Poi il rientro a casa, e a mezzanotte una telefonata a una paziente ansiosa di "parlare con il professore", per tranquillizzare e garantire interessamento e impegno. Quasi a dire, per oggi ho finito. E a questo punto, come avviene nei ricordi delle persone care, dove si intrecciano e si affastellano sensazioni e immagini vicine e lontane nel tempo, senza una definita sequenza temporale, vale la spesa sottolineare l'opera appassionata, in campo sociale e in campo culturale, di Gianpiero Gaidano per gli anziani della Fondazione Ferrero, della quale, negli anni più recenti, era anche Consigliere di Amministrazione. È qui presente in sala il dott. Mario Strola, Direttore Generale della Fondazione, proprio per testimoniare i sentimenti di stima, amicizia, riconoscenza profonda per quanto ha fatto ad Alba il loro indimenticabile prof. Gaidano. A lui sono personalmente grato per quanto mi ha detto nelle scorse settimane con grande partecipazione emotiva.

E veniamo adesso alle affermazioni e alle realizzazioni del clinico e del docente medico, alla vita scientifica, ai successi e alle intuizioni. In breve, al prestigio derivato dal suo *curriculum*. Ma anche qui, un informale ricordo personale, di grande intensità. Un vero tuffo al cuore, per me. Alcuni di voi già conoscono questo aneddoto, così potremmo definirlo. Oltre vent'anni or sono, nel 1986, moriva il mio Maestro, Francesco Ceresa. Per me erano tempi difficili. Dopo il successo, per le circostanze davvero tale, del concorso universitario, rimaneva l'incertezza su dove dovessimo andare. Al plurale. Un gruppo attivo, coeso. Pensavamo di avere bene meritato, ma ci sentivamo non poco emarginati. Finimmo poi oltre il Sangone-Missouri, nell'allora Far West del San Luigi. Voltammo pagina, fu l'inizio di una bella storia. Io



già da qualche anno ero socio dell'Accademia e sembrava non ci fossero dubbi che ero l'allievo-erede della cultura scientifica di Ceresa. Ma la sua commemorazione in Accademia venne affidata a Gaidano, che peraltro era stato il braccio destro di Ceresa nell'organizzazione e nella gestione della struttura di Semeiotica Medica al San Vito, e che era più anziano di me nella prima fascia universitaria. Gianpiero mi cercò per avere riscontri e ulteriori indicazioni sulla produzione scientifica che riteneva più qualificante. Era il suo metodo: umiltà, dialogo, verifica, razionalità. Fu un vero amico. Mi ricordo benissimo. Eravamo in auto, guidavo io nel traffico della città. Mi disse: caro Alberto, lo so che la commemorazione di Ceresa dovresti farla tu, e ti servirebbe anche, in questo momento. Ma non fartene un peso, vedrai che farai la mia!

Ecco, si dice spesso che in aneddoti come questo si ritrova tutta la persona di cui si parla. Non è certo così. Ma alcuni aspetti del suo modo di essere ed operare, tutt'affatto peculiare, qui emergono. Il gusto della battuta tagliente, il disincanto per gli eventi della vita di chi ha saggezza non meno che rigore morale, la capacità di disinnescare tensioni con il sorriso e la discrezione. Sorriso che veniva spontaneo anche in chi lo ascoltava, perché era arguto, curioso e molto colto, a 360 gradi. Un grande clinico non può che essere appassionato dell'esperienza umana e di tutte le sue espressioni nella letteratura, nelle arti figurative, nella musica, nella società civile. Grazie anche di questa lezione, professor Gaidano.

Gianpiero Gaidano era nato a Torino nel 1925, e nell'Università di Torino è sempre rimasto, da allievo interno della mitica Clinica Medica Generale diretta da Carlo Gamna sino alla massima posizione accademica di Professore Emerito di Medicina Interna. L'anno di nascita ha rilevanza non marginale. Gianpiero vive gli ultimi anni di liceo e l'iscrizione alla Facoltà di Medicina nel periodo turbinoso e tragico della lotta partigiana, della liberazione e dello straordinario fervore intellettuale che caratterizzò Torino dopo l'Aprile 1945. Pur non ricoprendo cariche ufficiali, non facendo politica attiva, come suol dirsi, diversamente quindi dal futuro cognato Adriano Vitelli, è impegnato a sostenere Giustizia e Libertà, partecipa alle tensioni ideali del Partito di Azione. Manterrà sempre in sé il senso di giustizia, individuale e sociale, come valore di riferimento prioritario per l'operare quotidiano. Niente retorica, e compromessi ridotti al minimo accettabile. Questo anche per quanto riguarda l'industria farmaceutica, che vedeva per il nostro microcosmo intrusiva e inquinante. In molte circostanze, non usava mezzi termini. Voleva, con chiarezza, una giustificazione etica alle scelte professionali, e anche alle scelte scientifiche.

Conobbi Gianpiero Gaidano nei primi anni '60, nel mitico corridoio dei Laboratori dell'allora Clinica Medica Generale diretta da Giulio Cesare Dogliotti. Era nel laboratorio a fianco, quello che faceva capo al prof. Pagliardi. Ci ritrovavamo spesso, nel cosiddetto "stanzino del Beckman", a maneggiare con cura maniacale le *cuvettes* di quarzo per la lettura spettrofotometrica. Lo ammiravo molto, soprattutto per la sua disponibilità a insegnare a noi più giovani il rigore metodologico della ricerca, la necessità di rivisitare sempre i risultati, il non dare nulla per scontato, nelle decisioni cliniche come nella discussione di un lavoro.

Onestà intellettuale, la sua grande lezione di allora. Ma poi, ecco la comunanza di lavoro, l'amicizia vera, vissuta e consolidata nel lavoro quotidiano degli anni trascorsi al San Vito, nell'allora Istituto di Semeiotica Medica diretto da Francesco Ceresa. Anni straordinari, di formazione continua e di confronto dialettico, di passione per una medicina clinica in rapida trasformazione, di progetti per un futuro che non pensavamo così nebuloso e insicuro. Si entrava, a metà corridoio, in una stanza difficile da descrivere, dove c'era di tutto, dal gas-cromatografo agli apparati artigianali per la distillazione e la preparazione dei reagenti. I metodi analitici dovevano essere ineccepibili, così per Ceresa come per Gaidano.

Gianpiero era la coscienza critica. Ma anche lo stimolo. Aveva lavorato egregiamente, molto egregiamente, nel campo dell'epatologia, della separazione elettroforetica di frazioni proteiche, della fisico-chimica dei pigmenti biliari<sup>(1-3)</sup> e non lesinava critiche, suggerimenti, ipotesi interpretative. In quella stanza con lui eravamo Giampaolo Molino, Giuseppe Boccuzzi, Roberto Frairia, Daniela Bisbocci, Paolo Avagnina, Alberto Cavanna, Romeo Cantoni, Carlo Genetta, Livio Perotti, Franco Bottasso, Ferdinando Melò, il sottoscritto e tanti altri, che tutti vorrei citare, e chiedo scusa per le omissioni. Ma eravamo in Semeiotica Medica, e la grande lezione di Gianpiero Gaidano fu per tutti noi il malato: la razionalità dell'approccio, sempre individuale, la visita e il colloquio diretto, mai di fretta, prima la clinica e poi gli esami, valutazione sempre globale e mai settoriale del caso. Vera Medicina Interna.

Non stupisce, quindi, che la carriera accademica di Gianpiero Gaidano abbia percorso tutte le tappe di maggior prestigio, com'era allora, 2 libere docenze, poi le Cattedre di Semeiotica Medica e Patologia Speciale Medica, la Direzione della Medicina Interna di via Genova, la Direzione del Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, la Direzione della Scuola di Specializzazione in Gastroenterologia. La sua passione fu sempre l'epatologia. Rimane mitico il "libro verde" Farmitalia sugli itteri dei primi anni '60, ma di particolare importanza è la più recente monografia, scritta

in collaborazione con Laura Berta, dal titolo emblematico “Epatopatie. Fisiopatologia e Clinica”<sup>(4-5)</sup>. Emblematico perché il messaggio portante di tutta l’attività didattica e del razionale, che poi è ragionamento clinico, di Gianpiero Gaidano, fu sempre quello di “partire” dalla fisiopatologia, di cercare i meccanismi responsabili del quadro morboso, in quel particolare paziente, nel contesto della progressione di malattia, della risposta ai farmaci, della comorbidità.

Era logico che le valenze didattiche che già ho sottolineato meritassero un riconoscimento ufficiale; erano da tutti apprezzate e ammirate. Ecco la Presidenza del Consiglio di Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia. Il suo impegno in anni di trasformazione della didattica universitaria (siamo negli anni '90) è stato ancora una volta esemplare. Anche perché la sua curiosità intellettuale e l’attività di ricerca non è mai venuta meno, anche in concomitanza di così evidente coinvolgimento in responsabilità organizzative e gestionali. Sono di assoluto rilievo le ricerche, da lui stimulate, seguite in prima persona, realizzate da un gruppo di giovani condotto da Roberto Frairia e Laura Berta sulle proteine plasmatiche di trasporto steroideo, in primo luogo la Sex Hormone Binding Protein<sup>(6-7)</sup>.

Mi avvio alla conclusione. Gianpiero Gaidano non gradiva ciò che chiamava “incensate” e “sbrodolate”. Chiudiamo con due diapositive che riportano riflessioni, sentenze, aforismi (chiamatele come volete) che vengono di lontano, sono a me care, e, sono sicuro, sarebbero care anche a Gianpiero. Si riferiscono a un antico proverbio Tamil tradotto in inglese da un colto e pazzo viaggiatore vittoriano dal nome molto inglese e molto banale, John Richardson, e a una battuta (ma non tanto) di Augusto Murri ai suoi studenti. Entrambe bene sintetizzano la cultura profonda, le scelte di vita e la lezione morale di gran classe che ci ha trasmesso il prof. Gaidano. La prima: *Who comprehends knowledge? He who reflects*. La seconda: Chi sono i nostri veri maestri? I nostri malati.

*Alberto Angeli*

## BIBLIOGRAFIA

1. Gaidano G., Pagliardi E., Vitelli A.: *L'applicazione del frazionamento secondo Cohn alla clinica per l'analisi delle frazioni proteiche di plasma normali e disprotidemiche*. Arch. Sci. Med. 104, 579-587, 1957.
2. Pagliardi E., Gaidano G., Vitelli A.: *Salting-out of serum proteins after the addition of known protein fractions*. Clin. Chem. 4, 49-52, 1958.
3. Gaidano G., Cravario A.: *Differenze dell'assorbimento luminoso di sieri diazotati di itteri a diversa patogenesi*. Minerva Gastroenterol. 6, 205-211, 1959.
4. Gaidano G.: *Diagnostica degli itteri*. Collana "Farmitalia" di Aggiornamenti Clinico-terapeutici. Minerva Medica ed., Torino 1963.
5. Gaidano G., Berta L.: *Epatopatie. Fisiopatologia e Clinica*. UTET ed., Torino 1990.
6. Fortunati N., Frairia R., Fissore F., Berta L., Fazzari A., Gaidano G.: *The receptor for human sex steroid binding protein (SBP) is expressed on membranes of neoplastic endometrium*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 42, 185-191, 1992.
7. Frairia R., Fortunati N., Fazzari A., Fissore F., Comba A., Becchis M., Catalano M.G., Benedusi-Pagliano F., Berta L., Mauro M., Gaidano G.: *Sex steroid binding globulin is a negative modulator of estrogen-induced breast cancer cell growth*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 784, 362-369, 1996.

## COMMEMORAZIONE DEL SOCIO ADRIANO VITELLI

Gentile Signora Vitelli, gentile Famiglia Vitelli, cari Soci ed amici dell'Accademia di Medicina di Torino, nel ricordare Adriano Vitelli, desidero unire alla voce dei suoi allievi quella della sua Accademia.

Il primo contatto di Adriano Vitelli con questa Accademia avvenne nel 1946, quando, un anno prima della laurea in Medicina e Chirurgia, egli partecipò alla celebrazione del centenario della sua fondazione, presso la prefettura di Torino, in presenza del Premio Nobel Sir Alexander Fleming. L'ultimo, nel giugno scorso, quasi abbracciato, in quest'aula stipatissima, dal gran numero di amici ed estimatori che egli era riuscito nel tempo ad acquisire.

Adriano Vitelli fu nominato Socio ordinario dell'Accademia di Medicina di Torino nel 1979 e sempre, con entusiasmo e costanza notevoli, frequentò queste sale, fino a diventarne uno degli attori principali, in particolare come vicepresidente, dal 1990 al 1993, con l'allora presidente Angelo Carbonara, un



altro Socio che ha amato tantissimo questa Accademia, e poi come presidente, nel quadriennio 1994-1997.

Il sottoscritto, che già conosceva la famiglia Vitelli per comune frequentazione estiva della Riviera Ligure, fu da lui chiamato a far parte del suo Consiglio di Presidenza. Sono stato dunque testimone diretto di quanto il prof. Adriano Vitelli è riuscito a fare in favore dell'Accademia di Medicina di Torino, soprattutto da Presidente, ma anche da Socio Ordinario prima e da Socio Onorario nazionale dal 2004 in poi.

Per dare un'idea forte dell'impatto che la sua opera ha avuto sulla sua Accademia è sufficiente citare alcune fondamentali acquisizioni ottenute nel corso della sua presidenza: 1) una convenzione decennale rinnovabile con l'Università degli Studi di Torino che ha di fatto gradualmente riavvicinato l'Ateneo torinese allo stabile di via Po 18, favorendone il susseguente impegno in importanti lavori di ristrutturazione; 2) il recupero e la ricollocazione nello scalone d'onore dell'affresco "La Crocifissione" di Bartolomeo Guidobono, grazie al generoso supporto della Fondazione CRT, con l'allora presidente Enrico Filippi; 3) l'organizzazione del 150° anniversario della fondazione dell'Accademia di Medicina, in presenza del Premio Nobel Renato Dulbecco;



4) la promozione della ricerca "Beni culturali in ambiente medico-chirurgico piemontese" a cura di Fulvia Zina Vignotto e Marco Galloni", presentata in convegno a Villa Gualino nel 1997 e di seguito documentata da due bei volumi editi dall'Accademia di Medicina, principalmente grazie al supporto della Regione Piemonte.



A nome di tutti i Soci dell'Accademia ancora un grazie affettuoso ad Adriano Vitelli, per la dimostrazione costante di attaccamento a tutti noi, sempre espressa con grande garbo, ma in modo sobrio, pragmatico, subalpino.

*Giuseppe Poli*  
Presidente dell'Accademia di Medicina  
2004-2007

## COMMEMORAZIONE DEL SOCIO ADRIANO VITELLI

Nei molti scritti e commenti della stampa ufficiale sulla persona del professor Adriano Vitelli, sulla sua carriera pubblica, sul suo impegno come cittadino politico partecipe e attivo, come clinico e dinamico interprete e sostenitore di iniziative per gli indirizzi professionali, sociali, etici, organizzativi e accademici della nostra pratica medica, è stato accennato, ma mai con evidenza sottolineato, il suo ruolo di Maestro della Medicina, quasi fosse stato un elemento marginale del suo strepitoso curriculum.

Va da sé che avesse avuto degli allievi, ma altro era stato il suo punto di forza e il valore.

Senza timore di esagerazione, desidero invece esaltare anche questo aspetto: con il professor Adriano Vitelli è scomparso un grande protagonista della Medicina Torinese che ha insegnato a centinaia di allievi, nel momento più importante della loro formazione professionale e culturale, con l'esempio e l'impegno in prima persona, il modo e l'assunzione di responsabilità nell'Arte della Cura.

Sono lieto e onorato per l'invito della Presidenza e del Direttivo dell'Accademia di Medicina a commemorare la sua rilevante presenza nel nostro mondo sanitario: io, il più mediocre dei suoi allievi, ma favorito dalla sorte nell'aver potuto apprezzare, imitare e seguire i suoi insegnamenti, di aver potuto alimentarmi della sua cultura e dei suoi stimoli di ricerca e, purtroppo, solo grottescamente, copiarne lo stile e l'abilità.

Un "grande" che ha segnato profondamente la professione di moltissimi studenti e la cui frequenza quotidiana, per anni e anche lustri, ha impresso nella loro memoria il ricordo più esaltante e glorioso della loro carriera, dalla formazione alla maturità.

Senza rinunciare all'ambizione personale e al coinvolgente interesse per gli studi accademici il professor Vitelli difendeva ed era consapevolmente obbediente al precetto ippocratico che suggerisce di servirsi della Medicina



come strumento per donare salute, non come mezzo fine a se stesso (inganno perseguito da molti): *“Dove c’è amore per l’uomo lì c’è amore anche per l’arte medica”*.

Chi, come il sottoscritto, si muove da curioso nella Storia della Medicina inevitabilmente incrocia le antiche leggende, i miti, che ingenuamente fanno affiorare le radici e l’essenza della nostra Arte.

Perché e come siamo Medici?

Esculapio, ignorato oggi da qualsiasi giovane collega, rimane un riferimento importante: egli non solo guariva, ma insegnava e tramandava agli uomini l’arte di “superare” la morte.

Incarnando una conoscenza più ampia, egli testimonia che è il pensiero lo strumento grazie al quale si può accedere all’immortalità, il tentativo, portato avanti dall’Uomo, di sfidare la morte e, con questo, l’anelito a ricongiungersi al divino.

Il mito di Esculapio, riletto dopo 3000 anni di civiltà, porta anche all’altra considerazione che riguarda il lato ombroso dell’Uomo “moderno”, quello dell’arroganza, della presunzione e della fantasia di onnipotenza.

L’uomo non dovrebbe mai dimenticare che la morte fisica non è un incidente di percorso, bensì “la” condizione tipicamente umana, una tappa sacra e universale. E in una visione drammaticamente consumistica della vita moderna il mito ci ricorda pure di non varcare mai il solco tra il limite e l’illimitato, tra il concreto e il simbolico.

Il professore sapeva governare questa tragicità esistenziale e al capezzale del malato morente, mostrando la carità del curante ferito, sapeva sottomettersi a tale limite e con la sua inesauribile tenacia, libero da ogni arrogante accanimento e accompagnando il morente, non lo lasciava solo e cedeva all’ultimo suo desiderio: *“Se non puoi farmi vivere, almeno stammi accanto e accompagnami.”*

Anche Eschilo nella sua tragedia piange per la sorte di Prometeo, il buono, colui che ha donato agli uomini il fuoco (la conoscenza e il sapere tecnico) e ha spento la vista della morte (la speranza che non vede). È stato condannato dagli dei a una pena infinita mentre Plutone, più violento e sprezzante, pretendeva dal fratello Giove una pena ancor più grande: *“colui che ama gli uomini più di qualunque altra divinità deve morire”*. Era impensabile per gli dei che gli uomini osassero tanto!

È vero, l’uomo è per sua natura desiderio, e il desiderio che noi umani perseguiamo con la Medicina è quello di star bene, non solo nell’istante presente, ma di durare, come gli astri del firmamento. Non vorremmo vedere la morte e crediamo in una scienza chiassosa che promette senza mantenere.

Non a caso la parola *de-siderio* ha la radice in *sidera*, tendere alle stelle, al compimento di tutto, l'ingresso nell'infinito ragionato. Ma inevitabilmente giunge il *dis-astro*, la caduta delle speranze, la caduta dalle stelle: e qui si innalza la forza ideale dell'uomo forte. Il suo cuore resta rosso, immortale nella memoria, infinito nell'aspirazione, come ha ben suggerito il pittore Matisse nel suo *Icarus* caduto.

Il desiderio non può spegnersi mai e viene incessantemente ceduto e ripreso da altri. Dice il proverbio: "*Finché anche uno solo ti penserà, tu non morirai*".

Il professor Vitelli era molto attento a non abdicare e a dare alla tecnica la parte migliore della sua essenza di medico, lasciando al malato tutti i vantaggi: non era un rinunciatario né un astensionista, ma sapeva fermarsi, e questo ci ha insegnato.

Egli era aperto a ogni nuova acquisizione scientifica e tecnologica, ma nel "fine vita" affiorava la missione di Medico: da principe della Medicina, confortato da una solida conoscenza scientifica, a saggio e comprensivo testimone della sofferenza umana e dei suoi limiti.

In obbedienza ai precetti della nuova scienza che Claude Bernard e Pasteur avevano inaugurato con il positivismo scientifico, dal 1950 il professore aveva avuto la fortuna di osservare e usare le novità rivoluzionarie offerte dalla tecnica e dalla ricerca di base e aveva saputo sfruttarle in tutte le sue potenzialità e opportunità, educando e spingendo anche noi giovani ad affacciarci in questa arca fantastica.

Non solo, ma ci aveva indirizzato verso una novella scienza, l'Epidemiologia clinica, che, sfruttando le ampie possibilità di osservazione della corsia, ci impegnava particolarmente spronandoci allo studio e alla scrittura dei risultati di indagine sullo studio delle malattie.

La sua vasta esperienza era la nostra guida e lo stimolo per nuove idee.

Il più profondo insegnamento era questo: il possesso e la gestione di tecnologie e rimedi di grande efficacia possono trasformare il medico in un esperto che ripara o guarisce guasti biologici, ma attenzione a non perdere la capacità di vedere il malato come una persona e di stabilire con lui quel particolare rapporto umano definito empatia.

Per lui il malato era veramente al centro del reciproco rapporto di fiducia: non era mai un altro caso, ma una persona che aveva bisogno d'aiuto per guarire o per allontanare la sofferenza.

Principio che sarà con forza sostenuto negli anni moderni rappresentando l'aspetto più maturo e il punto di forza del nostro servizio sanitario con impegno prioritario dello Stato a vantaggio di una più complessa ragione sociale.

Anatole Broyard, notissimo critico letterario del New York Times deceduto nel 1990 all'età di 70 anni, aveva riflettuto in modo eloquente sulla sua esperienza psicologica e spirituale di malato di cancro prostatico metastatico: *“Per il medico tipico – egli scriveva – la mia malattia è un incidente di routine nel giro delle visite, mentre per me è la crisi della mia esistenza. Mi sentirei meglio se avessi un medico che perlomeno percepisse questa incongruità (...). Vorrei solo che per una volta mi concedesse l'intera sua attenzione, che fosse legato a me per un breve spazio, che esplorasse la mia anima tanto quanto la mia carne, per arrivare al mio malessere, perché ogni uomo sta male a modo proprio”*.

Vitelli dava il massimo dell'attenzione ad ogni malato e noi allievi lo vedevamo partecipare con sincera empatia al suo dolore rispettando la sua autonomia decisionale, suggerendo un percorso condiviso.

Affiorava sempre nell'incontro, con chiunque, la sua serena disponibilità e l'assoluta onestà intellettuale. Era un Primario speciale, sempre al suo posto ed efficace nella comunicazione.

Negli anni della nostra formazione i filosofi discutevano e cercavano i principi di una nuova etica, l'etica della responsabilità che inserita in un contesto sanitario dava forma e maturità all'ancora perdurante paternalismo medico, ma già orientato a un paziente giustamente informato e consenziente.

Stava entrando in corsia il consenso informato e il diritto del malato alla scelta terapeutica: erano maturi i tempi perché il professore, dopo meditate e lunghe riflessioni, diventasse l'apostolo e l'instancabile sostenitore dell'emergente bioetica nei suoi riflessi profondi sulla vita sociale, sulla libertà dell'individuo e sui diritti inalienabili dei malati, anche agli alti livelli istituzionali.

Diventeranno dei classici negli indirizzi etici sanitari le sue consulenze con le alte rappresentanze confessionali e laiche per l'elaborazione dei documenti sull'uso dei trattamenti analgici e l'uso degli oppioidi, sull'eutanasia, sul suicidio assistito, sull'umanizzazione della morte, sull'aborto assistito, ecc.

Il nostro Maestro aveva accettato negli anni l'onere del “suggeritore” della qualità in un difficile, ma indispensabile, rinnovamento degli ospedali, istituzioni in cui credeva profondamente, ma che si dimostravano antichi e non più adeguati alla nuova Società.

Egli pativa quotidianamente la crescente consapevolezza dell'onere sociale della scienza medica, negli anni in cui si sviluppavano le istanze sociali e politiche della mutualità generalizzata, del buon governo ospedaliero attraverso le riforme sanitarie, della riorganizzazione degli organici e della formazione medica e infermieristica, delle convenzioni tra Università e Ospedale.

Anche la Medicina Interna, di cui Lui era un dinamico paladino, andava riorganizzata, caricandosi coscientemente di tutto il peso che sapeva poter reggere, e con il desiderio di mantenere per essa la peculiarità dell'insieme di *“cultura + organizzazione”*, cioè di *“materia d'insegnamento e specialità professionale”*.

Tra gli anni '60 e '80 del vecchio secolo le riforme, soprattutto indotte da sviluppi culturali e tecnologici inimmaginabili in altre epoche, avevano sviluppato un nuovo concetto di clinica per la Medicina Interna: in una perdurante confusione di ruoli nel nuovo concetto di Clinica Medica si stavano fondendo l'immortale prassi ippocratica con il più moderno metodo sperimentale, l'epistemologia meccanicistica con la teoria del processo di malattia, la nuova concezione antropologica della vita e della morte con una nuova alleanza tra la medicina e i fatti sociali.

In tutto ciò il professore credeva e ci invitava, allievi e assistenti, a seguirlo e a intervenire insieme nelle trasformazioni.

Il filosofo della scienza M. Foucault aveva ben compreso questo dinamismo e il processo evolutivo della cultura ospedaliera, illustrando il percorso con il commento: *“L'ospedale moderno non è più venuto dalla carità, ma dalla scienza: la rivoluzione è partita dalla clinica”*.

Il Primario ci faceva partecipi delle novità introducendo nel reparto, via via, tutta una serie di innovazioni che portarono la nostra pratica ad essere molto all'avanguardia, anche se allocati, per un certo tempo, ancora in un vecchio e storico ospedale di Torino – il San Giovanni Battista Antica Sede – ma assai glorioso per la storia della medicina torinese.

In sintesi, inaugurammo in quegli anni nuove esperienze di medicina ambulatoriale e di Day Hospital, attività di laboratorio e innovazioni strumentali, versatili competenze nelle diverse branche internistiche, soprattutto in Diabetologia, innovativa gestione dei percorsi del paziente geriatrico, applicazione di nuove conoscenze di medicina preventiva e sua applicazione pratica, esperienze di gestione di malati anche psichiatrici e comportamentali, sperimentali esperienze sulla revisione della qualità delle cure, molta attenzione ai nuovi aspetti economici dell'assistenza medica, rafforzamento degli aspetti umanistici e scientifici dell'Arte della Medicina, partecipazione ai trial farmacologici presupposto di una futura Medicina basata sulle Evidenze.

Nel lontano 1927 in America un clinico carismatico della facoltà medica di Harvard, Francis Weld Peabody, durante una lezione agli studenti di medicina aveva detto: *“Una delle qualità fondamentali del clinico è l'interesse per l'umanità, perché il segreto per curare sta nell'aver a cuore il paziente”*.

Questo ci ricordava il professor Vitelli durante il suo giro di controvisita serale, il momento più tranquillo e intimo della giornata: *“Un buon medico deve conoscere i suoi pazienti dalla testa ai piedi, e questa conoscenza è acquisita a caro prezzo. Tempo, comprensione e solidarietà devono essere elargiti con generosità. La vera ricompensa consiste in un legame personale che rappresenta – lo ricordi sempre, Scaroina, negli anni – la più grossa soddisfazione nella nostra professione medica. Una delle qualità precipue del clinico deve essere l’interesse per l’umanità, perché il segreto per curare sta nell’aver a cuore il paziente”*. E ancora: *“La storia della medicina occidentale è metaforicamente la storia dello sguardo del medico che si posa sul malato: secondo come egli lo guarda, il malato si riduce a “corpo della malattia”, organo separato su cui operare, o si impone come essere che soffre e a cui va ridata l’armonia”*.

Si ritornava sempre al Precetto ippocratico: *“Dove c’è amore per l’uomo lì c’è amore anche per l’arte medica”*.

Purtroppo il Professore è morto. Ha seguito il destino delle centinaia di migliaia di malati che aveva curato e obbediente alla legge della natura – riferiscono i familiari – ha accettato con serenità il termine umano della vita.

Ora egli vive nei nostri cuori e nelle nostre azioni, lontano dall’idea di imitarlo, ma consapevoli di avere sempre al suo fianco la sua guida illuminata.

Anche il pittore Chagall ha dipinto il suo Icaro, la scienza limitata e ferita. Egli ci mostra con tenerezza e compassione un fantoccio che cade, senza derisione e senza accuse, accolto da un popolo di gente semplice che sa accogliere quell’angelo decaduto conscio di sapere e di dover dividerne lo stesso destino, lo stesso desiderio, lo stesso limite.

Questa folla è rossa, il rosso della passione e dell’emozione, il rosso della vita che scorre, il rosso del cuore che palpita e compatisce.

È la stessa folla che ha accolto la cattiva notizia del trapasso del suo medico e con il cuore palpitante d’amore e gratitudine l’ha accompagnato nell’ultimo viaggio terreno.

Ora Egli brilla tra le stelle e il suo desiderio primo, il bene dell’uomo, si è unito all’infinito del firmamento.

Grazie Professore per quello che ci ha dato, ma soprattutto per tutto ciò che ci ha fatto intravedere e desiderare.

Tocca a noi custodire la sua eredità e trasmetterla ad altri allievi

*Francesco Scaroina*

## LE MALATTIE PARODONTALI

*M. Aimetti*

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

Key words: *Periodontal diseases / Malattie parodontali*  
*Periomedicine / Periomedicine*  
*Periodontal regeneration / Rigenerazione parodontale*

### **Abstract:**

The periodontal diseases have been classified as gingivitis or periodontitis. Gingivitis represents the inflammatory response to bacterial colonization of tooth surfaces. It is a reversible condition since by controlling the gingival plaque it can heal successfully. In susceptible individuals, gingivitis can eventually progress to periodontitis. In such cases the inflammatory process involves the periodontal ligament and the alveolar bone allowing the development of anatomical defects.

The prevalence of gingivitis is very high (about 90% of the population), while progression from gingivitis to periodontitis occurs in 40-50% of cases, of whom 10-15% is severely affected. Requisite for periodontitis to develop is the bacterial component, however microorganisms alone are insufficient to cause destructive lesions. Periodontitis is the result of a complex interplay of bacterial challenge and host susceptibility because of genetic, systemic (diabetes mellitus, neutrophil dysfunction), and environmental factors (tobacco habits). In last years an increasing number of papers have provided evidence of a strong association between periodontitis and systemic diseases particularly atherosclerosis, diabetes and preterm birth (periomedicine).

Meticulous control of gingival plaque, which maintains gingival health, is therefore an essential method for successful treatment of periodontal diseases. With regard to anatomical defects, regeneration of all components of periodontal support (root cement, periodontal ligament, alveolar bone) can now be achieved by so-called regenerative therapy, allowing retention of teeth formerly regarded as hopeless.

### **Riassunto:**

Le patologie che interessano il parodonto si suddividono in gengiviti e parodontiti. Le gengiviti rappresentano la risposta infiammatoria alla colonizzazione batterica della superficie dentale. Sono reversibili: rimuovendo il fattore eziologico, la placca microbica, si ha il ripristino di uno stato di

salute parodontale. In alcuni individui suscettibili la gengivite non trattata può evolvere in parodontite. Il processo infiammatorio in questi casi si estende al legamento parodontale e all'osso alveolare con la formazione di difetti anatomici.

La prevalenza della gengivite nella popolazione è molto elevata (oltre il 90%), mentre la sua evoluzione in parodontiti avviene nel 40-50% dei casi dei quali il 10-15% presenta una forma grave. Requisito necessario ma non sufficiente per lo sviluppo della parodontite è la componente batterica che deve interagire con un ospite suscettibile in virtù di componenti genetiche, sistemiche (diabete, disfunzione dei PMN) e ambientali (fumo).

Negli ultimi anni c'è stato un forte incremento di pubblicazioni che hanno dimostrato una forte associazione tra parodontiti e patologie sistemiche come aterosclerosi, diabete e parto prematuro (periomedicine).

Un meticoloso controllo di placca, presupposto necessario per garantire una condizione di salute parodontale, rappresenta lo strumento imprescindibile della terapia. Per quanto riguarda il trattamento dei difetti anatomici causati dalla malattia, disponiamo oggi di tecniche di rigenerazione del parodonto profondo (osso, cemento radicolare e legamento) che consentono il recupero di elementi dentali un tempo considerati persi.

## Introduzione

Le patologie che interessano il parodonto vengono suddivise in gengiviti e parodontiti. La gengivite<sup>(14)</sup> è una condizione infiammatoria localizzata al parodonto marginale ed è espressione della risposta immunitaria alla placca microbica. La parodontite<sup>(14)</sup> ne rappresenta l'evoluzione ed è caratterizzata dalla distruzione del parodonto profondo (cemento radicolare, legamento parodontale, osso alveolare).

L'evoluzione della gengivite avviene secondo tre fasi che tengono conto della sequenza di eventi istopatologici determinati dall'azione della placca batterica: iniziale, precoce e stabilizzata<sup>(31)</sup>. Clinicamente si manifesta con arrossamento, edema e sanguinamento<sup>(27)</sup> ed è condizionata da fattori come il fumo, alcuni farmaci (nifedipina, ciclosporina, fentoina), patologie sistemiche (diabete) e modificazioni ormonali<sup>(31)</sup>.

La parodontite rappresenta la progressione di una gengivite stabilizzata: il processo infiammatorio si estende verso la parte più profonda del tessuto connettivo coinvolgendo l'osso alveolare. Si determinano così la distruzione irreversibile dell'attacco connettivale e dell'osso alveolare e la contaminazione batterica del cemento radicolare. Se è vero che una gengivite precede sempre una parodontite, non tutte le gengiviti progrediscono in parodontite<sup>(8)</sup>, inoltre la parodontite non necessariamente colpisce tutti gli elementi dentali<sup>(8)</sup>. Dal momento che non è possibile prevedere i siti in cui la gengivite progredirà in parodontite, è necessario impostare un programma di prevenzione e terapia di tutte le gengiviti<sup>(4)</sup>.

Le parodontiti, in base ad entità di distruzione ed età del paziente, sono classificate in 3 entità nosografiche: forme croniche, aggressive e necrotizzanti<sup>(9)</sup>. La parodontite cronica, generalizzata o localizzata (a seconda che siano coinvolti più o meno del 30% dei siti), è la più diffusa nell'ambito della popolazione. Nei paesi occidentali circa il 35-40% degli adulti sopra i 30 anni ne è affetto<sup>(4)</sup>. Di questi, circa il 13% presenta una forma severa di parodontite e circa il 22% ha una forma di media gravità<sup>(2)</sup>. Questi dati, insieme a quelli emersi dagli studi epidemiologici analitici, hanno messo in evidenza l'importanza della suscettibilità individuale nell'insorgenza della parodontite. La parodontite è una patologia relativa all'individuo (solo una minoranza della popolazione è affetta da forme gravi della patologia) e sitospecifica poiché solo alcuni siti in questi soggetti sono colpiti<sup>(32)</sup>. La progressione della malattia può essere considerata un processo continuo con periodi di esacerbazione<sup>(26,28)</sup>.



### **Patogenesi ed istopatologia della malattia parodontale**

Il tessuto gengivale clinicamente sano presenta sempre nei preparati istologici un infiltrato infiammatorio, costituito in prevalenza da granulociti neutrofili, a causa della costante colonizzazione microbica della superficie dentale. La funzione primaria di tale infiltrato leucocitario è fagocitare i batteri penetrati nel tessuto attraverso l'epitelio del solco gengivale. La migrazione dei polimorfonucleati verso il solco crevicolare avviene in seguito al rilascio di citochine da parte delle cellule epiteliali danneggiate dai microrganismi e di peptidi batterici con azione chemiotattica<sup>(3,10,11,16)</sup>. Una volta nel solco i neutrofili svolgono azione antibatterica. In questo stadio l'infiammazione gengivale è reversibile se la placca batterica viene rimossa<sup>(27)</sup>.

Nei primi stadi della gengivite i cambiamenti clinici sono di modesta entità mentre si rilevano marcati cambiamenti istopatologici. Page e Schroeder<sup>(31)</sup> hanno sviluppato una classificazione clinica ed istopatologica della malattia parodontale in base alla progressione del processo infiammatorio parodontale: lesione iniziale (salute clinica), lesione precoce (gengivite iniziale), lesione stabilizzata (gengivite cronica), lesione avanzata (parodontite cronica). La lesione iniziale compare dopo 4 giorni di accumulo di placca. Non è clinicamente visibile<sup>(27)</sup> ed è caratterizzata da una risposta infiammatoria acuta all'accumulo batterico<sup>(37)</sup>. È localizzata alla regione del solco gengivale, all'epitelio giunzionale ed alla porzione più coronale del tessuto connettivale sottostante. All'analisi istopatologica si evidenzia una dilatazione di arteriole e venule del plesso dentogengivale con aumento della permeabilità. Il flusso del fluido crevicolare è aumentato ed i granulociti neutrofili migrano dal plesso vascolare nell'epitelio giunzionale e nel solco gengivale. L'infiltrato infiammatorio occupa il 5-10% del connettivo gengivale sopracrestale.

Dopo circa 7 giorni di accumulo della placca, la lesione iniziale evolve in lesione precoce. I vasi rimangono dilatati, ma aumentano di numero per l'apertura di vasi inizialmente inattivi. Linfociti e macrofagi predominano alla periferia della lesione. Le plasmacellule sono ancora poche e sparse. In questa fase l'infiltrato infiammatorio occupa circa il 15% del connettivo gengivale e la distruzione delle fibre collagene raggiunge nell'area infiltrata il 60-70%. Clinicamente le modificazioni infiammatorie si presentano con un quadro di eritema ed edema<sup>(27)</sup>.

Dopo 2 o 3 settimane di accumulo di placca, la lesione precoce evolve in lesione stabilizzata. Clinicamente si evidenziano edema ed arrossamento gengivali più accentuati rispetto alla fase precedente. Dal punto di vista istologico gli epiteli sulcolare e giunzionale formano degli zaffi che

si approfondiscono nel connettivo sottostante. La porzione coronale dell'epitelio giunzionale non aderisce più alla superficie dentale e si forma una tasca gengivale. L'infiltrato infiammatorio occupa un'area più estesa ed è caratterizzato da una predominanza di plasmacellule e linfociti alla periferia della lesione. Macrofagi e linfociti sono evidenziabili nella lamina propria della tasca gengivale. A livello del solco e dell'epitelio giunzionale predominano, invece, i polimorfonucleati<sup>(24,25,37)</sup>.

La lesione stabilizzata può in alcuni individui rimanere stabile (gengivite) ed in altri evolvere in lesione avanzata (parodontite). La progressione da gengivite a parodontite è certamente multifattoriale e, oltre alla presenza della componente batterica che svolge il ruolo eziologico primario, dipende strettamente da fattori relativi all'individuo. Ad oggi non siamo ancora in grado di prevederla con precisione. La progressione da gengivite a parodontite si accompagna alla comparsa di un infiltrato infiammatorio cronico in cui predominano i linfociti T e B. È ampiamente dimostrato che le plasmacellule sono le cellule più rappresentate<sup>(23)</sup>. Nella lesione avanzata i cambiamenti istopatologici presenti nella lesione gengivale stabilizzata si accompagnano alla distruzione dell'attacco connettivale ed alla migrazione apicale dell'attacco epiteliale<sup>(24)</sup>. Altri cambiamenti includono formazione della tasca parodontale, ulcerazione della superficie epiteliale, suppurazione, distruzione dell'osso alveolare e del legamento parodontale, mobilità dentale ed eventualmente perdita dentale.

La distruzione tessutale che caratterizza la malattia parodontale è il risultato dell'azione microbica diretta e della risposta dell'ospite<sup>(15,38,39,40)</sup>. La presenza di microrganismi considerati potenzialmente patogeni per il parodonto appare necessaria, ma non sufficiente per l'insorgenza della malattia. La parodontite è conseguenza dell'interazione tra fattori genetici, ambientali, immunologici e microbici. La presenza di microrganismi è il fattore cruciale perché si instauri una malattia parodontale, ma la progressione della malattia è relazionata alla risposta immunitaria dell'individuo e ai suoi fattori di rischio. Tra i principali fattori di rischio annoveriamo l'età, il sesso, il fumo, e alcune patologie sistemiche come il diabete mellito.

### **Suscettibilità alla malattia parodontale e fattori di rischio**

La prevalenza della malattia parodontale aumenta con l'età<sup>(2)</sup> anche se non è chiaro se l'invecchiamento aumenti la suscettibilità alla malattia o se si verifichi un effetto cumulativo durante la vita che spieghi la prevalenza della malattia nella popolazione anziana<sup>(44)</sup>.

L'associazione tra fumo e perdita di attacco parodontale è stata confermata da studi trasversali e longitudinali<sup>(12,17,18,28,33,34,41,45)</sup>. A parità di livello di igiene orale e di infiammazione gengivale il rischio di insorgenza di parodontiti aumenta da 2.5 a 7 volte nel fumatore e la velocità di progressione del danno risulta raddoppiata con conseguenti valori di prevalenza, estensione e gravità del danno maggiori rispetto al non fumatore<sup>(36)</sup>. La severità della condizione parodontale nel fumatore sembrerebbe attribuibile ai costituenti del tabacco capaci di modulare le risposte immunitaria ed infiammatoria dell'ospite<sup>(34)</sup>. Vi è inoltre un ridotto potenziale riparativo che rende difficile la guarigione dei tessuti ed influenza negativamente l'esito della terapia non chirurgica e chirurgica<sup>(19)</sup>.

Malattie sistemiche che deprimono le difese immunitarie dell'organismo possono aumentare il rischio di insorgenza della malattia parodontale. Una riduzione numerica o funzionale dei neutrofili è stata associata con parodontiti di severa gravità<sup>(5)</sup>.

È stato evidenziato che il diabete mellito aumenta il rischio di malattia parodontale<sup>(1,35,42,43)</sup>.

Numerose evidenze indicano che la componente genetica predisporrebbe all'insorgenza della malattia parodontale<sup>(20)</sup>. Studi sui gemelli hanno confermato l'importanza del fattore genetico<sup>(29,30)</sup> che avrebbe un ruolo preminente in particolare modo nelle forme gravi di parodontite aggressiva. La ricerca negli ultimi anni si è incentrata sullo studio del polimorfismo dei geni che regolano la produzione di citochine, cui è stato ricondotto l'aumentato rischio di parodontite nell'adulto<sup>(22)</sup>.

### **Parodontite come fattore di rischio associato a malattie sistemiche**

Nel corso degli ultimi 20 anni medici ed odontoiatri hanno iniziato a riesaminare la questione relativa al rapporto tra infezioni del cavo orale e malattie sistemiche. Dall'analisi dei dati epidemiologici è emerso che le parodontiti rappresenterebbero un fattore di rischio per alcune patologie sistemiche. Tra i criteri che permettono di considerare un possibile fattore di rischio associato ad una malattia come causa rilevante di quella malattia vi sono la plausibilità biologica e la conferma prodotta da evidenze sperimentali. Questi dati ci permettono oggi di assimilare le parodontiti ad un fattore di rischio per coronaropatie ed aterosclerosi più in generale, per complicanze della gravidanza ( neonati pretermine e con basso peso alla nascita), per il diabete mellito e per infezioni respiratorie.

Risulta chiaro che la parodontite è fortemente associata a tali condizioni sistemiche, ma rimane ancora da chiarire l'esatta natura della relazione.

## **Cenni di diagnosi e terapia**

Una diagnosi corretta si esegue attraverso la valutazione dei dati raccolti con anamnesi, esame clinico parodontale, valutazione radiografica, eventuali esami di laboratorio e, quando necessarie, consultazioni medico-specialistiche.

La valutazione dell'igiene orale è determinante per la diagnosi (rapporto relativo fra quantità di placca microbica rilevata e gravità delle lesioni parodontali) e per la formulazione di un corretto piano di trattamento, in quanto le modificazioni delle abitudini igieniche del paziente giocano un ruolo determinante nella scelta delle possibilità terapeutiche. Per tale motivo è fondamentale monitorare il livello di placca in quanto indicatore del grado di motivazione del paziente.

Il sondaggio parodontale è la manovra essenziale per la diagnosi delle malattie parodontali poiché consente di stimare la perdita di attacco, segno patognomonico delle parodontiti. La diagnosi deve poi essere completata con l'esame radiografico sistematico endorale che fornisce ulteriori informazioni relative soprattutto alle caratteristiche morfologiche dei difetti ossei oltre che allo stato di salute dei denti.

Per quanto riguarda la terapia, questa si articola in vari momenti. Nella fase iniziale di trattamento si considera la presenza di malattie sistemiche e fattori di rischio che possono influenzare patogenesi, prognosi e terapia della malattia parodontale. A questa segue la fase di terapia causale che include l'istruzione e la motivazione del paziente all'igiene domiciliare e la cura dei tessuti parodontali per mezzo della terapia non chirurgica.

Completata la fase di terapia eziologica segue la fase correttiva che comprende procedure designate a correggere gli effetti della malattia parodontale sui tessuti parodontali, sui denti e sul sistema masticatorio. Questa include la terapia oclusale, la chirurgia parodontale, la terapia ortodontica e la chirurgia implantare.

Per quanto riguarda la terapia chirurgica delle lesioni causate dalla parodontite si sono sviluppate negli ultimi anni procedure chirurgiche e microchirurgiche (rigenerazione tessutale guidata) che consentono di rigenerare l'osso e il legamento parodontale andati perduti. Queste possibilità terapeutiche consentono il recupero anatomico e funzionale di elementi dentali la cui prognosi sarebbe stata infausta fino a pochi anni fa.

Infine la fase di mantenimento, essenziale in ogni piano di trattamento parodontale, ma sarebbe meglio dire odontoiatrico. Una terapia parodontale può fallire se non è seguita da un adeguato controllo di placca domiciliare e da un adeguato follow-up di supporto. Un controllo professionale ogni 3 o 4 mesi

sembra essere efficace per il mantenimento del paziente parodontale. Ad ogni controllo devono essere monitorati tutti i parametri parodontali ed occlusali. Deve essere eseguito un continuo rinforzo motivazionale per garantire il mantenimento di un'adeguata igiene domiciliare ed in presenza di siti con un peggioramento dei parametri clinici vanno eseguite sedute di levigatura radicolare aggiuntive.

#### BIBLIOGRAFIA

1. A.A.P.: *Position paper on diabetes and periodontal disease*. J. Periodontol. 70, 935-949, 1999.
2. Albandar J.M. e al.: *Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994*. J. Periodontol. 70, 13-29, 1999.
3. Armitage G.C.: *Longitudinal evaluation of elastase as a marker for the progression of periodontitis*. J. Periodontol. 65, 120-128, 1994.
4. Axelsson P., Lindhe J., Nystrom B.: *On the prevention of caries and periodontal disease. Results of a 15 year longitudinal study in adults*. J. Clin. Periodontol. 18, 182-189, 1991.
5. Baehni C.: *Periodontal status associated with chronic neutropenia*. J. Clin. Periodontol. 10: 222-230, 1983.
6. Barr C. e al.: *Periodontal changes by HIV serostatus in a cohort of homosexuals and bisexuals men*. J. Clin. Periodontol. 19, 794-801, 1992.
7. Bergstrom J.: *Tobacco use as a risk factor*. J. Periodontol. 65, 545-550, 1994.
8. Brown L.J., Loe H.: *Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease*. Periodontol. 2000 2, 57, 1993.
9. Caton J.: *Classification of Periodontal Disease*. In: *Proceedings of the World Workshop in Clinical Periodontics*. A.A.P. 1989 1.2-1.3.
10. Eley B.M., Cox S.W.: *Correlation between gingivain/gingipain and bacterial dipeptidyl peptidase activity in gingival crevicular fluid and periodontal attachment loss in chronic periodontitis patients. A 2-year longitudinal study*. J. Periodontol. 67, 703-716, 1996.

11. Eley B.M. e al.: *A 2-year longitudinal study of elastase in human gingival crevicular fluid and periodontal attachment loss*. J. Clin. Periodontol. 23, 681-692, 1996.
12. Feldman R., Bravacos J., Rose C.: *Association between smoking different tobacco products and periodontal indexes*. J. Periodontol. 54, 481-487, 1983.
13. Friedman R.B. e al.: *Periodontal status of HIV-seropositive and AIDS patients*. J. Periodontol. 62, 623-627, 1991.
14. *Glossary of periodontal terms*. J. Periodontol. 57 (suppl): 23,1986.
15. Goodson J.M. et al.: *Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease*. J. Clin. Periodontol. 9, 472-481, 1982.
16. Graves D.T. e al.: *Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental periodontitis*. J. Periodontol. 69, 1419-1425, 1998.
17. Haber J., Kent R.L.: *Cigarette smoking in a periodontal practice*. J. Periodontol. 63, 100-106, 1992.
18. Haber J., Wattles L., Crowley M., Mandell R., Joshipura K., Kent R.L.: *Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis*. I. Periodontol. 64,16-23, 1993.
19. Haber J.: *Smoking is a major risk factor for periodontitis*. Curr. Opin. Periodontol. 1218, 1994.
20. Hart T.C.: *Genetic risk factors for early onset periodontitis*. I. Periodontol. 67, 355-366, 1996.
21. Klein R.S.: *Periodontal disease in heterosexuals with acquired immunodeficiency syndrome*. J. Periodontol. 62, 535-540, 1991.
22. Kornman K.S., Crane A., Wang H.Y., di Giovine F.S., Newman M.G., Pirk F.W.: *The interleukin I genotype as a severity factor in adult periodontal disease*. J. Clin. Periodontol. 24, 72-77, 1997.
23. LiIjenberg B., Lindhe J., Berglundh T., Dahl6n G.: *Some microbiological, histopathological and immunohistochemical characteristics of progressive periodontal disease*. I. Clin. Periodontol. 21, 720-727, 1994.
24. Lindhe J., LiIjenberg B., Listgarten M.: *Some microbiological features of periodontal disease in man*. J. Periodontol. 51, 264-269, 1980.
25. Lindhe J., Okamoto H., Yoneyama T., Haffajee A., Socransky S.S.: *Periodontal loser sites in untreated adult subjects*. J. Clin. Periodontol. 16, 671-678, 1989.
26. Listgarten M.: *Patogenesis of periodontitis*. I. Clin. Periodontol. 13, 418-425, 1986.
27. Loe H., Theilade E., Jensen S.: *Experimental gingivitis in man*. J. Periodontol. 36, 177-187, 1965.
28. Loe H.: *Natural history of periodontal disease in man*. J. Cl. Periodontol. 13, 431-440, 1986.
29. Michalowicz B.S., Aeppli D., Virag J.G., Klump D.G., Hinrichs J.E., Segal N.L., Bouchard T.J. Jr, Pihlstrom B.L.: *Periodontal findings in adult twins*. J. Periodontol 62, 293-299, 1991.
30. Michalowicz B.S.: *Genetic and heritable risk factors in periodontal disease*. J. Periodontol 65, 479-488, 1994.

31. Page R.C.: *Gingivitis*. J. Clin. Periodontol. 13, 345, 1986.
32. Papananou P.N., Wennström J.L., Grondhal K.: *Periodontal status in relation to age and tooth type. A crosssectional radiographic study*. J. Clin. Periodontol. 15, 469-478, 1988.
33. Preber H., Bergström J., Linder L.E.: *Occurrence of periopathogens in smoker and nonsmoker patients*. J. Clin. Periodontol. 19, 667-671, 1992.
34. Preber H., Bergström J.: *Effect of cigarette smoking on periodontal healing following surgical therapy*. J. Clin. Periodontol. 17, 324-328, 1990.
35. Safkan-Seppala A., Ainamo J.: *Periodontal conditions in insulin-dependent diabetes mellitus*. J. Clin. Periodontol. 24-29, 1992.
36. Salvi G., Lawrence L., Offenbacher S.: *Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis*. Periodontol. 2000 14, 173-201, 1997.
37. Seymour G., Powell R., Cole K., Aitken J., Brooks D., Beckham I., Zola H., Bradley J., Burns G.: *Experimental gingivitis in humans. A histochemical and immunological characterization of the lymphoid cell subpopulations*. J. Periodontal Res. 18, 375-385, 1983.
38. Socransky S., Haffajee A.: *Evidence of bacterial aetiology: a historical perspective*. Periodontol. 2000 5, 725, 1994.
39. Socransky S., Haffajee A.: *The bacterial aetiology of destructive periodontal disease: current concepts*. J. Periodontol. 63, 332-331, 1992.
40. Socransky S.S., Haffajee A.D., Goodson J.M., Lindhe J.: *New concepts of destructive periodontal disease*. J. Clin. Periodontol. 11, 21-32, 1984.
41. Stoltenberg J.I., Osborn J.B., Pihlström B.L., Herzberg M.C., Aepli D.M., Wolff L.F., Fischer G.E.: *Association between cigarette smoking, bacterial pathogens, and periodontal status*. J. Periodontol. 64, 1225-1230, 1993.
42. Tervonen T., Oliver R.C.: *Long-term control of diabetes mellitus and periodontitis*. J. Clin. Periodontol. 20, 431-435, 1993.
43. Thorstensson H., Hugoson A.: *Periodontal disease experience in adult long-duration insulin-dependent diabetics*. J. Clin. Periodontol. 20, 352-358, 1993.
44. Van der Welden U.: *Effect of age on the periodontium*. J. Clin. Periodontol. 11, 281-294, 1984.
45. Zambon J.J., Grossi S.G., Machtei E.E., Ho A.W., Dunford R., Genco R.J.: *Cigarette smoking increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens*. J. Periodontol. 67 (suppl.), 1050-1054, 1996.

## ASSOCIAZIONE TRA LA PATOLOGIA INFIAMMATORIA CRONICA ENDODONTICA E PARODONTALE E LE CORONAROPATIE: STUDIO CLINICO E BIOMOLECOLARE

*E. Berutti, D. Pasqualini*

University of Turin Dental School - Dept. of Endodontics

Key words: *Cardiovascular disease / Malattia cardiovascolare*  
*Apical periodontitis / Parodontite apicale*  
*Chronic periodontitis / Parodontite cronica*  
*Risk factors / Fattori di rischio*

### **Abstract:**

#### **Association between chronic inflammatory apical periodontitis, periodontal disease and cardiovascular disease: a clinical and biomolecular investigation**

Several lines of evidence support the causative role of oral inflammatory lesions and certain systemic diseases, such as atherosclerosis and cardiovascular diseases (CVD). Chronic periodontitis seems to be associated to an increased prevalence and incidence of CVD, regardless of conventional risk factors. A number of cross-sectional studies addressing a possible association between oral health and systemic diseases have also investigated the presence or the absence of periapical lesions. Young adults with apical periodontitis exhibit certain biochemical changes, which have been shown to elevate the risk for cardiovascular diseases. However, these studies cannot either confirm or refute a role of the periapical inflammatory lesion in the observed associations. For this aim it has been designed a case-control clinical trial (300 patients each group, 2 years enrollment, 90% study power). Epidemiological, clinical and radiological data will be collected in the patients identified as CASES (age ranging 25 to 55 years, non-diabetes, CVD affected). Healthy subjects with the same demographic characteristics will be considered as matched CONTROLS. Blood and saliva samples from both groups will be analysed to investigate polymorphisms of CD14 gene promoter and the soluble CD14 amount. Patients from both groups will be classified on the basis of gravity scores associated to their oral, endodontic and periodontal status and the periradicular bone resorption. The association between endodontic and periodontal disease and CVD will be investigated with appropriate logistic regression models.

### **Riassunto:**

Diverse linee di ricerca sostengono il nesso causale tra lesioni infiammatorie orali e alcune malattie sistemiche, come l'aterosclerosi e le patologie



cardiovascolari. La parodontite cronica sembrerebbe essere associata ad una aumentata prevalenza ed incidenza della coronaropatia indipendentemente dai fattori di rischio convenzionali. Alcuni studi cross-sectional che individuano una possibile associazione tra salute orale e malattie sistemiche, hanno anche valutato la presenza o l'assenza di lesioni periapicali. Giovani adulti con parodontite apicale cronica manifestano alcuni mutamenti a livello biochimico i quali, è stato dimostrato, incrementano il rischio di manifestare patologie cardiovascolari. Tuttavia questi studi non sono in grado di confermare o smentire un ruolo eventuale delle lesioni infiammatorie periapicali nelle associazioni osservate. A tale scopo viene disegnato uno studio clinico osservazionale caso-controllo (300 pazienti per gruppo in 2 anni di reclutamento, per una Potenza del 90%). Nei pazienti identificati come CASI (età compresa tra 25 e 55 anni, non diabetici, con coronaropatia nota, pregresso infarto miocardico, pregressa angina instabile, angina da sforzo con soglia stabile, entro 12 mesi dall'evento acuto come prima manifestazione), verranno raccolti i parametri clinico-radiografici endodontici e parodontali ed epidemiologici. Inoltre tramite i campioni di sangue e saliva prelevati, verranno studiati i polimorfismi del promotore del gene del CD14 e la quantità di CD14 solubile. Verranno considerati come CONTROLLI soggetti sani dal punto di vista cardiologico, con pari caratteristiche demografiche dei CASI, nei quali verranno eseguiti il prelievo di sangue e di saliva con le stesse modalità. I pazienti di entrambi i gruppi verranno classificati in base a indici di gravità definiti sulla base dello stato dentale, endodontico e parodontale e sull'entità del riassorbimento osseo radiografico periradicolare. L'associazione tra malattie endodontiche o parodontali e coronaropatie verrà analizzata mediante modelli di regressione logistica.

## PROGRAMMA SCIENTIFICO

### Contesto e razionale

Le sindromi coronariche acute rappresentano uno dei maggiori problemi di salute pubblica nei paesi industrializzati per la significativa morbidità e mortalità (10%). In Italia 80.000 pazienti all'anno sono dimessi con diagnosi di IMA. Negli ultimi anni è stata data particolare attenzione ai fattori di rischio non convenzionali (genetici, infiammatori ed infettivi) per spiegare l'evento ischemico in pazienti giovani o non esposti a fattori di rischio coronarici noti. La parodontite cronica sembrerebbe essere associata ad una aumentata prevalenza ed incidenza della coronaropatia indipendentemente dai fattori di rischio convenzionali<sup>(3)</sup>. L'infezione parodontale potrebbe influire sullo sviluppo della coronaropatia attraverso la presenza di un microbiota prevalentemente Gram-ed un'alterata risposta dell'ospite<sup>(1)</sup>. Il lipopolisaccaride (endotossina) dei batteri Gram-, attraverso il legame alle cellule di Langherans ed al recettore CD14 localizzato sulla membrana di fagociti ed endotelio, determinerebbe il rilascio di mediatori infiammatori e l'espressione di adesine coinvolti nei processi di aterogenesi e trombogenesi<sup>(7)</sup>. Negli individui con fenotipo monocito/macrofago iperinflammatorio l'aggressione batterica causa una eccessiva produzione di citochine e mediatori lipidici<sup>(7)</sup>. La parodontite apicale rappresenta la risposta immunitaria ad una contaminazione batterica cronica dello spazio endodontico e periradicolare. Pur essendo dimostrate importanti similitudini con la risposta infiammatoria presente nella parodontite cronica, i dati sulle manifestazioni sistemiche del processo flogistico periapicale sono ancora controversi<sup>(5-6)</sup>. Recentemente un importante studio longitudinale (VA Dental Longitudinal Study – Boston Area) ha dimostrato che i soggetti maschi più giovani al baseline, nei quali era evidente la presenza di lesioni periradicolari di origine endodontica, avevano un rischio incrementato di sviluppare malattia coronarica<sup>(2)</sup>. Data l'importanza della risposta dell'ospite nell'eziopatogenesi delle patologie cardiovascolari, endodontiche e parodontali, lo studio dei polimorfismi dei geni che codificano per i mediatori infiammatori potrebbe rendere possibile l'individuazione di soggetti a rischio. La suscettibilità individuale è influenzata da una componente ereditaria alla base di alterazioni nella struttura e/o funzione dei geni.

### Obiettivi

Obiettivo primario dello studio è valutare l'associazione tra patologia infiammatoria cronica endodontica e parodontale e malattia coronarica.

Inoltre, l'obiettivo secondario è identificare alcuni polimorfismi genetici come markers di predisposizione all'insorgenza di cardiopatia ischemica al di sotto dei 55 anni.

## **Metodi**

Lo studio clinico osservazionale, basato su un disegno caso-controllo, prevede l'arruolamento (in 2 anni) di circa 300 pazienti per gruppo che permetteranno di raggiungere una Potenza del 90%. I pazienti identificati come CASI saranno reclutati presso il Reparto di Cardiologia Universitaria (Prof. Trevi) dell'A.S.O. S. Giovanni Battista – Molinette di Torino e dovranno essere soggetti di età compresa tra 25 e 55 anni, non diabetici, con coronaropatia nota (pregresso infarto miocardio, pregressa angina instabile, angina da sforzo con soglia stabile, entro 12 mesi dall'evento acuto come prima manifestazione). Al momento dell'arruolamento verranno raccolti i parametri clinico-epidemiologici (età, sesso, fattori di rischio coronarici). I pazienti effettueranno una visita odontostomatologica (cariologica/endodontica e parodontale) ed un ERSE (esame radiografico sistematico delle arcate dentarie) per evidenziare la presenza di carie, malattia endodontica o parodontale. Saranno sottoposti ad un prelievo di sangue intero dal dito medio e ad un prelievo di 5 ml di saliva non stimolata sottolinguale per lo studio dei polimorfismi genetici e del CD14 solubile. Verranno considerati come CONTROLLI soggetti sani dal punto di vista cardiologico, con pari caratteristiche demografiche dei CASI, reclutati da basi dati ospedaliere. I soggetti verranno sottoposti a questionario medico (anamnesi e profilo di rischio cardiovascolare), elettrocardiogramma e visita cardiologica c/o la Divisione Universitaria di Cardiologia. Al momento della valutazione endodontica e parodontale saranno effettuati un prelievo di sangue ed uno di saliva con le stesse modalità sopra descritte per i CASI. I pazienti di entrambi i gruppi (CASI e CONTROLLI), effettuata la diagnosi certa di carie, malattia endodontica, parodontale o combinata endodontico-parodontale, verranno classificati in base a indici di gravità definiti sulla base dello stato dentale e parodontale (FMPS, FMBS, PPD, DMFT, PAI, PAL) e sull'entità del riassorbimento osseo radiografico periradicolare. Saranno analizzati i polimorfismi del promotore del gene del CD14 in posizione -260 (C-T) e -159 (C-T) mediante la tecnica Restriction Fragments Length Polymorphism che permette l'identificazione, mediante enzimi di restrizione, di una singola mutazione nella sequenza nucleotidica di interesse. Per correlare il polimorfismo studiato con eventuali variazioni quantitative della proteina corrispondente (CD14 solubile), aliquote di proteine salivari saranno

sottoposte ad elettroforesi e identificazione mediante anticorpi monoclonali. L'associazione tra malattie endodontiche o parodontali e coronaropatie verrà analizzata mediante modelli di regressione logistica; i risultati verranno presentati in termini di odds ratio grezzi e aggiustati per i principali fattori di confondimento (sesso, età, abitudini al fumo ecc.) e relativi intervalli di confidenza al 95%.

### **Risultati attesi**

Eventuali risultati statisticamente significativi permetterebbero di evidenziare le malattie endodontiche e/o parodontali come probabili ulteriori fattori di rischio non convenzionali nello sviluppo di patologie coronariche. Inoltre, l'identificazione di "markers genetici" potrebbe essere il punto di partenza per una valutazione prognostica del paziente con implicazioni cliniche importanti quali lo sviluppo di potenziali terapie volte alla prevenzione, alla cura o al rallentamento della progressione delle malattie infiammatorie croniche odontoiatriche e delle patologie ad esse eventualmente correlate.

### **Ricadute per il Servizio Sanitario regionale**

Lo studio potrebbe fornire ulteriori conoscenze per l'identificazione di popolazioni a rischio di coronaropatia, attraverso strumenti diagnostici non invasivi (visita odontostomatologica, radiografie endorali di routine, prelievo ematico e di saliva) e di costo limitato e modelli prognostici affidabili. La rapidità e la non invasività dell'indagine potrebbe rendere possibile effettuare visite di screening su ampi campioni della popolazione. Inoltre, i soggetti a rischio di patologia cardiovascolare potrebbero essere sottoposti a programmi di prevenzione primaria e secondaria. In questo modo si potrebbe contribuire a ridurre la prevalenza e l'incidenza della malattia coronarica con minori oneri a carico del SSR.

## BIBLIOGRAFIA

1. Al-Zaharani M.S.: *Periodontitis and cardiovascular disease: a review of shared risk factors and new findings supporting a causality hypothesis*. Quintessence Int. 37, 11-18, 2006.
2. Caplan D.J., Chasen J.B., Cai J., Kang S., Krall E., Garcia R., Offenbacher S., Beck J.D.: *Lesions of endodontic origin and risk of coronary heart disease*. J. Dent. Res. 85, 996-1000, 2006.
3. Dietrich T., Garcia R.: *Associations between periodontal disease and systemic diseases: evaluating the strength of the evidence*. J. Periodontol. 76, 2175-2184, 2005.
4. Honda T., Oda T., Yoshie H., Yamazaki K.: *Effects of Porphyromonas gingivalis antigens and proinflammatory cytokines on human coronary artery and endothelial cells*. Oral Microbiol. Immunol. 20, 82-88, 2005.
5. Marton I.J., Bergenholtz G.: *The periapical inflammatory process – systemic and local manifestations: introduction*. Endodontic Topics 8, 1-2, 2004.
6. Marton I.J.: *How does the periapical inflammatory process compromise general health?* Endodontic Topics 8, 3-14, 2004.
7. Southerland J.H., Taylor G.W., Moss K., Beck J.D., Offenbacher S.: *Commonality in chronic inflammatory diseases: periodontitis, diabetes, and coronary artery disease*. Periodontol. 40, 130-143, 2006.

## EDENTULISMO E SINDROME DELLE APNEE OSTRUTTIVE NEL SONNO (OSAS)

*S. Carossa, F. Erovigni*

Dipartimento di Scienze Biomediche ed Oncologia Umana  
Reperto di Protesi Dentaria - Università degli Studi di Torino

Key words:     *OSAS / OSAS*  
                  *Edentulism / Edentulismo*  
                  *Vertical dimension / Dimensione verticale*  
                  *of occlusion (VDO)     di occlusione (DVO)*  
                  *Denture / Protesi totale*

### **Abstract:**

*Aim:* Obstructive sleep apnoea (OSA) is a sleep disorder characterised by repetitive episodes of upper airway obstruction (apnoea) or reduced airflow (hypopnoea) despite persistent respiratory effort. The OSA syndrome (OSAS) is defined as an apnoea-hypopnoea index (AHI; total number of episodes of apnoea and hypopnoea per hour of sleep) of 5 or more episodes with excessive somnolence. OSAS is considered nowadays an important risk factor for cardiovascular disease as the myocardial infarction, hypertension, and brain infarction. Recently, it has been suggested that edentulism worsens sleep apnoea; sleeping without dentures is associated with a significant increase in the AHI.

*Methods and results:* In a recent study of the Turin University a group of 48 complete edentulous patients were analysed through poli-somnography during two nights: one with and the other without dentures. Both AHI and mean SaO<sub>2</sub> were significantly worse in the night slept without dentures. The decrease in pharyngeal airway by edentulism is supported by the findings of cephalometry. The main anatomical changes caused by the loss of natural teeth consists in loss of the vertical dimension of occlusion (VDO), reduction of the lower face height and rotation of the mandible, all leading to occlusion disharmony. A recent study conducted by the Turin University on a population of 403 people (age range, 65-90 yr) showed a significant correlation among incongruous VDO, lack of use of the denture in the night-time and high OSAS-risk.

*Conclusion:* It is useful to suggest complete edentulous patients to wear their denture during sleeping and to remove them for a few hours during day. The role of the dentist in recognising and prevention of OSA is really important, considering that just the control of a correct VDO, a constant follow-up, and a screening questionnaire for OSAS can improve the quality of life of the aged-patients.

**Riassunto:**

*Introduzione:* L'apnea ostruttiva (OSA) è un disturbo del sonno caratterizzato da ripetuti episodi di ostruzione totale (apnee) o parziale (ipopnee) delle vie aeree superiori seguiti da uno sforzo respiratorio volto a superare l'ostruzione. La Sindrome delle Apnee Ostruttive del Sonno (OSAS) viene identificata da un indice di apnea-ipopnea (AHI, numero totale di apnee ed ipopnee per ora di sonno) maggiore o uguale a 5 in associazione a frequente sonnolenza. L'affaticamento cardiaco che segue l'ipossia apnoica, fa sì che l'OSAS oggi venga considerato un importante fattore di rischio per patologie cardiovascolari quali l'infarto miocardico, l'ipertensione arteriosa e l'infarto cerebrale. Recentemente è stato suggerito che l'edentulismo peggiori l'apnea ostruttiva del sonno.

*Metodi e risultati:* in un recente studio su 48 pazienti edentuli sono stati analizzati sia l'AHI che la SaO<sup>2</sup> durante il sonno sia con che senza protesi. I suddetti valori sono peggiorati significativamente nella notte dormita senza protesi. Il cambiamento anatomico principale consiste nella perdita della dimensione verticale di occlusione (DVO) e conseguente riduzione del calibro faringeo. Tale riduzione è stata verificata mediante un'analisi cefalometrica. In uno studio condotto dall'Università di Torino su 403 pazienti di età compresa tra 65 e 90 anni, è emersa una correlazione significativa tra il mancato utilizzo della protesi durante la notte, l'incongruità della DVO e il rischio di apnee notturne.

*Conclusioni:* In base ai risultati è utile consigliare al paziente completamente edentulo di portare la protesi durante il sonno e toglierla per qualche ora durante il giorno. Risulta pertanto evidente l'importanza che il ruolo dell'odontoiatra può assumere nei confronti di questa popolazione considerando che il controllo della DVO, un follow-up regolare e l'utilizzo di semplici questionari di screening per l'OSAS possono migliorare la qualità di vita del paziente edentulo.

## INTRODUZIONE

L'apnea ostruttiva (OSA) è un disturbo del sonno caratterizzato da ripetuti episodi di ostruzione totale (apnee) o parziale (ipopnee) delle vie aeree superiori<sup>(1,9,10)</sup> seguiti da uno sforzo respiratorio volto a superare l'ostruzione<sup>(1,13,14,16)</sup>. L'apnea è definita come la cessazione del respiro per almeno 10 sec" durante il sonno, mentre l'ipopnea è definita come la riduzione di oltre il 30% del flusso respiratorio per almeno 10 sec con una riduzione della saturazione di ossigeno del 4%<sup>(1,13,14,16)</sup>. La Sindrome delle Apnee Ostruttive del Sonno (OSAS) viene identificata da un indice di apnea-ipopnea (AHI, numero totale di apnee ed ipopnee per ora di sonno) maggiore o uguale a 5 in associazione a frequente sonnolenza<sup>(1)</sup>. L'ostruzione avviene soprattutto a carico della faringe poiché essa non è dotata di strutture ossee o cartilaginee che si oppongano al collasso. Durante il sonno l'attività dei muscoli faringei è notevolmente ridotta; favorendone così il possibile collasso (estensione del collo, arretramento della mandibola con conseguente scivolamento all'indietro della lingua e del palato molle sulla parete posteriore del faringe). L'OSA è spesso associata a fattori che favoriscono l'ostruzione delle vie aeree superiori quali macroglossia, palato molle lungo ed inspessito, o ostruzione nasale da polipi<sup>(13,14,23)</sup>. Sono maggiormente interessati soggetti di sesso maschile in età avanzata che presentano obesità (BMI > 29 kg/m<sup>2</sup>) e circonferenza del collo abbondante (> 42.5 cm)<sup>(13,14,23)</sup>. Anche alcune anomalie cranio-facciali, l'ipotiroidismo e l'acromegalia rientrano tra i fattori di rischio<sup>(13,14,23)</sup>. La sintomatologia che accompagna questa sindrome comprende russamento, sonnolenza diurna, mal di testa al risveglio, problemi di memoria e depressione<sup>(1,13,14,16,19,26)</sup>. Questi sintomi, visibili durante il giorno, sono frutto delle numerose interruzioni del sonno che si verificano durante gli episodi apnoici notturni<sup>(14)</sup>. L'affaticamento cardiaco che segue l'ipossia apnoica, fa sì che l'OSAS oggi venga considerato un importante fattore di rischio per patologie cardiovascolari quali l'infarto miocardico, l'ipertensione arteriosa e l'infarto cerebrale<sup>(13)</sup>. Studi recenti suggeriscono che l'OSAS abbia una prevalenza del 4% negli uomini e del 2% nelle donne di età compresa tra 30 ed 80 anni<sup>(27,18)</sup>. La prevalenza dell'OSAS in persone di età superiore ai 60 anni è stimato essere compresa tra il 20%<sup>(10)</sup> ed il 24%<sup>(3)</sup>. L'esame strumentale di elezione per l'accertamento dell'OSAS è la polisonnografia<sup>(21)</sup>. La polisonnografia consiste nel monitoraggio durante il sonno di alcuni parametri corporei, definiti "canali", dai quali si è in grado di dedurre l'eventuale presenza di apnee o ipopnee e quindi l'AHI. I canali fondamentali che vengono monitorati sono: elettroencefalogramma (EEG), elettrooculografia (EOG), elettromiografia (EMG), flusso nasale ed orale, saturazione arteriosa di ossigeno, sforzo respiratorio toracico ed addominale,



elettrocardiogramma (ECG). L'utilizzo di questionari specifici, come ad esempio il "Questionario di Berlino" può comunque intercettare con buona approssimazione la presenza o assenza di questo disturbo<sup>(11,20)</sup>. Il "Questionario di Berlino", sviluppato nel 1996 da Netzer, focalizza la propria attenzione su una serie di sintomi e situazioni tipiche associate alla presenza di apnee notturne ed è stato dimostrato avere un valore predittivo positivo per l'apnea notturna dell'89%<sup>(20)</sup>. L'approccio attraverso il questionario sembra più accettabile per i pazienti ed è più economico rispetto all'esame polisonnografico. Rimane comunque indispensabile l'esame strumentale per la certezza di diagnosi qualora dal questionario emerga un alto rischio di OSAS.

## METODI E RISULTATI

Recentemente è stato suggerito che l'edentulismo peggiori l'apnea ostruttiva del sonno<sup>(5,7)</sup>. I risultati di un recente studio condotto dall'Università di Torino su 48 pazienti, dimostrano che l'edentulismo favorisce l'ostruzione delle vie aeree superiori durante il sonno. Infatti, in una popolazione di edentuli portatori di protesi totale sono stati analizzati sia l'AHI che la SaO<sub>2</sub> e si è visto che i suddetti valori sono peggiorati significativamente nella notte dormita senza protesi<sup>(6)</sup>. L'indice di apnea/ipopnea (AHI) senza protesi è risultato significativamente più alto rispetto a quello con la protesi ( $17.4 \pm 3.6$  versus  $11.0 \pm 2.3$  -  $p = 0.002$ ). Dormendo con la protesi, 23 soggetti (48%) hanno avuto un AHI > 5, considerato presenza di OSA, ma, dormendo senza la protesi, il numero di soggetti con AHI patologico è cresciuto a 34 (71%). Nello stesso studio l'ossido nitrico esalato (eNO) e quello orale (oNO) sono stati misurati come markers di infiammazione delle vie aeree ed orofaringea<sup>(6)</sup>. Il livello di oNO ed eNO misurato al mattino dopo la notte dormita senza indossare la protesi era più alto (eNO  $46.1 \pm 8.2$  ppb versus  $33.7 \pm 6.3$  ppb;  $p = 0.035$ ; oNO  $84.6 \pm 13.7$  ppb versus  $59.2 \pm 17.4$  ppb;  $p = 0.001$ ). La riduzione del calibro faringeo del paziente edentulo è stata inoltre supportata da un'analisi cefalometrica<sup>(6,4,12)</sup>. All'esame cefalometrico, si è evidenziato che la rimozione delle protesi ha indotto una riduzione significativa dello spazio retrofaringeo (da  $1.522 \pm 0.33$  cm a  $1.27 \pm 0.42$  cm;  $p = 0.006$ )<sup>(12)</sup>; riduzione che è stata confermata da un'analisi condotta mediante RM in cui l'area della faringe nella porzione compresa tra il palato molle e l'epiglottide è risultata ridotta quando il paziente non indossava la protesi. Questi dati suggeriscono che la perdita completa dei denti favorisce l'ostruzione delle vie aeree superiori durante il sonno. Tale effetto avverso sembra derivare da una riduzione dello spazio retrofaringeo ed è associato ad incremento delle concentrazioni di NO orale ed esalato. Le conoscenze attuali suggeriscono che l'edentulismo influisce

sulla faringe attraverso numerosi meccanismi, da semplici cambiamenti anatomici alla riduzione dei riflessi neurologici e dell'attività neuromuscolare. Il cambiamento anatomico principale consiste nella perdita della dimensione verticale di occlusione (DVO), con conseguente riduzione dell'altezza del terzo inferiore del viso e rotazione della mandibola in avanti e in alto<sup>(22)</sup>. In uno studio condotto dall'Università di Torino su 403 pazienti di età compresa tra 65 e 90 anni, è emersa una correlazione significativa tra il mancato utilizzo della protesi durante la notte, l'incongruità della DVO e il rischio di apnee notturne<sup>(15)</sup>. Tale peggioramento, legato al collasso delle vie aeree superiori, sembra essere associato alla mancanza di uno stop al sollevamento della mandibola<sup>(24)</sup>. Poiché la riduzione della dimensione verticale di occlusione (DVO) nei pazienti già riabilitati tende a diminuire costantemente a causa del perenne riassorbimento osseo<sup>(20)</sup> risulta di fondamentale importanza un solido follow-up del paziente, soprattutto al fine di evitare l'adattamento del paziente ad una protesi incongrua con una DVO insufficiente (iperadattamento)<sup>(8)</sup>.

## CONCLUSIONI

Gli odontoiatri generalmente raccomandano di rimuovere la protesi durante la notte per evitare che un continuo contatto con le strutture del cavo orale possa aumentare il rischio di irritazione o di riassorbimento alveolare<sup>(17,25)</sup>. Se si considera che, secondo dati epidemiologici l'edentulismo colpisce il 18% dei soggetti di età superiore a 60 anni (prevalenza destinata a rimanere tale per i prossimi 30 anni) e che il 70% delle persone sopra i 65 anni ha almeno 5 episodi di apnea-ipopnea/ora<sup>(10)</sup>, si può dedurre che oltre il 10% dei soggetti anziani rischia un peggioramento dell'OSA dormendo senza protesi. Inoltre, da alcune stime<sup>(9)</sup> si prevede che nel 2020 i portatori di protesi totale passeranno da 33,6 milioni a 37,9 milioni solo negli Stati Uniti, per cui risulta evidente l'importanza che il ruolo dell'odontoiatra può assumere nei confronti di questa popolazione attuando semplicemente i seguenti accorgimenti:

- consigliare di portare la protesi totale di notte, lasciando riposare le mucose per qualche ora durante il giorno
- eseguire follow-up regolari per ridurre al minimo la fisiologica riduzione della dimensione verticale di occlusione e l'iperadattamento del paziente a questa situazione
- eseguire il Questionario di Berlino per tutti i pazienti portatori di protesi totale al fine di individuare quelli più a rischio di OSAS e, di conseguenza, attuare i necessari approfondimenti.

## BIBLIOGRAFIA

1. AASM: *Sleep-related breathing disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurements techniques in clinical research*. Sleep 22, 667-689, 1999.
2. Ancoli-Israel S., Gehrman P., Kripke D.F. et al.: *Long-term follow-up of sleep disordered breathing in older adults*. Sleep Medicine 2, 511-516, 2001.
3. Ancoli-Israel S., Kripke D.F., Klauber M.R. et al.: *Sleep-disordered breathing in community-dwelling elderly*. Sleep 14, 486-495, 1991.
4. Bucca C., Carossa S., Cicolin A., Preti G.: *Respiratory sleep disturbances in complete edentulism*. Int. J. Prosthodont. 6, 685, 2003.
5. Bucca C., Carossa S., Pivetti S., Gai V., Rolla G., Preti G.: *Edentulism and worsening of obstructive sleep apnoea*. The Lancet 353, 121-122, 1999.
6. Bucca C., Cicolin A., Brussino L. et al.: *Tooth loss and obstructive sleep apnoea*. Respiratory Research 7, 8, 2006.
7. Carossa S., Bucca C., De Lillo A. et al.: *Correlation between edentulism, sleep disorders and arterial hypertension*. Preliminary research. Minerva Stomatol. 49, 399-404, 2000.
8. Collett H.A.: *Motivation, a factor in denture treatment*. J. Prosthet. Dent. 17, 5-15, 1967.
9. Douglass C.W., Shih A., Ostry L.: *Will there be a need for complete dentures in the United States in 2020?* J. Prosthet. Dent. 87, 9-14, 2002.
10. Douglass C.W. *Clinical practice, delivery of service*. J. Prosthet. Dent. 21, 274-83, 1990.
11. El Sohl A., Mador M.J., Ten-Brock E., Shucard D.W., Abul-Khoudoud M., Grant J.B.: *Validity of neural network in sleep apnoea*. Sleep 22, 105-111, 1999.
12. Erovigni F., Graziano A., Ceruti P., Gassino G., De Lillo A., Carossa S.: *Valutazione cefalometrica delle vie aeree in pazienti portatori di protesi totale*. Minerva Stomatologica 2005.
13. Flemons W.W.: *Obstructive Sleep Apnoea*. N. Engl. J. Med. 347, 498-504, 2002.
14. Friedlander A.H., Friedlander I.K., Pogrel M.A.: *Dentistry's role in the diagnosis and co-management of patients with sleep apnoea/hypopnoea syndrome*. Br. Dent. J. 189, 76-80, 2000.
15. Gassino G., Cicolin A., Erovigni F., Carossa S., Preti G.: *Obstructive sleep apnea, depression, and oral status in elderly occupants of residential homes*. Int. J. Prosthodont. 18, 316-322, 2005.
16. Goodday R.H.B., Precious D.S., Morrison A.D., Robertson C.G.: *Obstructive Sleep Apnoea Syndrome: diagnosis and management*. J. of Canadian Dent. Ass. 67, 652-658, 2001.
17. Jozefowicz W.: *The influence of wearing dentures on residual ridges, a comparative study*. J. Prosthet. Dent. 24, 137-45, 1970.
18. Lindberg E., Gislason T.: *Epidemiology of sleep-related obstructive breathing*. Sleep Med. Rev. 4, 411-433, 2000.
19. Mercado J.C.: *Identifying obstructive sleep apnoea: a highly prevalent and underdiagnosed disease*. Physician Assistant 27, 39-45, 2003.
20. Netzer N.C., Hoegel J.J., Loube D. et al.: *Prevalence of symptoms and risk of sleep apnoea in primary care*. Chest 124, 1406-1414, 2003.

21. Polysomnography Task Force, American Sleep Disorders Association Standards of Practice Committee: *Practice parameters for the indication for polysomnography and related procedures*. Sleep 20, 406-22, 1997.
22. Pound E.: *Controlling anomalies of vertical dimension and speech*. J. Prosthet. Dent. 36, 124-135, 1976.
23. Qureshi A., Ballard R.D.: *Obstructive sleep apnoea*. J. Allergy Clin. Immunol. 112, 643-51, 2003.
24. Tallgren A.: *The continuing reduction of the residual alveolar ridges in complete denture wearers, a mixed longitudinal study covering 25 years*. J. Prosthet. Dent. 27, 120-132, 1972.
25. Tautin F.S.: *Should dentures be worn continuously?* J. Prosthet. Dent. 39, 372-74, 1978.
26. Westbrook P.R.: *Sleep disorders and upper airway obstruction in adults*. Otolaryng. Clin. of North America 23 (4), 727-743, 1990.
27. Young T., Palta M., Dempsey J. et al.: *The occurrence of sleep-disordered breathing among the middle-aged adults*. N. Eng. J. Med. 328, 1230-1235, 1993.

## RIABILITAZIONE PROTESICA FACCIALE POST-CHIRURGICA NEI PAZIENTI CON SEVERA PERDITA DI SOSTANZA

*G. Gassino*

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

Key words: *Facial-prostheses / Epitesi facciale*  
*Facial-implants / Impianti cranio-facciali*  
*Multidisciplinary approach / Approccio multi disciplinare*

### **Abstract:**

The retention of facial prostheses with adhesive, extrinsic or intrinsic method result often unsatisfactory for the patient in terms of security and comfort.

The introduction of extraoral implants has resulted in encouraging evolution providing both convenience and predictable retention for a variety of facial prostheses.

Extra oral osseointegrated implants however are not uniformly successful and failure seems to be site specific and time dependent. Auricular site show to be one of the most favorable outcome in terms of predictable high survival rates. Recourse to the implants in the mastoid area for the retention of the auricular prostheses has become popular. Also different mechanical and magnet retention system associated with osseointegrated implants have been proposed and evaluated. The mechanical system are best suited when tensile and shear forces operate, magnet system when horizontal forces on implants are absent. The variations in mechanical system behavior is larger than in magnet system and not produce a repeatable load delivery to the implants. The auricular prostheses have to counteract both vertical and horizontal dislodging forces therefore a mechanical retention system is indicated.

### **Riassunto:**

I difetti facciali possono essere il risultato di traumi, neoplasie e malformazioni congenite.

I più comuni difetti facciali che il protesista maxillo-facciale riabilita sono dovuti ad eseresi chirurgiche per neoplasie. In base alla sede del tumore da enucleare avremo quindi difetti diversi che potranno riguardare il naso, il padiglione auricolare e l'occhio. Ciascuna di queste menomazioni comporta per il paziente gravi problemi funzionali, estetici e psicologici, problematiche a cui si cerca di porre almeno in parte rimedio anche se con successo diverso,

a seconda dei vari pazienti, attraverso la riabilitazione protesica facciale. Il successo della riabilitazione protesica dei difetti facciali è influenzata da diversi fattori: estetica accettabile, biocompatibilità e ritenzione. Il provvedere ad una adeguata ritenzione per l'epitesi è stata per anni una costante sfida per i protesisti maxillo-facciali. Sia la ritenzione meccanica sfruttando i sottosquadri del difetto, sia mediante l'uso di adesivi, l'ancoraggio dell'epitesi è sempre stato problematico o inaccettabile.

Negli ultimi dieci anni sono stati fatti rilevanti progressi nella riabilitazione di pazienti trattati per questo tipo di neoplasia. Parte di questi miglioramenti sono stati il risultato di sviluppo di tipo tecnico quali l'avvento e l'utilizzo di impianti osteointegrati, e sviluppi legati alla collaborazione tra internisti e odontoiatri, il cosiddetto approccio multi-disciplinare al trattamento del cancro.

Gli specialisti della riabilitazione protesica vedono ed esaminano i pazienti prima che abbia inizio il loro trattamento, lavorando insieme ai loro colleghi di chirurgia oncologica, chirurgia ricostruttiva con i radioterapisti e gli psicologi al fine di minimizzare gli stati patologici post-terapeutici e sviluppare un corretto piano di riabilitazione.

## INTRODUZIONE

Negli ultimi anni c'è stato un considerevole aumento delle richieste di riabilitazioni protesiche da parte di pazienti con difetti facciali dovuti a traumi, neoplasie, malformazioni congenite. I difetti facciali riferiti al protesista maxillo facciale per la riabilitazione sono usualmente il risultato di resezioni chirurgiche di tumori epiteliali. Il ripristino dei difetti facciali è una sfida difficile sia per il chirurgo che per il protesista. Sia la ricostruzione chirurgica che la riabilitazione protesica hanno entrambi dei limiti. Il chirurgo è limitato dalla mancanza di tessuto, dalla compromissione dell'apporto ematico locale, secondario a radio-terapia cervico-facciale e dalla condizione fisica del paziente. Il protesista maxillo-facciale è limitato dai pochi materiali disponibili dal contorno dei difetti facciali irregolari, dalla difficoltà di ritenzione delle grandi epitesi e dalla capacità del paziente di accettare e incorporare il manufatto protesico. La capacità del paziente di accettare l'epitesi è perlopiù dovuto alle aspettative non realistiche del paziente. I difetti facciali si dividono in difetti riguardante il naso, l'occhio e l'orecchio asportati a seguito di neoplasia. Le maggiori conoscenze rendono oggi possibile una diagnosi e un trattamento più precoce della neoplasia, quindi i pazienti che sopravvivono aumentano. Purtroppo molte delle nuove tecniche chirurgiche sono altamente demolitive, residuando ampi difetti, che compromettono non solo la funzionalità e l'estetica, ma anche le condizioni psico-sociali del paziente. Questi problemi esigono una pronta riabilitazione mediante interventi chirurgici o protesici. Il mio intervento sarà soprattutto basato sulla riabilitazione protesica maxillo-facciale.

La messa a punto di una protesi ha il vantaggio di essere rapida, reversibile, semplice dal punto di vista clinico e può essere prontamente rimossa per consentire di valutare le condizioni sottostanti<sup>(1,13)</sup>. (Figure 1 e 2).

La realizzazione protesica dei difetti facciali non era però priva di difficoltà di vario tipo: estetica non soddisfacente, ritenzione inadeguata dell'epitesi, aspettative non realistiche del paziente, quindi un impatto negativo sulla qualità della vita<sup>(16)</sup>. Queste problematiche hanno portato negli ultimi dieci anni a notevoli progressi nella riabilitazione protesica dei pazienti trattati per questo tipo di neoplasie. Parte di questi miglioramenti sono stati il risultato di sviluppo di tipo tecnico quali l'avvento e l'utilizzo di impianti osteointegrati, ma per la maggior parte si è trattato di sviluppi legati alla collaborazione tra internisti e odontoiatri, appunto il cosiddetto approccio multi-disciplinare al cancro. Gli specialisti della riabilitazione vedono ed esaminano i pazienti prima che abbia inizio il loro trattamento, lavorando insieme ai loro colleghi di chirurgia oncologica, di chirurgia ricostruttiva con gli specialisti in radioterapia e con gli



*Figura 1.*



*Figura 2.*

psicologi al fine di minimizzare gli stati patologici post terapeutici e sviluppare un corretto piano di riabilitazione. Di conseguenza, oggi, con un corretto approccio multi-disciplinare alla cura del paziente quasi tutti i soggetti con cancro oro-facciale possono davvero essere riabilitati e soprattutto interagire socialmente con la famiglia e gli amici. Un altro campo nel quale l'approccio multi disciplinare ha avuto un impatto significativo oltre all'assistenza è stato quello della ricerca. I materiali e le tecnologie attuali ci consentono di restituire al paziente un aspetto pressoché normale. Gli impianti osteointegrati hanno un grande impatto nella accettazione delle epitesi facciali da parte dei pazienti<sup>(13,14)</sup>. Essi conferiscono al paziente maggior sicurezza, estetica, durata della protesi,



riduzione dello stimolo irritativo dell'adesivo sulla cute e di conseguenza maggior comfort rispetto ai metodi di ritenzione personali. Gli impianti osteo-integrati opportunamente modificati nel disegno al fine di poter essere utilizzati in pazienti con difetti cranio-facciali, sono in grado di fornire un'adeguata ritenzione e un eccellente ancoraggio alle epitesi. Senza dubbio, il risultato estetico è ancora sostanzialmente determinato dalla natura della resezione chirurgica del tumore. Se il chirurgo nell'asportare un tumore procede all'exeresi del naso o di un orecchio senza consultarsi con un protesista, creando perciò un difetto dai limiti irregolari in prossimità di strutture facciali profondamente alterati, con difficoltà ad ottenere un risultato estetico accettabile nonostante i materiali e le tecnologie. Logicamente i dati riportati in letteratura evidenziano che il successo degli impianti osteo-integrati non è uniforme. Il fallimento e le complicanze dipendono dalla sede, struttura, architettura ossea e dall'eventuale terapia radiante (dose, campo e tempo)<sup>(6,7,8,9,11,12)</sup>.

## **FASI OPERATIVE**

Il protocollo di costruzione delle epitesi prevede un'impronta preliminare che ha lo scopo di stabilire i margini della protesi. Si inizia delimitando la zona di interesse con cerotto di seta sintetica (Omnisilk Paul Hartmann Ag.D 89522 Heidenheim). L'impronta viene eseguita con un polisolfuro light body (Kerr Permlastic Ligth Body), che viene coperto con uno strato di garza per favorire l'adesione con il gesso a presa rapida che viene sovrapposto (Contura – Produits Dentaires S.A. CH-1800 Vevey/Suisse). Il gesso viene posizionato sul materiale da impronta in tre diversi strati, avendo cura di attendere l'indurimento di ogni singolo strato al fine di evitare distorsioni del materiale da impronta. Sul modello maestro ottenuto si esegue la ceratura per la confezione di un'epitesi provvisoria<sup>(1)</sup>. Nella protesi provvisoria in resina trasparente vengono inseriti reperi radio-opachi per valutare la posizione ideale degli impianti. Si inseriscono gli impianti secondo il protocollo Branemark<sup>(5,8)</sup>. Dopo tre o quattro mesi si procede al secondo tempo chirurgico. A guarigione avvenuta si collegano i transfer agli impianti e si rileva l'impronta con l'ausilio di un portaimpronta individuale. Si rileva l'impronta utilizzando un silicone. Ai transfer vengono avvitati speciali analoghi da laboratorio. Questi analoghi sono stati sviluppati dalla SECOTEC per permettere il fenomeno dell'elettroerosione che attraverso un'asportazione selettiva del metallo permette un adattamento ottimale delle parti metalliche<sup>(14,15)</sup>.

La barra viene collegata ad uno dei tre elettrodi implantari di forma identica agli impianti di laboratorio. Per l'avvitamento si utilizza la chiave

dinamometrica regolata a 15 Nm. La barra collegata ad una sola vite metterà in evidenza l'assenza di contatto o imperfezioni di contatto verso gli altri elettrodi implantari. Quindi la necessità di usare il sistema elettroerosivo SAE SECOTEC. Durante il processo elettroerosivo la sottostruttura viene abbassata sul modello in modo che l'asportazione di metallo dall'armatura mediante l'elettroerosione corrisponda esattamente al design dei montanti implantari degli impianti inseriti nel mascellare. Una volta concluso il processo elettroerosivo, della durata di circa 30 minuti per tutti e tre i processi elettroerosivi (sgrossamento, lisciamento e lisciamento fine).

Gli elettrodi vengono nuovamente sostituiti con gli impianti per modello. La barra viene riposta sul modello e ripetuto il test di Schieffeld, che dimostra in tutte le posizioni di avvvitamento una barra che non si solleva in nessun punto, quindi una barra passiva priva di tensioni.

## **ESECUZIONE DELLA SOVRASTRUTTURA**

La sovrastruttura rimovibile viene cerata e fusa rispettando l'esatta posizione del chiavistello tipo SAE, usando un modello refrattario duplicato della sottostruttura a barra fresata.

A fusione avvenuta la sovrastruttura con la sottostruttura viene posizionata nella macchina per elettroerosione, rispettando il tragitto di inserzione della protesi che deve coincidere con il movimento verticale della macchina. Nell'armatura metallica si possono elettroerodere diversi meccanismi di ritenzione per aumentare la ritenzione e la resistenza della sovrastruttura rimovibile. La scelta del sistema di bloccaggio (tecnica del chiavistello tipo SAE) è preferita in quanto consente un'efficace splintaggio e un fissaggio regolabile tramite frizione dell'elemento secondario, evitando tensione sugli impianti. Per eseguire il chiavistello, il modello master con la sottostruttura e la sovrastruttura vengono posizionati su di un piattello di lavoro del sistema elettroerosivo SAE –EDM 2000. La macchina elettroerosiva permette di lavorare nei tre assi: x, y, z. Un elettrodo di rame in fase di elettroerosione determinerà l'alloggiamento del chiavistello sia nella sottostruttura che nella sovrastruttura<sup>(10,17,18)</sup>. A chiavistello inserito l'epitesi in cera viene adattata alla sovrastruttura. Un ulteriore controllo clinico sul paziente, quindi l'epitesi in cera viene tramite la tecnica della messa in muffola trasformata in silicone (Cosmesil, Cosmedica Ltd, Uwist, Cardiff).

La consegna prevede la posizione della barra sugli impianti e la chiusura a 25 Nm. Viene quindi effettuata il trimming dell'epitesi ed eventuali ritocchi della colorazione estrinseca (Figure 3, 4, 5).



*Figura 3.*



*Figura 4.*



*Figura 5.*

## **CONCLUSIONI**

L'uso degli impianti osteointegrati e l'approccio multidisciplinare alla riabilitazione protesica dei difetti facciali post interventi chirurgici per neoplasie, hanno aiutato il clinico nella risoluzione di casi complessi. Il problema della ritenzione delle epitesi era per il paziente molto invalidante, a cui si aggiungeva una estetica insoddisfacente. Logicamente la selezione del paziente è importante per il successo a lungo termine degli impianti osteointegrati. Importanti sono anche i sistemi di ritenzione con l'obiettivo di ottenere un accoppiamento passivo di precisione tra metallo-metallo, fra la sottostruttura (barra) e la sovrastruttura rimovibile. Ciò permette di evitare traumi a livello implantare, vista la necessità di rimuovere l'epitesi. Abolizione dell'uso di qualsiasi collante e riduzione dei rifacimenti dell'epitesi dovuti ai ripetuti lavaggi per la rimozione del collante. Riduzione delle dermatiti da contatto (epitesi – collante – cute).

## BIBLIOGRAFIA

1. Beumer J., Zlotolow I.: *Restoration of facial defects*. In Beumer J., Curtis T. MarunicK M.: *Maxillofacial Rehabilitation (Prosthodontic and Surgical consideration)*. 2<sup>nd</sup> edition Ishiaku, St. Louis, Mo 1996.
2. Beumer J., Curtis T., Muranick M.: *Maxillo facial rehabilitation: Prosthodontics e surgical considerations*. Ishiyaku EuroAmerica, Inc. St. Louis Tokyo.
3. Tolman D.E., Desyardins R.P.: *Extraoral application of osseointegrated implants*. J. Oral Maxillofacial Surgery 49, 33-4, 1991.
4. Del Valle V., Faulkner G., Wolfaardt J., Rangert B., Kuang Tan H.: *Mechanical Evaluation of craniofacial osseointegration retention Systems*. Int. J. Oral Maxillofacial Implants 10, 491-498, 1995
5. Granstrom G., Tjellstrom A., Branemark P-I, Fornander J.: *Bone-anchored reconstruction of the irradiated head and neck cancer patient*. Otolaryngol. Head Neck Surg. 108, 334-343, 1993.
6. Granstrom G., Tjellstrom A., Albrektsson T.: *Postimplantation irradiation for head and neck cancer treatment*. Int. J. Oral Maxillofacial Implants 8, 495-501, 1993.
7. Granstrom G., Tjellstrom A.: *Effects of irradiation on osseointegration before and after implant placement: A report of three cases*. Int. J. Oral Maxillofacial Implants 12, 547-555, 1997.
8. Granstrom G., Tjellstrom A., Branemark P-I.: *Osseointegrated implants in irradiated bone: a case-controlled study using adjunctive hyperbaric oxygen therapy*. J. Oral maxillofacial Surg. 57, 493-499, 1999.
9. Gassino G.: *Anatomy and Implant succes in the craniofacial skeleton*. American Academy of Maxillofacial Prosthetics, forty-fourth annual meeting, Kansas City Usa, September 29 October 2, 1996.
10. Lemon C.J., Chambers S.M.: *Locking retentive attachment for an implant-retained auricular prothesis*. J. Prosthet. Dent. 8, 336-338, 2002.
11. Nishimura R.D., Roumanas E., Beumer J., Moy P.K., Shimizu K.T.: *Restoration of irradiated patients using osseointegrated implants: current perspectives*. J. Prosthet. Dent. 79, 641-647, 1998.
12. Nishimura R., Roumanas E., Lewis S., Sugai T., Moy P.: *Auricular prostheses and osseointegrated implants: UCLA experience*. J. Prosthet. Dent. 73, 555-558, 1995.
13. Parel S., Tjellstrom A.: *The United States and Swedish experience with osseointegration and facial prostheses*. Intl. J. Oral Maxil. Impl. 6, 67-679, 1991.
14. Roumanas E.D., Freymiller E.G., Chang T.L., Aghaloo T., Beumer J. 3<sup>rd</sup>: *Implant-retained prostheses for facial defects: an up to 14-year follow-up report on the survival rates of implants at UCLA*. Int. J. Prosthodont. 15: 325-332, 2002.
15. Van Rockel N.B.: *L'elettroerosione in Odontoiatra*. Int. J. Prosthodont. 5, 114-121, 1992.
16. Parel S.M.: *Diminishing dependence on adhesives for retention of facial prostheses*. J. Prosthet. Dent. 43: 552-560, 1980.
17. White G.E.: *Implantat Zahntechnik*. Quintessenz, Berlin 1993.
18. Weber H., Ruebeling G., Otten B., Kloss S., Frank G.: *Combined fixed removable prothesis with the SAE spark erosion system (clinic and laboratory)*. Quintessence, Berlin 1992.

**RICERCA DI NUOVI MARKERS  
NEL CARCINOMA UROTELIALE DELLA VESCICA MEDIANTE  
UN APPROCCIO PROTEOMICO DIFFERENZIALE**

*P. Destefanis<sup>1</sup>, G. Barbero<sup>2</sup>, G. Giribaldi<sup>2</sup>,  
G. Mandili<sup>2</sup>, D. Fontana<sup>1</sup>, F. Turrini<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Divisione Universitaria di Urologia 2  
Ospedale San Giovanni Battista “Molinette”, Torino

<sup>2</sup> Sezione di Biochimica - Dipartimento di Genetica, Biologia e Biochimica  
Università degli Studi di Torino

Key words: *Bladder cancer / Carcinoma vescicale*  
*Tumor markers / Marcatori tumorali*  
*Proteomic / Proteomica*

**Abstract:**

The most reliable procedure for the diagnosis and the follow-up of bladder cancer is an invasive cystoscopy accompanied with bladder biopsies. Several alternative diagnostic techniques have been developed in order to avoid or reduce the need of cystoscopy without reaching the desired results. The aim of our work was the identification and validation of new protein markers for bladder cancer by comparative proteomic (2-D electrophoresis and mass-spectrometry) analysis of normal and tumor tissues.

Bladder cancer samples (5-10 mg) obtained during TURBT or radical cystectomy and similar size samples from normal tissues were used. Following extraction of proteins and RNA, proteins were solubilized and separated by 2-DE electrophoresis. Gels obtained were stained with the Silver Stain technique or with Colloidal Coomassie. Afterwards, the images were acquired by densitometry, compared by specific software and differential proteins identified. Identifications were carried after in-gel proteolysis of the electrophoretic spots. Proteins have been identified by MALDI-TOF analysis and provide peptide sequence data.

Through the comparison of the electrophoresis pattern from healthy and carcinoma tissue it has been possible to characterize several proteins more significantly ( $p < 0.05$ ) expressed in the tumor tissues. We found both quantitative and qualitative differences. Some proteins (qualitative difference) were found only in cancer specimens (PDZ/LIM protein, isoform 1 (O00151), cytokeratin 19 (P08727), alfa-enolase (P06733), Dehydrogenase/reductase, family member 2 (Q13268) e ribo-nucleoprotein, A2/B1 (P22626).

**Riassunto:**

L'esame più affidabile nella diagnosi e nei controlli del carcinoma della vescica è la cistoscopia (procedura invasiva) associata o meno alla biopsia vescicale. Sono state proposte molte altre tecniche alternative al fine di evitare o, almeno, ridurre il ricorso alla cistoscopia, senza ottenere i risultati sperati. Lo scopo del nostro lavoro è l'identificazione e la validazione di nuove proteine come marcatori tumorali per il carcinoma vescicale mediante proteomica differenziale (elettroforesi bidimensionale e spettrometria di massa, confrontando campioni di tessuto neoplastico con campioni di tessuto sano).

Sono stati utilizzati campioni di carcinoma vescicale (5-10 mg) ottenuti durante TURB o cistectomia radicale e analoghi campioni di tessuto macroscopicamente sano. Dopo l'estrazione di proteine e di RNA, le proteine sono state solubilizzate e separate mediante elettroforesi bidimensionale. I gel ottenuti sono stati colorati con colorazioni all'argento o con Coomassie. Successivamente le immagini sono state acquisite con densitometria e confrontate con uno specifico software e sono state identificate le proteine con espressione differente tra tessuto sano e neoplastico. L'identificazione è stata effettuata dopo proteolisi nel gel degli spots elettroforetici. Le proteine sono state identificate mediante analisi con MALDI-TOF ed è stata ricavata la sequenza proteica.

È stato possibile identificare e sequenziare un'elevato numero di proteine espresso in modo significativamente differente ( $p < 0.05$ ) nel tessuto neoplastico rispetto al tessuto sano. Sono state registrate differenze qualitative e quantitative. Alcune proteine (differenze qualitative) sono state riscontrate solo nei campioni di tessuto neoplastico (proteina PDZ/LIM, isoforma 1 (O00151), citokeratina 19 (P08727), alfa-enolasi (P06733), deidrogenasi/riduttasi, isoforma 2 (Q13268) e ribo-nucleoproteina, isoforma A2/B1 (P22626).

## Introduzione

La vescica è la sede più frequente di cancro delle vie urinarie. Il carcinoma della vescica è quasi 3 volte più frequente nell'uomo che nella donna. Rappresenta, nell'uomo il quarto tipo di tumore più frequente dopo quello prostatico, polmonare e coloretale, ed è la quinta causa di morte per cancro. Costituisce il 5,5% di tutti i casi di cancro, mentre nella donna è l'ottavo tipo di neoplasia più frequente e rappresenta il 2,3% di tutte le neoplasie. Per quanto riguarda la realtà italiana e piemontese, secondo il registro tumori di Torino il tasso grezzo di incidenza è di 78,3 nuovi casi anno per 100000 abitanti maschi (nel periodo compreso tra il 1993 e il 1998) e di 19,3 nuovi casi anno per 100000 donne. La stima ottenuta confrontando vari registri tumori italiani riporta tassi pari a 65,3 nuovi casi anno per 100000 abitanti maschi e 15,5 nuovi casi anno per 100000 donne. L'incidenza di carcinoma della vescica sembra in costante aumento nei paesi occidentali: negli Stati Uniti è aumentata, tra il 1984 e il 1993, del 36%. Considerando che i mezzi diagnostici sono rimasti per lo più inalterati nelle ultime 6 decadi, è assai verosimile che tale aumento sia realmente presente nella popolazione e non sia causato dal miglioramento delle tecnologie mediche-diagnostiche<sup>(14,20)</sup>.

Per quanto riguarda l'eziopatogenesi, sono stati studiati numerosi meccanismi di alterazione genetica alla base della formazione del carcinoma della vescica. Tra di essi sono stati riconosciuti e studiati geni onco-soppressori e oncogeni quali il gene della proteina p53, il gene del retinoblastoma, le proteine p15 e p16. Circa il 20% dei casi di carcinoma della vescica sono probabilmente causati da forme di esposizione lavorative a sostanze cancerogene. Tra di esse si annoverano i coloranti anilini, la 2-naftilamina, il 4-aminobifenile, il 4-nitrobifenile, la benzidina, il 2-amino-1-naftolo, i gas di combustione e le ceneri del carbone, gli idrocarburi alifatici. Tali sostanze sono state, in passato, principalmente utilizzate nell'industria dei coloranti chimici, nel tessile e nella produzione e lavorazione della gomma. Il tempo di latenza osservato tra esposizione lavorativa e manifestazione della malattia può essere molto lungo, raggiungendo periodi anche di 30-50 anni. Le professioni, quindi, a maggior rischio di contrarre il carcinoma della vescica sono operai delle industrie automobilistiche, pittori, camionisti, trivellatori, conciatori di cuoio, metalmeccanici e tutti coloro che adoperano sostanze chimiche di natura organica, come i pulitori a secco, gli operai delle cartiere e i parrucchieri. Da questi dati si evince come tale patologia abbia un importante impatto sociale. A fianco del fattore eziologico lavorativo, il fumo si impone come importante causa di carcinoma della vescica: i fumatori

hanno infatti una incidenza di carcinoma vescicale 4 volte superiore ai non fumatori a causa dei prodotti della combustione del tabacco inalati con il fumo<sup>(15)</sup>.

Allo stato attuale, la diagnosi del carcinoma della vescica, si basa ancora sul riconoscimento dei sintomi. Tra questi il più frequentemente osservato è l'ematuria indolore che si verifica nell'85% dei soggetti. Tuttavia in un quarto circa dei pazienti tali sintomi si presentano solo quando la malattia è in stadio avanzato e comporta quindi da un lato la necessità di asportare radicalmente l'organo, dall'altro l'evoluzione verso il decesso del paziente in metà circa dei casi. La metodica più affidabile per la diagnosi e il follow-up del carcinoma della vescica è l'esame cistoscopico con eventuale biopsia vescicale (procedura di tipo invasivo)<sup>(13)</sup>. Per tale motivo sono stati studiati numerosi approcci diagnostici al fine di evitare o ridurre la necessità dell'esame cistoscopico. Il principale di questi è l'esame citologico delle urine, mentre le altre metodiche possono ritenersi finora in fase sperimentale, dati i risultati ancora incerti che hanno fornito. Si desume quindi che non esiste attualmente alcun metodo proponibile per un eventuale screening del carcinoma della vescica. Anche se l'esame citologico delle urine rimane il "gold standard" tra gli approcci non invasivi, l'alta percentuale di falsi negativi, soprattutto nel caso di neoplasie con basso grado di malignità, dimostra i limiti della cito-patologia come integrazione alla cistoscopia<sup>(3,12)</sup>. I numerosi tentativi di applicare anticorpi monoclonali diretti contro antigeni correlati al tumore hanno incontrato solo un modesto successo a causa della presenza di problemi nell'esecuzione tecnica, nell'interpretazione dei risultati e nella specificità. È attualmente disponibile un esame per la diagnosi del carcinoma della vescica, che ha superato il vaglio dell'ente americano Food and Drug Administration (FDA): si tratta del test per la ricerca su urine dell'antigene solubile NMP22<sup>(21)</sup>. Esiste comunque almeno uno studio che riporta problemi di specificità con tale esame. È stato poi proposto un altro test immuno-citologico, l'Immunocyt, anche questo approvato dalla FDA; tale test, però, non è stato validato da un recente trial clinico<sup>(16)</sup>. Sembra invece molto promettente una nuova e innovativa metodica di ibridazione con fluorescenza in situ (FISH), che sfrutta multipli markers su microsatelliti cromosomiali, proposta per il controllo delle recidive di carcinoma vescicale<sup>(23,24)</sup>. Comunque tale metodica, benché accurata, richiede un equipaggiamento con microscopi a fluorescenza dedicati e l'esecuzione routinaria su campioni di urine di questo test è tuttora una sfida tecnica<sup>(7)</sup>. Recentemente l'RT-PCR è stata utilizzata come metodo non invasivo per studiare l'espressione genica della citocheratina 20 nelle cellule uro-epiteliali di esfoliazione nelle urine di pazienti con carcinoma



TCC (carcinoma a cellule transizionali). Apparentemente questo tipo di analisi diminuisce la frequenza di risultati falsi negativi<sup>(2,10)</sup>. Tuttavia dal momento che la citocheratina 20 (CK20) è espressa nelle cellule di transizione uroteliali, nelle iperplasie e negli stati infiammatori, un'analisi di tipo qualitativo può avere alcuni limiti<sup>(8,22)</sup>. Più recentemente, è stato introdotto un sistema di monitorare la reazione di PCR in tempo reale utilizzando coloranti fluorescenti con strumenti dedicati che combinano la velocità dei termociclatori con l'analisi on-line della fluorescenza sviluppata dai prodotti di PCR. L'amplificazione in real-time consente la quantificazione del DNA poiché il ciclo di amplificazione nel quale la fluorescenza del campione supera la fluorescenza di base è inversamente correlato con il numero di copie di DNA iniziali<sup>(11)</sup>. Quindi questo approccio è stato introdotto come una alternativa pratica alla PCR convenzionale per la ricerca di mutazioni, per lo studio della malattia minima residua nelle neoplasie ematologiche e nella valutazione quantitativa del rischio di micrometastasi nei tumori della mammella e gastrointestinali<sup>(5,17,19)</sup>. Tuttavia l'analisi quantitativa su cellule dei tumori urologici con la Real-Time PCR non è stata ancora fatta nei tumori urologici eccetto per l'mRNA della telomerasi trascrittasi inversa (hTERT)<sup>(4)</sup> e della CK20 nei tumori della vescica<sup>(9)</sup>. Quest'ultimo studio indica che la Real-Time RT-PCR è un metodo molto sensibile, quantitativo, specifico e rapido per la ricerca di cellule libere nell'urina con un buon potenziale per il monitoraggio delle recidive dei carcinomi uroteliali a cellule transizionali. Lo studio e l'identificazione di nuovi marcatori tumorali per il carcinoma della vescica, alla luce delle attuali metodiche a disposizione, è quindi un impellente necessità.

L'obiettivo del nostro lavoro è l'identificazione di nuovi markers proteici e peptidici nelle urine di pazienti affetti da carcinoma della vescica a partire dallo studio del proteoma delle cellule sane e tumorali. Lo studio si articola sulle seguenti fasi di ricerca.

- analisi proteomica differenziale di tessuti sani e tessuti tumorali per l'identificazione di potenziali marcatori proteici
- analisi differenziale sulle urine di pazienti affetti da carcinoma della vescica e di soggetti di controllo per l'identificazione di potenziali marcatori peptidici
- validazione clinica dell'efficacia diagnostica e prognostica dei marcatori identificati

I risultati riportati sono preliminari e si riferiscono alla prima fase dello studio, relativa ad analisi proteomica differenziale.

## **Materiali e metodi**

### *Raccolta dei campioni*

Sono stati utilizzati campioni (5-10 mg) di carcinoma uroteliale della vescica prelevati da pezzi operatori di TURB e cistectomia radicale. I pazienti sono stati reclutati presso la Divisione Universitaria di Urologia II (diretta dal Prof. D. Fontana) dell'ospedale San Giovanni Battista - Molinette di Torino, previo firma del consenso informato e dopo aver ricevuto l'approvazione del progetto da parte del comitato etico dell'Azienda "Ospedale Molinette di Torino".

Il prelievo è stato eseguito in modo da non inficiare per nulla la qualità del campione da inviare all'esame istopatologico; dagli stessi pezzi operatori sono stati prelevati campioni (di analoghe dimensioni) di tessuto sano. Le successive procedure di analisi proteomica sono state effettuate presso le unità di Biochimica del Dipartimento di Genetica, Biologia e Biochimica dell'Università di Torino.

### *Estrazione di RNA e proteine*

Il tessuto è stato omogeneizzato in potter di vetro-teflon in presenza di 1 ml di soluzione di fenolo/guanidinio tiocianato (Nurex). L'omogenato è quindi stato centrifugato (12000 g, 15 min) e la fase acquosa è stata trasferita in un nuovo tubo e l'RNA è stato precipitato utilizzando Isopropanolo freddo in proporzione 1:1. Il pellet di RNA così ottenuto è stato quindi lavato in etanolo al 75%, in acetone e infine risospeso in acqua DEPC. L'RNA è quindi stato quantificato mediante l'uso di uno spettrofotometro.

Per precipitare il DNA, alla fase organica sono stati aggiunti 0.3 ml di etanolo; dopo aver centrifugato (2000 g, 5 min a 4°C) il surnatante contenente le proteine è stato trasferito in un nuovo tubo, mentre il pellet contenente il DNA è stato lavato due volte con una soluzione di Sodio citrato (Na-Citrato 0,1M in 10% etanolo) e una volta con etanolo al 75% e quindi conservato a -20°C.

Al surnatante, contenente le proteine, è stato aggiunto 1 ml di isopropanolo e lasciato così per 5-10 min a temperatura ambiente; le proteine sono quindi state precipitate centrifugando (12000 g, 10 min) e il pellet proteico così ottenuto è stato lavato due volte con una soluzione 0.3 M di guanidinio idrocloruro in etanolo al 95% per 20min a temperatura ambiente e poi centrifugando (7500 g, 5 min a 4°C). Alla fine sono stati aggiunti 2 ml di etanolo e il pellet è stato così conservato a -20°C.

Il pellet proteico ottenuto è stato quindi risospeso nel tampone di solubilizzazione per l'elettroforesi bidimensionale (8M Urea, 2% CHAPS,

40mM Tris, 1mM PMSF, 1mM EDTA) e lasciato overnight a 4°C. Dopo aver centrifugato (12000 g, 15 min) il surnatante è stato recuperato e la concentrazione delle proteine è stata misurata (Protein Assay, BIO-RAD) utilizzando una curva standard di siero albumina bovina. Le proteine così ottenute sono quindi state conservate a -20°C.

#### *Elettroforesi bidimensionale (Focalizzazione Isoelettrica e SDS-Page)*

Per l'isoelettrofocalizzazione agli estratti proteici è stato aggiunto 1% DTE e 0.8% Anfoline (pH 3-10 Amersham) e così sono stati caricati su IPG strips mediante reidratazione overnight. Sono state utilizzate strips con gradiente non-lineare pH 3-10 di lunghezza 17cm e sono stati caricati 180µg di estratto proteico per i gel analitici e 1,2mg per i gel preparativi. Complessivamente sono stati applicati sino ad un massimo di 60.000Vh per le strip da 17cm mantenendo la temperatura costante a 18°C e con un limite di corrente di 50 µA per strip. Al termine della focalizzazione le strip sono state conservate a -20°C oppure utilizzate subito per la seconda dimensione. Le strips sono quindi state incubate per due volte per 15min in due soluzioni di equilibratura (sol 1: 6M Urea, 3% w/v SDS, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 30% v/v Glicerolo e 1% w/v DTE sol 2: 6M Urea, 3% w/v SDS, 0.375M Tris-HCl pH 8.8, 30% v/v Glicerolo e 2.5% w/v iodoacetamide). Per l'SDS page sono stati preparati gel in poliacrilammide al 12% 18 x 20 cm. Dopo la corsa, i gel analitici sono stati colorati con Nitrato d'Argento (Hochstrasser, 1988), i gel preparativi sono stati colorati con coomassie G-250 (Neuhoff 1988).

Le immagini dei gel sono quindi state acquisite con uno scanner (HP) e analizzate utilizzando un software per il rilevamento degli spot (PDQuest, Biorad). Attraverso l'utilizzo del software, per ogni spot è stata misurata l'intensità da utilizzare come indicatore dell'espressione della proteina separata. Le medie dei valori di intensità degli spot nei gel dei vari pazienti sono quindi state utilizzate per fare un confronto di espressione proteica nei tessuti malati e nei tessuti di controllo: sono state prese in considerazione le differenze significative attraverso il calcolo del test di Student.

#### *Analisi in spettrometria di massa MALDI-TOF e identificazione delle proteine*

Dai gel colorati in Coomassie sono quindi stati tagliati gli spots di interesse da cui estrarre le proteine per l'analisi in spettrometria di massa. Per primo gli spots sono stati decolorati (50% Acetonitrile, 2.5mM Ammonio bicarbonato) e disidratati in acetonitrile. Gli spots sono quindi stati reidratati per 40 min a

4°C con una soluzione contenente tripsina (10ng/μl tripsina, 5mM Ammonio bicarbonato) e dopo aver rimosso l'eccesso di soluzione è stata aggiunta una quantità di ammonio bicarbonato 5mM tale da ricoprire lo spot. I campioni sono quindi stati trasferiti in un incubatore e lasciati a 37°C overnight e poi conservati a 4°C sino all'uso.

Quindi i digeriti triptici sono stati miscelati con una uguale quantità di una soluzione satura di acido alfa-cyano-4-idrossicinnamico in 40% acetonitrile e 0.1% acido trifluoroacetico (v/v), caricati sulla piastra target e lasciati asciugare all'aria, prima dell'analisi al MALDI-TOF. Gli spettri di massa dei singoli digeriti sono stati ottenuti dalla somma di 20-25 spettri, e calibrati mediante lock mass utilizzando un peptide di massa conosciuta frammento 18-39 dell'ormone ACTH (Sigma A-8346). Le 25 masse peptidiche più intense ottenute sono quindi state usate per la ricerca in database grazie al programma MASCOT al fine di ottenere l'identificazione della proteina in analisi. I parametri utilizzati per la ricerca sono stati: gruppo tassonomico uomo, Database SwissProt, enzima tripsina, un sito di clivaggio ammesso, carboamidometilazione delle cisteine come modifica fissa e ossidazione delle metionine come modifica variabile, massimo errore ammesso 0,2 Da. Sono state prese in considerazione solo identificazioni di proteine con score significativo,  $p < 0,05$ .

## Risultati

Attraverso l'approccio proteomico (2DE e MALDI-TOF / MS) sono stati analizzati i campioni di carcinoma uroteliale e tessuto normale. Il gruppo di pazienti analizzato include tutti i principali stadi clinici di progressione tumorale locale (Ta, T1 e T2).

Le proteine estratte dai tessuti sono state separate in elettroforesi bidimensionale e le mappe proteiche ottenute sono state confrontate attraverso l'utilizzo del software PD-Quest (Bio-Rad). I campioni tumorali sono stati analizzati singolarmente (per ogni campione una mappa proteica), per i campioni sani si è scelto, invece, di creare dei pool di proteine in modo da ottenere una normalizzazione preliminare. Quindi le mappe delle proteine estratte dai tessuti tumorali sono state confrontate una ad una con quelle dei pool di campioni sani. Il programma PD-Quest restituisce per ogni mappa analizzata una lista di spot a cui viene attribuito un valore di intensità calcolato sia sulla base della dimensione dello spot che sull'intensità. Con la funzione "matching" tutti gli spot sono stati sovrapposti e i valori di intensità confrontati ed utilizzati per calcolare delle medie all'interno dei gruppi (Normale, Tumore a sua volta

suddiviso in Ta e T1-2). È stato così possibile calcolare la significatività delle variazioni di intensità degli spot tra i gruppi attraverso il Test di Student.

Da quest'analisi è stato possibile ottenere due tipi di risultati:

- I) spot proteici che erano presenti nella quasi totalità delle mappe bidimensionali ottenute dalle proteine estratte dai tessuti tumorali e non presenti in nessuna delle mappe bidimensionali ottenute dai pool di proteine estratte dai tessuti normali. (DIFFERENZE QUALITATIVE)
- II) spot proteici maggiormente intensi nelle mappe bidimensionali ottenute dalle proteine estratte dai tessuti tumorali rispetto a quelli corrispondenti nelle mappe bidimensionali ottenute dai pool di proteine estratte dai tessuti normali. Sono stati scelti quelli in cui la differenza risultava essere significativa ( $T \leq 0,05$ ). (DIFFERENZE QUANTITATIVE)

Gli spot di interesse (Figura 1) così individuati sono quindi stati identificati tramite analisi in spettrometria di massa MALDI-TOF. Per l'identificazione

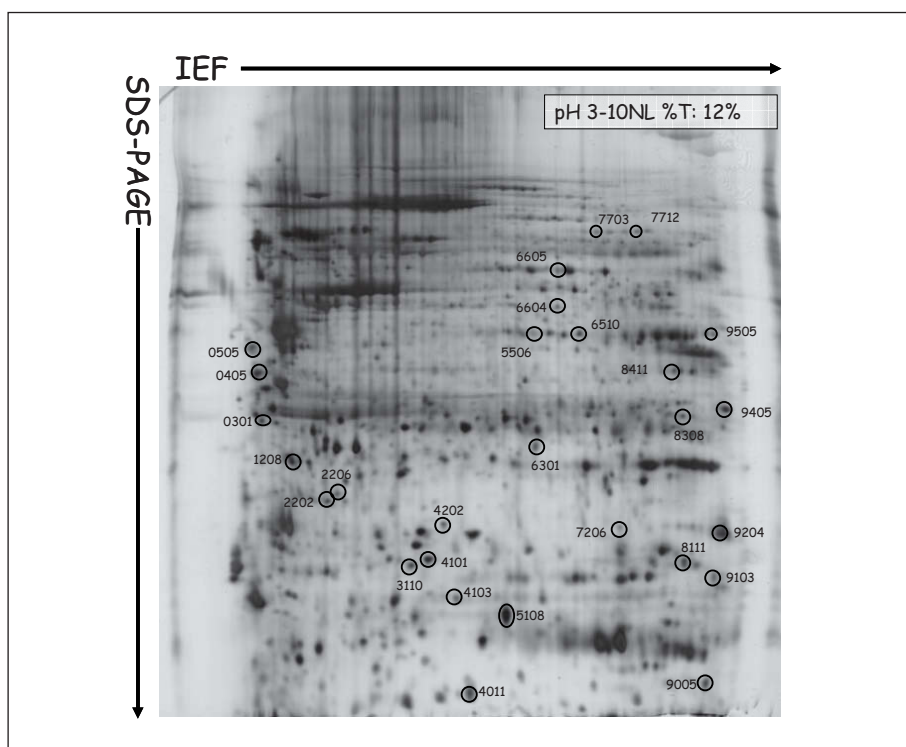


Figura 1. Gel rappresentativo ottenuto da proteine estratte da tessuto tumorale. Cerchiati e numerati sono gli spot identificati.

delle proteine è stato necessario produrre un gel preparativo da cui sono stati staccati gli spot di interesse utilizzati per l'identificazione delle proteine.

Dall'analisi in spettrometria di massa è stato possibile ottenere due elenchi di proteine che differivano o qualitativamente (Tabella IA) o quantitativamente (Tabella IB e Figura 2).

<b>A</b>				
Spot N°	SP <sup>1</sup> N°	Nome	Valutazione <sup>2</sup>	
			Ta	T1-2
5506	O00151	PDZ and LIM domain protein 1	7/7	-----
6604	P08727	Keratin, type I cytoskeletal 19	7/7	6/7
6605	P06733	Alpha-enolase	7/7	6/7
8308	Q13268	Dehydrogenase/reductase SDR family member 2	7/7	7/7
9505	P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	6/7	7/7

<b>B</b>				
Spot N°	SP <sup>1</sup> N°	Nome	Valutazione <sup>2</sup>	
			T1-2/ctrl	Ta/ctrl
301	P31947	14-3-3 protein sigma		2,12
2206	P02787	Serotransferrin	2	
3110	Q9NYI0	PH and SEC7 domain-containing protein 3	1,87	
4101	P16949	Oncoprotein 18	4,41	2,18
4103	P61088	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N		2,17
4202	P15531	Nucleoside diphosphate kinase A	3,08	3,33
5108	Q5T9A4	ATPase family AAA domain-containing protein 3B	1,94	2,19
7703	P04040	Catalase	1,8	
7712	P14618	Pyruvate kinase muscle isozyme	2,48	
8111	P22392	Nucleoside diphosphate kinase B	1,58	
9005	P61604	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	3,47	3,43
9204	P23284	PPlase B	2,46	
9405	Q00688	FK506-binding protein 3	3,17	

<sup>1</sup> SP acc. N°: numero di accesso della proteina nella banca dati SWISS PROT  
<sup>2</sup> Valutazione: Le differenze qualitative sono state classificate secondo il numero di campioni in cui è stato ritrovato lo spot-proteico nelle due categorie di pazienti, Ta e T1. Le differenze quantitative sono state classificate secondo il rapporto delle espressioni proteiche ottenute attraverso il programma di analisi d'Immagine PD-Quest (Biorad)

Tabella I. Identificazioni in Spettrometria di massa MALDI-TOF dello studio proteomico-differenziale. A: Differenze qualitative. B: Differenze quantitative

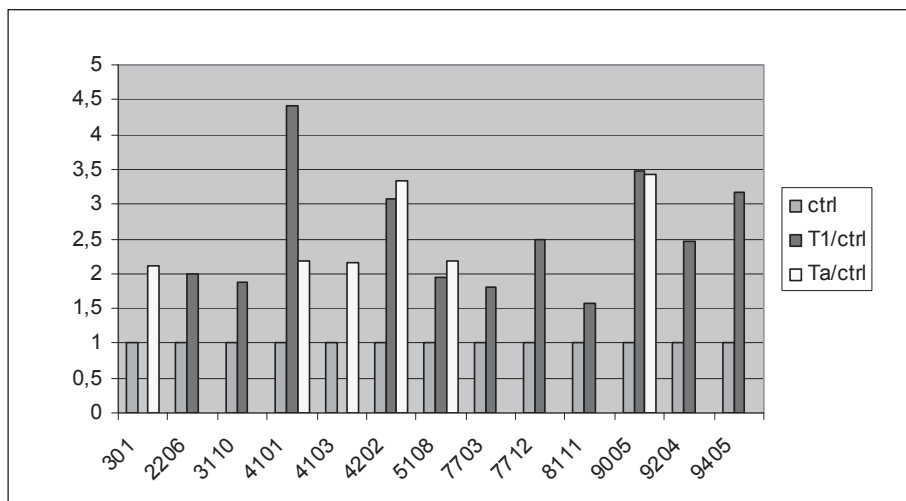


Figura 2. Rapporto relativo di espressione tra tessuto sano e neoplastico (T1-2 e Ta) per le proteine identificate come differenzialmente espresse.

## Discussione e conclusioni

Il carcinoma uroteliale della vescica rappresenta la quinta neoplasia per incidenza nell'uomo nei paesi occidentali. L'elevata percentuale di recidiva (70%) insieme con l'elevata percentuale di progressione e metastatizzazione (15%) impongono una stretta sorveglianza del paziente da parte del clinico. Tale sorveglianza prevede una cistoscopia trimestrale con uno studio della citologia urinaria per i primi due anni dopo la diagnosi, con successive cistoscopie semestrali in caso di assenza di recidiva cistoscopica. Tuttavia questo protocollo è spesso mal tollerato dal paziente ed è certamente costoso.

La possibilità di evidenziare una recidiva tumorale in questi pazienti, insieme con la possibilità di diagnosticare precocemente una neoplasia vescicale in alcune categorie di soggetti (lavoratori a rischio, forti fumatori, etc.) mediante l'utilizzo di marcatori specifici, potrebbe influenzare profondamente i protocolli diagnostici e terapeutici permettendo tassi di guarigione più elevati. A tutt'oggi tuttavia non esiste un marker "ideale", dotato di sensibilità e specificità elevate e dosabile con metodi semplici da eseguire e poco costosi. Nella continua ricerca di questo marcatore ideale, sono state proposte nuove tecnologie tra le quali rivestono una certa importanza gli studi del proteoma.

Reso possibile dalla messa in commercio di spettrometri di massa affidabili e dall'accessibilità di banche dati on-line, l'analisi proteomica ha rapidamente consentito l'identificazione di numerosi potenziali marcatori.

I dati fino ad ora pubblicati, anche se hanno permesso di identificare numerosi potenziali markers di neoplasia, non hanno ancora permesso di applicare alla pratica clinica i risultati ottenuti con la ricerca di base.

Con lo scopo di investigare nuovi aspetti del processo tumorigenico della vescica e di individuare dei possibili nuovi marcatori, abbiamo analizzato campioni di tessuto provenienti da pazienti affetti da carcinoma vescicale con un approccio proteomico-differenziale, consistito nell'analisi di tessuti sani e tumorali tramite elettroforesi bidimensionale e identificazione delle proteine differenzialmente espresse tramite spettrometria di massa. È stato possibile identificare un pannello di proteine differenziali, di cui alcune espresse in modo esclusivo nei tessuti tumorali, altre sovra-espresse nei tessuti tumorali rispetto a quelli sani.

Gli spot-proteici ritrovati esclusivamente nelle mappe bidimensionali dei tessuti tumorali corrispondono alle seguenti proteine: **proteina PDZ/LIM, isoforma 1** (O00151), **citocheratina 19** (P08727), **alfa-enolasi** (P06733), **Deidrogenasi/reduattasi, isoforma 2** (Q13268) e **ribo-nucleoproteina, isoforma A2/B1** (P22626). Le prime due sono proteine strutturali: la citocheratina 19 è una proteina costituente i filamenti intermedi, mentre la proteina contenente i domini PDZ e LIM esplica la sua funzione di proteina adattatrice nei confronti del citoscheletro. La citocheratina 19 è già da tempo considerata un potenziale marcatore del carcinoma uroteliale della vescica e per questo sono stati sviluppati dei test utilizzati sia nel plasma che nelle urine per cercare un frammento della citocheratina 19, il CYFRA 21-1. Tuttavia i risultati finora ottenuti non sono concordi nell'esprimere un giudizio positivo sull'utilizzo di questo marcatore nella pratica clinica<sup>(1,6)</sup>.

Analizzando la bibliografia delle proteine identificate molte sono già note come proteine coinvolte in processi di tumorigenesi, ovvero **Deidrogenasi/reduattasi, isoforma 2** (Q13268), **nm23-H1** (P15531), **nm23-H2** (P22392), **proteina 14-3-3, isoforma sigma** (P31947), **oncoproteina 18**. Per quanto riguarda l'isoforma sigma delle proteine 14-3-3 è stata trovata una sovraespressione di questa proteina solo nei papillomi, mentre per quanto riguarda i tumori T1 non si osserva nessun cambiamento rispetto al tessuto di controllo. Questo dato concorda con altri dati già presenti in bibliografia dove è stata osservata una diminuzione di espressione di questa proteina negli stadi avanzati del tumore vescicale (al momento noi non abbiamo dati relativi agli stadi avanzati poiché le analisi sono tuttora in corso)<sup>(18)</sup>.

In conclusione, in base ai nostri studi e ai dati presenti in letteratura, possiamo dire che le proteine differenzialmente presenti nei tessuti tumorali potrebbero avere un ruolo come marcatori nella diagnosi precoce o nella prognosi del



carcinoma uroteliale della vescica; la conferma della loro efficacia richiederà un lungo ed approfondito studio di validazione su campioni urinari di pazienti affetti da carcinoma della vescica e di pazienti sani in modo tale da verificare la sensibilità e la specificità dei potenziali marcatori. A tale scopo, inizieremo a studiare eventuali differenze tra proteine urinarie provenienti da soggetti sani e da pazienti con tumore della vescica attraverso la produzione di specifici anticorpi monoclonali e la messa a punto di test multiparametrici (Antibody arrays).

#### BIBLIOGRAFIA

1. Andreadis C., Touloupidis S., Galaktidou G., Kortsaris A.H., Boutis A., Mouratidou D.: *Serum CYFRA 21-1 in patients with invasive bladder cancer and its relevance as a tumor marker during chemotherapy*. J. Urol. 174, 1771-1775; discussion 1775-1776, 2005.
2. Buchumensky V., Klein A., Zemer R., Kessler O.J., Zimlichman S., Nissenkorn I.: *Cytokeratin 20: a new marker for early detection of bladder cell carcinoma?* J Urol. 160, 971-974, 1998.
3. Burchardt M., Burchardt T., Shabsigh A. et al.: *Current concepts in biomarker technology for bladder cancers*. Clin. Chem. 46, 595-605, 2000.
4. De Kok J.B., Schalken J.A., Aalders T.W., Ruers T.J., Willems H.L., Swinkels D.W.: *Quantitative measurement of telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in urothelial cell carcinomas*. Int. J. Cancer 87, 217-220, 2000.
5. Emig M., Saussele S., Wittor H., Weisser A., Reiter A., Willer A., Berger U., Hehlmann R., Cross N.C., Hochhaus A.: *Accurate and rapid analysis of residual disease in patients with CML using specific fluorescent hybridization probes for real time quantitative RT-PCR*. Leukemia 11, 1825-1832, 1999.
6. Fatela-Cantillo D., Fernandez-Suarez A., Menendez V., Galan J.A., Filella X.: *Low utility of CYFRA 21-1 serum levels for diagnosis and follow-up in bladder cancer patients*. J. Clin. Lab. Anal. 19, 167-171, 2005.
7. Halling K.C., King W., Sokolova I.A. et al.: *A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of urothelial carcinoma*. J. Urol. 164: 1768-1775, 2000.
8. Harnden P., Eardley I., Joyce A.D., Southgate J.: *Cytokeratin 20 as an objective marker of urothelial dysplasia*. Br. J. Urol. 78, 870-875, 1996.

9. Inoue T., Nakanishi H., Inada K., Hioki T., Tatematsu M., Sugimura Y.: *Real time reverse transcriptase polymerase chain reaction of urinary cytokeratin 20 detects transitional cell carcinoma cells*. J. Urol. 166, 2134-2141, 2001.
10. Klein A., Zemer R., Buchumensky V., Klaper R., Nissenkorn I.: *Expression of cytokeratin 20 in urinary cytology of patients with bladder carcinoma*. Cancer 82, 349-354, 1998.
11. Kreuzer K.A., Lass U., Bohn A., Landt O., Schmidt C.A.: *LightCycler technology for the quantitation of bcr/abl fusion transcripts*. Cancer Res. 59, 3171-3174, 1999.
12. Lokeshwar V.B., Soloway M.S.: *Current bladder tumor tests: does their projected utility fulfill clinical necessity?* J. Urol. 165, 1067-1077, 2001.
13. Matthew B. Gretzer, Alan W. Partin, Daniel W. Chan, Robert W. Veltri: *Modern Tumor Marker Discovery in Urology: Surface Enhanced Laser Desorption and Ionization (seldi)*. Reviews in Urology 5, 81-89, 2003.
14. Messing E.M., Catalona W.M.: *Tumori uroteliali delle vie urinarie: Epidemiologia*. Da: Walsh P.C., Retik A.B., Vaughan E.D., Wein A.J.: *Campbell's Urology*. 7a edizione, italiana. W.B. Saunders Philadelphia - Verduci editore 2354-2356, 1999.
15. Messing E.M., Catalona W.M.: *Tumori uroteliali delle vie urinarie: Eziologia e fattori di rischio*. Da: Walsh P.C., Retik A.B., Vaughan E.D., Wein A.J.: *Campbell's Urology*. 7a edizione, italiana. W.B. Saunders Philadelphia - Verduci editore, 2354-2356, 1999.
16. Mian C., Pycha A., Wiener H. et al.: *Immunocyt: a new tool for detecting transitional cell cancer of the urinary tract*. J. Urol. 161, 1486-1489, 1999.
17. Miyake Y., Fujiwara Y., Ohue M., Yamamoto H., Sugita Y., Tomita N., Sekimoto M., Shiozaki H., Monden M.: *Quantification of micrometastases in lymph nodes of colorectal cancer using real-time fluorescence polymerase chain reaction*. Int. J. Oncol. 2, 289-293, 2000.
18. Moreira JM, Gromov P, Celis JE. Expression of the tumor suppressor protein 14-3-3 sigma is down-regulated in invasive transitional cell carcinomas of the urinary bladder undergoing epithelial-to-mesenchymal transition. Mol Cell Proteomics. 2004 4;410-419.
19. Nakanishi H., Kodera Y., Yamamura Y., Ito S., Kato T., Ezaki T., Tatematsu M.: *Rapid quantitative detection of carcinoembryonic antigen-expressing free tumor cells in the peritoneal cavity of gastric-cancer patients with real-time RT-PCR on the lightcycler*. Int. J. Cancer 89, 411-417, 2000.
20. Registro Tumori di Torino. Dati disponibili su internet.
21. Sharma S., Zippe C.D., Pandrangi L. et al.: *Exclusion criteria enhance the specificity and positive predictive value of NMP22 and BTA stat*. J. Urol. 162, 53-57, 1999.
22. Southgate J., Harnden P. Re: *Cytokeratin 20: a new marker for early detection of bladder cell carcinoma*. J. Urol. 162, 501-502, 1999.
23. Steiner G., Schoenberg M.P., Linn J.F. et al.: *Detection of bladder cancer recurrence by microsatellite analysis of urine*. Nat. Med. 3, 621-624, 1997.
24. Vriesema J.L., Atsma F., Kiemeneij L.A. et al.: *Diagnostic efficacy of the ImmunoCyt test to detect superficial bladder cancer recurrence*. Urology 58, 367-371, 2001.

## CLINICA DELLA CALCOLOSI RENALE

*M. Marangella*

S.C. Nefrologia e Dialisi - ASO Ordine Mauriziano di Torino

Parole chiave: *Calcolosi renale*  
*Ipercalciuria*  
*Iperossaluria*  
*Ipocitraturia*  
*Stato di saturazione*

### **Abstract:**

Renal stone disease is caused by the formation and passage of poorly soluble salts in the urinary tract. Classification is based on the chemical composition of the main components, and includes calcium nephrolithiasis, uric acid, cystine and struvite stones, as well as more rare stone types. An essential condition for a stone to form is a state of supersaturation of urine environment with a solid phase. Saturation depends on the concentration of constituent ions. It is now available a computer method to calculate saturation, which uses values of chemical species easily measurable in routine laboratory.

However, while saturation is able to fully explain some types of stones, including cystine, struvite and, partially, uric acid stones, it fails to establish a clear cut separation between stone-formers and controls in case of calcium nephrolithiasis. It is therefore hypothesised that inhibitors of stone formation, ionic or macromolecular, could act in urine, with citrate standing as the most important one.

Metabolic evaluation of stone forming patients utilises well established laboratory protocols and is aimed at selective medical management of these patients.

Treatment, which must be tailored to a given type of stone disease, may be centred on dietary advises, or may use alkali for cystine and uric acid stones, thiols for cystine stones, thiazides and potassium citrate for calcium stones. Results, over long-term trials, show positive outcomes in term of stable remission, reduction of stone-recurrence rate, prevention of complications and progression to renal failure.

### **Riassunto:**

La calcolosi renale consegue alla formazione ed al transito di sostanze poco solubili che precipitano nel rene o nelle vie urinarie. La classificazione delle calcolosi si basa sulla composizione del componente principale e comprende

quella calcica, di calcio ossalato e fosfato, urica, cistinica, infetta e forme rare. La patogenesi della calcolosi ha come premessa la sopraturazione delle urine rispetto alla fase solida precipitante. Lo stato di saturazione dipende a sua volta dalla concentrazione degli ioni che compongono il sale. Possibile calcolare lo stato di saturazione mediante un sistema computerizzato che utilizza i valori di specie ioniche facilmente misurabili nella routine. Tuttavia, mentre la saturazione spiega alcune calcolosi, quali quella cistinica, infetta ed in parte quella urica, lo stesso non vale per la calcolosi calcica. In questa si invoca il ruolo di inibitori, ionici o macromolecolari, il più importante dei quali è il citrato.

Lo studio dei pazienti con calcolosi, premessa per una gestione medica mirata, utilizzata protocolli sperimentati che consentono di individuare le anomalie metaboliche presenti, separare le calcolosi secondarie da quelle idiopatiche, dedurre le abitudini alimentari, controllare la compliance alla terapia.

La terapia è specifica per i diversi tipi di calcolosi, può prevedere un approccio dietetico conservativo, oppure utilizzare alcali nelle forme uriche e cistiniche, thiolici nella cistinuria, alcali e diuretici tiazidici nelle calcolosi calciche. I risultati di terapie di lungo periodo evidenziano i risultati positivi in termini di remissioni, riduzione delle recidive, prevenzione delle complicanze e della evoluzione verso la insufficienza renale.

## INTRODUZIONE

La calcolosi renale è l'insieme delle manifestazioni cliniche derivanti dalla formazione e dal transito di sostanze poco solubili che precipitano nel rene o nelle vie urinarie. Si tratta di patologia le cui manifestazioni cliniche coinvolgono rene e vie urinarie, ma le cui cause possono essere sia renali che metaboliche o sistemiche. In via preliminare, possiamo trovarci di fronte ad una patologia d'organo o d'organismo.

Riferendoci alla patologia d'organo, non intendiamo considerare i casi, comunque rari, in cui la nefrolitiasi è chiaramente causata da anomalie delle vie urinarie, ma quelli in cui essa dipende da complesse alterazioni della fisiopatologia renale – acidosi tubulari, ipercalcemie X-linked, tubulopatie fosfaturiche, cistinuria. Parlando di patologia d'organismo intendiamo evidenziare come la nefrolitiasi sia l'*end-point* di alterazioni metaboliche o endocrine più o meno complesse, che coinvolgono altri organi ed apparati. Si tratta in questo caso di problematiche di tipo internistico che favoriscono la nefrolitiasi inducendo alterazioni fisiopatologiche renali che svolgono un ruolo causale nella formazione dei calcoli.

Si distinguono diversi tipi di calcoli classificabili a seconda della composizione del componente principale (Tabella I).

Componente Principale	%
Calcio ossalato	70.1
Calcio fosfato	7.6
Acido urico	15.2
Struvite	2.8
Cistina	1.5
Altri	4.8

*Tabella I. Classificazione dei calcoli in base al componente principale e distribuzione percentuale. Esame spettrofotometrico IR su 16.000 calcoli analizzati presso il Laboratorio Calcolosi Renale ASO Ordine Mauriziano.*

## PATOGENESI

Condizione indispensabile per la formazione dei calcoli è la soprassaturazione dell'ambiente urinario rispetto alla fase solida. In alcuni tipi di calcolosi questa condizione è anche sufficiente a spiegare la litogenesi<sup>(7)</sup>. Questa affermazione

poggia sul fatto che tutti i soggetti che fanno calcoli di un dato tipo hanno urine soprasature rispetto a quella fase solida, mentre soggetti normali hanno urine sempre sottosature. Questo vale per le calcolosi di cistina, di struvite e, in parte, di acido urico. In queste, la stima dello stato di saturazione costituisce una valida discriminante fra i formatori di calcoli e i controlli.

Tuttavia, questa semplificazione non è applicabile alle calcolosi di gran lunga più frequenti di calcio ossalato e calcio fosfato, che rendono conto di quasi l'80% di tutti i calcoli renali. In questo tipo di nefrolitiasi non è possibile distinguere con nettezza fra litiasici e non sulla base dello stato di saturazione, in quanto la misura di questo parametro evidenzia una ampia sovrapposizione fra le due popolazioni, nella nostra come in quasi tutte le casistiche pubblicate<sup>(2,20,31)</sup>. Per spiegare il motivo per cui i soggetti normali non facciano calcoli nonostante urine soprasature, è stato proposto un ruolo determinante degli inibitori della cristallizzazione. Si tratta di sostanze capaci di interferire con i processi di formazione, crescita ed aggregazione cristallina. Esistono due grosse sottoclassi di inibitori, quelli ionici e quelli macromolecolari (Tabella II). Tuttavia, i molti studi che sono stati fin qui condotti sugli inibitori non hanno consentito di stabilire con certezza quale di questi sia il più efficace, se esistano differenze quantitative o qualitative fra controlli e litiasici<sup>(18)</sup>. È probabile che uno sbilanciamento fra saturazione e potenziale inibitorio siano in grado di spiegare la litogenesi calcica, ma ad oggi non disponiamo di un algoritmo, clinicamente applicabile, che esprima in modo soddisfacente questa grandezza. Come spiegheremo sotto, l'unico inibitore che ha trovato fin qui un impiego clinico è il citrato.

<b>Ionici</b>	<b>Macromolecolari</b>
Magnesio	Proteina di Tamm-Horsfall
Citrato	Glicosaminoglicani
Tartrato	Nefrocalcina/ Bakunina
Pirofosfato	Calgranulina
Fosfocitrato	Frammento 1 della Protrombina (UPTF-1)
	Uropontina
	Nuove molecole

*Tabella II. Inibitori della cristallizzazione.*

Poste queste premesse su stato di saturazione ed inibizione, lo schema di formazione dei calcoli che riscuote maggior credito è quello riportato in Figura 1. Il *primum movens* (*driving force*) per la formazione dei primi nuclei cristallini, è uno stato di soprassaturazione delle urine che, se persistente, favorisce la crescita ed aggregazione in cristalli più grandi. L'intrappolamento degli stessi nei tubuli renali, la loro interazione con l'epitelio tubulare, ed il presunto legame che alcuni cristalli stabiliscono con le cellule tubulari, favoriscono il formarsi del calcolo finale. Ai diversi livelli di questo processo potrebbe intervenire una insufficienza del potenziale inibitorio dell'ambiente urinario.

Secondo alcuni autori, compreso chi scrive, questo modello generale può variare a seconda dei tipi di calcolosi. Abbiamo già accennato come in alcuni tipi (cistina, struvite, acido urico) non sia necessario invocare l'intervento di inibitori. Probabilmente anche nelle calcolosi calciche vi sono situazioni in cui la soprassaturazione gioca un ruolo prevalente se non esclusivo. È il caso delle calcolosi in corso di iperossaluria primitiva o secondaria, o delle ipercalciurie

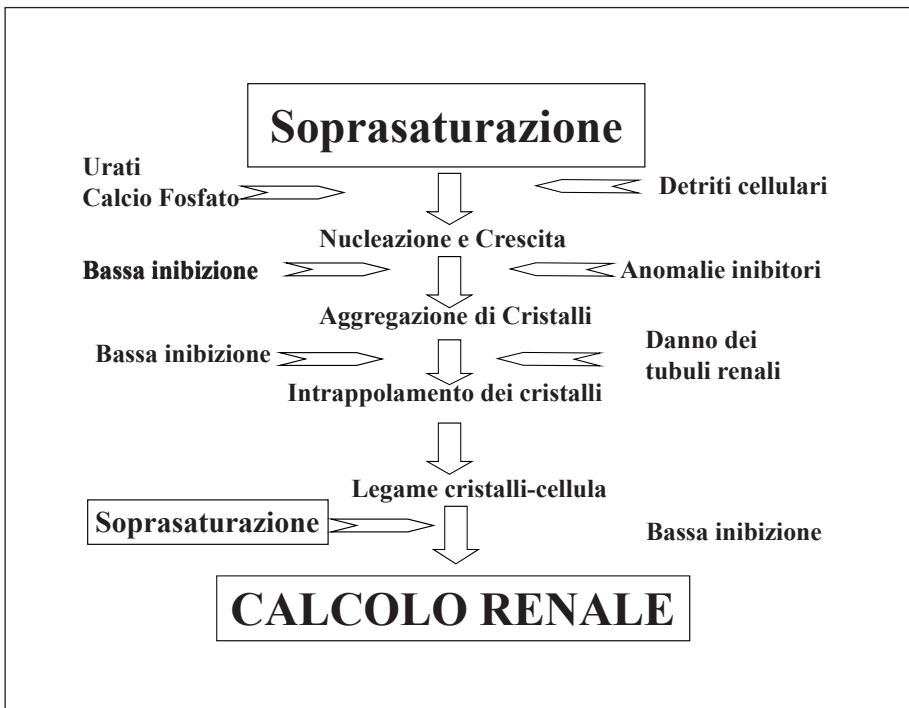


Figura 1. Modello generale della litogenesi in ambiente urinario.

severe nei casi di iperparatiroidismo primario. Qui la elevata e persistente sovrasaturazione delle urine rispetto ai sali di calcio è sufficiente a provocarne la precipitazione endotubulare a livello dei collettori, costituendo pre-calcoli. Nelle forme idiopatiche è stato ipotizzato che i primi nuclei cristallini, forse di fosfato di calcio in forma di apatite, possano formarsi nell'ansa di Henle, estendersi attraverso rotture dell'epitelio nell'interstizio e poi nelle papille renali formando le cosiddette placche di Randall<sup>(7)</sup>.

### Lo stato di saturazione

Lo stato di saturazione esprime l'energia libera delle urine che tende a ridursi spontaneamente, per entropia, producendo nucleazione e crescita di cristalli. Lo stato di saturazione (S) dipende dal prodotto delle attività elettrochimiche degli ioni che costituiscono un sale. L'attività ionica a sua volta dipende dalla concentrazione di uno ione e dal suo coefficiente di attività (f). Ad esempio, lo stato di saturazione per il calcio ossalato potrà essere espresso dalla equazione 1:

$$S = f_i [\text{Ca}] \times f_i [\text{Ox}] \quad (\text{eq. 1})$$

Il prodotto di solubilità ( $K_{sp}$ ) rappresenta il prodotto ionico di un sale a saturazione, e può essere espresso dalla equazione 2:

$$K_{sp} = f_o [\text{C}] \times f_o [\text{A}] \quad (\text{eq. 2})$$

La soprasaturazione relativa ( $\beta$ ), è calcolata dal rapporto espresso dalla equazione 3:

$$\beta = S/K_{sp} \quad (\text{eq. 3})$$

È pertanto possibile esprimere la saturazione in funzione del prodotto di solubilità, secondo una scala in cui  $\beta = 1$  indica saturazione,  $\beta < 1$  sottosaturazione e  $\beta > 1$  soprasaturazione.

Poiché le misure suddette dipendono dalla concentrazione degli ioni liberi, e non da quella totale, dei componenti di un sale, è necessario calcolare la prima a partire dalla seconda. Si calcola la quota libera di uno ione dalla differenza fra la sua concentrazione totale e la sommatoria dei complessi solubili che si formano fra le specie ioniche nelle urine. La concentrazione di questi complessi solubili dipende dalle costanti di stabilità, e queste sono state calcolate per



circa 50 complessi maggiormente rappresentati nelle urine. Il calcolo si effettua risolvendo un sistema di equazioni multiple: *ab initio calculation*.

Da anni presso il Centro Calcolosi dell'Ospedale Mauriziano è in uso un programma computerizzato, progettato e preparato con gli Istituti di Chimica Analitica di Torino e di Catania, che consente nella routine il calcolo dello stato di saturazione dei sali litogeni<sup>(20)</sup>. I parametri necessari al calcolo sono i seguenti:

- Cationi: sodio, potassio, ammonio, calcio, magnesio, idrogeno (pH).
- Anioni: ossalato, fosfato, citrato, solfato inorganico, cloruro.
- Acido urico e cistina, per il calcolo delle relative saturazioni.

Il nostro gruppo ha sviluppato e pubblicato un software, denominato *LithoRisk*, che riproduce un profilo di rischio litogeno, e che comprende il calcolo dello stato di saturazione dei sali implicati nella calcolosi renale<sup>(21)</sup>. Un esempio di grafico prodotto con *LithoRisk* è riportato in Figura 2.

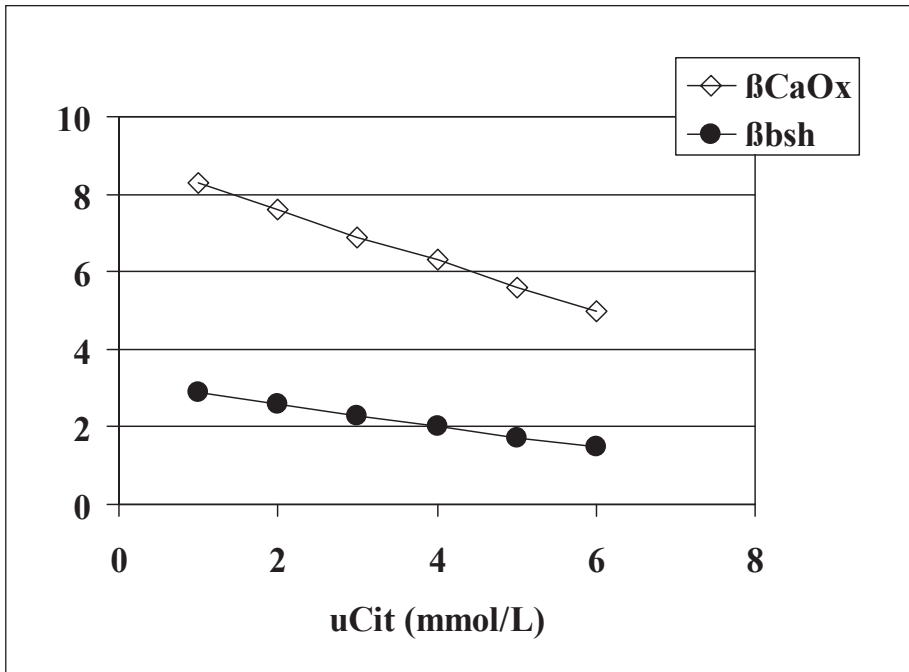


Figura 2. Variazioni dello stato di saturazione delle urine rispetto al calcio ossalato ( $\beta_{CaOx}$ ) ed al calcio fosfato ( $\beta_{Sh}$ ) in relazione alle variazioni della concentrazione del citrato. I valori di  $\beta$  sono stati calcolati variando solo la concentrazione di Citrato e tenendo fisse le concentrazioni di tutti gli altri ioni urinari.

La stima dello stato di saturazione consente di valutare il potenziale litogeno in modo complessivo. Vi è una buona corrispondenza fra la composizione dei calcoli e il grado di saturazione rispetto ai sali corrispondenti<sup>(2)</sup>. Inoltre con *LithoRisk* è possibile personalizzare le prescrizioni terapeutiche e controllarne l'efficacia. Tuttavia, nel caso della nefrolitiasi calcica idiopatica, la saturazione non consente una netta demarcazione fra sani e litiasici; non informa sul potenziale inibitorio delle urine; non rende conto dei processi cinetici della cristallizzazione che governano crescita ed aggregazione dei cristalli.

### **Le anomalie metaboliche**

Come riportato nel paragrafo precedente, lo stato di saturazione dipende dalla interazione di alcune specie ioniche nelle urine. L'alterata escrezione urinaria di alcune di queste concorre al rischio litogeno. Poiché oltre il 70% dei calcoli contiene calcio, le indagini orientate alla ricerca dei fattori di rischio corrispondenti occupano uno spazio preponderante. I parametri di rischio più sperimentati sono il calcio, l'ossalato e l'acido urico, fra i promotori, ed il citrato ed il magnesio fra gli inibitori. La incidenza di anomalie di questi parametri in corso di nefrolitiasi calcica è significativa in tutte le casistiche riportate<sup>(17,23,25,26)</sup>. L'iper calciuria è unanimemente riconosciuta come l'anomalia più frequente, isolata od associata alla iper calciuria fasting<sup>(8)</sup>, con percentuali oscillanti fra il 30 ed il 50% dei casi di nefrolitiasi calcica. Percentuali meno elevate, ma sempre significative sono attribuite alla iperossaluria ed alla ipocitraturia<sup>(17,23,26)</sup>. Alla iperuricuria, presente in circa il 10-15% dei pazienti con nefrolitiasi calcica, è attribuito un significato patogenetico che ne giustifica la ricerca ed il trattamento in questi pazienti<sup>(10)</sup>. Riportiamo qui di seguito qualche cenno sulla fisiopatologia di alcune di queste alterazioni.

#### *Ipercalciuria*

Si definisce tale una escrezione calcica  $> 300$  e  $250$  mg/24 ore nell'uomo e nella donna rispettivamente, oppure  $> 4$  mg/kg/die. Classicamente le Ipercalciurie sono suddivise in:

- a. Assorbitiva: elevato assorbimento intestinale del calcio esogeno
- b. Renale: aumento della escrezione frazionale del calcio filtrato
- c. Riassorbitiva: aumentato riassorbimento osseo

Esula dallo scopo di questa rassegna una trattazione dettagliata dell'argomento. Per questa si rimanda a precedenti articoli<sup>(8,26)</sup>.

Conviene comunque sottolineare che questa classificazione rigorosa non ha retto alla verifica sperimentale e clinica, ed oggi si ritiene che le ipercalciurie si distribuiscano secondo un continuum e che la maggior parte di queste abbia una genesi mista. Si preferisce oggi distinguere le ipercalciurie in dieta-dipendenti o dieta indipendenti.

La *dieta-dipendenza* deve essere valutata tenendo conto che i fattori che influenzano la escrezione calcica sono in ordine di importanza: proteine, specie quelle di origine animale; sale; calcio esogeno; zuccheri semplici. L'effetto calciurico delle proteine animali e del sale è stato documentato sia in studi sperimentali che in quelli clinici<sup>(5,12)</sup>. Entrambi i nutrienti aumentano l'escrezione calcica con un meccanismo misto che coinvolge in misura variabile i tre sopra elencati. Il coefficiente angolare della correlazione fra calcio dietetico e calciuria non è molto alto, e questo perché l'asse ormonale PTH/vitamina D è in grado di modulare in modo molto efficiente l'assorbimento intestinale frazionale del calcio e, di qui, l'escrezione renale. Pertanto, nel giudizio di dieta-dipendenza della ipercalciuria è opportuno considerare non solo l'intake di calcio, ma anche quello degli altri nutrienti che ne possono influenzare lo handling renale.

La *dieta-indipendenza* della ipercalciuria è definita dalla esclusione degli effetti di cui sopra. In questi casi il bilancio esterno del calcio tende ad essere negativo, soprattutto se si fanno incongrue prescrizioni di diete ipocalciche. La genesi delle ipercalciurie dieta indipendenti è ancora dibattuta e ad oggi non del tutto chiarita. Una perdita renale di calcio è presente in una modesta percentuale di pazienti ipercalciurici. In questi potrebbe svolgere un ruolo

Iperparatiroidismo primario
Ipertiroidismo ed altre disendocrinie
Acidosi tubulare renale distale
Acidosi metaboliche sistemiche
Sarcoidosi
Intossicazione da vitamina D
Ipercalcemie
Malattie metaboliche dell'osso

Tabella III. Ipercalciurie secondarie.

l'attivazione del *calcium sensing receptor* che è espresso a livello delle cellule tubulari renali ove riduce il riassorbimento del calcio filtrato<sup>(35)</sup>. In altri casi l'iperocalciuria deriva da un riassorbimento osseo elevato, sia primitivo, come ad esempio nelle osteoporosi ad alto turnover, sia indotto da una alimentazione acidogena, quale è quella ricca di proteine animali<sup>(15)</sup>. Vi sono infine le Ipercalciurie secondarie a malattie sistemiche o di altri organi. Un elenco di queste è riportato nella Tabella III.

### *Iperossaluria*

Si definisce tale una escrezione di ossalato > 45 mg (0.5 mmol)/24 ore, oppure un rapporto > 55  $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  di creatinina urinaria. Classicamente si ritiene che la maggior parte dell'ossalato sia endogeno, rendendo conto fino al 90% del totale. Tuttavia, in alcuni casi l'assorbimento intestinale frazionale di ossalato può aumentare in modo significativo. Emblematica è l'iperossaluria in corso di diete ipocalciche, in cui la riduzione del calcio nel lume intestinale riduce la frazione di complessi calcio-ossalato, poco solubili, a favore di altri (sodio, potassio) solubili e facilmente assorbibili. Lo stesso meccanismo è la causa della iperossaluria enterica nel corso di sindromi da malassorbimento. In questi casi il malassorbimento di acidi grassi e la conseguente saponificazione con il calcio intestinale, consente all'ossalato di legarsi in complessi più solubili<sup>(30,33)</sup>. All'iperossaluria enterica concorrono altri meccanismi, quali l'aumentata permeabilità della mucosa intestinale indotta dalla infiammazione. Di recente è stato dimostrato che la distruzione della flora batterica indotta dalla terapia antibiotica di lunga durata, coinvolge un particolare batterio *Oxalobacter Formigenes*, un germe anaerobio obbligato capace di utilizzare l'ossalato a fini energetici, riducendone la concentrazione e la biodisponibilità. Questo meccanismo opera nelle calcolosi renali iperossaluriche che spesso si accompagnano alla fibrosi cistica<sup>(16,34)</sup>.

Le forme più gravi, e per fortuna più rare, di iperossaluria sono quelle primitive del tipo 1 e tipo 2 (PH1, PH2). Si tratta di malattie monogeniche, a trasmissione autosomica recessiva, e causate da mutazioni di due distinti geni, l'uno che codifica per l'enzima epatico alanina-gliossilato aminotransferasi (AGT), nella PH1; l'altro che codifica per la gliossilato-reduttasi (GR), nella PH2. In entrambi i casi la calcolosi renale è causata da una elevazione severa e persistente di ossalato, con una evoluzione ad ossalosi sistemica dopo l'insorgenza di insufficienza renale cronica. Questi pazienti possono essere salvati solo con un trapianto combinato di fegato e rene. Il nostro Centro si è qualificato come riferimento nazionale per le PH1 e PH2, ed è oggi in grado di offrire diagnosi biochimica e genetica, in collaborazione con la genetica medica

della università di Torino: Molto sono stati sottoposti a trapianto di rene o di fegato-rene con ottimi risultati. Per una trattazione più estesa dell'argomento si rimanda a precedenti articoli<sup>(22)</sup>.

### *Ipicitraturia*

Circa il 20% dei pazienti con calcolosi calcica ha una riduzione del citrato urinario. Questa è definita da una citraturia < 2.0 mmol/24 ore, oppure < 0.2 mmol/mmol di creatinina. Abbiamo accennato al ruolo del citrato come inibitore della cristallizzazione. Un ruolo ulteriore è svolto dalla elevata affinità del citrato per il calcio, con il quale crea complessi solubili, riducendo la frazione di calcio disponibile per il legame con ossalato e fosfato. Un esempio di come l'aumento della concentrazione di citrato sia in grado di ridurre in modo significativo lo stato di saturazione rispetto ai sali di calcio litogeni è riportato in Figura 2.

Il citrato è soggetto ad un complesso handling renale in quanto esso viene filtrato dal glomerulo, in parte riassorbito ed in parte catabolizzato dalla cellula tubulare<sup>(32)</sup>. Le condizioni che inducono ipocitraturia sono il deficit di potassio e l'acidosi metabolica. Tuttavia, nella maggior parte vi è una ipocitraturia *mild* la cui causa non è del tutto chiara. In alcuni pazienti la ipocitraturia è chiaramente correlata ad una dieta che determina una elevata produzione di acidi fissi, oppure ad una scarsa assunzione di potassio. In molti casi, spesso famigliari, la ipocitraturia potrebbe derivare da alterazioni dei trasportatori tubulari del citrato ed in particolare dal carrier sodio-dipendente degli acidi dicarbossilici (NaDC1). Pochi sono gli studi fin qui pubblicati sull'argomento, e ad oggi la maggior parte delle ipocitaturie resta idiopatica.

### *Iperuricuria*

Si ammette che una normale escrezione di acido urico debba essere contenuta entro 700 e 650 mg/24 ore nell'uomo e nella donna, rispettivamente. L'aumento della escrezione urinaria di acido urico ha un ruolo causale sia nella calcolosi calcica che in quella urica. Paradossalmente, la sua importanza potrebbe essere maggiore nella prima rispetto alla seconda. Infatti è stato ipotizzato che la nucleazione di urato monosodico possa costituire i nidi iniziali su cui avviene per epitassia la crescita dei sali di calcio. Secondo altre teorie, per altro non confermate, l'acido urico potrebbe interferire con gli inibitori naturali della cristallizzazione, riducendone la potenza<sup>(9)</sup>.

Infine, disponiamo dei risultati di un solo studio controllato che ha dimostrato che la terapia con allopurinolo è efficace nel ridurre le recidive di calcolosi calcica, ma solo nei pazienti affetti da iperuricuria<sup>(14)</sup>

### *Iperacidità urinaria*

La emissione di urine a pH persistentemente acido rappresenta il principale fattore di rischio di calcolosi urica. Tipicamente i pazienti con nefrolitiasi urica hanno pH urinari  $\leq 5.0$  e questo determina soprassaturazione rispetto all'acido urico anche per concentrazioni dello stesso ampiamente in limiti di norma. L'eccessiva concentrazione di idrogenioni nelle urine è secondaria ad una ridotta produzione renale di ammonio, che esplica la maggior parte del potere tampone urinario. La frequente associazione di calcolosi urica con sindrome metabolica, la cui patogenesi poggia sulla resistenza all'azione dell'insulina, ha suggerito che l'aumento dei livelli di insulina possa interferire con la produzione tubulare di ammonio<sup>(1)</sup>.

### *Cistinuria*

La escrezione di cistina è significativamente elevata nei pazienti affetti da calcolosi cistinica. Questo raro difetto, trasmesso con modalità autosomica recessiva nel tipo I o codominante nelle forme non tipo I, è causato da mutazioni dei carrier tubulari degli aminoacidi bibasici. Il risultato è quello di un aumento della escrezione di cistina, a valori ben superiori a 300 mg/24 ore (1 mmol/24 ore), associata ad un aumento degli ALO, arginina, lisina, ornitina<sup>(6)</sup>. La scarsa solubilità della cistina in urine, specie a pH < 7.0, determina la precipitazione dei tipici cristalli esagonali, e la formazione di calcoli.

## **LO STUDIO METABOLICO**

Se la genesi dei calcoli renali deriva da alterazioni metaboliche e fisico-chimiche dell'ambiente urinario, ne consegue la opportunità di avviare protocolli di studio mirati alla ricerca di queste anomalie. Questi si sono diffusi in molti centri, non solo del nostro Paese, e sono ormai ampiamente sperimentati. L'impostazione da noi proposta è schematizzata in Tabella IV.

L'esame chimico dei calcoli eventualmente espulsi o dei frammenti risultanti dalle procedure urologiche è da ritenersi un passaggio preliminare. L'analisi spettrofotometrica in infrarosso offre le maggiori garanzie di attendibilità, fattibilità e contenimento dei costi. Questa analisi è fattibile anche su piccoli frammenti eliminati dopo ESWL o aspirati in corso di procedure percutanee o ureteroscopiche.

La conoscenza preliminare della composizione del calcolo consente di orientare le indagini biochimiche e funzionali successive. Queste richiedono una raccolta urinaria di 24 ore, da effettuarsi secondo istruzioni particolari ed

Analisi chimica del calcolo
Indagini funzionali renali
Dosaggio dei parametri urinari dieta dipendenti
Calcolo dello stato di saturazione delle urine
Indagini sul metabolismo scheletrico
Test dinamici mirati
Indagini di biologia e di genetica molecolare

*Tabella IV. Aspetti diagnostici dello studio metabolico.*

utilizzando conservanti specifici che rendano i campioni idonei alle analisi programmate. Sul piano organizzativo questo tipo di attività richiede una buona integrazione fra il momento clinico, svolto dal nefrologo, e quello laboratoristico, in cui è auspicabile la creazione di percorsi dedicati alla tipologia del paziente con calcolosi. Si noti infine che, per le sue caratteristiche, lo studio metabolico richiede l'integrazione fra diversi settori di laboratorio (chimica clinica, ormonologia, medicina nucleare).

I risultati delle indagini metaboliche rispondono a diversi obiettivi, elencati in Tabella V. Si sottolineano in particolare due aspetti relativi alla utilità dello studio metabolico:

- a. I risultati di alcuni parametri urinari danno precise informazioni nutrizionali, relative all'apporto di proteine totali (azoturia) ed animali

Individuazione delle anomalie metaboliche
Fisiopatologia delle anomalie metaboliche
Diagnostica di patologie sistemiche
Informazioni nutrizionali
Orientamento nelle scelte terapeutiche
Controllo di compliance alla terapia
Individuazione delle complicanze della terapia
Valutazione dei risultati della terapia

*Tabella V. Obiettivi dello studio metabolico del paziente con calcolosi renale.*

(solfato inorganico), sale (sodiuria), calcio (calciuria di 24 ore e su urine *fasting*). È così possibile stabilire se le alterazioni osservate hanno o meno una dieta-dipendenza. Nel follow-up inoltre le indagini informano sulla aderenza del paziente alle eventuali prescrizioni dietetiche.

- b. È possibile individuare la presenza di patologie sistemiche o d'organo cui la nefrolitiasi sia eventualmente secondaria, quali iperparatiroidismo primitivo, sarcoidosi, eccessivo uso di vitamina D, patologie metaboliche dell'osso, etc.

## **TERAPIA DELLA CALCOLOSI RENALE**

Gli obiettivi sono: dissoluzione dei calcoli, prevenzione delle recidive, prevenzione delle complicanze che possano indurre danno funzionale renale.

### **Dissoluzione dei calcoli renali**

Questa è possibile solo se si riesce a portare stabilmente le urine a sottosaturazione. La cosiddetta chemiolisi è stata praticata nella calcolosi di acido urico. Si noti in Figura 3 come sia possibile sottosaturare le urine aumentandone il pH a valori  $> 6.5$ , anche a concentrazioni relativamente elevate di acido urico. Sia la terapia litolitica sia la prevenzione delle recidive di calcolosi urica si fondano sul binomio: elevazione del pH /riduzione della concentrazione dell'acido urico. Di qui l'uso di alcalinizzanti, elevata introduzione idrica (diluizione dell'acido urico) ed allopurinolo. La Figura 3 dimostra con chiarezza che il provvedimento più importante è l'alcalinizzazione. Questa usa sodio bicarbonato (30-40 mg/kg peso corporeo/die); potassio citrato (1-2 mEq/kg/die); sodio citrato (1-2 mEq/kg/die)<sup>(27)</sup>.

Un discorso analogo è teoricamente possibile anche per la calcolosi cistinica. Tuttavia, la particolare durezza di questi calcoli, le concentrazioni molto elevate di cistina presenti nei pazienti cistinurici, la dipendenza da pH  $> 7.0$ , limitano le possibilità di trattamento litolitico e di successo dello stesso. La chemiolisi cistinica utilizza farmaci con gruppi thiolici, capaci di legare la cistina producendo disolfuri misti, solubili nelle urine. I più utilizzati sono i seguenti: tiopronina (15-50 mg/kg/die), suddivisi in 3 somministrazioni; penicillamina (10-15 mg/kg/die).

L'alcalinizzazione utilizza sali di citrato o di bicarbonato, a dosi più elevate rispetto a quelle sufficienti nella calcolosi urica, poiché il target è pH  $\geq 7$ . Il dosaggio della cistina libera è l'indicatore principale di efficacia terapeutica,



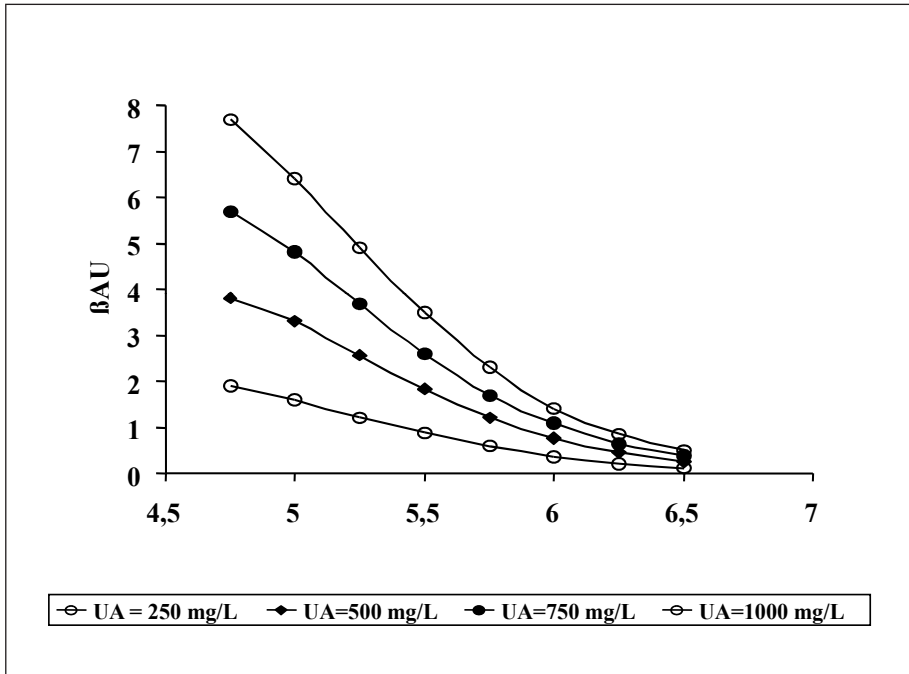


Figura 3. Andamento della saturazione rispetto all'acido urico ( $\beta$ AU) in relazione ai valori di pH a concentrazioni di acido urico comprese fra 250 e 1000 mg/L.

ma questo non è disponibile facilmente. È stato pertanto proposto di utilizzare lo studio della cristalluria cistinica nel sedimento come valido indicatore<sup>(13)</sup>.

Gli stessi provvedimenti sono fortemente raccomandati nella prevenzione delle recidive, in cui si dimostrano altamente efficaci<sup>(4)</sup>.

Non risulta ad oggi disponibile alcuna proposta di chemiolisi per le calcolosi calciche in quanto è praticamente impossibile ottenere una sottosaturazione delle urine persistente ed efficace.

### Prevenzione delle Recidive

È un fatto acquisito che la storia naturale della nefrolitiasi può essere modificata da una terapia medica appropriata<sup>(9,11,28)</sup>. Questo appare ovvio nelle calcolosi, appena descritte, in cui si riesce a sottosaturare le urine rispetto al componente principale. Nel caso della calcolosi calcica idiopatica si ritiene improbabile l'ottenimento di remissioni stabili della malattia, ma la terapia medica selettiva o non selettiva, consente di ridurre

in modo significativo la frequenza delle recidive. È stato anche dimostrato che la prevenzione ha un impatto favorevole sui costi di gestione del paziente con calcolosi<sup>(29)</sup>.

La Società Italiana di Nefrologia ha emanato linee guida per la prevenzione delle recidive di calcolosi calcica, raccomandandone l'uso sulla base dei risultati di studi controllati<sup>(3)</sup>. Si rimanda a queste per un trattamento dettagliata sull'argomento.

Nelle forme a bassa recidività ed in caso di dieta-dipendenza è consigliabile un approccio dietetico che si impernia su:

- a. elevata introduzione di liquidi ad almeno 2.0 L/die.
- b. normalizzazione dell'apporto di proteine, limitandole a 1 mg/kg/die, di cui il 50% di origine animale.
- c. Controllo dell'apporto di sale, regolandolo su una sodiuria non superiore a 150 mmol/24 ore.
- d. Normalizzazione dell'apporto calcico, tenendo conto che il fabbisogno minimo consigliato dalla OMS è di almeno 0.8-1.0 g/die.

Una dieta così programmata è stata impostata prospettivamente ad un gruppo di pazienti con nefrolitiasi calcica ipercalcica, risultando più efficace rispetto ad una dieta ipocalcica<sup>(5)</sup>.

Nelle forme di calcolosi ad andamento più severo si ricorre all'uso di farmaci, fra i quali i più utilizzati sono:

1. Duretici tiazidici: idroclorotiazide (da 25 a 50 mg/die) solo o associato ad amiloride, ha un effetto di protezione, con una riduzione media del 21.3% del tasso di recidive, in quanto riduce la calciuria. Questo si traduce in un bilancio esterno del calcio positivo e, nel lungo periodo, capace di un effetto protettivo sull'osso, deducibile da una significativa riduzione della incidenza di fratture.
2. Citrato di potassio: alla dose di circa 1 mmol/kg/die, da suddividere in 2-3 somministrazioni, ha dato risultati positivi valutati anche in studi di metanalisi<sup>(25)</sup>. Gli effetti del citrato alcalino sono quelli già descritti sopra. All'azione chelante sul calcio si aggiunge l'effetto inibitorio sui processi di cristallizzazione dei sali di calcio. Anche per il citrato alcalino sono stati descritti effetti favorevoli sul metabolismo scheletrico.
3. Allopurinolo: alle dosi di 150-300 mg/die, trova indicazione, anche nella calcolosi calcica, ma solo nei pazienti che abbiano elevata escrezione di acido urico<sup>(14)</sup>.

Si deve sottolineare che la valutazione di efficacia della prevenzione nei pazienti con calcolosi renale non è agevole. Infatti la patologia ha un andamento capriccioso, che alterna periodi anche lunghi di remissione, con altri di elevata attività. La persistenza del rischio richiede trattamenti e follow-up di lungo periodo cui solo pochi pazienti aderiscono. Tuttavia, quando si verificano i risultati di lungo periodo, ad esempio più di 10 anni come in un nostro studio, la gestione medica della calcolosi consente di ottenere remissioni stabili in circa il 40% dei pazienti, ed una riduzione del tasso di recidive pari ad oltre il 70%.

Questi risultati comportano una parallela riduzione del fabbisogno di procedure urologiche, e di conseguenza una riduzione delle giornate di degenza e di giornate lavorative perse.

### **Prevenzione e terapia delle complicanze**

La riduzione delle complicanze legate agli episodi di calcolosi, si traduce in ultimo in un minore rischio di evoluzione verso la insufficienza renale.

In una nostra casistica, non recente, osservammo una prevalenza di IRC pari al 18%<sup>(19)</sup>. Nei pazienti con insufficienza renale la malattia durava da più

<b>Natura della Nefrolitiasi</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Congenite</li> <li>Secondarie</li> <li>Associate ad anomalie urinarie</li> <li>Associate ad altre patologie</li> </ul>
<b>Complicanze della Nefrolitiasi</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Infezione urinaria</li> <li>Ostruzione</li> <li>Iperensione arteriosa</li> </ul>
<b>Terapia della Nefrolitiasi</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Terapia medica</li> <li>Procedure chirurgiche urologiche</li> <li>Procedure semi-invasive (ESWL, PUL, URS)</li> </ul>

*Tabella VI. Fattori che favoriscono la progressione della calcolosi renale verso la insufficienza renale.*

anni, ma il numero di calcoli non era differente rispetto a quello dei pazienti con funzione normale. Tuttavia la severità dei singoli episodi era maggiore nei primi, come suggerito da maggior ricorso a procedure urologiche e maggiore incidenza di complicazioni.

Nelle calcolosi idiopatiche il rischio di IRC non deriva tanto dalla calcolosi stessa – la riduzione della funzione renale comporta del resto cambiamenti fisiopatologici che riducono la propensione alla litogenesi – quanto da fattori complicanti, oppure dalla associazione della nefrolitiasi con altre patologie potenzialmente nefrolesive, come ipertensione arteriosa, obesità, sindrome metabolica. Un elenco riassuntivo dei fattori di potenziale danno funzionale renale in corso di nefrolitiasi è riportato in Tabella VI.

## BIBLIOGRAFIA

1. Abate N., Chandalia M., Cabo-Chan A.V. Jr., Moe. O.W., Sakhaee K. : *The metabolic syndrome and uric acid nephrolithiasis: novel features of renal manifestation of insulin resistance*. *Kidney Int.* 65, 386-92, 2004.
2. Asplin J., Parks J., Lingeman J., Kahnoski R., Mardis H., Lacey S., Goldfarb D., Grasso M., Coe F.: *Supersaturation and stone composition in a network of dispersed treatment sites*. *J. Urol.* 159, 1821-1825, 1998.
3. Baggio B. (coordinatore), Borghi L., Caudarella R., Gambaro G., Marangella M., Messa P.G.: *Linee guida per la nefrolitiasi*. *Giorn. It. Nefrol.* 17, 59-64, 2000.
4. Barbey F., Joly D., Rieu P., Mejean A., Daudon M., Jungers P.: *Medical treatment of cystinuria: critical reappraisal of long-term results*. *J. Urol.* 163, 1419-1423, 2000.
5. Borghi L., Schianchi T., Meschi T., Guerra A., Allegri F., Maggiore U., Novarini A.: *Comparison of two diets for the prevention of recurrent stones in idiopathic hypercalciuria*. *N. Engl. J. Med.* 346, 77-84, 2002.
6. Bruno M., Marangella M.: *Cystinuria: recent advances in pathophysiology and genetics*. *Contrib. Nephrol.* 122, 173-177, 1997.

7. Coe F.L., Evan A., Worcester E.: *Kidney stone disease*. J. Clin. Invest. 115, 2598-2608, 2005.
8. Coe F.L., Parks J.H.: *Idiopathic hypercalciuria: the contribution of Dr. Jacob Lemann, Jr.* J. Am. Soc. Nephrol. 5 (Suppl 1), S59-69, 1994.
9. Coe F.L.: *Treated and untreated recurrent calcium nephrolithiasis in patients with idiopathic hypercalciuria, hyperuricosuria, or no metabolic disorder*. Ann. Intern. Med. 87, 404-410, 1977.
10. Coe F.L.: *Uric acid and calcium oxalate nephrolithiasis*. Kidney Int. 24, 392-403, 1983.
11. Colussi G., De Ferrari M.E., Brunati C., Civati G.: *Medical prevention and treatment of urinary stones*. J. Nephrol. 13 suppl 3, S65-70, 2000.
12. Curhan G.C., Willet W., Rimm E.B., Stampfer M.J.: *A prospective study of dietary calcium and other nutrients and the risk of symptomatic kidney stones*. New Engl. J. Med. 328, 833-838, 1993.
13. Daudon M., Jungers P.: *Clinical value of crystalluria and quantitative morphoconstitutional analysis of urinary calculi*. Nephron Physiol. 98, 31-36, 2004.
14. Ettinger B., Tang A., Citron J.T., Livermore B., Williams T.: *Randomized trial of allopurinol in the prevention of calcium oxalate calculi*. N. Engl. J. Med. 315, 1386-1389, 1986.
15. Giannini S., Nobile M., Sartori L., Dalle Carbonare L., Ciuffreda M., Corro P., D'Angelo A., Calò L., Crepaldi G.: *Acute effects of moderate dietary protein restriction in patients with idiopathic hypercalciuria and calcium nephrolithiasis*. Am. J. Clin. Nutr. 69, 267-271, 1999.
16. Gibney E.M., Goldfarb D.S.: *The association of nephrolithiasis with cystic fibrosis*. Am. J. Kidney Dis. 42, 1-11, 2003.
17. Hess B., Hasler-Strub U., Ackermann D., Jaeger P.: *Metabolic evaluation of patients with recurrent idiopathic calcium nephrolithiasis*. Nephrol. Dial. Transplant. 12: 1362-1368, 1997.
18. Marangella M., Bagnis C., Bruno M., Vitale C., Petrarulo M., Ramello A.: *Crystallization inhibitors in the pathophysiology and treatment of nephrolithiasis*. Urol. Int. 72 Suppl 1, 6-10, 2004.
19. Marangella M., Bruno M., Cosseddu D., Linari F.: *Prevalence of chronic renal insufficiency in the course of idiopathic recurrent calcium stone disease. Risk factors and patterns of progression*. Nephron 54, 302-306, 1990.
20. Marangella M., Daniele P.G., Ronzani M., Sonego S., Linari F.: *Urine saturation with calcium salts in normal subjects and idiopathic calcium stone formers estimated by an improved computer model system*. Urol. Res. 13, 189-193, 1985.
21. Marangella M., Petrarulo M., Daniele P.G., Sammartano S.: *LithoRisk: A software for the calculation and visualisation of risk profiles of nephrolithiasis*. G. Ital. Nefrol. 19, 693-698, 2002.
22. Marangella M., Petrarulo M., Vitale C.: *The primary hyperoxalurias*. Contrib. Nephrol. 136, 11-32, 2001.
23. Marangella M., Vitale C., Bagnis C., Bruno M., Ramello A.: *Idiopathic calcium nephrolithiasis*. Nephron. 81 (Suppl 1), 38-44, 1999.
24. Marangella M.: *Metabolic evaluation of calcium nephrolithiasis. (Review)*. J Nephrol. 8, 179-84, 1995.

25. Mardis H.K., Parks J.H., Muller G., Ganzel K., Coe F.L.: *Outcome of metabolic evaluation and medical treatment for calcium nephrolithiasis in a private urological practice.* J. Urol. 171, 85-88, 2004.
26. Pak C.Y., Britton F., Peterson R. et al.: *Ambulatory evaluation of nephrolithiasis. Classification, clinical presentation and diagnostic criteria.* Am. J. Med. 69, 19-30, 1980.
27. Pak C.Y.C., Sakhaee K., Fuller C.: *Successful management of uric acid nephrolithiasis with potassium citrate.* Kidney Int. 30, 422-428, 1986.
28. Pak C.Y.C.: *Medical management of nephrolithiasis in Dallas: update 1987.* J. Urol. 140; 461-467, 1988.
29. Parks J.H., Coe F.L.: *The financial effects of kidney stone prevention.* Kidney Int. 50, 1706-1712, 1996.
30. Parks J.H., Worcester E.M., O'Connor R.C., Coe F.L.: *Urine stone risk factors in nephrolithiasis patients with and without bowel disease.* Kidney Int. 63: 255-265, 2003.
31. Preminger G.M.: *The metabolic evaluation of patients with recurrent nephrolithiasis: a review of comprehensive and simplified approaches.* J Urol 141, 760-763, 1989.
32. Simpson D.P.: *Citrate excretion: a window on renal metabolism.* Am. J. Physiol. 244, F223-F234, 1983.
33. Sutton R.A., Walker V.R.: *Enteric and mild hyperoxaluria.* Min. Electr. Metab. 20, 352-360, 1994.
34. Terribile M., Capuano M., Cangiano G., Carnovale V., Ferrara P., Petrarulo M., Marangella M.: *Factors increasing the risk for stone formation in adult patients with cystic fibrosis.* Nephrol. Dial. Transplant. 21, 1870-1875, 2006.
35. Vezzoli G., Tanini A., Ferrucci L. et al.: *Influence of calcium-sensing receptor gene on urinary calcium excretion in stone-forming patients.* J. Am. Soc. Nephrol. 13, 2517-2523, 2002.

## GENETICA DELLA CALCOLOSI RENALE

*G. Vezzoli<sup>1</sup>, T. Arcidiacono<sup>1</sup>, V. Paloschi<sup>1</sup>,  
A. Terranegra<sup>2</sup>, R. Biasion<sup>2</sup>, L. Soldati<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Unità di Nefrologia e Dialisi - Istituto Scientifico San Raffaele  
Università Vita Salute - Milano

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche - Università di Milano - Milano

Parole chiave: *Calcolosi renale*  
*Genetica*  
*Calcio*  
*Ossalato*

### **Summary:**

Genetic studies of calcium kidney stones have till now assessed single candidate-genes. Linkage disequilibrium or association studies evidenced the possible involvement of calcium-sensing receptor gene and vitamin D receptor gene. In addition to research in humans, the study of different strains of knock-out mice let us include the gene of phosphate reabsorption carrier NPT2 and caveolin-1 among the candidate genes. However, the interaction among genes and also among environmental factors and genes are generally considered fundamental in calcium stone formation. Therefore, further studies are needed to understand the causes of calcium kidney stones and they will make use of the instruments that the modern biotechnology and bioinformatics make available to the researchers.

### **Riassunto:**

Gli studi genetici sulla calcolosi renale di calcio hanno sino ad oggi valutato singoli geni-candidato. Studi di linkage disequilibrium o di associazione tra un locus e la malattia hanno evidenziato il possibile coinvolgimento dei geni del Calcium-sensing receptor e del recettore della vitamina D. Oltre alle ricerche sull'uomo, lo studio di diversi ceppi di topi knock-out ha permesso di includere tra i possibili determinanti i geni del trasportatore renale del fosfato NPT2 e della caveolina-1. Tuttavia, nella formazione dei calcoli renali vengono generalmente ritenute fondamentali le interazione tra i diversi geni come pure tra i geni e le componenti

ambientali. Ulteriori studi sono perciò necessari per capire le cause della calcolosi renale calcica e potranno avvalersi dell'uso degli strumenti che la moderna biotecnologia e bioinformatica mettono oggi a disposizione dei ricercatori.



I dati epidemiologici ad disponibili dimostrano che la calcolosi renale ha oggi una elevata frequenza nella popolazione, ed è fra le tre principali cause di ricovero in ambito nefro-urologico, insieme alla ipertrofia prostatica e alla insufficienza renale cronica. I dati ISTAT relativi al 1994, indicano che in Italia l'incidenza della calcolosi è pari a 1.68 nuovi casi per 1000 abitanti, con un totale di 95.000 nuovi casi/anno, mentre la prevalenza risulta di 17/1000 abitanti, pari a 974.000 pazienti calcolotici. Come è ben noto, queste frequenze sono aumentate nel corso degli ultimi anni. Secondo i dati ISTAT dal 1995 ad oggi i ricoveri ospedalieri per calcolosi sono aumentati fino ad attestati intorno a 100.000 all'anno con 12.000 interventi chirurgici, 50.000 interventi ESWL, e una spesa annua ospedaliera di 250 milioni di euro circa.

La storia familiare positiva è probabilmente il fattore di rischio più predittivo della tendenza a sviluppare calcoli renali di calcio, ma dimostra anche il substrato genetico della malattia<sup>(11)</sup>. In uno studio svedese, il 29.6% dei familiari di primo grado dei pazienti stone formers era affetto da calcolosi di calcio mentre tra i sani questo avveniva nel 17.4% dei loro familiari di primo grado. Lo stesso dato è stato osservato in uno studio americano (16.2% vs 5.3%)<sup>(19,27)</sup>. In uno studio italiano di Trinchieri et al il 45% delle donne affette e il 31% degli uomini affetti aveva una familiarità positiva per nefrolitiasi<sup>(30)</sup>.

Il pattern di trasmissione del carattere "calcolosi" è apparso come non-mendeliano sin dai primi studi, che ipotizzavano una trasmissione complessa e poligenica. Goodman e coll hanno elaborato un modello secondo il quale 3-4 geni potrebbero fornire il principale contributo alla formazione dei calcoli renali di calcio, intervenendo sulla escrezione di citrato, calcio e ossalato<sup>(12)</sup>. Una alternativa possibile è che più geni, ciascuno incapace da solo di causare calcolosi, agiscano sinergicamente. Questo può avvenire per l'intervento di pochi geni che sono necessari per lo sviluppo della malattia oppure per l'intervento di molti geni con effetto tra loro additivo, ciascuno dei quali predispone alla malattia calcolotica<sup>(9)</sup>. Una analisi della trasmissione del carattere nelle famiglie dei calcolotici ha ipotizzato un gene maggiore solo per la ipercalciuria<sup>(20)</sup>, un fenotipo spesso associato alla calcolosi calcica.

Lo strumento più utilizzato negli studi genetici sulla calcolosi idiopatica di calcio è stato quello degli studi di associazione caso-controllo o familiari. In questi studi veniva ipotizzato un gene-candidato e studiata la cosegregazione dei suoi polimorfismi o di altri marcatori genetici con la calcolosi. Gli studi familiari di linkage viceversa si sono dimostrati utili per scoprire i geni responsabili delle forme monogenetiche di calcolosi renale (S di Dent, acidosi tubulare, rachitismo ipercalciurico), ma poco efficaci nell'analisi dei caratteri non-mendeliani come la calcolosi di calcio idiopatica<sup>(9,16,21)</sup>.

Parte degli studi genetici realizzati hanno considerato come candidato i geni responsabili delle forme di calcolosi renale o di ipercalciuria a trasmissione mendeliana. Sono state così associate alla calcolosi le mutazioni del gene codificante per il canale del cloro CICN5 responsabile della sindrome di dent, del gene NPT2 sito sul cromosoma 5q35 che codifica per un trasportatore sodio-fosfato del tubulo prossimale, del gene PCLN-1 che codifica per la paracellina<sup>(15,17,25,28)</sup>. Tuttavia le mutazioni di questi geni non sono state osservate in ampie casistiche di pazienti con calcolosi renale<sup>(17,28)</sup>.

Altri geni sono stati oggetto di studio perchè codificavano per proteine con potenziale valore fisiopatologico. Tra queste, recentemente il Calcium-sensing receptor (CaSR) ha catturato le maggiori attenzioni<sup>(3)</sup>. Distribuito lungo tutto il nefrone, esso è in grado di “sentire” la concentrazione extracellulare di calcio e di modulare il riassorbimento di acqua, sodio e calcio lungo il tubulo, attraverso diverse vie di signalling intracellulare. Nel collettore riduce il riassorbimento dell’acqua impedendo l’espressione del canale dell’acqua (acquaporina 2) sulla membrane apicale delle cellule principali. Nel tratto ascendente spesso dell’ansa e nel convoluto distale inibisce il riassorbimento di sodio interferendo con il riciclo del potassio attraverso i canali specifici. Nel tratto ascendente spesso dell’ansa e nel convoluto distale deprime il riassorbimento del calcio attraverso una inibizione della attività della pompa del calcio e del trasporto paracellulare di calcio<sup>(1)</sup>. Verrebbero così abnormemente amplificate le condizioni che favoriscono la precipitazione salina nell’interstizio a formare la placca di Randall o altri possibili depositi<sup>(3)</sup>. Nonostante queste aspettative, gli studi di associazione tra i locus del CaSR (3q13-21) e la calcolosi hanno dato risultati negativi, anche se uno di questi ha trovato un’associazione positiva tra il polimorfismo Arg990Gly del gene CaSR e l’ipercalciuria<sup>(18,33)</sup>. Inoltre, i pazienti con iperparatiroidismo primitivo portatori di una o due copie dell’allele variante glicina al codone 990 risultavano più frequentemente affetti da calcolosi renale rispetto agli omozigoti per l’allele arginina<sup>(10,29)</sup>. Uno studio preliminare ha osservato che i polimorfismi della regione 5’-non tradotta, che ospita il promotore del gene CaSR, sono associati alla calcolosi di calcio in una ampia casistica italiana. Il significato di questi polimorfismi non è ancora noto, ma studi in questo senso sono in corso in modo da accompagnare il dato epidemiologico-genetico a quello funzionale<sup>(9)</sup>.

Un gene che ha ottenuto le attenzioni di molte ricerche, è stato quello del recettore della vitamina D (VDR, locus 12q12-14), che media l’effetto della vitamina D nelle cellule target. Diversi studi caso-controllo hanno osservato l’associazione della calcolosi con i polimorfismi genetici dell’introne 8 ed esone 9 dell’estremità 3’ del gene VDR oppure con il polimorfismo del codone

di inizio della trascrizione<sup>(6,24)</sup>. Altri studi, viceversa, non hanno osservato alcuna di queste associazioni<sup>(5,26)</sup>. Altri studi ancora, hanno trovato che le varianti alleliche di due polimorfismi genetici dell'estremo 3' del gene VDR si associavano ad un andamento più severo della malattia, poichè i pazienti con questi genotipi presentavano familiarità più frequentemente positiva, urine più soprassature di calcio-ossalato, minore età di insorgenza e valori di citraturia più bassi<sup>(22,23)</sup>. È perciò possibile che questo gene intervenga sulla calcolosi determinando l'andamento della malattia.

A questi studi se ne sono aggiunti altri che non sono mai stati ripetuti in ulteriori casistiche. Uno di questi studi ha osservato una relazione della calcolosi di calcio con i polimorfismi genetici dell'antagonista del recettore della interleukina-1 (cromosoma 2q) mettendo in evidenza la relazione tra la flogosi e lo sviluppo di calcolosi<sup>(8)</sup>. Altri hanno trovato una relazione della calcolosi con il gene dell'urochinasi<sup>(31)</sup>, della E-caderina<sup>(32)</sup>, e con il fattore di crescita endoteliale<sup>(7)</sup>.

Sono stati anche selezionati ceppi di animali spontaneamente affetti da calcolosi di calcio<sup>(2)</sup>. Il primo è un ceppo di ratti ipercalciurici che hanno un locus al cromosoma 1 associato alla calcolosi<sup>(13)</sup>. Altri due esempi sono i topi knock-out che non esprimono il gene Slc26a6 o della caveolina-1. Il gene Slc26a6 codifica per lo scambiatore cloro-ossalato e limita l'assorbimento dell'ossalato nell'intestino<sup>(14)</sup>. La caveolina-1 è la molecola strutturale delle caveole, che sono invaginazioni della membrana cellulare nelle quali hanno origine i segnali per diverse importanti attività cellulari<sup>(4)</sup>.

In conclusione quindi nessun gene è stato identificato con sufficiente certezza come causa della calcolosi renale. Dagli studi condotti fino ad oggi emerge il probabile coinvolgimento di alcuni geni che regolano il trasporto degli ioni nel rene e nell'intestino. Ulteriori studi dovranno essere prodotti in tal senso, ma il compito dei ricercatori appare oggi difficile, data la complessità delle condizioni che possono indurre la malattia e le probabili interrelazioni tra le componenti genetica ed ambientale nello sviluppo della calcolosi.

## BIBLIOGRAFIA

1. Ba J., Friedman P.A.: *Calcium-sensing receptor regulation of renal mineral ion transport*. Cell Calcium, 35, 229-237, 2004.
2. Bushinsky D.A., Frick K.K., Nehrke K.: *Genetic hypercalciuric stone-forming rats*. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 15, 403-418, 2006.
3. Bushinsky D.A.: *Nephrolithiasis: site of the initial solid phase*. J. Clin. Invest. 111, 602-605, 2003.
4. Cao G., Yang G., Timme T.L., Saika T., Truong L.D., Satoh T., Goltsov A., Park S.H., Men T., Kusaka N., Tian W., Ren C., Wang H., Kadmon D., Cai W.W., Chinault A.C., Boone T.B., Bradley A., Thompson T.C.: *Disruption of the caveolin-1 gene impairs renal calcium reabsorption and leads to hypercalciuria and urolithiasis*. Am. J. Pathol. 162, 1241-1248, 2003.
5. Chen H.Y., Hsu C.D., Wu J.Y., Tsai F.J.: *No association of vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms with calcium oxalate stone formation*. Mol. Urol. 5, 7-10, 2001.
6. Chen W.C., Chen H.Y., Lu H.F., Hsu C.D., Tsai F.J.: *Association of the vitamin D receptor gene start codon Fok I polymorphism with calcium oxalate stone disease*. BJU Int. 87, 168-171, 2001.
7. Chen W.C., Chen H.Y., Wu H.C., Wu M.C., Hsu C.D., Tsai F.J.: *Vascular endothelial growth factor gene polymorphism is associated with calcium oxalate stone disease*. Urol. Res. 31, 218-222, 2003.
8. Chen W.C., Wu H.C., Chen H.Y., Wu M.C., Hsu C.D., Tsai F.J.: *Interleukin-1beta gene and receptor antagonist gene polymorphisms in patients with calcium oxalate stones*. Urol. Res. 29, 321-324, 2001.
9. Colhoun H.M., McKeigue P.M., Smith J.D.: *Problems of reporting genetics associations with complex outcomes*. Lancet 361, 865-872, 2003.
10. Corbetta S., Eller-Vainicher C., Filopanti M., Saeli P., Vezzoli G., Arcidiacono T., Loli P., Syren M.L., Soldati L., Beck-Peccoz P., Spada A.: *R990G polymorphism of the calcium-sensing receptor and renal calcium excretion in patients with primary hyperparathyroidism*. Eur. J. Endocrinol. 155, 687-692, 2006.
11. Curhan G.C., Willett W.C., Rimm E.B., Stampfer M.J.: *Family history and risk of kidney stones*. J. Am. Soc. Nephrol. 8, 1568-1573, 1997.
12. Goodman H.O., Brommage R., Assimos D.G., Holmes R.P.: *Genes in idiopathic calcium oxalate stone disease*. World J. Urol. 15, 186-194, 1997.
13. Hoopes R.R., Middleton F.A., Sen S., Hueber P.A., Reid R., Bushinsky D.A., Scheinman S.J.: *Isolation and confirmation of a calcium excretion quantitative trait locus on chromosome 1 in genetic hypercalciuric stone-forming congenic rats*. J. Am. Soc. Nephrol. 17, 1292-1304, 2006.
14. Jiang Z., Asplin J.R., Evan A.P., Rajendran V.M., Velaquez H., Nottoli T.P., Binder H.J., Aronson P.S.: *Calcium oxalate urolithiasis in mice lacking anion transporter Slc26a6*. Nat. Genet. 38, 474-478, 2006.
15. Kutluturk F., Temel B., Uslu B., Aral F., Azezi A., Orhan Y., Konrad M., Ozbey N.: *An unusual patient with hypercalciuria, recurrent nephrolithiasis, hypomagnesemia and G227R mutation of Paracellin-1*. Horm. Res. 66, 175-181, 2006.

16. Laird N.M., Lange C.: *Family-based designed in the age of large-scale gene-association studies*. *Nature Rev. Genet.* 7, 385-394, 2006.
17. Lapointe J.-Y., Tessier J., Paquette Y., Wallendorff B., Coady M.J., Pichette V., Bonnardeaux A.: *NPT2a gene variation in calcium nephrolithiasis with renal phosphate leak*. *Kidney Int.* 69, 2261-2267, 2006.
18. Lerolle N., Coulet F., Lantz B., Paillard F., Houillier P., Soubrier F., Gattegno B., Jeunemaitre X., Ronco P., Rondeau E.: *No evidence for point mutations of the calcium-sensing receptor in familial idiopathic hypercalciuria*. *Nephrol. Dial. Transplant.* 16, 2317- 2322, 2001.
19. Ljunghall S.: *Family history of renal stones in a population study of stone formers and healthy subjects*. *Br. J. Urol.* 51, 249-252, 1979.
20. Loredó-Ostí J.C., Roslin N.M., Tessier J., Fujiwara T.M., Morgan K., Bonnardeaux A.: *Segregation of urine calcium excretion in families ascertained for nephrolithiasis: evidence for a major gene*. *Kidney Int.* 68, 966-971, 2005.
21. Morton N.: *Linkage disequilibrium maps and association mapping*. *J. Clin. Invest.* 115, 1425-1430, 2005.
22. Mossetti G., Rendina D., Viceconti R., Manno G., Guadagno V., Strazzullo P., Nunziata V.: *The relationship of 3' vitamin D receptor haplotypes to urinary supersaturation of calcium oxalate salts and to age at onset and familial prevalence of nephrolithiasis*. *Nephrol. Dial. Transplant.* 19, 2259-2265, 2004.
23. Mossetti G., Vuotto P., Rendina D., Numis F.G., Viceconti R., Giordano F., Cioffi M., Scopacasa F., Nunziata V.: *Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and tubular citrate handling in calcium nephrolithiasis*. *J. Intern. Med.* 253, 194-200, 2003.
24. Nishijima S., Sugaya K., Naito A., Morozumi M., Hatano T., Ogawa Y.: *Association of vitamin D receptor gene polymorphism with urolithiasis*. *J. Urol.* 167, 2188-2191, 2002.
25. Prie D., Huart V., Bakouh N., Planelles G., Dellis O., Gérard B., Hulin P., Benqué-Blanchet F., Silve C., Grandchamp B., Friedlander G.: *Nephrolithiasis and osteoporosis associated with hypophosphatemia caused by mutations in the type 2a sodium-phosphate cotransporter*. *N. Engl. J. Med.* 347, 983-991, 2002.
26. Relan V., Khullar M., Singh S.K., Sharma S.K.: *Association of vitamin D receptor genotypes with calcium excretion in nephrolithiatic subjects in northern India*. *Urol. Res.* 32, 236-240, 2004.
27. Resnick M., Pridgen D.B., Goodman H.O.: *Genetic predisposition to formation of calcium oxalate renal calculi*. *N. Engl. J. Med.* 278, 1313-1318, 1968.
28. Scheinman S.J., Cox J.P.D., Lloyd S.E., Pearce S.H., Salenger P.V., Hoopes R.R., Bushinsky D.A., Wrong O., Asplin J.R., Langman C.B., Norden A.G., Thakker R.V.: *Isolated hypercalciuria with mutation in CLCN5: relevance to idiopathic hypercalciuria*. *Kidney Int.* 57, 232-239, 2000.
29. Scillitani A., Guarnieri V., Battista C., De Geronimo S., Muscarella L.A., Chiodini I., Cignarelli M., Minisola S., Bertoldo F., Francucci C.M., Malavolta N., Piovesan A., Mascia M.L., Muscarella S., Hendy G.N., D'Agruma L., Cole D.E.: *Primary hyperparathyroidism and the presence of kidney stones are associated with different haplotypes of the calcium-sensing receptor*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 277-283, 2007.

30. Trinchieri A., Mandressi A., Luongo P., Coppi F., Pisani E.: *Familial aggregation of renal calcium stone disease*. J. Urol. 138, 478-481, 1988.
31. Tsai F.J., Lin C.C., Lu H.F., Chen H.Y., Chen W.C.: *Urokinase gene 3'-UTR T/C polymorphism is associated with urolithiasis*. Urology 59, 458-461, 2002.
32. Tsai F.J., Wu H.C., Chen H.Y., Lu H.F., Hsu C.D., Chen W.C.: *Association of E-cadherin gene 3-UTR C/T polymorphism with calcium oxalate stone disease*. Urol. Int. 70, 278-281, 2003.
33. Vezzoli G., Tanini A., Ferrucci L., Soldati L., Bianchin C., Franceschelli F., Malentacchi C., Porfirio B., Adamo D., Terranegra A., Falchetti A., Cusi D., Bianchi G., Brandi M.L.: *Influence of calcium-sensing receptor gene on urinary calcium excretion in stone-forming patients*. J. Am. Soc. Nephrol. 13, 2517-2523, 2002.

## **DISTURBI DELLO SPETTRO AUTISTICO DALLA CLINICA ALLA GENETICA**

*R. Rigardetto<sup>1</sup>, M. Gandione<sup>1</sup>, A. Persico<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Pediatriche e dell'Adolescenza dell'Università di Torino  
Sezione di Neuropsichiatria Infantile

<sup>2</sup> Laboratorio di Psichiatria Molecolare & Neurogenetica  
Università "Campus Bio-Medico" - Roma

**Key words:**     *Autism Spectrum Disorders / Disturbi dello Spettro Artistico*  
                      *Endophenotypes / Endofenotipi*  
                      *Neurodevelopment / Neurosviluppo*  
                      *Intestinal permeability / Permeabilità intestinale*  
                      *Genetic predisposition / Predisposizione genetica*

### **Summary:**

Autism is one of the most involving disorders in the field of child psychiatry, and its etiology remains largely unknown. It is currently believed that different clinical forms exist, hence it is preferable to use the terms Autism Spectrum Disorders (ASD) and Autistic Disorder (AD). Until recently Autistic Disorder was considered to be a very rare pathology (0.4-1 cases per 10,000 newborns), while today the prevalence is estimated at 6-7 per 1,000 newborns, with an increase in the last decade. Diagnosis is exclusively clinical, in absence of biological markers or specific laboratory tests. Internationally approved diagnostic assessment scales permit homogeneity in clinical classification. There is particular interest in MRI and fMRI studies which have identified certain anatomic-functional characteristics of the brain of affected children. The correlation between gastrointestinal disorders and ASD is being investigated in a collaborative study involving the Department of Child Neuropsychiatry and the Department of Gastroenterology of the University of Torino. Results suggest that treatment of the intestinal inflammatory process may bring about an improvement in both abdominal and neuropsychiatric symptoms. Another important contribution to autism research is the genetic studies conducted by the Laboratory of Molecular and Neurogenetic Psychiatry at the Bio-Medical University Campus of Rome. The research concerns "endophenotypes", hereditary features of a biochemical, morphological or clinical nature, whose distribution diverges significantly from normal values in both patients and members of their immediate family. In conclusion, it is generally accepted that Autistic Disorder, usually included among neurodevelopmental alterations, should be defined as a systemic disorder of prenatal pathogenic origin. Examples of systemic

symptoms are macrosomia, excessive intestinal permeability, altered immune reaction etc. The links between neurodevelopmental alterations and immune dysfunction point to the existence of genetic predisposition to Autistic Disorder correlated with both neurodevelopment and the immune system.

### **Riassunto:**

L'Autismo, rappresenta ancora oggi uno degli ambiti più affascinanti della Psichiatria Infantile e la sua eziopatogenesi rimane in gran parte ignota. Attualmente si ritiene che esistano forme cliniche diverse, per cui si preferisce parlare di Disturbi dello Spettro Autistico (DSA) e di Disturbo Autistico (DA).

Il D.A. era considerato in un recente passato una patologia molto rara (0,4-1 ogni 10.000 nati), mentre oggi la prevalenza è stimata nell'ordine del 6-7 ogni 1.000 nati, con un reale incremento nell'ultimo decennio.

La diagnosi è esclusivamente clinica, in assenza di markers biologici o strumentali. Esistono scale di valutazione diagnostica validate a livello internazionale che consentono un'omogeneità di inquadramento clinico.

Nella ricerca scientifica particolare interesse rivestono gli studi in MRI e fMRI che hanno permesso di evidenziare alcune caratteristiche anatomico-funzionali del cervello di questi soggetti.

A Torino è particolarmente attiva la ricerca sulle correlazioni tra disturbi gastroenterici e DSA, condotta in collaborazione tra il Dipartimento di Neuropsichiatria Infantile e quello di Malattie dell'Apparato Digerente dell'Università, i cui risultati evidenziano la possibilità che il trattamento del processo infiammatorio intestinale possa indurre un miglioramento sia dei sintomi addominali, che di quelli neuropsichiatrici.

Un altro fondamentale contributo scientifico deriva dagli studi di Genetica condotti dal Laboratorio di Psichiatria Molecolare e Neurogenetica dell'Università Campus Bio-Medico di Roma. La ricerca verte sullo studio degli "endofenotipi", cioè dei caratteri ereditari di natura biochimica, morfologica o clinica, la cui distribuzione è significativamente distante dalla normalità sia tra i pazienti che i loro familiari di I grado.

In conclusione si è visto come il DA, generalmente incluso tra i disturbi da alterato neurosviluppo, dovrebbe essere definito come un disturbo sistemico ad esordio patogenetico prenatale. Esempi di sintomi sistemici sono la macrosomia, l'eccessiva permeabilità intestinale, l'alterata reattività immunitaria ecc. Gli stessi legami tra alterazioni del neurosviluppo e disreattività immunitaria implicano l'esistenza di geni di vulnerabilità per il DA correlati sia con il neurosviluppo che con il sistema immunitario.



## INTRODUZIONE

L'Autismo, quale quadro clinico autonomo, fu descritto per la prima volta nel 1943 da Kanner, che ne delineò le caratteristiche essenziali con un'accuratezza ancora oggi valida<sup>(20)</sup>. Egli descrisse come la caratteristica comune a questi soggetti fosse l'incapacità a mettersi in relazione con l'ambiente fin dai primi mesi di vita. Essi venivano presentati dai genitori come bambini da sempre "autosufficienti", "felici se lasciati soli", "come in un guscio". Risultava tipica la tendenza ad isolarsi, a non recepire segnali relazionali provenienti dall'esterno, tanto che spesso giungevano alla consultazione per un sospetto di sordità. Fondamentale appariva l'evoluzione delle competenze linguistiche: il linguaggio veniva acquisito nei 2/3 dei casi, ma non era utilizzato per comunicare in modo adeguato, mentre in 1/3 dei casi non vi era sviluppo di linguaggio, anche se poteva essere pronunciata qualche parola.

Il linguaggio veniva utilizzato con modalità ecolaliche e i pronomi venivano pronunciati come recepti uditivamente, cioè usando il tu al posto dell'io. Un'altra caratteristica descritta da Kanner era la preoccupazione ossessiva per il mantenimento dell'immutabilità degli ambienti e delle abitudini.

Lo sviluppo cognitivo risultava globalmente deficitario, anche se si evidenziavano prestazioni particolarmente buone in alcuni settori.

L'ipotesi eziologia dell'autore era che si trattasse di un disturbo di natura congenita.

Nei decenni successivi vari Autori hanno apportato nuovi contributi alla definizione del quadro clinico e del decorso naturale dell'Autismo, ma la descrizione iniziale di Kanner rimane a tutt'oggi paradigmatica. Furono formulate negli anni diverse interpretazioni eziologiche, che spaziavano dal deficit uditivo al danno neurologico congenito o acquisito al disturbo relazionale precoce e cioè alla pura matrice psicogenetica del disturbo, ma nessuna di queste era pienamente soddisfacente.

Va sottolineato che fino a pochi anni fa l'Autismo era considerato una sindrome molto rara con una prevalenza di 0,4/1 ogni 10.000 nati.

Nell'attuale millennio si è assistito al fiorire di nuovi interessi e di una moltitudine di ricerche rispetto a questa patologia, favorito dai progressi tecnologici, dalla genetica molecolare alla Risonanza Magnetica funzionale.

L'Autismo rappresenta oggi uno degli ambiti più affascinanti e stimolanti della Psichiatria Infantile e la comprensione delle basi eziopatogenetiche che lo sottendono consentirà sicuramente una miglior comprensione dei meccanismi biologici che supportano lo sviluppo e l'organizzazione funzionale del cervello e della mente nella prima età della vita.

Un dato fondamentale da considerare è che a tutt'oggi la diagnosi è esclusivamente clinica, in assenza di markers neurochimici, neurofisiologici e neuroradiologici.

Il nucleo del quadro sintomatologico dell'Autismo è dato dalla cosiddetta "Triade delle Compromissioni" e cioè:

- deficit nell'interazione sociale (difficoltà ad instaurare relazioni sociali);
- deficit nella comunicazione sociale (difficoltà nella comunicazione verbale e non verbale);
- deficit di immaginazione (difficoltà nello sviluppo del gioco, dell'immaginazione e delle funzioni simboliche).

In aggiunta a questa triade i modelli di comportamento ripetitivo e le stereotipie sono un'altra caratteristica percettibile e difficilmente modificabile.

Attualmente si ritiene che esistano forme cliniche diverse nel contesto dell'Autismo, per cui si preferisce parlare di *Disturbi dello Spettro Autistico* e di *Disturbo Autistico*. In questo ambito vengono classicamente riconosciute forme progressive e regressive, forme "low functioning" e "high functioning", in rapporto alle potenzialità intellettive.

Va ricordato che, benché le modalità di esordio siano in genere subdole e mal definite, la maggioranza dei genitori, retrospettivamente, riferisce la comparsa dei sintomi nei primi 24 mesi di vita del figlio, mentre l'età media della diagnosi segnalata in letteratura si situa tra i 5 e i 7 anni.

Il ritardo nella definizione diagnostica deriva sia dal fatto che i pediatri spesso non prestano la dovuta attenzione ai primi sintomi sia dal margine di soggettività e dalla difformità di valutazione che una diagnosi solo clinica comporta.

Diventa quindi indispensabile che nel percorso diagnostico vengano utilizzate scale di valutazione validate a livello internazionale che garantiscano omogeneità di procedura e confrontabilità di giudizio.

Tra quelle maggiormente utilizzate in Europa ricordiamo le seguenti:

- interviste ai genitori o **Questionario Rimland** (E-2 Diagnostic Checklist, Rimland, 1971) o **ADI-R** (Autistic Diagnostic Interview Revised, Lord et al., 1994) o **VABS** (Vineland Adaptive Behavior Scales, Sparrow, 1984)
- scale di osservazione dei comportamenti del bambino **ADOS** (Autistic Diagnostic Observation Schedule – Lord et al. 2000) o **ECA-R** (Echelle des Comportements Autistiques – Révisée Lelord, Barthelemy 1997)
- **Scale di valutazione dello sviluppo cognitivo del bambino**

- **BECS** (Batterie des Evaluations Cognitives et Sociales, Adrien, 1997)
- **Gram/Griffith/Wippsi/Wisc** (a seconda dell'età)
- **CARS** (Childhood Autism Rating Scale, Schopler e al. 1988).

Un altro aspetto di grande importanza è che negli ultimi 15-20 anni si è assistito ad un notevole incremento del numero di nuovi casi, in parte riconducibile al maggior affinamento e attenzione alle tecniche diagnostiche, ma in larga misura dovuto ad un reale aumento dei Disturbi dello Spettro Autistico.

Riportiamo alcuni dati recenti che ben evidenziano l'entità di questo fenomeno.

## PREVALENZA

Ricerca condotta in USA in soggetti in età scolare con lo stesso criterio diagnostico (DSM)

nel 1995-6 → 28.813 bambini

nel 2002-3 → 118.603 bambini<sup>(45)</sup>

- La prevalenza valutata dall'American Academy of Pediatrics nel 2006 negli USA è del 6-7/1000 all'età di 8 anni<sup>(25)</sup>.
- La prevalenza in età prescolare in UK è del 6,2/1000, mentre 15 anni prima era di 3/1000<sup>(11)</sup>.
- Una ricerca condotta nel 2005 nel South Thames (UK) sulla popolazione di età compresa tra 9 e 10 anni, utilizzando la classificazione ICD-10, ha evidenziato una prevalenza di 1/100, di cui circa il 70% high-functioning<sup>(1)</sup>.

## EZIOLOGIA

Il versante più affascinante e misterioso di questa patologia è quello dell'**eziologia**, tuttora non chiarita e oggetto di grandi dibattiti, nella misura in cui la fenomenologia clinica è totalmente diversa da quella di qualunque altra patologia psichiatrica, perché compare all'inizio della vita e lo sviluppo mentale del bambino autistico si realizza in un mondo parallelo, in una galassia lontana nello spazio e nel tempo, alieno alla comunità dei coetanei.

Tralasciamo di illustrare i numerosi studi condotti con tecniche obsolete o comunque ormai superate sotto il profilo della ricerca per concentrarci sui risultati più recenti e di maggior interesse speculativo.

Negli ultimissimi anni la visione dell'Autismo quale malattia esclusiva del SNC si è modificata trasformandosi in quella di una patologia che può

essere multisistemica per il coinvolgimento di altri organi ed apparati quali quello gastroenterico, quello immunitario ecc. con una genesi sicuramente multifattoriale.

## STUDI NEUROFISIOLOGICI

È ben noto che la frequenza con cui compaiono anomalie di tipo epilettico e/o crisi epilettiche nei soggetti con DSA è nettamente più elevata rispetto alla popolazione normale di pari età. Studi recenti evidenziano un 20-25% dei bambini autistici con anomalie epilettiformi e almeno altrettanti con crisi epilettiche sia di tipo generalizzato che parziale<sup>(14,12)</sup>.

Le caratteristiche cliniche delle crisi epilettiche non si differenziano da quelle comunemente riscontrabili nelle stesse fasce d'età, ma costituiscono un fattore prognostico negativo relativamente alle possibilità di recupero a livello cognitivo e comportamentale<sup>(12)</sup>.

Gli studi condotti sulle caratteristiche delle anomalie EEG presenti in questi soggetti ha portato ulteriori conferme alla teoria della “underconnectivity”<sup>(14)</sup>, alla formulazione dell'ipotesi di un'alterazione dei meccanismi eccitatori ed inibitori a livello corticale<sup>(33)</sup>, alla formulazione di un'ipotesi di strette correlazioni tra anomalie della sincronizzazione neuronale e deficit cognitivi, suggestiva di un'alterazione della funzionalità del lobo temporale, soprattutto destro<sup>(41)</sup>.

## STUDI IN RISONANZA MAGNETICA (MRI)

- La MRI volumetrica ha evidenziato il frequente riscontro di un aumento del volume cerebrale nello sviluppo postnatale, in particolare tra il 1° e il 2° anno di vita, interessante sia la sostanza grigia che bianca. Le anomalie di sviluppo interessano soprattutto i lobi frontali, temporali e il cervelletto. Nel successivo sviluppo le dimensioni cerebrali sembrano riequilibrarsi in parametri nei limiti della norma<sup>(21,13,8)</sup>.
- Si è evidenziata una riduzione dei collegamenti inter e intraemisferici con conseguente iposviluppo del corpo calloso. La riduzione delle connessioni intercorticali verrebbe compensata da un incremento dei collegamenti talamo-corticali. Il riscontro della riduzione dei collegamenti all'interno del SNC ha portato alla formulazione della “Theory of cortical underconnectivity” che propone come base patogenetica dell'Autismo un deficit di integrazione delle informazioni sensitivo-sensoriali<sup>(18,43,24)</sup>.
- In MRI funzionale (fMRI) si è dimostrata una ridotta attività nel network nuclei caudati - corteccia cerebrale, che sarebbe alla base delle stereotipite

così caratteristiche e frequenti nei bambini con Disturbi dello Spettro Autistico<sup>(40)</sup>.

- In soggetti autistici in cui erano presenti evidenti sintomi ansioso-depressivi è stato segnalato un aumento del volume dell'amigdala destra<sup>(17)</sup>.
- Di particolare attualità è lo studio dei neuroni specchio nei soggetti autistici. È segnalata una riduzione dell'attività dei mirror neurons dell'area 44 alla fMRI durante l'osservazione e imitazione di espressioni emotive facciali, mentre si assiste all'attivazione delle aree premotorie e parietali anteriori, non riscontrabile nei soggetti normali di pari età<sup>(9)</sup>.

Se consideriamo che una funzione importante dei neuroni specchio è quella di permettere la comprensione empatica degli stati emotivi altrui possiamo renderci conto di come un loro alterato funzionamento può contribuire a farci comprendere le difficoltà di comunicazione e relazione tipiche dei bambini autistici.

## **DISTURBI GASTROINTESTINALI E DISTURBI DELLO SPETTRO ARTISTICO**

Un breve cenno meritano le possibili correlazioni tra Disturbo Autistico e Disturbi gastrointestinali, recente oggetto di studio, in particolare del nostro gruppo in collaborazione con il Dipartimento di Malattie dell'Apparato Digerente e della Nutrizione dell'Università di Torino. È stata infatti descritta<sup>(44)</sup> una nuova patologia infiammatoria cronica intestinale, denominata "enterocolite autistica", caratterizzata dal punto di vista infiammatorio da un'ileo-colite cronica con iperplasia nodulare linfoide di grado elevato associata ad un quadro immunologico peculiare caratterizzato da segni di immunodepressione e autoimmunità. La sintomatologia, caratterizzata da alternanza di stipsi e diarrea, insufficienza digestiva, distensione addominale, dolori addominali ecc., è spesso misconosciuta o attribuita a infezioni intercorrenti. È stato ipotizzato che l'intestino possa costituire la fonte principale di attivazione genica del sistema immune il cui effetto potrebbe scatenare l'attivazione a distanza di quello cerebrale<sup>(44)</sup>. È dunque ipotizzabile che il trattamento del processo infiammatorio intestinale possa indurre un miglioramento non solo dei sintomi addominali, ma anche di quelli neuropsichiatrici<sup>(42)</sup>. Negli ultimi anni abbiamo iniziato uno studio in collaborazione tra la Neuropsichiatria Infantile e la Gastroenterologia Universitaria, rispettivamente dell'ASO OIRM - S. Anna e delle Molinette, sui possibili aspetti di patologia intestinale nei soggetti con Disturbi dello Spettro Artistico. Dagli esami endoscopici

finora effettuati su oltre 30 pazienti è emersa la presenza di malattia intestinale visivamente rilevabile in oltre la metà. L'analisi delle biopsie su mucosa apparentemente normale ha ulteriormente incrementato la percentuale di soggetti affetti evidenziando un interessamento gastroenterico, a livello microscopico, nel 75% dei pazienti. I primi risultati relativi ai tentativi di trattamento farmacologico dell'infiammazione intestinale e alla prescrizione di una dieta priva di glutine e caseina appaiono interessanti e incoraggianti, anche sul versante dei sintomi comportamentali<sup>(2)</sup>.

### LA GENETICA DEI DISTURBI DELLO SPETTRO ARTISTICO

Secondo i classici studi di gemelli e di familiarità, l'autismo presenta la "ereditabilità" più elevata tra tutte le patologie psichiatriche, con una predisposizione genetica che dovrebbe contribuire per circa il 90% alla patogenesi della malattia<sup>(22)</sup>. Tuttavia, contrariamente alle stime iniziali che prevedevano un limitato numero di geni essere coinvolto nella malattia, nel corso degli anni si è andato sempre più evidenziando un notevole grado di complessità, riferibile ai seguenti aspetti: (a) eterogeneità genetica, cioè presenza di geni diversi che predispongono alla malattia in individui diversi; (b) ereditarietà di tipo poligenico, cioè un contributo genetico che viene conferito non da un singolo gene maggiore, bensì da molti geni, ognuno "di piccolo peso"; (c) interazioni gene-gene e gene-ambiente, tali per cui il contributo di un singolo gene nella grande maggioranza dei casi non causerebbe la malattia ma ne aumenterebbe il rischio, conferendo solo una predisposizione<sup>(15,26,23)</sup>. A tutt'oggi, gli studi di linkage effettuati su tutto il genoma hanno identificato numerose regioni cromosomiche ad elevata probabilità di contenere geni di suscettibilità per l'autismo (1q, 2q, 5q, 6q, 7q, 11p, 13q, 15q, 17q, 22q, Xp and Xq)<sup>(26,35,39)</sup>. Sono inoltre stati identificati alcuni geni che, a seguito di riarrangiamenti cromosomici o mutazioni *de novo* presenti nel paziente ma non riscontrate né nei genitori, né in fratelli/sorelle sani, rappresentano l'unica causa di rare forme di autismo "primario" (*NLGN3*, *NLGN4*, *SHANK3*) oppure "sindromico" (*FMRI*, *TSC1*, *TSC2*, *NF1*, *MECP2*)<sup>(15,29,39)</sup>. Infine sono stati identificati vari geni che conferiscono suscettibilità all'autismo, ossia aumentano il rischio ma non causano di per sé la malattia. Le varianti di questi geni che conferiscono un'aumentata vulnerabilità all'autismo sono quindi piuttosto diffuse nella popolazione generale, come accade, ad esempio, per l'ipertensione, le allergie e molte altre patologie complesse.

Per quanto riguarda le regioni cromosomiche implicate nell'autismo, è interessante notare che queste potrebbero non albergare necessariamente

mutazioni, bensì essere frequentemente soggette a riarrangiamenti cromosomici submicroscopici *de novo*, ossia presenti nel paziente ma non nei genitori. Microdelezioni e microduplicazioni di dimensioni orientativamente inferiori alle 2 Mb non vengono evidenziate nel corso dei routinari esami citogenetici, mentre sono state recentemente evidenziate mediante tecniche microarray in circa il 10% dei pazienti autistici appartenenti a famiglie simplex (cioè con un solo figlio affetto), contro il 3% dei pazienti provenienti da famiglie multiplex (con due o più figli affetti da autismo) e l'1% degli individui normali<sup>(15)</sup>. Questa eccessiva instabilità genomica rappresenta uno sviluppo recente della ricerca molto interessante: inattivando uno dei due alleli, una microdelezione potrebbe, ad esempio, causare una riduzione di espressione genica con conseguenze funzionali non dissimili da quelle di mutazioni responsabili di patologie tipicamente a trasmissione mendeliana autosomica dominante. In alternativa, potrebbe contribuire a determinare la malattia abbassandone la soglia di rischio, in congiunzione con varianti geniche comuni nella popolazione generale.

Per quanto riguarda invece i geni causali o di suscettibilità, quali indicazioni forniscono essi da un punto di vista funzionale riguardo ai meccanismi patogenetici sottesi alla malattia autistica? In apparenza, si tratta di geni scarsamente correlati tra loro, impegnati in ruoli apparentemente molto distanti, che includono il rimodellamento della cromatina (*MeCP2*, responsabile della sindrome di Rett), il controllo della trascrizione (*FMRI*, responsabile della sindrome dell'X fragile, e altri fattori di trascrizione quali *EN2*, *HOXA1* e *WNT2*), la dinamica del citoscheletro (*NF1* ed *TSC1*, responsabili rispettivamente della neurofibromatosi di tipo 1 e della sclerosi tuberosa, che spesso si accompagna a ritardo mentale, epilessia ed autismo), la strutturazione delle sinapsi eccitatorie (*NLGN3*, *NLGN4*, *SHANK3* e *NRXN1*), la neurotrasmissione glutammatergica (*NR2A* e *GRIK2*), gabaergica (*GABRA4* e *GABRB1*) e serotoninergica (*SLC6A4*), la neurotrasmissione neuropeptidergica (*OXTR* ed *AVPR1*), la trasduzione intracellulare della neurotrasmissione mediante secondi messaggeri (*PRKCB1*, che codifica le due isoforme della PKC $\beta$ ), la migrazione cellulare (*NrCAM*, *ITGB3*, ed *ITGA4*, che codificano molecole d'adesione, mentre *RELN* e *PON1* codificano proteine secrete dotate di molteplici funzioni tra cui attività enzimatiche), ed il funzionamento mitocondriale correlato al calcio intracellulare (*SLC24A12*) (vedi ref. 26 per review).

Contrariamente all'impressione iniziale di network genetiche e biochimiche slegate tra loro, uno studio attento di queste funzioni fornisce invece alcune indicazioni interessanti che, convergendo con i dati forniti da alcuni studi

neuroanatomici, clinici e biochimici, ci portano ad alcune conclusioni di massima, nonché a formulare promettenti ipotesi da sottoporre nel prossimo futuro a verifica sperimentale. Gli studi neuroanatomici effettuati *post-mortem* su cervelli di pazienti autistici hanno evidenziato molteplici alterazioni a livello microscopico che includono una ridotta apoptosi e/o un'eccessiva proliferazione cellulare, anomalie citoarchitettoniche in varie regioni cerebrali (specie corteccia cerebrale e cerebellare, ippocampo, amigdala, nuclei cerebellari profondi, nuclei troncoencefalici di vari nervi cranici), e ridotta migrazione cellulare<sup>(23)</sup>. Poiché nei vertebrati la proliferazione e l'apoptosi dei precursori neuronali, nonché la loro migrazione, hanno luogo essenzialmente in epoca prenatale, queste anomalie microscopiche non possono che derivare da una noxa patogena che ha influito sul neurosviluppo in epoca prenatale. Alcuni studi epidemiologici effettuati su casi di autismo conseguenti ad esposizione ad agenti teratogeni, come il talidomide, mostrano che l'assunzione del farmaco deve avvenire orientativamente in III-VI settimana, con massima probabilità tra il 20° ed il 24° giorno dal concepimento, perchè l'esposizione teratogena esiti in autismo<sup>(36)</sup>. Inoltre, già alla nascita, o almeno a 4-6 mesi di vita (e quindi molto prima della diagnosi di autismo, che normalmente si pone non prima dei 2 anni e mezzo), l'esame clinico o lo studio postumo di filmati fatti in famiglia ha evidenziato la presenza di fini anomalie motorie, un precursore di malattia che dimostra ancora una volta l'eziologia prenatale della sindrome<sup>(37,38)</sup>. Pertanto è ragionevole attendersi che geni codificanti proteine coinvolte nei processi di neurosviluppo possano albergare varianti in grado di aumentare il rischio di malattia o addirittura di causarla. Ecco quindi come geni in apparenza funzionalmente lontani tra loro, ma in grado di influenzare il neurosviluppo a livello di ciclo cellulare, posizionamento dei neuroni e successiva strutturazione architettonica delle reti neurali, sinaptogenesi e neurochimica (non dimentichiamo lo squilibrio tra neurotrasmissione eccitatoria ed inibitoria che rende l'epilessia di frequente riscontro tra i pazienti autistici) possano, in interazione tra loro e con eventuali fattori ambientali, conferire vulnerabilità allo sviluppo di questo disturbo o addirittura esserne la causa<sup>(23)</sup>.

Nonostante la notevole complessità riscontrata sia a livello genetico sia a livello della caratterizzazione comportamentale del disturbo autistico, ulteriori passi avanti sono stati compiuti grazie allo studio degli "endofenotipi", cioè di caratteri ereditari di natura biochimica, morfologica o clinica, la cui distribuzione è significativamente distante dalla normalità tra i pazienti e, in minor grado, tra i loro familiari di primo grado. Nell'ambito dell'autismo, gli endofenotipi più studiati, e quelli sui quali ci siamo principalmente soffermati



nelle nostre ricerche, includono [a] la macrocefalia (una circonferenza cranica > 97° percentile), presente in circa il 20% dei bambini autistici durante i primi anni di vita<sup>(13,22,31,34)</sup>; [b] livelli ematici eccessivi di serotonina, che si registrano in circa il 30-40% dei casi<sup>(28,30,32)</sup>; [c] una perdita eccessiva di oligopeptidi con le urine, che si verifica in percentuali molto variabili (da rari casi fino al 60%) a seconda del contesto geografico di provenienza<sup>(32)</sup>. Lo studio di questi endofenotipi biochimici e morfologici è stato da noi ritenuto prioritario, rispetto agli endofenotipi clinici, essenzialmente per due motivi: in primo luogo, perché la loro misurazione offre maggiori garanzie di affidabilità e di costanza rispetto alla misurazione di variabili comportamentali, anche se effettuata da clinici esperti mediante apposite scale; in secondo luogo, perché queste variabili rispecchiano più direttamente il livello genetico rispetto a quelle comportamentali, che inevitabilmente dipendono anche dall'azione dei fattori ambientali mediata dalla plasticità del sistema nervoso. Nel corso di questi studi, grazie ai quali abbiamo identificato vari geni che contribuiscono a questi endofenotipi, si è recentemente evidenziato uno scenario inatteso e molto promettente. Studiando la circonferenza cranica in un campione di 241 pazienti autistici idiopatici di età compresa tra 3 e 16 anni, abbiamo scoperto che innanzitutto la macrocefalia, già evidenziata da altri gruppi<sup>(22)</sup>, fa in realtà parte di un quadro più ampio che si configura come una vera e propria macrosomia<sup>(29,34)</sup>. In secondo luogo, la circonferenza cranica del paziente è positivamente correlata con un'anamnesi positiva per disturbi allergici o immunitari nel paziente stesso, come anche nei familiari di primo grado<sup>(3,19)</sup>. Questi due risultati aprono scenari sorprendenti e potenzialmente molto rilevanti. Da un lato, essi dimostrano il ruolo centrale che ha la disregolazione del ciclo cellulare e/o una ridotta apoptosi nel determinare la macrocefalia/macrosomia, rispetto invece ad ipotesi inizialmente derivate da studi di brain imaging che prevedevano la macrocefalia come un fenomeno locale dovuto ad un eccesso di fioritura o ad un deficit di retrazione neuritica che avrebbe luogo durante lo sviluppo<sup>(5,7,27)</sup>. In secondo luogo, questo studio fornisce le prime evidenze indirette che questa disregolazione del ciclo cellulare e/o dell'apoptosi potrebbe in qualche modo essere funzionalmente connessa alla presenza di disturbi di natura allergica o immunitaria, frequentemente riscontrati in pazienti autistici, nonché nei familiari<sup>(4,19)</sup>.

In conclusione, abbiamo visto come l'autismo, generalmente incluso tra i disturbi da alterato neurosviluppo, dovrebbe più propriamente essere definito un disturbo sistemico ad esordio patogenetico prenatale. Infatti, oltre all'evidente componente neuropsichiatrica, ulteriori segni e sintomi sistemici che abbiamo brevemente descritto includono la macrosomia<sup>(34)</sup>, l'eccessiva permeabilità

intestinale connessa alla “enterocolite autistica”<sup>(19,21,38)</sup>, l’alterata reattività immunitaria<sup>(19,34)</sup> e la oligopeptiduria renale<sup>(32)</sup>. La presenza di un’anomala attivazione immunitaria a livello del sistema nervoso centrale è stata evidenziata sia in cervelli post-mortem, sia nel liquor di bambini autistici, che presenta una quantità elevata di svariate citochine<sup>(7)</sup>. Questi risultati sono in accordo con studi precedenti che hanno evidenziato alterazioni di vari parametri immunitari a livello plasmatici<sup>(19,27)</sup>, nonché un eccessivo stress ossidativo che rappresenta una normale conseguenza di un sistema immunitario iperattivo<sup>(7)</sup>. Recettori coinvolti primariamente nell’interazione tra cellule immunitarie sono espressi nel sistema nervoso centrale e, ad esempio nel caso del CD38, mediano una liberazione di ossitocina indispensabile per lo sviluppo di una normale cognitiv  sociale<sup>(10,16)</sup>. Infine, una variante genica del gene MET conferisce un aumentato rischio di sviluppare patologia autistica<sup>(5,6)</sup>. Questo gene codifica per il recettore dell’HGF (hepatocyte growth factor), molecola importantissima sia nel determinare la migrazione dei precursori degli interneuroni gabaergici dalla eminenza ganglionare alla corteccia cerebrale, sia nel regolare a livello immunitario la secrezione di citochine, l’attivit  mitogenica e la migrazione di cellule dendritiche e monociti<sup>(4,27)</sup>. Gli stretti legami esistenti tra alterazioni del neurosviluppo e disreattivit  immunitaria implicano quindi probabilmente l’esistenza di geni di vulnerabilit  per l’autismo correlati non solo, o non tanto, con il neurosviluppo, quanto piuttosto con il funzionamento del sistema immunitario. Questa ipotesi   oggetto di intensi studi che mirano a definire un pannello di parametri genetici, biochimici ed immunitari in grado di supportare la diagnostica clinica con un test dotato di una buona affidabilit  e di una ragionevole predittivit  sull’evoluzione di quadri clinici molto precoci o di difficile interpretazione.

## BIBLIOGRAFIA

1. Baird G. et al.: *Prevalence of disorders of the autism spectrum in a population cohort of children in South Thames*. The Lancet 368-210-15, 2006.
2. Balzola F, Clauser D, Caldognetto M, Gandione M, Rigardetto R, M. Rizzetto et al.: *Beneficial behavioural effects of IBD therapy and gluten/casein-free diet in an Italian cohort of patients with autistic enterocolitis followed over one year*. Gastroenterology 130, 1364-71, 2006.
3. Bauman M.L., Kemper T.L.: *Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions*. Int. J. Dev. Neurosci. 23, 183-187, 2005.
4. Beilmann M. et al.: *Hepatocyte growth factor-stimulated invasiveness of monocytes*. Blood 90, 4450-4458, 1997.
5. Campbell D.B. et al.: *A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 16834-16839, 2006.
6. Campbell D.B. et al.: *Disruption of cerebral cortex MET signaling in autism spectrum disorder*. Ann. Neurol., in press 2007.
7. Chauhan A., Chauhan V.: *Oxidative stress in autism*. Pathophysiology 13, 171-181, 2006.
8. Courchesne E. et al.: *Autism at the beginning: growth abnormalities underlying the cognitive and behavioural phenotype of autism*. Dev. Psychopathol. 17, 577-97, 2005.
9. Dapretto M. et al.: *Understanding emotions in others: mirror neuron dysfunction in children with autism spectrum disorders*. Nat. Neurosci. 9, 28-30, 2006.
10. Deaglio S., Vaisitti T., Billington R., Bergui L., Omedè P, Genazzani A.A., Malavasi F.: *CD38/CD19: a lipid raft dependent signaling complex in human B cells*. Blood 109, 5390-5398, 2007.
11. Frombonne E. et al.: *PDD in Preschool Children: Confirmation of High Prevalence*. AM. J. Psychiatry 162, 1133-41, 2005.
12. Hara H.: *Autism and epilepsy: A retrospective follow-up study*. Brain Dev. 23, 15-22, 2007.
13. Hazlett H.C. et al.: *MRI and head circumference study of brain size in autism: birth through age 2 years*. Arch. Gen. Psychiatry 62, 1366-76, 2005.
14. Hughes J.R.: *Autism: The first firm finding = underconnectivity?* Epilepsy Behav. 23, 4-11, 2007.
15. Jacquemont M.L. et al.: *Array-based comparative genomic hybridisation identifies high frequency of cryptic chromosomal rearrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders*. J. Med. Genet. 43, 843-849, 2006.
16. Jin D. et al.: *CD38 is critical for social behaviour by regulating oxytocin secretion*. Nature 446, 41-45, 2007.
17. Juranek J. et al.: *Association between amygdala volume and anxiety level: MRI study in autistic children*. J. Child Neurol. 21, 1051-8, 2006.
18. Just M.A. et al.: *Functional and Anatomical Cortical Underconnectivity in Autism*. Cereb. Cortex 13, 210-18, 2006.

19. Jyonouchi H. et al.: *Dysregulated innate immune responses in young children with autism spectrum disorders: their relationship to gastrointestinal symptoms and dietary intervention*. *Neuropsychobiology* 51, 77-85, 2005.
20. Kanner L.: *Autistic disturbances of affective contact*. In "Nervous Child" 2, 217-50, 1943.
21. Lainhart J. E.: *Advances in autism neuroimaging research for the clinician and genetist*. *Am. J. Med. Genet.* 142, 33-9, 2006.
22. Lainhart J.E. et al.: *Macrocephaly in children and adults with autism*. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry* 36, 282-290, 1997.
23. Miller M.T. et al.: *Autism associated with conditions characterized by developmental errors in early embryogenesis: a mini review*. *Int. J. Dev. Neurosci.* 23, 201-219, 2005.
24. Mizuno A. et al.: *Partially enhanced thalamocortical functional connectivity in autism*. *Brain Res* 1104, 160-74, 2006.
25. MMWR Surveill Summ. 56, 29-40, 2007.
26. Muhle R., Trentacoste S.V., Rapin I: *The genetics of autism*. *Pediatrics* 113, e472-e486, 2004.
27. Okunishi K. et al.: *A novel role for hepatocyte growth factor as an immune regulator through suppressing dendritic cell function*. *J. Immunol.* 175, 4745-4753, 2005.
28. Persico A.M. et al.: *Serotonin transporter promoter variants do not explain the hyperserotonemia in autistic children*. *Mol. Psychiatry* 7, 795-800, 2002.
29. Persico A.M., Bourgeron T: *Searching for ways out of the autism maze: genetic, epigenetic and environmental clues*. *Trends Neurosci.* 29, 349-358, 2006.
30. Piven J. et al.: *Platelet serotonin, a possible marker for familial autism*. *J. Autism Dev. Disord.* 21, 51-59, 1991.
31. Redcay E., Courchesne E.: *When is the brain enlarged in autism? A meta-analysis of all brain size reports*. *Biol. Psychiatry* 58, 1-9, 2005.
32. Reichelt W.H. et al.: *Urinary peptide levels and patterns in autistic children from seven countries, and the effect of dietary intervention after 4 years*. *Dev. Brain Dysfunct.* 10, 44-55, 1997.
33. Rippon G., Brock J., Brown C., Boucher J.: *Disordered connectivity in the autistic brain: challenges for the "new psychophysiology"*. *Int. J. Psychophysiol.* 63, 164-72, 2007.
34. Sacco R. et al.: *Clinical, morphological, and biochemical correlates of head circumference in autism*. *Biol. Psychiatry* 2007, in press.
35. Sebat J. et al.: *Strong association of de novo copy number mutations with autism*. *Science* 316, 445-449, 2007.
36. Stromland K. et al.: *Autism in thalidomide embryopathy: a population study*. *Dev. Med. Child Neurol.* 36, 351-356, 1994.
37. Teitelbaum O. et al.: *Eshkol-Wachman movement notation in diagnosis: the early detection of Asperger's syndrome*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 11909-11914, 2004.
38. Teitelbaum P. et al.: *Movement analysis in infancy may be useful for early diagnosis of autism*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 13982-13987, 1998.

39. The Autism Genome Project Consortium: *Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements*. Nat. Genet. 39, 319-328, 2007.
40. Turner KC et al.: *Atypically diffuse functional connectivity between caudate nuclei and cerebral cortex in autism*. Behav. Brain Funct. 16, 26-34, 2006.
41. Uhlhaas P.J., Singer W.: *Neural synchrony in brain disorders: relevance for cognitive dysfunctions and pathophysiology*. Neuron. 5, 155-68, 2006.
42. Vargas D.L. et al.: *Neuroglial Activation and Neuroinflammation in the Brain of Patients with Autism*. Ann. Neurol. 57, 251-60, 2005.
43. Vidal CN et al.: *Mapping corpus callosum deficits in autism: an index of aberrant cortical connectivity*. Biol. Psychiatry 60, 218-25, 2006.
44. Wakefield A.J. et al.: *Enterocolonic encephalopathy, autism and opionoid receptor ligands*. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 16: 663-674, 2002.
45. Yarbak F.E. et al.: *The prevalence and causes of autistic spectrum disorders*. Arch. Dis. Child, 91, 16-19, 2004.

## TRIIODOTIRONINA: UN MITOGENO MULTI-ORGANO CON EFFETTI ANTISTEATOSICI E ANTI TUMORALI

*A. Perra, G. Simbula, M. Simbula, M. Pibiri, M.A. Kowalik,  
P. Sulas, G.M. Ledda-Columbano, A. Columbano*

Department of Toxicology - Oncology and Molecular Pathology Unit  
University of Cagliari - Italy

Key words:     *Thyroid hormones*  
                  *Nuclear receptors*  
                  *Cell proliferation*  
                  *Non-alcoholic steatosis*  
                  *Liver carcinogenesis*

### **Abstract:**

The thyroid hormone (T3), affects cell growth, differentiation and regulates metabolic functions via its interaction with the thyroid hormone nuclear receptors (TRs). The mechanism by which TRs mediate cell growth is unknown. Our initial studies to investigate the mechanisms responsible for the mitogenic effect of T3, demonstrated that hepatocyte proliferation induced by a single administration of T3 to Wistar rats occurred in the absence of activation of AP-1, NF- $\kappa$ B and STAT3 or changes in the mRNA levels of the immediate early genes c-fos, c-jun and c-myc that are considered to be essential for liver regeneration after partial hepatectomy (PH). On the other hand, T3 treatment caused an increase in cyclin D1 mRNA and protein levels that occurred much more rapidly compared to liver regeneration following 2/3 PH, suggesting that cyclin D1 induction is one of the earlier events in hepatocyte proliferation induced by T3. T3 is mitogenic for other organs as well; indeed, it induces proliferation of pancreatic acinar cells and stimulates the re-entry into S phase of adult rat cardiomyocytes. Notably, in spite of its mitogenic activity, T3 does not promote liver chemical hepatocarcinogenesis; indeed, T3 stimulates the regression of carcinogen-induced preneoplastic nodules, reduces the incidence of hepatocellular carcinomas and completely inhibits lung metastasis. Finally, our recent studies showed that T3 inhibits accumulation of hepatic triglycerides (TGs) and strongly reverts fatty accumulation, most probably by increasing beta-oxidation of fatty acids, thus preventing their esterification to TGs. Similar effects were obtained with a selective agonist of the beta-isoform of TR, namely GC-1, which does not exert any significant effect on heart rate. The latter results are potentially important in view of the notion that non-alcoholic

fatty liver is the most common non infectious liver disease in clinical practice and there is an increasing need for new therapeutic approaches in the treatment of liver damage.

**Riassunto:**

L'ormone tiroideo triiodotironina (T3) influenza la crescita, il metabolismo e le funzioni fisiologiche di pressoché tutti gli organi. La sua attività biologica deriva dall'attivazione di recettori nucleari (TRs), che a loro volta modulano l'espressione di numerosi geni. Il meccanismo con il quale i TRs mediano la crescita cellulare non é conosciuto. Nostri iniziali studi volti a chiarire i meccanismi responsabili dell'effetto mitogenico del T3 nel fegato di roditori, hanno dimostrato che la proliferazione degli epatociti avviene in assenza di attivazione di AP-1, NF- $\kappa$ B e STAT3 o modificazioni dei livelli di mRNA di geni della risposta precoce quali c-fos, c-jun e c-myc considerati essenziali per la rigenerazione epatica dopo 2/3 PH. D'altra parte il trattamento con T3 causava un rapido aumento dei livelli di mRNA e di proteine della ciclina D1, suggerendo che questa ciclina sia il gene target responsabile per l'attività mitogenica. Il T3 non è mitogenico solo per il fegato, in quanto induce proliferazione anche delle cellule acinari del pancreas e stimola l'entrata in fase S di cardiomiociti adulti. L'attività mitogenica del T3 non rappresenta un fattore favorente l'evoluzione neoplastica, in quanto cicli di T3 inducono la regressione di noduli preneoplastici, riducono del 50% l'incidenza di carcinoma epatocellulare ed inibiscono completamente la comparsa di metastasi polmonari. Infine, nostri recenti studi dimostrano che il T3 è in grado di inibire l'accumulo di trigliceridi epatici e di far regredire la statosi epatica, probabilmente in quanto stimola la beta-ossidazione degli acidi grassi prevenendo così la loro esterificazione a trigliceridi. Effetti simili a quelli esercitati dal T3 sono stati ottenuti anche con un agonista selettivo dell'isoforma beta del TR, il GC-1, che non esercita alcun significativo effetto sulla frequenza cardiaca. In considerazione del fatto che la steatosi epatica non-alcolica é il danno epatico di natura non-infettiva più comune nella pratica clinica, e che c'è una necessità in costante aumento di nuovi approcci terapeutici per il trattamento del danno epatico.

The thyroid hormones, 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T3) and thyroxine (T4), influence a variety of physiological processes, including cell growth and metabolism in mammals, metamorphosis in amphibians, and development of the vertebrate nervous system<sup>(46,24,65)</sup>. Most of the effects of T3 are mediated by thyroid hormone nuclear receptors, TRs, which act as transcription factors<sup>(5,32)</sup>. Two different TR subtypes, TR- $\alpha$  and TR- $\beta$ , have been identified which are the products of distinct genes<sup>(22)</sup>. The TR- $\alpha$ 1 and the TR- $\beta$ 1 isoforms bind thyroid hormone with near-equal affinity, and are ubiquitously expressed, although TR- $\alpha$ 1 predominates in heart (50-70% of TRs) while TR- $\beta$ 1 predominates in the liver (80% of TRs)<sup>(54)</sup>. Data collected from various TR knockout mice suggest that TR- $\alpha$ 1 mediates the effects of thyroid hormones on heart rate, whereas TR- $\beta$ 1 is important in mediating the cholesterol-lowering and TSH suppressant effects of T3<sup>(54)</sup>. Discriminating the different effects of thyroid hormones has both theoretical and practical importance. TRs are members of the steroid/thyroid receptor superfamily of nuclear hormone receptors, which includes the two retinoid acid receptors (RAR and RXR), the vitamin D receptor (VDR), the peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR), the Constitutive Androstane Receptor (CAR) and some orphan receptors<sup>(40)</sup>.

### **T3 AND LIVER CELL PROLIFERATION**

Although T3 influences a variety of physiological processes, including cell growth, the exact mechanisms by which TRs mediate hepatocyte proliferation remain elusive. A large body of evidence has demonstrated that a key role in the control of the cell cycle is played by complex formation between cyclins and cyclin-dependent kinases (cdks). Activation through phosphorylation of cyclin-cdk complexes leads to progression into the cell cycle<sup>(43)</sup>. Each cyclin, with its cdk partner, acts at a different step of the cell cycle, the D-type cyclins in association with its main partner cdk4 or cdk6 being important in the early G1 phase, and cyclin E in association with cdk2, acting in the late phase of G1<sup>(55,50)</sup>. The ultimate substrate in this pathway is pRb, which is the major target of cyclin D1/cdk4 complex<sup>(25)</sup>. Phosphorylation of pRb by the cyclin D1/cdk4 complex frees the E2F transcription factors, enabling them to transactivate target genes responsible for the progression from G1 to S phase of the cell cycle. Synthesis of the various cell cycle-regulatory proteins is believed to occur as a consequence of rapid changes occurring immediately after the mitogenic stimulus. In the case of compensatory regeneration such as after PH, hepatocyte proliferation is mediated by several growth factors (hepatocyte growth factor and transforming growth factor- $\alpha$ ),



which after binding to their cell surface receptors evoke a cascade of signal transduction leading to induction of immediate early genes and activation of G1 cyclins<sup>(42,20,61)</sup>. However, hepatocytes *in vivo* have a low sensitivity to growth factors, and in order to effectively respond to these factors, they have to be modified (primed) by cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-6 which are known to activate several key transcription factors, such as NF- $\kappa$ B and STAT3. These changes are considered to be essential for the transition of hepatocytes from G0 to G1 in the model of liver regeneration after 2/3 surgical PH<sup>(1,16,64)</sup>. In the past few years, however, it has become increasingly clear that hepatocytes can be induced to proliferate following treatment with agents (primary mitogens), in the absence of cell loss/death<sup>(11)</sup>. Liver hyperplasia induced by these agents is independent on changes in immediate early genes, growth factors/cytokines and transcription factors<sup>(33,12,41)</sup>. Interestingly, agents that induce direct hyperplasia include ligands of nuclear receptors. To investigate whether T3 could induce hepatocyte proliferation by activating pathways different from those activated during liver regeneration, we determined the response of rat liver to a single treatment of T3. The results<sup>(49)</sup> demonstrated that hepatocyte proliferation induced by T3 in Wistar rats occurred in the absence of activation of AP-1, NF- $\kappa$ B and STAT3 or changes in the mRNA levels of the immediate early genes *c-fos*, *c-jun* and *c-myc* that are considered to be essential for liver regeneration after PH. On the other hand, T3 treatment caused an increase in cyclin D1 mRNA and protein levels that occurred much more rapidly compared to liver regeneration following 2/3 PH, suggesting that cyclin D1 induction is one of the earlier events in hepatocyte proliferation induced by T3. The early increase in cyclin D1 expression was associated with accelerated onset of DNA synthesis, as demonstrated by a 20-fold increase of bromodeoxyuridine (BrdU)-positive hepatocytes at 12 hours after T3 treatment, and by a 20-fold increase in mitotic activity at 18 hours<sup>(49)</sup>.

### **T3 AND PANCREATIC CELL PROLIFERATION T3 INDUCES THE ENTRY INTO CELL CYCLE IN PANCREAS AND HEART**

Pancreas of adult organisms is, like liver, a quiescent organ that, similar to the adult hepatic tissue, has the potential for regeneration after partial pancreatectomy<sup>(6,47)</sup> and acinar cell necrosis<sup>(57)</sup>. However, whether also primary mitogens could induce proliferation of pancreatic cells was unknown. Therefore, we investigated the effect of T3 on normal pancreatic cell turnover, in experiments where F-334 rats were fed a basal diet supplemented with 4 mg/kg of diet for 1 week. The results showed that while pancreatic cells from

control rats were essentially BrdU-negative, T3 treatment resulted in increased pancreatic cell proliferation<sup>(34)</sup>, with most of the labelled cells being acinar cells with islet cells and ductular cells almost completely unaffected. Labeling index was dramatically increased over the control values (L.I. of T3-treated rats was 46.7% vs 7.1% of controls). The increased BrdU incorporation was associated as early as 2 days after treatment with enhanced expression of cyclin D1, cyclin A, a marker of S phase, and PCNA. To establish whether the proliferative effect induced by T3 could be the consequence of T3-induced pancreatic cell damage and compensatory regeneration or, rather, a direct mitogenic effect, the serum values of  $\alpha$ -amylase and lipase, two secretory enzymes known to be released in the serum during pancreatitis, were determined; no increase in the activity of both the enzymes was observed in T3-treated rats, the values being 184 U/l and 18 U/l for  $\alpha$ -amylase and lipase, respectively vs 236 U/l and 17 U/l in controls.

### **T3 STIMULATES RE-ENTRY INTO CELL CYCLE OF ADULT CARDIOMIOCYTES**

Although it is generally believed that mammalian cardiomyocytes are unable to divide in the adult, studies have shown that an increase in myocyte number occurs in cases of severe myocardial hypertrophy<sup>(58,2)</sup>. In addition, a small population of cardiomyocytes retaining a proliferative capacity has been shown to be present in regions adjacent to the infarcts in the adult heart<sup>(30,4)</sup>. Evidence that the adult heart has a limited but significant proliferative capacity raises the possibility that increasing the number of the remaining cardiomyocytes by activating their proliferative potential could replace damaged myocardium. Improvement in the knowledge of the mechanisms that regulate cell cycle progression may be of help in finding efficient ways to stimulate cardiomyocyte progression into the cell cycle. In the heart, evidence that cyclin D1 may play an important role in cardiomyocyte proliferation stems from the following findings:

- i) during cardiomyocyte differentiation, pRb phosphorylation is reduced in association with cell cycle arrest<sup>(21)</sup>;
- ii) stimuli that induce cardiomyocyte hypertrophy also upregulate cyclin D1 expression<sup>(59)</sup>, and,
- iii) coinfection of recombinant adenoviruses expressing a variant of cyclin D1 and CDK4 induces pRb phosphorylation and stimulates re-entry into the cell cycle of cardiomyocytes in culture as well as in adult hearts<sup>(60)</sup>.

The latter finding suggests that prevention of the nuclear import of the cyclin D1/CDK4 complex plays a critical role as a barrier to prevent cardiomyocyte

proliferation; however, it also implies that post-mitotic cardiomyocytes have the potential to proliferate provided that this complex can accumulate in the nucleus. Thyroid hormone (T3), is a well known inducer of cardiac hypertrophy<sup>(39,31)</sup>, an adaptive enlargement of the myocardium characterized by increased size of individual myocytes in response to several extrinsic as well as intrinsic stimuli. However, it is not known whether cardiomyocyte proliferation is also involved in this process; it is also not known whether T3 affects the expression of cell cycle associated proteins in cardiomyocytes. Interestingly, induction of cyclin D1 is one of the earlier events associated with hepatocyte proliferation caused by T3, suggesting that this cyclin may represent a critical target in cell proliferation induced by this hormone<sup>(49)</sup>. We have performed experiments aimed at addressing the following questions:

- i) does T3 induce cyclin D1 expression in the heart?;
- ii) is T3 treatment able to induce nuclear translocation of cyclin D1?; and,
- iii) does T3 possess the ability to induce re-entry of cardiomyocytes into the cell cycle?

The results obtained from these studies<sup>(35)</sup> can be summarized as follows: we showed by northern blot, western analysis and immunohistochemistry that 3,5,3'-triiodothyronine (T3) treatment of adult rats caused an increase of cyclin D1 mRNA and protein levels. The increased cyclin D1 protein content was associated with its translocation into the nucleus of cardiomyocytes. These changes were accompanied by the re-entry of cardiomyocytes into the cell cycle, as demonstrated by increased levels of cyclin A, PCNA, and incorporation of BrdU into DNA (labelling index was 30.2% in T3-treated rats *vs* 2.2% in controls). Entry into the S phase was associated with an increased mitotic activity as demonstrated by positivity of cardiomyocyte nuclei to antibodies anti-phosphohistone-3, a specific marker of the mitotic phase (Mitotic index was 3.01/1000 cardiomyocyte nuclei in hyperthyroid rats *vs* 0.04 in controls). No biochemical or histological signs of tissue damage were observed in the heart of T3-treated rats<sup>(35)</sup>. These results demonstrated that T3 treatment is associated with a re-entry of cardiomyocytes into the cell cycle, and may thus be potentially important for the development of future therapeutic strategies aimed at inducing proliferation of cardiomyocytes.

### **T3 AND LIVER CARCINOGENESIS**

Liver cell proliferation is considered to play an important role in the several steps of carcinogenic process, initiation, promotion and progression<sup>(19)</sup>.

Although the exact mechanism by which cell proliferation plays a role in initiation is not known, its involvement in events such as fixation of a miscoding lesion in the newly made DNA has been entertained<sup>(8,29,13)</sup>. A second site at which cell proliferation exerts a critical effect is the promotion of carcinogen-initiated cells. Increased incidence of preneoplastic lesions and tumors has been observed when carcinogen treatment was followed by compensatory regeneration induced by repeated PH or multiple treatment with necrogenic agents<sup>(51,18,14)</sup>. On the contrary, the effect of agents which cause liver hyperplasia without previous cell loss/death (primary mitogens) on the growth of carcinogen induced preneoplastic hepatocytes is far less clear. To investigate the effect of hepatocyte proliferation induced by primary mitogens on the growth of carcinogen-induced putative preneoplastic lesions, we have examined the effect of T3 on the progression of hepatic nodules, induced in rats by the Resistant-hepatocyte (R-H) model<sup>(8)</sup>, to hepatocellular carcinomas.

Livers from rats exposed to DENA + R-H and sacrificed 6 weeks after release of 2-AAF showed the presence of several macroscopically evident, white nodules, merging from the surface. Immunohistochemically, two types of nodules could be easily identified: those characterized by a uniform GSTP staining and therefore classified as persistent nodules and those showing a progressive loss of GSTP staining (remodeling nodules), the total number of GSTP-positive nodules being 41/cm<sup>2</sup>. Feeding T3 for 1 week caused a dramatic change in the macroscopic appearance of the liver<sup>(36)</sup>. Indeed, most of T3-fed rats exhibited a liver characterized by a smooth surface, with only a few protruding nodules. Accordingly, histological observation of liver sections stained with H&E did reveal the presence of very few nodules in T3-fed rats, in contrast with the large number found in DENA + R-H group. Quantification of the number of GSTP-positive nodules in T3-treated rats showed a 3 fold reduction in their number (from 41 to 14). Reduction of the number of GSTP-positive nodules was accompanied by a decrease in the percent area occupied by GSTP-positive hepatocytes. The above results show that T3 feeding for one week, in spite of its mitogenic potency, exerted an inhibitory effect on the number of GSTP-positive nodules. To determine whether the disappearance of the vast majority of the nodules observed in T3-fed rats could have occurred as a consequence of an initial inhibition of hepatocyte proliferation within the nodules, rats were given BrdU in drinking water and sacrificed 2, 4 and 7 days after starting of T3 diet. While T3 feeding for 1 week exerted a strong inhibitory effect on the number of GSTP-positive nodules, treatment with T3 for only 2 or 4 days did modify the number and/or size of GSTP-positive nodules. L.I. of hepatocytes was determined by analyzing the number of

BrdU-positive hepatocyte nuclei within the GSTP<sup>+</sup> nodules, using a double immunohistochemical technique. Feeding of T3 for 2 days caused a striking increase in L.I. of GSTP-positive nodules compared to that of nodules from rats maintained on a basal diet (51% and 12%, respectively), range of L.I. being 47 to 57% in nodules from T3-treated rats *versus* 10 to 24% of controls. An increased L.I. in T3-liver nodules was also observed at 4 days (55% *versus* 21% of controls).

Based on the findings that liver nodules generated by several promoting protocols have an increased rate of apoptosis<sup>(15,53,68)</sup>, we investigated whether selective apoptosis of GSTP-positive hepatocytes could be responsible for the 70% reduction in the number of the nodules in T3-treated rats. Therefore, A.I. within nodule hepatocytes was determined in rats sacrificed 2, 4 and 7 days after T3. Results indicate that treatment with T3 for 2 days caused an increase, though statistically not significant, in the A.I. of the nodules (3.4 *versus* 2.3 of controls), thus, probably explaining the lack of increase in the size of T3-nodules. No differences in A.I. between T3 fed rats and controls could be observed at 4 and 7 days, clearly indicating that apoptosis was not responsible for the dramatic reduction in the number of nodules observed after 7 days of T3 feeding<sup>(36)</sup>.

To determine whether the inhibitory effect of T3 on GSTP-positive nodules could result in a decreased incidence of hepatocellular carcinoma (HCC), nodule-bearing rats were exposed to seven cycles of T3 (one week/month for seven months) and sacrificed 16 months after initiation. Macroscopically, no tumors could be observed in untreated rats or in animals treated with DENA alone. All rats exposed to the complete R-H protocol (DENA + AAF + PH) showed multiple tumors with livers weighing up to 60-70 grams. On the opposite, only 50% of the rats exposed to T3 following the R-H model showed evidence of tumor. In contrast to the T3-untreated group, a single clearly defined tumoral mass was observed in these animals. Histological observation confirmed the presence of tumors in all rats exposed to DENA + AAF + PH in the absence of T3, and revealed that all tumors in this group were classical trabecular hepatocellular carcinomas, while three out of the five tumors seen in DENA + AAF + PH + T3 group were adenocarcinomas with frequent cystic or papillary cystic patterns. Moreover, in the DENA + AAF + PH group, metastases to the lung were found in five out of 15 animals (33%), no metastases were found in T3-exposed animals<sup>(36)</sup>. These results indicate that cell proliferation *per se* might not necessarily represent a promoting condition for putative preneoplastic lesions and demonstrates an anticarcinogenic effect of T3.

### T3 AND NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER

Hepatic steatosis or fatty infiltration is emerging as the most common liver disease in clinical practice, and is a condition that can evolve into steatohepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma<sup>(67)</sup>. Two broad categories of this condition have been recognized: alcoholic fatty liver disease (AFLD) and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Both categories are characterized by an initial phase consisting of hepatic steatosis that can progress to steatohepatitis (ASH and NASH), a state characterized by necroinflammatory changes consisting of ballooning degeneration and apoptosis of hepatocytes eliciting inflammatory and eventually fibrogenic responses, that can lead to development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC)<sup>(52)</sup>. Although the precise etiopathogenesis of NAFLD remains to be defined, it is a disease due to perturbations of intermediary fat metabolism. In hepatic steatosis, an excess of free fatty acids are released from peripheral tissues into the serum<sup>(7)</sup>. These excess serum-free fatty acids are cleared by the liver where they are esterified and converted in neutral fat. The formation of neutral fat is presumably due to a limited capacity to oxidize excess fatty acids. The exact mechanism underlying the transition from steatosis to steatohepatitis is also unknown. According to the “two-hit” hypothesis<sup>(17)</sup>, the fatty liver becomes susceptible to secondary insults, including reactive oxygen species, gut-derived endotoxins, cytokines such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) or interleukin-6 (IL-6). Furthermore, reactive oxygen species activate stellate cells that participate in fibrogenesis. Lipid peroxidation products as well as proteins modified by reactive oxygen species develop immunogenic properties causing an inflammatory response.

Among the experimental models developed to investigate the biochemical changes occurring in fatty liver and NASH, a very useful one is the high-fat choline-methionine deficient diet (CMD), known to cause in rodents fatty change, hepatocyte injury, fibrosis, cirrhosis, oxidative DNA damage *via* 8-hydroxydeoxyguanosine generation, and HCC<sup>(56,45)</sup>. Using the CMD model, it has been shown that peroxisome proliferators (PPs), ligands of the nuclear receptors PPARs, a family of transcription factors which regulate metabolism of endo- and xenobiotic compounds, are capable not only to prevent, but also to reverse, the development of the dietary-induced elevation of hepatic triglycerides and of steatohepatitis<sup>(27,28)</sup>.

Triiodothyronine (T3) resembles PPs in that;

- i) it is a ligand of a nuclear receptor (TRs) of the same superfamily of steroid hormone nuclear receptors<sup>(40)</sup>;
- ii) it is a potent hepatomitogen<sup>(34,23)</sup>, and,

iii) it regulates serum lipid homeostasis and fat tissue metabolism<sup>(26,9)</sup>. However, the effect of T3 on NAFLD is not known.

The aim of this study was to investigate whether T3 could influence the occurrence and/or reversal of steatosis and steatohepatitis induced by CMD. Moreover, the effect of a new thyroid hormone analog devoid of the cardiac effects of thyroid hormones, namely GC-1<sup>(10)</sup>, on the occurrence/reversal of steatosis was also investigated. Feeding the CMD diet for 1 week caused an approximately 25% increase of liver weight and of the liver weight/body weight ratio. Histological examination of the livers of CMD-fed rats showed severe steatosis involving all hepatic lobules, while no liver fat accumulation was present in CS-fed animals. In rats co-fed T3 and the CMD diet liver weight and liver weight/body weight ratio were strongly decreased compared to CMD-fed rats. Histological examination and biochemical determination of TGs hepatic content showed an almost complete absence of lipid accumulation, demonstrating that T3 completely prevented the induction of hepatic steatosis by the CMD diet<sup>(48)</sup>. Since the reduction in hepatic steatosis was consistent with stimulation of fatty acid oxidation by T3, we evaluated its effect of T3 on the expression of target genes involved in peroxisomal and mitochondrial fatty acid oxidation. In the liver, expression of ACO, the rate-limiting enzyme in the peroxisomal  $\beta$ -oxidation pathway of fatty acids was assessed. Feeding the CMD diet slightly reduced the ACO mRNA levels, while co-feeding T3 strongly induced the expression of ACO; moreover, the two key genes involved in mitochondrial  $\beta$ -oxidation, carnitine palmitoyl transferase (CPT1A) and mitochondrial trifunctional protein (MTP) showed a significant increase in CMD + T3-fed rats. These results suggest that T3 may prevent the CMD diet-induced fatty liver by decreasing the transfer of fatty acids for glycerolipid biosynthesis and increasing their breakdown through the  $\beta$ -oxidation pathway<sup>(48)</sup>.

To determine whether T3 could reverse fully established steatosis, rats were fed CMD diet for 11 weeks. This treatment caused a significant increase of liver weight and of liver weight/body weight ratio. Histologically, livers from CMD diet-fed rats showed extensive steatosis compared with CS-fed animals. Co-feeding T3 + CMD diet for 1 week following 10 weeks of CMD diet caused a decrease in both liver weight and the liver weight/body weight ratio compared to rats fed CMD alone. Consistent with the decrease in liver weight, livers from CMD + T3-fed rats showed little if any, fat accumulation<sup>(48)</sup>. The absence of fat accumulation in T3-co-fed rats was confirmed by the determination of the triglyceride hepatic content. These data thus, demonstrate that T3 not only prevents, but also induces a complete regression of fatty liver. The products

of lipid peroxidation can mediate inflammatory responses by activating the nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) with downstream consequences that include expression of cyclooxygenases (COXs). COXs catalyze the conversion of arachidonic acid to prostanoids and thromboxanes, some of which are intensely pro-inflammatory. Since COX-2 acts as a pro-inflammatory mediator in the CMD-induced steatohepatitis model<sup>(66)</sup>, and co-administration of T3 strongly reduces the hepatic accumulation of lipids, we investigated the effect of T3 on COX-2 expression. The results demonstrate that the CMD diet increased the expression of COX-2 when compared to the CS diet, and that T3 added to the CMD diet strongly decreased the hepatic levels of this pro-inflammatory protein. Induction of CYP2E1 and accumulation of hepatic lipoperoxides has been shown to occur in rodents with steatohepatitis induced by feeding a CMD diet<sup>(63)</sup>. CYP2E1 overexpression causes an activation of Jun N-terminal kinase (JNK)<sup>(38)</sup>. As phosphorylation of JNK regulates hepatocellular injury and insulin resistance<sup>(44)</sup>, thus mediating the development of steatohepatitis, the expression of JNK was examined in the liver of rats fed CMD diet with or without T3. The results showed that the CMD diet causes an increase of JNK phosphorylation and that T3 almost completely inhibited activation of this kinase. Very little activation of JNK was observed in the non-injured liver from CS-fed animals. Signal transducer activator of transcription-3 (STAT3) plays a crucial role in inflammation and cell proliferation<sup>(37)</sup>; hepatic protein levels of phosphorylated STAT3 were increased after 11 weeks of CMD dietary feeding compared to CS. Consistent with the proposed pro-inflammatory role of STAT3, the hepatic levels of phosphorylated STAT3 were strongly reduced in rats given T3 together with the CMD diet, compared to CMD alone. All together, these results show that T3 can prevent and reverse liver steatosis induced by a nutritional model<sup>(48)</sup>.

### **SIMILAR EFFECT ARE EXERTED BY GC-1, A SELECTIVE AGONIST OF THE BETA-ISOFORM OF TRS**

Because T3-based therapies often result in undesired side effects, particularly cardiac dysfunction, i.e. tachycardia, arrhythmias, and precipitation of ischemic episodes or heart failure<sup>(31)</sup>, we felt it was important to investigate whether the beneficial effect played by T3 on liver steatosis and steatohepatitis could also be achieved using new thyroid hormone analogs devoid of the cardiac effects of thyroid hormones, such as GC-1<sup>(10)</sup>. Therefore, rats were fed a CMD diet or a CMD diet supplemented with 5 mg/kg of GC-1 for 2 weeks. The results showed that, similar to T3, co-administration of GC-1 for 2 weeks reduced



liver weight/body weight ratio, and serum TG levels. GC-1 also caused a reduction of CMD-induced triglycerides accumulation in the liver, albeit at a lesser extent than T3, and GC-1 co-feeding also diminished lipoperoxidation. Finally, the potential capacity of GC-1 to revert CMD-induced steatosis was investigated. Rats fed a CMD-diet for 10 weeks were shifted to a CMD+GC-1 diet for the last 2 weeks, or maintained on a CMD diet. Similar to T3, GC-1 co-feeding caused a striking reduction of TGs content which was already evident as early as 3 days after its administration and was almost complete 2 weeks afterwards. The disappearance of hepatic triglycerides was accompanied by a concomitant decrease of lipoperoxidation and of liver injury.

In conclusion, our studies show that T3 in rodents

- i) exerts a powerful mitogenic activity in different organs,
- ii) inhibits the progression of hepatocellular carcinoma, and
- iii) inhibits and reverses non-alcoholic fatty liver fatty liver induced by a nutritional model.

In addition, our results also show that many of the effects induced by T3 are shared by GC-1, a recently developed selective agonist of the  $\beta$ -isoform of TR. Notably, GC-1 can elicit these effects at doses that have no significant side effects on heart rate, do not cause muscle loss or an increase in the overall catabolic state<sup>(62)</sup>. Because of the “selective hyperthyroidism” generated by GC-1, this compound has the potential to be developed as a new therapeutic agent for the treatment of a variety of thyroid hormone-related metabolic disorders, like lipid disorders and obesity<sup>(3)</sup>. Our finding that GC-1 is also capable to prevent steatosis and to induce a rapid and dramatic reduction of pre-accumulated hepatic triglyceride makes this member of the new class of halogen-free thyroid hormone agonists, an ideal one for therapy against fatty liver disease, and suggests that activation of specific TR isoforms may have important applications in future strategies in therapy of liver damage.

## REFERENCES

1. Akerman P., Cote P., Yang S.Q., McClain C., Nelson S., Bagby G.J., Diehl A.M.: *Antibodies to tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibit liver regeneration after partial hepatectomy*. Am. J. Physiol. 263, 579-585, 1992.
2. Astorri E., Bolognesi R., Colla B., Chizzola A., Visioli O.: *Left ventricular hypertrophy: a cytometric study on 42 human hearts*. J. Mol. Cell. Cardiol. 9, 763-765, 1977.
3. Baxter J.D., Webb P., Grover G., Scanlan T.S.: *Selective activation of thyroid hormone signaling pathways by GC-1: a new approach to controlling cholesterol and body weight*. Trends Endocrinol. Metab. 15, 154-157, 2004.
4. Beltrami A.P., Urbanek K., Kajstura J., Yan S.M., Finato N., Bussani R., Nadal-Ginard B., Silvestri F., Leri A., Beltrami A., Anversa P.: *Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction*. N. Engl. J. Med. 344, 1750-1757, 2001.
5. Brent G.A.: *The molecular basis of thyroid hormone action*. N. Engl. J. Med. 331, 847-853, 1994.
6. Brochenbrough J.C., Weir G.C., Bonner-Weir S.: *Discordance of exocrine and endocrine growth after 90% pancreatectomy in rats*. Diabetes 37, 232-236, 1988.
7. Browning J.D., Horton J.D.: *Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury*. J. Clin. Invest. 114, 147-152, 2004.
8. Cayama E., Tsuda H., Sarma D.S.R., Farber E.: *Initiation of chemical carcinogenesis requires cell proliferation*. Nature 275, 60-61, 1978.
9. Castellan L.W., Wilcox H.C., Heimberg M.: *Relationships between fatty acid synthesis and lipid secretion in the isolated perfused rat liver: effects of hyperthyroidism, glucose and oleate*. Biochim. Biophys. Acta. 1086, 197-208, 1991.
10. Chiellini G., Apriletti J.W., Baxter J.D., Ribeiro R.C.J., Scanlan T.S.: *A high affinity subtype-selective agonist ligand for the thyroid hormone receptor*. Chem. Biol. 5, 299-306, 1998.
11. Columbano A., Shinozuka H.: *Liver regeneration versus direct hyperplasia*. FASEB J. 10, 1118-1128, 1996.
12. Columbano A., Ledda-Columbano G.M., Pibiri M., Piga R., Shinozuka H., DeLuca V., Cerignoli F., Tripodi M.: *Increased expression of c-fos, c-jun and LRF-1 is not required for in vivo priming of hepatocytes by the mitogen TCPOBOP*. Oncogene 14, 857-863, 1997.
13. Columbano A., Rajalakshmi S., Sarma D.S.R.: *Requirement of cell proliferation for the initiation of liver carcinogenesis as assayed by three different procedures*. Cancer. Res. 41, 2079-2083, 1981.
14. Columbano A., Ledda-Columbano G.M., Curto M., Ennas G.M., Coni P., Sarma D.S.R., Pani P.: *Cell proliferation and promotion of rat liver carcinogenesis: different effect of hepatic regeneration and mitogen-induced hyperplasia on the development of enzyme altered foci*. Carcinogenesis 11, 771-776, 1990.
15. Columbano A., Ledda-Columbano G.M., Rao P.M., Rajalakshmi S., Sarma D.S.R.: *Occurrence of cell death (apoptosis) in preneoplastic and neoplastic liver cells. A sequential study*. Am. J. Pathol. 116, 441-446, 1984.

16. Cressman D.E., Greenbaum L.E., DeAngelis R.A., Ciliberto G., Furth E.E., Poli V., Taub R.: *Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice*. *Science* 274, 1379-1383, 1996.
17. Day C.P., James O.F.: *Steatohepatitis: a tale of two hits?* *Gastroenterology* 114, 842-845, 1999.
18. Dragani T.A., Manenti G., Della Porta G.: *Enhancing effect of carbon tetrachloride in mouse hepatocarcinogenesis*. *Cancer Lett.* 31, 171-179, 1986.
19. Farber E., Sarma D.S.R.: *Hepatocarcinogenesis: A dynamic cellular perspective*. *Lab. Invest.* 56, 4-21, 1987.
20. Fausto N., Laird A.D., Webber E.M.: *Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration*. *FASEB J.* 9, 1527-1536, 1995.
21. Flink I.L., Oana S., Maitra N., Bahl J.J., Morkin E.: *Changes in E2F complexes containing retinoblastoma protein family members and increased cyclin-dependent kinase inhibitor activities during terminal differentiation of cardiomyocytes*. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30, 563-578, 1998.
22. Forrest D., Vennstrom B.: *Functions of thyroid hormone receptors in mice*. *Thyroid* 10, 45-52, 2000.
23. Francavilla A., Carr B.I., Azzarone A., Polimeno L., Wang Z., Van Diehl D.H., Subbotin V., Prelich J.G., Starzl T.E.: *Hepatocyte proliferation and gene expression induced by triiodothyronine in vivo and in vitro*. *Hepatology* 20, 1237-1241, 1994.
24. Greenspan F.S.: *In The Thyroid Gland*. Basic & Clinical Endocrinology, 5<sup>th</sup> ed. Appleton & Lange, Stamford. 1997.
25. Herwig S., Strauss M.: *The retinoblastoma protein: a master regulator of cell cycle, differentiation and apoptosis*. *Eur. J. Biochem.* 15, 581-601, 1997.
26. Hulbert A.J.: *Thyroid hormones and their effects: a new perspective*. *Bio. Rev.* 75, 519-631, 2000.
27. Ip E., Farrell G., Robertson G., Hall P., Kirsch R., Leclercq I.: *Central role of PPAR $\alpha$ -dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice*. *Hepatology* 38, 123-132, 2003.
28. Ip E., Farrell G., Hall P., Robertson G., Leclercq I.: *Administration of the potent PPAR $\alpha$  agonist Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice*. *Hepatology* 39, 1286-1296, 2004.
29. Ishikawa T., Takayama S., Kitagawa T.: *Correlation between time of partial hepatectomy after a single treatment with diethylnitrosamine and induction of adenosine triphosphatase-deficient islands in rat liver*. *Cancer. Res.* 40, 4261-4264, 1980.
30. Kajstura J., Leri A., Finato N., Di Loreto C., Feltrami C.A., Anversa P.: *Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 8801-8805, 1998.
31. Klein I., Ojamaa K.: *Thyroid hormone and the cardiovascular system*. *N. Engl. J. Med* 344, 501-509, 2001.
32. Lazar M.A.: *Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities*. *Endocr. Rev.* 14, 184-193, 1993.
33. Ledda-Columbano G.M., Curto M., Piga R., Zedda A.I., Menegazzi M., Sartori C., Shinozuka H., Bluethmann H., Poli V., Ciliberto G., Columbano A.: *In vivo hepatocyte proliferation is inducible through a TNF and IL-6-independent pathway*. *Oncogene* 17, 1039-1044, 1998.

34. Ledda-Columbano G.M., Perra A., Pibiri M., Molotzu F., Columbano A.: *Induction of acinar cell proliferation by thyroid hormone*. J. Endocrinol. 185, 393-399, 2005.
35. Ledda-Columbano G.M., Molotzu F., Pibiri M., Cossu C., Perra A., Columbano A.: *Thyroid hormone induces cyclin D1 nuclear translocation and DNA synthesis in adult rat cardiomyocytes*. FASEB J. 1, 87-94, 2006.
36. Ledda-Columbano G.M., Perra A., Loi R., Dore M., Shinozuka H., Columbano A.: *Cell proliferation induced by triiodothyronine in rat liver is associated with nodule regression and reduction of hepatocellular carcinomas*. Cancer. Res. 60, 603-609, 2000.
37. Levy D.E., Lee C.K.: *What does Stat3 do?* J. Clin. Invest. 109, 1143-1148, 2002.
38. Liu H., Jones B.E., Bradham C., Czaja M.J.: *Increased cytochrome P-450 2E1 expression sensitises hepatocytes to c-jun mediated cell death from TNF-alpha*. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 282, 257-266, 2002.
39. Lortet S., Zimmer H.G., Rossi A.: *Inotropic response of the rat heart during development and regression of T3-induced hypertrophy*. J. Cardiovasc. Pharmacol. 14, 707-712, 1989
40. Mangelsdorf D.J., Umesono K., Evans R.M.: *The Retinoids: biology, chemistry and medicine. In The retinoid receptors*. Raven Press, New York, 319-349, 1984.
41. Menegazzi M., Carcereri A., Suzuki H., Shinozuka H., Pibiri M., Piga R., Columbano A., Ledda-Columbano G.M.: *Liver cell proliferation induced by nafenopin and cyproterone acetate is not associated with increases in activation of transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1 or expression of tumor necrosis factor- $\alpha$* . Hepatology 25, 585-592, 1997.
42. Michalopoulos G.K., DeFrances M.C.: *Liver regeneration*. Science 276, 60-66, 1997.
43. Morgan, D.O.: *Cyclin dependent kinase: engines, clocks, and microprocessors*. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 13, 261-291, 1997.
44. Nakatani Y., Kaneto H., Kawamori D., Hatazaki M., Miyatsuka T., Matsuoka T.A., Kajimoto Y., Matsuhisa M., Yamasaki Y., Mori M.: *Modulation of the JNK pathway in liver affects insulin resistance status*. J. Biol. Chem. 279, 45803-45809, 2004.
45. Newberne P.M.: *Lipotropic factors and oncogenesis*. Adv. Exp. Med. 206, 223-251, 1986.
46. Oppenheimer J.H., Schwartz H.L., Strait K.A.: *The Thyroid: a Fundamental and Clinical Text. In The molecular basis of thyroid hormone action*. Lippincott-Raven, New York, 1996.
47. Pap A., Boros L., Hajnal F.: *Essential role of colecystokinin in pancreatic regeneration after 60% distal resection in rats*. Pancreas 6, 412-418, 1991.
48. Perra A., Simbula G., Simbula M., Pibiri M., Kowalik M.A., Sulas P., Cocco M.T., Ledda-Columbano G.M., Columbano A.: *Thyroid hormone (T3) and TR-beta agonist GC-1 inhibit/reverse nonalcoholic fatty liver in rats*. FASEB J. Apr 23. [Epub ahead of print], 2008.
49. Pibiri M., Ledda-Columbano G.M., Cossu C., Simbula G., Menegazzi M., Shinozuka H., Columbano A.: *Cyclin D1 is an early target in hepatocyte proliferation induced by thyroid hormone (T3)*. FASEB J. 15, 1006-1013, 2001.
50. Pines J.: *Cyclins and cyclin dependent kinases: a biochemical view*. Biochem. J. 308, 697-711, 1995.
51. Pound A.W., McGuire L.J.: *Repeated partial hepatectomies as a promoting stimulus for carcinogenic response of liver to nitrosamines in rats*. Br. J. Cancer. 37, 585-594, 1978.

52. Reddy J.K., Rao M.S.: *Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty acid disease and fatty acid oxidation*. Am. J. Pathol. 290, 852-858, 2006.
53. Rotstein J., Sarma D.S.R., Farber E.: *Sequential alterations in growth control and cell dynamics of rat hepatocytes in early precancerous steps in hepatocarcinogenesis*. Cancer. Res. 46, 2377-2385, 1986.
54. Schwartz H.L., Strait K.A., Ling N.C., Oppenheimer J.H.: *Quantitation of rat tissue thyroid hormone binding receptor isoforms by immunoprecipitation of nuclear triiodothyronine binding capacity*. J. Biol. Chem. 267, 11794-11799, 1992.
55. Sherr C.J.: *Cancer cell cycles*. Science 274, 1672-1677, 1996.
56. Shinozuka H., Katyal S.L.: *Pathology of choline deficiency*. Marcel Dekker, New York 1985.
57. Slater S.D., Williamson R.C., Foster C.S.: *Proliferation of parenchymal epithelial cells is enhanced in chronic pancreatitis*. J. Pathol. 186, 104-108, 1998.
58. Soonpaa M.H., Field L.J.: *Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis*. Circ. Res. 83, 15-26, 1998.
59. Tamamori M., Ito H., Hiroe M., Terada Y., Marumo F., Ikeda M.A.: *Essential roles for G1 cyclin-dependent kinase activity in development of cardiomyocytes hypertrophy*. Am. J. Physiol. 275, 2036-2040, 1998.
60. Tamamori-Adachi M., Ito H., Sumrejkanchanakij P., Adachi S., Hiroe M., Shimizu M., Kawuachi J., Sunamori M., Marmo F., Kitajima S., Ikeda M.A.: *Critical role of cyclin D1 nuclear import in cardiomyocyte proliferation*. Circ. Res. 92, 12-19, 2003.
61. Taub R.: *Transcriptional control of liver regeneration*. FASEB J. 10, 413-427, 1996.
62. Trost S.U., Swanson E., Gloss B., Wang-Iverson D.B., Zhang H., Volodarsky T., Grover G.J., Baxter J.D., Chiellini G., Scanlan T.S., Dillmann W.H.: *The thyroid hormone receptor  $\beta$ -selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity*. Endocrinology 141, 3057-3064, 2000.
63. Weltman M.D. Farrell G.C., Hall P., Ingelman-Sundberg M., Liddle C.: *Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology 27, 128-133, 1998.
64. Yamada Y., Kirillova I., Peschon J.J., Fausto N.: *Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor*. Proc. Natl. Acad. Sci. 94, 1441-1446, 1997.
65. Yen P.M.: *Physiological and molecular basis of thyroid hormone action*. Physiol. Rev. 81, 1097-1142, 2001.
66. Yu J., Ip E., Dela Pena A., Hou J.Y., Sessa J., Pera N., Hall N., Kirsch R., Leclercq I., Farrell G.C.: *COX-2 induction in mice with experimental nutritional steatohepatitis: role as pro-inflammatory mediator*. Hepatology 43, 826-836, 2006.
67. Zafrani E.S.: *Non-alcoholic fatty liver disease: an emerging pathological spectrum*. Virchows Arch. 444, 3-12, 2004.
68. Zerban H., Radig S., Kopp-Schneider A., Bannasch P.: *Cell proliferation and cell death (apoptosis) in hepatic preneoplasia and neoplasia are closely related to phenotypic cellular diversity and instability*. Carcinogenesis 15, 2467-2473, 1994.

## ALLERGENI NEGLI ALIMENTI PRIMARI E TRASFORMATI

*F. Valfrè, V. Moretti, M.A. Paleari, F. Bellagamba*

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare  
Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Milano

Key words:     *Allergy*  
                  *Allergens*  
                  *Food*  
                  *Databases*  
                  *Immunoassay*

### **Abstract:**

The significant increase of human allergy from food has required, by European Countries, a mandatory declaration (Commission Directive 2006/13/EC) of allergenic food which includes the major allergenic ingredients from plant and of animal origin. Among allergens with plant origin, peanuts, nuts (hazelnut, walnut, almond), soybean, celery, sesame seed, and mustard, are the main responsible of allergic human syndrome. In addition, wheat, together with apple, strawberry, aubergine and onion have to be mentioned as ingredients with high allergenicity. Moreover, colourings, such as tartrazine, sulphites, sulphuric anhydride, and metals like copper, nickel, chrome, have to be remind and considered. Concerning allergens of animal origin the most important to be mentioned are: cow's milk, because of caseins and beta-lactoglobulin, egg, fish, crustaceans, molluscs, and derived products. In human's milk,  $\alpha$ -s2 casein and  $\beta$ -lactoglobulin, are not present. These protein fractions characterize cow's milk, and their high allergenicity is the main responsible of allergy in young population. Finally, the allergenic risk of products produced by biotechnology (es.: GMO) has to be seriously considered.

Moreover, foods produced with several ingredients, including preservatives and colouring matter, combine together different allergenic proteins that heating and processing technology result not able to decrease, but sometimes a synergic effect among them have been demonstrated.

Different allergenic protein fractions are mentioned and analytical methods for their detection are here described.

### **Riassunto:**

Il costante aumento delle malattie allergiche di origine alimentare nell'uomo ha indotto L'UE ad emanare un provvedimento che obbliga a

dichiarare chiaramente in etichetta dei vari prodotti alimentari trasformati posti in commercio la presenza di fattori di origine vegetale e/o animali capaci di scatenare le sindromi allergiche in soggetti sensibili. Tra i prodotti vegetali spiccano soia, arachide, sedano, senape, lupino, frutta a guscio, e i rispettivi derivati, ma anche mele, melanzane, cipolle, fragole grano e derivati cui sono da aggiungere coloranti a larga diffusione come tartrazina, ed anche anidride solforosa, solfiti, bisolfiti, alcuni metalli come cromo, rame, nickel. Nel campo animale sono da ricordare il latte bovino per le caseine e la beta-lattoglobulina, le uova, pesci, molluschi, crostacei e prodotti derivati. Il latte umano è privo della caseina  $\alpha$ -s<sub>2</sub>, e della  $\beta$ -lattoglobulina presenti invece in quello di vacca e fortemente allergeniche. Diventa importante anche menzionare la valutazione del rischio allergico di quegli ingredienti o alimenti ottenuti attraverso l'impiego di biotecnologie (OGM).

Inoltre, in alcuni alimenti pronti aventi più ingredienti, conservanti, coloranti, con frazioni proteiche allergeniche non sempre attenuate nei loro effetti da cottura o altri processi di conservazione, vi possono essere sinergie negli effetti clinici non sempre facilmente identificabili.

Sono identificate le frazioni allergeniche dei vari alimenti ed indicate le metodiche analitiche utili a supporto delle diagnosi cliniche.

## **Introduzione**

Le allergie alimentari propriamente dette, cioè quelle che avvengono a seguito di una risposta immunitaria indotta da proteine presenti negli alimenti, costituiscono un importante problema per la salute della popolazione soprattutto nei Paesi più industrializzati<sup>(1)</sup>. L'incidenza delle allergie alimentari è significativamente maggiore nei bambini, con un ordine di grandezza che supera il 6% della popolazione infantile, valore che si dimezza per la popolazione adulta<sup>(14)</sup>, e con un trend destinato ad aumentare.

I problemi legati alla prevenzione, al controllo e alla cura di queste patologie sono complessi e articolati in diversi settori della ricerca scientifica che vanno dalle numerose discipline e specializzazioni della medicina, nonché delle moderne biotecnologie vegetali e animali (creazione di organismi geneticamente modificati che non esprimono alcune proteine), alla trasformazione alimentare (adozione di procedure di trasformazione rivolte ad attenuare e/o eliminare le proteine allergeniche in alcune preparazioni alimentari).

Anche dal punto di vista legislativo, in Europa, così come in tutti i Paesi industrializzati, sono stati adottati una serie di provvedimenti<sup>(7)</sup> per l'etichettatura degli alimenti allo scopo di informare e quindi tutelare il consumatore relativamente alla presenza di alcune proteine o ingredienti con proprietà allergeniche.

L'adozione di queste misure precauzionali dettate dal fatto che le patologie legate alle allergie alimentari possono, in alcuni soggetti a rischio, causare conseguenze per la salute anche molto gravi, ha provocato non pochi problemi, che riguardano diversi aspetti. Da un lato, ci sono gli operatori dell'industria alimentare che comunque devono informare il consumatore secondo la normativa vigente nei vari Paesi, e che spesso non sono in grado di "garantire" l'assenza, cioè il livello zero, di alcuni ingredienti per la mancanza di linee di produzione separate, diversificate e dedicate. Dall'altro, ci sono gli organismi di controllo, che comunque devono essere in grado di avere a disposizione metodologie che possano identificare la presenza di proteine allergeniche nelle più svariate preparazioni alimentari.

Diversi studi epidemiologici hanno evidenziato che le allergie alimentari sono strettamente legate alle abitudini alimentari di una certa popolazione. Esempi in questo senso sono la diffusione dell'allergia alle arachidi nei paesi anglosassoni, dovuta soprattutto al consumo di burro di arachidi; quella alle proteine di alcuni pesci nei paesi scandinavi e quella per i molluschi e crostacei dei paesi mediterranei.

Sebbene più di seimila molecole, naturalmente presenti negli alimenti, possono essere causa di reazioni allergiche di varia natura e gravità in soggetti



predisposti ed a particolari condizioni (Tabella I), è stato ritenuto che per il 90% le allergie alimentari vengano di fatto scatenate da un numero ben più contenuto di alimenti: latte vaccino, uova, crostacei, arachidi, soia, frutta con guscio, cereali. Questi sono anche gli alimenti per cui, unitamente ad alcune specie ittiche (merluzzo) e molluschi, nonché al sedano, la legislazione già vigente in Europa obbliga la dichiarazione in etichetta. Benché il numero degli alimenti da dichiarare appaia relativamente contenuto, è tuttavia possibile trovare questi stessi alimenti in un numero molto più ampio di preparazioni alimentari (Tabella II e III). Se pensiamo per esempio alle proteine della soia o a quelle del latte, diventa subito un problema complesso stabilire quali prodotti alimentari trasformati, da un soggetto allergico a questi alimenti possano essere consumati in assenza di rischio. Questi costituiscono i cosiddetti “hidden allergens”, cioè quegli “allergeni nascosti”, che sono anche i più subdoli e difficili da individuare anche dal punto di vista analitico, perché nascosti in matrici complesse difficili da sospettare e da analizzare.

Relativamente alle allergie alimentari, la preparazione e trasformazione di un alimento diventa un processo cruciale, che in molti casi può avere un effetto migliorativo inibendo l’attività allergizzante della proteina, ma che in altri casi può avere invece un effetto peggiorativo (Tabella IV). Per quanto riguarda le proteine di origine animale, soprattutto per quelle del latte e delle uova, il trattamento termico non riduce significativamente il loro potere allergizzante, quindi possono essere spesso presenti in molte preparazioni alimentari, termicamente trattate, come allergeni nascosti. Anche alcuni processi biochimici che avvengono durante la trasformazione di alcuni prodotti, per esempio la fermentazione nei lattici e nei formaggi o in alcuni salumi e/o insaccati possono migliorare il prodotto, riducendo l’attività antigenica di alcune proteine presenti<sup>(3)</sup>. Le proteine del pesce sono invece risultate più resistenti; per contro il confezionamento in scatola del tonno e del salmone sembra abbassare il potere allergenico di queste specie ittiche<sup>(2)</sup>. Nelle preparazioni a base di pesce, ad esempio, il *surimi* ha dimostrato minore allergenicità.

Le proteine con potere allergizzante della carne e dei prodotti derivati, sono poco stabili al calore e ancora meno all’attività idrolitica di alcuni enzimi. Gli allergeni della carne non sono in genere nascosti nelle matrici alimentari, tuttavia le gelatine in quanto prodotti derivati della carne sono considerati pericolosi allergeni nascosti.

Per quanto riguarda gli allergeni appartenenti al mondo vegetale, la frutta a guscio è quella che più crea problemi, anche in relazione alla buona resistenza dei suoi allergeni al calore; analogamente la soia, i cereali e il sedano hanno

Alimenti	Sintomatologia
Uovo, arachidi, noci, nocciole, pesce, crostacei, latte vaccino	Generano reazioni allergiche immediate quali orticaria, anafilassi, ed asma nei bambini
Cioccolato, fragole, ananas e frutti esotici, crostacei, albume d'uovo, formaggi fermentati, cavoli, alcool	Provocano liberazione di istamina e inducono la comparsa di orticaria
Tonno, sarde, aringhe, sgombri, formaggi fermentati, salsicce, salame, coppa, pancetta affumicata, pomodori, spinaci, crauti, alcuni vini, birra	Contengono notevole quantità di istamina e possono di conseguenza favorire l'insorgenza di orticaria
Frutta secca, frutti di bosco, arance, albicocche, ananas, uva, cetrioli, indivia, olive, miele, erbe aromatiche, salsa di pomodoro, tè, vini liquori	Tutti con elevato contenuto di salicilati naturali sono la causa di orticaria cronica
Succhi di frutta, bevande colorate, sottoaceti, salse confezionate, maionese, senape, preparati per torte, minestre in scatola, budini istantanei, cioccolatini ripieni, caramelle, lecca-lecca, gelatine, gelati, marmellate	Possono favorire l'insorgenza di orticaria cronica e asma
Insalate e macedonie, cipolline, sottaceto, frutta secca, succhi di frutta, marmellate a base di frutta, baccalà, vini	Possono favorire l'insorgenza di orticaria cronica e asma
Alimenti preconfezionati che contengono solfiti, bisolfiti in cui vengono aggiunti come conservanti/antiossidanti (E221, E222, E223, E224, E225, E226, E227)	Aggravano la sintomatologia asmatica di alcuni soggetti
Formaggi, cioccolato, agrumi, nitrati presenti come conservanti in alcuni insaccati e carni in scatola	Per il loro contenuto di istamina o amine pressorie in soggetti sensibili possono scatenare cefalee anche a distanza di ore dall'ingestione

*Tabella I. Manifestazioni allergiche da singoli alimenti.*

<b>Alimento</b>	<b>Possibili ingredienti allergenici</b>
Salame	Polvere di latte Lattosio
Mortadella	Frutta a guscio (pistacchio) Latte in polvere Caseinati Sieroproteine Proteine della soia Maltodestrine
Prosciutto Cotto	Latte in polvere Caseinati Sieroproteine Proteine della soia Maltodestrine
Prodotti ittici	Crostacei Molluschi
Gelati	Uova Latte e derivati Frutta a guscio

*Tabella II. Alimenti di origine animale nei quali possono essere presenti ingredienti con proprietà allergeniche.*

una buona stabilità per i rispettivi allergeni al trattamento termico, così come a quello enzimatico. Gli oli non raffinati e ottenuti da spremitura a freddo possono contenere proteine allergeniche.

Accanto alle più conosciute proteine allergeniche, merita sicuramente anche una riflessione la valutazione del rischio allergico di quegli ingredienti o alimenti ottenuti attraverso l'impiego di biotecnologie. Le strategie adottate per la valutazione del rischio per il cosiddetto "novel food" hanno portato a stabilire (es.: Fao/WHO 2001 Decision Tree) una serie di procedure che hanno come punto di partenza la valutazione dell'omologia a livello molecolare tra la sequenza primaria della "nuova" proteina espressa e quella degli allergeni

conosciuti, le cui strutture molecolari sono già depositate in numerose banche dati ufficiali e di pubblico dominio (es. [www.allergome.org](http://www.allergome.org))<sup>(12)</sup>. La valutazione della sequenza primaria rappresenta tuttavia un approccio non sufficiente ed esaustivo, in quanto non tiene in considerazione quegli epitopi conformazionali, composti da pochi aminoacidi, che sono comunque parte integrante della proteina se studiata nella sua struttura terziaria e che possono rappresentare importanti siti di legame per le IgE e IgG. La perdita della struttura conformazionale originale della proteina diventa perciò una valutazione fondamentale da tener presente per la corretta valutazione delle potenzialità allergeniche relative alla stessa proteina. In una fase successiva, diventa fondamentale nella procedura di valutazione del rischio allestire test immunologici per verificare la cross reattività tra immunoglobuline di classe E, prodotte dopo sensibilizzazione con allergeni noti, e le proteine ottenute da organismi geneticamente modificati; quindi studi *in vitro* e *in vivo* per valutare la digeribilità gastrica e intestinale.

<b>Esempi di alimenti che possono contenere proteine di soia</b>
Prodotti da forno
Cereali
Margarine, olio
Carne in scatola, tonno in scatola, zuppe in scatola
Formaggio
Cioccolata
Dolciumi
Hamburger, Hot dog
Gelati
Tofu
Salse
Salumi
Muesli
Condimenti per insalate
Pasta

*Tabella III. Alimenti che possono contenere proteine della soia.*

Allergeni	Trattamento termico	Idrolisi enzimatica	Importanza come allergeni nascosti
Latte e derivati	stabile	parzialmente stabile	Elevata
Uova e derivati	stabile	stabile	Elevata
Pesce e derivati	stabile	parzialmente stabile	Bassa
Crostacei e derivati	stabile	non conosciuta	Bassa
Carne e derivati	parzialmente stabile	labile	Bassa

Tabella IV. Stabilità degli allergeni di origine animale e loro presenza come allergeni nascosti (da M. Besler et al. , 2001).

## ETICHETTATURA E INFORMAZIONI AL CONSUMATORE

Con la Direttiva 2003/89/EC, recepita in Italia con il DL.vo 114/2006<sup>(8)</sup>, è stata introdotta l'obbligatorietà di indicare in etichetta – qualora presenti in un prodotto alimentare tra gli ingredienti, ma anche come derivati – una serie di sostanze considerate allergeniche.

Il DL.vo 114/2006, modifica così il DL.vo 109/92, che rappresenta la normativa di riferimento sull'etichettatura dei prodotti alimentari destinati al consumatore, venduti sia sfusi che confezionati. In base all'allegato I, sezione III, del predetto Decreto, devono figurare in etichetta i seguenti alimenti:

- ✓ Cereali contenenti glutine (grano, orzo, segale, avena, farro, kamut o i loro ceppi ibridati) e prodotti derivati
- ✓ Crostacei e prodotti derivati
- ✓ Uova e prodotti derivati
- ✓ Pesce e prodotti derivati
- ✓ Molluschi (recente introduzione)
- ✓ Arachidi e prodotti derivati
- ✓ Soia e prodotti derivati

- ✓ Lupino (recente introduzione)
- ✓ Latte e prodotti derivati (compreso lattosio)
- ✓ Frutta a guscio cioè mandorle (*Amigdalus communis L.*), nocciole (*Corylus avellana*), noci comuni (*Juglans regia*), noci di acagiù (anacardo, *Anacardum occidentale*), noci pecan (*Carya illinoiesis (Wangenh) K. Koch*), noci del Brasile (*Bertholletia excelsa*), pistacchi (*Pistacia, vera*), noci del Queensland (*Macadamia ternifolia*) e prodotti derivati
- ✓ Sedano e prodotti derivati
- ✓ Senape e prodotti derivati
- ✓ Semi di sesamo e prodotti derivati
- ✓ Anidride solforosa e solfiti in concentrazioni superiori a 10mg/Kg o 10 mg/l espressi come SO<sub>2</sub>

La complessità riguardante la scelta di quali alimenti introdurre nella lista, ha fatto sì che questa stessa lista venga sottoposta a revisioni periodiche, con eventuali integrazioni, senza escludere la possibilità di eliminare dall'elenco quegli alimenti per i quali il parere scientifico di un'apposita Authority, ne riconosca un significato trascurabile come elementi allergizzanti. Verosimilmente, si ritiene che la lista degli ingredienti da dichiarare in etichetta sia destinata a future estensioni, e ciò almeno finché non verrà stabilito una soglia quantitativa accettabile, almeno per alcuni tra questi ingredienti.

Il campo di applicazione riguarda solo gli ingredienti e le sostanze volontariamente messe in opera, salvo i solfiti per i quali si fa riferimento alla concentrazione nel prodotto finito.

La presenza involontaria degli allergeni è estranea al campo di applicazione. Pertanto è facoltà del produttore informare il consumatore della eventuale presenza involontaria di allergeni ricorrendo a diciture del tipo “Può contenere tracce di.....”; “Prodotto in uno stabilimento che lavora anche.....”.

La deroga di etichettatura dell'ingrediente composto, che consentiva di non indicare gli ingredienti dell'ingrediente composto rappresentante meno del 25% del prodotto finito, è stata soppressa e sostituita dalla deroga per gli ingredienti composti utilizzati in quantità inferiori al 2% e per i miscugli di piante aromatiche, erbe e spezie utilizzate per meno del 2%. Queste deroghe non valgono comunque per gli allergeni.

I coadiuvanti tecnologici, i *carry-over*, i supporti di additivi ed aromi sono ancora considerati esenti da indicazione in etichetta, ma se contengono un allergene, questo va menzionato: per esempio, il lattosio utilizzato come supporto di aromi e l'amido di frumento utilizzato come coadiuvante

tecnologico. Un'eccezione consentita, ma già oggetto di polemiche tra ricercatori e industria alimentare, riguarda la possibilità di non considerare come potenziali allergeni, quindi senza l'obbligo di essere menzionati in etichetta, alcune sostanze, come il maltosio e le maltodestrine, che pur provenienti da mais e frumento, si ottengono da processi tecnologici che riducono significativamente le potenzialità allergeniche.

Gli additivi più comunemente implicati nelle manifestazioni cliniche riferibili alla pseudoallergia sono, in ordine di frequenza decrescente, alla luce delle risultanze di test e di indicazioni cliniche, i salicilati, i solfiti, i nitrati, la tartrazina, i benzoati; questi additivi vanno già indicati in etichetta in ottemperanza al DM 209/96<sup>(9)</sup>.

Per quanto riguarda gli additivi derivati da alimenti con proprietà allergeniche, questi devono essere riportati in etichetta con il relativo riferimento, per esempio: emulsionante E 322 (da soia) o (da uova); conservante E1105 da uova; conservante lisozima da uova.

In tabella II e III sono riportati gli alimenti di origine animale che possono contenere tra gli ingredienti diversi allergeni. Tra i prodotti di origine vegetale spiccano la soia e la frutta a guscio; fra quelli di origine animale i derivati del latte e delle uova, i crostacei e i molluschi. Accanto a questi meritano anche di essere ricordati l'anidride solforosa (conservante per vini e succhi di frutta, frutta secca, marmellate), alcuni metalli (cromo, rame, nichel), solfiti, bisolfiti. Così alcuni coloranti come tartrazina, (E 102 - colore giallo), che hanno larga diffusione in bevande colorate, maionese, preparati per torte, budini istantanei, gelati, marmellate.

Anche residui eventuali di penicilline in latti e carni hanno rappresentato nel passato un certo rischio, ora cessato.

## **METODICHE ANALITICHE PER L'IDENTIFICAZIONI DEGLI ALLERGENI NELLE DIVERSE MATRICI ALIMENTARI**

L'identificazione degli allergeni risulta spesso molto complessa perché sono presenti in un alimento in tracce o sono mascherati dalla matrice<sup>(10,11,15)</sup>. Il livello di sensibilità richiesto varia da 1 a 100 ppm. Tutti gli allergeni sono proteine o glicoproteine, il cui peso molecolare è variabile da 5-70 kDa (polipeptidi) a 200 kDa (oligomeri) (Tabella V e Tabella VI)<sup>(4,5)</sup>.

Le metodiche analitiche per la ricerca di allergeni negli alimenti si basano essenzialmente su metodi immunologici e, di introduzione più recente, quelli di biologia molecolare e l'impiego di biosensori<sup>(11,15)</sup>. Le tecniche si basano sul riconoscimento della proteina o di un marker che indica

<b>Alimento</b>	<b>Allergene</b>
Nocciole ( <i>Corylus avellana</i> )	proteine specifiche (Cor a 1, Cor a 2, Cor a 8)
Arachidi ( <i>Arachis hypogea</i> )	proteine specifiche (Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3)
Soia ( <i>Glycine max</i> )	inibitore della tripsina proteine specifiche (Gly m 1, Gly m 2, Gly m 3, Gly m 4)
Frumento ( <i>Triticum aestivum</i> )	gliadina, agglutinina, omega-5 (Tri a 18, Tri a 19)
Orzo ( <i>Hordeum vulgare</i> )	alfa-amilasi, beta-amilasi, (Hor v 16, Hor v 17), gliadina (Hor v 21)
Segale ( <i>Secale cereale</i> )	secalina (Sec c 20)

Tabella V. Alimenti di origine vegetale e allergeni specifici in essi contenuti.

la presenza dell'allergene, sono quindi tecniche immunologiche: RAST (radio-allergosorbent test), EAST (enzyme allergosorbent test), RIE (rocket immuno-electrophoresis), Dipstick, ELISA. I metodi RAST, EAST, ELISA sono considerati metodi quantitativi o semi-quantitativi. Parallelamente ai metodi immunologici e immunoenzimatici, sono stati sviluppati anche metodi di biologia molecolare, che si basano sulla PCR. Anche per queste metodiche è possibile approssicare un sistema di quantificazione, con l'impiego della RealTime-PCR.

I metodi immunologici e quelli di biologia molecolare si basano su principi diversi, per il fatto che l'analita target nel primo caso è sempre rappresentato dalla proteina allergenica, mentre nel secondo la ricerca evidenzia la presenza di un DNA specifico. L'approccio analitico diventa quindi importante e la matrice da analizzare deve orientare circa la scelta per la ricerca della proteina specifica, reale responsabile della reazione allergica, piuttosto che del DNA di un ingrediente responsabile di allergia. Per i prodotti che contengono uova o latte e i prodotti da essi derivati i metodi immunologici hanno dimostrato una migliore sensibilità, poiché in questo caso la presenza del DNA specifico



è quasi assente. Al contrario, i metodi che si basano sul DNA sono più idonei nella ricerca di quegli alimenti (per esempio: il sedano, la senape) il cui contenuto di proteina è decisamente basso.

I kits ELISA disponibili in commercio per la ricerca dei diversi allergeni negli alimenti sono molteplici. La validazione di questi test ha comportato l'organizzazione di studi comparativi – *interlaboratory studies* – i cui risultati sono stati ampiamente discussi e commentati in letteratura<sup>(11,15)</sup>. La finalità di riuscire a trovare protocolli comuni e materiali ufficiali di riferimento ha coinvolto numerosi gruppi di lavoro a livello internazionale, quali la FDA; la Food Product Association; Health Canada, l'European Commission's Institute for reference Materials and Measurements (EC-JRC-IRMM).

La corretta e sicura identificazione degli allergeni all'interno di una matrice ha perciò una priorità assoluta nella salvaguardia del paziente allergico. Si dibatte molto anche sul fatto di poter o meno arrivare ad una corretta quantificazione degli allergeni negli alimenti, ma in questo caso i dati clinici a disposizione non sono considerati sufficienti per assumersi la

Alimento	Allergene
Latte ( <i>Bos domesticus</i> )	alfa-lattalbumina, beta-lattoglobulina, sieralbumina, immunoglobuline, caseina (Bos d 4, Bos d 5, Bos d 6, Bos d 7, Bos d 8)
Uovo ( <i>Gallus domesticus</i> )	ovomucina, ovoalbumina, conalbumina, lisozima, sieralbumina (Gal d 1, Gal d 2, Gal d 3, Gal d 4, Gal d 5)
Gamberetti ( <i>Metapenaeus ensis</i> , <i>Penaeus aztecus</i> , <i>Penaeus indicus</i> , <i>Penaeus monodon</i> )	tropomiosine (Met e 1, Pen a 1, Pen i 1, Pen m 1, Pen m 2)
Merluzzo ( <i>Gadus callarias</i> )	allergene M (Gad c 1)
Salmone ( <i>Salmo salar</i> )	parvalbumina (Sal s 1)
Seppia ( <i>Todarodes pacificus</i> )	tropomiosina (Tod p 1)
Abalone ( <i>Haliotis midae</i> )	tropomiosina (Hal m 1)

Tabella VI. Alimenti di origine animale e allergeni specifici in essi contenuti.

responsabilità di stabilire un livello massimo per il quale l'alimento possa essere considerato privo di rischio. Tanto più che la risposta del singolo paziente allergico può essere condizionata da molteplici fattori di carattere individuale (stato di salute, effetti associativi con altri alimenti ingeriti, stagionalità).

La corretta identificazione della proteina allergenica può essere raggiunta solo attraverso l'impiego di nuove metodologie (per esempio: LC-MS/MS), in grado di identificare la proteina target e gli eventuali peptidi che si formano a seguito della trasformazione tecnologica del prodotto, raggiungendo livelli di sensibilità superiori rispetto agli altri sistemi precedentemente descritti. La cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa ha già avuto applicazioni recenti nell'identificazione degli allergeni del latte e delle arachidi<sup>(13,16)</sup>.

## **CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE**

Le allergopatie in generale non sono mai di facile diagnosi per il medico ed il problema può complicarsi quando ci si trovi di fronte a fatti acuti ed iperacuti per i quali i tempi di intervento possono essere brevi e quindi risultano difficili sia l'acquisizione di una corretta anamnesi che l'impiego di sistemi diagnostici differenziali appropriati quando sia stato emesso un giusto sospetto.

È per queste ragioni e perché sono in costante aumento le allergopatie di origine alimentare nell'uomo che l'UE ha codificato e per alimenti in vendita costituiti da più ingredienti od eventualmente aggiunti di conservanti, coloranti, additivi ecc., l'obbligo di dichiarare in etichetta quei componenti che sono ritenuti essere i più attivi nell'indurre la comparsa, in soggetti umani sensibili, di allergie alimentari di varia gravità.

In genere, si occupa dell'approvvigionamento familiare una persona adulta, che in buona misura sa se lui od altri della famiglia sono allergici a particolari componenti alimentari e, leggendo le etichette dei prodotti che sceglie, sa se può acquistarli o meno. Sono però possibile fonte di rischio tutta la serie degli snack, dei gelati e di taluni soft-drink acquisibili direttamente anche da distributori automatici da parte di giovani e giovanissimi, tutti prodotti che possono avere al loro interno coloranti come la tartrazina, conservanti come anidride solforosa, solfiti, bisolfiti; si pensi a certi soft-drink, alla frutta secca, o ai conservanti presenti negli involucri di certi prodotti da forno, per cui i rischi aumentano e proprio nella fascia di popolazione dei giovani, dove è più alta la percentuale (più dell' 6%) di soggetti sensibili.

Tutto ciò fa sì che, in mancanza totale o in carenza di una informazione capillare e diretta, sia assolutamente necessaria una specifica attività di medicina preventiva rivolta in primis ai medici di medicina generale ed in concomitanza con la formazione scolastica ove talvolta dietisti e dietologici si dilungano a proporre diete e dimenticano di segnalare i rischi più sopra descritti. Riteniamo inoltre che debbano essere coinvolte anche le normali catene distributive sia tradizionali che le GDO nelle varie tipologie quali hard-discount, discount, super- ed iper mercati. D'altro canto il monitoraggio pubblico delle dinamiche delle casistiche cliniche delle forme allergiche di origine alimentare, potrebbe dare utili indicazioni per mantenere oppure cancellare dall'uso tecnologico coloranti, conservanti, additivi vari qualora si avessero conferme certe dei loro effetti secondari. Riteniamo altresì che sarebbe necessario correlare tali situazioni con l'uso di taluni vaccini ancora prodotti su embrioni di pollo, o ancora con la serie di additivi e/o conservati che entrano nella preparazione degli stessi vaccini o di taluni farmaci.

#### RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Aalberse R.C.: *Food allergens*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 4, 55-60, 1997.
2. Bernhisel-Broadbent J., Strause D., Sampson H.A.: *Fish Hypersensitivity, II: clinical relevance of altered fish allergenicity cause by various preparation methods*. J. Allergy Clin. Immunol., 90, 622-627, 1992.
3. Besler M., Steinhart H., Pashcke A.: *Stability of food allergens and allergenicity of processed foods*. J. Chromatogr. B. 756, 207-228, 2001.
4. Breiteneder H., Radauer C.: *A classification of plant food allergens*. J. Allergy Clin. Immunol. 113, 821-830, 2004.
5. Brusica V., Millot M., Petrovsky N., Gendel S.M., Gigonzac O., Stelman S.J.: *Allergen databases*. Allergy 58, 1093-1100, 2003.
6. *Direttiva 2000/13/EC*. Official Journal of European Community L109, 29-42, 2000.

7. *Direttiva 2003/89/EC*. Official Journal of European Community L308, 15-18, 2003.
8. *Decreto Legislativo 8 febbraio 2006, n. 114, "Attuazione delle direttive 2003/89/CE, 2004/77/CE e 2005/63/CE in materia di indicazione degli ingredienti contenuti nei prodotti alimentari"*. Gazz. Uff. n. 69 del 23 marzo 2006.
9. *Decreto Ministeriale 27 febbraio 1996, n. 209, Regolamento concernente la disciplina degli additivi alimentari consentiti nella preparazione e per la conservazione delle sostanze alimentari in attuazione delle direttive n. 94/34/CE, n. 94/35/CE, n. 94/36/CE, n. 95/2/CE e 95/31/CE*. Suppl. ordinario n. 69, alla Gazz. Uff. n. 96, del 24 aprile 1996.
10. Natale M., Bisson C., Monti G., Peltran A., Perono Garoffo L., Valentini S., Fabris C., Bertino E., Coscia A., Conti A.: *Cow's milk allergens identification by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry*. Mol. Nutr. Food Res. 48, 363-369, 2004.
11. Poms E.R., Klein C.L., Anklan E.: *Methods for allergen analysis in food: a review*. Food Add. Cont. 21 (1) 1-31, 2004.
12. Poulsen L.K.: *Allergy assessment of food or ingredients derived from biotechnology, gene-modified organisms, or novel food*. Mol. Nutr. Food Res. 48, 413-423, 2004.
13. Shefcheck K.J., Callahan J.H., Musser S.M.: *Confirmation of peanut protein using peptide markers in dark chocolate using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)*. J. Agric. Food Chem. 56, 7953-7959, 2006.
14. Sicherer S.H., Sampson H.A.: *Food Allergy*. J. Allergy Clin. Immunol. 117, S470-475, 2006.
15. Van Hengel A.J.: *Food allergen detection methods and challenge to protect food-allergic consumers*. Anal. Bioanal Chem. 389, 111-118, 2007.
16. Weber D., Raymond P., Ben-Rejeb S., Lau B.: *Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method using capillary liquid chromatography and nanoelectrospray ionization-quadrupole time-of-flight hybrid mass spectrometer for the detection of milk allergens*. J. Agric. Food Chem. 54, 1604-1610, 2006.

## ALIMENTAZIONE COME CAUSA DI MALATTIA ALLERGIA ALIMENTARE

*G. Rolla, L. Bommarito, S. Mietta, R. Bergia*

Allergologia e Immunologia - Clinica dell'Università degli Studi di Torino  
A.O. Ordine Mauriziano - Torino

Key words: *Food allergy / Allergia alimentare*  
*Symptoms / Sintomatologia*  
*Diagnosis / Diagnostica*  
*Food challenge / Challenge alimentare*

### **Abstract:**

Food allergy is a common and increasing problem worldwide. The newly-found knowledge might provide novel experimental strategies, especially for laboratory diagnosis. Approximately 20% of the population alters their diet for a perceived adverse reaction to food, but the application of double-blind placebo-controlled oral food challenge, the “gold standard” for diagnosis of food allergy, shows that questionnaire-based studies overestimate the prevalence of food allergies. The clinical disorders determined by adverse reactions to food can be classified on the basis of immunologic or nonimmunologic mechanisms and the organ system or systems affected. Diagnosis of food allergy is based on clinical history, skin prick tests, and laboratory tests to detect serum-food specific IgE, elimination diets and challenges.

### **Riassunto:**

L'allergia alimentare è una malattia comune e in incremento in tutto il mondo. Le nuove scoperte potrebbero permettere l'identificazione di nuove strategie diagnostiche, soprattutto per quanto riguarda la diagnosi di laboratorio. Circa il 20% della popolazione modifica la propria dieta per una presunta reazione avversa ad alimenti, ma il test di scatenamento (o challenge) in doppio cieco, controllato con placebo, considerato come il “gold standard” per la diagnosi dell'allergia alimentare, mostra che studi basati solo su questionari sovrastimano la reale prevalenza delle allergie alimentari. I disturbi clinici determinati dalle reazioni avverse ad alimenti possono essere classificati in base ai meccanismi patogenetici (non

immunologici e immunologici, IgE- e/o non IgE- mediati), e a organi o apparati coinvolti. La diagnosi di allergia alimentare si basa sull'anamnesi, sugli skin prick test, sugli esami di laboratorio per la determinazione delle IgE sieriche specifiche per alimenti, sulle diete di eliminazione e sul challenge.

## INTRODUZIONE

Con il termine generico di “reazione avversa ad alimenti” si intende qualsiasi reazione clinica avvenuta dopo ingestione, contatto od inalazione di qualunque alimento, derivato od additivo alimentare. Sulla base dei meccanismi responsabili è possibile distinguere fra reazioni immunomediate (allergia alimentare) e non immunomediate (intolleranza alimentare). Il termine intolleranza alimentare è spesso utilizzato in maniera impropria, in quanto sono poche le intolleranze alimentari per le quali sia noto il meccanismo in grado di determinarle e in cui sia stato dimostrato un ruolo nel provocare alcuni sintomi (ad es. intolleranza al lattosio per deficit enzimatico, intolleranza farmacologica per ingestione di alimenti ricchi di istamina o tiramina, ecc.).

## EPIDEMIOLOGIA

L'allergia alimentare è una malattia comune in tutto il mondo e in costante aumento nelle ultime due decadi nei paesi industrializzati, così come le altre patologie su base allergica. Una percentuale variabile dal 5 al 25% degli adulti si considera allergico o pensa di avere avuto una reazione allergica dopo assunzione di alimenti<sup>(28,29)</sup>. Questi dati, ottenuti tramite questionari, sovrastimano la reale prevalenza dell'allergia alimentare; infatti studi scientifici validati indicano che le reazioni allergiche riguardano il 6-8% dei bambini nei primi 3 anni di vita<sup>(2)</sup>, percentuale che tende a ridursi dopo la prima decade<sup>(24,8)</sup>.

In particolare, le allergie a latte, uova, soia e frumento, le più frequenti durante la prima infanzia, tendono a regredire in età scolare (circa l'80% sviluppano tolleranza nei primi 5-10 anni di vita), mentre le allergie alle arachidi, alle nocciole e ai frutti di mare persistono anche in età adulta (ad es. l'allergia all'arachide regredisce solamente nel 20% dei bambini)<sup>(8,27)</sup>. Negli adulti, le cause più comuni di allergia alimentare sono, invece, i crostacei, le arachidi, le nocciole, il pesce e la pesca.

Bambini con storia di atopia (dermatite atopica, oculorinite e/o asma) sono più a rischio di sviluppare una reazione allergica ad alimenti rispetto ai non atopici; il 35% dei bambini con dermatite atopica moderata-severa presenta IgE specifiche verso allergeni alimentari<sup>(5)</sup> e circa il 6-8% dei bambini asmatici presenta broncospasmo indotto da alimenti<sup>(12)</sup>.

## ALLERGENI ALIMENTARI

La sensibilizzazione ad allergeni alimentari può avvenire nel tratto intestinale, come risultato di un'alterazione dei meccanismi di tolleranza nei

GRUPPO	ALLERGENI
<b>Superfamiglia delle cupine</b>	
Viciline	Ara h 1 (arachide), Jug r 2 (noce)
Legumine	Ara h 3-4 (arachide), Cor a 9 (nocciaola)
<b>Superfamiglia delle prolamine</b>	
2S albumine	Ber e 1 (noce brasiliana), Ses i 2 (sesamo)
Lipid transfer protein	Pru p 3 (pesca), Cor a 8 (nocciaola)
Inibitori dell'alfa-amilasi dei cereali	Inibitore dell'alfa-amilasi del riso
Prolamine dei cereali	Tri a 19 (grano), Sec c 20 (segale)
<b>Pathogenesis related protein</b>	
PR-2: endoglucanasi	Glucanasi di banana
PR-3: chitinasi di classe 1	Pers a 1 (avocado), Cas s 5 (castagna)
PR-4: win-like protein	Bra r 2 (rapa)
PR-5: thaumatin-like protein	Pru av 2 (ciliegia), Mal d 2 (mela)
PR-9: perossidasi	Tri a Bd 36 K (grano)
PR-10: PR intracellulari	Api g 1 (sedano), Mal d 1 (mela)
<b>Proteasi</b>	
Cisteino proteasi papaino-simili	Act c 1 (kiwi), Gly m Bd 30 K (soia)
Serin proteasi subtilisino-simili	Cuc m 1 (melone)
<b>Inibitori della proteasi</b>	
Inibitore della proteasi tipo Kunitz	Inibitore triptico della soia
<b>Proteine strutturali</b>	
Profiline	Api g 4 (sedano), Pru av 4 (ciliegia)
Oleosine	Oleosina di arachide
<b>Proteine di deposito (storage protein)</b>	
Patatina	Sol t 1 (patata)
<b>Enzimi</b>	
Riduttasi dell'etere benzilico di fenil cumarano	Pyr c 5 (pera)
Ciclofiline	Ciclofilina di carota
Beta-fruttofurinidasi	Lyc c 2 (pomodoro)
Ossidasi di flavin adenina dinucleotide-dipendente	Api g 5 (sedano)

*Tabella I. Principali famiglie di allergeni alimentari.*



confronti di alimenti ingeriti (considerata allergia tradizionale o di tipo 1), oppure può derivare da una sensibilizzazione nei confronti di allergeni inalanti che presentano analogie strutturali con proteine alimentari (reazione alimentare di tipo 2)<sup>(4)</sup>. I principali allergeni alimentari, identificati come allergeni di tipo 1, sono rappresentati da glicoproteine idrosolubili, con peso molecolare compreso tra 10 e 60 Kd, stabili al calore, all'acidità e alle proteasi<sup>(20)</sup>. Le principali proteine vegetali si suddividono in varie famiglie: cupine, prolamine e proteine di difesa delle piante. La superfamiglia delle cupine è rappresentata dalle proteine dei semi: 7S (viciline, come Ara h 1, Jug r 2, Ses i 3) e 11S (legumine, come Ara h 3, Cor a 9, e Ber e 2). La superfamiglia delle prolamine comprende proteine di deposito: 2S albumina (ad esempio Ara h 2, Jug r 1, Ber r 1 e Ses i 2), proteine di trasferimento lipidico (ad esempio Cor a 8, Mal d 3 e Pru av 3) e inibitori delle alfa-amilasi e proteasi dei cereali. Gli allergeni maggiori derivano prevalentemente dalle proteine del sistema di difesa delle piante, in particolare 14 tipi di "pathogenesis related protein", inibitori delle proteasi e proteasi. Le "pathogenesis related protein" sono prodotte dalle piante in risposta a diversi patogeni come virus, muffe, parassiti e stress ambientali e, conseguentemente, possono presentarsi in quantità variabile all'interno delle stesse specie di frutta o verdura. Le profiline, che svolgono il ruolo maggiore nella regolazione della polimerizzazione dei filamenti di actina e comprendono un'ampia gamma di allergeni di classe 2, sono altamente conservate nel regno vegetale e cross-reagiscono con gli allergeni pollinici (Tabella I)<sup>(3,4)</sup>. I pazienti sensibilizzati ai pollini spesso, per via della cross-reattività con le profiline della frutta o della verdura, manifestano sintomi faringei (mangiando frutta o verdura crudi) definiti con il termine di sindrome orale allergica o allergia pollini-alimenti. La maggior parte degli allergeni di classe 2 sono caratterizzati da epitopi conformazionali e pertanto altamente labili al calore, suscettibili alla degradazione enzimatica e spesso difficili da isolare, rendendo insoddisfacente la standardizzazione degli estratti a scopo diagnostico. La varietà di allergeni del regno animale è più ristretta, anche in senso di cross-reattività. Un alto numero di allergeni alimentari è stato identificato, clonato, sequenziato ed espresso come proteine ricombinanti, e tali informazioni sono consultabili ad esempio nel sito dell'International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Subcommittee's Web site (<http://www.allergen.org/>).

## **CLASSIFICAZIONI DELLE REAZIONI DA IPERSENSIBILITÀ**

L'allergia alimentare rappresenta una anormale risposta del sistema immunitario verso antigeni/allergeni assorbiti per via orale in individui

geneticamente predisposti attraverso un'alterazione della tolleranza orale<sup>(26)</sup>. Reazioni di tipo immediato sono caratterizzate dal contatto dell'allergene alimentare con anticorpi IgE che si legano a mastociti e basofili, provocandone l'attivazione e determinando il rilascio di mediatori e citochine. La Tabella II riassume i principali tipi di reazione ad alimenti (IgE-, celluloso-, IgE-cellulo-mediata).

<b>IgE-MEDIATI</b>	
Gastrointestinali	Sindrome orale allergica, anafilassi gastrointestinale
Cutanei	Orticaria, angioedema, rash morbilliformi e flushing
Respiratori	Rinocongiuntivite acuta, broncospasmo (sibilo)
Generalizzati	Shock anafilattico
<b>MISTO IgE-E CELLULO MEDIATI</b>	
Gastrointestinali	Esofagite eosinofila allergica, gastroenterite eosinofila allergica
Cutanei	Dermatite atopica
Respiratori	Asma
<b>CELLULO MEDIATI</b>	
Gastrointestinali	Enterocolite indotta da proteine alimentari, proctocolite indotta da proteine alimentari, sindrome enteropatica indotta da proteine animali, celiachia
Cutanei	Dermatite da contatto, dermatite herpetiforme
Respiratori	Emosiderosi polmonare indotta da alimenti (Sindrome di Heiner)

*Tabella II. Disordini da ipersensibilità alimentare.*

## SEGNI E SINTOMI DELL'ALLERGIA ALIMENTARE

Le reazioni allergiche agli alimenti possono manifestarsi con segni e sintomi caratteristici a carico del tratto gastrointestinale, della cute e delle alte e basse vie respiratorie e possono essere ricondotte a meccanismi patogenetici IgE-mediati e/o non IgE-mediati<sup>(18)</sup>.

I **sintomi gastrointestinali** possono includere prurito del cavo orale, edema di labbra e lingua, prurito e/o edema della glottide, nausea, dolori addominali crampiformi, vomito e diarrea. Il disturbo più comune è la **sindrome orale allergica** (sindrome polline-cibo), causata da una varietà di cross-reattività tra proteine vegetali e allergeni aerodispersi dei pollini, specialmente pollini di betulla e di ambrosia<sup>(3)</sup>. I pazienti allergici al polline di betulla possono manifestare sintomi in seguito all'ingestione di patate, carote, sedano, mele, pere, nocciole e kiwi crudi, mentre i pazienti con allergia per il polline di ambrosia possono reagire all'ingestione di melone e banane. Patologia meno comune, ma la cui prevalenza è tuttavia in aumento, è l'**esofagite allergica eosinofila** (AEE), una condizione caratterizzata da un infiltrato eosinofilo della parete esofagea, gastrica e/o intestinale che può essere legata a reazioni ad alimenti sia IgE- che non IgE-mediate<sup>(22,17)</sup>. Si presenta tipicamente con sintomi da reflusso gastro-esofageo, come nausea, disfagia, vomito e dolore epigastrico, resistenti alle terapie mediche anti-reflusso. La prognosi a lungo termine della AEE non è stata chiaramente delineata, ma vi è la possibilità che pazienti non correttamente trattati possano andare incontro allo sviluppo dell'esofago di Barrett.

I **sintomi cutanei** includono prurito generalizzato, manifestazioni eritematose morbilliformi o flushing, orticaria e angioedema. L'orticaria acuta e l'angioedema sono tra i sintomi più comuni delle reazioni allergiche ad alimenti, anche se non ne è nota l'esatta prevalenza; è anche molto comune l'orticaria acuta da contatto con cibi come carni, verdure e frutta. Le allergie alimentari giocano inoltre un ruolo patogenetico in circa il 35% dei bambini con dermatite atopica moderata-grave<sup>(23)</sup>. In uno studio condotto da Reekers et al<sup>(15)</sup> si è evidenziato come in circa il 45% di pazienti adulti con dermatite atopica e allergia al polline di betulla ci fosse stato un peggioramento della sintomatologia cutanea entro 48 ore dall'ingestione di cibi contenenti Bet v 1 (mele, carote e sedano crudi), anche in assenza di sintomi orali immediatamente percepiti.

I **sintomi respiratori** possono coinvolgere la laringe e le alte o basse vie respiratorie; sintomi tipici includono quelli classici dell'oculorinite allergica (prurito perioculare, eritema e lacrimazione congiuntivale, prurito nasale, congestione, rinorrea e starnutazioni) fino a sintomi riferibili all'edema laringeo, come dispnea, tosse e wheezing.

In caso di allergia alimentare raramente l'oculorinite si presenta come manifestazione isolata, in quanto comunemente si associa ad altri sintomi allergici. L'allergia alimentare non è una causa comune di patologia asmatica, anche se il broncospasmo acuto e il peggioramento di un'asma preesistente possono essere indotti dall'ingestione di piccole quantità di allergeni alimentari in soggetti sensibilizzati<sup>(10)</sup>. Il sospetto che sintomi asmatici siano indotti da alimenti dovrebbe essere approfondito in pazienti con asma refrattaria e anamnesi di dermatite atopica, reflusso gastro-esofageo, allergia alimentare o problemi alimentari nell'infanzia, anamnesi di cutipositività e/o di reazioni sistemiche all'ingestione di alimenti.

L'allergia alimentare è la causa più comune di **anafilassi** extra-ospedaliera; i pazienti presentano solitamente una varietà di manifestazioni cutanee, respiratorie o gastrointestinali e possono manifestare sintomi cardiovascolari, come ipotensione, collasso cardiocircolatorio e aritmie cardiache<sup>(14)</sup>. Studi retrospettivi su casi di anafilassi fatale cibo-indotta hanno identificato una serie di fattori di rischio comuni: età adolescenziale, anamnesi positiva per pregresse reazioni ad alimenti (di solito non pericolose per la vita e spesso solo lievi), presenza di asma, non disponibilità dell'adrenalina autoiniezzabile (solo nel 10% dei casi era disponibile al momento della reazione), ingestione di arachidi e noci (94%).

Una forma particolare di reazione sistemica indotta da alimenti è l'anafilassi da sforzo, che si manifesta in seguito ad esercizio fisico effettuato entro 2-4 ore dall'ingestione di alimenti verso cui il soggetto è sensibilizzato; in assenza di questa concomitanza i pazienti possono ingerire l'alimento senza manifestare alcuna reazione apparente. Questa forma può rendere conto fino al 50% dei casi di anafilassi da sforzo ed è più comune nel sesso femminile tra i 15 e i 35 anni<sup>(6)</sup>.

## LA DIAGNOSI DI ALLERGIA ALIMENTARE

La storia clinica assume una importanza fondamentale nella diagnostica della allergia alimentare. Il sospetto anamnestico di reazione alimentare viene infatti posto in base al tipo di sintomatologia manifestata e alla sua relazione con l'alimento ingerito. È essenziale stabilire il lasso di tempo intercorso fra il pasto e l'esordio dei sintomi; le reazioni IgE-mediate si presentano entro una o due ore, al contrario delle reazioni non IgE-mediate. L'esposizione all'alimento sospettato può avvenire, oltre che per ingestione, anche per contatto o per inalazione (per esempio il vapore proveniente dal liquido di cottura di gamberi). Altre importanti informazioni anamnestiche provengono dal conoscere

eventuali precedenti reazioni con l'alimento sospettato, come pure fattori favorevoli concomitanti, quali l'esercizio fisico post-prandiale, l'assunzione di farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) o la contemporanea assunzione di alcolici. Una precisa storia clinica è indispensabile per pianificare i successivi accertamenti; una anamnesi fortemente suggestiva di reazione alimentare inoltre è predittiva di un esito positivo al challenge orale in doppio cieco controllato con placebo (DBPCFC) in circa il 30-40% dei casi. Quest'ultimo rappresenta il gold standard della diagnostica allergologica alimentare e consiste nella somministrazione dell'alimento sospetto in dosi crescenti; la possibilità di reazioni sistemiche anche gravi limita l'esecuzione di tale test a centri specializzati e con pronta disponibilità di intervento rianimatorio.

Lo **skin prick test** è una metodica rapida che permette uno screening dei pazienti con sospetto di sensibilizzazione alimentare, intesa come la presenza di IgE specifiche nei confronti di un determinato allergene. Sono considerati positivi gli allergeni alimentari che elicitano una risposta cutanea almeno 3 mm superiore al controllo negativo (soluzione salina) alla lettura effettuata 15-20 minuti dopo l'esecuzione del test. Una intensa positività, intesa come un diametro del pomfo superiore a 8-10 mm, può essere indicativa di una maggiore probabilità di reattività clinica all'alimento testato. Da uno studio condotto su bambini al di sopra dei due anni è emerso che gli skin prick test per l'uovo e per il latte con un diametro  $\geq 8$  mm avevano una predittività di manifestazioni cliniche superiore al 95%<sup>(7)</sup>. Una negatività dei test cutanei, d'altra parte, conferma l'assenza di una sensibilizzazione alimentare con un valore diagnostico negativo del 95%<sup>(21)</sup>.

Gli estratti allergenici commerciali standardizzati sono comunemente impiegati per l'esecuzione di skin prick test per alimenti, tuttavia possono essere inadeguati qualora si vogliano testare molti alimenti vegetali, a causa della labilità al calore delle proteine responsabili. Al fine di diagnosticare molte sensibilizzazioni responsabili di quadri clinici di sindrome allergica orale (ad esempio per cross-reattività fra graminacee e melone) si utilizza l'alimento fresco per effettuare un "**prick by prick**", pungendo prima l'alimento e quindi la cute del paziente<sup>(13)</sup>.

Le analisi di laboratorio per la determinazione del **dosaggio delle IgE specifiche** verso gli alimenti forniscono un'altra evidenza di sensibilizzazione allergica nel sospetto di allergia alimentare IgE mediata. Comunemente chiamata "rast", per la metodica di radioassorbimento *in vitro* utilizzata in passato, più recentemente la determinazione delle IgE specifiche viene effettuata tramite metodiche quantitative quali il CAP system FEIA o l'UniCAP (Pharmacia; Uppsala, Svezia), che si sono dimostrate più predittive

di manifestazioni cliniche di allergia alimentare. Alcuni studi hanno fornito livelli diagnostici di IgE specifiche per vari tipi di alimenti; ad esempio, un paziente con un valore di IgE specifiche per l'arachide superiore a 14 kUA/L ha una probabilità del 95% di avere una reazione allergica in caso di ingestione del suddetto alimento; vi è una diretta correlazione fra livello di IgE specifiche per un determinato alimento e l'eventualità di una reazione<sup>(19)</sup>. È doveroso sottolineare, tuttavia, che anche un paziente con un livello di IgE specifiche inferiore a 0.35 kUA/L può avere una reazione allergica alimentare.

Nel caso quindi di una anamnesi suggestiva di allergia alimentare con test negativi, un DBPCFC con l'alimento sospetto rappresenta il gold standard diagnostico che permette di confermare l'assenza di una allergia alimentare.

### **Recenti sviluppi diagnostici**

Negli ultimi anni è stato isolato il cDNA di numerose proteine e sono state prodotte molecole ricombinanti, permettendo di effettuare il dosaggio delle IgE specifiche non più rivolte verso l'alimento intero, ma nei confronti di specifiche sequenze proteiche, permettendo una più precisa definizione diagnostica del pattern di sensibilizzazione. L'utilizzo di un *allergen microarray* permette di analizzare piccole quantità di siero con un microchip e di fornire contemporaneamente il profilo di reattività individuale verso le diverse molecole allergeniche ricombinanti; l'alto costo di tale metodica tuttavia ne limita l'utilizzo attuale nella pratica clinica.

Recentemente si è cercato di mappare le regioni leganti le IgE (epitopi allergenici) di molti degli allergeni alimentari maggiori e di determinare dove le IgE si legano a queste proteine<sup>(10)</sup>.

Si è visto che sia gli epitopi conformazionali che quelli sequenziali possono essere responsabili delle reazioni allergiche con una differenza: i soggetti che producono IgE rivolte verso gli epitopi conformazionali possono tollerare piccole quantità dell'alimento in questione dopo cottura o idrolisi parziale, poiché la struttura terziaria viene alterata e gli epitopi conformazionali sono distrutti, mentre i soggetti con le IgE rivolte verso gli epitopi sequenziali reagiscono all'alimento in qualsiasi forma<sup>(35-36)</sup>.

Inoltre in alcuni pazienti allergici al latte di mucca o all'uovo sono state trovate delle IgE dirette contro specifiche sequenze di epitopi, che implicano il persistere dell'allergia anche in età adulta, mentre i pazienti con IgE rivolte contro epitopi conformazionali tendono a sviluppare con l'età la tolleranza verso l'alimento<sup>(37-38)</sup>.

Ricerche future potranno essere utili nel capire se il legame ad epitopi specifici può correlare in modo ottimale con la reattività clinica rispetto alla sola determinazione quantitativa delle IgE specifiche<sup>(39)</sup> e valutare se il numero di epitopi legati dalle IgE può correlare con la gravità della reazione clinica<sup>(40)</sup>.

## **CONCLUSIONI**

Il DBPCFC a tutt'oggi rappresenta l'unico test che permette di effettuare una diagnosi precisa di allergia alimentare, tuttavia lo sviluppo continuo di nuove tecnologie sta migliorando il valore predittivo dei test di laboratorio. L'impiego dei livelli quantitativi delle IgE specifiche, grazie all'alto valore predittivo positivo, evita la necessità di effettuare un challenge orale nel 50% dei casi in cui precedentemente sarebbe stato indispensabile per la diagnosi. Quando una accurata storia clinica è suggestiva di allergia alimentare e si accorda con la presenza di significative quantità di IgE specifiche verso l'alimento sospettato, il numero di pazienti che deve essere sottoposto a DBPCFC si riduce notevolmente. In futuro, lo sviluppo di test che analizzano il legame specifico delle IgE all'epitopo incrementerà ulteriormente il valore predittivo positivo degli esami di laboratorio, fornendo ulteriori informazioni sulla storia naturale dell'allergia (ad esempio sulla probabilità di regressione), su cross-reattività alimentari clinicamente rilevanti e probabilmente sulla potenziale gravità delle reazioni da ingestione di alimenti in base al pattern molecolare di sensibilizzazione.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bieber T., Kraft S., Jugeng M., Strobel I., Haberstock J., Tomov H. et al.: *New insights in the structure and biology of the high affinity receptor for IgE (Fc epsilon RI) on human epidermal Langerhans cells.* J. Dermatol. Sci. 13, 71-75, 1996.
2. Bock S.A.: *Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life.* Pediatrics 79, 683-688, 1987.
3. Breiteneder H., Ebner C.: *Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens.* J. Allergy Clin. Immunol. 106, 27-36, 2000.
4. Breiteneder H., Radauer C.: J. Allergy Clin. Immunol. 113, 821-30, 2004.
5. Eigenmann P.A., Sicherer S.H., Borkowski T.A., Cohen B.D., Sampson H.A.: *Prevalence of IgE-mediated food allergy among children with atopic dermatitis.* Pediatrics 101, E8, 1998.
6. Horan R., Sheffer A.: *Food-dependent exercise-induced anaphylaxis.* Immunol. Allergy Clin. N. A. 11, 757-766, 1991.
7. Hill D.J., Hosking C.S., Reyes-Benito L.V.: *Reducing the need for food allergen challenges in young children: a comparison of in vitro with in vivo tests.* Clin. Exp. Allergy Jul 31 (7), 1031-1035, 2001.
8. Hourihane J.O., Roberts S.A., Warner J.O.: *Resolution of peanut allergy: case-control study.* B.M.J. 316, 1271-1275, 1998.
9. James J.M., Bernhisel-Broadbent J., Sampson H.A.: *Respiratory reactions provoked by double-blind food challenges in children.* Am. J. Respir. Crit. Care Med. 149, 59-64, 1994.
10. James J.M., Eigenmann P.A., Eggleston P.A., Sampson H.A.: *Airway reactivity changes in food-allergic, asthmatic children undergoing double-blind placebocontrolled food challenges.* Am. J. Respir. Crit. Care Med. 153, 597-603, 1996.
11. Lin R.Y., Schwartz L.B., Curry A., Pesola G.R., Knight R.J., Lee H.S. et al.: *Histamine and tryptase levels in patients with acute allergic reactions: an emergency department-based study.* J. Allergy Clin. Immunol. 106, 65-71, 2000.
12. Novembre E., de Martino M., Vierucci A.: *Foods and respiratory allergy.* J. Allergy Clin. Immunol. 81, 1059-1065, 1988.
13. Ortolani C., Spano M., Pastorello E.A., Ansaloni R., Magri G.C.: *Comparison of results of skin prick tests (with fresh foods and commercial food extracts) and RAST in 100 patients with oral allergy syndrome.* J. Allergy Clin. Immunol. 83 (3), 683-690, 1989.
14. Pumphrey R.S.: *Lessons for management of anaphylaxis from a study of fatal reactions.* Clin. Exp. Allergy 30, 1144-1150, 2000.
15. Reekers R., Beyer K., Niggemann B., Wahn U., Freidhorst J., Kapp A. et al.: *The role of circulating food antigenspecific lymphocytes in food allergic children with atopic dermatitis.* Br. J. Dermatol. 135, 935-941, 1996.
16. Roberts G., Patel N., Levi-Schaffer F., Habibi P., Lack G.: *Food allergy as a risk factor for life-threatening asthma in childhood: a case-controlled study.* J. Allergy Clin. Immunol. 112, 168-174, 2003.
17. Rothenberg M.E., Mishra A., Collins M.H., Putnam P.E.: *Pathogenesis and clinical features of eosinophilic esophagitis.* J. Allergy Clin. Immunol. 108, 891-894, 2001.



18. Sampson H.A.: *Update of food allergy. J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 805-819, 2004.
19. Sampson H.A.: *Food allergy. J. Allergy Clin. Immunol. Review Feb*, 111 (2 Suppl), S540-547, 2003.
20. Sampson H.A.: *Food Allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. J. Allergy Clin. Immunol.* 103, 717-728, 1999.
21. Sampson H.A.: *Food allergy. Part 2: diagnosis and management. J. Allergy Clin. Immunol. Review Jun* 103 (6), 981-989, 1999.
22. Sampson H.A., Sicherer S.H., Birnbaum A.H.: *AGA technical review on the evaluation of food allergy in gastrointestinal disorders. American Gastroenterological Association. Gastroenterology* 120, 1026-1040, 2001.
23. Sampson H.A., Sicherer S.H.: *Eczema and food hypersensitivity. Immunol. Allergy Clin. N. A.* 19, 495-518, 1999.
24. Sicherer S.H., Munoz-Furlong A., Sampson H.A.: *Prevalence of seafood allergy in the United States determined by a random telephone survey. J. Allergy Clin. Immunol.* 114, 159-165, 2004.
25. Sicherer S.H., Munoz-Furlong A., Sampson H.A.: *Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial telephone survey: a 5-year follow-up study. J. Allergy Clin. Immunol.* 112, 1203-1207, 2003.
26. Sicherer S.H., Furlong T.J., Maes H.H., Desnick R.J., Sampson H.A., Gelb B.D.: *Genetics of peanut allergy: a twin study. J. Allergy Clin. Immunol.*, 106, 53-56, 2000.
27. Skolnick H.S., Conover-Walker M.K., Koerner C.B., Sampson H.A., Burks W., Wood R.A.: *The natural history of peanut allergy. J. Allergy Clin. Immunol.* 107, 367-374, 2001.
28. Sloan A.E., Powers M.E.: *A perspective on popular perceptions of adverse reactions to foods. J. Allergy Clin. Immunol.* 78, 127-133, 1986.
29. Woods R.K., Abramson M., Bailey M., Walters E.H.: *International prevalences of reported food allergies and intolerances. Comparisons arising from the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS) 1991-1994. Eur. J. Clin. Nutr.* 55, 298-304, 2001.

**TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI  
NEL MIDOLLO SPINALE IN UN MODELLO SPERIMENTALE  
DI SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA**

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

*C. Borgogna*

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

Key words: *Mesenchymal stem cells*  
*Amyotrophic lateral sclerosis*  
*SOD1*  
*Neurodegenerative*

**Abstract:**

Stem-cell transplantation is an attractive strategy for neurological disease. With the lack of effective drug treatments for amyotrophic lateral sclerosis (ALS), stem-cell research has highlighted this disease as a candidate for stem-cell treatment. ALS is a lethal disease affecting motoneurons: 10% cases are familial, i. e. bear mutations in the superoxide dismutase gene (SOD1): G93A SOD1 mice, having a mutation in the SOD1 gene, represent a good experimental model of ALS, in which to study the molecular pathways leading to motoneuron death and to test novel therapeutic tools. In this study we have transplanted bisbenzimidazole-labeled human mesenchymal stem cells (MSCs), obtained from bone marrow, into the cisterna magna and/or lumbar spinal cord of SOD1 mice before the onset of the disease. MSCs have great proliferative capacity and differentiative potential and are capable of secreting immunomodulatory and trophic substances. SOD1 mice having received MSCs underwent behavioral tests (rotarod, PaGE) before and after surgery, to follow the functional progression of the disease. Mice were killed, perfused and histologically examined for stem-cell survival and for astrogliosis. MSCs were found in the spinal cord a few mm from the injection site, and sometimes were localized close to motoneurons. We haven't observed neural differentiation in MSCs.

In females, where the progression of ALS is slower than in males, astrogliosis was reduced in MSC-injected mice compared to controls. Behavioral tests showed a significant improvement in males, whereas were unchanged in females which were not functionally impaired at the age of sacrifice.

Therefore we suggest that MSCs can provide immunomodulatory and trophic substances which have beneficial effects on the progression of ALS.

**Sommario:**

La *sclerosi laterale amiotrofica* (SLA) è la forma più comune di malattia degenerativa dei motoneuroni, e si può considerare un esempio paradigmatico di patologia neurodegenerativa. Per tale patologia esistono a tutt'oggi scarse possibilità di cura, ma grazie a un modello sperimentale che riproduce nell'animale la sintomatologia tipica della SLA (topo G93A SOD1) è possibile studiare sia il meccanismo che porta alla morte dei motoneuroni che nuovi approcci terapeutici.

In questo studio è stato eseguito il trapianto di cellule staminali mesenchimali (MSC), marcate con bisbenzimidide, in cisterna magna e/o nel midollo spinale di topi SOD1 prima dell'instaurarsi della patologia.

Abbiamo osservato che le MSC sopravvivono a lungo e si localizzano oltre che nelle vicinanze del sito d'inoculo anche nelle corna anteriori (sito di degenerazione) rendendo evidente la loro capacità migratoria. Nel nostro studio, inoltre, non abbiamo rilevato alcun differenziamento delle MSC in senso neurale.

Le potenzialità terapeutiche del trapianto di MSC sono state valutate mediante la quantificazione dell'astrogliosi reattiva (indice della neuroinfiammazione) e mediante l'analisi comportamentale (Rotarod test e PaGE test). È stato messo in evidenza che la percentuale di astrogliosi reattiva diminuisce significativamente nelle femmine trapiantate rispetto alle femmine di controllo.

In entrambi i test comportamentali, dato che le femmine presentano una malattia più tardiva e meno debilitante (dovuta probabilmente all'effetto neuroprotettivo degli estrogeni), abbiamo osservato che i valori ottenuti dalle femmine di controllo e trapiantate non differiscono molto. Nel gruppo dei maschi invece si osservano differenze più significative tra le due coorti, la diminuzione delle prestazioni nei trapiantati è meno marcata.

I risultati ottenuti mostrano che le MSC, pur non differenziandosi in neuroni, esercitano un effetto neuroprotettivo, che rallenta la progressione del deficit motorio ma non aumenta significativamente la sopravvivenza. Questi miglioramenti sembrano essere dovuti al rilascio, da parte delle MSC, di diversi fattori: immunomodulatori e trofici.

Questo studio offre il punto di partenza per l'introduzione del trapianto di cellule staminali mesenchimali come strategia terapeutica applicabile nell'uomo.

### **Introduzione:**

Le malattie neurodegenerative costituiscono uno dei grandi problemi della Sanità dei paesi occidentali. In questo settore della medicina si hanno a disposizione trattamenti solo sintomatici, che cioè si limitano a contrastare i sintomi con i quali la malattia si manifesta, ma non sono in grado di procurare la guarigione. L'elenco delle malattie annoverabili in quest'area comprende il morbo di Parkinson, l'Alzheimer, la corea di Huntington, la sclerosi laterale amiotrofica...

La *sclerosi laterale amiotrofica* (SLA) è la forma più comune di malattia degenerativa dei motoneuroni, e può essere considerata un esempio paradigmatico di patologia neurodegenerativa. La sua incidenza è di circa 1-3 casi per 100.000 l'anno e la sua prevalenza si aggira sui 3-5 casi per 100.000 l'anno (rapporto maschi/femmine 1.5/1), rappresentando così la causa più frequente di paralisi nell'adulto. Benché la SLA possa colpire individui di ogni età, generalmente è prediletta l'età adulta avanzata con picco fra i 50-70 anni. Dal punto di vista anatomopatologico, è caratterizzata dalla perdita selettiva dei motoneuroni della corteccia cerebrale e dei motoneuroni delle corna anteriori del midollo spinale. I motoneuroni superstiti sono generalmente atrofici, e spesso presentano anomali accumuli di neurofilamenti (Corpi di Lewy), sia a livello del corpo cellulare sia a livello dell'assone. Queste alterazioni neuronali sono associate all'astrogliosi reattiva, che accompagna qualsiasi alterazione degenerativa del sistema nervoso interessando le fibre dei fasci piramidali che decorrono nelle colonne laterali del midollo.

Le più comuni manifestazioni cliniche dalla SLA includono debolezza muscolare, fascicolazioni, crampi e progressiva atrofia muscolare. La lesione del motoneurone periferico causa paresi e atrofia muscolare. La lesione del motoneurone centrale, oltre a concorrere a provocare i fenomeni paretici, si manifesta con accentuazione dei riflessi propriocettivi (risposte poliocinetiche, estensione delle aree riflessogene, fenomeno di Babinski, cloni delle rotule e dei piedi, riduzione dei riflessi esterocettivi addominali) e con spasticità.

La SLA ha un decorso progressivamente ingravescente e di solito porta a morte in 2-3 anni per complicazioni varie; frequenti sono la polmonite ab ingestis dovuta alla disfagia e l'insufficienza respiratoria causate dal progressivo declino della funzione muscolare. Non sono eccezionali i casi con sopravvivenza più lunga (almeno un caso su cinque).

Dal punto di vista epidemiologico si possono distinguere due forme di SLA. Comunemente la SLA è di tipo sporadico (SALS), solo nel 10% dei casi la SLA è ereditaria (o familiare: FALS). Non vi sono differenze cliniche apprezzabili tra SALS e FALS ad eccezione dell'età di esordio: nei casi di

SALS è intorno ai 60 anni, nei casi di FALS è intorno ai 40 anni. La SLA di tipo sporadico inoltre colpisce maggiormente gli uomini rispetto alle donne, e in questi l'esordio sembra essere più precoce e la malattia più severa.

Le cause di SLA sono tutt'oggi sconosciute.

Solo nel 10% dei casi di SLA familiare, è stato identificato come causa un difetto genetico sul cromosoma 21, in particolare sul gene della Cu/Zn superossido-dismutasi (SOD1), enzima citoplasmatico antiperossidante<sup>(18)</sup>. Tale enzima ha il compito di rimuovere i radicali liberi dalle cellule. In particolare SOD1 catalizza la reazione di detossificazione dell'anione superossido ( $O_2^-$ ) che viene convertito in perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ). Si conoscono 114 mutazioni sul gene SOD1 che causano la malattia, la maggior parte con ereditarietà di tipo dominante. La mutazione più frequente è D90A, la più studiata è G93A. Infatti la ricerca genetica, grazie all'utilizzo di modelli murini, ripone in essa le speranze per comprendere il meccanismo fisiopatologico della malattia e per identificare nuovi approcci terapeutici<sup>(3)</sup>.

Non esistono delle efficaci strategie terapeutiche, l'unica eccezione, sulla base dell'ipotesi eccitotossica, è al momento rappresentata dal Riluzolo (inibitore della liberazione pre-sinaptica del glutammato)<sup>(6)</sup>. I recenti trials clinici con l'uso di questo farmaco sono stati piuttosto deludenti, hanno dimostrato solo un modesto aumento della sopravvivenza, di circa 3 mesi, e una scarsa efficacia nel combattere la progressione della malattia<sup>(15)</sup>.

Una svolta a questi problemi è stata data dalle recenti scoperte sulle cellule staminali; data la loro capacità di autorinnovamento e di differenziazione, le cellule staminali rappresentano una concreta possibilità terapeutica per la sostituzione dei tessuti danneggiati. Negli ultimi anni è stato osservato che le cellule staminali embrionali, neurali, midollari potrebbero differenziarsi in diversi tipi cellulari, ad esempio in neuroni, i quali potrebbero emettere prolungamenti e stabilire contatti con i neuroni dell'individuo ospite. Questo ha aperto nuove prospettive terapeutiche e speranze per i malati.

L'utilizzo delle cellule staminali prelevate da embrioni sembra essere molto promettente. Infatti, recentemente, il gruppo di ricercatori di Jong Hoon Kim ha pubblicato di aver trapiantato alcuni neuroni dopaminergici, derivati da cellule staminali embrionali, in topi con sintomi simili al morbo di Parkinson. Questi neuroni si sono integrati funzionalmente nel tessuto ospite ed hanno portato al recupero delle funzioni motorie<sup>(9)</sup>. Tuttavia l'utilizzo di cellule staminali prelevate da embrioni non può essere attuato perché comporta diversi problemi etici, insormontabili per ora nella legislazione italiana<sup>(8)</sup>.

Le speranze sono quindi focalizzate sull'impiego di cellule staminali adulte, che anche se disponibili in minore quantità e di più lenta proliferazione,

hanno fornito già risultati incoraggianti. Una terapia innovativa per la cura di malattie neurodegenerative è rappresentata dall'uso di cellule staminali neurali. In alcuni protocolli cellule staminali neurali ingegnerizzate vengono utilizzate per stimolare le cellule staminali neurali endogene a proliferare e riparare i danni neurologici<sup>(11)</sup>. Questa strategia non è ancora utilizzabile perché: in primo luogo l'isolamento di cellule staminali neurali non è certo di facile attuazione nella pratica clinica e in secondo luogo in alcune patologie neurodegenerative la degenerazione neurale coinvolge proprio le cellule staminali neurali endogene<sup>(10)</sup>.

Le diverse problematiche potrebbero trovare soluzione nell'utilizzo delle cellule staminali mesenchimali (MSC) derivate dal midollo osseo o dal cordone ombelicale. È stato dimostrato che le MSC hanno diverse caratteristiche favorevoli per l'attuazione della terapia cellulare. Sono, infatti, facilmente isolabili ed espandibili e possono essere iniettate direttamente nel circolo sistemico. Inducono tolleranza nel donatore senza la necessità di eseguire un'immunoterapia prolungata, infatti, queste cellule sono in grado di sopprimere la reazione mista leucocitaria (MLR), mediante il rilascio di molecole immunomodulatrici e inoltre, risultano essere poco immunogeniche a causa dell'assenza di HLA di classe II e alla minima espressione di molecole costimolatorie<sup>(12)</sup>. Un'altra straordinaria capacità di queste cellule è rappresentata dalla specifica migrazione al tessuto danneggiato in seguito all'infusione sistemica. Questo è stato dimostrato nel caso di fratture ossee<sup>(16,5)</sup>, infarto al miocardio<sup>(20)</sup> e ischemia cerebrale<sup>(21)</sup>. Il meccanismo che guida l'*homing* non è ancora chiaro, probabilmente sono richiamate da fattori rilasciati dal tessuto danneggiato. In questi siti le MSC sembra possano essere indotte a rigenerare non solo tessuti della linea mesenchimale, ma anche cellule derivate da altri layers (es. neuroni). Queste osservazioni dimostrano il superamento del loro commissionamento specifico in senso mesodermico, sottolineando la loro elevata plasticità e suggerendo il loro potenziale utilizzo clinico. Recenti evidenze sperimentali però suggeriscono che almeno alcuni dei risultati interpretati come plasticità delle cellule staminali potrebbero derivare da fenomeni di fusione.

Comunque, è riportato in letteratura che le MSC svolgano sia un ruolo di immunomodulazione<sup>(7)</sup> sia producano fattori trofici<sup>(13)</sup>, perciò è ipotizzabile che esse possano comunque influire sulla progressione della patologia senza necessariamente differenziarsi in motoneuroni, quindi senza dover sostituire i motoneuroni che muoiono in seguito alla SLA. Fattori immunomodulatori e/o neurotrofici da esse prodotti potrebbero migliorare la sopravvivenza dei motoneuroni e rallentare così l'insorgere dei sintomi motori<sup>(17)</sup>.

Grazie a modelli sperimentali che riproducono malattie neurodegenerative (topo SOD1 nel caso della SLA) è possibile studiare la fattibilità del trapianto di cellule staminali, la sicurezza e l'eventuale miglioramento neurologico.

## **MATERIALI E METODI**

### **Prelievo ed espansione delle MSC**

Le cellule staminali mesenchimali necessarie per il trapianto sono state raccolte da campioni di midollo osseo prelevati: 1) dallo sterno di pazienti di età compresa tra i 20 e i 50 anni, non affetti da patologie oncologiche, sottoposti a intervento chirurgico presso il reparto di cardiocirurgia dell'ospedale San Giovanni Battista di Torino; 2) dalle creste iliache di donatori adulti (età compresa fra i 20 e i 50 anni) e pediatrici (età compresa fra i 2 e i 13 anni), sottoposti ad espianto di midollo osseo per trapianto allogenico a familiare in cura presso il Centro Trapianti di Midollo Osseo dell'Azienda Ospedaliera O.I.R.M.-S. Anna di Torino.

Per ogni espianto midollare da donatore è stata recuperata la sacca filtrata contenente gli agglomerati cellulari, che normalmente è eliminata prima dell'infusione nel paziente; la sacca è stata lavata tre volte con PBS (Phosphate Buffer Saline) 1X al fine di raccogliere il maggior numero di cellule residue. Per quanto riguarda il midollo sternale, pochi millilitri di sangue midollare sono prelevati per aspirazione e raccolti in una provetta contenente eparina sodica.

Le cellule recuperate dalla sacca e quelle raccolte dal midollo sternale sono state lavate a 1200 rpm per dieci minuti e in seguito stratificate su gradiente Percoll (densità: 1,073 g/ml) e centrifugate a 1100 rpm per trenta minuti. Le cellule presenti nell'interfase sono state lavate due volte con PBS1X (1200 rpm per dieci minuti) e quindi seminate ad una densità di 800.000/cm<sup>2</sup> in a-MEM con l'aggiunta del 10% di Siero Fetale Bovino (FBS) e degli antibiotici L-glutamina e streptomicina rispettivamente all'1% e al 2%, in fiasche da 75 cm<sup>2</sup> o 25 cm<sup>2</sup>, mantenute a una temperatura di 37°C in un'atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo tre giorni le cellule non aderenti sono state rimosse ed il terreno è stato cambiato ogni 3-4 giorni.

Per espandere le cellule così isolate, il monostrato aderente è stato staccato con tripsina 0,05% + EDTA 0,02% per cinque minuti a 37°C, dopo 15 giorni per il primo passaggio ed ogni 7 giorni per i passaggi successivi; e le cellule nuovamente seminate ad una densità di 8.000/cm<sup>2</sup>.

## Trapianto intraspinale di MSC umane nel topo

### *IL MODELLO MURINO*

Gli animali utilizzati per questo studio provengono da una colonia di topi allevata negli stabulari del Dipartimento di Anatomia, Farmacologia e Medicina Legale dell'Università degli Studi di Torino. Gli animali, in questi locali, hanno avuto libero accesso a cibo ed acqua. Tutte le procedure sperimentali eseguite sugli animali in vita sono state condotte in accordo con le linee guida per l'utilizzo di animali da laboratorio indicate dal Ministero Italiano della Sanità (DL 116/92).

Tale colonia deriva da una coppia originario del ceppo B6SJL-TgN(SOD1-G93A)<sup>dl1</sup>Gur/J (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA), portatore di un transgene che codifica per una variante della *superossido dismutasi-1* (SOD1) umana in cui la glicina in posizione 93 è stata sostituita con un'alanina (G93A). Nei topi portatori del transgene la patologia si instaura in media all'età di 34,4±3,4 settimane con un esordio agli arti posteriori, e la morte sopraggiunge in media a 37,9±3,0 settimane, con una durata di malattia di quattro settimane circa.

All'interno della colonia ogni nidiata è stata tipizzata mediante Polymerase Chain Reaction (PCR) per individuare gli individui portatori del transgene. All'età di due settimane da ogni animale è stato prelevato un campione di tessuto mediante l'amputazione della parte terminale della coda (per la lunghezza di circa tre millimetri).

<b>oIMR042</b>	5'-CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT-3'
<b>oIMR043</b>	5'-GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC-3'
<b>oIMR0113</b>	5'-CAT CAG CCC TAA TCC ATC TGA-3'
<b>oIMR0114</b>	5'-CGC GAC TAA CAA TCA AAG TGA-3'

*Tabella IV. Primers utilizzati nella PCR per l'identificazione dei topi portatori del transgene: oIMR0113 e oIMR0114 amplificano una sequenza di 236bp all'interno del quarto esone del gene per la SOD1 umana; oIMR042 e oIMR043 amplificano una sequenza di 342bp de gene murino Il 2. I primers per Il 2 vengono utilizzati nella stessa reazione come controllo per l'avvenuta amplificazione del DNA: nei topi portatori del transgene verranno amplificati sia il prodotto di SOD1 sia quello di Il 2, mentre negli animali wild-type sarà amplificato solamente il prodotto di Il 2, a maggior peso molecolare.*



Gli animali riconosciuti portatori del transgene (SOD1<sup>+</sup>) sono stati divisi casualmente in due coorti, delle quali una è stata sottoposta all'impianto di MSC umane, l'altra è stata usata come controllo.

#### *COLTURA DI MSC*

Alcuni giorni prima del trapianto è stata allestita una coltura di MSC dedicata, a partire dalle linee cellulari coltivate nel laboratorio del Centro Trapianti di Midollo Osseo dell'Ospedale Infantile Regina Margherita. Le cellule, raggiunta la confluenza, sono state marcate (24 ore prima dell'inoculo) con bisbenzimidide aggiunta al terreno di coltura alla concentrazione di 10 ng/ml, al fine di permettere l'identificazione nei preparati mediante l'osservazione al microscopio a fluorescenza. Per ogni esperimento sono state inoculate 10<sup>5</sup> cellule risospese in 2 ml di soluzione fisiologica sterile, una concentrazione di 50.000 cellule/ml.

#### *INOCULO DELLE MSC UMANE NEL TOPO SOD1*

Il trapianto, che consiste nell'inoculo intraspinale di MSC umane o di fisiologica pura rispettivamente nei trattati e nei controlli (sham-operated), è stato effettuato a 28 settimane di vita per lo studio a lungo termine. Inoltre, è stato effettuato un trapianto di MSC nella cisterna magna e/o nel midollo lombare a 12 settimane di vita per lo studio a breve termine. L'animale sottoposto al trapianto è stato anestetizzato con un'iniezione intraperitoneale di cloralio idrato al 3% (dose: 300 ml per 30 gr di peso corporeo); in seguito è stata praticata un'anestesia locale a livello dell'incisione cutanea. È stata praticata un'incisione dorsale mediana a livello del tratto lombare della colonna vertebrale, è stato individuato il tratto di midollo spinale compreso tra T13 e L4 e con una micropipetta collegata a una siringa di precisione le cellule (o la fisiologica nel caso degli sham) sono state inoculate nel tratto di midollo esposto. Un intervento simile è stato effettuato anche negli animali trapiantati in cisterna magna.

Negli animali trapiantati non è stata effettuata alcuna immunosoppressione: infatti le cellule staminali (e in particolar modo quelle mesenchimali) sono scarsamente immunogeniche, e per di più il sistema nervoso centrale è un sito immunologicamente privilegiato, scarsamente reattivo nei confronti del non-self<sup>(17)</sup>.

#### *ALLESTIMENTO DEI PREPARATI*

Gli animali operati sono stati sacrificati con overdose di anestetico (cloralio idrato) somministrato per via intraperitoneale. Sono state scelte date di

sacrificio diverse: tra la tredicesima e la sedicesima settimana di vita, per lo studio a breve termine, e 38 settimane di vita, per lo studio a lungo termine. Per garantire un migliore allestimento dei preparati, gli animali sacrificati sono stati perfusi con soluzione fissativa. In seguito sono stati prelevati, per lo studio a breve termine, sia encefalo che midollo e per lo studio a lungo termine solo il midollo spinale, in particolare, sono stati isolati i mielomeri compresi tra T13 e L4. I tessuti prelevati sono stati sottoposti a post-fissazione per due ore a 4°C nella medesima soluzione fissativa usata per la perfusione, e in seguito immessi in una soluzione crioprotettiva (saccarosio al 30% in tampone fosfato 0,1 M), in cui sono rimasti overnight a una temperatura di 4°C. Infine encefalo e midollo sono stati congelati in OCT e tagliati al criostato in sezioni trasversali seriate di 50 µm di spessore.

Per lo studio a breve termine le sezioni di encefalo e midollo sono state sottoposte a osservazione al microscopio a fluorescenza per valutare la sopravvivenza e la localizzazione delle MSC trapiantate; e sono state sottoposte a diverse reazioni di immunofluorescenza: MAP-2 (*microtubule-associated protein*), NSE (*neuron specific enolase*) e Neu-N (*neuronal-specific nuclear protein*), GFAP (*Glial Fibrillary Acid Protein*).

Per lo studio a lungo termine le sezioni isolate dal midollo in parte sono state sottoposte a reazione di immunofluorescenza per GFAP (*Glial Fibrillary Acid Protein*) con l'intento di valutare l'astrogliosi reattiva e in parte sottoposte all'osservazione al microscopio a fluorescenza per valutare la sopravvivenza e la localizzazione delle MSC trapiantate.

#### *IMMUNOFLUORESCENZA SU SEZIONI ISTOLOGICHE*

Gli antigeni di cui si è analizzata l'espressione mediante l'immunofluorescenza sono stati: MAP-2 (clone AP-18, diluizione 1:10, dono di Riederer BM, IBCM, Lausanne), NSE (diluizione 1:50, DBA) e Neu-N (diluizione 1:100, Chemicon) per la plasticità in senso neuronale, GFAP (diluizione 1:500, DAKO) per la plasticità in senso gliale.

Le sezioni istologiche destinate a tali reazioni sono state permeabilizzate con PBS-Triton allo 0,1% per 20 minuti, e poi sottoposte a bloccaggio dei siti aspecifici mediante una soluzione di PBS-Triton 0,1% + 10% di siero isospecie dell'anticorpo secondario (Sigma) per 30 minuti; il tutto è avvenuto a temperatura ambiente. In seguito è stato aggiunto l'anticorpo primario ad opportuna concentrazione diluito in una soluzione composta da una parte di soluzione di bloccaggio e una parte di soluzione permeabilizzante; l'incubazione con l'anticorpo primario è avvenuta overnight ad una temperatura di 4°C. Dopo tre lavaggi con PBS 1X le sezioni sono state incubate per 60 minuti

con l'anticorpo secondario che veicola il fluorocromo specifico. Al termine della reazione, le sezioni sono state montate e osservate al microscopio a fluorescenza.

#### *ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI GFAP*

Oltre a valutare la plasticità in senso astrogliale delle MSC trapiantate, l'espressione della GFAP (*Glial Fibrillary Acid Protein*) è stata analizzata anche con l'intento di valutare l'astrogliosi reattiva nel midollo dell'ospite. La quantificazione dell'astrogliosi reattiva è stata eseguita sulle corna anteriori. Sono state fotografate, con macchina fotografica digitale Nikon Coolpix 995 ad un ingrandimento di 40X, 7 sezioni ad una distanza l'una dall'altra di 1200 µm. In totale vengono realizzate 24 foto che permettono di coprire bene l'area delle corna anteriori. Le foto sono state rielaborate mediante il programma di analisi di immagine "Scion Image". L'astrogliosi è stata espressa come percentuale di area occupata dalla reazione rispetto all'area totale.

#### *TEST CLINICI COMPORTAMENTALI*

Sui due gruppi di animali, trapiantati e sham operated, sono stati eseguiti dei test di valutazione del fenotipo clinico per seguire la progressione dei sintomi e rilevare gli eventuali miglioramenti connessi al trapianto delle MSC. Essi sono:

- **PaGE:** L'animale viene posto sul retro del coperchio di una normale gabbia di stabulazione. Il coperchio viene scosso leggermente per permettere al topo di aggrapparsi alle asticelle metalliche, quindi viene rovesciato rapidamente e viene calcolato il tempo necessario perché l'animale si stacchi dal coperchio con entrambi gli arti posteriori. Un tempo di 90 secondi è stato considerato normale; anche qui ogni animale viene sottoposto ogni seduta a tre test consecutivi, fra i quali viene registrata la performance migliore.

Il PaGE è il test più sensibile per rilevare i primi segni di malattia, infatti è in grado di testare la forza prensile e l'equilibrio.

- **Rotarod test:** Il *Rotarod* è un apparecchio costituito da una serie di cilindri rotanti del diametro di 3,5 cm sui quali gli animali sono costretti a correre. La rotazione dei cilindri aumenta progressivamente di velocità, finché l'animale cade dal cilindro e lo strumento interrompe il conteggio del tempo di corsa. Un tempo superiore a 300 secondi è stato considerato normale; ogni animale viene sottoposto ogni seduta alla ripetizione del test per tre volte, fra le quali viene registrata la performance migliore.

Il Rotarod test, che è ampiamente usato nello studio della SLA, serve per testare la coordinazione motoria, l'equilibrio e la forza prensile. Il declino nella performance del rotarod rappresenta un parametro indiretto di misurazione del deficit motorio in questa malattia.

- **Monitoraggio del peso corporeo:** Il peso corporeo rappresenta il parametro più oggettivo per valutare la malattia, ma la perdita di peso (che effettivamente si osserva nel decorso della malattia) non rappresenta un sintomo specifico, infatti può essere dovuto anche ad altre cause (disidratazione e anomalità di sviluppo).
- **Punteggio in base al tipo di deficit motorio**
  - **4 punti:** normale
  - **3 punti:** presenza di tremore agli arti posteriori quando sospesi per la coda
  - **2 punti:** anomalità di andatura (PaGE e rotarod)
  - **1 punto:** paralisi ad almeno un arto posteriore
  - **0 punti:** se inclinato dal lato paralizzato, non riesce a risollevarsi entro 30 secondi

I test sono stati effettuati 1 volta a settimana a partire da circa 4 settimane prima del trapianto fino al decesso naturale o alla data del sacrificio. I valori vengono presi in considerazione dalla ventisettesima settimana, mentre quelli ottenuti precedentemente vengono considerati un addestramento.

L'inizio della malattia viene definito dalla presenza dei sintomi (punteggio <4) per più di due settimane consecutive. Lo stadio terminale della malattia viene determinato da punteggi pari a zero o da una perdita di peso superiore al 20%.

## RISULTATI

Lo scopo di questo studio sperimentale è osservare il destino delle cellule staminali mesenchimali e i benefici da loro apportati in seguito al trapianto.

In questo lavoro sono stati condotti sia uno studio a breve termine che uno a lungo termine.

### Studio a breve termine

Lo scopo dello studio a breve termine è valutare la sopravvivenza delle MSC trapiantate, e valutare il loro differenziamento in senso neurale in vivo,

in particolare osservando se le cellule trapiantate si differenziano in neuroni e stabiliscono contatti con i neuroni dell'ospite.

In questo studio agli animali il trapianto di MSC è stato effettuato alla dodicesima settimana di vita o in un unico sito d'inoculo: la cisterna magna o in due siti d'inoculo: la cisterna magna e il midollo lombare. Il sacrificio è avvenuto in diverse date tra la tredicesima e la sedicesima settimana. In questo modo è stato possibile studiare il comportamento delle MSC, libere di circolare nel sistema liquorale dell'animale, a tempi diversi.

### *SOPRAVVIVENZA*

La sopravvivenza delle cellule marcate con bisbenzimidide è stata osservata, con microscopio a fluorescenza, in tutti gli animali trapiantati. Dopo quattro settimane le cellule risultavano ancora presenti e solitamente sono state ritrovate in cluster sia nel midollo lombare e cervicale che nell'encefalo (bulbo encefalico, corteccia somatosensitiva, zona periventricolare).

### *DESTINO DIFFERENZIATIVO*

Le MSC osservate nei preparati istologici non hanno mostrato alcun segno di differenziamento morfologico né in senso astrocitario né in senso neuronale. Dal punto di vista immunofenotipico le sezioni istologiche sono state sottoposte a reazioni di immunofluorescenza per tre marcatori di differenziazione neuronale (NSE, Neu-N e MAP-2) e per un marcatore di differenziazione gliale (GFAP); sono quindi state ricercate cellule positive sia per la bisbenzimidide sia per il marker specifico (*doppie marcature*). In nessun animale le cellule positive per la bisbenzimidide hanno dimostrato una positività anche per Neu-N, NSE o GFAP. Invece, sono state evidenziate a due settimane dal trapianto, nel midollo lombare, cellule bisbenzimidide positive, a livello nucleare, e diffusamente positive per MAP-2, a livello citoplasmatico. Inoltre, dopo quattro settimane dal trapianto, le MSC sono state riscontrate nella sostanza bianca e nelle corna anteriori del midollo lombare in prossimità dei motoneuroni MAP-2 positivi.

### **Studio a lungo termine**

Gli scopi dello studio a lungo termine sono sia valutare l'effetto delle MSC trapiantate sulla morte neuronale e su altri indici di danno del sistema nervoso, come l'astrogliosi reattiva, sia valutare, mediante test clinici, se le MSC trapiantate sono in grado di rallentare significativamente la progressione dei deficit motori.

In questo studio sono stati utilizzati 29 topi portatori del transgene SOD1, di cui 21 sono stati sottoposti al trapianto di cellule staminali mesenchimali e 8, infusi con soluzione fisiologica, utilizzati come controllo (*sham-operated*).

Questi animali sono stati sottoposti al trapianto in un unico sito d'inoculo, a livello del midollo lombare, alla ventottesima settimana di vita. Sono, poi, stati sacrificati alla trentottesima settimana (sia i trapiantati che i controlli), all'infuori di quelli deceduti per malattia prima del raggiungimento della data del sacrificio.

Inoltre, questi topi sono stati sottoposti settimanalmente, dalla ventiquattresima settimana fino al decesso naturale o alla data di perfusione, a una serie di test comportamentali.

#### *SOPRAVVIVENZA E MIGRAZIONE*

La sopravvivenza delle MSC è stata valutata in tutti gli animali trapiantati. Al momento del sacrificio, le cellule marcate con bisbenzimide sono state riscontrate soprattutto nei cordoni posteriori e nella commissura posteriore (nelle vicinanze del sito d'inoculo), e talvolta a livello delle corna anteriori (sito di degenerazione). Ciò fa presupporre che siano in grado di migrare sia nel liquido cefalorachidiano, infatti, sono state osservate cellule distribuite lungo la superficie esterna del midollo, sia nel tessuto nervoso, infatti è stata riscontrata la presenza di MSC, sia a livello di parti interne della sostanza bianca sia a livello della sostanza grigia.

Per alcuni animali è stato, anche, osservato che lungo l'asse cranio-caudale del midollo spinale le MSC si localizzano nelle vicinanze del sito d'inoculo per un'estensione longitudinale media di 2050µm.

#### *ANALISI MORFOLOGICA E COMPORTAMENTALE*

In questi studi, gli animali sono stati considerati separatamente, in base al sesso, perché nelle femmine e nei maschi la malattia si presenta con una gravità diversa. Ha un'insorgenza più precoce e debilitante negli animali di sesso maschile. Molti animali del gruppo dei maschi, infatti, muoiono spontaneamente o sono stati perfusi prima della data del sacrificio stabilita.

#### *ANALISI MORFOLOGICA*

Nell'analisi morfologica è stata valutata la presenza dell'astrogliosi reattiva. È noto che nel topo SOD1 vi è un aumento della proliferazione

astrocitaria col progredire della malattia: nel caso le MSC producano fattori neuroprotettivi si attende una riduzione significativa dell'astrogliosi nei topi trapiantati.

La quantificazione dell'astrogliosi è stata effettuata sul gruppo di femmine, costituito da 10 animali trapiantati e 5 animali controllo, un numero sufficiente per fare un'analisi statistica. Come si rileva dal grafico in Figura 1 le femmine trapiantate presentano una marcata riduzione di astrogliosi rispetto al gruppo di

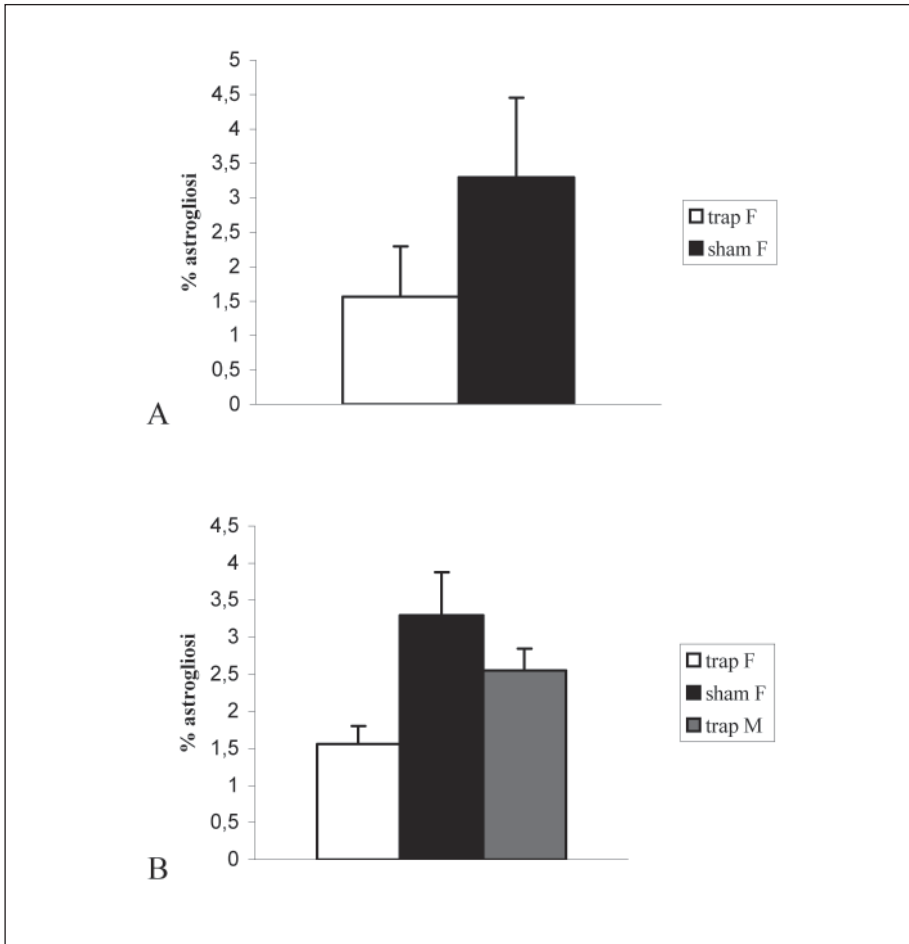


Figura 1. *Quantificazione dell'astrogliosi reattiva.*

Fig. A) *Grafico di confronto tra i valori ottenuti dalle femmine trapiantate e sham-operated.*

Fig. B) *Grafico di confronto tra i valori ottenuti dalle femmine trapiantate e sham-operated e dai maschi trapiantati.*

controllo (ANOVA a una via  $p = 0,003286$ ). Infatti, i valori medi di astrogliosi sono nel gruppo dei trapiantati:  $1,5628\% \pm 0,2434$  e nel gruppo dei controlli:  $3,2972\% \pm 0,5759$ .

Per quanto riguarda il gruppo dei maschi non è, per ora, possibile realizzare un'analisi statistica perché gli animali sham sono morti spontaneamente e l'analisi dell'astrogliosi non si è potuta effettuare a causa della degradazione post-mortem dei tessuti. In futuro si cercherà di ottenere anche dati riguardanti questo gruppo. È stato, comunque, effettuato un confronto tra femmine sham, maschi e femmine trapiantati, il quale ha messo in evidenza che il gruppo dei maschi trapiantati presenta una percentuale di astrogliosi inferiore alle femmine sham (valore medio dell'astrogliosi dei maschi trapiantati:  $2,5493\% \pm 0,2915$ ), ma superiore alle femmine trapiantate (Figura 1). Il test statistico condotto contemporaneamente sui tre gruppi di animali risulta comunque significativo (ANOVA a una via  $p = 0,004079$ ).

#### *ANALISI COMPORTAMENTALE*

Lo scopo dell'analisi comportamentale è di valutare se le MSC trapiantate sono in grado di rallentare la progressione dei deficit motori.

In questo studio sono stati presi in considerazione i risultati a partire dalla ventisettesima settimana. I valori ottenuti dagli animali nei diversi test sono stati normalizzati per il valore massimo ottenuto, perché in entrambi i test motori sia alcuni animali trapiantati che alcuni animali sham-operated non sono mai arrivati al limite di tempo stabilito (300" per Rotarod test, 90" per PaGE).

1) *Rotarod*: Nel gruppo delle femmine come si può osservare dalla Figura 2 i valori ottenuti da animali sham-operated e trapiantati non si discostano molto, ma è rilevabile un lieve miglioramento nei trapiantati a partire dalla trentacinquesima settimana. Entrambi i gruppi non presentano grandi disabilità.

Nel gruppo dei maschi, invece, si notano delle differenze significative tra gli animali trapiantati e i controlli (Figura 2). Nei controlli si osserva un lento decremento della prestazione dalla ventottesima alla trentaduesima settimana, in seguito avviene una brusca diminuzione fino a valori pari a zero nelle ultime settimane di vita. Nei trapiantati i valori delle prestazioni diminuiscono più gradatamente e alla trentottesima settimana non si osservano valori pari a zero, ma un decremento della prestazione di circa il 50%.



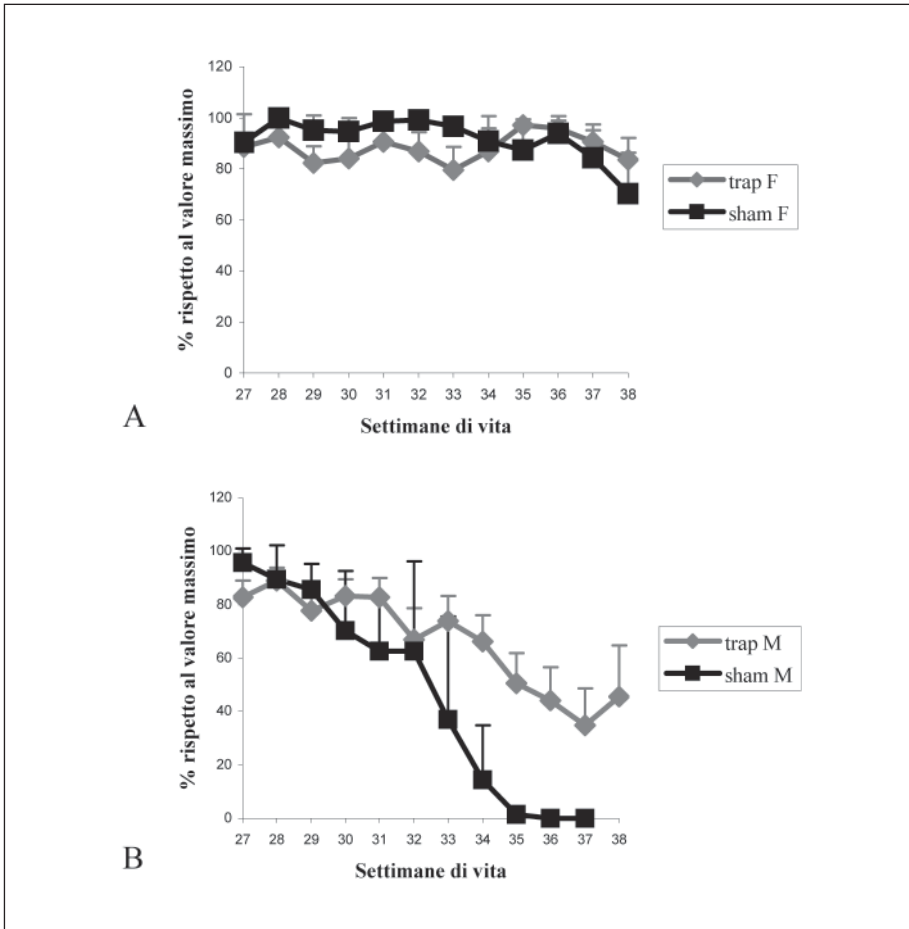


Figura 2. Rotarod test. Valori delle prestazioni normalizzati rispetto al valore massimo ottenuto.

A) Grafico di confronto tra i valori ottenuti dalle femmine trapiantate e le femmine sham-operated;

B) Grafico di confronto tra i valori ottenuti dai maschi trapiantati e i maschi sham-operated.

2) *PaGe*: Anche per quanto riguarda questo test, nel gruppo delle femmine i valori ottenuti dagli animali sham e trapiantati non differiscono di molto, ma è rilevabile un lieve miglioramento delle prestazioni negli animali trapiantati dalla trentacinquesima settimana (Figura 3).

Nel gruppo dei maschi si osserva un netto decremento in entrambi i gruppi, ma nei trapiantati la diminuzione delle prestazioni è meno marcata.

Negli sham si hanno valori pari a zero a partire dalla trentaquattresima settimana. Nel gruppo dei trapiantati si osserva un decremento del 50% a partire dalla trentaquattresima settimana. In seguito le prestazioni diminuiscono circa del 60-70%, ma non vengono mai raggiunti valori pari a zero (Figura 3).

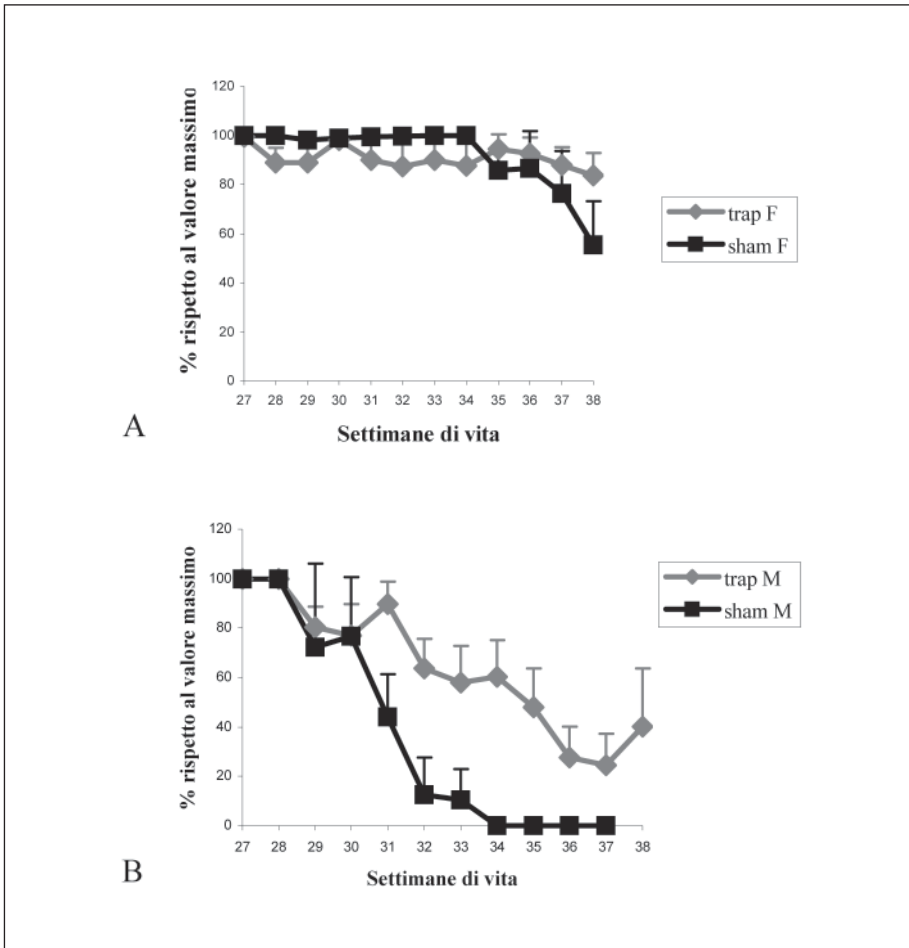


Figura 3: PaGe (Paw Grip Endurance) test. Valori delle prestazioni normalizzati rispetto al valore massimo ottenuto.

A) Grafico di confronto tra i valori ottenuti dalle femmine trapiantate e le femmine sham-operated;

B) Grafico di confronto tra i valori ottenuti dai maschi trapiantati e i maschi sham-operated.

## DISCUSSIONE

In letteratura è stato dimostrato che topi chimerici, generati dall'iniezione di cellule staminali embrionali *wild-type* in blastocisti di topi SOD1, presentano una patologia meno grave; ciò dimostra che la presenza di cellule *wild-type* diminuisce la degenerazione dei motoneuroni e fa aumentare la sopravvivenza degli animali<sup>(2)</sup>. Sulla base di questi studi è stato effettuato il trapianto di cellule staminali mesenchimali ed è stato riportato, anche in questo caso, un miglioramento nel fenotipo della patologia<sup>(4)</sup>. In particolare, in questo studio sono state valutate la potenzialità del trapianto di MSC nella terapia delle malattie neurodegenerative. Il trapianto di cellule staminali, infatti, potrebbe apportare benefici mediante il differenziamento e la sostituzione di cellule neurali danneggiate oppure mediante la produzione di fattori neurotrofici.

### Sopravvivenza, migrazione e differenziamento delle MSC trapiantate

In questo lavoro, in primo luogo, grazie alla marcatura con bisbenzamide effettuata prima del trapianto è stato possibile osservare che le cellule staminali mesenchimali sopravvivono in vivo per lunghi periodi, infatti dopo dieci settimane dal trapianto risultano essere ancora presenti. Le cellule bisbenzamide positive sono state ritrovate raggruppate soprattutto nelle vicinanze del sito d'inoculo, ma in alcuni casi sono state osservate anche distribuite lungo la superficie esterna del midollo o in prossimità delle corna anteriori, rendendo evidente la loro capacità migratoria<sup>(19)</sup>. Questo conferma quanto riportato in letteratura, infatti nello studio di Satake era già stato osservato che le MSC iniettate nello spazio subaracnoideo del midollo spinale lombare hanno la capacità di migrare nel liquido cefalorachidiano e nel tratto toracico lesionato, inoltre queste cellule sembrano localizzarsi maggiormente a livello del tessuto lesionato rispetto al tessuto sano. In secondo luogo, è stato osservato se, *in vivo*, le cellule trapiantate si differenziavano in neuroni o glia, in quanto è stato riportato da alcuni autori che cellule staminali derivate dal midollo osseo sembrerebbero avere capacità plastiche tali da trasformarsi anche in cellule neurali (neuroni, astrociti e microglia, fotorecettori). Questo è ancora un argomento molto discusso, verso il quale numerose sono le obiezioni.

Nel nostro studio non abbiamo rilevato alcun differenziamento in senso neurale, fino a quattro settimane dal trapianto.

### Analisi morfologica e comportamentale

La SLA, come molte altre malattie neurodegenerative, è una patologia caratterizzata dalla neuroinfiammazione, questa non rappresenta la causa della

malattia ma ne influenza la sua progressione. Il processo infiammatorio si manifesta con un'aumentata espressione dell'astrogliosi reattiva a livello delle aree di degenerazione<sup>(14)</sup>. Per questo come parametro quantitativo dell'analisi morfologica è stata scelta l'entità dell'astrogliosi reattiva. È stato messo in evidenza che la percentuale di astrogliosi reattiva diminuisce nelle femmine trapiantate rispetto alle femmine sham-operated. Purtroppo non è ancora stata condotta un'analisi parallela nei maschi per mancanza di sham-operated, in quanto questi sono morti spontaneamente e l'analisi dell'astrogliosi non si è potuta effettuare a causa della degradazione post-mortem dei tessuti. È stato comunque rilevato che la percentuale dell'astrogliosi nei maschi trapiantati è minore di quella delle femmine sham-operated. Questo sembra rappresentare comunque un dato positivo, visto che nelle femmine la malattia risulta essere meno aggressiva (nei maschi sham-operated la percentuale di astrogliosi dovrebbe essere maggiore).

Invece, i dati sull'evoluzione clinica della malattia sono stati ottenuti sottoponendo gli animali ad un'analisi comportamentale<sup>(22)</sup>. I test comportamentali scelti per la valutazione del deficit motorio sono il Rotarod test e il test PaGE, i quali permettono la quantificazione della progressione della malattia.

In entrambi i test si osserva che i valori ottenuti dalle femmine sham-operated e trapiantate non differiscono molto, ma è rilevabile un lieve miglioramento negli animali trapiantati a partire dalla trentacinquesima settimana. Nel gruppo dei maschi invece si osservano differenze più significative tra le due coorti, la diminuzione delle prestazioni nei trapiantati è meno marcata e non vengono mai raggiunti valori pari a zero, come negli animali sham-operated. (Figure 2, 3).

Come si può notare, sia nell'analisi morfologica che in quella comportamentale gli animali sono stati separati in due gruppi, in base al sesso, perché la malattia si presenta con una gravità diversa, più aggressiva e precoce nei maschi. Le femmine presentano una malattia meno debilitante grazie alla presenza degli estrogeni, che sembrano avere un effetto neuroprotettivo. L'opinione attuale è che l'estradiolo regoli l'attività delle cellule neurali attraverso due meccanismi: 1) la modulazione diretta della trascrizione genica mediante recettori per gli estrogeni ad alta affinità (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ); 2) l'interazione con molecole di segnale intracellulare (Ca<sup>2+</sup>, cAMP, PKC); ciò aumenta la sintesi dei fattori di crescita e diminuisce la sintesi di proteine coinvolte nell'inizio della cascata apoptotica<sup>(1)</sup>.

Nel gruppo delle femmine, infatti, nei test comportamentali non si osservano grandi differenze tra trapiantati e sham-operated, probabilmente perché la

malattia si presenta più tardivamente. In futuro sarà necessario condurre uno studio in cui la data del sacrificio viene procrastinata, per valutare se gli effetti del trapianto delle MSC diventano evidenti come nel gruppo dei maschi.

Complessivamente i risultati ottenuti in entrambe le analisi mostrano che le MSC, pur non differenziandosi in neuroni, esercitano un effetto neuroprotettivo, che rallenta la progressione del deficit motorio ma non aumenta significativamente la sopravvivenza. Questi miglioramenti sembrano essere dovuti al rilascio, da parte delle MSC, di diversi fattori: antinfiammatori, antiapoptotici, antiossidanti. Il prosieguo della sperimentazione quindi valuterà la natura di questi fattori neurotrofici.

Inoltre, lo studio continuerà analizzando il possibile effetto neuroprotettivo a livello dei motoneuroni. Infatti, le sezioni colorate con il metodo di Nissl saranno sottoposte alla conta degli  $\alpha$ -motoneuroni delle corna anteriori del midollo spinale (nello stadio finale della malattia si osserva una riduzione pari al 67% degli  $\alpha$ -motoneuroni, nel caso le MSC producano fattori neuroprotettivi si attende una riduzione significativa della morte neuronale negli animali trapiantati rispetto ai controlli).

Qualora i risultati venissero confermati dalle ulteriori indagini, si aprirebbero nuove prospettive terapeutiche per l'utilizzo delle MSC nelle malattie traumatiche e degenerative del sistema nervoso centrale.

## BIBLIOGRAFIA

1. Belcredito S., Vegeto E., Brusadelli A., Ghisletti S., Mussi P., Ciana P., Maggi A.: *Estrogen neuroprotection: the involmente of the Bcl-2 binding protein BNIP2*. Brain Res. Rev. 37, 335-342, 2001.
2. Clement A.M., Nguyen M.D., Roberts E.A., Garcia M.L., Boill e S., Rule M., McMahon A.P., Doucette W., Siwek D., Ferrante R.J., Brown R.H. Jr, Julien J.P., Goldstein L.S., Cleveland D.W.: *Wild-type non-neuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice*. Science 302, 113-117, 2003.
3. Cleveland D.W.: *From Charcot to SOD1: mechanism of selective motor neuron death in ALS*. Neuron 24, 515-520, 1999.
4. Corti S., Locatelli F., Donadoni C., Guglieri M., Papamitriou D., Strazzer S., Del Bo R., Comi G.: *Wild-type bone marrow cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice and contribute to CNS, heart and skeletal muscle*. Brain 127, 2518-2532, 2004.
5. Devine M.J., Mierisch C.M., Jang E., Anderson P.C., Balian G.: *Transplanted bone marrow cells localize to fracture callus in a mouse model*. J. Orthop. Res. 6, 1232-1239, 2002.
6. Gurney M.E., Cutting F.B., Zhai P., Doble A., Taylor C.P., Andrus P.K., Hall E.D.: *Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis*. Ann. Neurol. 39, 147-57, 1996.
7. Hoffman R., Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M., Ferrer K., Patil S., Devine S., Deans R., Moseley A.: *Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo*. Exp. Hematol. 30, 42-48, 2002.
8. Holm S.: *Stem cell transplantation and ethics: a European overview*. Fetal. Diagn. Ther. 19, 113-18, 2004.
9. Kim J.H., Auerbach J.M., Rodriguez-Gomez J.A., Velasco I., Gavin D., Lumelsky N., Lee S.H., Nguyen J., Sanchez-Pernaute R., Bankiewicz K., McKay R.: *Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease*. Nature 418, 50-56, 2002.
10. Limke T.L., Rao M.S.: *Neural stem cell therapy in the aging brain: pitfall and possibilities*. J. Hematother. Stam. Cell. Res. 12, 615-623, 2003.
11. Liu C.Y., Westerlund U., Svensson M., Moe M.C., Varghese M., Berg-Johnsen J., Apuzzo M.L., Tirrell D.A., Langmoen I.A.: *Artificial niches for human adult neural stem cells: possibility for autologous transplantation therapy*. J. Hematother. Stem. Cell. Res. 12, 689-699, 2003.
12. Majumdar M.K., Keane-Moore M., Buyaner D., Hardy W.B., Moorman M.A., McIntosh K.R., Mosca J.D.: *Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells*. J. Biomed. Sci. 10, 228-241, 2003.
13. Majumdar M.K., Thiede M.A., Haynesworth S.E., Bruder S.P., Gerson S.L.: *Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages*. J. Hematother. Stem. Cell. Res. 9, 841-848, 2000.
14. McGeer P.L., McGeer E.G.: *Inflammatory process in amyotrophic lateral sclerosis*. Muscle and Nerve 26, 459-470, 2002.

15. Miller R.G., Mitchell J.D., Moore D.H.: *Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis*. Cochrane Database Syst. Rev. 2, CD001447, 2002.
16. Mosca J.D., Hendricks J.K., Buyaner D., Davis-Sproul J., Chuang L.C., Majumdar M.K., Chopra R., Barry F., Murphy M., Thiede M.A., Junker U., Rigg R.J., Forestell S.P., Böhnlein E., Storb R., Sandmaier B.M.: *Mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery*. Clin. Orthop. Rel. Res. 379, 71-90, 2000.
17. Penkowa M., Camats J., Giralt M., Molinero A., Hernández J., Carrasco J., Campbell I.L., Hidalgo J.: *Metallothionein-I overexpression alters brain inflammation and stimulates brain repair in transgenic mice with astrocyte-targeted interleukin-6 expression*. Glia 42, 287-306, 2003.
18. Rosen D.R., Siddique T., Patterson D., Figlewicz D.A., Sapp P., Hentati A., Donaldson D., Goto J., O'Regan J.P., Deng H.X.: *Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis*. Nature 362, 59-62, 1993.
19. Satake K., Lou J., Lenke L.G.: *Migration of MSC through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue*. Spine 29, 1971-1979, 2004.
20. Shake J.G., Gruber P.J., Baumgartner W.A., Senechal G., Meyers J., Redmond J.M., Pittenger M.F., Martin B.J.: *Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects*. Ann. Thorac. Surg. 73, 1919-1925, 2002.
21. Wang L., Li Y., Chen J., Gautam S.C., Zhang Z., Lu M., Chopp M.: *Ischemic cerebral tissue and MCP-1 enhance rat bone marrow stromal cell migration in interface culture*. Exp. Hematol. 30, 831-836, 2002.
22. Weydt P., Hong S.Y., Kliot M., Moller T.: *Assessing disease onset and progression in the SOD1 mouse model of ALS*. Neuroreport 14, 1051-1054, 2003.
23. Xie Y., Weydt P., Howland D., Kliot M., Moller T.: *Inflammatory mediators and growth factors in the spinal cord of G93A SOD1 rats*. Glial cells 15, 2513-2516, 2004.

**INFUSIONE PROTRATTA DI 5 FLUOROURACILE  
IN ASSOCIAZIONE AD OCTREOTIDE A LENTO RILASCIO  
IN PAZIENTI CON NEOPLASIA NEUROENDOCRINA AVANZATA  
NON A PICCOLE CELLULE**

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

*A. Ferrero*

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

Key words:     *Neuroendocrine tumor*  
                  *Octreotide LAR*  
                  *Metronomic 5-fluorouracil*

**Abstract:**

*Background.* Well differentiated neuroendocrine carcinomas are highly vascularized and may be potentially sensitive to cytotoxic drugs administered on a metronomic schedule that has shown antiangiogenetic properties. A phase II study was designed to test the activity of protracted 5-fluorouracil (5FU) infusion in association with long-acting release (LAR) octreotide as first-line treatment in patients with neuroendocrine carcinoma.

*Patients and methods.* Twenty-nine patients with metastatic or locally advanced well differentiated neuroendocrine carcinoma not amenable to surgery with radical intent were enrolled. Treatment consisted of 5FU protracted intravenous infusion (200 mg/m<sup>2</sup> daily) in association with Octreotide LAR (20 mg once every 4 weeks). 5FU treatment was administered until progression or for a maximum of 6 months. Octreotide LAR was administered until progression. Patients were followed for toxicity, objective response, symptomatic response, biochemical response, time to progression and survival.

*Results.* According to RECIST criteria a partial response was observed in 7 patients (24.1%), a stable disease in 20 pts (69.0%) and a progression disease in only 2 pts (6.9%). Disease response did not differ stratifying patients according to primary malignancy site and proliferative activity. A biochemical (chromogranin A) response was observed in 12/25 assessable patients (48.0%), 9/15 symptomatic patients (60.0%) obtained symptom relief. Post-treatment surgery was performed in three patients and one of them was radically resected. The median time to progression was 22.6 months (range 2.7-68.5 months), median overall survival was not reached. Toxicity was mild and manageable. No patient withdrew from the study because of adverse events.



*Conclusions.* Continuous/metronomic 5FU infusion plus octreotide LAR is well tolerated and shows promising activity in patients with advanced well differentiated neuroendocrine carcinoma.

### **Sommario:**

*Introduzione.* I tumori neuroendocrini ben differenziati sono altamente vascolarizzati e possono essere potenzialmente sensibili a farmaci citotossici somministrati secondo modalità metronomica, che ha dimostrato proprietà antiangiogenetiche. Questo studio di fase II è stato disegnato allo scopo di testare l'attività del 5-fluorouracile in infusione continua in associazione ad octreotide a rilascio prolungato (LAR) come trattamento di I linea in pazienti affetti da carcinoma neuroendocrino.

*Pazienti e metodi.* Sono stati arruolati ventinove pazienti affetti da carcinoma neuroendocrino metastatico o localmente avanzato, non suscettibile di intervento chirurgico radicale. La schedula di trattamento consisteva nell'infusione endovenosa protratta di 5FU (200 mg/m<sup>2</sup>/die) in associazione ad Octreotide LAR (20 mg ogni 4 settimane). Il 5FU è stato somministrato fino a progressione o per un massimo di 6 mesi. L'Octreotide LAR è stato somministrato fino a progressione. Tutti i pazienti sono stati valutati per tossicità, risposta obiettiva, risposta sintomatologica, risposta biochimica, tempo a progressione e sopravvivenza.

*Risultati.* In accordo con i criteri RECIST è stata osservata una risposta parziale in 7 pazienti (24.1%), malattia stabile in 20 pazienti (69.0%) e progressione di malattia in soli 2 pazienti (6.9%). Le risposte obiettive non differivano stratificando i pazienti secondo la sede della neoplasia primitiva e l'attività proliferativa. Una risposta biochimica (cromogranina A) è stata osservata in 12/25 pazienti eleggibili (48.0%), 9/15 pazienti sintomatici (60.0%) hanno ottenuto un miglioramento della sintomatologia. Dopo il trattamento 3 pazienti sono stati sottoposti ad intervento chirurgico, di cui uno risultato radicale. La mediana del tempo a progressione è stata 22.6 mesi (range 2.7-68.5 mesi), la sopravvivenza media non è stata raggiunta. La tossicità è risultata modesta, nessun paziente ha abbandonato lo studio per eventi avversi.

*Conclusioni.* L'associazione di 5FU in infusione protratta/metronomica ed octreotide LAR è ben tollerata ed ha dimostrato una certa attività in pazienti affetti da neoplasia neuroendocrina ben differenziata in fase avanzata.

## INTRODUZIONE

I tumori neuroendocrini (NET) sono un gruppo eterogeneo di neoplasie che originano da sedi diverse, a comportamento biologico variabile, caratterizzati da differente aggressività e prognosi<sup>(9,11)</sup>.

La recente classificazione della World Health Organization (WHO) suddivide tali tumori in 3 categorie: tumori differenziati, carcinomi ben differenziati (a basso grado di malignità), e carcinomi scarsamente differenziati (ad alto grado di malignità)<sup>(18)</sup>. La terapia chirurgica rappresenta attualmente il trattamento di scelta per le neoplasie neuroendocrine. Dopo intervento chirurgico radicale le probabilità di recidiva sono molto basse, tuttavia più del 50% dei casi vengono diagnosticati in fase avanzata di malattia. Nei casi di malattia metastatica o localmente avanzata possono essere prese in considerazione diverse opzioni terapeutiche, anche se al momento non esiste una terapia sistemica standard. Nelle neoplasie neuroendocrine scarsamente differenziate è consolidato il trattamento chemioterapico con schemi contenenti platino ed etoposide, mentre a pazienti affetti da tumore endocrino ben differenziato viene proposta la bioterapia (analoghi della somatostatina, interferone) oppure un trattamento loco-regionale (chemioembolizzazione, radiofrequenza)<sup>(13)</sup>.

Più dell'80% dei tumori neuroendocrini ben differenziati esprimono recettori per la somatostatina. La terapia con analoghi della somatostatina è in grado di controllare efficacemente la sintomatologia legata all'iperincretione ormonale, ma l'attività antineoplastica specifica è limitata (0-5% dei pazienti) e molti tumori sono destinati a diventare refrattari al trattamento<sup>(13,18)</sup>.

I tumori neuroendocrini ben differenziati sono altamente vascolarizzati<sup>(7)</sup>; elevati livelli di espressione del Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) sono stati recentemente correlati alla malattia metastatica e ad una prognosi peggiore<sup>(15)</sup>. Esiste perciò un forte razionale a sperimentare farmaci dotati di proprietà anti-angiogenetiche in questo gruppo di neoplasie<sup>(7)</sup>.

La chemioterapia metronomica è la somministrazione protratta nel tempo di farmaci citotossici a basse dosi, tali da evitare effetti collaterali dose-limitanti e senza richiedere periodi di sospensione<sup>(5)</sup>. Questa modalità di trattamento non colpisce in maniera diretta la cellula tumorale, ma esplica il suo effetto antineoplastico a livello delle cellule endoteliali tumorali inibendo l'angiogenesi e la vasculogenesi<sup>(4,6,16,21)</sup>.

Il 5-Fluorouracile (5FU) è stato impiegato in diversi studi, in combinazione con altri farmaci citotossici, per il trattamento di carcinomi neuroendocrini avanzati non resecabili<sup>(8,10,12,14)</sup>. L'attività del 5FU in associazione ad interferone nei tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici precedentemente trattati con analoghi della somatostatina, è stata testata in 3 studi di fase II. In 2 studi

tale associazione si è dimostrata inattiva<sup>(10,14)</sup>, mentre lo studio di Andreyev e collaboratori, in cui il 5FU veniva somministrato secondo modalità metronomica (200 mg/mq/die), ha permesso di ottenere una risposta obiettiva nel 40% dei pazienti trattati<sup>(1)</sup>.

Questo studio di fase II, disegnato dalla Rete Oncologica Piemontese, si propone di indagare l'attività ed il profilo di tollerabilità del 5FU in infusione continua protratta associato ad octreotide LAR come trattamento di I linea in pazienti affetti da neoplasia neuroendocrina ben differenziata in stadio avanzato.

L'obiettivo primario è rappresentato dalla risposta clinica al trattamento; obiettivi secondari sono la valutazione della tossicità, la risposta sintomatica e biochimica, il tempo a progressione e la sopravvivenza.

## **PAZIENTI E METODI**

### **Popolazione in studio**

I criteri di eleggibilità allo studio erano i seguenti: diagnosi citologica o istologica di carcinoma endocrino ben differenziato secondo classificazione WHO, malattia metastatica o localmente avanzata non suscettibile di chirurgia radicale, almeno una lesione misurabile, ECOG performance status  $\leq 2$ , aspettativa di vita maggiore di 12 settimane, adeguata riserva midollare (WBC  $> 3.5 \times 10^9/L$ , piastrine  $\geq 100 \times 10^9/L$ , emoglobina  $\geq 10$  g/dL), adeguata funzionalità epatica e renale.

I criteri di esclusione erano: carcinomi endocrini scarsamente differenziati, condizioni cliniche o malattie sistemiche precludenti il trattamento in studio, infarto miocardico nei 6 mesi precedenti il trattamento, metastasi clinicamente evidenti a livello del sistema nervoso centrale, seconda neoplasia primitiva, ed infine trattamento antineoplastico specifico precedente.

La valutazione basale includeva esame clinico, ematochimici di screening, cromogranina A circolante, marcatori endocrini urinari o circolanti (gastrina, acido 5 idrossiindolacetico, etc), TC torace e addome, scintigrafia recettoriale con analoghi della somatostatina (Octreoscan). Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico di ogni centro partecipante. Tutti i pazienti hanno fornito consenso informato scritto prima di iniziare il trattamento.

### **Valutazione istologica e immunistochemica**

Dopo l'arruolamento in studio, per ogni paziente è stata effettuata la revisione dei preparati istologici da parte di due patologi esperti (V.M.,

P.M.). La revisione includeva anche la conta delle mitosi, la valutazione immunoistochimica dell'indice di proliferazione (Ki-67) e dell'espressione dei recettori per la somatostatina.

### **Schedula di trattamento e adeguamenti posologici**

L'octreotide LAR 20 mg è stato somministrato per via intramuscolare ogni 28 gg. Alla prima somministrazione è stato associato l'octreotide sottocute per 14 giorni (0.1 mg sottocute ogni 8 ore) come trattamento di induzione. Il 5-fluorouracile è stato somministrato per via endovenosa continua alla dose di 200 mg/mq/die senza interruzione attraverso una pompa elastomerica collegata ad accesso venoso centrale.

Gli eventi avversi correlati al trattamento sono stati valutati in tutti i pazienti secondo i National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCI CTC)<sup>(20)</sup>.

In caso di tossicità ematologica grado III-IV WHO il 5FU è stato sospeso per una settimana, fino al ripristino della crasi ematica. In caso contrario il dosaggio del farmaco è stato ridotto del 25%.

La sindrome mani-piedi da lieve a moderata (secchezza cutanea ed eritema palmo-plantare) non ha richiesto sospensione del 5FU; per sindromi mani-piedi di grado severo (eritema palmo-plantare con sanguinamento, desquamazione e dolore) il farmaco è stato sospeso fino a guarigione delle lesioni.

Per diarrea grado I e II sono stati somministrati farmaci antidiarroici; per diarrea persistente è stato sospeso il farmaco per una settimana. Mucositi grado II hanno richiesto la sospensione del 5FU per una settimana, mucositi di grado severo (III-IV WHO) interruzione fino a guarigione e ripresa con dosaggio ridotto del 25%.

Non sono stati necessari adeguamenti posologici per tossicità da octreotide LAR.

### **Valutazione della risposta**

Dopo l'inizio del trattamento la risposta radiologica è stata valutata mediante tomografia assiale computerizzata ogni 3 mesi. La risposta obiettiva è stata classificata in accordo ai "Response Evaluation Criteria in Solid Tumors"<sup>(19)</sup>.

La remissione completa (CR) è stata definita come regressione di malattia in tutte le sedi precedentemente interessate per almeno un mese e non evidenza di nuove lesioni; la remissione parziale (PR) come riduzione del 30% o più nella somma del diametro maggiore di ciascuna lesione per almeno un mese e senza evidenza di nuove lesioni; la stabilizzazione di malattia (SD) come regressione di tutte le lesioni misurabili < al 30% o progressione < al 20% nella somma del diametro maggiore di ciascuna lesione misurabile, per almeno un mese e

senza comparsa di nuove lesioni; la progressione di malattia (PD) infine come aumento  $> 0 =$  al 20% nella somma del diametro maggiore di ciascuna lesione misurabile oppure comparsa di nuove lesioni.

Data la lenta crescita di queste neoplasie è stata considerata la migliore risposta ottenuta a 3 o a 6 mesi.

La cromogranina A circolante (CgA) è stata valutata ogni 3 mesi. Una riduzione dei livelli di CgA in pazienti con valori elevati alla valutazione basale è stata considerata come risposta biochimica, in particolare risposta biochimica completa (CR) con il rientro del marcatore tumorale nei limiti di normalità. Una riduzione  $>$  al 50% del valore del marcatore definiva la risposta biochimica parziale (PR), mentre un aumento del 25% o più una progressione biochimica (PD).

Per quanto attiene la risposta sintomatica, la completa scomparsa dei sintomi correlati alla sindrome identificava la risposta completa sintomatologica (sCR); una attenuazione del 50% dei sintomi definiva la risposta parziale (sPR); una lieve modificazione dei sintomi veniva inquadrata come stabilità di malattia (sSD); l'incremento dei sintomi coincideva con la progressione (sPD).

### **Considerazioni statistiche**

Questo studio di fase II è stato disegnato secondo il modello a 2 stadi di Simon<sup>(17)</sup>, l'end-point primario è costituito dalla percentuale di risposta al trattamento. La percentuale di risposta corrispondente ad una sostanziale inattività (P0) è stata fissata al 10%, e la percentuale di risposta meritevole di essere presa in considerazione con sufficiente potenza statistica (P1) al 30%. Nel primo stadio dello studio sono stati arruolati 10 pazienti, con il limite di 1 risposta (CR o PR) su 10 per proseguire l'arruolamento fino a 29 casi. Il tempo a progressione (TTP) e la sopravvivenza globale (OS) sono state calcolate secondo il metodo di Kaplan-Meier.

## **RISULTATI**

### **Caratteristiche dei pazienti**

Dal 2002 al 2006 sono stati arruolati nello studio 29 pazienti in 7 diversi centri partecipanti. Le caratteristiche dei pazienti alla valutazione basale sono riportate nella Tabella I. L'età media era di 59 anni; il 52% dei pazienti erano maschi ed il 48% femmine.

La sede più frequente della neoplasia primitiva era il pancreas (45% dei casi), ed in 7 pazienti la sede della primitività era sconosciuta. Due pazienti erano

<b>Pazienti</b>	<b>n° 29</b>
<b>Età mediana (range)</b>	59 anni (26 – 80)
<b>Sesso</b>	
Maschi	15 (52%)
Femmine	14 (48%)
<b>ECOG</b>	
0	11 (37.9%)
1	17 (58.6%)
2	1 (3.5%)
<b>Sede del tumore primitivo</b>	
Pancreas	13 (44.8%)
Sconosciuta	7 (24.2 %)
Piccolo intestino	7 (24.2 %)
Appendice	1 (3.4%)
Colon	1 (3.4%)
<b>N.ro sedi di metastasi</b>	
< 2 sedi	13 (44.8%)
≥ 2 sedi	16 (55.2%)
<b>Chirurgia del primitivo</b>	9/29
<b>Sintomi al basale</b>	
Diarrea	6 (20.6%)
Flushing	4 (13.8%)
Sindrome da carcinoide	4 (13.8%)
Hipoglicemia	2 (6.9%)
Altro	10 (34.5%)
<b>Mediana % Ki67 (range)</b>	5.0 (1 – 80)
<b>Livelli di Cromogranina A</b>	
Livelli normali	2 (7%)
Livelli elevati	27 (93%)

*Tabella I. Caratteristiche dei pazienti.*

affetti da malattia localmente avanzata e 27 da malattia metastatica. La revisione istologica ha confermato la diagnosi di carcinoma endocrino ben differenziato in 27 pazienti. Un paziente era affetto da carcinoma neuroendocrino scarsamente differenziato, ma è stato arruolato nello studio per “intent to treat”.

La valutazione immunoistochimica ha dimostrato che tutti i tumori valutati esprimevano il recettore SST2 e che il 68% aveva meno di 2 mitosi per campo microscopico ad alto ingrandimento. Su 27 tumori valutati, 24 avevano Ki67 < 10% e 2 > 10%.

### **Trattamento somministrato e relativa tossicità**

La mediana dei cicli somministrati è stata 6 (range 2-9). Tutti i pazienti sono stati valutati per tossicità. Gli effetti collaterali correlati al trattamento sono stati riportati nella Tabella II. Quattro pazienti hanno riportato neutropenia di grado I-II, in un solo caso è stata riscontrata trombocitopenia. Nessun paziente ha riportato infezioni e non è mai stato necessario ricorrere ad ospedalizzazione per tossicità da trattamento. La tossicità gastroenterica (nausea, vomito) è stata moderata; 3 pazienti hanno avuto mucosite grado II-III e diarrea. Si sono verificati 2 casi di sindrome mani-piedi grado III. Il dosaggio del 5FU è stato ridotto del 75% in 2 pazienti per età avanzata e diarrea grado III e del 50% in un paziente con mucosite severa.

<b>Maggior grado di tossicità WHO (29 pts)</b>			
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Anemia	–	2 (6.9%)	–
Trombocitopenia	1 (3.4%)	–	–
Neutropenia	2 (6.9%)	2 (6.9%)	–
Astenia	9 (31%)	2 (6.9%)	–
Nausea-vomito	7 (24.1%)	1 (3.4%)	–
Diarrea	16 (55.1%)	2 (6.9%)	1 (3.4%)
Sindrome mani-piedi	4 (13.8%)	4 (13.8%)	2 (6.9%)
Mucosite	4 (13.8%)	2 (6.9%)	1 (3.4%)

*Tabella II. Tossicità correlata al trattamento.*

### Attività del trattamento

Tutti i pazienti hanno completato almeno un mese di trattamento e sono stati valutati radiologicamente. Non sono state osservate risposte complete al trattamento, in 7 pazienti (24.1%) è stata ottenuta una risposta parziale e in 20 (69.0%) una stabilizzazione di malattia. Solo 2 pazienti (6.9%) sono andati incontro a progressione (Tabella III). Tre pazienti, uno in risposta parziale e 2 con stabilizzazione di malattia, sono stati sottoposti ad intervento chirurgico al termine della terapia.

Un paziente ha subito l'asportazione della neoplasia pancreatica primitiva seguita da chemioembolizzazione delle secondarietà epatiche; un paziente è stato sottoposto ad emicolectomia destra e radiofrequenza delle lesioni epatiche ripetitive, all'ultimo paziente sono state radicalmente asportate sia la primitività pancreatica che 2 metastasi epatiche.

La risposta obiettiva radiologica non si modificava stratificando i pazienti in base a sede della neoplasia primitiva, conta delle mitosi, percentuale di cellule Ki67 positive ed intensità di espressione dei recettori della somatostatina.

Alla valutazione pre-trattamento 25 pazienti avevano elevati livelli di CgA sierica, ed erano quindi valutabili per risposta biochimica (Tabella III).

Quattro pazienti hanno ottenuto una risposta biochimica completa (16.0%), 8 una risposta biochimica parziale (32.0%), 11 (44.0%) una stabilizzazione dei livelli di CgA e 2 (8%) un incremento dei valori.

	<b>Risposta obiettiva (RECIST) No = 29 pts</b>	<b>Risposta biochimica No = 25 pts</b>	<b>Risposta sintomatologica No = 15 pts</b>
Progressione	2 (6.9%)	2 (8.0%)	
Stabilizzazione	20 (69.0%)	11 (44.0 %)	6 (40%)
Risposta parziale	7 (24.1%)	8 (32.0%)	6 (40%)
Risposta completa	–	4 (16.0%)	3 (20%)
Risposta globale	7 (24.1%) (95% CI 8.3%-39.9%)	12 (48.0%) (95% CI 28.0%-68.0%)	

Tabella III. Risposta al trattamento.



La riduzione dei livelli di CgA è stata osservata in 4 tra i 7 pazienti (57.1%) che hanno raggiunto una risposta obiettiva parziale e in 8 dei 20 pazienti (40.0%) con stabilità di malattia. Alla diagnosi 15 pazienti presentavano sintomatologia legata all'iperincrezione ormonale; di questi 3 (20.0%) hanno raggiunto una totale scomparsa dei sintomi, 6 (40.0%) hanno ottenuto una riduzione dell'intensità o della frequenza degli episodi, mentre la sintomatologia non si è modificata nei restanti 6 pazienti (40.0%).

Nessun paziente ha avuto un peggioramento dei sintomi durante il trattamento.

## **DISCUSSIONE**

La somministrazione di farmaci citotossici secondo modalità metronomica può avere proprietà antiangiogenetiche ed essere quindi potenzialmente attiva in tumori neuroendocrini ben differenziati altamente vascolarizzati. In questo studio di fase II l'associazione di 5-fluorouracile in infusione continua prolungata ed octreotide LAR si è dimostrata attiva nel trattamento di I linea di tumori endocrini avanzati. Infatti è stato evidenziato un tasso di risposta obiettiva radiologica del 24%, un tasso di risposta biochimica del 48% ed infine un tasso di risposta sintomatologia del 60%.

Il tasso di risposte obiettive del 24% ottenuto nel presente studio è maggiore rispetto a quello previsto con la sola somatostatina (0-5%)<sup>(2,13)</sup>; questo suggerisce che l'efficacia dell'analogo possa essere potenziata dall'associazione con il 5FU in infusione continua. La riduzione della massa tumorale (risposta parziale o risposta minima), raggiunta grazie all'associazione dei 2 farmaci, ha reso fattibile l'intervento chirurgico sulla malattia residua più/meno chemoembolizzazione o radiofrequenza epatica in 3 pazienti. Questo approccio di tipo multidisciplinare sembrerebbe essere efficace; all'ultimo follow-up infatti un paziente era libero da malattia dopo 35 mesi, uno era libero da progressione dopo 27 mesi e l'ultimo era andato in progressione dopo 20.

Al fine di verificare l'omogeneità della popolazione in studio, nel rispetto dei criteri di inclusione, i preparati istologici di tutti i pazienti sono stati revisionati nel centro coordinatore da 2 patologi referenziati (MP e MV). La diagnosi di carcinoma neuroendocrino ben differenziato è stata confermata in tutti i pazienti tranne uno. In accordo con il principio "intent to treat" questo paziente non eleggibile è stato comunque arruolato. La revisione istologica ha fornito inoltre alcuni importanti parametri biologici con significato prognostico, come l'espressione di Ki67 e la conta delle mitosi, parametri reciprocamente correlati. L'indice di proliferazione Ki67 è utilizzato come marcatore predittivo

in molti algoritmi decisionali per l'approccio terapeutico. I pazienti con Ki67 basso infatti dovrebbero essere indirizzati verso la bioterapia, mentre in pazienti con Ki67 elevato dovrebbe essere proposta la chemioterapia up front. Oberg e collaboratori hanno proposto un cut off del 5% per dividere queste 2 categorie (ASCO Educational, 2005). Le ragioni di questa suddivisione sono da ricercare nella bassa risposta al trattamento chemioterapico convenzionale da parte dei carcinomi a bassa proliferazione. Nonostante ciò, nel presente studio è stata evidenziata una risposta al trattamento sia in neoplasie con Ki67 > 5%, sia in neoplasie con Ki67 minore. Risultati sovrapponibili sono stati ottenuti stratificando i pazienti in base alla conta delle mitosi (Tabella IV). Questi dati sostengono l'ipotesi che la riduzione della massa tumorale indotta dalla chemioterapia metronomica non sia direttamente mediata da un effetto propriamente antiproliferativo. L'effetto antiangiogenetico potrebbe essere suggerito come meccanismo responsabile, anche se la valutazione del VEGF pre e post-trattamento non è ancora stata effettuata.

	<b>Sede del tumore primitivo</b>	
Pancreas	2/13	(15.4%)
Intestino	2/6	(33.3%)
Altro	3/10	(30.0%)
	<b>Attività proliferativa</b>	
Ki67 ≤ 5%	3/15	(20.0%)
Ki67 > 5%	3/11	(27.3%)
	<b>Mitosi x 10 HPF</b>	
< 2	4/17	(23.5%)
≥ 2	2/8	(25.0%)
	<b>SST2</b>	
Debole (1-2+)	4/10	(40.0%)
Forte (3+)	1/12	(8.3%)

Tabella IV. Distribuzione della risposta secondo sede del tumore primitivo e caratteristiche del tumore.

In un recente studio multicentrico italiano l'associazione di Oxaliplatino e capecitabina (un analogo del 5FU somministrato per via orale) in metronomica, testata su 40 pazienti, ha evidenziato tassi di risposte interessanti. È stata osservata una risposta obiettiva nel 23% dei pazienti affetti da NET ad alto grado di malignità, e nel 30% dei pazienti con NET a basso grado di malignità, rispettivamente<sup>(3)</sup>. Questi risultati sono in contrasto con la maggior parte degli studi sulla chemioterapia convenzionale pubblicati fino ad oggi, che dimostravano l'attività della chemioterapia esclusivamente nei carcinomi scarsamente differenziati. L'introduzione di farmaci citotossici somministrati con schedula metronomica potrebbe spiegare la discrepanza osservata. Studi precedenti suggerivano che i tumori endocrini pancreatici fossero più responsivi alla chemioterapia rispetto ai carcinoidi. Questi dati non sono stati confermati dal nostro studio, in cui si sono osservate delle risposte in entrambi i casi. La risposta al trattamento, secondo i nostri dati, potrebbe essere diversificata in base all'intensità di espressione dei recettori della somatostatina, essendo maggiore nei tumori con espressione minore rispetto a quelli con espressione più intensa. Questa osservazione necessita comunque di conferma.

L'infusione protratta di 5FU è stata ben tollerata, la tossicità riscontrata è stata di grado lieve-moderato (I-II). Come atteso, la tossicità dose limitante non è stata quella ematologica (mucosite, diarrea, sindrome mani-piedi).

È stata effettuata una riduzione di dose per tossicità solo in 2 pazienti, e nessun paziente ha interrotto precocemente il trattamento a causa di effetti collaterali.

Concludendo, l'associazione di 5FU in infusione continua protratta ed octreotide LAR ha dimostrato una certa attività nel trattamento di tumori neuroendocrini ben differenziati metastatici o localmente avanzati. Le risposte di malattia osservate sono indipendenti dalla sede di neoplasia primitiva e dall'attività proliferativa del tumore.

In futuro potrebbe essere interessante associare alla chemioterapia metronomica farmaci dotati di proprietà antiangiogenetiche al fine di potenziarne l'attività.

## BIBLIOGRAFIA

1. Andreyev H.J.N., Scott-Mackie P., Cunningham D. et al.: *Phase II Study of Continuous Infusion Fluorouracil and Interferon Alfa-2b in the Palliation of Malignant Neuroendocrine Tumors*. J. Clin. Oncol. 13, 1486-1492, 1995.
2. Arnold R., Simon B., Wied M.: *Treatment of neuroendocrine GEP tumours with somatostatin analogues. A review*. Digestion 62 (S1), 84-91, 2000.
3. Bajetta E., Zilembo N., Di Bartolomeo M., Di Leo A., Pilotti S., Bochicchio A.M., Castellani R., Buzzoni R., Celio L., Dogliotti L.: *Treatment of metastatic carcinoid and other neuroendocrine tumors with recombinant interferon alpha-2*. Cancer 72, 3099-3105, 1993.
4. Belotti D., Vergani V., Drudis T. et al.: *The microtubule-affecting drug paclitaxel has antiangiogenic activity*. Clin. Cancer Res. 2, 1843-1849, 1996.
5. Bocci G., Nicolau K.C., Kerbel R.S.: *Protracted low-dose effects on human endothelial cell proliferation and survival in vitro reveal a selective antiangiogenetic window for various chemotherapeutic drugs*. Cancer Res. 62, 638-643, 2002.
6. Colleoni M., Rocca A., Sandri M.T. et al.: *Low dose oral methotrexate and cyclophosphamide in metastatic breast cancer: antitumor activity and correlation with vascular growth factor levels*. Ann. Oncol. 13: 73-80, 2002.
7. Couvelard A., O'Toole D., Turley H., Leek R., Sauvanet A., Degott C., Ruzsiewicz P., Belghiti J., Harris A.L., Gatter K., Pezzella F.: *Microvascular density and hypoxia-inducible factor pathway in pancreatic endocrine tumours: negative correlation of microvascular density and VEGF expression with tumour progression*. Br. J. Cancer 92, 94-101, 2005.
8. Engstrom P., Lavin P., Moertel C., Folsch E., Douglass H.: *Streptozocin plus fluorouracil versus doxorubicin therapy for metastatic carcinoid tumor*. J. Clin. Oncol. 2, 1255-1259, 1984.
9. Faiss S., Pape U.F., Bohmig M., Dorffel Y., Mansmann U., Golder W., Riecken E.O., Wiedenmann B., International Lanreotide and Interferon Alfa Study Group: *Prospective, randomized, multicenter trial on the antiproliferative effect of lanreotide, interferon alfa, and their combination for therapy of metastatic neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors - the International Lanreotide and Interferon Alfa Study Group*. J. Clin. Oncol. 21, 2689-2696, 2003.
10. Hughes M.J., Kerr D.J., Cassidy J., Soukop M., McGregor K., Blackburn N., Yosef H., Kaye S.B.: *A pilot study of combination therapy with interferon- $\alpha$ -2a and 5-fluorouracil in metastatic carcinoid and malignant endocrine pancreatic tumours*. Ann. Oncol. 7, 208-210, 1996.
11. Modlin I.M., Lye K.D., Kidd M.: *A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors*. Cancer. 5, 97 (4), 934-59, 2003.
12. Moertel C., Lefkopoulo M., Lipsitz S., Hahn R., Klaassen D.: *Streptozocin-doxorubicin, streptozocin-fluorouracil, or chlorozotocin in the treatment of advanced islet-cell carcinoma*. N. Engl. J. Med. 326, 519-523, 1992.
13. Oberg K., Kvols L., Caplin M., Delle Fave G., de Herder W., Rindi G., Ruzsiewicz P., Woltering E.A., Wiedenmann B.: *Consensus report on the use of somatostatin analogs for the management of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system*. Ann. Oncol. 15, 966-973, 2004.
14. Papamichael D., Seymour M.T., Penson R.T., Wilson P., Gallagher C.J., Besser G.M., Slevin M.L.: *Double Modulation of 5-fluorouracil with Interferon alpha-2a and high-dose leucovorin in advanced neuroendocrine tumours*. Eur. J. Cancer, 34 (13): 2133-2134, 1998.

15. Phan A.T., Wang L., Xie K., Zhang J., Rashid A., Evans D., Vauthey J., Abdalla E., Abbruzzese J.L., Yao J.C.: *Association of VEGF expression with poor prognosis among patients with low-grade neuroendocrine carcinoma*. J. Clin. Oncol., 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I, Vol 24, No. 18S (June 20 Supplement), abs 4091, 2006.
16. Rozados V.R., Sánchez A.M., Gervasoni S.I. et al.: *Metronomic therapy with cyclophosphamide induces rat lymphoma regression and is devoid of toxicity*. Ann. Oncol. 15, 1543-1550, 2004.
17. Simon R.: *Optimal two-stage designs for phase II clinical trials*. Control Clin trials 10: 1-10, 1989.
18. Solcia E., Kloppel G., Sobhin L.H.: *Histological typing of endocrine tumours*. Springer-Verlag, New York, 2000.
19. Therasse P., Arbutck S.G., Eisenhauer E.A., Wander J., Kaplan R.S., Rubinstein L., Verweij J., Van Glabbeke M., van Oosterom A.T., Christian M.C., Gwyther S.G.: *New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors*. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of Canada. J. Natl. Cancer Inst. 92, 205-216, 2000.
20. Trotti A., Colevas A.D., Setser A., Rusch V., Jaques D., Budach V., Langer C., Murphy B., Cumberling R., Coleman C.N., Rubin P.: *CTCAE v3.0: development of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment*. Semin. Radiat. Oncol. 13, 176-181, 2003.
21. Vacca A., Iurlaro M., Ribatti D. et al.: *Antiangiogenesis is produced by nontoxic doses of vinblastine*. Blood 94, 4143-4155, 1999.

**LA FISIOPATOLOGIA DELLO SCHELETRO:  
ASPETTI CELLULARI, BIOMECCANICI E CLINICI**

Premio di Ricerca sulle Malattie Metaboliche dell'osso  
Fondazione per l'Osteoporosi Piemonte  
in collaborazione con l'Accademia di Medicina di Torino

*P. D'Amelio, G.C. Isaia*

Dipartimento di Medicina Interna - Università di Torino

Key words:     *Osteoporosi*  
                  *Osteoclasti*  
                  *Linfociti T*  
                  *Biomeccanica*  
                  *Ossso*

**Abstract:**

Bone is a living tissue involved in multiple metabolic pathways within the organism and could be studied by different approaches and methods: the present article describes four different topics in the field of bone metabolism:

1. Human skeletal morphogenesis
2. Bone biomechanics
3. Clinical aspects of bone metabolic disorders
4. Bone cells biology

The interplay between these different approaches allow us to achieve new information on the appearance of ossification centres in the femur, on the mechanical behaviour of bone, in relation to the variation in the animal mass, on the relation between immune system and bone metabolism and bone metabolic diseases as postmenopausal osteoporosis.

**Riassunto:**

Il tessuto osseo è coinvolto in molteplici attività metaboliche e non metaboliche dell'organismo e può essere studiato con approcci e metodologie differenti; il presente articolo descrive i seguenti approcci di studio:

1. Morfogenesi dello scheletro umano
2. Biomeccanica dello scheletro

3. La clinica sulle malattie metaboliche dello scheletro

4. Biologia delle cellule ossee

L'interazione tra questi filoni di ricerca ha consentito al nostro gruppo di acquisire nuove informazioni sulla comparsa dei nuclei d'ossificazione femorale, sul comportamento meccanico dell'osso in relazione alla variazione della massa dell'animale, sull'interazione tra sistema immune e metabolismo osseo ed anche su alcuni aspetti clinici delle patologie correlate all'alterazione del metabolismo osseo come l'osteoporosi postmenopausale.

## INTRODUZIONE

Lo scheletro è un tessuto vivente che svolge sia funzione di sostegno che un'attiva funzione metabolica. È composto per la maggior parte da matrice inorganica formata da cristalli di idrossiapatite che s'intercalano sulla matrice extracellulare collagenica. La parte inorganica dello scheletro è responsabile della sua funzione di sostegno e se ne possono studiare le caratteristiche meccaniche valutando la resistenza dell'osso alla frattura tramite carico macroscopico o microscopico.

La parte inorganica è sottoposta a continuo rimaneggiamento da parte della componente cellulare dell'osso, che è organizzata in Unità Metaboliche Ossee (BMU), definibili come unità di rimodellamento osseo caratterizzate da un continuo processo di neoapposizione e riassorbimento da parte delle cellule ossee. L'attività delle cellule ossee (osteoblasti, osteoclasti ed osteociti) è regolata sia da fattori locali che da processi fisiopatologici che coinvolgono l'intero organismo.

Il tessuto osseo è al centro di molteplici attività metaboliche e non metaboliche dell'organismo e può essere studiato con diversi approcci e metodologie e l'attività di ricerca del nostro gruppo ha preso in considerazione diversi aspetti della fisiopatologia e della clinica dell'osso

In particolar modo la nostra attività si è sviluppata in 4 distinti ambiti:

1. Morfogenesi dello scheletro umano
2. Biomeccanica dello scheletro
3. La clinica sulle malattie metaboliche dello scheletro
4. Biologia delle cellule ossee

### Studi di morfogenesi dello scheletro umano

Grazie allo studio della morfogenesi dello scheletro fetale ed infantile umano è stato possibile evidenziare la precoce comparsa dei nuclei di ossificazione secondari del femore e la relazione tra densità minerale ossea (BMD) ed età concezionale, ipotizzando un importante ruolo sia di fattori genetici che di altri fattori correlati all'ambiente di vita uterino nel regolare il fisiologico accrescimento scheletrico già nei primi momenti dello sviluppo<sup>(12,15,26,27)</sup>. Gli studi su ossa isolate *in vitro* si sono focalizzati anche sullo studio della mandibola che è un osso particolare, sia per il tipo di ossificazione mista, sia per il carico a cui è sottoposto nel corso della masticazione<sup>(10,11)</sup>. Gli studi sulla mandibola hanno permesso di ipotizzare un diverso comportamento della BMD a quel livello in relazione all'età ed al sesso del soggetto studiato, ma



soprattutto in relazione alla diversa regione analizzata e, quindi, al diverso carico meccanico imposto all'osso.

### **Studi di biomeccanica dello scheletro**

Lo scheletro, oltre a svolgere un'importante funzione metabolica, svolge anche una ben nota funzione di sostegno: la resistenza al carico ed alla frattura dipende dalla struttura macro e microscopica del tessuto osseo e dalle sue proprietà meccaniche, caratteristiche che variano al variare della massa dell'individuo.

La relazione tra le dimensioni dell'individuo e le caratteristiche anatomiche, fisiologiche ed ecologiche degli organismi viventi sono state intensamente studiate in biologia: particolare interesse desta il fenomeno dello scalamento (scaling), relativamente al quale sono stati studiati numerosi fenomeni connessi alla variazione delle dimensioni delle ossa che possono essere spiegati in termini di principi fisici della meccanica e di relazioni geometriche. Nell'interpretare lo scaling come la soluzione ottimale a problemi di carattere meccanico questi primi studi hanno fondato la moderna disciplina della biomeccanica: Il principio sul quale si basano tutti gli studi teorici e quantitativi sullo scaling sostiene che alterazioni nelle dimensioni di un sistema fisico o biologico richiedano continui aggiustamenti nelle relazioni tra i suoi componenti e processi al fine di consentirgli di continuare a funzionare. I principi fisici che regolano lo sviluppo ed il comportamento dei componenti e dei processi sono universali ma le conseguenze biologiche dipendono dalle dimensioni dell'organismo. Le conseguenze di un aumento delle dimensioni di un organismo sono sostanzialmente connesse all'andamento del rapporto tra superficie e volume ed all'associata produzione e dispersione d'energia. Il progetto di un organismo vivente è governato da tre principi: esponenti interconnessi, quantità invarianti e simmorfosi. Gli esponenti interconnessi sono quelli che soddisfano le equazioni allometriche che descrivono le relazioni tra due parametri d'interesse. Una tipica equazione allometrica ha la forma  $Y=Y_0M^b$ , dove  $Y$  è una variabile dipendente,  $Y_0$  è una costante di normalizzazione,  $M$  è la massa corporea e  $b$  è l'esponente di scalamento. Le quantità invarianti sono quelle caratteristiche che variano come  $M^0$ . Esempi tra i mammiferi sono il raggio dei capillari e la velocità e pressione sanguigna sia nell'aorta che nei capillari. La simmorfosi è la tendenza delle strutture biologiche di svilupparsi al fine di venire incontro alla massime esigenze, ma non oltre. Queste relazioni di scaling mostrano soluzioni il cui unico fine è di soddisfare i requisiti massimi. Lo scaling del sistema muscolo scheletrico degli animali terrestri ed il suo adattamento ai vincoli di natura meccanica sono

stati anch'essi profondamente indagati, principalmente in studi interspecifici. A causa del differente scaling della superficie rispetto al volume, con l'aumentare delle dimensioni corporee, l'energia che la struttura ossea deve sopportare aumenta in misura maggiore rispetto alla variazione dei parametri fisici (densità, geometria, etc) atti ad assorbire l'energia stessa evitando la frattura. Indagini volte a descrivere in quale maniera le proprietà geometriche, densitometriche e meccaniche dell'osso scalino con l'aumentare della massa di un animale in una data specie può fornire un'idea delle strategie adottate dal tessuto osseo per adattare la propria struttura al fine di compensare le conseguenze geometriche, fisiche e biologiche di una taglia differente.

Gli studi sulla biomeccanica ossea<sup>(2,3)</sup> sono stati focalizzati sullo studio dello scalino nel modello canino in collaborazione con il Dipartimento di Meccanica del Politecnico di Torino. L'utilizzo del cane come modello sperimentale ci ha consentito di analizzare ossa appartenenti ad individui di massa notevolmente differente nell'ambito della stessa specie.

I risultati di questi studi suggeriscono che è la geometria il parametro che, all'interno di una stessa specie, è in grado di smorzare gli effetti energetici indotti dall'aumento della massa animale. Lo scaling allometrico della lunghezza di un osso e della disposizione tridimensionale della sua sezione, senza incremento del materiale proporzionalmente impiegato, riesce a mantenere il rapporto tra la massa e la quantità d'energia necessaria a fratturare l'osso lineare e compensare l'incremento delle tensioni sulla sezione. Le differenze di genere riscontrate evidenziano differenti proprietà meccaniche delle ossa, indipendentemente dalla massa dell'individuo, che possono essere attribuite alla diversa quantità di tessuto impiegato in osso corticale e spongioso.

### **Studi clinici sulle malattie metaboliche dello scheletro**

La clinica delle malattie metaboliche dello scheletro è molto vasta e comprende diverse patologie la più frequente delle quali è l'osteoporosi sulla quale si sono concentrati la maggioranza dei nostri studi che si sono indirizzati sia agli aspetti legati ai fattori di rischio per osteoporosi<sup>(6,13,14,22,28)</sup> che a quelli terapeutici<sup>(24)</sup>.

Per quanto attiene ai fattori di rischio per osteoporosi abbiamo esaminato il ruolo del metabolismo marziale nella genesi dell'osteoporosi menopausale<sup>(28)</sup> e la correlazione tra metabolismo lipidico ed osteoporosi<sup>(13)</sup>. In un recente studio epidemiologico abbiamo evidenziato l'elevata prevalenza d'ipovitaminosi D e di malnutrizione nella popolazione anziana, nonché la diffusa sottostima del fenomeno da parte dei Medici<sup>(6)</sup>. Lo studio dei fattori di rischio<sup>(14)</sup> ci ha consentito di proporre un nuovo score per la precoce individuazione di

pazienti a maggior rischio di osteoporosi denominato AMMEB (acronimo delle variabili prese in considerazione: Age, Menopause, MENarche e BMI) (vedi Tabella).

Linea guida	Cut off	Punteggio
<b>Age, years after Menopause, age at MENarche, BMI (AMMEB)</b>	Score uguale o maggiore di 10	<i>Età (anni):</i> 15 se 75+, 9 se 65-74, 5 se 56-64, 0 se uguale o inferiore rispetto 55  <i>BMI:</i> 6 se <20, 2 se 20-23, 1 se 24-26, 0 se >26  <i>Age at menarche:</i> 0 se <11, 1 se 11-13, 6 se >13  <i>Anni dalla menopausa:</i> 5 se >16, 3 se 12-16, 1 se 5-11, 0 se <5.

### Studi di biologia cellulare

Per quanto riguarda la biologia delle cellule ossee, ci siamo maggiormente occupati dei processi che regolano la formazione e l'attività degli osteoclasti (OC) e della relazione tra sistema immunitario e fisiopatologia dello scheletro. Gli OC sono cellule giganti multinucleate caratterizzate dall'espressione di alcuni marcatori tipici come la fosfatasi acida tartrato resistente (TRAP), il recettore per la vitronectina (VNR), il recettore per la calcitonina (CTR) e, soprattutto, dalla capacità di riassorbire la matrice ossea.

Gli OC sono le cellule più studiate nell'ambito del tessuto osseo poiché sono il target specifico della maggioranza dei farmaci utilizzati nella cura delle malattie metaboliche dello scheletro e sono facilmente ottenibili in coltura. Negli ultimi anni lo studio dei meccanismi che ne regolano la formazione e l'attività ha portato ad individuare molecole di segnale coinvolte nella loro formazione ed a ipotizzare una stretta relazione tra il sistema immunitario e

la regolazione della formazione e dell'attività degli OC, dando l'avvio ad una nuova branca di studio della biologia ossea, l'osteoinmunologia.

Per quanto attiene alla formazione ed all'attività degli OC, abbiamo dimostrato come sia possibile ottenere queste cellule ponendo in coltura le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) senza l'aggiunta di fattori di crescita<sup>(9)</sup>. Partendo da questo dato abbiamo studiato l'effetto della somministrazione di un bisfosfonato il risedronato, sull'osteoclastogenesi *in vitro*. I bisfosfonati (BSP) sono farmaci inibenti il riassorbimento osseo che agiscono sugli OC, hanno un'alta affinità di legame alla matrice ossea ed attualmente rappresentano la classe di farmaci maggiormente utilizzata nella terapia delle affezioni scheletriche come il morbo di Paget, l'osteoporosi e le metastasi ossee. Il meccanismo d'azione dei BSP dipende dalla presenza o meno di un gruppo amminico nella molecola. In particolare, i non-amino BSP come il clodronato, l'etidronato ed il tiludronato sono analoghi del pirofosfato endogeno ed agiscono inducendo l'apoptosi dell'OC, sono accumulati a livello intracellulare in analoghi non idrolizzabili dell'ATP che risultano essere tossici per la cellula. Invece gli amino-BSP come il pamidronato, l'alendronato, l'ibandronato, lo zoledronato ed il risedronato inibiscono la farnesil pirofosfato sintetasi, un enzima della via del mevalonato. L'inibizione di questa via impedisce la sintesi di lipidi isoprenoidi che sono essenziali per la farnesilazione e la geranylgeranilazione delle piccole GTPasi di membrana e, quindi, inibisce l'attività di riassorbimento osseo dell'osteoclasto e ne induce l'apoptosi.

Alcuni studi *in vitro* hanno dimostrato chiaramente che i BSP possono indurre apoptosi se aggiunti a colture di OC, altri suggeriscono che i BSP sono in grado di ridurre la capacità degli OC di aderire alla matrice mineralizzata. Tuttavia, vi sono ancora dubbi sul possibile effetto dei BSP sui precursori degli osteoclasti<sup>(1,21,31)</sup> e sono presenti in letteratura dati contrastanti sull'effetto dei BSP sulla produzione citochinica: alcuni studi suggeriscono un effetto pro-infiammatorio dei BSP con maggior produzione di citochine pro-osteoclastogeniche come IL6 e TNF  $\alpha$ , mentre altri non individuano nessun effetto della terapia oppure una riduzione a lungo termine dei livelli di dette citochine.

Nello studio sull'osteoclastogenesi ed il risedronato<sup>(8)</sup> abbiamo preso in considerazione: la presenza di precursori circolanti, la formazione, l'attività e la vitalità delle cellule formatesi in coltura e il livello di citochine prodotte sia nel mezzo di coltura che a livello plasmatico. L'innovazione introdotta nel disegno dello studio consiste nella valutazione *in vitro* di una terapia somministrata *in vivo* con metodiche relativamente semplici che potrebbero

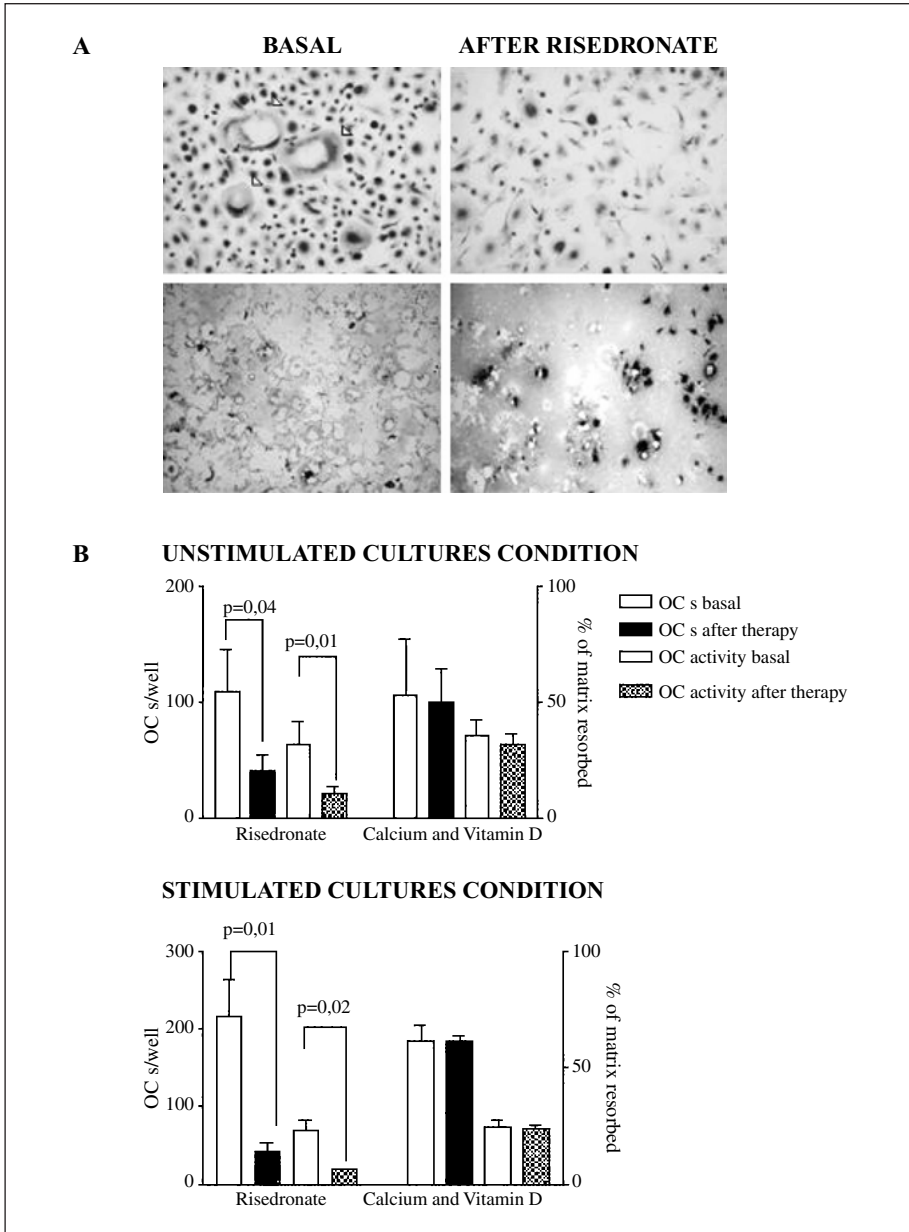


Figura 1. Le microfotografie mostrano gli OCs formati in coltura al basale e dopo terapia con RIS (pannelli in alto) ed il riassorbimento della matrice simil-ossea (pannelli in basso) in coltura al basale e dopo terapia con risedronato. I grafici mostrano il numero degli Oc formati e l'attività di riassorbimento osseo in coltura con o senza stimolo.

essere introdotte nella routine del laboratorio per valutare la risposta e la compliance alla terapia delle pazienti.

I nostri dati dimostrano come la terapia con risedronato sia in grado di inibire l'osteoclastogenesi da PBMC nelle pazienti affette da osteoporosi, sia in assenza che in presenza di fattori di crescita, dopo soli tre mesi dall'inizio della terapia (Figura 1). Inoltre suggeriscono come il risedronato somministrato in vivo agisca inibendo la formazione di osteoclasti in vitro, sia riducendo il numero e la quantità di markers di superficie espressi dai precursori osteoclastici circolanti, sia riducendone l'emivita in coltura che inibendo la produzione di citochine pro-osteoclastogeniche nel mezzo di coltura.

L'effetto sull'emivita delle cellule in coltura, che avviene sia in presenza che in assenza di fattori di crescita, pur senza l'aggiunta del BSP *in vitro* potrebbe essere spiegato sia con la riduzione del numero di cellule capaci di indurre osteoclastogenesi in coltura sia con l'induzione di un pattern proapoptotico nelle cellule stesse, come suggerito dalla letteratura precedente<sup>(37)</sup>.

I dati di questo studio suggeriscono che il risedronato è in grado di ridurre il reclutamento degli OC dal sangue periferico e questo potrebbe essere dovuto alla ridotta produzione di citochine. È stato suggerito che i BSP richiedano gli osteoblasti per la mediazione del riassorbimento osseo<sup>(30,33)</sup> e che possano modulare la secrezione di fattori dagli osteoblasti<sup>(16,36)</sup>; questo meccanismo potrebbe spiegare il ridotto reclutamento degli OC dal sangue periferico.

Il dato sulla riduzione dei livelli di OPG sierici conferma i dati sul precoce effetto dei BSP sull'OPG<sup>(16,20)</sup> e quelli sulla riduzione dei livelli di sRANKL libero confermano precedenti dati in vitro che indicavano che lo zoledronato riduce i livelli di RANKL clivando la forma transmembrana di RANKL in cellule simil-osteoblastiche attraverso la up-regolazione di TACE, un enzima in grado di clivare RANKL<sup>(25)</sup>.

Nell'ambito dell'osteoinmunologia ci siamo occupati del metabolismo osseo in donne timestomizzate (THX)<sup>(7)</sup>. In recenti studi è stato dimostrato come nel topo ovariectomizzato si osserva un aumento dell'output dei linfociti T maturi e immaturi nel midollo e nella milza dovuto al deficit di estrogeni<sup>(4,5,32)</sup> e dopo l'ovariectomia avviene un incremento nella produzione di TNF $\alpha$  e RANKL, citochine secrete dai T che mediano il riassorbimento osseo<sup>(17)</sup>. È stato inoltre dimostrato che nel topo nudo l'ovariectomia non induce il riassorbimento osseo, mentre la ricostituzione del patrimonio T cellulare in questo modello sperimentale ripristina il fisiologico riassorbimento osseo postmenopausale<sup>(32)</sup>. Dati sperimentali suggeriscono che IL-7 svolge

un importante ruolo nel trofismo delle cellule T<sup>(35)</sup> e le stimola a produrre RANKL<sup>(18,38)</sup>.

Questi dati suggeriscono l'importanza del ruolo dei linfociti T che producono TNF $\alpha$  nella regolazione del metabolismo fosfo-calcico e, in particolare, nella perdita di massa ossea che si osserva dopo la menopausa. I dati sperimentali sul topo sono confermati anche da altri studi sull'essere umano: in particolare è stato dimostrato come sia evidente una diversa distribuzione delle popolazioni T cellulari, ed in particolare un'alterazione del rapporto CD4+/CD8+ in pazienti affette da osteoporosi complicata da fratture da fragilità rispetto a controlli non fratturati<sup>(29)</sup>.

È ben noto che il timo svolge una funzione fondamentale nella regolazione immunitaria ed, in particolare, nella maturazione dei T linfociti ed è stato recentemente dimostrato che esso riprende la sua funzione al cessare della produzione ormonale sia nel modello animale che nell'uomo<sup>(19,34)</sup>. Pertanto, in conformità a questi dati, lo scopo del nostro lavoro<sup>(7)</sup> è stato di valutare la presenza di un'eventuale relazione tra l'alterazione delle sottopopolazioni T cellulari indotta dalla timectomia ed il riassorbimento osseo postmenopausale. I dati di questo studio suggeriscono che le pazienti timectomizzate hanno un diverso subset linfocitario con una riduzione dei T linfociti, che questa riduzione si manifesta soprattutto a carico dei linfociti T CD4+ e che dipende da un minor output timico di cellule naïve, mentre si osserva un'espansione del pool periferico dei T memoria soprattutto a carico dei T CD8+ (Figura 2). Anche il numero di linfociti T produttori TNF è inferiore nelle pazienti THX, ma questi linfociti sembrano più reattivi riuscendo lo stesso a produrre una quantità di TNF uguale a quella prodotta dai soggetti di controllo. Questo dato potrebbe essere spiegato dalla maggior produzione di IL7 nelle THX che, com'è noto, svolge una funzione linfotrofica.

Interessante anche il dato che individua le PBMC come fonte di IL7, mentre era in precedenza descritto che solo le cellule stromali, i cheratinociti e gli osteoblasti oltre ad alcune cellule leucemiche erano in grado di produrre IL7 (Figura 3). Questo dato potrebbe essere spiegato nelle pazienti THX come un tentativo compensatorio alla mancanza di linfociti T e nelle donne di controllo in menopausa come un effetto della mancanza estrogenica che, di per se, stimola la secrezione di IL7 come in precedenza dimostrato nel modello murino<sup>(38)</sup>.

Non sono invece emerse differenze significative nei confronti del metabolismo osseo nonostante la maggior produzione di RANKL nelle pazienti: ciò potrebbe suggerire un ruolo svolto dall' IL-7 nell'inibizione del riassorbimento osseo come suggerito da Lee et al<sup>(23)</sup>.

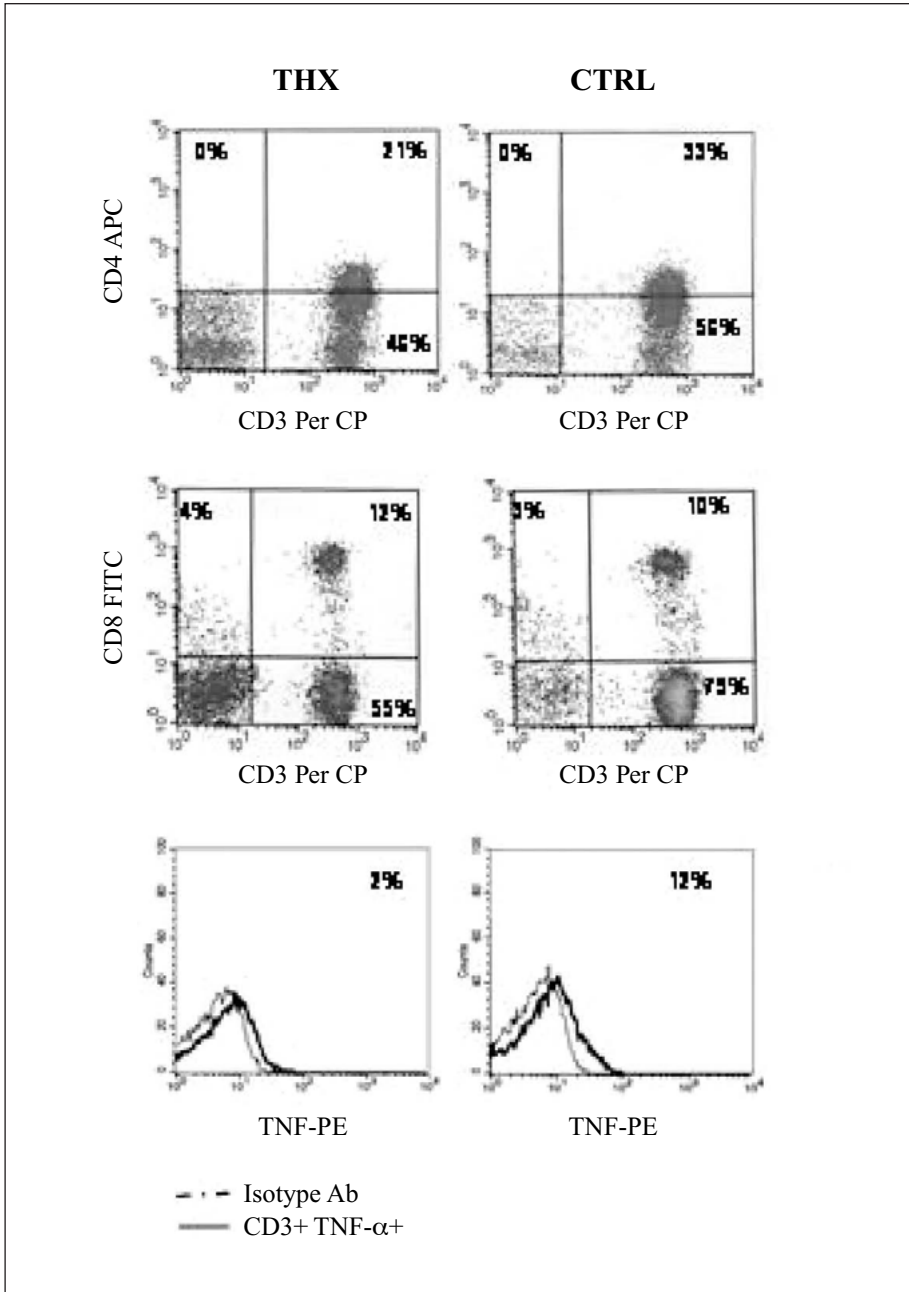


Figura 2. Dot plots ottenuti al FACS che mostrano le sottopopolazioni T nelle pazienti THX e nei controlli. L'istogramma mostra le cellule T produttrici TNF.



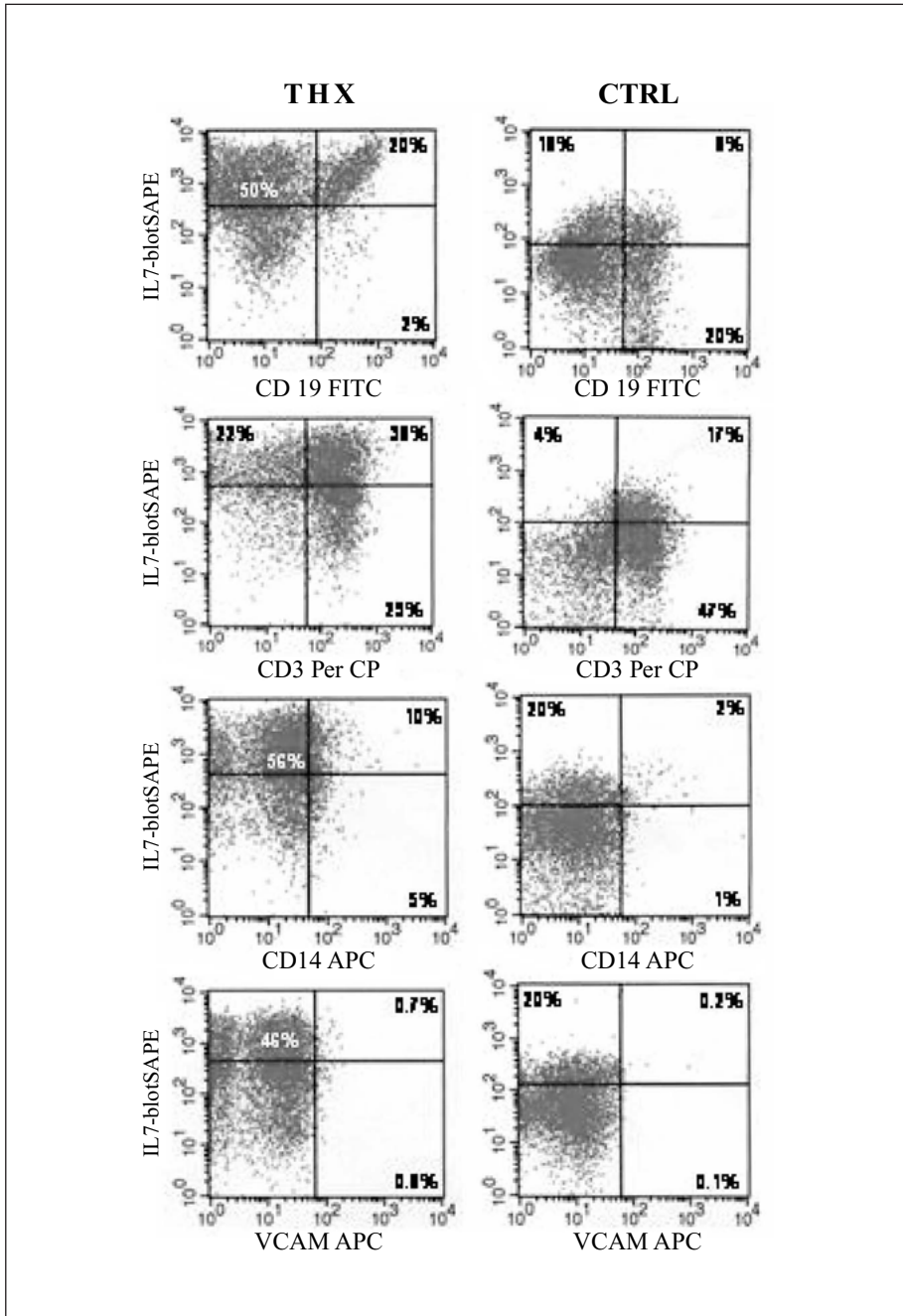


Figura 3. Analisi al FACS della produzione di IL-7 in pazienti THX e controlli.

## CONCLUSIONI

Sulla base degli studi sviluppati dal nostro gruppo di ricerca negli ultimi anni, possiamo certamente confermare che la funzione globale del tessuto osseo non è limitata a quella meccanica e di sostegno, ma che coinvolge numerosi aspetti metabolici: esso deve pertanto essere considerato un tessuto chiamato a svolgere funzioni assai complesse ed in gran parte ancora sconosciute nei loro aspetti biologicamente più fini che coinvolgono in modo coordinato numerosi tipi cellulari che si interfacciano strettamente per assolvere, attraverso il corretto espletamento di diversi e rispettivi compiti, al compito di equilibrare ed eventualmente compensare numerosi processi metabolici ed immunitari il cui corretto funzionamento è indispensabile per la sopravvivenza dell'individuo.

## 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. Brianza S.Z., D'Amelio P., Pugno N., Delise M., Bignardi C., Isaia G.: *Allometric scaling and biomechanical behavior of the bone tissue: an experimental intraspecific investigation*. Bone 40, 1635-1642, 2007.
3. Brianza S.Z., Delise M., Maddalena Ferraris M., D'Amelio P., Botti P.: *Cross-sectional geometrical properties of distal radius and ulna in large, medium and toy breed dogs*. J. Biomech. 39, 302-311, 2006.
4. Cenci S., Toraldo G., Weitzmann M.N., Roggia C., Gao Y., Qian W.P., Sierra O., Pacifici R.: *Estrogen deficiency induces bone loss by increasing T cell proliferation and lifespan through IFN-gamma-induced class II transactivator*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 10405-10405, 2003.
5. 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.
6. Corino A., D'Amelio P., Gancia R., Del Rizzo P., Gabasio S., Limone P., Isaia G.: *Hypovitaminosis D in internal medicine inpatients*. Calcif. Tissue Int. 80, 76-80, 2007.

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. D'Amelio P, Grimaldi A., Di Bella S., Tamone C., Brianza S.Z., Ravazzoli M.G., Bernabei P, Cristofaro M.A., Pescarmona G.P, Isaia G.: *Risedronate Reduces Osteoclast Precursors and Cytokine Production in Postmenopausal Osteoporotic Women.* J. Bone Miner. Res. (in corso di stampa) 2007.
9. D'Amelio P, Grimaldi A., Pescarmona G.P, Tamone C., Roato I., Isaia G.: *Spontaneous osteoclast formation from peripheral blood mononuclear cells in postmenopausal osteoporosis.* Faseb J. 19, 410-412, 2005.
10. D'Amelio P, Panattoni G.L., Di Stefano M., Isaia G.C.: *Bone mineral density in the growing human mandible.* J. Craniofac. Genet. Dev. Biol. 20, 201-205, 2000.
11. D'Amelio P, Panattoni G.L., Di Stefano M., Nassisi R., Violino D., Isaia G.C.: *Densitometric study of dry human mandible.* J. Clin. Densitom. 5, 363-367, 2002.
12. D'Amelio P, Panattoni G.L., Isaia G.C.: *Densitometric study of human developing dry bones: a review.* J. Clin. Densitom. 5, 73-78, 2002.
13. D'Amelio P, Pescarmona G.P, Gariboldi A., Isaia G.C.: *High density lipoproteins (HDL) in women with postmenopausal osteoporosis: a preliminary study.* Menopause 8, 429-432, 2001.
14. D'Amelio P, Tamone C., Pluviano F., Di Stefano M., Isaia G.: *Effects of lifestyle and risk factors on bone mineral density in a cohort of Italian women: suggestion for a new decision rule.* Calcif. Tissue Int. 77, 72-78, 2005.
15. Di Stefano M., Sciolla A., D'Amelio P, Panattoni G.L., Isaia G.C.: *Prenatal growth and ossification patterns of the human femur: a preliminary densitometric study.* Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 71, 281-284, 1995.
16. Dobnig H., Hofbauer L.C., Viereck V., Obermayer-Pietsch B., Fahrleitner-Pammer A.: *Changes in the RANK ligand/osteoprotegerin system are correlated to changes in bone mineral density in bisphosphonate-treated osteoporotic patients.* Osteoporos. Int. 17, 693-703, 2006.
17. Eghbali-Fatourehchi G., Khosla S., Sanyal A., Boyle W.J., Lacey D.L., Riggs B.L.: *Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women.* J. Clin. Invest. 111, 1221-1230, 2003.
18. Giuliani N., Colla S., Sala R., Moroni M., Lazzaretti M., La Monica S., Bonomini S., Hojden M., Sammarelli G., Barille S., Bataille R., Rizzoli V.: *Human myeloma cells stimulate the receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) in T lymphocytes: a potential role in multiple myeloma bone disease.* Blood 100, 4615-4621, 2002.
19. Heng T.S., Goldberg G.L., Gray D.H., Sutherland J.S., Chidgey A.P., Boyd R.L.: *Effects of castration on thymocyte development in two different models of thymic involution.* J. Immunol. 175, 2982-2993, 2005.
20. Hofbauer L.C., Kuhne C.A., Viereck V.: *The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases.* J. Musculoskelet. Neuronal Interact. 4, 268-275, 2004.
21. 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.

22. Isaia G., D'Amelio P., Di Bella S., Tamone C.: *Protein intake: the impact on calcium and bone homeostasis*. J. Endocrinol. Invest. 30, 48-53, 2007.
23. Lee S.K., Kalinowski J.F., Jastrzebski S.L., Puddington L., Lorenzo J.A.: *Interleukin-7 is a direct inhibitor of in vitro osteoclastogenesis*. Endocrinology 144, 3524-3531, 2003.
24. Marangella M., Di Stefano M., Casalis S., Berutti S., D'Amelio P., Isaia G.C.: *Effects of potassium citrate supplementation on bone metabolism*. Calcif. Tissue Int. 74, 330-335, 2004.
25. Pan B., Farrugia A.N., To L.B., Findlay D.M., Green J., Lynch K., Zannettino A.C.: *The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF-alpha converting enzyme (TACE)*. J. Bone Miner. Res. 19, 147-154, 2004.
26. Panattoni G.L., D'Amelio P., Di Stefano M., Isaia G.C.: *Ossification centers of human femur*. Calcif. Tissue Int. 66, 255-258, 2000.
27. Panattoni G.L., D'Amelio P., Di Stefano M., Sciolla A., Isaia G.C.: *Densitometric study of developing femur*. Calcif. Tissue Int. 64, 133-136, 1999.
28. Pescarmona G.P., D'Amelio P., Morra E., Isaia G.C.: *Haptoglobin genotype as a risk factor for postmenopausal osteoporosis*. J. Med. Genet. 38, 636-638, 2001.
29. Pietschmann P., Grisar J., Thien R., Willheim M., Kersch-Schindl K., Preisinger E., Peterlik M.: *Immune phenotype and intracellular cytokine production of peripheral blood mononuclear cells from postmenopausal patients with osteoporotic fractures*. Exp. Gerontol. 36, 1749-1759, 2001.
30. Rodan G.A., Martin T.J.: *Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption - a hypothesis*. Calcif. Tissue Int. 34, 311, 1982.
31. Rogers M.J., Chilton K.M., Coxon F.P., Lawry J., Smith M.O., Suri S., Russell R.G.: *Bisphosphonates induce apoptosis in mouse macrophage-like cells in vitro by a nitric oxide-independent mechanism*. J. Bone Miner. Res. 11, 1482-1491, 1996.
32. 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. USA 98, 13960-13965, 2001.
33. Sahni M., Guenther H.L., Fleisch H., Collin P., Martin T.J.: *Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts*. J. Clin. Invest. 91, 2004-2011, 1993.
34. Sutherland J.S., Goldberg G.L., Hammett M.V., Uldrich A.P., Berzins S.P., Heng T.S., Blazar B.R., Millar J.L., Malin M.A., Chidgey A.P., Boyd R.L.: *Activation of thymic regeneration in mice and humans following androgen blockade*. J. Immunol. 175, 2741-2753, 2005.
35. 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. USA 100, 125-130, 2003.
36. Vitte C., Fleisch H., Guenther H.L.: *Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption*. Endocrinology 137, 2324-2333, 1996.
37. 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.
38. Weitzmann M.N., Cenci S., Rifas L., Brown C., Pacifici R.: *Interleukin-7 stimulates osteoclast formation by up-regulating the T-cell production of soluble osteoclastogenic cytokines*. Blood 96, 1873-1878, 2000.

## ONDE D'URTO AD ALTA ENERGIA: EFFETTI BIOLOGICI E NUOVE PROSPETTIVE TERAPEUTICHE

*R. Frairia, R. Canaparo, L. Serpe, M.G. Catalano, L. Berta*

Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Università di Torino

Key words: *High energy shock waves / Onde d'urto extracorporee  
HESW / HESW  
Shockwave therapy / Shock waves  
Cytotoxicity / Citotossicità  
Apoptosis / Apoptosi  
Chemotherapy / Chemioterapia*

### **Abstract:**

High energy shock waves (HESW) have been described to alter growth characteristics of tumor cells *in vitro* and *in vivo*. Different tumor lines of human and animal origin have been studied in order to get deeper in the mechanisms of interactions of ultrasound shock waves and tumors. Moreover, a significant enhancement of the cytotoxic effect of some anticancer agents on tumor cell suspensions has been obtained by the combination with HESW. We describe the response of a human breast cancer cell line (MCF-7) to the combined effect of HESW generated by a piezoelectric device and paclitaxel, an antimicrotubular agent with significant activity against a variety of solid tumors, including breast cancer. A dose-dependent impairment of cell viability was observed after HESW treatment (250 to 2000 shock waves). Single HESW treatment produced no significant growth inhibition. Combined exposure to paclitaxel (ranging 0.1 nM to 20  $\mu$ M) and HESW resulted in a significant reduction of MCF-7 cell proliferation at day 3 after treatment in respect with cells treated with paclitaxel alone. Notably, a cell viability reduction of about 50% was obtained after combined treatment with HESW and 10 nM paclitaxel, in front of a reduction of only 40% using 10  $\mu$ M paclitaxel alone. Moreover, an earlier induction as well as an enhancement of apoptosis was observed in cells subjected to combined treatment with HESW and paclitaxel. In conclusion, HESW can enhance paclitaxel cytotoxicity in MCF-7 cells, thus allowing the treatment with lower doses of drug. Since shock waves can be well focused even deep in the body, their combination with paclitaxel may be applicable in the treatment of breast carcinoma by implementing local action of the drug. Current treatment strategies for many cancers include surgery, ionizing radiation and chemotherapy. Other treatment schedules are worth to be explored to evaluate the potential utility of HESW in cancer therapy, especially in combination with other modalities.

**Riassunto:**

È stato osservato da numerosi Autori che le onde d'urto ad alta energia (High Energy Shock Waves, HESW) sono in grado di alterare le caratteristiche di crescita di cellule tumorali, sia *in vitro*, sia *in vivo*. Diverse linee cellulari di origina animale o umana sono state oggetto di studio al fine di comprendere il meccanismo di interazione fra le onde d'urto (onde acustiche) e la neoplasia. Inoltre, un incremento significativo dell'effetto citotossico e citolitico di alcuni farmaci antitumorali è stato ottenuto su sospensioni di cellule tumorali sottoposte al trattamento combinato con onde d'urto ad alta energia. In questo lavoro si descrive la risposta al trattamento con onde d'urto ad alta energia (HESW, prodotte da un generatore piezoelettrico) di una linea cellulare di carcinoma mammario umano estrogeno-dipendente (MCF-7), avendo valutato anche l'effetto combinato del trattamento con onde d'urto e paclitaxel, un farmaco chemioterapico con azione antimicrotubulare, attivo nei confronti di una varietà di tumori solidi, incluso il carcinoma mammario. Al giorno 3 dopo il trattamento combinato, la vitalità delle cellule trattate (HESW + paclitaxel, range 0.1 nM - 20µM), era significativamente ridotta rispetto alle cellule sottoposte solo a paclitaxel. Da rilevare la riduzione del 50% della vitalità cellulare dopo trattamento combinato (HESW + paclitaxel 10 nM) rispetto ad una riduzione del 40% dopo esposizione a solo paclitaxel 10 µM. Nelle cellule sottoposte a trattamento combinato si osservava inoltre una più precoce e più intensa induzione di apoptosi. Dal momento che le onde d'urto possono essere ben focalizzate anche per raggiungere tessuti profondi nel corpo, la loro combinazione con il paclitaxel potrebbe essere applicata nel trattamento del carcinoma mammario, potenziando così l'azione locale del farmaco. Si intravede la possibilità di allestire nuovi schemi di terapia antineoplastica che prevedano l'applicazione delle onde d'urto al fine di migliorare l'indice terapeutico dei farmaci citostatici.

## INTRODUZIONE

Le onde d'urto (Extracorporeal Shock Waves, ESW) sono particolari onde acustiche presenti nella vita di ogni giorno: il rumore di un tuono o di una esplosione, l'applauso di una folla, sono tipici esempi. Attraverso le onde d'urto, l'energia può essere trasmessa a distanza: per esempio, un aereo che rompe la barriera del suono genera un rumore molto intenso che può determinare la frantumazione di vetri anche a grande distanza. La prima volta che fu documentata l'azione delle onde d'urto sui tessuti umani risale alla II Guerra Mondiale, quando si riscontrarono lesioni polmonari in alcuni naufraghi in seguito allo scoppio di bombe sottomarine<sup>(28)</sup>. Negli anni successivi iniziarono ricerche sperimentali volte a studiare gli effetti delle shock waves sui tessuti biologici.

Tra il 1968 e il 1971 in Germania fu indagata l'interazione tra onde d'urto e tessuti negli animali: si dimostrò la capacità delle onde d'urto di produrre effetti biologici anche a grande distanza. Fu osservato che le shock waves provocavano minimi effetti collaterali attraversando muscoli, tessuto adiposo, connettivo e tessuto osseo<sup>(19)</sup>. Questi studi portarono successivamente a ipotizzare la possibile frantumazione dei calcoli renali mediante shock waves: risale al 1971 la prima disintegrazione *in vitro* di un calcolo renale con onde d'urto<sup>(17)</sup>.

Nel 1980 venne descritta la prima procedura di frantumazione di calcoli (litotripsia) con shock waves in un paziente affetto da litiasi renale<sup>(7)</sup>. Da allora la litotripsia con onde d'urto ha avuto un impatto drammatico sul trattamento della litiasi delle vie urinarie e nell'arco di pochi anni è diventata in tutto il mondo la terapia d'elezione per la calcolosi renale ed ureterale. Negli anni a seguire si iniziò ad adottare la litotripsia nel trattamento della litiasi anche in altri distretti, in particolare a livello del pancreas, delle ghiandole salivari e delle vie biliari<sup>(21,46,47)</sup>.

I primi studi sull'azione delle shock waves sull'osso dimostrarono che il tessuto osseo sano non veniva danneggiato; al contrario, le esperienze condotte su animali evidenziarono addirittura che le onde d'urto favorivano l'osteogenesi, stimolando il consolidamento delle fratture<sup>(18)</sup>. Sulla scia di queste ricerche, a partire dagli anni 90, la terapia con onde d'urto è entrata progressivamente in uso in campo ortopedico, applicata ad un numero sempre maggiore di patologie muscolo-scheletriche. L'associazione internazionale per la terapia ad onde d'urto (ISMST, International Society for Medical Shockwave Therapy) ha riconosciuto, nel 1996, **quattro indicazioni cliniche elettive in ortopedia**: la tendinosi calcifica della spalla, lo sperone calcaneare con fascite plantare, l'epicondilite e la pseudoartrosi.

## DEFINIZIONE DI ONDA D'URTO

L'onda d'urto è caratterizzata da una transitoria alterazione di pressione che si propaga tridimensionalmente nello spazio. È un'onda acustica sul cui fronte di avanzamento la pressione si eleva, nel volgere di frazione di nanosecondi ( $10^{-9}$  secondi), dal livello della pressione atmosferica (1.01-1.02 Bar) sino a valori compresi fra 10 e 100 MegaPascal (1 Mpa = 10 Bar) cioè sino a 100-1000 volte la pressione atmosferica<sup>(35)</sup>. La fase iniziale di rapido aumento della pressione è seguita da un decremento pressorio della durata di alcuni microsecondi. Il range di frequenza è compreso tra 16 Hz e 20 MHz. La velocità di propagazione dell'onda d'urto è determinata dal mezzo in cui si propaga (si definisce impedenza acustica la resistenza di un mezzo alla diffusione dell'onda) e dall'intensità dell'onda stessa. Nei tessuti, lo spessore del fronte di shock (la distanza fra il punto in cui si è raggiunta la massima ampiezza di pressione e il punto in cui prevale nuovamente la pressione atmosferica) varia fra 1 e 6 micrometri. Le pareti cellulari, che hanno spessore di pochi strati molecolari, sono perciò sottoposte a **gradienti pressori elevatissimi** al transitare delle onde d'urto.

## GENERATORI DI ONDE D'URTO

I generatori di onde d'urto possono essere elettroidraulici, piezoelettrici oppure elettromagnetici.

### Generatori elettroidraulici

Sono gli apparecchi di prima generazione impiegati per il trattamento in ambito medico. Il meccanismo di azione è simile a quello della candela di un motore a scoppio: un alto voltaggio viene applicato tra due elettrodi posizionati nel fuoco di un riflettore ellissoidale pieno d'acqua, provocando così una scarica elettrica all'interno dello stesso. La scarica elettrica scalda e vaporizza l'acqua circostante, provocando la formazione di piccole bolle di gas. L'istantanea espansione e la successiva implosione di queste bolle determinano la formazione dell'onda d'urto, che, a sua volta, viene riflessa attraverso la parete metallica dell'ellissoide e rifocalizzata in un secondo punto focale. Quest'ultimo deve corrispondere alla regione anatomica da sottoporre al trattamento.

### Generatori elettromagnetici

Si dividono in 2 categorie: quelli con bobina piatta e lente focalizzante e quelli, tecnologicamente più avanzati, che adottano una bobina cilindrica



circondata da una membrana metallica: questa, espandendosi, trasforma la tensione applicata alla bobina in un'onda meccanica (onda d'urto) che viene riflessa e focalizzata sull'area da trattare mediante un paraboloide. Anche per questi generatori occorre un accurato "puntamento" della zona da trattare: questo si può ottenere mediante una sonda ecografia posizionata all'interno della bobina cilindrica, in modo da risultare coassiale rispetto alla sorgente di onde d'urto. Occorre assicurare differenti livelli di energia a seconda del quadro patologico: bassi livelli energetici per flogosi tendinee, livelli medi per tendinosi calcaree, alti livelli per pseudoartrosi o ritardi di consolidamento osseo dopo frattura.

### **Generatori piezoelettrici**

Un elevato numero di cristalli di quarzo posizionati all'interno di una semisfera viene sottoposto una rapida scarica elettrica. Questo determina una deformazione dei cristalli (effetto piezoelettrico) che induce un impulso pressorio nell'acqua circostante, generando un'onda d'urto. La disposizione geometrica dei cristalli all'interno della semisfera, determina la focalizzazione dell'onda a livello di un punto focale corrispondente all'area da trattare.

## **EFFETTI DELLE ONDE D'URTO SUI TESSUTI**

Gli effetti biologici delle onde d'urto non sono limitati alla sola frammentazione di concrezioni. Sono anche stati dimostrati la stimolazione della formazione ossea in casi di ritardata guarigione di fratture e l'induzione della guarigione di tendinopatie acute e croniche<sup>(5,18)</sup>. I meccanismi biologici alla base dell'azione delle onde d'urto a livello cellulare sono tutt'ora conosciuti solo in parte.

La elevazione quasi istantanea della pressione è responsabile dell'effetto "diretto o primario" delle onde d'urto: una tensione molto elevata a livello delle interfacce tra tessuti con differenti impedenze acustiche provoca la rottura della struttura stessa del materiale. Questo effetto dipende dalla plasticità del materiale: per esempio, l'energia di un onda d'urto che è in grado di disintegrare un calcolo renale ha minimi effetti sui tessuti corcostanti.

La componente elastica dell'onda d'urto, che determina la caduta della pressione, è responsabile dell'effetto "indiretto o secondario": nei tessuti ad elevato contenuto liquido si ha la formazione di microscopiche bolle di gas (effetto cavitazionale)<sup>(10)</sup>. Una successiva onda d'urto a elevata pressione

colpisce la bolla gassosa formata in precedenza, la deforma e ne provoca il collasso. Ne deriva la formazione di un microgetto d'acqua (*jet-stream*) che viene accelerato enormemente dal campo di bassa pressione che si genera all'interno della microbolla gassosa subito dopo l'implosione. Il microgetto d'acqua raggiunge velocità elevatissime, da 100 a 800 metri/secondo. Nei tessuti si vengono così a creare delle microlesioni la cui entità è in funzione del numero degli impulsi e della loro energia<sup>(10)</sup>.

Oltre alle microlesioni provocate per effetto meccanico dai *jet-streams*, interviene, sia nell'osso che nei tessuti molli, un effetto a livello vascolare<sup>(48)</sup>. A carico dell'endotelio si rileva un danno cellulare la cui entità è in funzione dell'energia erogata e del numero degli impulsi ("colpi") applicati. Inoltre, all'interno delle cellule endoteliali, si generano delle *stress fibers*, fibrille di actina intracellulare, che determinano una retrazione dei margini cellulari, con incremento della permeabilità capillare. Nel contempo, intervengono fenomeni riparativi, di rivascularizzazione (neocapillarogenesi indotta dall'Endothelial Stimulating Angiogenic Factor liberato dalle cellule endoteliali danneggiate e dai fibroblasti) con incremento del flusso ematico<sup>(10,48)</sup>.

In conseguenza dei microtraumi, con incremento del flusso ematico per neocapillarogenesi riparativa, viene indotta nel tessuto osseo una prevalente risposta di tipo osteogenico, mentre nei tessuti molli, oltre alla risposta di tipo vascolare, viene indotta una risposta antinfiammatoria.

---

Dalla metà degli anni 80 hanno preso avvio studi sulla possibile applicazione in campo oncologico delle modificazioni indotte dalle shock waves a livello cellulare. Alla base di questa idea vi era la supposizione che, così come le onde d'urto erano in grado di determinare un danno in organi come il rene, la colecisti, il fegato, il polmone, così avrebbero potuto indurre analoghe alterazioni nei tumori, determinando la necrosi e bloccando la crescita del tessuto tumorale. In numerosi esperimenti *in vivo*, si è dimostrato che le onde d'urto sono in grado di bloccare temporaneamente la crescita tumorale e, in alcuni casi, di portare al completo controllo del tumore<sup>(15,20,44)</sup>. Risulta determinante sia il numero di trattamenti, sia l'intervallo fra le applicazioni: per osservare un effetto significativo, è necessario un trattamento con un elevato numero di colpi su volumi tumorali relativamente piccoli. Inoltre, è stato dimostrato che il trattamento con onde d'urto è in grado di ridurre temporaneamente il flusso ematico a livello del tessuto neoplastico<sup>(8)</sup>.

## **EFFETTI *IN VITRO* DELLE ONDE D'URTO**

Ad oggi, numerosi sono gli studi sugli effetti delle onde d'urto su cellule benigne e maligne *in vitro*<sup>(40,45,55)</sup>. Una notevole difficoltà nel comparare le varie osservazioni è costituita dalla grande eterogeneità di variabili meccaniche, biologiche ed analitiche presenti in ogni procedura sperimentale. Gli studi *in vitro* hanno dimostrato che il trattamento con shock waves determina una riduzione della vitalità cellulare immediata e nella capacità di formare colonie<sup>(44,51)</sup>. L'impatto delle onde d'urto sulla sopravvivenza cellulare varia non soltanto con il tipo cellulare, ma anche tra linee cellulari dello stesso tipo<sup>(51)</sup>. Si è ipotizzato che le cellule in fase G2-M del ciclo cellulare possano essere più facilmente danneggiate dalle onde d'urto rispetto a cellule in fase G-0.

Per quanto riguarda il meccanismo con cui le shock waves inducono danno cellulare, sono state avanzate numerose ipotesi. Basandosi sul fatto che nelle cellule immobilizzate in agar non veniva dimostrato alcun danno cellulare, Brummer et al. proposero che le collisioni cellula-cellula potessero avere un ruolo nel modificare la vitalità cellulare<sup>(4)</sup>; venne successivamente dimostrato che la vitalità cellulare non veniva influenzata dal variare della concentrazione cellulare<sup>(51)</sup>. Venne anche ipotizzato un possibile ruolo dei radicali liberi generati dalle shock waves nell'indurre danno cellulare<sup>(37)</sup>.

Attualmente l'ipotesi più accreditata sul meccanismo di danno cellulare indotto dalle onde d'urto è quella della cavitazione e della generazione di *jet streams* nell'ambiente extracellulare. Nelle cellule in agar o gelatina non si ha cavitazione ed il danno cellulare è minimo<sup>(4,30)</sup>. Le modificazioni che si riscontrano più precocemente sono il rigonfiamento e la frammentazione dei mitocondri<sup>(44)</sup>; altre modificazioni includono la dilatazione del reticolo endoplasmatico, la segmentazione nucleare, le alterazioni della morfologia della membrana cellulare<sup>(44)</sup>. Il danno di membrana si correla con l'alterata capacità delle cellule trattate di attaccarsi alle piastre di coltura, di produrre colonie in agar e di resistere agli effetti dannosi dei farmaci chemioterapici. In contrasto, non sono stati osservati danni alla cromatina nucleare.

Le onde d'urto sono in grado di creare danni letali e subletali alle cellule tumorali *in vitro*. Le cellule che sopravvivono al trattamento sono ancora in grado di formare tumori se inoculate in modelli animali; tuttavia questi tumori sono di dimensioni inferiori rispetto ai controlli (non trattati con onde d'urto) in quanto una notevole percentuale (dal 40 al 60%) delle cellule vive inoculate presenta danni subletali indotti dalle shock waves<sup>(44)</sup>.

Numerosi studi hanno dimostrato che il trattamento combinato di cellule tumorali in sospensione mediante alcuni farmaci antitumorali e onde

d'urto determina un potenziamento significativo dell'azione citotossica dei chemioterapici<sup>(16,23,24,40,42,53,54)</sup>.

Si è osservato che le onde d'urto, quando applicate a cellule *in vitro*, sono in grado (anche a bassa energia) di determinare un transitorio incremento della permeabilità delle membrane cellulari, attraverso l'apertura di micropori, permettendo così di ottenere più elevati concentrazioni di farmaco all'interno della cellula<sup>(11,25,26)</sup>.

## **TRATTAMENTO *IN VITRO* DI LINEE CELLULARI NEOPLASTICHE CON ONDE D'URTO E FARMACI CITOSTATICI**

Gli studi sull'azione delle shock waves su linee cellulari tumorali di origine animale e umana hanno preso in considerazione pressochè tutti i tessuti: solo il carcinoma mammario ha ricevuto scarsa attenzione riguardo ad una possibile sensibilità al trattamento con onde d'urto<sup>(13)</sup>. Nel Laboratorio di Endocrinologia del Dipartimento di Fisiopatologia Clinica si è studiata la risposta al trattamento con onde d'urto di una linea cellulare di carcinoma mammario umano estrogeno-dipendente (MCF-7). Inoltre è stato valutato, sulla medesima linea cellulare, l'effetto combinato del trattamento con onde d'urto e paclitaxel, un farmaco chemioterapico con azione antimicrotubulare, attivo nei confronti di una varietà di tumori solidi, incluso il carcinoma mammario<sup>(42,52)</sup>.

Recentemente, la soppressione della proliferazione cellulare indotta da onde d'urto è stata correlata ad un meccanismo apoptotico<sup>(24)</sup>. L'apoptosi, cioè la morte cellulare programmata, è un meccanismo di autodistruzione cellulare, caratterizzata da ben definite alterazioni morfologiche e molecolari, che svolge un ruolo fondamentale nella sorveglianza dell'organismo sui processi tumorali<sup>(49)</sup>. L'induzione di apoptosi si verifica in risposta ad una grande varietà di segnali di stress<sup>(1,12,29)</sup> che possono comprendere anche le onde d'urto<sup>(24)</sup>. In questo studio è stato anche indagata l'induzione di apoptosi nelle cellule MCF-7 in seguito a trattamento combinato mediante onde d'urto e paclitaxel.

## **METODOLOGIA**

### **Colture cellulari**

Sono state utilizzate le cellule MCF-7, linea cellulare di carcinoma mammario umano che presenta positività del recettore per gli estrogeni. Le cellule venivano mantenute in coltura – secondo le metodiche standard – in fiasche da 25 cm<sup>2</sup> a 37°C, 5% di CO<sub>2</sub> e 95% di umidità. Il medium di coltura

era costituito da RPMI 1640 con rosso fenolo, addizionato di 100 UI/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomina e supplementato con 10% di Siero Fetale di Bovino (FCS) inattivato per 30 minuti a 56°C.

### **Trattamento con onde d'urto**

Il generatore di onde d'urto utilizzato per gli esperimenti *in vitro* è un apparecchio piezoelettrico (Piezoson 100, Richard Wolf, Knittlingen, Germania) specificatamente studiato per uso clinico in ortopedia e traumatologia. Lo strumento, messo a disposizione dalla Società Med & Sport 2000 S.r.l. di Torino, è in grado di generare onde d'urto a diverse frequenze (1-4 shocks/secondo) ed intensità (0.05-1.48 mJ/mm<sup>2</sup>). L'apparecchio è costituito da un generatore di corrente elettrica ad alto voltaggio ed un riflettore ripieno d'acqua. Sulla superficie del riflettore, gli elementi piezoelettrici, disposti a formare una semisfera, sono stimolati dal passaggio di corrente elettrica. Ciò determina la vibrazione o la rapida espansione dei cristalli, portando alla formazione di onde d'urto, che si propagano attraverso l'acqua e vengono focalizzate sulla zona da trattare. La pressione nell'area focale è proporzionale al voltaggio applicato. L'energia a livello del punto focale è definita come la densità del flusso di energia (EFD) per impulso<sup>(48)</sup>, espressa come joules per area (mJ/mm<sup>2</sup>). Per uso medico in ortopedia vengono applicate onde d'urto approssimativamente di 0.01-0.6 mJ/mm<sup>2(39)</sup>. L'area focale, che è peculiare in ogni tipo di generatore, è definita come l'area in cui è raggiunto il 50% della massima energia<sup>(53)</sup>: nel Piezoson 100 ha una estensione di 10 mm nella direzione dell'asse dell'onda d'urto ed un diametro di 2.5 mm perpendicolare all'asse.

Aliquote di 500 µl di sospensione cellulare (8 x 10<sup>6</sup> cellule/ml) venivano poste in tubi di polipropilene da 2 ml, che successivamente venivano completamente riempiti di medium di coltura. Ogni tubo veniva posto in allineamento verticale con l'area focale in modo tale che il punto centrale dell'area focale corrispondesse al centro del fondo del tubo. L'unità generatrice di onde d'urto veniva mantenuta in contatto con il tubo attraverso l'interfaccia contenente acqua. Le cellule venivano sottoposte a trattamento con onde d'urto (EFD = 0.25 mJ/mm<sup>2</sup>; pressione positiva di picco 31 MPa, pressione negativa di picco 4.3 MPa) con un numero di colpi compreso tra 100 e 2000 (frequenza = 4 shocks/secondo).

### **Analisi statistica**

I risultati sono espressi come media ± SEM, calcolata su 3 esperimenti differenti. Le analisi statistiche sono state condotte con l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Bonferroni. Il paragone tra gli indici

apoptotici osservati dopo esposizione continua al paclitaxel e quelli riferiti all'effetto ritardato del farmaco, sono stati analizzati con *t* test. Sono stati considerati statisticamente significativi valori di  $P < 0.05$ .

## RISULTATI

### Vitalità cellulare

La vitalità delle cellule MCF-7 è stata valutata (mediante esclusione del trypan blue) prima e dopo il trattamento con shock waves. L'esposizione a 250 colpi era in grado di indurre una significativa riduzione della vitalità cellulare. L'esposizione fino a 1000 colpi lasciava un numero di cellule vitali (> 70%) sufficiente per permettere i successivi trattamenti col farmaco citostatico. Un numero maggiore di colpi riduceva ulteriormente la vitalità cellulare (Figura 1).

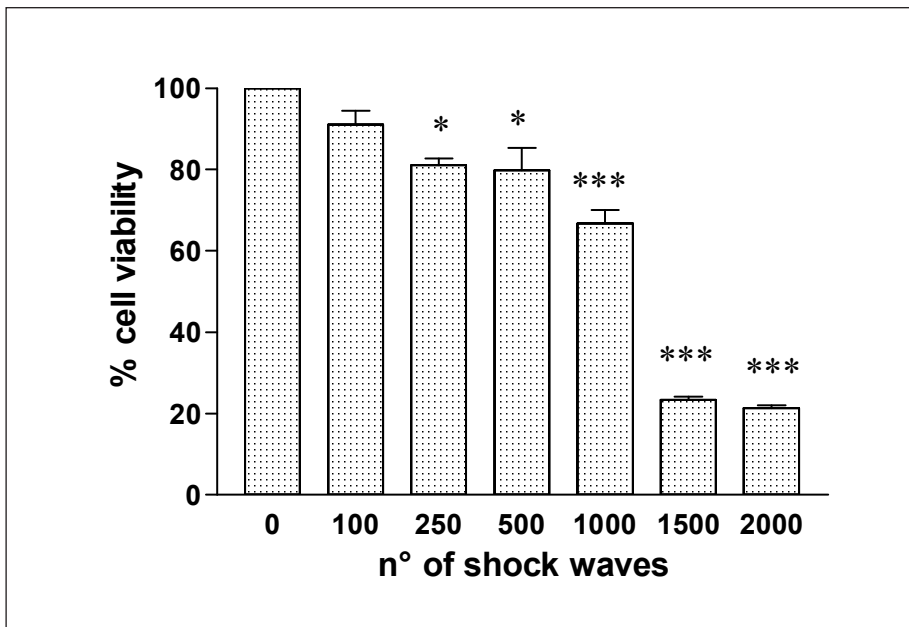


Figura 1. *Vitalità cellulare dopo trattamento con onde d'urto.* La vitalità cellulare è stata determinata con il metodo di esclusione al trypan blu ed espressa come rapporto tra le cellule trattate con onde d'urto tra 100 e 2000 colpi ( $EFD=0.25\text{mJ/mm}^2$ ) e le cellule non trattate (0). I risultati sono espressi come medie  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs 0; \*\*\*  $P < 0.001$  vs 0.

### **Proliferazione cellulare**

La crescita delle cellule MCF-7 trattate con shock waves (range da 100 a 1000 colpi) non era statisticamente differente rispetto al controllo durante l'intero esperimento.

### **Trattamento con paclitaxel**

Prima dell'uso, la soluzione di paclitaxel (5.8 mg/ml; Taxol 100, Bristol-Myers Squibb) veniva diluita in PBS a differenti concentrazioni, da 100 nM a 1 mM. Dopo il trattamento con onde d'urto, le cellule venivano normalizzate a 5000 cellule/100  $\mu$ l, seminate in piastre multiwell da 96 pozzetti e trattate con 0.1 ml di medium, in assenza o in presenza di paclitaxel (0.1, 1, 10, 100 nM; 10, 20  $\mu$ M). Dopo incubazione overnight (16 ore), il medium contenente il farmaco veniva rimosso, le cellule erano lavate con PBS e successivamente veniva aggiunto nuovo medium. Le piastre venivano incubate per una settimana.

### **Studi di proliferazione**

Ai giorni 3, 5, 8 e 13 dopo il trattamento, la crescita delle cellule vitali era valutata con un kit che utilizza 3-(4,5-dimetiltiazol-2,5 difenil tetrazolio bromuro (MTT, Sigma).

Ad ogni pozzetto della piastra venivano aggiunti 10  $\mu$ l di MTT; dopo 4 ore di incubazione, erano aggiunti 100  $\mu$ l di NaCl 0.04 N in isopropanolo e successivamente veniva misurata l'assorbanza a 495 nm usando un lettore di piastre (ETI-System Reader, DiaSorin). Ogni condizione era replicata in 8 pozzetti. La proliferazione delle cellule trattate, veniva calcolata come frazione della proliferazione delle cellule non trattate nel rispettivo esperimento.

### **Determinazione di apoptosi. Valutazione dei nucleosomi con metodica Elisa**

Per gli studi di apoptosi, le cellule venivano trattate con onde d'urto come descritto sopra; dopo il trattamento, venivano seminate in piastre multiwell da 96 pozzetti ed incubate con paclitaxel 200 nM o 20  $\mu$ M. L'apoptosi veniva valutata utilizzando il kit Cell Death Detection ELISA PLUS (Roche), che si basa sull'utilizzo di anticorpi monoclonali diretti rispettivamente verso DNA ed istoni per determinare in maniera specifica la presenza di mono ed oligonucleosomi nella frazione citoplasmatica dei lisati cellulari.

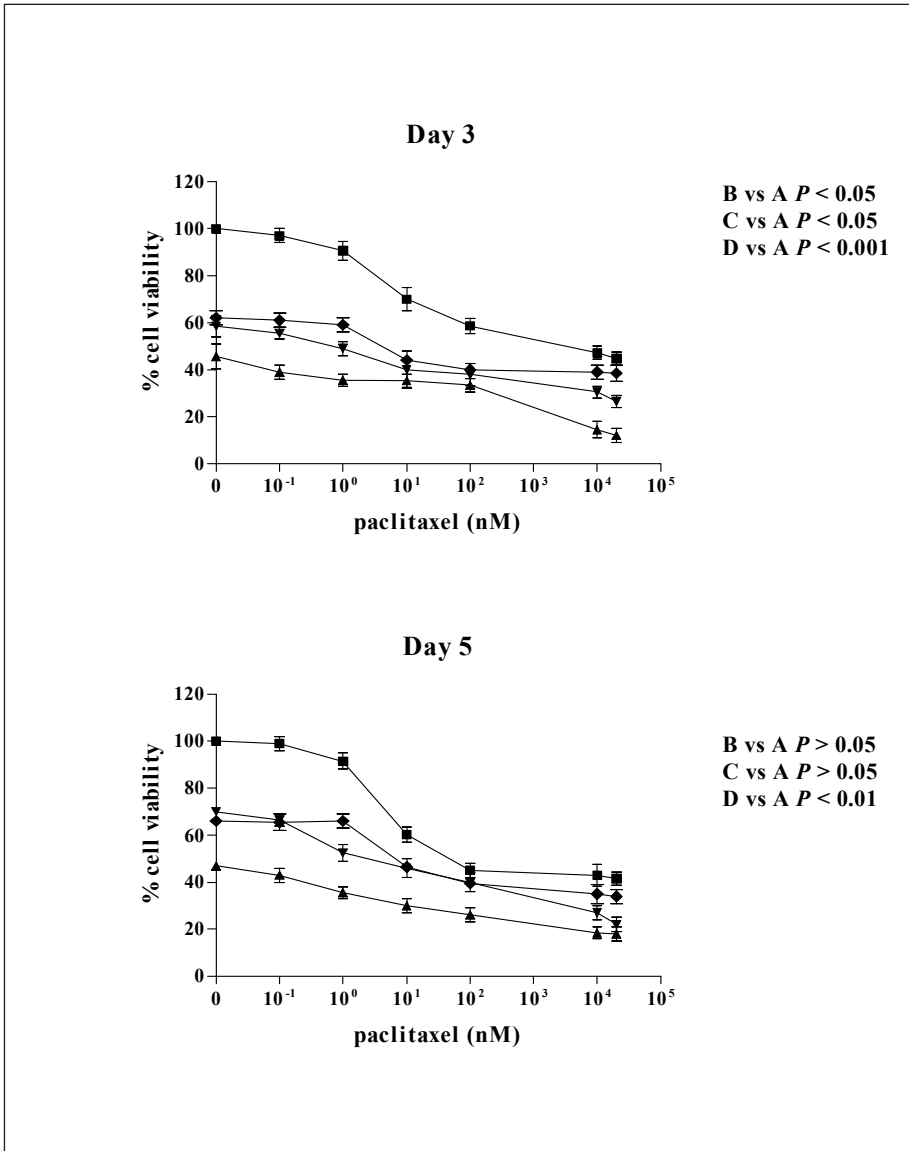


Figura 2. Effetto delle onde d'urto sulla sensibilità delle MCF-7 al paclitaxel. Cellule non trattate con onde d'urto (A; ■) e dopo trattamento con 100 (B; ◆), 500 (C; ▼) e 1000 (D; ▲) colpi sono state trattate con paclitaxel da 0.1 nM a 20  $\mu$ M. Dopo il trattamento, le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti. Dopo un' incubazione di 16 ore, il terreno contenente il paclitaxel è stato rimosso e la vitalità cellulare è stata valutata ai giorni 3 e 5 dopo la semina. La vitalità cellulare è stata determinata come rapporto tra le cellule trattate e quelle non trattate (100%). I risultati sono espressi come medie  $\pm$  SEM,  $n = 3$ .



### **Effetto delle onde d'urto sulla citotossicità da paclitaxel**

Nella Figura 2 sono riportati gli effetti della esposizione a 100, 500 e 1000 colpi (EFD = 0.25 mJ/mm<sup>2</sup>) seguiti da incubazione overnight in assenza o in presenza di paclitaxel (da 0.1 nM a 20 µM). A 3 giorni dal trattamento, la vitalità delle cellule trattate con 100, 500 e 1000 colpi + paclitaxel a qualsiasi concentrazione, era significativamente ridotta rispetto a quella delle cellule non sottoposte alle shock waves. Questo effetto sulla vitalità cellulare veniva conservato sino al 5° giorno per le cellule trattate con 1000 colpi, mentre veniva perso in quelle trattate con 100 e 500 colpi. Dopo 8 giorni, non si evidenziava nessuna differenza significativa in tutte le diverse condizioni.

### **Effetto delle onde d'urto e del paclitaxel sull'induzione di apoptosi**

Come sopra descritto, le cellule MCF-7 venivano sottoposte ad esposizione ad onde d'urto da sole (da 100 a 1000 colpi) o seguite da trattamento con paclitaxel 200 nM e 20 µM (esposizione continua per 16, 64, 88 ore o esposizione di 16 ore, seguita da incubazione con medium privo di farmaco). Il trattamento con sole onde d'urto non determinava alcun incremento di apoptosi a 16, 64 e 88 ore dall'applicazione (nessuna differenza statisticamente significativa tra le assorbanze).

Come dimostrato in Figura 3, il trattamento con paclitaxel da solo, induceva apoptosi dopo 64 ore (20 µM,  $P < 0.05$ ) e dopo 88 ore (200 nM e 20 µM,  $P < 0.001$ ) di esposizione continua al farmaco. Veniva anche evidenziata apoptosi come un effetto ritardato del farmaco a 88 ore (200 nM e 20 µM,  $P < 0.01$ ).

Quando le cellule venivano trattate con 500 o 1000 colpi, si osservava un significativo aumento dell'apoptosi dopo 64 e 88 ore di esposizione continua a paclitaxel 200 nM, oltre ad un significativo effetto ritardato a 88 ore. Per quanto riguarda il trattamento con paclitaxel 20 µM, l'esposizione ad onde d'urto (500 e 1000 colpi) induceva un significativo aumento di apoptosi già dopo 16 ore di esposizione al farmaco, con un ulteriore aumento dopo 64 e 88 ore di esposizione continua; veniva anche osservato un effetto ritardato sull'induzione di apoptosi.

### **Western Blot su PARP**

Il clivaggio della poli-ADP riboso polimerasi (PARP), rappresenta un marker di attivazione delle caspasi; attraverso western blot veniva valutata la presenza nei lisati cellulari della forma clivata (89 kDa). Dopo 16 ore di esposizione continua, il clivaggio di PARP era evidente solo dopo il trattamento combinato di onde d'urto (500 o 1000 colpi) e paclitaxel 20 µM (Figura 4).

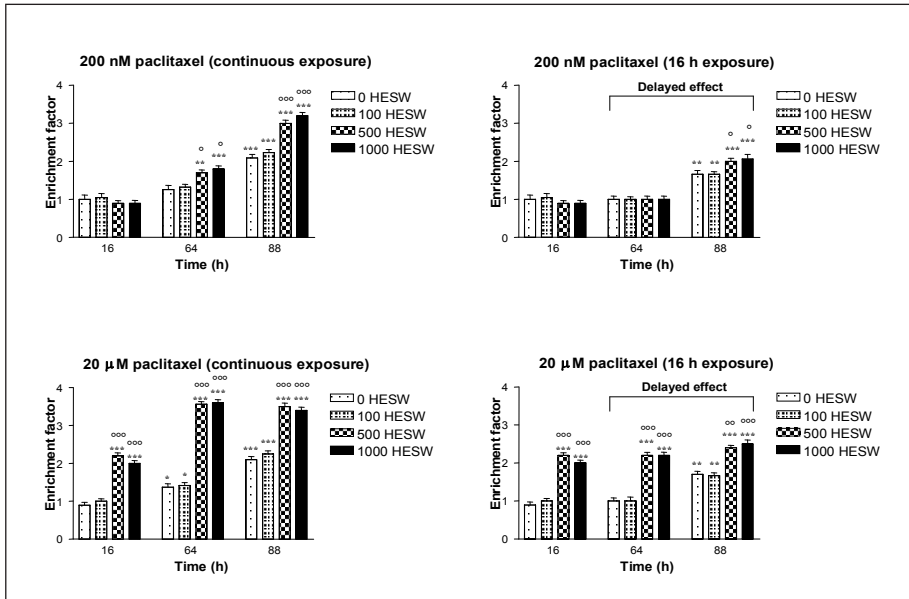
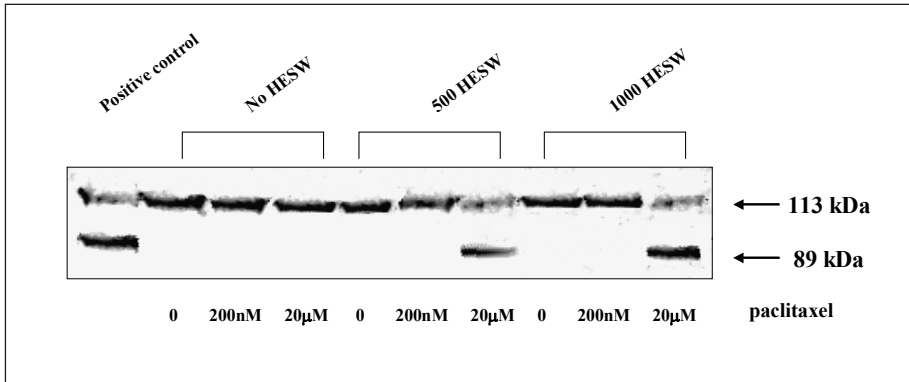


Figura 3. Valutazione mediante test ELISA del complesso DNA-istone nel citoplasma di cellule MCF-7 trattate con onde d'urto (HESW) ed esposte a paclitaxel. Le cellule non trattate (0 HESW) e quelle esposte a 100, 500 e 1000 colpi, rispettivamente, erano incubate in presenza di differenti concentrazioni (200 nM; 20 μM) di paclitaxel per i seguenti tempi: a) 16 ore, 64 ore oppure 88 ore e quindi sottoposte al test ELISA; b) 16 ore, quindi lavate e incubate in medium senza paclitaxel, successivamente, sottoposte al test ELISA dopo 64 oppure 88 ore per valutare l'effetto ritardato del farmaco. Enrichment factor = rapporto fra i valori di assorbanza misurati nelle cellule trattate e i valori misurati nei rispettivi controlli. I risultati sono espressi come media + ES; n = 3. Significatività vs cellule non esposte al paclitaxel: \*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$ . Significatività vs cellule non trattate con onde d'urto (0 HESW): °°°  $P < 0.001$ ; °°  $P < 0.01$ ; °  $P < 0.05$ .

## CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

In questo studio si è stato dimostrato che le cellule MCF-7 sono sensibili al trattamento con onde d'urto: è stata osservata una correlazione tra la riduzione della vitalità cellulare e l'aumento del numero dei colpi applicati, in accordo con la già dimostrata riduzione della vitalità cellulare conseguente al trattamento con onde d'urto su svariate linee cellulari, sia normali che neoplastiche<sup>(9,20,36,54)</sup>. La proliferazione cellulare non sembra essere influenzata negativamente da trattamento con sole onde d'urto: tuttavia, il trattamento combinato con paclitaxel e onde d'urto determina una significativa inibizione della proliferazione delle cellule MCF-7.



**Figura 4. Clivaggio dell'enzima PARP dopo trattamento con onde d'urto e paclitaxel.** Cellule non trattate o trattate con 500 e 1000 colpi, sono state esposte al paclitaxel (200 nM; 20  $\mu$ M) per 16 ore. Le proteine sono state estratte e sottoposte ad elettroforesi su SDS-PAGE all'8%. Il clivaggio di PARP è stato valutato con tecnica di western blotting utilizzando un anticorpo anti-PARP (1:2000) che rileva la presenza della proteina intera (113 kDa) e del frammento di clivaggio (89 kDa).

Il paclitaxel è un agente chemioterapico utilizzato in monoterapia nel trattamento di donne con carcinoma mammario in stadio avanzato<sup>(41)</sup>. Il meccanismo con cui il paclitaxel esplica la sua azione citotossica, è quello della stabilizzazione dei microtubuli; in questo modo interferisce con le alterazioni dinamiche che si verificano durante la formazione del fuso mitotico, portando così all'arresto della mitosi e alla conseguente induzione della morte cellulare<sup>(22)</sup>.

È stata valutata la proliferazione cellulare per 8 giorni dopo il trattamento combinato onde d'urto-paclitaxel. La riduzione della vitalità cellulare dopo il trattamento combinato, raggiungeva valori significativi rispetto al trattamento col solo farmaco, al terzo giorno, indipendentemente dal tipo di schema di trattamento con onde d'urto utilizzato. Al giorno 5, solo le cellule trattate con 1000 colpi + paclitaxel raggiungevano una riduzione significativa della vitalità rispetto a quelle trattate con solo paclitaxel.

Questi dati concordano con gli studi precedenti, che indicavano un effetto immediato delle onde d'urto nel potenziamento dell'effetto citotossico di alcuni chemioterapici su differenti linee cellulari, attraverso un temporaneo incremento della permeabilità di membrana<sup>(16,23,24)</sup>.

È noto che gli agenti chemioterapici con azione verso i microtubuli provocano l'arresto mitotico e possono indurre l'apoptosi nelle cellule

neoplastiche. L'esistenza di diversi meccanismi apoptotici e la differente risposta al paclitaxel, evidenziata in tipi cellulari diversi, ha portato allo sviluppo di linee di ricerca volte allo studio delle vie di traduzione del segnale apoptotico indotto dai taxani<sup>(2,6,52)</sup> e alla esplorazione di nuovi schemi di trattamenti combinati in grado di sensibilizzare l'apoptosi cellulare indotta dal paclitaxel<sup>(3,32)</sup>.

Nei nostri esperimenti, l'esposizione a paclitaxel, in assenza di trattamento con onde d'urto, era in grado di indurre apoptosi dopo 64 ore di esposizione continua al farmaco (20  $\mu$ M); l'esposizione continua al farmaco per 88 ore induceva apoptosi, sia nelle cellule trattate con paclitaxel 200 nM, che in quelle trattate con paclitaxel 20  $\mu$ M. Nel trattamento combinato con alte dosi di paclitaxel (20  $\mu$ M) e onde d'urto (rispettivamente 500 e 1000 colpi) è stata osservata una più precoce induzione di apoptosi. Dopo 64 e 88 ore di trattamento, le onde d'urto (500 e 1000 colpi), erano in grado di aumentare l'effetto apoptotico del paclitaxel in tutte le condizioni.

PARP è un enzima associato alla cromatina che, in risposta ad un danno del DNA, si lega ai frammenti della catena del DNA e va incontro ad automodificazione, formando lunghi polimeri di poli (ADP) ribosio<sup>(33)</sup>. Nel nostro studio si è dimostrato il clivaggio di PARP in condizioni di aumentata apoptosi, confermando così che questa proteina può essere utilizzata come indicatore di apoptosi indotta non solo da agenti che danneggiano il DNA, ma anche da farmaci con azione anti-microtubuli<sup>(34)</sup>.

Al momento attuale non è noto in dettaglio il meccanismo di interazione delle onde d'urto con i tessuti biologici. Il danno del DNA intracellulare e la lisi cellulare sono stati attribuiti, oltre che al meccanismo della cavitazione, anche agli effetti dello stress meccanico conseguente alle oscillazioni pressorie determinate dall'onda d'urto<sup>(20)</sup>. Le nostre esperienze indicano che le onde d'urto provocano un danno cellulare acuto e inducono una aumentata suscettibilità delle cellule MCF-7 al paclitaxel. Si pensa che le onde d'urto agiscano inducendo un temporaneo aumento della permeabilità della membrana cellulare, permettendo così a farmaci citotossici e anche a grandi molecole, di essere trasferiti all'interno delle cellule<sup>(11,25,26, 27,31,50)</sup>. L'incremento dell'effetto apoptotico del paclitaxel potrebbe essere la conseguenza dell'aumentata permeabilità della membrana cellulare indotta dalle onde d'urto.

Dal momento che le onde d'urto possono essere ben focalizzate anche per raggiungere tessuti profondi nel corpo, la loro combinazione con il paclitaxel potrebbe essere applicata nel trattamento del carcinoma mammario, potenziando così l'azione locale del farmaco.

Finora le strategie terapeutiche per il trattamento della maggior parte delle neoplasie includono la chirurgia, la radioterapia e la chemioterapia. Devono ancora essere esplorati nuovi schemi terapeutici per valutare la potenziale utilità delle onde d'urto nella terapia antineoplastica, soprattutto in combinazione ad altre modalità.

## **Riassunto**

La litotripsia, ovvero la procedura atta a frantumare i calcoli (renali, biliari, salivari) mediante le onde d'urto (Extracorporeal Shock Waves, ESW), è nota da oltre vent'anni. Nel 1980 venne descritto il primo trattamento con le onde d'urto su un paziente affetto da calcolosi renale. Da allora, la letteratura medica internazionale sull'applicazione di questa forma di energia si è espansa enormemente e sono ormai diverse centinaia le pubblicazioni scientifiche in campo urologico, gastroenterologico, maxillofaciale. Dalla metà degli anni '90 si è esteso il campo di applicazione delle onde d'urto alle patologie del sistema muscolo-scheletrico e, più recentemente, si è manifestato un crescente interesse per la prospettiva di estendere l'applicazione di questa metodologia anche in campo oncologico. In questo lavoro si descrive la risposta al trattamento con ESW (prodotte da un generatore piezoelettrico) di una linea cellulare di carcinoma mammario umano estrogeno-dipendente (MCF-7), avendo anche valutato l'effetto combinato del trattamento con ESW e paclitaxel, un farmaco chemioterapico con azione antimicrotubulare, attivo nei confronti di una varietà di tumori solidi, incluso il carcinoma mammario. Al giorno 3 dopo il trattamento combinato, la vitalità delle cellule trattate (ESW + paclitaxel, range 0.1 nM - 20 µM) era significativamente ridotta rispetto alle cellule sottoposte solo a paclitaxel. Da rilevare la riduzione del 50% della vitalità cellulare dopo trattamento combinato (ESW + paclitaxel 10 nM) rispetto ad una riduzione del 40% dopo esposizione a solo paclitaxel 10 µM. Nelle cellule sottoposte a trattamento combinato si osservava, inoltre, una più precoce e più intensa induzione di apoptosi. Dal momento che le onde d'urto possono essere ben focalizzate anche per raggiungere tessuti profondi nel corpo, la loro combinazione con il paclitaxel potrebbe essere applicata nel trattamento del carcinoma mammario, potenziando così l'azione locale del farmaco. Si intravede la possibilità di allestire nuovi schemi di terapia antineoplastica che prevedano l'applicazione delle onde d'urto al fine di migliorare l'indice terapeutico dei farmaci citostatici.

## BIBLIOGRAFIA

1. Ashus H., Rozenszajn L.A., Blass M., Barda-Saad M., Azimov D., Radnay J., Zipori D., Rosenschein U.: *Apoptosis induction of human myeloid leukaemia cells by ultrasound exposure*. Cancer Res. 60, 1014-1020, 2000.
2. Bacus S.S., Gudkov A.V., Lowe M., Lyass L., Yung Y., Komarov A.P., Keyomarsi K., Yarden Y., Seger R.: *Taxol induced apoptosis depend on MAP kinase pathways (ERK and p38) and is independent of p53*. Oncogene 20, 147-155, 2001.
3. Beherens P., Brinkmann U., Wellman A.: *CSE1L/CAS: its role in proliferation and apoptosis*. Apoptosis 8, 39-44, 2003.
4. Brummer F., Brenner J., Brauner T. et al.: *Effect of shock waves on suspended and immobilized L1210 cells*. Ultrasound Med. Biol. 15, 229, 1989.
5. Brummer F., Brauner T., Hulsen D.F.: *Biological effects of shock waves*. World J. Urol. 8, 224-232, 1990.
6. Charles A.G., Han T-Y., Liu Y.Y., Hansen N., Giuliano A.E., Cabot M.C.: *Taxol-induced ceramide generation and apoptosis in human breast cancer cells*. Cancer Chemother. Pharmacol. 47, 444-450, 2001.
7. Chaussy C., Brendel W., Schmiedt E.: *Extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves*. Lancet 2, 1265-68, 1980.
8. Cornel E.B., Smits G.A.H., Debruyne F.M.J., Heerschap A., Schalken J.A., Oosterhof G.O.N.: *The effect of successive high energy shock wave administration on tumor blood flow*. Ultrasound Med. Biol. 21, 243-48, 1995.
9. Delius M., Denk R., Berding C., Liebich H.G., Jordan M., Brendel W.: *Biological effects of shock waves: cavitation by shock waves in piglet liver*. Ultrasound Med. Biol. 16: 467-72, 1990.
10. Delius M., Ueberle F., Eisenmenger W.: *Extracorporeal shock waves act by shock wave-gas bubble interaction*. Ultrasound Med. Biol. 24: 1055-59, 1998.
11. Delius M., Adams G.: *Shock wave permeabilization with ribosome inactivating proteins: a new approach to tumor therapy*. Cancer Res. 59: 5227-5232, 1999.
12. Feril Jr L.B., Kondo T., Zhao Q.I., Ogawa R.: *Enhancement of hypertermia induced apoptosis by non-thermal effects of ultrasound*. Cancer Lett. 178: 63-70, 2002.
13. Ferlazzo G., Scisca C., Iemmo R., Quartarone G., Ciccirello R., Gagliardi M.E., Mesiti M.: *Cytotoxic effects of high energy shock waves on cancer cells linked to metallic beads vehicled by monoclonal antibodies*. J. Urol. 157, 366-370, 1997.
14. Folberth W., Kohler G., Rohwedder A., Matura E.: *Pressure distribution and energy flow in the focal region of two different electromagnetic shock wave sources*. J. Stone Dis. 4, 1-7, 1992.
15. Gambihler S., Delius M., Brendel W.: *Biological effects of shock waves: cell disruption, viability, and proliferation of L1210 cells exposed to shock waves in vitro*. Ultrasound Med. Biol. 16, 587-593, 1990.
16. Gambihler S., Delius M.: *In vitro effects of lithotripter shock waves and cytotoxic drugs*. Br. J. Cancer 66, 69-73, 1992.
17. Hausler E., Kiefer W.: *Anregung von stosswellen in flussigkeiten*. Acustica 12, 185-202, 1962.

18. Haupt G.: *Use of extracorporeal shock waves in the treatment of pseudarthrosis, tendinopathy and other orthopedic diseases.* J. Urology 158, 4-11, 1997.
19. Hepp W., Grunewald M., Brendel W.: *Die extrakorporale stosswellen-lithotripsie.* Spektrum der Wissenschaft 7, 44-53, 1991.
20. Huber P.E., Debus J.: *Tumor cytotoxicity in vivo and radical formation in vitro depend on the shock wave-induced cavitation dose.* Radiat. Res. 156, 301-309, 2001.
21. Iro H., Schneider H., Fodra C., Waitz G. et al.: *Shockwave lithotripsy of salivary duct stones.* Lancet 339, 1333-36, 1992.
22. Jordan M.A., Toso R.J., Thrower D., Wilson L.: *Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 9552-9556, 1993.
23. Kambe M., Ioritani N., Kanamaru R.: *Enhancement of chemotherapeutic effects with focused shock waves: extracorporeal shock wave chemotherapy (ESWC).* Hum. Cell 10, 87-94, 1997.
24. Kato M., Ioritani N., Suzuki T., Kambe M., Inaba Y., Watanabe R., Sasano H., Orikasa S.: *Mechanism of anti-tumor effect of combination of bleomycin and shock waves.* Jpn. J. Cancer Res. 91, 1065-1072, 2000.
25. Kodama T., Hamblin M.R., Doukas A.G.: *Cytoplasmic molecular delivery with shock waves: importance of impulse.* Biophys. J. 79, 1821-1832, 2000.
26. Kodama T., Doukas A.G., Hamblin M.R.: *Shock wave-mediated molecular delivery into cells.* Biochim. Biophys. Acta 1542, 186-194, 2002.
27. Kodama T., Doukas A.G., Hamblin M.R.: *Delivery of ribosome-inactivating protein toxin into cancer cells with shock waves.* Cancer Lett. 189, 69-75, 2003.
28. Krause H.: *Physik und technik medizinischer stob-wellemsysteme.* In Rompe J.D. extrakorporale stoswellentherapie. Weinheim, Germany, Chapman & Hall, GmbH 15-34, 1997.
29. Lagneaux L., Cordemans de Meulenaer E., Delforge A., Dejefeffe M., Massay M., Moerman C., Hannecart B., Canivet Y., Lepeltier M.F., Bron D.: *Ultrasonic low energy treatment: a novel approach to induce apoptosis in human leukemic cells.* Exp. Hematol. 30, 1293-1301, 2002.
30. Laudone V.P., Morgan T.R., Huryk R.F. et al.: *Cytotoxicity of high energy shock waves: methodologic considerations.* J. Urol. 141, 965, 1989.
31. Lauer U., Burgelt E., Squire Z., Messmer K., Hofschneider P.H., Gregor M., Delius M.: *Shock wave permeabilization as a new gene transfer method.* Gene Ther. 4: 710-715, 1997.
32. Lee S., Yang W., Lan K-H., Sellappan S., Klos K., Hortobagyi G., Hung M-C., Yu D.: *Enhanced sensitisation to taxol-induced apoptosis by herceptin pre-treatment in ErbB2-overexpressing breast cancer cells.* Cancer Res. 62: 5703-5710, 2002.
33. Lindahl T., Satoh M.S., Poirier G.G., Klungland A.: *Post-translational modification of poly (ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks.* Trends Biochem. Sci. 20: 405-411, 1995.
34. Liu X.M., Wang L.G., Kreis W., Budman D.R., Adams L.M.: *Differential effect of vinorelbine versus paclitaxel on ERK2 kinase activity during apoptosis in MCF-7 cells.* Br. J. Cancer 85: 1403-1411, 2001.

35. Maier M., Ueberle F., Rupprecht G.: *Physical parameters of extracorporeal shock waves*. Biomed. Tech. (Berlin) 43, 269-74, 1998.
36. Miller D.L., Thomas R.M.: *The role of cavitation in the induction of cellular DNA damage by ultrasound and lithotripter shock waves in vitro*. Ultrasound Med. Biol. 22, 681-687, 1996.
37. Morgan T.R., Laudone V.P., Heston W.D.W. et al.: *Free radical production by high energy shock waves comparison with ionising irradiation*. J. Urol. 139, 186, 1988.
38. Mosmann T.: *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J. Immunol. Methods 65, 55-63, 1983.
39. Ogden J.A., Alvarez R.G., Levitt R., Marlow M.: *Shock wave therapy (Orthotripsy) in musculoskeletal disorders*. Clin. Orthop. 387, 22-40, 2001.
40. Oosterhof G.O.N., Smits G.A.H.J., deRuyter J.E., van Moorselaar R.J.A., Schalken J.A., Debruyne F.M.J.: *The in vitro effect of electromagnetically generated shock waves (lithostar) on the Dunning R3327 PAT-2 rat prostatic cancer cell line. A potentiating effect on the in vitro cytotoxicity of vinblastin*. Urol. Res. 17, 13-19, 1989.
41. Paridaens R., Biganzoli L., Bruning P., Klijn J.G., Gamucci T., Houston S., Coleman R., Schacter J., Van Vreckem A., Sylvester R., Awada A., Wildiers J., Piccart M.: *Paclitaxel versus doxorubicin as first line single-agent chemotherapy for metastatic breast cancer: a European Organization for Research and Treatment of Cancer Randomized Study with cross over*. J. Clin. Oncol. 18: 724-733, 2000.
42. Perez E.A.: *Paclitaxel in breast cancer*. Oncologist 3: 373-389, 1998.
43. Prat F., Sibille A., Luccioni C., Pansu D., Chapelon J.Y., Beaumatin J., Ponchon T., Cathignol D.: *Increased chemo-cytotoxicity to colon cancer cells by shock wave induced cavitation*. Gastroenterology 106: 937-944, 1994.
44. Randazzo R.F., Chaussy G.C., Fuchs G.J., Bhuta S.M., Lovrekovich H., De Kernion J.B.: *The in vitro and in vivo effects of extracorporeal shock waves on malignant cells*. Urol. Res. 16, 419-26, 1988.
45. Roessler W., Rothgangel B., Hofstaedter F., Wieland W.F.: *Treatment of human renal cell carcinoma with high energy shock waves: a new in vivo/in vitro model*. Urol. Intern. 55, 1-5, 1995.
46. Sauerbruch T., Delius M., Paumgartner G. et al.: *Fragmentation of gallstones by extracorporeal shock waves*. N. Engl. J. Med. 314: 818-22, 1986.
47. Sauerbruch T., Holl J., Sackmann M. et al.: *Disintegration of pancreatic duct stone with extracorporeal shock waves in a patient with chronic pancreatitis*. Endoscopy 19, 207-08, 1987.
48. Seeman O., Rassweiler J., Chvapil M., Alken P., Drach G.W.: *The effect of single shock waves on the vascular system of artificially perfused rabbit kidneys*. J. Stone Dis. 5, 172-78, 1993.
49. Steller H.: *Mechanism and genes of cellular suicide*. Science (Washington DC) 267, 1445-1449, 1995.
50. Tschoep K., Hartmann G., Jox R., Thompson S., Eigler A., Krug A., Erhardt S., Adams G., Endres S., Delius M.: *Shock waves: a novel method for cytoplasmic delivery of antisense nucleotides*. J. Mol. Med. 79: 306-323, 2001.



51. van Dogen J.W., van Steenbrugge G.J., Romijn J.C. et al.: *The cytotoxic effect of high energy shock waves on human prostatic tumor cell lines*. Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 25: 1173-79, 1989.
52. Wang L.G., Liu X.M., Kreis W., Budman D.R.: *The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review*. Cancer Chemoter. Pharmacol. 44: 355-361, 1999.
53. Wess O., Ueberle F., Durßen R.N., Hilcken D., Krauß W., Reuner T., Schultheib R., Staudenraus I., Rattner M., Haaks W., Granz B.: *Working group technical developments – consensus report*. In Chaussy C., Eisenberger F., Jocham D., Wilbert D. (eds) *High Energy Shock waves in Medicine. Clinical Application in Urology, Gastroenterology and Orthopedics*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1997, pp 59-71.
54. Wilmer A., Gambihler S., Delius M., Brendel W.: *In vitro cytotoxicity activity of lithotripter shock waves combined with adriamycin or with cisplatin on L1210 mouse leukaemia cells*. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 115, 229-234, 1989.
55. Worle K., Steinbach P., Hofstadter F.: *The combined effects of high-energy shock waves and cytostatic drugs or cytokines on human bladder cancer cells*. Br. J. Cancer 69, 58-65, 1994.
56. Yao C.Z., Ishizuka J., Bold R.J., Townsend Jr C.M., Thompson J.C.: *Cytotoxic effect of high energy shock wave on tumor cells enhanced with larger dose and multiple exposures*. Surg. Oncol. 3, 229-235, 1994.

## ACQUA E SALUTE PUBBLICA: UN RAPPORTO PROBLEMATICO

*G. Gilli*

Dipartimento di Sanità Pubblica e Microbiologia  
Università degli Studi di Torino

Key words:     *Risorsa idrica*  
                  *Acqua potabile*  
                  *Servizio idrico integrato*  
                  *Salute pubblica*

### **Abstract:**

To supply a water service today, in a developed Country, means to guarantee not only the quality of waters, but also to answer to requirement such as amounts and continuity of the service. All this is not easy obtainable. Also in developed areas of our Country, always, the amount and the continuity are not enough. However the integrated water service, as today it is called, has objects more important. It should guarantee not only what is cited before but also, question less famous, it should carried collecting and cleaning the waters used from the human activities.

### **Estratto:**

Fornire un servizio idrico oggi, in un Paese sviluppato, significa garantire non solo la qualità delle acque, ma anche rispondere a requisiti quali quantità e continuità del servizio; tutto ciò non è facilmente ottenibile tanto è che, anche in aree del nostro Paese, quantità e continuità sovente lasciano a desiderare. Tuttavia il servizio idrico integrato, come oggi si chiama, ha obiettivi assai più rilevanti volendo garantire non solo quanto sopra citato ma, cosa ormai meno nota, farsi carico di raccogliere, collettare e depurare le acque utilizzate dalle attività umane.

Per fornire acqua idonea all'uso potabile devono essere garantiti tre requisiti fondamentali ovvero la quantità, la qualità e la continuità. L'acqua del rubinetto deve essere di buona qualità (batteriologicala, chimica e fisica), disponibile a tutti in quantità sufficiente e in modo continuo<sup>(3)</sup>.

In particolare il concetto di quantità è legato sia alla disponibilità intrinseca del territorio, sia alla necessità di ricorrere nel tempo a nuovi rifornimenti idropotabili. La qualità invece è un concetto che si è evoluto con il sapere scientifico e con la valutazione del rischio correlato alla presenza di microrganismi, sostanze naturali o dovute al degrado per contaminazione.

La correlazione tra acqua disponibile e salute umana è ben nota. Il problema della fornitura e dell'uso di acqua qualitativamente accettabile è stato parzialmente risolto solo nei Paesi occidentali, dove però rimane ancora aperto il problema del rischio legato sia alla presenza e moltiplicazione di patogeni emergenti, sia alla presenza nelle acque di sostanze chimiche proveniente dai settori industriale e agricolo<sup>(19,20)</sup>.

Spesso, quando si parla di carenza d'acqua non si parla di scarsità del bene ma di impossibilità ad accedere al bene da parte della popolazione. Il problema della difficoltà o dell'impossibilità di accedere ad un servizio idrico adeguato e ad adeguate strutture per la fornitura è ormai riconosciuto come uno dei più gravi che assillano il genere umano<sup>(18)</sup>.

La superficie del nostro pianeta è coperta per il 71% di acqua; diverso è il discorso riguardante la sua qualità, in quanto, della totalità dell'acqua presente sul pianeta, ben il 97,5% risulta essere salata e del rimanente 2,5% circa i due

	<b>Km cubi</b>	<b>% totale</b>	<b>% acqua dolce</b>
Acqua totale	1.500.000.000		
Oceani e mari	1.462.500.000	97,500	
Acqua dolce	37.500.000	2,500	
Ghiaccio	25.837.500	1,723	68,9
Acque profonde	11.212.500	0,748	29,9
Umidità suolo/aria	337.500	0,023	0,9
Laghi e fiumi	112.500	0,008	0,3

*Tabella I. Descrizione delle risorse idriche sul pianeta.*

terzi sono costituiti da ghiacciai e nevi perenni (Tabella I): in definitiva l'acqua disponibile per l'uomo arriva a malapena all'1% della scorta totale<sup>(16)</sup>.

Ancora oggi l'acqua viene utilizzata senza tenere conto della sua crescente scarsità e sebbene essa sia, al momento attuale, ancora commisurata alle necessità, circa un terzo della popolazione vive in Paesi segnati da periodiche carenze idriche<sup>(18)</sup>.

Infatti, secondo una stima del "Population Information Program" nel 1995 circa 500 milioni di persone, distribuite in 31 paesi, hanno risentito delle condizioni di scarsità d'acqua e, sempre secondo la stessa stima si calcola che nel 2050 la popolazione interessata al problema sarà più che decuplicata (Figura 1).

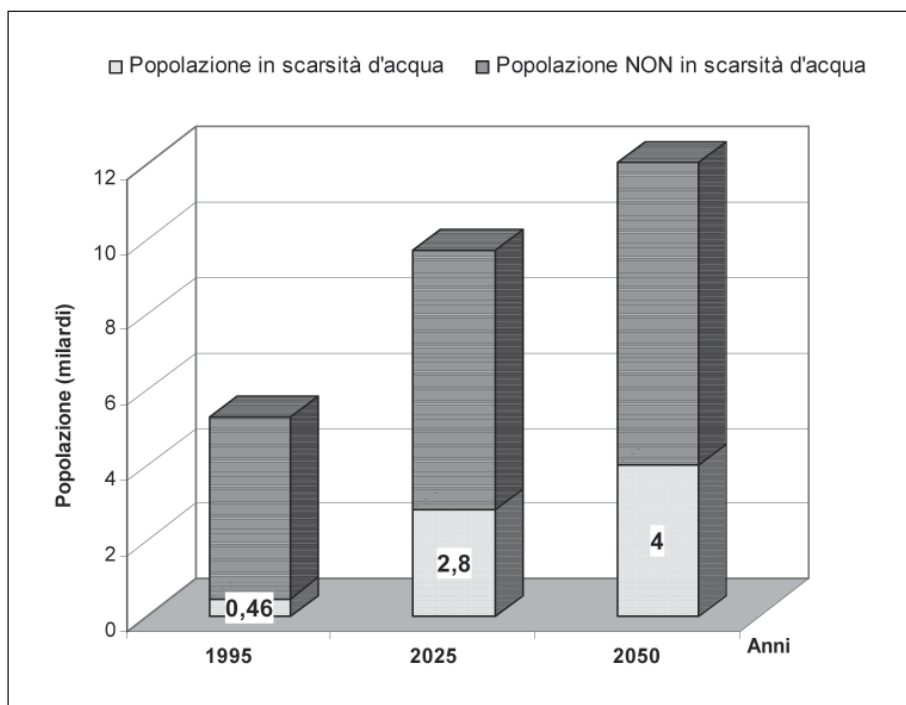


Figura 1. Tratto e modificato da Hinrichsen et al.<sup>(11, 12)</sup>.

Uno degli elementi responsabili dell'aumento dei consumi di acqua è senza dubbio rappresentato dallo sviluppo socio-economico. La crescita nel settore industriale e in quello agricolo, che ha avuto luogo con lo sviluppo economico, ha determinato il sovrasfruttamento delle risorse idriche. Accanto alle attività

civili, che sfruttano globalmente il 10% dell'acqua disponibile, quelle agricole ed industriali utilizzano la quantità più cospicua della risorsa, il 70% e il 20% rispettivamente.

Questi valori sono tuttavia disuguali in funzione delle diverse aree territoriali, considerando, ad esempio, che se in Europa il consumo di acqua per uso agricolo è pari al 35%, per il settore industriale corrisponde a circa il 50% e per le attività agricole al 15%; in Africa, in Asia e in Centro America invece, circa il 90% viene utilizzato per l'agricoltura, il 5-10% per l'industria e altrettanto per l'uso civile<sup>(6)</sup>.

In Italia la situazione si discosta leggermente da quella mondiale: la percentuale di utilizzo dell'acqua in agricoltura si aggira intorno al 55%, mentre le attività civili ed industriali sfruttano rispettivamente il 25% e il 20% della risorsa totale (elaborazione ANPA su dati CNR-IRSA,1999).

Poiché l'agricoltura e l'industria sono i settori che più assorbono in termini di consumo idrico, è soprattutto in questi ambiti che occorre intervenire. Il miglioramento delle tecniche di irrigazione e l'introduzione di tecniche di ricircolo negli usi industriali, con il riutilizzo di acque reflue adeguatamente trattate, potrebbero contribuire a ridurre i consumi ed il depauperamento delle risorse.

Per quanto riguarda invece i consumi civili, secondo dati dell'EUROSTAT<sup>(9)</sup> è emerso che gli italiani consumano una media di 213 litri al giorno di acqua corrente da rubinetto ma di questi ne bevono solo l'1%. Il 45 % viene utilizzato per l'igiene personale, il 15% per la lavatrice, il 23% per gli scarichi del WC e il 17% per il lavaggio delle stoviglie (Tabella II). Ma c'è anche il 15% della popolazione italiana, ossia circa otto milioni di persone che per quattro mesi l'anno (giugno settembre) è sotto la soglia del fabbisogno idrico minimo di 50 litri di acqua al giorno a persona. Tra le diverse regioni d'Italia, inoltre, le differenze nella disponibilità d'acqua sono alte. Mentre le regioni del Nord ne hanno in abbondanza, al Sud tale disponibilità è ridotta: sia in termini di precipitazioni (Puglia, Sicilia e Sardegna ricevono il 40-

<b>USO DOMESTICO</b>	Bagno	100 litri
	WC	50 litri
	Bucato	30 litri
	Piatti	25 litri

*Tabella II. Destinazione dell'acqua utilizzata in ambito domestico.*

50% in meno delle precipitazioni delle regioni più piovose), sia in termini di risorse disponibili.

Al fine di tutelare la salute pubblica, risulta fondamentale garantire la sicurezza e la qualità dell'acqua potabile, infatti, come affermato nella Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea del 7/1/2002, "l'acqua viene ingerita, come ogni altro alimento, direttamente o indirettamente, contribuendo così al rischio complessivo al quale si espongono i consumatori attraverso l'ingestione di sostanze, tra cui contaminanti chimici e microbiologici".

I principali esperti di qualità dell'acqua provenienti da America (American Water Works Association), Europa (European Union Association of Water Operators) ed Australia (Water Services Association of Australia) riunitisi in un workshop tenutosi a Bonn nel 2001, hanno posto come obiettivo per il 21° secolo il "fornire acqua da bere buona e sicura dal punto di vista igienico-sanitario, che goda della fiducia dei consumatori"<sup>(3)</sup>.

La disponibilità di acqua potabile influisce in modo sostanziale sulla salute umana e sulla speranza di vita, in particolare nell'età infantile. Nei paesi in cui la popolazione che ha accesso all'acqua potabile è inferiore al 50% (ad esempio Etiopia e Congo), la mortalità infantile sotto i 5 anni raggiunge livelli assai elevati: tra i 150 e i 200 morti su 1000; invece, in paesi industrializzati come la Svezia, nella quale l'intera popolazione ha accesso all'acqua potabile, la mortalità infantile sotto i 5 anni si riduce a meno di 10 bambini su 1000<sup>(17)</sup>.

A metà del 1800 è stato stabilito il collegamento tra contaminazione microbiologica dell'acqua e malattie umane. Da quel momento in avanti l'enorme riduzione dell'incidenza di alcune patologie quali il colera, il tifo ed altre malattie diarroiche costituisce uno dei principali successi della prevenzione primaria in sanità pubblica. Basti pensare, a titolo di esempio, che nella città di Detroit, Michigan, grazie alla disinfezione dell'acqua, ed in seguito, grazie al trattamento combinato di disinfezione e filtrazione, la mortalità per tifo è diminuita progressivamente da valori pari a 25 morti su 100.000 a valori prossimi allo zero.

Attualmente nei paesi occidentali queste epidemie sono diventate relativamente rare, mentre creano ancora gravi problemi nei paesi in via di sviluppo. Ogni anno 1,8 milioni di persone muoiono per patologie diarroiche, incluso il colera, e la maggioranza di questi decessi coinvolge bambini dei paesi in via di sviluppo; eppure basterebbe un trattamento domestico di clorazione dell'acqua per prevenire il 35-39% delle patologie diarroiche<sup>(14)</sup>.

La maggior parte delle patologie veicolate dall'acqua si origina a partire da una contaminazione fecale dell'acqua stessa da parte di animali o di

soggetti malati; gli agenti patogeni presenti possono essere ingeriti dall'uomo direttamente tramite il consumo dell'acqua contaminata, o indirettamente attraverso il consumo di alimenti che ne sono venuti a contatto.

Nonostante i numerosi interventi di prevenzione primaria messi in atto nei paesi occidentali, le epidemie dovute al consumo di acqua sono rare ma continuano a verificarsi.

Negli USA a partire dagli anni '20 le epidemie ad eziologia batterica sono diminuite progressivamente, mentre sono aumentate a partire dagli anni '70 quelle dovute a protozoi; i protozoi enterici generalmente implicati nelle epidemie idrodifuse sono *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora*, *Mycrosporidia* e *Isospora*. Sempre negli USA gli agenti causali di numerose epidemie restano sconosciuti, ma spesso è stata ipotizzata un'origine virale supportata dal riconoscimento di Norwalk-like virus negli ultimi 10 anni. Nel biennio 1999-2000 si sono verificate 39 epidemie associate al consumo di acqua, che hanno coinvolto 2068 persone, di cui 122 ospedalizzate e 2 morte, per un costo complessivo di 20 miliardi di dollari<sup>(15)</sup>. Bisogna ricordare la grande epidemia idrodiffusa scoppiata a Milwaukee nel 1993 e causata da *Cryptosporidium parvum*: su una popolazione di 1,6 milioni circa di abitanti si sono ammalati 403.000 soggetti, per una spesa totale di 96.244.000 dollari<sup>(7)</sup>.

In Inghilterra e in Galles, gli agenti causali di epidemie associate al consumo di acqua potabile derivante da fonti pubbliche sono mutati notevolmente negli anni. Fino agli anni '50 la *Salmonella* era il principale agente eziologico coinvolto, ma grazie agli interventi di clorazione la salmonellosi è diminuita, fino a scomparire negli ultimi anni. Attualmente l'agente infettivo maggiormente presente è il *Cryptosporidium*<sup>(10)</sup>.

Alcune stime dimostrano che la criptosporidiosi in paesi altamente sviluppati come il Canada costa al sistema sanitario diversi milioni di dollari all'anno<sup>(2)</sup>.

Uno studio di Hrudey & Hrudey del 2007<sup>(13)</sup> ha censito 73 epidemie idrodifuse verificatesi negli ultimi 30 anni nei paesi tecnologicamente avanzati, di cui il maggior numero negli USA (23 epidemie), e in Canada (12 epidemie); per l'Italia è stata considerata un'unica epidemia, avvenuta nel Golfo di Taranto nel 2006, probabilmente di origine virale. L'agente eziologico maggiormente coinvolto è *Cryptosporidium*, seguito da *Campylobacter* (rispettivamente presenti in 20 e in 14 epidemie), meno numerose in generale risultano le epidemie ad eziologia batterica rispetto a quelle di origine protozoaria, è inoltre sostanzialmente limitato il numero di epidemie in cui l'agente non è stato identificato<sup>(5)</sup>. I sistemi di rifornimento

privati sono coinvolti nel 36% delle epidemie, sebbene riforniscano solo lo 0,5% dei consumatori. I fattori principalmente implicati sono:

- contaminazione con acque reflue;
- conoscenze inadeguate sull'origine dei rischi idrici;
- inadeguata disinfezione;
- condizioni climatiche estreme (ad esempio pesanti precipitazioni ed allagamenti);
- infiltrazioni di contaminanti derivanti da rifiuti,

Se poniamo in confronto i dati che descrivono gli episodi epidemici infettivi e gli episodi di tossicità acuta imputabili alla presenza di molecole inquinanti avvenuti a causa del consumo di acqua potabile negli Stati Uniti tra il 1920 ed il 1996 ci accorgiamo che il numero di episodi infettivi resta elevato: 529 nel ventennio 1920-1940 vs 624 nel periodo 1970-1996 con un numero di casi totali 3 volte superiore nel periodo più recente; mentre aumentano gli episodi di intossicazione passando da 1 a 79, coinvolgendo un numero di soggetti che aumenta in modo esponenziale alla fine del secolo XX<sup>(6)</sup>.

Probabilmente il potenziamento dei sistemi di sorveglianza epidemiologica e la capillarità nella raccolta dei dati rispetto ai casi di malattia ha fatto sì che il miglioramento igienico sanitario delle acque potabili generalmente osservato durante il XX secolo non si traducesse in una diminuzione di casi. Esiste quindi il problema della sottostima per i dati precedenti agli anni settanta, tuttavia il numero di casi attualmente registrati induce a focalizzare l'attenzione sullo studio dei problemi igienico sanitari legati alla produzione e consumo di acqua potabile.

Inoltre negli ultimo 50 anni più di 1.000.000 di nuovi composti di sintesi sono stati introdotti nell'ambiente. Il ritmo di crescita della produzione di questi composti è elevatissimo: si stima nell'ordine di 1000-2000 nuove molecole l'anno. Tra questi composti troviamo fitofarmaci (insetticidi, erbicidi, fungicidi, nematocidi), i composti utilizzati per la produzione delle plastiche (ftalati, bisfenolo A, clorurovinilmomomeri, ecc.), farmaci (DES, pillola anticoncezionale, ecc.), composti chimici industriali (PCBs, diossine, idrocarburi policiclici aromatici), metalli (piombo, mercurio, arsenico, cadmio), detergenti (nonilfenolo, ottilfenolo), ecc.

Molteplici evidenze epidemiologiche correlano la presenza di questi composti nell'acqua potabile con l'insorgenza di alcune patologie cronico-degenerative quali il cancro e malformazioni cardiache congenite. In particolare dal 1953 al 1998 sono stati pubblicati 17 studi che evidenziano una correlazione positiva



e significativa tra consumo di acqua potabile prodotta con acqua di superficie clorata e tumore alla vescica. La stessa osservazione è stata evidenziata in 11 studi per il tumore del retto, a seguire delle correlazioni sono state evidenziate per tumori allo stomaco, al polmone, all'apparato digerente ed urinario, al pancreas, all'esofago, al rene ed al fegato.

Un'altra evidenza emerge da interessanti articoli pubblicati nei primi anni del secolo in corso che evidenziano la correlazione tra sottoprodotti della clorazione e malformazioni cardiache congenite. Cadergen et al.<sup>(5)</sup>, hanno pubblicato nel 2002 i risultati di uno studio svolto in Svezia su 75832 neonati tra il 1982 ed il 1996, la ricerca ha investigato sulla comparsa di malformazioni congenite cardiache ed esposizione della popolazione ai sottoprodotti del cloro utilizzato per la disinfezione dell'acqua.

L'acqua destinata al consumo umano è risultata essere associata con tali malformazioni in particolare quando il trattamento era eseguito con biossido di cloro (OR: 1,61 IC98% 1.00-2.59). Il rischio di contrarre malformazioni cardiache è risultato correlato in modo statisticamente significativo con la presenza di triometani nell'acqua.

Occorre comunque sottolineare che questi studi sono fortemente limitati dalla presenza di numerosi fattori di confondimento che non sono facilmente descrivibili e quantificabili e che incidono pesantemente sull'osservazione epidemiologica.

Questo quadro complessivo ha condotto l'Organizzazione Mondiale della Sanità a rivedere le linee guida per la qualità dell'acqua potabile. La terza edizione di questo documento pubblicata nel 2004 è in linea con le recenti direttive europee<sup>(4)</sup>. Le principali novità sono: alcune variazioni sui parametri chimici (uranio, bario, solfati, cloriti, ecc.), un maggior interesse verso gli aspetti analitici, interesse alla gestione dei processi, un generale approccio basato sulla prevenzione del rischio di contaminazione di una risorsa idrica. La prevenzione si fonda sull'attuazione della "*risk analysis*", ovvero la conoscenza delle problematiche di rischio specifiche di ciascuna risorsa idrica in relazione al suo rapporto con il territorio (*risk assessment*) e la sua gestione (*risk management*). È ribadito con forza che la valutazione del rischio a monte sulla risorsa idrica e l'attuazione dell'autocontrollo lungo la filiera mediante il sistema HACCP sono metodi fondamentali per garantire la sicurezza e la qualità dell'acqua potabile.

La mancanza di continuità nell'erogazione di acqua potabile può essere legata a cause naturali, come carenze nelle fonti di approvvigionamento per siccità o dovute a eventi naturali eccezionali (sismi, ecc...), oppure a carenze dovute alla indisponibilità delle fonti a causa dell'inquinamento. Per porre rimedio a

questo genere di carenze gli interventi da adottare devono essere preventivi, per ogni pericolo, in modo da evitare che l'evento si realizzi, e correttivi, nel caso in cui si verificano delle emergenze. Il problema della carenza di continuità caratterizza ancora alcune zone del territorio nazionale. In Italia il consumo procapite di acque minerali è da tempo il più alto in Europa con una media, nel 2003, di 180 litri all'anno contro una media europea di 100 litri annui. In Italia inoltre dal 1988 al 2003 si è registrato un aumento dei consumi del 115%, mentre nello stesso periodo in Europa l'aumento era del 106%<sup>(1)</sup>.

Il consumatore italiano beve quindi tanta acqua minerale sopportandone i costi più elevati, che sono in media, per 1 m<sup>3</sup> di acqua, 500 volte più alti<sup>(1,8)</sup>, e gli innumerevoli effetti negativi e disagi (impatto ambientale, sollevamento pesi, trasporto). Tutto questo a fronte di un prezzo dell'acqua potabile a Torino che si assesta a 0.75 €/m<sup>3</sup> (0.81 €/m<sup>3</sup> considerando i costi fissi per il mercato italiano), tra i più bassi in Italia ed in Europa (International Statistics for water supply 2005, SMAT spa).

La continuità del servizio deve essere legata alla qualità organolettica dell'acqua. A tale proposito sono stati formati i "sommelier dell'acqua" con lo scopo di studiare l'organolessi e la sua variabilità per le acque erogate dai centri di potabilizzazione costruendo una mappatura del gradimento dell'acqua distribuita ed attuando un confronto delle acque di rubinetto con le acque minerali commerciali.

Una commissione di giudici adeguatamente formati ("i sommelier dell'acqua") valuta la qualità organolettica dell'acqua assegnando un punteggio (l'indice edonico globale, IEG) sulla base di descrittori olfattivi, gustativi-tattili e retrofattivi dell'analisi sensoriale sia quantitativi (intensità, cloro, terra, salato, leggerezza, amaro, ecc.) che qualitativi (purezza, bontà e gradevolezza).

I centri di produzione torinesi hanno ottenuto un IEG medio di 6.1 mentre in città si beve acqua con un IEG medio di 6.2 contro la media delle principali acque minerali in bottiglia che si assestano a 7.0. In provincia la qualità organolettica per i siti presi in considerazione è di poco migliore (media 6.4), ma con una maggiore variabilità, si passa infatti da San Mauro con IEG pari a 5.3 a Rivoli con IEG di 6.9.

Più il ciclo idrico integrato riuscirà a recuperare l'acqua "usata", tanto meno ne "consumeremo". Tecnologie per il trattamento di potabilizzazione, tecniche di ingegneria idraulica meno impattanti e più efficienti, tecniche di depurazione sempre più efficaci servono complessivamente a garantire il reperimento idrico, e al contempo impediscono che acque usate vengano disperse senza idonei trattamenti di depurazione determinando così inquinamenti diffusi.

La quantità, circa 200 litri/procapite/giorno, cioè un enorme massa prodotta in continuità, viene veicolata in reti acquedottistiche sempre più articolate (migliaia di chilometri), ma deve comunque arrivare alle utenze con tutti i requisiti della potabilità.

Ad oggi la qualità del servizio, la qualità del prodotto acqua e costi irrisori all'utenza rappresentano un ottimo risultato igienico sanitario combinato ad un ottimo risultato economico.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Altamore G.: *Qualcuno vuol darcela a bere*. F.lli Frilli editore, 2004.
2. Aramini J., McLean M., Wilson J., Holt J., Copes R., Allen B., Sears W.: *Drinking water quality and health-care utilization for gastrointestinal illness in greater Vancouver*. Can. Commun. Dis. Rep. 26, 211-214, 2000.
3. AWWA (American Water Work Association) Research Foundation: *Bonn Workshop: A Framework for Assuring the Quality of Drinking Water in the 21<sup>st</sup> Century*. 30 Ottobre 2001.
4. CE n. 2, Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee, 7/1/2002.
5. Cedergren M.I., Selbing A.J., Löfman O., KällénWho B.A.J.: *Chlorination Byproducts and Nitrate in Drinking Water and Risk for Congenital Cardiac Defects*. Environmental Research 89, 124-130, 2002.
6. *Centres of Disease Control and Prevention, Emerging infectious diseases*. Volume 6-2000.
7. Corso P.S., Kramer M.H., Blair K.A., Addis D.G., Davis J.P., Haddix A.C.: *Cost of illness in the 1993 waterborne Cryptosporidium outbreak, Milwaukee, Wisconsin*. Emerg. Infect. Dis. Apr. 9, 426-431; 2003.
8. COVIRI: *Secondo rapporto sui piani d'Ambito*. Roma: Comitato per la vigilanza sull'uso delle risorse idriche. 2004.
9. Eurostat: *Statistical Office of the European Communities*. 2001.
10. Health Protection Agency: *Surveillance of waterborne disease and water quality: July to December 2003*. Commun. Dis. Rep. CDR Wkly 14, 15, 2003.

11. Hinrichsen D., Robey B., Upadhyay U.D.: *Solution for a water – short world*. Baltimore, MD, Johns Hopkins University School of Public Health. Population Reports Series M, No 14.
12. Hinrichsen D.: *Feeding a future world*. People and the Planet 7, 6-9, 1998.
13. Hrudehy S.E., Hrudehy E.J.: *Published case studies of waterborne disease outbreaks – evidence of a recurrent threat*. Water Environment Research 79, 233-245, 2007.
14. Leclerc H., Schwartzbrod L., Dei-Cas E.: *Microbial agents associated with waterborne diseases*. Crit. Rev. Microbiol. 28, 371-409, 2002.
15. Lee S.H., Levy D.A., Craun G.F., Beach M.J., Calderon R.L.: *Surveillance for waterborne-disease outbreaks – United States, 1999-2000*. MMWR Surveill. Summ. 51, 47, 2002.
16. Shiklomanov et al.: *Assessment of Water Resources and Availability in the World*. State Hydrological Institute, St. Petersburg, Russia, 1996.
17. UNICEF: *Rapporto “Progress for Children”*. 2002.
18. WHO: *Guidelines for drinking water - third edition*. 1, 2004.
19. WHO: *Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater*. 2006.
20. WHO: *Water Quality: Guidelines, Standards and Health*. 2001.

## LA MICROCHIRURGIA ENDOSCOPICA TRANSANALE: INDICAZIONI E RISULTATI NELLE NEOPLASIE DEL RETTO

*M.E. Allaix, C. Garrone, M. Caldart, R. Rimonda, M. Morino*

Chirurgia Generale II - Centro Universitario di Chirurgia Mininvasiva  
Azienda Ospedaliera San Giovanni Battista, Molinette  
Università degli Studi di Torino

Key words: *Transanal Endoscopic Microsurgery*  
*Adenoma / Adenoma*  
*Adenocarcinoma / Adenocarcinoma*  
*Extraperitoneal rectum / Retto extraperitoneale*

### **Abstract:**

**Background.** Resection of the rectum is associated with a significant morbidity, in particular referred to sphincteric, urinary and sexual dysfunctions. To reduce these complications, the Transanal Endoscopic Microsurgery (TEM) is an effective minimally invasive technique for local excision of rectal cancers in highly selected patients.

**Methods.** Preoperative assessment included digital examination, proctoscopy, colonoscopy, transanal ultrasound, CT scan and an anorectal manometry. The parameters evaluated included operating time, morbidity and mortality rate, hospital stay, histological and staging discrepancy and oncological results.

**Results.** From January 1993 to September 2007, TEM was performed in 291 patients, with a mean age of 64.9 (range, 25-89) years. Distal tumor's margin ranged from 4 to 20 cm from the anal verge. Preoperative indications were 211 (72.5%) adenomas, 63 (21.6%) carcinomas and 17 various pathologies. Mean operative time was 70.5 (range 15-240) minutes. Intraoperative complications consisted of 12 cases of inadvertent peritoneum opening, treated in 9 cases by intraoperative transanal repair using TEM and in 3 cases by conversion to laparoscopic (2 cases) or to laparotomic anterior resection (1 case). The rate of conversion to abdominal surgery was 1.0% (3/291). No patients required intraoperative blood transfusion. There was no mortality. The overall incidence of morbidity was 6.5% (19/291). Mean hospital stay was 4.6 (range 2-14) days. At final histology there were 35 T1, 35 T2 and 15 T3. Mean follow-up was 60 (3-130) months, with a recurrence rate of 0% in pT1, 28.6% in pT2 and 40% in pT3. Overall estimated 5-years survival was 88.5%; the disease-free survival rate was 76.2%.

**Conclusion(s).** Local excision by TEM is a safe and effective approach in the treatment of rectal T1 carcinomas. Adjuvant radiotherapy and surgical resection of recurrences allow to obtain good long term results in T2 patients.

**Riassunto:**

**Introduzione.** La chirurgia del retto è associata ad un'elevata morbidità, in particolare per quanto riguarda le disfunzioni sfinteriche, urinarie e sessuali. La Transanal Endoscopic Microsurgery (TEM) è una tecnica mininvasiva che permette l'exeresi di neoformazioni rettali in pazienti altamente selezionati.

**Metodi.** La valutazione preoperatoria consiste nell'esplorazione rettale, rettoscopia, colonscopia, ecoendoscopia transrettale, TC addome e manometria anorettale. I parametri valutati sono il tempo operatorio, i tassi di morbidità e mortalità, la degenza ospedaliera, la discrepanza istologica e i risultati oncologici.

**Risultati.** Nel periodo di tempo compreso tra Gennaio 1993 e Settembre 2007, 291 pazienti, con età media di 64.9 (range, 25-89) anni sono stati sottoposti a TEM. La distanza della lesione dal margine anale era compresa tra 2 e 20 cm. Le principali indicazioni preoperatorie sono state 211 (72.5%) adenomi e 63 (21.6%) carcinomi. Il tempo operatorio medio è stato di 70.5 (range 15-240) minuti. Si sono verificati 12 casi di apertura accidentale del pneumoperitoneo, trattati in 9 casi con sutura diretta in TEM e in 3 casi mediante conversione a resezione anteriore laparoscopica (2 casi) o laparotomica (1 caso). Il tasso di conversione alla chirurgia addominale è stato del 1.0% (3/291). Nessun paziente ha richiesto emotrasfusioni intraoperatorie. Non vi è stata mortalità. Il tasso complessivo di morbidità è stato del 6.5% (19/291). La degenza media è stata di 4.6 (range 2-14) giorni. La distribuzione delle neoplasie maligne, in base all'esame istologico definitivo, è stata la seguente: 35 T1, 35 T2 e 15 T3.

Durante un periodo di follow-up medio di 60 (3-130) mesi, il tasso di recidiva è stato di 0% per i pT1, 28.6% per i pT2 e 40% per i pT3. Il tasso complessivo di sopravvivenza a 5 anni è del 88.5%; il tasso di sopravvivenza libera-damalattia è del 76.2%.

**Conclusioni.** L'escissione locale con TEM è un approccio sicuro ed efficace nel trattamento dei carcinomi del retto T1. La radioterapia adiuvante e la resezione chirurgica permettono di ottenere buoni risultati a lungo termine nei pazienti affetti da carcinoma T2.

## INTRODUZIONE

Il retto è da sempre una delle zone di più difficile accesso chirurgico. La tradizionale chirurgia laparotomica si è andata sempre più perfezionando riducendo al massimo le indicazioni agli interventi demolitivi e aumentando l'efficacia degli interventi "sphincter saving". Nonostante ciò una colostomia definitiva rimane necessaria dal 10 al 30% dei casi, disfunzioni uro-genitali sono molto frequenti dopo chirurgia resettiva del retto e mortalità e morbilità postoperatoria restano consistenti.

Per tutti questi motivi, per le lesioni benigne ad ampia base d'impianto non asportabili in colonscopia e per alcune lesioni maligne negli stadi iniziali, la resezione locale con accesso transanale si è andata negli ultimi anni affermando come la via di accesso preferenziale, in ragione della sua minore invasività e dei migliori risultati funzionali.

Recentemente, ad opera di G. Buess<sup>(1)</sup>, è stata messa a punto una particolare strumentazione denominata T.E.M. (Transanal Endoscopic Microsurgery o Microchirurgia Endoscopica Transanale), costituita da un rettoscopio operativo di 4 cm di diametro con ottica stereoscopica e tre vie di accesso strumentale. Tale strumento, previa realizzazione di uno pneumo-retto mediante un insufflatore di CO<sub>2</sub>, consente la resezione a tutto spessore delle lesioni del retto extraperitoneale e una ricostruzione precisa della continuità della parete rettale.

Inizialmente concepita per la resezione delle neoformazioni benigne a larga base d'impianto non resecabili in colonscopia, la T.E.M. è stata recentemente utilizzata anche nella resezione di lesioni maligne con intento radicale o palliativo.

## INDICAZIONI ALL'INTERVENTO

La T.E.M. è indicata nel trattamento delle neoplasie rettali extraperitoneali perchè sfrutta la costituzione di uno pneumo-retto, che verrebbe a mancare qualora venisse resecata a tutto spessore la parete del retto intraperitoneale.

Pertanto, i limiti anatomici imposti alla tecnica, consistono in circa 12 cm dal margine anale sulla parete anteriore del retto, 15 sulle pareti laterali e 18-20 sulla parete posteriore, essendo questi i limiti di inserzione del peritoneo sulla parete del retto (Figura 1).

Per quanto riguarda la natura delle lesioni, le indicazioni universalmente accettate sono le seguenti:

- Adenomi del retto non asportabili in colonscopia;
- Adenocarcinomi del retto T1, nei quali l'exeresi in T.E.M. ha alte probabilità di essere curativa nei G1 e G2;

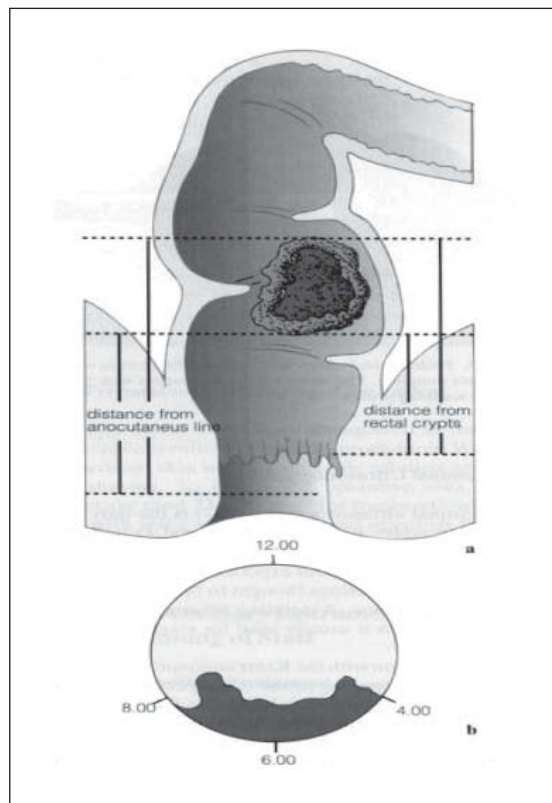


Figura 1. Rappresentazione schematica dell'anatomia del retto.

- Adenocarcinomi del retto in stadi avanzati in interventi palliativi.

Recentemente, alcuni Autori<sup>(2)</sup> hanno proposto l'associazione di radio-chemioterapia preoperatoria con la resezione locale tramite T.E.M. con intento radicale anche nei tumori T2, ma tale indicazione è ancora controversa.

### Accertamenti preoperatori

In considerazione delle precise indicazioni in termini di sede e di stadiazione della lesione, gli accertamenti preoperatori assumono un ruolo fondamentale:

- Esame clinico comprensivo di esplorazione rettale, per valutare la distanza dal margine anale, le dimensioni della neoformazione e la fissità ai piani profondi;
- Colonscopia completa;



- Rettoscopia con strumento rigido, per effettuare biopsie, per localizzare la lesione in senso circonferenziale e misurare la sua esatta distanza dal margine anale;
- Ecoendoscopia transrettale (EUS) con sonda rotante, per la stadiazione locale della malattia;
- TC addominale superiore ed inferiore con mezzo di contrasto, per la valutazione dell'estensione locale ed eventuale metastatizzazione a distanza (nei casi di diagnosi istologica di adenocarcinoma);
- Marcatori neoplastici (CEA e CA19-9).

## **STRUMENTARIO**

La T.E.M. si avvale dei seguenti strumenti:

- Rettoscopio operativo rigido con diametro di 4 cm, a becco di flauto, di 12 o 20 cm di lunghezza, chiuso da un dispositivo a tenuta d'aria con 4 canali operativi attraverso i quali vengono introdotti i vari strumenti chirurgici, dapprima inserito nel retto con un introduttore atraumatico mediante modica divulsione anale, e successivamente connesso al braccio di sostegno;
- Strumenti chirurgici: elettrocoagulatore, pinza da presa, porta aghi, applicatore di clips, aspiratore e forbici;
- Ottica stereoscopica angolata binoculare che offre un'immagine tridimensionale magnificata sei volte; in parallelo è inserita un'ottica di 5 mm collegabile ad una videocamera, così da proiettare l'immagine operatoria sullo schermo televisivo;
- Insufflatore per instaurare e mantenere lo pneumo-retto, con funzione anche di aspiratore e di lavaggio del campo operatorio.

## **NOTE DI TECNICA**

Il paziente dev'essere posto sul lettino operatorio in posizione ginecologica, prona a gambe divaricate o in decubito laterale destro o sinistro, a seconda che la neoplasia sia localizzata sulla parete posteriore, anteriore, laterale destra o sinistra del retto, in modo che la lesione si trovi sempre sulla parete inferiore del campo operatorio (Figura 2). Questo permette un'inquadratura efficace della lesione e semplifica la tecnica operatoria, sia nel tempo resettivo che in quello della sutura.

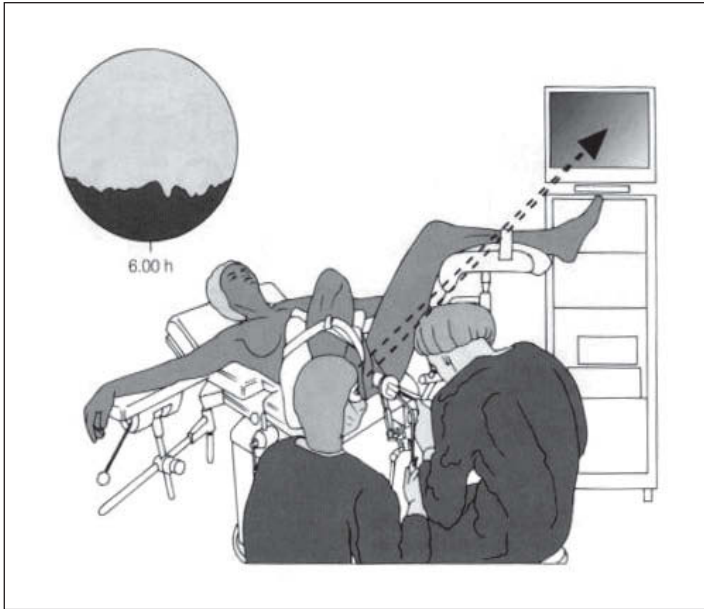


Figura 2. Paziente in posizione ginecologica per lesione della parete posteriore.

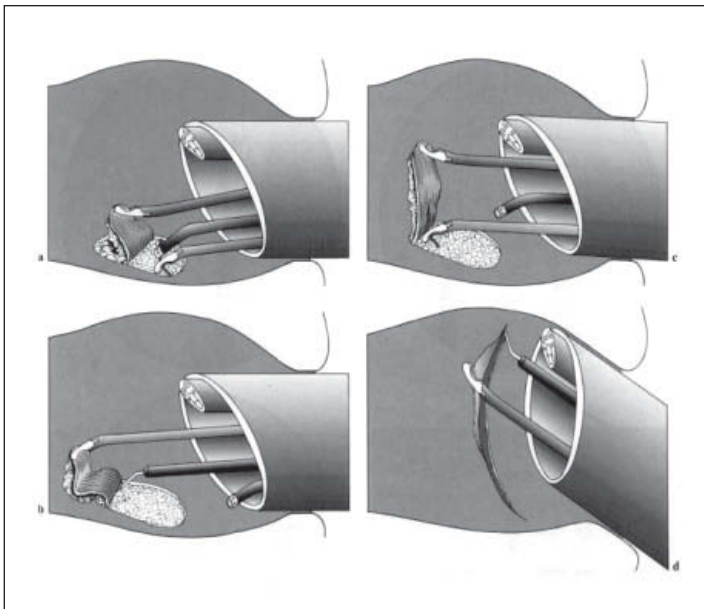


Figura 3. Resezione della base d'impianto della lesione e coagulazione del tessuto perirettale.

Si esegue, quindi, un'escissione a tutto spessore della parete del retto fino al grasso perirettale (Figura 3). L'intervento chirurgico si conclude con la sutura della breccia chirurgica in monofilamento a lento riassorbimento. Per l'impossibilità tecnica di eseguire dei nodi, l'applicazione di clips d'argento ai due capi del filo garantisce la tenuta di tale sutura.

## **I RISULTATI**

Nel periodo di tempo compreso tra Gennaio 1993 e Settembre 2007, 291 pazienti affetti da neoformazioni del retto extraperitoneale sono stati sottoposti a TEM. Di questi, 179 erano maschi e 112 femmine, con un'età media di 64.9 (range, 25-89) anni. Le indicazioni preoperatorie sono state le seguenti: 211 (72.5%) adenomi, 63 (21.6%) carcinomi, 8 (2.7%) polipi infiammatori, 4 (1.4%) ulcere del retto, 2 (0.7%) granulomi epitelioidi, 1 (0.3%) angiodisplasia, 1 (0.3%) GIST e 1 (0.3%) fistola retto-vaginale.

La distanza della lesione dal margine anale era compresa tra 2 e 20 cm.

### *Risultati intraoperatori*

Il tempo operatorio medio è stato di 70.5 (range, 15-240) minuti. Il tasso di complicanze intraoperatorie è stato del 4.1%, a causa di 12 casi di apertura accidentale del peritoneo, trattati in 9 casi con sutura diretta in TEM, e in altri 3 casi mediante conversione a resezione anteriore laparoscopica (2 casi) o laparotomica. Pertanto, il tasso di conversione alla chirurgia addominale è stato del 1.0% (3/291). Il sanguinamento intraoperatorio è stato minimo e non ha mai richiesto emotrasfusioni.

### *Risultati postoperatori*

Il tasso complessivo di morbidità postoperatoria a 30 giorni è stato del 6.5% (19/291): 9 casi di rettorragia (3 trattati chirurgicamente, 3 con tamponamento transrettale e 3 con emotrasfusione), 5 deiscenze di sutura (3 trattati conservativamente), 2 fistole rettovaginali (1 trattata chirurgicamente e 1 conservativamente), 1 ascesso di parete rettale trattato mediante terapia antibiotica, 1 incontinenza maggiore trattata con cicli di biofeedback, e 1 fistola rettovescicale, trattata chirurgicamente, in un paziente sottoposto alcuni anni prima a prostatectomia radicale per cancro.

La degenza media è stata di 4.6 (range, 2-14) giorni. Non vi è stata mortalità (Tabella I).

Indicazioni	Totale 291	
	Preoperatorie	Istologiche definitive
	211 adenomi 63 carcinomi 8 polipi infiammatori 4 ulcere del retto 2 granulomi epitelioidi 1 GIST 1 angiodisplasia 1 fistola retto-vaginale	171 adenomi 87 carcinomi 16 tessuto sano 8 polipi infiammatori 4 ulcere del retto 2 granulomi epitelioidi 1 GIST 1 angiodisplasia 1 fistola retto-vaginale
<b>Tempo operatorio medio (range)</b>	70.5 (15-240) minuti	
<b>Tasso di conversione</b>	1.0%	
Morbilità postoperatoria	Percentuale 6.5%	
	Tipo	Trattamento
	9 rettorragia  5 deiscenze sutura  2 fistole retto-vaginali 1 ascesso di parete 1 incontinenza maggiore 1 fistola retto-vescicale	3 emostasi endoscopica 3 tamponamento transrettale 3 emotrasfusioni 3 terapia medica 1 TEM 1 chirurgia addominale 1 sutura chirurgica terapia antibiotica biofeedback chirurgia addominale
<b>Mortalità postoperatoria</b>	0%	

*Tabella I. Risultati perioperatori.*

### *Risultati anatomopatologici*

La superficie media asportata è stata di 13 (range, 2-56) cm<sup>2</sup>. All'esame istologico definitivo sul pezzo operatorio, è stata fatta diagnosi di adenoma

in 171 casi, di carcinoma in 87 casi, mentre in 16 casi sottoposti a TEM con intento di radicalizzare una pregressa polipectomia endoscopica, l'analisi del tessuto asportato non ha evidenziato malattia residua.

La distribuzione degli stadi delle neoplasie maligne, in accordo con la classificazione TNM, è stata la seguente: 2 carcinoidi, 35 carcinomi pT1, 35 pT2 e 15 pT3.

Pertanto, la percentuale di discrepanza istologica è stata pari al 11.4% (24/211 adenomi).

### *Risultati a lungo termine*

Durante un periodo di follow-up di 60 (range, 2-150) mesi, il tasso di recidiva per adenoma è stato del 5.3% (9/171): 6 pazienti sono stati trattati nuovamente con TEM, una paziente è stata sottoposta ad exeresi transanale, un paziente è stato sottoposto a resezione anteriore laparoscopica con anastomosi colo-anale, mentre una paziente ha rifiutato una nuova TEM.

Per quanto riguarda i pazienti affetti da patologia neoplastica maligna, si sono verificati tra gli 87 pazienti con un follow-up minimo di 6 mesi (follow-up medio 60, range 6-110 mesi) 16 casi di recidiva locale e/o a distanza: 10 tra i 35 pazienti T2 (28.6%) e 6 tra gli 15 T3 (40%).

Dieci pazienti (7 T2 e 3 T3) sono stati successivamente sottoposti a radicalizzazione chirurgica.

Tutti i pazienti affetti da carcinomi e carcinoidi T1 sono stati trattati in modo radicale e non hanno sviluppato recidive.

Il tasso complessivo di sopravvivenza a 5 anni è del 88.5%; il tasso di sopravvivenza libera-da-malattia è del 76.2%.

Considerando lo stadio, la sopravvivenza globale e libera-da-malattia è del 100% per i T1, del 82.9% e del 64% per i T2, del 67.7% e 49.1% per i T3, rispettivamente (Tabella II).

	<b>Sopravvivenza globale</b>	<b>Sopravvivenza libera da malattia</b>
<b>Tutti i carcinomi</b>	88.5%	76.2%
<b>pT1</b>	100%	100%
<b>pT2</b>	82.9%	64%
<b>pT3</b>	67.7%	49.1%

*Tabella II. La sopravvivenza a 5 anni.*

## CONCLUSIONI

La nostra esperienza e i dati disponibili in Letteratura<sup>(3)</sup> dimostrano come la TEM permetta di asportare lesioni polipoidi benigne del retto extraperitoneale con un bassissimo tasso di morbidità intra- e postoperatoria, e in modo radicale in pazienti che altrimenti sarebbero sottoposti ad interventi di chirurgia maggiore, con un ben più alto rischio di complicanze a breve e a medio termine. Infatti, senza contare le frequenti complicanze urologiche e sessuali, dobbiamo ricordare che le migliori serie di chirurgia resettiva tradizionale per tumori del retto medio-distale presentano<sup>(4)</sup> una mortalità tra 2 e 5% (0% nella nostra serie TEM), una morbidità tra 20 e 50% (6.5% nella serie TEM) ed una percentuale di colostomie definitive tra 10 e 30% (0% nella serie TEM).

La TEM permette altresì di asportare, con risultati sovrapponibili alla chirurgia tradizionale, lesioni neoplastiche maligne stadiate come carcinomi T1 a “basso rischio” di metastasi linfonodali. Nessun caso di recidiva è stato registrato nei 35 T1 da noi trattati. Inoltre, studi recentemente pubblicati<sup>(2)</sup> hanno utilizzato la TEM preceduta da radio-chemioterapia neoadiuvante per lesioni T2 con ottimi risultati clinici seppur con un follow up ancora limitato. A tale riguardo, occorre sottolineare come la diagnosi istologica e la stadiazione preoperatorie siano fondamentali nella selezione accurata dei pazienti affetti da lesione polipoide del retto extraperitoneale, per una corretta indicazione alla TEM.

Tali pazienti, secondo il nostro parere, devono essere inviati a Centri specializzati, in cui operino chirurghi, endoscopisti, gastroenterologi ed anatomo-patologi sensibilizzati a tale problematica in modo da offrire loro, se indicato, l'opportunità di evitare i rischi e le mutilazioni connessi alla chirurgia demolitiva del retto e di sfruttare tutti i vantaggi di questa innovativa tecnica chirurgica.

## BIBLIOGRAFIA

1. Buess G., Hutterer F., Theiss R., Bobel M., Isselhard W., Pichlmaier H.: *Das System für die transanale endoskopische Rektumoperation*. Chirurgie 55, 677-680, 1984.
2. Lezoche E., Guerrieri M., Paganini A.M., Baldarelli M., De Sanctis A., Lezoche G.: *Long-term results in patients with T2-3 N0 distal rectal cancer undergoing radiotherapy before transanal endoscopic microsurgery*. Br. J. Surg. 92, 1546-1552, 2005.
3. Middleton P.F., Sutherland L.M., Maddern G.J.: *Transanal Endoscopic Microsurgery: a systematic review*. Dis. Colon Rectum 48, 270-284, 2005.
4. Morino M., Allaix M.E., Giraudo G., Corno F., Garrone C.: *Laparoscopic versus open surgery for extraperitoneal rectal cancer: a prospective comparative study*. Surg. Endosc. 19 (11), 1460-1467, 2005.

## TORINO E L'ANZIANO FRAGILE

*L.M. Pernigotti*

Dipartimento di Geriatria - Azienda Sanitaria Locale Torino 1 - Regione Piemonte

Key words: *Elderly*  
*Frailty*  
*Longevity*  
*Ageism*

### **Abstract:**

Since 1998 citizens of Turin over 65 increased from 20.6% at 23.7%. The population aging was not caused from emigration of young people or decrease in fertility, but a less mortality of the younger old people and longevity of the older. A great part of that continue to live at home with poor assistance, without special service activated (20% until 90 ys old and 4% over 95). Otherwise, in the City, we saw geographic variation of longevity related to social and resource determinants. It supposed that these determinants may be results in biological conditions, for a decrease access to care for chronic illness: in most case of geriatric syndrome characterized from dizziness, syncope, fall and delirium, which is the more frequent motive of access at Emergence Department for old people, the pathogenesis searched in younger people (until 85 ys); older people had a poor diagnosis than younger and they have more access to the same Department. In 335 old people living at home with high prevalence of frailty and chronic illness, despite a lack of cognitive decline, maintaining positive and hardly relation with their relatives. For the people affected from dementia and their relatives, it positive results the Daily Center frequency that can reduce and postpone the institutionalization. For sever behavioral disturbance, admission to Special Department in Nursing Home for little period may be allow the come back home. We think that interventions used in the care continuity for frailty patients, may be catch up a better aging and reduce the admission to the Hospital.

### **Riassunto:**

In dieci anni, dal 1998 al 2007, i residenti in Torino con 65+anni sono aumentati, da 20,6% a 23,7%. L'invecchiamento della popolazione non è stato determinato da emigrazione di giovani o da diminuzione della fertilità, ma da una diminuzione della mortalità di anziani più giovani e da longevità dei grandi anziani. Molti grandi anziani continuano a vivere a casa autogestiti



senza interventi di protezione speciale da parte di servizi sanitari (20% sino a 90 anni, 4% oltre 95 anni). Tuttavia si è rilevata una disomogeneità geografica della longevità, all'interno della Città, correlata a ineguaglianza di fattori sociali di salute. È fatta ipotesi che le ineguaglianze ricadano in fragilità biologiche, per un ridotto accesso alle cure di malattie croniche: è risultato che nei casi di sindrome geriatrica sincope/caduta/delirium, motivo più frequente di accesso degli anziani al Pronto Soccorso, lo studio delle cause è più frequente nei meno anziani (di età < 85+ aa); le diagnosi della sindrome sono minori nei grandi anziani (di età 85+ aa) ma essi hanno un numero maggiore di riammissioni ospedaliere. In 355 anziani, viventi a casa, con elevata prevalenza di fragilità e vulnerabilità per malattie croniche, in assenza di declino cognitivo, nelle relazioni deboli che mantengono, sono risultate, in modo predominante, emozioni favorevoli e rafforzanti. Per i pazienti affetti da demenza ed i loro familiari, è risultata rafforzante la frequenza al Centro Diurno Alzheimer, ritardante l'istituzionalizzazione; per pazienti affetti da disturbi comportamentali gravi associati alla demenza, programmi di ricovero temporaneo e di cura in nuclei residenziali speciali sono risultati favorevoli e utili al ritorno a casa. Si prospetta che alcuni interventi descritti siano utilizzati per sviluppare la continuità di cura a favore degli anziani fragili e vulnerabili, per rafforzare l'indebolimento dei processi di invecchiamento e ridurre l'ospedalizzazione.

## INTRODUZIONE

### Città, Vecchi e Medicina

L'uomo moderno, in uno dei tempi più brevi della sua storia, ha sviluppato il suo più grande cambiamento, cioè un aumento della durata della sua vita di quasi un terzo in meno di un secolo<sup>(10)</sup>. La Città si lega a questo tema come realtà di spazi e di atti che siano efficaci perché, in questo tempo aggiunto, l'anziano trovi luoghi adeguati e rispetto e l'anziano ammalato sia assistito e curato nell'ambito di quelle conoscenze e prassi che vanno sotto il nome di Medicina che si prende cura dell'esistenza dei Vecchi, della Geriatria<sup>(2)</sup>.

In questo tempo si è davanti allo sviluppo di una società degli uomini nella quale emergono l'incapacità umana di trovare un posto per tutti e la crudeltà della natura che restringe le risorse. In questo scenario, il vivere più a lungo si sostanzia come un non senso sociale che toglie serenità alla vita del vecchio. L'ammalato anziano si pone in questo contesto come il più debole e, gravato del peso di ciò che gli avviene intorno, matura un senso di solitudine individuale devastante quando sembra mancargli la possibilità di trovare supporti nella comunità. Dice qualcuno che i segni del nostro tempo non paiono tratteggiati da generosità diffuse, e quand'anche l'osservazione del mondo reale ci indica che lì dovrebbe coltivarsi viepiù l'impegno di assistenza, cioè di vicinanza e cura, si continua a spendere sempre di più nella ricerca dello star bene, ma non altrettanta attenzione si dedica a chi avrebbe bisogno di aiuto<sup>(25)</sup>. È opinione corrente che la parte predominante della spesa della sanità sia dedicata all'assistenza delle persone anziane e che i costi della sanità aumentino in proporzione all'invecchiamento della popolazione. Ne consegue che nell'immaginario collettivo, il vecchio e la sua vecchiaia hanno la colpa di essere una parte in causa nella congiuntura economica del mondo<sup>(16,17)</sup> ed ancora ci trasciniamo quel senso di incompiuto che al termine del secolo appena trascorso aveva fatto emergere i limiti di un sistema nel quale le malattie croniche, in particolare quelle dei vecchi, costituiscono una pietra dello scandalo, perché rappresentano la voce più incisiva della spesa sanitaria, ma, allo stesso tempo perché con il loro carico di sofferenza, richiamano con forza la società al dovere di protezione<sup>(14)</sup>. Se pur vero è che le spese per la sanità, negli stati industrializzati, riguardano in modo predominante la cura di malati affetti da patologie croniche e per di più vecchi, la concezione che questo andamento sia colpa dell'invecchiamento delle persone e non di altre evidenze è discutibile ed è un pensiero, almeno in parte, costruito su di una lettura molto superficiale dei fatti del mondo economico, lontana da una attenta analisi del mondo reale.

Le scienze, mediche, psicologiche, sociologiche sono in grado di spiegare solo in piccola parte i fenomeni che accompagnano la vita di una persona anziana, il resto appartiene all'area dell'incertezza, che può significare incapacità di trovare una strada, una ricerca disordinata di una meta, ma anche, all'opposto che la strada deve essere continuamente sperimentata, verso una meta delineata dai risultati. Alla prima condizione corrisponde la visione ideologica del riconoscere un diritto umanitario in una città che contenga tutti, alimentando con la solidarietà civile gli interventi contro ogni fragilità, senza esigenze o legami imposti dall'esterno, svincolati dal puro calcolo dei costi e dei ricavi, alla seconda si sottendono le regole della globalizzazione, di una visione incantata dal progresso, ma destrutturante la capacità dell'uomo contemporaneo a costruire una giustizia allargata. Nell'assenza di un modello completamente accettabile alcuni suggeriscono di accogliere la via scientifica, esemplificata dalle linee guida basate sulla Medicina delle prove, ma utilizzate secondo il modello delle *glidepaths*, cioè quello di costruire città sulla base di certezze scientifiche, convinti di non usarle come verità assolute, come quando il pilota dell'aereo atterra nei sentieri indicati dai radar di un aeroporto, libero di modificare la rotta a seconda delle condizioni di volo<sup>(13)</sup>.

### **L'anziano e l'anziano fragile**

Se il problema è la convivenza tra deboli e forti, l'interrogativo su quale spazio ci sarà per l'anziano si risolverà con la misura della sua condizione di forza o debolezza. Anche in questo campo stereotipi e pregiudizi caratterizzano il senso comune e poche idee traggono generazione da analisi e misure scientifiche. Su chi è il vecchio, su come è il vecchio, su cosa fa o può fare il vecchio e di rimando sulla garanzia della sua libertà si propone un dibattito culturale e politico che corre il rischio di ripercorrere gli scontri che hanno segnato in questa città la lotta medica tra vitalismo e positivismo, conservazione e progresso. La vecchiaia non è una malattia, ma la vecchiaia può essere l'età delle malattie. L'osservazione demografica di una curva di sopravvivenza sempre meno pendente verso la morte e che raggiunge la forma di quasi un quadrato ci esprime la tendenza a morire tutti alla stessa età, una età anziana, anche se più o meno lunga, e ci pone di fronte un uomo, aiutato dalla Medicina, che ha vinto e sta vincendo la lotta alla letalità delle malattie. Applicando il modello di analisi antropologica di chi ha osservato come il mondo degli uomini più forti si disegna intorno a tre assi di misura, della conoscenza dei metalli, della costruzione delle armi, dell'intercorrere della malattia che uccide<sup>(3)</sup>, nel contempo, una Medicina che tende ad annullare la morte naturale, lascia che la forza dell'uomo resti in balia della scienza

dell'uso delle risorse, e di quelle di guerra, oggi delle guerre economiche. Il fatto è che chi è insieme agli altri ugualmente in vita può essere molto differente, più o meno forte, più o meno malato. Nel mondo comune queste differenze si misurano in libertà e nel potere di restare libero. È un dato reale che le molte malattie che si possono accompagnare alla vecchiaia frequentemente limitino la libertà, ma anche chi vive il trascorrere degli anni senza che divengano malattia, è soggetto al rischio di perdere libertà. L'anziano pur potendo godere di una individuale esistenza significativa, corre il rischio di confrontarsi con gli altri sotto una atmosfera caratterizzata da logiche di marginalizzazione e di sostanziale inutilità. In questo modo l'anziano che mantiene, in quanto libero, o poco condizionato da malattie, la capacità di esprimere la propria attività è ridotto ad una entità problematica non dissimile da quella di chi ha una vitalità ridotta per malattia individuale e divenendo un problema sociale poco si distingue e si assimila al malato. In questo scenario si possono sviluppare continuità da una esistenza contrassegnata dalla tristezza esistenziale, tematica non medica, all'espressione di un fenotipo depressivo, proprio della competenza di studio e trattamento medico<sup>(19)</sup>. È possibile prospettare che l'anziano del contempo, di pari passo allo sviluppo della protezione messa in atto dai paesi civili, contro le patologie carenziali, la fame, quelle da consumo, il logoramento del sistema scheletrico articolare, e, in senso opposto, quelle esemplificate dal lusso metabolico ossidativo<sup>(21)</sup>, abbia ampie possibilità individuali di vivere un lungo tempo libero da malattie invalidanti<sup>(8,9)</sup>, ma su lui incombono, emergenti ed epidemiche, indotte dalla sconfitta del suo potere nello scontro intergenerazionale, i rischi di patologie da privazione, ad esempio, quelle che derivano dalla limitazione di stimoli alla plasticità cerebrale, nella vita non rinnovata da allenamento fisico o da nuovi apprendimenti<sup>(6)</sup>. Ciò porta a considerare la necessità di un ingresso nelle tematiche mediche della organizzazione degli spazi di vita legati al loro significato preventivo di malattia, ovvero della esistenza nella città di atti e spazi corroboranti e catalizzanti il mantenimento del potere contrattuale dell'anziano nello sviluppo sociale, dai supporti strutturali e tecnologici facilitanti i meno forti, ai centri di incontro promuoventi le relazioni, a politiche di sostegno, esemplificate dalle cosiddette *shareholder advocacy*, cioè la cessione di azioni di società che gestiscono servizi pubblici a rappresentanti delle fasce deboli. Per tali sviluppi la Medicina, in particolare nella sua parte speciale gerontologica e geriatrica, ha il ruolo di indirizzo di misura del campo di azione, di costruzione delle valutazioni di esito, che comporta il prerequisito di agire sulla base di conoscenze di un mondo reale del vecchio verso il quale solo in poche esperienze si è agito ponendo le basi

di una organizzazione speciale, quanto meno informativa di ciò che avviene. L'interrogativo si chiude con il riconoscimento delle possibilità che l'anziano sia individualmente favorito da una conquista di anni liberi da malattie invalidanti, ma che sia a rischio di perdere i guadagni ottenuti in uno scenario di svalutazione del significato di proteggere le fragilità dei suoi individui da parte della società in cui vive.

La fragilità è una condizione umana tanto facile da immaginare quanto difficile da definire. La predisposizione al rompersi, ad accusare un danno durante il periodo di invecchiamento, può corrispondere bene al concetto di ridotta capacità di resistere allo stress, di omeostenosi, causato dalla progressiva diminuzione con l'età della fisiologica riserva funzionale degli organi, aggravata dalla concorrenza di malattie croniche<sup>(7)</sup>. Nella persona che vive la vecchiaia, aspetti biologici e sociali indebolenti possono interagire criticamente, complicando le possibilità di una definizione biologica della fragilità. È pertanto la fragilità una nozione intuitiva che può avere ambiti di precisazione disparati a seconda che se ne esplorino misure fisiche piuttosto che in campi della morale e del sentimento ove la valutazione sarà poetica ed affidata alla sensibilità individuale<sup>(15)</sup>. Numerosi ed in progresso si contano le ricerche di criteri che consentano di identificare la fragilità come entità nosografica<sup>(26)</sup>. Si sono evidenziate condizioni funzionali: disturbi dell'equilibrio, della marcia, ridotto recupero dopo sforzo; anatomiche: perdita di peso, sarcopenia, malnutrizione, peraltro predominanti nella parte della popolazione anziana di oltre 80 anni, tutte associate ad incremento del rischio di istituzionalizzazione e morte, nonché alla insorgenza delle cosiddette sindromi geriatriche: non autosufficienza nelle attività quotidiane, depressione e deterioramento cognitivo, cadute, incontinenza urinaria<sup>(11)</sup>. In uno scenario così ampio non è ancora possibile stabilire il paradigma della fragilità, se quello della utilità di individuare una condizione riconoscibile in molti che invecchiano e che possano essere stimolati da una attenzione a temi di prevenzione, allargata agli ambiti ambientali e socioeconomici, o del riconoscere la necessità di buone pratiche sanitarie per alleviare le sofferenze individuali, il carico assistenziale, i tassi ed i costi di ospedalizzazione di una importante, ma piccola, parte di popolazione anziana, disabile e dipendente, od ancora del mettere in atto una cura efficace per rallentare una vulnerabilità<sup>(27)</sup>, concetto declinato da quello di fragilità, e circoscritto a definire una situazione patogenetica di declino funzionale e morte tipica delle comorbilità concorrenti di molte persone anziane malate. L'evidenza che ai fenotipi sindromici di fragilità si possono associare espressioni biologiche di condizioni modulatorie negative, rivelate, seppur aspecificamente, da indicatori plasmatici di infiammazione, suggerendo

snodi comuni con quelli di progressione di malattie vascolari, spinge a farci considerare una possibile reale identità di una fragilità distinta dalle malattie croniche che pur con essa possono agire sinergicamente. Quindi la prospettiva di una comprensione biologica del processo di fragilità dell'anziano suggerisce di accogliere un modello gerontologico bio-psico-sociale che consenta la identificazione di raggruppamenti della popolazione omogenei per rischio di declino e di morte, considerando obiettivi di ricerca, di cura e di interventi di salute, distinti per l'anziano, l'anziano fragile, l'anziano malato fragile (o anziano vulnerabile).

### **La nuova ricerca in Geriatria**

La condizione biologica dell'uomo è sempre stata "varia, variabile e multiforme" segnata sino all'inizio del secolo scorso dal suo modo di essere ed agire nella crescita e nell'invecchiamento. Nell'uomo moderno la connotazione della condizione anziana ha perso alcune delle specificità biologiche e sempre più si è avvicinata ad una definizione sociale, dando una dimostrazione secolare di come le dinamiche di adattamento possano essere una forza incredibile di plasticità del corpo e della mente. All'uomo del contempo si prospetta una condizione anziana ancora contrassegnata più da fenomeni sociali che fisiologici, ma soprattutto dalle capacità di dominare le malattie croniche, non associate alla vecchiaia, ma correlate al tempo di vita. In termini pragmatici per chi abbraccia oggi l'interesse all'anziano si affaccia una prospettiva sempre meno geriatrica, più gerontologica, e per la geriatria una centralità di cura ed assistenza focalizzata su quella situazione, tanto indefinita quanto intrigante e complessa, di fragilità che correla con lo sviluppo delle malattie croniche, piuttosto che con l'invecchiamento e di ricerca dei fattori di longevità. La Città diviene quindi luogo di studio per definirne le interazioni con i processi di fragilità dell'anziano.

## **INVECCHIAMENTO DELLA POPOLAZIONE E LONGEVITÀ A TORINO**

### **Metodi**

In una prima parte si è effettuata una raccolta dei dati dell'anagrafe del Comune di Torino sulla popolazione generale residente rilevata dal 31 dicembre 1998 al 31 marzo 2007 per elaborare considerazioni sulle ricadute nella popolazione anziana di un corso decennale segnato da eventi economici di congiuntura. Sono stati definiti anziani i residenti che nell'anno di

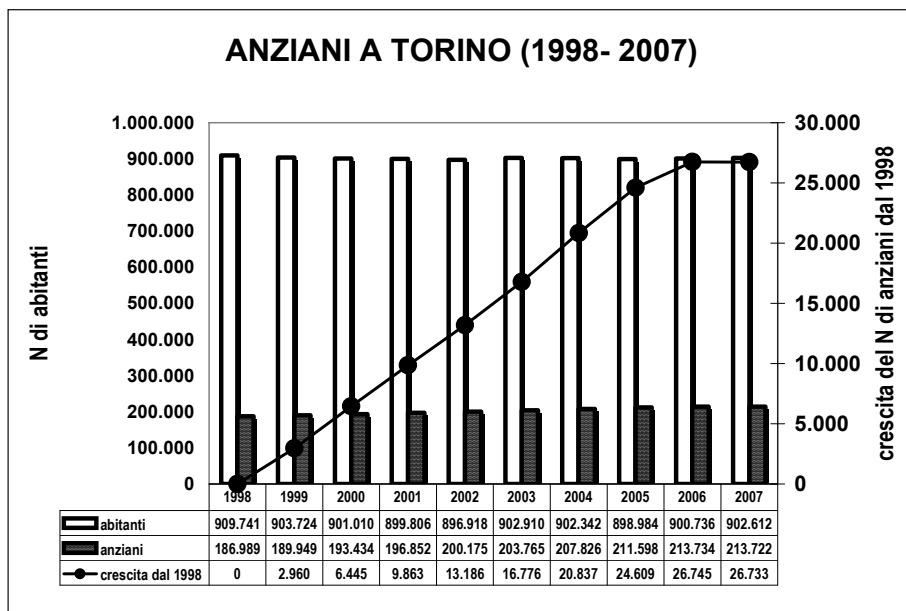
osservazione hanno compiuto 65 anni o più, bambini e adolescenti i residenti che nell'anno hanno compiuto meno di 16 anni.

In una seconda parte si è effettuata una raccolta dei dati dell'anagrafe del Comune di Torino, limitatamente ai residenti anziani, nel corso degli ultimi 15 anni per confrontare la velocità di progressione del loro aumento in due periodi consecutivi ognuno di 7 anni. È stata calcolata la differenza tra le prevalenze delle 8 classi di età nelle quali gli anziani sono stati suddivisi (65-69; 70-74; 75-79; 80-84, 85-90; 90-95; 95-99;  $\geq 100$ , anni).

In una terza parte si sono analizzate le domande di servizi per la non autosufficienza presentate da cittadini ultranovantenni dal 1 gennaio 2001 al 31 dicembre 2006 presso l'Unità di Valutazione Geriatrica della ASL 2 di Torino e sono stati valutati gli esiti dei percorsi di cura attivati.

## Risultati

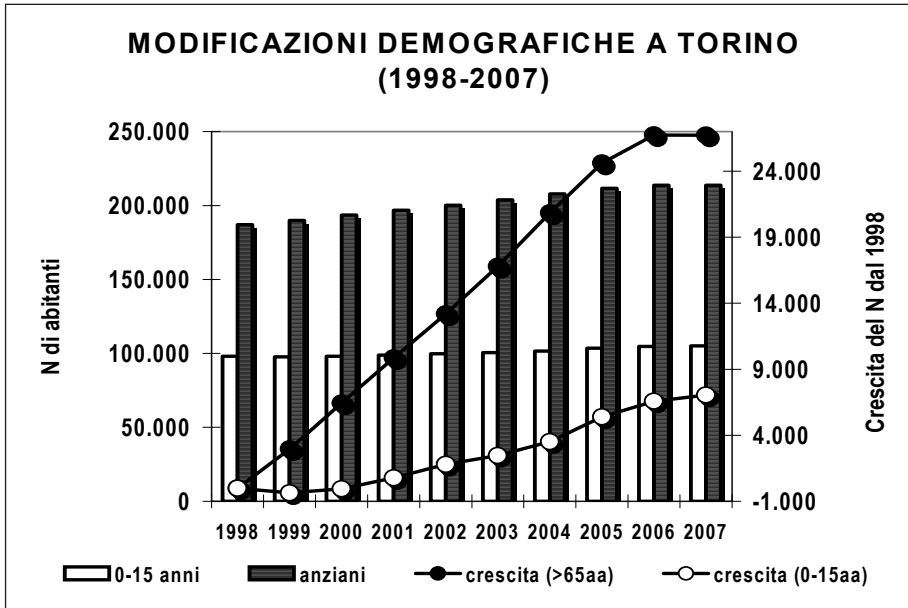
In dieci anni, si è osservata una crescita progressiva del numero di abitanti anziani che ha portato la Città ad avere 26.733 anziani cittadini in più, dai 186.979 del 1998 ai 213.722 al 31 marzo 2007. La popolazione generale inizialmente di 909.741 residenti risultava al 31 marzo 2007 di 902.612 con una proporzione di ultrasessantacinquenni rispettivamente 20,55% e 23,68% (Tabella I). L'aumento delle persone anziane, in termini assoluti e proporzionali, è stato progressivo: inizialmente si è accompagnato ad una diminuzione della popolazione generale che ha raggiunto il nadir nel 2002, al ritmo di circa 3000 persone in meno all'anno per 5 anni. In questo quinquennio l'aumento della proporzione di anziani nella popolazione generale potrebbe essere conseguente ad emigrazione e mancato ricambio di cittadini, condizionati dalle sfavorevoli opportunità produttive ed economiche, e non a processi individuali di invecchiamento. Nei cinque anni successivi, dopo il 2002, si rileva una ripresa del numero di abitanti, in generale, e contemporaneamente una progressione di crescita degli anziani, consentendo di riconoscere che, almeno in parte, l'aumento della proporzione di anziani nella Città è stato sostenuto da una crescita reale dell'invecchiamento delle persone che vi hanno abitato. Tuttavia la velocità di progressione della proporzione del numero di cittadini anziani, dopo la fase iniziale e centrale, si è rallentata, potendo far ipotizzare una diminuzione della velocità di crescita del ritardo dei processi di invecchiamento individuali o il raggiungimento, al termine del decennio, del loro massimo rallentamento. Potremmo commentare che l'aumento degli anziani a Torino, al termine dei primi cinque anni osservati, sia interpretabile come un *invecchiamento della Città* per via di trasformazioni del suo contesto sociale ed economico, ma l'osservazione che l'aumento degli anziani,



*Tabella I. Anziani a Torino (1998-2007). È rappresentato il numero di abitanti, residenti all'anagrafe del Comune della Città di Torino, per ogni anno, dal 1 gennaio 1998 al 31 marzo 2007, il numero dei cittadini residenti che nell'anno hanno compiuto 65 anni o più e la sua crescita, espressa come differenza del numero di essi tra l'inizio e la fine del periodo osservato. Nell'anno 2002 si osserva il numero più basso di residenti della popolazione generale e nell'anno 2006 si osserva un arresto della crescita del numero di anziani (Dati dell'ufficio statistico del Comune di Torino).*

nel successivo quinquennio, si accompagna alla ripresa della popolazione generale ci consente di immaginare anche un fenomeno reale di aumento della durata di vita degli abitanti, delineando Torino come *una Città che consente di invecchiare*. La riduzione della velocità di progressione della crescita degli anziani osservata negli anni finali, dal 2006, ci fa interrogare e richiede di essere esaminato per comprendere quanto in questa città, ove è consentito invecchiare, sia duraturo l'invecchiamento delle persone e se Torino sia *una Città in cui si vive a lungo*. Associando l'osservazione degli anziani a quella dei bambini ed adolescenti (Tabella II) si può rilevare che dal 1998 al 2002 la crescita del numero dei primi si accompagna a diminuzione o stabilizzazione del numero dei secondi, contestualmente alla già descritta diminuzione del numero totale di abitanti. Nel secondo periodo, la crescita degli anziani e della popolazione generale si accompagna ad una parallela crescita di bambini





*Tabella II. Modificazioni demografiche a Torino (1998-2007). Sono rappresentati, i cittadini residenti all'anagrafe del Comune della Città di Torino, per ogni anno, dal 1 gennaio 1998 al 31 marzo 2007, che, nell'anno, hanno compiuto 65 anni e più o meno di 16 anni e le modificazione delle due categorie, espressa come differenza tra l'inizio e la fine del periodo osservato. (Dati dell'ufficio statistico del Comune di Torino).*

ed adolescenti. Analizzando, le variazioni annuali del numero di anziani suddivisi in tre gruppi tra quelli che avevano compiuto 65-74 anni (giovani anziani), 75-84 anni (anziani) e 85 o più anni (grandi anziani) si rileva un aumento degli anziani di età di mezzo (75-84 anni) progressivo in tutti i dieci anni e molto ampio (circa 20.000 individui dall'inizio alla fine del periodo di osservazione), un aumento dei giovani anziani (65-74 anni) meno elevato (circa 5.000 individui) limitato ai primi anni ed interrotto dopo il 2004, ed aumento dei grandi anziani (85 anni ed oltre) particolarmente spiccato negli ultimi anni, con una flessione nel 2003 conseguente agli eventi climatici che in quell'anno hanno segnato la particolare delicatezza di questa fascia estrema della popolazione (Tabella III).

In conclusione l'andamento delle modificazioni della popolazione di Torino, negli ultimi dieci anni, dimostra un suo chiaro invecchiamento; questo aspetto demografico può essere interpretato, quando contemporaneo alla deflessione della popolazione generale, tra il 1998 e il 2002, come conseguenza di cambiamenti socioeconomici della Città, ma, successivamente, quale segno

di una Città che consente ai suoi cittadini che invecchiano di guadagnare un allungamento di vita.

Le analisi demografiche adottate dagli organismi internazionali, dall'Assemblea delle Nazioni Unite, comportano la possibilità di valutare il grado con il quale nei diversi territori cresce lo Sviluppo, consentendone la definizione tra quelli in via di raggiungerlo e quelli che lo hanno già raggiunto. In queste analisi si riconoscono tre fasi di transizione mosse dai due fondamentali fenomeni regolatori, la caduta della *mortalità* e la caduta della *fertilità*. Indicatori di questi fenomeni sono le misure dell'aumento di bambini e adolescenti oppure l'aumento di adulti in età di lavoro e di anziani. La prima delle tre fasi è definita sulla base di una riduzione della mortalità con aumento di bambini ed adolescenti, la seconda sulla base di una interazione tra la caduta della mortalità e una iniziale riduzione della

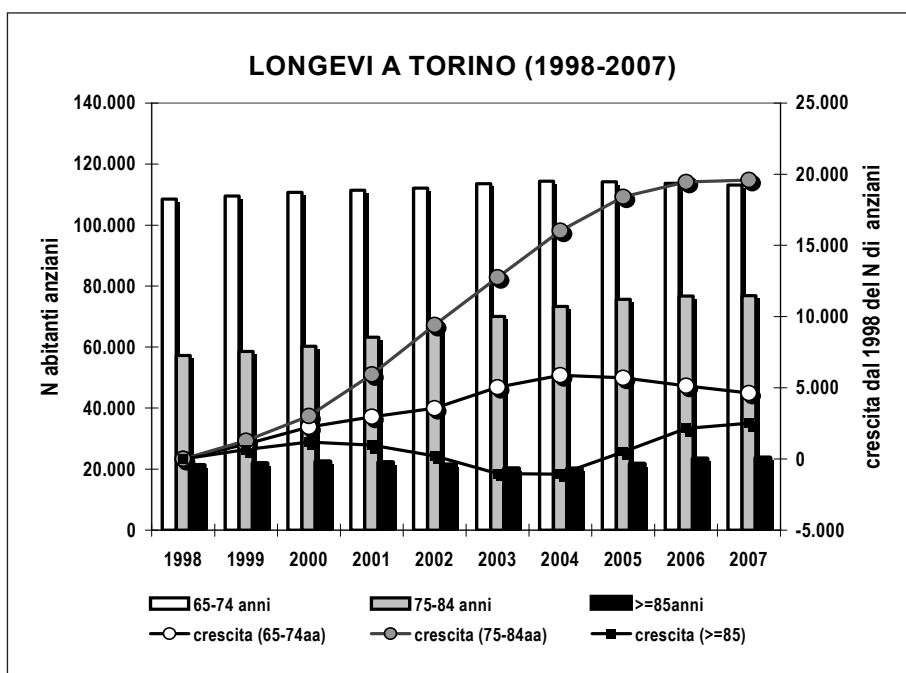


Tabella III. *Longevi a Torino*. È rappresentata la distribuzione per ogni anno dal 1998 al 2007 dei cittadini anziani residenti all'anagrafe della Città di Torino, suddivisi in quelli che nell'anno avevano compiuto 65-74 anni (giovani anziani), 75-84 anni (anziani) e 85 o più anni (grandi anziani) e la crescita annuale del numero dei tre gruppi dall'inizio alla fine del periodo osservato. Nel 2003 si osserva la deflessione della crescita correlata agli eventi climatici (Dati dell'ufficio statistico del Comune di Torino).

fertilità con un aumento degli adulti, la terza sulla base di una caduta della fertilità con aumento degli anziani. Con questi riferimenti le connotazioni di un paese si identificano con caratteristiche diverse e graduate di *sviluppo* o di *invecchiamento* o di *invecchiamento parallelo a sviluppo*. La situazione di Torino riconosce, nell'ultimo decennio, una crescita sia di anziani che di bambini ed adolescenti consentendo di affermare che in essa si intersecano contemporanei elementi di sviluppo ed invecchiamento. Peraltro, i territori che hanno raggiunto la massima speranza di vita alla nascita, e tra questi primeggia l'Italia, e tra le grandi città, Torino, particolarmente in alcune sue Circoscrizioni, sfuggono alla possibilità di essere completamente classificati in una delle tre fasi tradizionali di transizione demografica e, come se si trattasse di un laboratorio sperimentale, si impone la necessità di individuare altri razionali, oltre ai determinanti di mortalità e fertilità, che consentano di spiegare la contemporaneità della crescita parallela di ogni classe di età, di bambini ed adolescenti, di adulti, di gruppi anziani di età differente. I risultati che ci indicano che la crescita degli anziani, a Torino, nell'ultima parte del trascorso decennio, è particolarmente segnata dalla crescita dei grandi anziani ci consente di considerare quale razionale del grado di sviluppo ed invecchiamento raggiunto l'esistenza di un nuovo momento, di *longevità*, determinante aspetti identificabili in una quarta nuova fase di transizione. Dalla crescita dei bambini ed adolescenti, nel dopoguerra e prima degli anni '90, al progressivo espandersi delle classi di età anziana, negli anni 2000, alla progressione del numero del numero dei grandi vecchi dal 2006 si delinea, in Torino, la successione dallo *sviluppo* all'*invecchiamento* alla *longevità*.

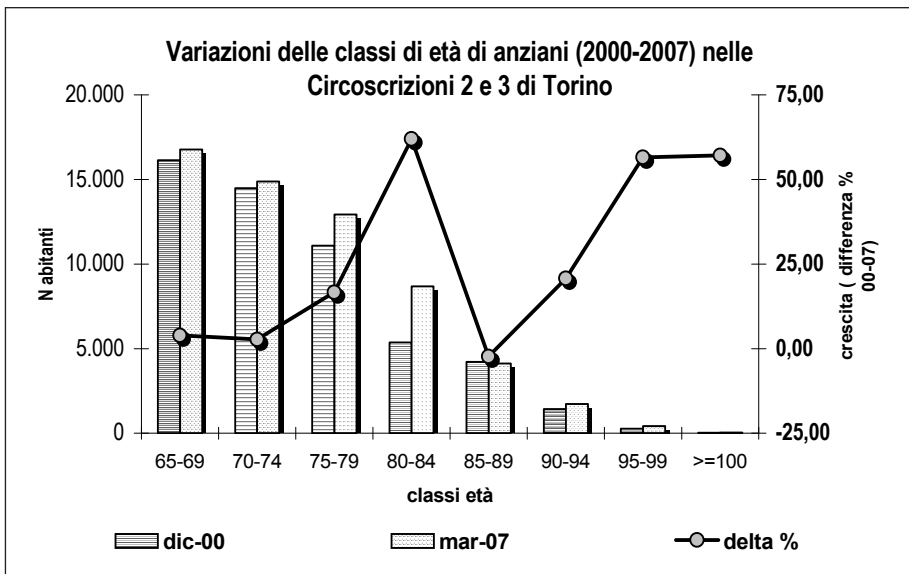
Ci si può interrogare di quanto è stato grande il fenomeno. Analizzando la composizione della popolazione anziana dal dicembre 1993 al 31 marzo 2007 si è osservata una tendenza generale alla progressiva crescita della grandezza delle classi di età di anziani con un andamento differente tra un primo periodo, tra il 1993 ed il 2000, ed un secondo periodo, tra il 2000 e il 2007.

Tra il 1993 ed il 2000 si sono osservate espandere le classi di età sino ad 80 anni e successive a 84 anni, ma non quella dei cittadini di età tra 80 e 84 anni. Tra il 2000 ed il 2007 si sono osservate espandere le classi di età sino ad 84 anni e successive a 89 anni, ma non quella dei cittadini di età 85-89 anni. Possiamo interpretare il fenomeno quale aumento di anni di vita per la maggior parte dei giovani anziani e per una più ridotta parte di grandi anziani. In altri termini si è evidenza: una configurazione della popolazione anziana in accordo ad una riduzione della mortalità per i giovani anziani; una tendenza alla progressiva concentrazione del termine della vita in età tra 80-89; un progressivo aumento della parte della parte della popolazione anziana che supera gli 89 anni. In

questa dinamica si sono evidenziate differenze tra un primo periodo, 1993-2000, ed un secondo, 2000-2007. Nel primo la diminuzione di mortalità pare interessare gli anziani di età immediatamente inferiore a 80 anni nel secondo gli anziani di età immediatamente inferiore a 85 anni.

Lo scenario rappresentato ci consente di ipotizzare che nel corso degli ultimi 15 anni a Torino si siano verificato un cambiamento dei processi di invecchiamento, con una progressione del cosiddetto invecchiamento di successo interessante molti cittadini grandi anziani ed uno slittamento verso una maggiore sopravvivenza di cittadini anziani fragili e vulnerabili, stimabile entro un range di 5 anni. D'altra parte i dati epidemiologici condotti dagli osservatori regionali confermano, nel periodo esaminato, un incremento della speranza di vita alla nascita.

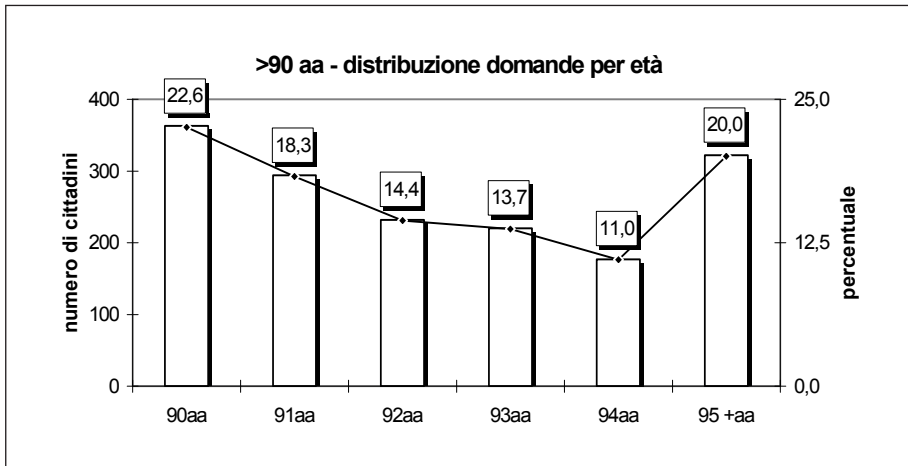
Ci si può interrogare sulla qualità di vita degli anni guadagnati. Si sono analizzate le valutazioni individuali effettuate, nel corso di 6 anni, in Torino, da parte della Unità di Valutazione Geriatrica (UVG) alla quale si riferiscono le due Circoscrizioni della Città, la 2 e la 3, che contano le maggiori prevalenze



*Tabella IV. Variazioni delle classi età di anziani (2000-2007) nelle Circoscrizioni 2 e 3 di Torino. Sono rappresentate le classi di età nell'anno 2000 e 2007 di anziani e la variazione delle loro grandezze con le differenze percentuali prima e seconda osservazione, nel 2000 e nel 2007. Le classi sino a 80 anni, nel 2000, e sino a 85 anni, nel 2007, delineano l'area dell'invecchiamento e quelle successive a 80 nel 2000 e a 85 nel 2007 l'invecchiamento di successo.*

di anziani. L'UVG è una organizzazione che raccoglie i bisogni della non-autosufficienza, funzionando quale unico snodo valutativo per ottenere da parte del Servizio Sanitario Nazionale l'erogazione di servizi di assistenza sanitaria residenziale, semiresidenziale e domiciliare.

Le domande di intervento per la non autosufficienza osservate durante 6 anni sono state 8420 e quelle di ultranovantenni 1608, 19,1%. Questa osservazione, seppur indirettamente, ci permette di immaginare che a Torino molti anziani vivano la vecchiaia mantenendo l'autonomia sino a tardissima età. Dalla distribuzione delle domande in relazione all'età dei cittadini ultranovant'enni, si osserva che nel 20% di essi l'età alla quale si era maturato il bisogno di aiuto, richiesto tramite l'UVG, era di oltre 95 anni (Tabella V). Tra le persone valutate, circa 10%, nonostante l'età di oltre 90 anni e la fragilità che le avevano portate a domandare aiuti assistenziali, è risultato avere problemi non associati ad invalidità da malattie croniche e l'aiuto richiesto conseguiva a problemi relazionali determinati da povertà nei campi di valutazione degli aspetti sociali di salute. Dai risultati degli esiti degli interventi effettuati si è riconosciuto elettivo quello dell'assistenza domiciliare. Si è rilevato che sono stati erogati servizi che hanno permesso a molti di godere della domiciliarità, ma questi non sono stati sufficienti per colmare le attese di tutti i cittadini per i quali ne era stato riconosciuto il bisogno.



*Tabella V. Domande di servizi di assistenza per la non autosufficienza nelle persone di oltre 90 anni a Torino. È rappresentata la distribuzione per diverse categorie di età, numero di cittadini e percentuale, di 1682 cittadini di età 90 aa e oltre che hanno presentato domande alla Unità di Valutazione Geriatrica della ASL2, raccolte tra le 8420 presentate nel periodo tra il 1 gennaio 2001 e il 31 dicembre 2006 da cittadini di tutte le età.*

I risultati ci presentano uno scenario nel quale: almeno 4% dei cittadini di Torino hanno raggiunto 95 anni vivendo in autogestione familiare, anche in condizioni di libertà da malattie croniche invalidanti; la fragilità e vulnerabilità di molti grandi anziani può essere affrontata con validi interventi domiciliari; lo sviluppo dei servizi territoriali è ancora incompleto per assolvere al bisogno di cure di molti anziani fragili che da essi potrebbero ricavarne un rafforzamento.

## **MEDICINA DELLE DISUGUAGLIANZE**

### **Metodi**

Si è considerata la eventualità di differenze geografiche, all'interno della Città, del processo di longevità e dell'offerta di alcuni percorsi di cura.

Dai dati dell'anagrafe relativi al periodo dal 31 dicembre 2000 al 31 marzo 2007, sono stati presi in considerazione i cittadini anziani delle 10 Circoscrizioni della Città di Torino, che nei diversi anni avevano compiuto 65 anni, suddivisi in 8 classi di età (65-69; 70-74; 75-79; 80-84, 85-90; 90-95; 95-99;  $\geq 100$ , anni). È stata analizzata la numerosità della varie classi, e la sue differenze negli anni in ognuna delle Circoscrizioni.

In una seconda parte è stato condotto uno studio osservazionale retrospettivo di coorte sui cittadini afferenti consecutivamente ad un Pronto Soccorso metropolitano, per sincope o lipotimia, dal gennaio 2003 all'ottobre 2003; i dati, stratificati per sesso, sintomi associati e patologie associate e correlate all'evento, sono stati analizzati mediante analisi della varianza (ANOVA). Per ciascun strato è stato comparato il ricorso all'eventuale necessità di ospedalizzazione o l'invio a eventuali successivi percorsi di cura territoriale.

### **Risultati**

Tra il 2000, ed 2007 in tutte le Circoscrizioni si è osservata una tendenza all'aumento del numero di anziani presenti nelle diverse classi di età, ad eccezione che per la classe di 85-90 anni, con una differenza positiva tra il primo e ultimo anno osservato, in seguito al cambiamento dell'impatto della mortalità nei cittadini di diversa età, ed all'acquisto di longevità. Nelle 10 Circoscrizioni il cambiamento non è stato omogeneo indicando che i processi di invecchiamento, ed in particolare dell'invecchiamento di successo è differente a seconda delle aree cittadine considerate. Il rilievo di queste differenze, all'interno della Città, coincide con l'osservazioni condotte dalla Rete Regionale dei Servizi di Epidemiologia che hanno messo in luce differenze

geografiche di mortalità generale e di ricovero ospedaliero anche all'interno di realtà ristrette del territorio cittadino<sup>(12)</sup>. A Torino, tra gli anni '80 ed il 2000, era stata evidenziata una influenza importante dei fattori non medici sulla speranza di vita, con differenze di circa 4 anni tra zone di residenza più povere rispetto a quelle più ricche<sup>(24)</sup>. I correlati della disomogeneità tra quartieri possono essere individuati in diversità delle origini geografiche ed etniche dei residenti, in quelle lavorative e delle situazioni abitative, della scolarità o di altri fattori che possono assumere importanza nel segnare condizioni di *deprivazione sociale* sviluppando dinamiche di fragilità gruppo-centrata (quartiere centrata) della popolazione anziana.

Fenomeni di impatto sulla salute da parte delle disuguaglianze sono stati provati diffusamente in molti paesi<sup>(4)</sup>. In modo esemplificativo si è presentato il caso della Germania ove la condizione di suddivisione della popolazione tra Est ed Ovest, dal dopoguerra alla caduta del comunismo, e la sua successiva riunificazione dopo la caduta del muro di Berlino ci ha messo a disposizione un laboratorio demografico sperimentale che ha permesso di verificare l'impatto dell'organizzazione politica e sociale in tre momenti di differente benessere socioeconomico: uno, sino al termine della guerra, in cui il contesto era simile per tutta la popolazione tedesca, un secondo caratterizzato da differenze di sviluppo nelle due di popolazione, veloce per quella nell'Ovest e ritardato per quella nell'Est, una terza, dopo la riunificazione delle due parti, in cui gli impatti socioeconomici hanno ripreso un corso comune sulla intera popolazione. Durante la divisione la crescita di speranza di vita è stata penalizzata di molti anni per la parte dell'Est, ma dopo la riunificazione, in pochi anni, la speranza di vita è ritornata omogenea per tutti i cittadini indivisi della Germania.

Le relazioni tra povertà e salute si declinano in rapporti tra *povertà assolute e salute* e tra *povertà relative e salute*. Le prime concernono la mancanza di risorse di base, così come avviene nei paesi del sottosviluppo, le seconde i rischi ambientali, gli stili di vita e l'esclusione sociale. Quest'ultima è la più incombente sugli anziani fragili e più in particolare tra quelli la cui fragilità è correlata a malattie croniche, gli anziani vulnerabili.

Nell'animo di verificare se la disponibilità del sistema sanitario della Città offre ai cittadini una disponibilità indiscriminata per età si è focalizzata l'attenzione sulle dinamiche di risposta ad una grande sindrome geriatrica nella quale episodicamente si altalenano nel decorso: *sincope/caduta/delirium*. La definizione dei singoli eventi che la compongono può riconoscere una correlazione positiva tra evento e malattia ischemica cardiaca o evento e malattia cerebrale acuta vascolare, chiaramente riconoscibili quali cause,

ma quando gli eventi si esprimono in sequela, come nelle storie frequenti di molti grandi anziani, più che al sovrapporsi di patologie differenti pare essere di fronte all'espressione fenotipica di una fragilità modulatoria della circolazione, una cosiddetta *instabilità neurocardiovascolare*. In osservazioni preliminari si era riconosciuta nello svenimento o sincope la motivazione più frequente di accesso al Pronto Soccorso tra gli ultrasessantacinquenni<sup>(22)</sup>. Analizzando una serie di 1291 pazienti, di età 75 o più anni, 42% maschi e 58% femmine, accettati in un Dipartimento di Emergenza e Accettazione di Torino, per svenimento o sincope, e seguendone i percorsi successivi si rileva una significativa maggiore prevalenza di grandi anziani, 52% vs 44% ( $p < 0,001$ ), esordio con sintomatologia associata complessa: dolore toracico (29%), delirium (24%), febbre (15%), riconoscimento diagnostico delle cause limitato al 60% dei casi, ospedalizzazione nel 66% dei casi con cardiopatia correlabile e nel 48% dei casi con malattia cerebrale correlabile. Tra i pazienti dimessi la programmazione di un percorso diagnostico assistenziale è risultata significativamente inferiore nei pazienti di 85 e più anni rispetto ai più giovani (4,2% vs 9,2%,  $p < 0,001$ ) mentre la riammissione per un nuovo evento è risultata significativamente superiore nei pazienti più anziani ( $> 84$  aa, 6,7%; 75-84 aa 1,0%,  $p < 0,001$ ). Le osservazioni confermano quanto frequentemente la fragilità del grande anziano si esprima in un evento polimorfo e nel quale, confondenti, entrino in gioco più malattie concorrenti. La sincope riassume una suscettibilità del grande anziano alla comparsa di una sindrome complessa di instabilità del circolo, per riduzione della riserva funzionale associabile all'invecchiamento, facilitante disfunzioni del ritmo cardiaco, ipotensione ortostatica, ipoafflusso cerebrale, disidratazione, effetti avversi di farmaci, ed elementi di malattie croniche correlate cerebrali, cardiache, osteoarticolari, renali. La molteplicità dei determinanti il complesso causale originario della sindrome complica il percorso diagnostico e comporterebbe l'attivazione di una organizzazione di tutela non esauribile in un Pronto Soccorso. I risultati paiono esprimere una insufficienza della rete di protezione, in particolare nei confronti dei grandi anziani, ed induce a ritenere una persistenza di atteggiamenti sanitari discriminatori per età che ricadono in un uso inappropriato di riammissioni ospedaliere evitabili. Le motivazioni profonde del problema possono ricondursi ad una situazione di esclusione sociale nella quale frequentemente versa l'anziano infragilito dalle malattie croniche. Questa può risultare un importante determinante della difficoltà di accesso ai servizi sanitari che risulta l'elemento prioritario delle possibilità di prevenzione per chi è malato onde evitare risposte discriminatorie della Medicina. In questo contesto la discriminazione può conseguire ad uno



squilibrio dell'accesso alle tecnologie sanitarie di maggiore qualità, disponibili in ospedale, meno accessibile, rispetto al territorio, più accessibile. Sotto questa luce sorge l'opportunità di uno sviluppo territoriale della medicina speciale incentrata sui bisogni dei pazienti anziani vulnerabili, e quindi di uno sviluppo territoriale delle competenze geriatriche<sup>(20)</sup>. Per questi motivi sono sorte le esperienze di *ospedalizzazione a domicilio* e di *congiunzione dell'assistenza geriatrica territoriale* con la medicina generalista nelle cure domiciliari, e Torino di alcune è stata antesignana in Italia<sup>(1,5)</sup>.

## **ASPETTI EMOZIONALI ED ASSISTENZIALI PER RAFFORZARE L'ANZIANO**

### **Metodi**

Per esplorare la complessità delle diverse sfaccettature nelle quali è possibile declinare il concetto di fragilità si sono condotte osservazioni sugli aspetti psicologici e comportamentali associati a condizioni di vulnerabilità di anziani, in assenza di deterioramento cognitivo, e, in anziani affetti da demenza, si sono considerate alcune prospettive di rafforzamento mediante interventi assistenziali.

Nella prima parte si è focalizzata l'attenzione sulle cosiddette relazioni deboli che, nell'anziano, più che nell'adulto, possono colmare un'esistenza privata di ruoli di attività sociale, analizzando le prevalenze di emozioni del quotidiano, riferite al tempo di 7 giorni precedenti, in una intervista semistrutturata, condotta a casa, parallelamente all'inquadramento complessivo del paziente da parte dell'Unità di Valutazione Geriatrica della ASL 2 di Torino, implementata con il ruolo di uno psicologo, in soggetti senza deterioramento cognitivo ad un scala di screening (Short Portable Mental Status Questionnaire (SPMSQ) > 7), ed in condizioni funzionali di mantenuta almeno parziale autosufficienza nelle attività basali della vita quotidiana (Activity Daily Living (ADL) perse < 3) in una serie di 355 residenti nelle Circoscrizioni 2,3 della Città, di età 73-99 anni, 215 femmine e 140 maschi, valutati consecutivamente dal novembre 2005 ad ottobre 2006.

In una seconda parte, si è disegnato uno studio osservazionale longitudinale caso/controllo per verificare l'efficacia di un programma di intervento mediante Centro Diurno Alzheimer (CDA) sulla riduzione di istituzionalizzazione, condotto in una serie di 392 pazienti residenti in Città nelle Circoscrizioni 2, 3, afferenti alla Unità di Valutazione Alzheimer della ASL 2 di Torino, tra gennaio 2003 e dicembre 2005, di età 61-87 anni, affetti da Demenza (secondo

i criteri del DSM IVR) con associati disturbi comportamentali, viventi al domicilio con mantenuta capacità di spostamento: 279 valutati eligibili al trattamento per disponibilità di caregiver, 94 (casi) inseriti nel programma di CDA con frequenza tra 4-6 sei giorni la settimana, per 6.8 ore al giorno, 184 non inseriti (controlli); follow-up di 18 mesi.

## **Risultati**

Il campione analizzato, reclutato in corso di visite al domicilio, per consulenza geriatrica al medico generalista o per la erogazione di interventi di protezione socio-sanitaria, è risultato rappresentativo degli anziani e grandi anziani fragili, risultando mediana la presenza di 4 malattie croniche per paziente, oltre la metà delle quali correlabili con declino funzionale. 50% dei casi vivevano soli, in minor grado erano rappresentate difficoltà già affrontate con un sostegno economico od assistenziale da parte dei servizi sociali (7%). È stato possibile catalogare le emozioni deboli, misurate con una intervista semistrutturata, riferita al tempo di una settimana, in favorevoli: vissuti emotivi contestuali o recenti di contentezza, soddisfazione, fiducia, orgoglio, conforto; od in sfavorevoli: frustrazione, tristezza, rabbia, noia, dispiacere, colpa, paura, vergogna. È stato rilevato che le prevalenze delle emozioni favorevoli variavano tra 60-90%, quelle delle sfavorevoli tra 15-40%. Emerge uno spaccato di Torino rappresentativo di una popolazione anziana, in parte malata, ma non colpita da declino cognitivo, che nella maggior parte dei casi risponde con forza alla fragilità, recuperando robustezza nel mantenimento della dignità di una propria casa e di una capacità di linguaggio e conoscenza.

I risultati hanno messo in luce un mondo reale che contrasta con la visione dello stereotipo di vecchio solo, disperato ed impaurito, ma riconosce una varia, multiforme immagine dell'anziano, tra fasi molteplici e variabili di vita. È possibile interpretare questa osservazione come scoperta che nell'invecchiamento associato alle fragilità delle malattie croniche esiste la forza di un mondo interiore che consente di mantenere integra, ancorché in età molto avanzata ed in condizioni di vulnerabilità, la capacità di autogestione individuale degli aiuti necessari per sopperire le dipendenze correlate alle fragilità somatiche e di dare senso ad una vita di maggiore o minore qualità.

Queste dinamiche di rafforzamento sono state evidenziate in anziani liberi dal condizionamento di declino cognitivo e si deve considerare un loro progressivo rallentamento e perdita, quando la condizione di vulnerabilità è correlata alle malattie neurodegenerative dementigene, che tendono ad esprimersi con una crescita esponenziale all'età, pur comportando un limite alla longevità della popolazione per via degli eventi mortali ad esse conseguenti. Peraltro, il

deterioramento cognitivo e la demenza causati da queste malattie si correlano a fragilità allargate, da quelle del paziente ai vicini, i familiari che li assistono, spesso anziani e grandi anziani, nei quali i processi di invecchiamento vengono esposti ad un rischio aggiuntivo di accentuazione delle fragilità, somatiche e psicologiche, per l'affaticamento assistenziale. Ci si può interrogare se e quanto siano ancora possibili dinamiche di rafforzamento dell'anziano fragile affetto da demenza. In questo caso il senso di qualità di vita, non più riconducibile ad espressioni emotive comunicabili, può essere segnato e misurato nel mantenimento della funzionalità somatica e della partecipazione alla vita familiare.

Per verificare un programma di intervento mediante CDA rivolto a pazienti affetti da demenza associata a disturbi psicotici e comportamentali, si è valutata la possibilità di ritardare per il paziente la definitiva perdita della casa e della continuità di relazione parentale (istituzionalizzazione) sollevando i familiari di una parte quotidiana dell'assistenza, per 6-8 ore al giorno, 4-6 volte la settimana. In 95 pazienti (34%) che per comodità dei familiari e facilità di spostamento sono stati inseriti nel programma, nel corso di 18 mesi di follow-up, l'istituzionalizzazione è risultata significativamente minore ( $12\% \pm 2.3$  vs  $28\% \pm 4.1$ ;  $p < 0.001$ ) e significativamente procrastinata ( $15 \pm 2$  mesi vs  $8 \pm 3$ ;  $p < 0.001$ ) rispetto a quella di 184 (66%) pazienti che non hanno seguito il programma.

È possibile considerare che il periodo di assistenza semiresidenziale sia risultato efficace nel ridurre l'istituzionalizzazione, pur in pazienti affetti da una fase avanzata di demenza, moderata o severa, associata a gravi disturbi comportamentali, sia per la disponibilità ambientale che per il programma in essa condotto, configurando il CDA non solo come sede di dinamiche assistenziali di sollievo, ma come luogo di cura<sup>(18,23)</sup>. Si prospetta la necessità di verificare con nuove ricerche quanto l'impatto favorevole del programma di CDA sia correlato alle differenti dinamiche che in esso sono contenute, ambientali e di assistenza, di farmacoterapia, di psicoterapia allargata ai familiari.

Il significato di utilità dell'efficacia, l'*effectiveness*, del programma di CDA ed in generale delle attenzioni a coinvolgere nelle cure dell'anziano vulnerabile per malattie dementigene i suoi familiari risulta provata da molteplici ricadute individuate, per il paziente, nel mantenere in vita l'oggettività di relazioni, la partecipazione alla vita di famiglia, per l'organizzazione sanitaria l'estensione dei tempi di autogestione familiare, in uno dei percorsi assistenziali a maggior costi gestionali tra quelli delle malattie a lungo termine, per l'organizzazione sociale lo sviluppo di un modo di esprimersi dell'alleanza tra cittadini anziani attivi e anziani fragili nel rispondere ai problemi di sofferenza della società.

L'evidenza che fattori emozionali, psicologici ed assistenziali possano contribuire a migliorare il benessere degli anziani fragili comporta l'assunzione di una organizzazione sociale e sanitaria che eviti di considerarli isolatamente o alternativi alle dinamiche di prevenzione delle fragilità biologiche correlate alle malattie croniche, metaboliche, cardiovascolari, oncologiche e costruisca una protezione per l'anziano fragile completa, comprensiva di interventi basati sulla considerazione che nelle differenti facce della fragilità si assiste ad un gioco interattivo, piuttosto che complementare, dei diversi fattori.

La raccolta di risultati favorevoli alla possibilità di rafforzamento ci consente di considerare che la fragilità dell'anziano è un concetto identificativo che trascende i riferimenti semantici alla debolezza della persona e dei suoi costituenti fisici, psicologici e sociali e si sostanzia come debolezza dell'essere misurata in termini di interventi possibili e realizzabili per risolvere il bisogno, ovvero l'attesa per abolire o ridurre le cause di problemi affrontabili.

## **IL RICOVERO E LA CONTINUITÀ DELL'ASSISTENZA**

### **Metodi**

L'impatto delle fragilità dell'anziano correlate all'invecchiamento e delle vulnerabilità determinate dalla concorrenza di malattie croniche sulla Città è stato considerato mediante indicatori elaborati dal Data Base del Dipartimento di Lung'assistenza e Anziani dell'ASL 2 di Torino. Questo strumento, espressione di un metodo di valutazione multidimensionale applicata nei diversi luoghi di cura afferenti all'organizzazione geriatrica dipartimentale: nelle cure domiciliari di lung'assistenza, negli ambulatori, nei nuclei residenziali di Unità di Cura Speciali (SCU) e nel CDA per i disturbi comportamentali e le comorbilità associati alla Demenza, nelle corsie ospedaliere dell'Unità Geriatrica per Acuti (UGA), nella Unità Valutativa Geriatrica, si basa sull'impiego di una cartella geriatrica orientata per problemi. La raccolta dati, associata alle attività quotidiane, comporta l'implementazione delle stesse con un sistema informativo finalizzato, prima che a scopi di consultazione o ricerca, al sostegno della possibilità di guidare, mediante la elaborazione di risultati di esito dei percorsi di cura effettuati, l'applicazione delle linee guida *evidence based*, in un mondo reale nel quale la variabile multiformità di presentazione dei problemi di malattia dell'anziano vulnerabile comporta scelte clinico assistenziali comprensive della valutazione di ogni sfaccettatura, biologica, psicologica, sociale delle fragilità. Si sono analizzati dati di attività sviluppate nel corso del 2006, esemplificative di uno spaccato della popolazione

anziana che è curata in ospedale, spesso soggetta a ricoveri ripetuti, per malattie a lungo termine che hanno condizionato la perdita dell'autonomia, e della popolazione anziana che vive temporaneamente o definitivamente in strutture residenziali, le case di riposo di un tempo, implementate di molte valenze terapeutiche ed assistenziali sanitarie e denominate RSA (Residenze Sanitarie Residenziali).

## **Risultati**

Il momento ospedaliero è quello più frequente ove avviene il passaggio da una condizione di rischio di declino allo sviluppo di scompensi cronici organici, funzionali, e sociali. I problemi che convergono nel ricovero ospedaliero degli anziani rispondono ad un ampio ventaglio di bisogni di cura, meno che nell'adulto con obiettivi di modifiche per possibili guarigioni, con esiti che comprendono frequentemente, se ne stima nel 5% di tutti i ricoveri in fase di acuzie, sopravvivenze condizionate alla continuità di terapie complesse e di dispositivi per un sostegno artificiale della vita, necessità di una assistenza continuativa per una grave perdita cronica dell'autosufficienza, perdita di autogestione individuale da una privazione di determinanti di salute relazionali, socioeconomici ed ambientali.

La parte degli anziani fragili più rappresentata nei ricoveri ospedalieri è quella delle persone di 80 e più anni che possono giungere a rappresentare dal 20 al 30% di tutti i ricoveri in area medica, ed ortopedica, dei grandi stabilimenti ospedalieri cittadini. In una serie di 535 (72% femmine, 28% maschi) ricoveri consecutivi in UGA, l'età media è risultata di  $83,7 \pm 5,6$  aa. Si è contata una mortalità intraospedaliera del 18% ed un esito in autogestione individuale o familiare nel 20%: il ritorno a casa è stato possibile nel 50% ma, 30% in gravi condizioni di dipendenza nelle funzioni della vita quotidiana (25% con necessità di interventi domiciliari di lung'assistenza con operatori tutelari, 5% in Assistenza Domiciliare Integrata (ADI), con supporti medico-infermieristici continuativi). Nel 32% l'esito della malattia acuta ha comportato il trasferimento in nuclei di cure residenziali, alcuni con progetti di riabilitazione geriatrica, altri di riorganizzazione della protezione domiciliare, altri, in attesa di un ricovero residenziale definitivo. Nella stessa serie, nel 62% il ricovero, oltre che per curare le patologie in fase di acuzie, è stato motivato dalla concorrenza di altri motivi non sanitari di disagio: 14% vivevano soli e problematicamente; 7% erano in attesa di istituzionalizzazione; in altri casi erano presenti: carenze abitative, malattie od indisponibilità alla assistenza da parte dei familiari, problemi comportamentali e conflittualità con i prossimi, danni da criminalità, malnutrizione non correlata a malattie ma a situazioni di povertà.

In questa rappresentazione dell'anziano vulnerabile in ospedale emergeva che la prevalenza predominante dei motivi di ricovero, 41%, riguardava una fase di malattia acuta e critica intercorrente a Demenza. Le diagnosi più frequenti associate alla Demenza, od ad essa correlate, risultavano Sepsi (18%), Polmonite da ingestione (18%), Stroke (14%), Disidratazione/Malnutrizione (13%), Cadute/Rabdomiolisi (10%), Scompenso Cardiaco (10%), Altre diagnosi (17%).

Questi dati ci consentono di considerare che lo spaccato della popolazione ospedaliera anziana è rappresentato da anziani malati fragili, o anziani vulnerabili, per la più parte dei quali è necessaria una continuità di cura tra ospedale e territorio, attraverso la predisposizione di qualificati percorsi, con piani assistenziali individualizzati, speciali per le diverse condizioni di vulnerabilità<sup>(27)</sup>.

La fotografia della rete residenziale cittadina ha messo in luce processi di accreditamento, segnati da qualificazione strutturale, dei livelli e dei ruoli assistenziali, una trasformazione radicale che può essere sintetizzata nel passaggio da *istituti per i poveri vecchi a luoghi di cura*. Il passaggio si è sviluppato, in partenza, con la creazione di una protesi alla solitudine dell'anziano, isolato e condotto all'istituzionalizzazione da povertà economiche e relazionali. In questa prima, ed ormai non più recente fase, la professionalizzazione degli operatori delle relazioni di aiuto ha portato a trasformare il ritiro sociale in un momento strutturato di accettazione e mantenimento della dignità di vita assistita. In una seconda fase, la trasformazione è approdata alla scoperta di inaspettate prospettive di cura. L'introduzione e l'applicazione di percorsi scientifici nella assistenza dei malati vulnerabili, con la possibilità di un ritorno alla vita a casa, nel contesto di un globale e ritrovato adattamento relazionale ed ambientale, ha predisposto uno spazio elettivo per la continuità delle cure ai malati fragili. Perché gli spazi e gli atti residenziali abbiano significato di utilità, di rafforzamento reale della fragilità, nel disporsi ad accogliere con valenze terapeutiche e risocializzanti i pazienti vulnerabili, tuttavia devono raccordarsi alla domiciliarità, alle dinamiche di qualificazione sanitaria dell'assistenza domiciliare di cosiddetta lung'assistenza.

Ci si può domandare in quale modo il ricovero in residenza possa divenire un valido complemento per la continuità delle cure in casi gravi, come nei casi di Demenza associata alla floridità di disturbi psicotici e comportamentali. Dai dati della SCU, in un periodo di un anno, in una serie di pazienti, 103 (35 maschi, 68 femmine, di età  $77,1 \pm 8,4$  aa), affetti da Demenza severa associata a gravi disturbi comportamentali e comorbilità, il trattamento ha

avuto come esito, in un tempo medio di ricovero di poco superiore al mese ( $37,3 \pm 2,4$  giorni), la possibilità di dimissione al domicilio nel 61,7% dei casi, raggiungendosi un compenso dei disturbi (admission vs discharge values of NeuroPsychiatric Inventory (NPI), “t” Student, end point 12 months: 41,6 Vs 21,9,  $p < 0,01$ ), con una parte di recupero dell’autosufficienza, e riduzione dei farmaci. L’intervento non ha modificato la malattia, riduce i sintomi ed il carico di stress dei familiari, risultando migliorata la possibilità di relazione del paziente.

Fotografando il mondo reale è possibile costruire modelli di intervento coerenti, misurandone l’efficacia sul piano clinico e la compatibilità su quello organizzativo ed economico.

In conclusione i risultati offrono elementi sufficienti per prospettare che nell’individuazione delle vie di sviluppo della continuità delle cure agli anziani fragili si cela una sfida sanitaria, ma anche di civiltà, di rispetto per chi soffre, in ultima analisi, di forza, contrapposta al rischio di indebolimento che può accompagnarsi agli anni guadagnati, alla longevità della Città.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Aimonino Ricauda N.A., Bo M., Molaschi M., Massaia M., Salerno D., Amati D., Tibaldi V., Fabris F.: *Home hospitalization service for acute uncomplicated first ischemic stroke in elderly patients: a randomized trial*. J. Am. Geriatr. Soc. 52, 278-283, 2004.
2. American Geriatrics Society Task Force on the Future of Geriatric Medicine: *Caring for older americans: the future of geriatric medicine*. J. Am. Geriatr. Soc. 53, 245-256, 2005.
3. Diamond J.: *Armi, Acciaio e Malattie*. Einaudi Torino, 1998.
4. Eikemo T.A., Huisman M., Bambra C., Kunst A.E.: *Health inequalities according to educational level in different welfare regimes: a comparison of 23 European countries*. Sociol. Health Illn. 30, 565-582, 2008.
5. Fabris F., Pernigotti L.: *Ospedalizzazione a Domicilio*. Rosenberg & Sellier Torino, 1990.

6. Fratiglioni L., Paillard-Borg S., Winblad B.: *An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia*. Lancet Neurol. 3, 343-353, 2004.
7. Fried L.P., Walston J.: *Frailty and failure to thrive*. In *Principles of Geriatric Medicine and Gerontology*. 4<sup>a</sup> ed. McGraw Hill, 1387-1402, 1998.
8. Fries J.F.: *Frailty, heart disease, and stroke: the Compression of Morbidity paradigm*. Am. J. Prev. Med. 29, 164-168, 2005.
9. Fries J.F.: *Measuring and monitoring success in compressing morbidity*. Ann. Intern. Med. 139, 455-459, 2003.
10. Golini A.: *L'invecchiamento della popolazione: un fenomeno che pone interrogativi complessi, in Rapporto Sanità 2005. Invecchiamento della popolazione e servizi sanitari*. Il Mulino Editore Bologna, 13-26, 2005.
11. Guralnik J.M., Ferrucci L., Simonsick E.M., Salive M.E., Fallace R.B.: *Lower extremity function in persons over the age 70 years as a predictor of subsequent disability*. N. Engl. J. Med. 332, 556-561, 1995.
12. Huisman M., Kuntst A.E., Andersen O., Bopp M., Borrel C., Costa G., Deboosere P., Desplanque G., Donkin A., Gadeyne S., Minder C., Regidor E., Spadea T., Valkonen T., Mackenbach J.P.: *Socioeconomic inequalities in mortality among elderly people in 11 European populations*. J. Epidemiol. Community Health 58, 468-475, 2004.
13. Kane R.L.: *Origin of the term glidepaths*. J. Am. Geriatr. Soc. 52, 651-652, 2004.
14. Levorato A., Rozzini R., Trabucchi M.: *I costi della vecchiaia. L'assistenza sanitaria negli anni Novanta: scenari e scelte possibili*. Il Mulino Editore Bologna, 1994.
15. Nahon L.: *Le fragilità psichiche in Rapporto Sanità 1998, Priorità e finanziamento del servizio sanitario nazionalità: la fragilità*. Il Mulino Editore Bologna, 1998.
16. Pernigotti L.M., Simoncini M.: *I costi della vecchiaia: dove nascono nuovi obiettivi di ricerca in geriatria*. G. Gerontol. 54, 2-5, 2004.
17. Pernigotti L.M.: *Il Mondo Reale*. I luoghi della Cura 2, 23-24, 2006.
18. Pernigotti L.M.: *La Cura del Paziente affetto da Demenza nella Senilità*. Prospettive Assistenziali 157, 13-19, 2007.
19. Pernigotti L.M.: *La Depressione nell'anziano: una patologia ancora misconosciuta e non adeguatamente trattata*. G. Gerontol. 52, 1-3, 2005.
20. Pernigotti L.M.: *Nuove prospettive nella cura delle fragilità contro la tirannia dell'urgenza e della frammentazione dei servizi sanitari*. Psicogeriatría 2, 88-102, 2007.
21. Semba R.D., Ferrucci L., Sun K., Walston J., Varadhan R., Guralnik J.M., Fried L.P.: *Oxidative stress is associated with greater mortality in older women living in the community*. J. Am. Geriatr. Soc. 55, 1421-1425, 2007.
22. Simoncini M., D'Agostino E., Pernigotti L.M.: *Syncope is it a misunderstood syndrome?* Arch. Gerontol. Geriatr. 44, 371-374, 2007.
23. Balla S., Simoncini M., Giacometti I., Magnano A., Leotta D., Pernigotti L.M.: *The daily center care on impact of family burden*. Arch. Gerontol. Geriatr. 44, 55-59, 2007.



24. Spadea T., Quarta D., Demarca M., Marinaci C., Costa G.: *Healthy life expectancy in the occupied segment of the Turin population*. Med. Lav. 96, 28-38, 2005.
25. Trabucchi M.: *I vecchi, la città e la medicina*. Il Mulino editore, Bologna, 2005.
26. Walston J., Hadley E.C., Ferrucci L., Guralnik J.M., Newman A.B., Studenski S.A., Ershler W.B., Hasrris T., Fried L.P.: *Research agenda for frailty in older adults: toward a better understanding of physiology and etiology: summary from the American Geriatrics Society / National Institute on Aging Research Conference on Frailty in Older Adults*. J. Am. Geriatr. Soc. 54, 991-1001, 2006.
27. Wenger N.S., Shekelle P.G.: *Measuring medical care provided to vulnerable elders: the assessing care of vulnerable elders-3 (ACOVE-3) quality indicators*. J. Am. Geriatr. Soc. 55, 247-487, 2007.



reported in the family of uncoupling proteins UCP. Finally an attitude to a lower level of physical activity has been observed in obese subjects, that persists unchanged after weight loss.

**Riassunto:**

La grande obesità – definita da un BMI > 40 kg/m<sup>2</sup> – ha una prevalenza in Italia dell'1% nelle donne e 0.7% negli uomini. Il trend di crescita negli USA denota incrementi ad andamento iperbolico a partire dal 1987, con maggior incremento nelle fasce di maggiore BMI. La grande obesità è associata a incremento di mortalità, con HR progressivamente crescenti: 2.44 per BMI > 50; in Italia è stato rilevato che, oltre al BMI, fattori indipendenti di incremento di mortalità sono il sesso maschile, l'età e l'inizio di malattia antecedente al 1980. I soggetti grandi obesi dimostrano alterata ossidazione dei lipidi, particolarmente a livello muscolare, con conseguente elevato quoziente respiratorio; tali alterazioni persistono anche dopo dimagrimento. Sono inoltre stati segnalati in soggetti obesi polimorfismi delle perilipine, che regolano la lipolisi basale. La regolazione della fame e sazietà a livello centrale e periferico può essere alterata nei soggetti obesi, e il cromosoma 2, che contiene il gene della pro-opiomelanocortina sembra poter essere individuato come un locus di suscettibilità dell'obesità. Alterazioni del sistema disaccoppiante persistenti anche dopo dimagrimento, sono ugualmente state segnalate nei soggetti obesi, come pure attitudini genetiche a scarsa attività fisica.

La grande obesità viene definita come lo stato clinico in cui il Body Mass Index (BMI) – Indice di Massa Corporea, dato dal rapporto tra peso corporeo (kg) e altezza (m<sup>2</sup>) – è  $\geq 40$ . Di recente, è stata inoltre identificata una situazione di ancora maggiore gravità (BMI  $\geq 50$  kg/m<sup>2</sup>), denominata obesità super o estrema. Nonostante l'evidente azione di fattori ambientali quali l'aumentata disponibilità di alimenti e l'adozione di stile di vita sedentario, l'obesità è largamente determinata da fattori genetici, che, come sarà esposto in questo articolo, determinano alterazioni sia della regolazione dell'ossidazione dei lipidi e della dispersione di calore, che del sistema regolatore della fame/sazietà e dell'attitudine all'attività fisica. Come è noto da tempo, studi su gemelli monocoriali, dizigotici, biologici e adottati hanno dimostrato che dal 30% al 70% dei casi il peso corporeo può essere ereditario<sup>(29,37,38)</sup>, avendo le attuali condizioni ambientali svolgono un ruolo altamente permissivo.

La grande obesità rappresenta un problema di notevole e crescente impatto sanitario, per la frequenza e la gravità delle complicanze e delle patologie associate, per l'elevata mortalità, e per i conseguenti elevati costi. Di recente è stato calcolato negli USA che negli obesi le spese sanitarie sono correlate in modo iperbolico al BMI: incremento, rispetto ai soggetti normopeso, del 25% per BMI da 30 a 35, del 50% per BMI da 35 a 40, e del 100% per BMI  $> 40$ <sup>(2)</sup>.

## PREVALENZA

La prevalenza nel 2000 in Italia è riportata nella Tabella I<sup>(23)</sup>.

Età (anni)	Maschi	Femmine
18-24	1	0.9
25-34	1.1	0.5
35-44	0.3	0.8
45-54	0.6	1.2
55-64	0.6	1.8
65-74	0.5	1.1
$\geq 75$	0.6	0.6
<b>Totale</b>	<b>0.7</b>	<b>1</b>

Tabella I. Prevalenza (% sulla popolazione adulta) in Italia di soggetti con BMI  $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup>.

È noto in Italia il tasso di crescita dell'obesità (+ 9%) dal 1999-2000 al 2005<sup>(23)</sup>, ma non sono reperibili informazioni sull'incremento specifico delle diverse classi di BMI. In USA, dove è stato studiato l'incremento percentuale dal 2000 al 2005, è risultato che l'aumento è progressivamente maggiore per i livelli di obesità più grave: + 24% per BMI > 30; + 38.6% per BMI > 35; + 52% per BMI > 40; + 66.4% per BMI > 45; + 75% per BMI > 50; il trend di incremento dei soggetti con BMI > 50 assume andamento iperbolico se lo si considera dal 1987: + 180% nel 1995; + 500% nel 2001; + 950% nel 2005<sup>(39)</sup>. Non è corretto traslare *sic et simpliciter* il dato nord-americano all'Italia, sia per le notevoli differenze di prevalenza e di trend (nel 2000-2001 la prevalenza dei soggetti con BMI > 40 era del 2.2% in USA e dello 0.85% in Italia e l'incremento percentuale 2000-2005 dei soggetti con BMI > 30 è stato rispettivamente del 24% e del 9%), che di abitudini alimentari e di stile di vita, ma comunque i dati americani dovrebbero allertare anche in Italia le Autorità Sanitarie a interventi specifici volti sia alla diagnosi precoce che al trattamento intensivo dei soggetti a rischio di grave obesità.

## MORTALITÀ

Due sono i più importanti studi di coorte volti a valutare la relazione tra BMI e mortalità: il primo, denominato "The American Cancer Society Study", pubblicato nel 1999<sup>(4)</sup>, ha considerato un milione di volontari, arruolati nel 1982 e seguiti per 14 anni; il secondo, "The Norwegian Study" pubblicato nel 2003<sup>(12)</sup>, ha considerato una coorte di 2 milioni di persone arruolata nel 1963-2001 e seguita sino al 2002. I risultati, riportati in dettaglio nella Tabella II,

The American Cancer Society Study <sup>(4)</sup>			The Norwegian Study <sup>(12)</sup>		
BMI	HR (uomini)	HR (donne)	BMI	HR (uomini)	HR (donne)
30.0-31.9	1.32	1.30	30.0-32.4	1.29	1.16
32.0-34.9	1.66	1.53	32.5-34.9	1.47	1.28
35.0-39.9	2.17	1.76	35.0-37.4	1.74	1.40
			37.5-39.9	1.90	1.62
>40	2.58	2.00	>40	2.53	1.93

HR = Hazard Ratio

Tabella II. Rischio di mortalità secondo BMI e sesso.

indicano chiaramente un incremento di mortalità relata all'incremento di BMI, con Harzard Rates di mortalità di circa 2.5 volte negli uomini e di 2 volte nelle donne con BMI > 40. Ambedue questi studi includevano soggetti con differenti livelli di obesità; il livello di BMI di riferimento era, rispettivamente, di 23.5-24.9 e di 22.5-23.4.

Un recente studio policentrico italiano, condotto dal Gruppo di Studio per la grande obesità, su una coorte di 4761 grandi obesi inclusi dal 1975, ha fornito dati molto interessanti e finora non disponibili: il rischio di mortalità nel grande obeso, in analisi multivariata (Tabella III), è maggiore negli uomini, e aumenta con l'età; l'incremento del BMI determina un rischio progressivamente crescente da 40 a 49.9, ma oltre a 50 aumenta dell'81%; l'epoca di arruolamento determina una riduzione progressiva del rischio, che si dimezza tra i soggetti reclutati negli anni 1975-1988 e quelli inclusi nello studio dopo 1994. Quest'ultimo dato può legarsi sia all'impatto della diffusione della chirurgia bariatrica che al miglioramento globale dell'efficacia delle cure<sup>(30)</sup>.

Variabile		Cox regression model	
		HR	95% CI
<b>Età<sub>1</sub></b>		1.96 <sub>3</sub>	1.82-2.12 <sub>3</sub>
<b>Sesso</b>	Donne	1	— <sub>2</sub>
	Uomini	2.63	2.16-3.21
<b>BMI</b>	40.0-42.4	1	— <sub>2</sub>
	42.4-44.9	1.12	0.85-1.49
	45.0-49.9	1.35	1.03-1.75
	≥ 50	2.44	1.91-3.13
<b>Arruolamento</b>	1975-1988	1	— <sub>2</sub>
	1989-1991	0.94	0.75-1.18
	1992-1993	0.67	0.51-0.88
	≥ 1994	0.49	0.35-0.66

<sup>1</sup> Per classi di 5 anni

<sup>2</sup> Categoria di riferimento

<sup>3</sup> Poisson regression model

Tabella III. Rischio di mortalità in una coorte italiana di grandi obesi. Analisi multivariata<sup>(30)</sup>.

## COMPOSIZIONE CORPOREA

Un recente studio in 1862 soggetti con elevata obesità ( $\text{BMI} \geq 35 \text{ kg/m}^2$ )<sup>(1)</sup> ha dimostrato che la relazione tra BMI e percentuale di tessuto adiposo è lineare negli uomini ma curvilinea nelle donne; in queste ultime, la % di grasso è del 10% superiore a quella degli uomini per BMI di 20 e di 40; tra questi due estremi aumenta sino al 13% per BMI di 30; per BMI > 40 la differenza tende progressivamente a diminuire, diventando del 5% a BMI 55. Gli Autori forniscono due equazioni per il calcolo della percentuale di grasso secondo sesso nell'obeso, ed evidenziano che la valutazione del rischio cardio-vascolare dovrebbe essere basata sul BMI corretto per sesso.

## ALTERAZIONI DELLA REGOLAZIONE DELL'OSSIDAZIONE LIPIDICA

La tradizionale equazione del bilancio energetico, che descrive l'incremento di peso come un'imbalance relativa a un eccesso di energia, deve essere sostituita da una serie di equazioni di bilancio dei macronutrienti: le calorie infatti non sono uguali nei loro effetti metabolici, l'interconversione tra i quattro macronutrienti (glicidi, proteine, lipidi, alcool) è praticamente negligibile e una gerarchia ossidativa opera in proporzione inversa ai depositi disponibili di ogni singolo macronutriente. Mentre in presenza di aumenti di intakes di proteine, glicidi e alcool, la relativa ossidazione di aminoacidi, glucosio e alcool aumenta in modo diretto, essendo sotto stretto controllo autoregolatorio a *feedback*, non vi è al contrario virtualmente alcun *feedback* tra l'introduzione e l'ossidazione di lipidi. Quest'ultima è sostanzialmente una funzione del *gap* tra la spesa energetica totale e la quantità di glicidi, proteine e alcool introdotti<sup>(33)</sup>. Inoltre, in risposta a un bilancio positivo dei macronutrienti, gli *intakes* di glicidi e proteine del giorno successivo vengono spontaneamente ridotti, mentre ciò non avviene per i lipidi<sup>(36)</sup>.

Studi sugli indiani Pima, popolazione a elevata prevalenza di obesità genetica<sup>(46)</sup> e su soggetti caucasici con predisposizione all'obesità (Quebec Family Study condotto su 300 individui di 75 famiglie<sup>(3)</sup>, e lo studio di Toubro e coll su 71 soggetti di 32 famiglie<sup>(42)</sup>), hanno evidenziato che negli obesi il quoziente respiratorio (RQ) è più elevato che nei soggetti normali, e che la familiarità spiega il 28%<sup>(46)</sup>, 20%<sup>(3)</sup> e 32%<sup>(42)</sup> della variabilità interindividuale. Com'è noto, il quoziente respiratorio (rapporto tra  $\text{O}_2$  consumato e  $\text{CO}_2$  prodotta) è specifico per ogni macronutriente (0.7 per i lipidi; 0.8 per le proteine; 1.0 per i glicidi), e un suo valore elevato è significativo per un'ossidazione preferenziale dei glicidi e ridotta dei lipidi. È stato evidenziato che l'RQ è un

tratto ereditario, legato al gene  $\alpha_2$  e al gene  $\beta$  della Na,K-ATPasi<sup>(11)</sup>, e ciò è ulteriormente confermato dallo studio di Guesbeck<sup>(19)</sup>, in cui è stato rilevato che sia l'RQ ( $0.90 \pm 0.02$  vs  $0.83 \pm 0.03$ ) che la percentuale di energia derivante dai lipidi durante esercizio submassimale ( $29.7 \pm 4.8\%$  vs  $53.2 \pm 9.7\%$ ) sono significativamente minori nei soggetti dimagriti dopo by-pass gastrico rispetto ai normali.

In soggetti con grande obesità è stata dimostrata l'esistenza, sia a livello plasmatico che muscolare, di un'alterazione dell'ossidazione lipidica: studi condotti con traccianti ( $^{13}\text{C}$  palmitato e  $^{14}\text{C}$  acetato) su soggetti grandi obesi (BMI  $40.8 \pm 5 \text{ kg/m}^2$ ) – vs normopesi – hanno evidenziato una significativa riduzione dell'ossidazione degli acidi grassi liberi sia a riposo ( $41.5\%$  vs  $66.6\%$ ) che durante esercizio ( $56.3\%$  vs  $86.3\%$ ); tale alterazione è correlata al BMI ( $r = -0.455$ ) e permane inalterata anche dopo dimagrimento  $> 45 \text{ kg}$  ( $39.9\%$  e  $57.3\%$  nelle due condizioni precedenti)<sup>(41)</sup>. L'alterazione è ancora più evidente a livello del muscolo scheletrico, dove è stata dimostrata una riduzione sia dei livelli di palmitato in biopsie muscolari<sup>(22)</sup>, che dell'ossidazione del palmitato e della palmitoil-carnitina *in vitro*<sup>(25)</sup>; esiste inoltre una relazione inversa tra BMI e livello intracellulare della carnitina-palmitoiltransferasi 1 (CTP1), enzima che regola il trasporto degli acidi grassi a catena lunga attraverso la membrana mitocondriale<sup>(25)</sup>. Il contenuto di trigliceridi intramiocellulare, correlato positivamente con la resistenza insulinica, è più elevato del normale nei soggetti obesi<sup>(17)</sup>; è interessante notare che, dopo dimagrimento, la quantità di trigliceridi muscolari si riduce e la sensibilità all'insulina si normalizza<sup>(18)</sup>, ma permane la riduzione dell'ossidazione lipidica a livello muscolare e dell'espressione dei geni che codificano per i sistemi enzimatici-chiave dell'ossidazione lipidica sia mitocondriale (CTP1 e ACOX1) che perossisomale (PPAR $\alpha$ )<sup>(13)</sup>.

Va comunque rilevato che in alcuni studi, condotti su medi obesi, è stato rilevato che l'ossidazione lipidica era comparabile<sup>(40,44)</sup>, o addirittura più elevata, che nei soggetti normali<sup>(21,24)</sup>; può essere ipotizzato che tali discrepanze siano attribuibili alla diversa genetica dei soggetti con lieve e severa obesità.

Nei soggetti grandi obesi sono inoltre state rilevate alterazioni genetiche delle perilipine, proteine fosforilate contenute negli adipociti, localizzate sulla superficie delle gocce lipidiche, che hanno ruolo chiave nella regolazione dell'accumulo lipidico intra-adipocitario. Le perilipine regolano la lipolisi

---

CTP1: carnitina-palmitoiltransferasi 1.

ACOX1: acyl-coenzima A ossidasi 1.

PPAR $\alpha$ : peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ .



basale, processo centrale nel mantenere normale il bilancio e l'utilizzazione energetica. Recenti evidenze suggeriscono che polimorfismi del gene delle perilipine possano predire la vulnerabilità all'obesità: gli omozigoti per il gene PLIN 11482 hanno maggiore risposta di insulino-resistenza correlata con la dieta<sup>(9)</sup>, maggiore resistenza a diete fortemente ipocaloriche e maggiore peso corporeo e BMI di altri oggetti con differenti polimorfismi delle perilipine<sup>(10)</sup>. Differenti livelli di BMI, percentuali di grasso corporeo e di circonferenza addominale sono inoltre stati osservati in soggetti con differenti polimorfismi di singoli nucleotidi delle perilipine<sup>(34)</sup>.

### **ALTERAZIONI DEL SISTEMA REGOLATORE DELLA FAME E SAZIETÀ**

I sistemi coinvolti nel controllo dell'assunzione del cibo sono molteplici, complessi e integrati tra di loro e con il sistema di regolazione metabolica: ad esso partecipano neurotrasmettitori periferici e centrali che regolano l'assunzione di cibo e il dispendio energetico (ad azione permissiva:  $\alpha$ -adrenergici, galanina, acido  $\gamma$ -aminobutirrico GABA; ad azione inibente:  $\beta$ -adrenergici, dopamina, serotonina), neuropeptidi ipotalamici (neuropeptide Y NPY, Agouti-related protein AgRP, peptide YY PYY,  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone  $\alpha$ -MSH, cocaine amphetamine-regulated transcript CART), effettori centrali (corticotropin-releasing hormone CRH, thyroid-releasing hormone TSH, urocortine, oressine A e B) e segnali periferici (leptina, insulina, acidi grassi liberi FFA, colecitochinina CKK, grelina, TNF- $\alpha$ , IL-6, adiponectina, resistina, ormoni tiroidei, angiotensinogeno). Va oltre l'obiettivo di questa relazione un'esposizione dettagliata: ci limiteremo a considerare alcuni dati riguardanti il pathway leptina-melanocortina e sue connessioni con la genetica dell'obesità severa.

La scoperta della leptina nel 1994, ormone secreto dagli adipociti, fornì la prima evidenza diretta di un sistema ormonale regolatore del peso corporeo: si dimostrò che una mutazione del gene *ob*, determinando una completa assenza della leptina, determinava la grave obesità caratteristica del topo *ob/ob*<sup>(45)</sup>; successivamente fu descritta anche nell'uomo l'esistenza di casi di carenza congenita di leptina associata a iperfagia e grave obesità<sup>(31)</sup>. Il fenotipo umano di obesità da carenza congenita di leptina è molto simile a quello del topo *ob/ob*, anche se nell'uomo non sono state rilevate, come nel topo, alterazioni della spesa energetica<sup>(14)</sup>. Se nel topo è bene dimostrato un *feedback* negativo tra livelli di leptina ed entità della massa adiposa, nell'uomo, pur essendo presente uno stretto parallelismo tra livelli di leptina e massa adiposa<sup>(8)</sup>, né

elevati livelli di leptina né la sua somministrazione esogena<sup>(20)</sup> inducono perdita di peso, suggerendo quindi la presenza di resistenza alla sua azione. Le azioni della leptina non si limitano alla regolazione dell'appetito e della spesa energetica, ma si estendono anche al metabolismo glucosio-insulina, alla lipolisi, alla risposta immunologica, all'ematopoiesi e all'angiogenesi, alle funzioni riproduttive. L'azione è mediata da almeno sei recettori, di cui l'isoforma Ob-Rb, espressa nell'ipotalamo, media l'effetto anoressante. Lo studio GOOS (Genetic of Obesity Study), recentemente svolto su 300 individui di una coorte di 2100 individui con obesità severa a inizio precoce (all'età di < 10 anni), ha individuato in otto di essi (3%) una mutazione del recettore della leptina<sup>(16)</sup>; i fenotipi della deficienza del recettore della leptina sono meno gravi di quelli della deficienza di leptina, e ciò suggerisce che nell'uomo il recettore della leptina può non essere l'unico sistema che media le funzioni neuro-endocrine dell'ormone. Gran parte dell'effetto della leptina sul controllo dell'introduzione di cibo è mediato dal sistema ipotalamico della melanocortina; nel nucleo arcuato essa agisce direttamente su due distinte classi di neuroni: una classe co-esprime i peptidi anoressanti pro-opiomelanocortina (POMC) e cocaina-amphetamine related transcript (CART), mentre l'altra classe co-esprime i peptidi oressanti NPY e agouti-related protein AgRP. L'azione delle melanocortine è mediata dalla famiglia di recettori MCRs: i MC3 e MC4 svolgono ruolo centrale nel controllo del peso corporeo. La carenza omozigote di POMC determina grave obesità e finora è stata descritta in 6 individui<sup>(15,26,27)</sup>; nell'uomo inoltre è stato evidenziato che soggetti con mutazione eterozigote del POMC-null hanno livelli di peso corporeo ai limiti della normalità o sono sovrappeso<sup>(15,27)</sup>. I ratti eterozigoti per POMC-null, tenuti a dieta iperlipidica, sviluppano incremento di massa adiposa superiore a quella degli stessi tenuti a dieta ipolipidica<sup>(5)</sup>: l'osservazione che l'incompleta alterazione genetica determini differenti fenotipi di obesità in relazione al tipo di dieta si accorda con l'ipotesi che il cromosoma 2, che contiene il gene POMC, sia un *locus* di suscettibilità dell'obesità umana<sup>(7)</sup>.

## DISPERSIONE DI CALORE

La dispersione di calore avviene prevalentemente nel tessuto adiposo bruno, presente anche nell'uomo, per azione della proteina disaccoppiante UCP-1; essa disaccoppia la fosforilazione ossidativa, dissipando il gradiente protonico generato dalla ossidazione del NADH nella catena respiratoria in seguito alla  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi. L'mRNA dell'UCP-1 è stato rilevato nel tessuto adiposo viscerale addominale di pazienti magri e obesi;

negli ultimi la sua quantità era significativamente ridotta. Dopo dimagrimento, il livello di UCP-1 mRNA rimaneva significativamente minore nei soggetti precedentemente obesi, suggerendo quindi che anche questo sistema sia coinvolto nella patogenesi dell'obesità. Questo assunto è avvalorato da alcuni studi: il Quebec Family Study ha rilevato che polimorfismi (A-G) dell'UCP1 si associavano ad aumento della massa adiposa<sup>(32)</sup>, mentre negli indiani PIMA è stato evidenziato che polimorfismi di altre proteine della famiglia disaccoppiante (UCP2 e UCP3) erano correlate al BMI<sup>(43)</sup>. Infine studi su gravi obesi in Francia hanno riportato addizionali effetti sull'incremento di peso dell'allele G di una variante dell'UCP1 e della mutazione Trp64Arg del gene  $\beta$ 3-AR<sup>(6)</sup>.

### **PROPENSIONE ALL'ATTIVITÀ FISICA**

Un interessante recente studio ha elegantemente dimostrato in volontari non solo che il tempo dedicato all'attività fisica è significativamente maggiore nei soggetti magri rispetto agli obesi, ma che tale differenza persiste inalterata dopo dimagrimento nei soggetti obesi e dopo incremento ponderale nei soggetti precedentemente magri<sup>(28)</sup>.

### **RISULTATI TERAPEUTICI**

La terapia della grande obesità è attualmente basata prevalentemente sulla chirurgia bariatrica, essendo i risultati degli interventi di tipo “conservativo” – dieta, attività fisica e terapia comportamentale – attualmente assolutamente insoddisfacenti. I recenti risultati dallo studio Swedish Obesity Study SOS<sup>(35)</sup> hanno evidenziato in una coorte di 2000 obesi con BMI iniziale  $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup> che la variazione di peso a 15 anni, nei soggetti non trattati con terapia chirurgica, è praticamente nulla, mentre riduzioni ponderali variabili ma consistenti persistono nei soggetti sottoposti a varie tipologie di chirurgia bariatrica.

### **CONCLUSIONI**

La prevalenza dell'obesità severa sta aumentando in modo progressivo nei paesi ad elevata disponibilità di alimenti, e ciò pone pressanti problemi di prevenzione, in ordine alla dimostrata maggiore morbilità e mortalità di questi soggetti. I dati attualmente disponibili indirizzano a considerare l'obesità una patologia ad eziologia poligenica, sulla quale l'ambiente ha indubbe azioni facilitanti. Alterazioni in molti degli ambiti coinvolti nei processi

di regolazione della massa adiposa sono state rilevate nei soggetti obesi, e persistono dopo dimagrimento. Escludendo i rari soggetti a componente monogenica dell'obesità, un grande sforzo di tipo preventivo dovrebbe essere svolto per la precoce diagnosi della predisposizione alla grave obesità, e a precoci tentativi di contenere il loro peso corporeo perlomeno in termini di moderata obesità.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Adams T.D., Health E.M., LaMonte M.J., Gress R.E., Pendleton R., Strong M., Smith C., Hunt C.: *The relationship between body mass index and per cent body fat in the severely obese*. Diabetes, Obesity and Metabolism 9, 498-505, 2007.
2. Andreyeva T., Sturm R., Ringel J.S.: *Moderate and severe obesity have large differences in health care costs*. Obes. Res. 12, 1936-1943, 2004.
3. Bouchard C., Dériaz L., Pérusse A., Tremblay A.: *Genetic of energy expenditure in humans*. In: *The Genetic of Obesity*. 135-145. CRC Press, Boca Raton, Florida 1994.
4. Calle E.E., Thun M.J., Petrelli J.M., Rodriguez C., Health C.V. jr.: *Body-mass index and mortality in a prospective cohort of USA adult*. New Engl. J. Med. 341, 1097-1105, 1999.
5. Challis B.G., Coll A.P., Yeo G., Pinnock B., Dickson L., Thresher R.R., Dixon J., Zahn D., Rochfor J.J., Whiter A., Oliver R.L., Millington G., Aparicio A., Colledge W.H., Russ A.P., Carlton M.B., O'Rahilly: *Mice lacking pro-opiomelanocortin are sensitive to high-fat feeding but respond normally to the acute anorectic effects of peptide YY*. Proc. Natl. Acad. Sci. UA 101, 4695-4700, 2004.
6. Clement K., Ruitz J., Casard-Doulcier A.M.: *Additive effects of polymorphism in the uncoupling protein gene and the beta-3 adrenergic receptor gene on weight gain in morbid obesity*. Int. J. Obesity 20, 1062-1066, 1996.
7. Comuzzie A.G., Hixon J.E., Almasy L., Mitchell B.D., Mahaney M.C., Dyer T.D., Stern M.P., NacCluer J.W., Blangero J.: *A major quantitative trait locus determining serum leptin levels and fat mass is located on human chromosome 2*. Nat. Genet. 15, 273-276, 1997.
8. Considine R.V., Sinha M.K., Heiman M.L., Kriauciunas A., Stephens T.W., Nyce M.R., Ohannesian J.P., Marco C.C., McKee L.J., Bauer T.L., Caro J.F.: *Serum immunoreactive-leptin concentration in normal-weight and obese humans*. N. Engl. J. Med. 334, 292-295, 1996.

9. Corella D., Qi L., Hyong Tai E., Deurenberg-Yap N., Eng Tan C., Kaai Chew, Ordovas J.M.: *Perilipin gene variation determines higher susceptibility to insulin resistance in asian women when consuming a high-saturated fat, low-carbohydrate diet.* Diabetes Care 29, 1313-1319, 2006.
10. Corella D., Qi L., Orli J.V., Godoy D., Portolés O., Coltell O., Greenberg A., Ordovas L.M.: *Obese subjects carrying the 11482G>A polymorphism at the perilipin locus are resistant to weight loss after dietary energy restriction.* J. Clin. Endocrinol. Metab. 90, 5121-5126, 2005.
11. Dériaz O., Dionne F., Pérusse L., Tremblay A., Vohol M.C., Cote G., Bouchard C.: *DNA variation in the genes of the Na,K-adenosine triphosphatase and its relation with resting metabolic rate, respiratory quotient, and body fat.* J. Clin. Invest. 93, 838-843, 1994.
12. Engeland A., Borge T., Selmer R.M., Tverdal A.: *Height and body mass index in relation to total mortality.* Epidemiology 14, 293-299, 2003.
13. Fabris R., Mingrone G., Milan G., Manco M., Granzotto M., Dalla Pozza A., Carda A., Erra R., Greco A.V., Federspil G., Vettor R.: *Further lowering of muscle lipid oxidative capacity in obese subjects after biliopancreatic diversion.* J. Clin. Endocrin. Metab. 89, 1753-1759, 2004.
14. Farooqi I.S., O'Rahilly S.: *Genetic of obesity in humans.* Endocr. Rev. 27: 710-718, 2006.
15. Farooqi I.S., Drop S., Clement A., Keogh J.M., Biernacka J., Lowenbein, Challis B.G., O'Rahilly: *Heterozygosity for a POMC-null mutation and increased obesity risk in human.* Diabete 55, 2549-2553, 2006.
16. Farooqi I.S., Wangenstein T., Collins, Kinber W., Mataree G., Keogh J.M., Lank E., Bottomley B., Lopez-Fernandez J., Ferraz-Amaro I., Dattani M.T., Ercan O., Myhre A.G., Rettetol L., Stanhope R., Edge J.A., McKenzie S., Lessan N., Ghodsi M., De Roa V., Perna F., Fontana, Barroo I., Undlien D.E., O'Rahilly S.: *Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor.* N. Engl. J. Med. 356, 237-247, 2007.
17. Goodpaster B.H., Theriault R., Watkin C., Kelley D.E.: *Intramuscular lipid content is increased in obesity and decreased by weight loss.* Metabolism 49, 467-472, 2000.
18. Greco A.V., Mingrone G., Giancaterini A., Manco M., Morroni M., Cinti Granzotto M., Vettor R., Camastra S., Ferrannini E.: *Insulin resistance in morbid obesity.* Diabetes 51, 144-151, 2002.
19. Guesbeck N.R., Hickey M.S., MacDonald K.G., Porie W.J., Harper I., Ravussin E., Dohm G.L., Houmard J.A.: *Substrate utilization during exercise in formerly morbidly obese women.* J. Appl. Physiol. 90, 1007-1012, 2001.
20. Heymsfield S.B., Greenberg A.S., Fujiota F., Dixon R.M., Kuhner R., Hunt T., Lubina J.A., Patane J., Elf B., Hunt P., McCamih M.: *Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomised, controlled, dose-escalation trial.* JAMA 282, 1568-1575, 1999.
21. Horowitz J.F., Klein S.: *Oxidation of nonplasma fatty acids during exercise is increased in women with abdominal obesity.* J. Appl. Physiol. 90, 1007-1012, 2000.
22. Hulver M.W., Berggern J.R., Cortright R.N., Dudek R.W., Thompon R.P., Porie W.J., MacDonald K.G., Cline G.W., Hulman G.I., Dohm G.L., Houmard J.A.: *Skeletal muscle lipid metabolism in obesity.* Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab 284, E741-E747, 2003.
23. Istituto Italiano di Statistica: [www.istat.it/salastampa/comunicati/non\\_calendario/20010313\\_00](http://www.istat.it/salastampa/comunicati/non_calendario/20010313_00).

24. Kanaley J.A., Weatherup-Dentes M.M., Alvarado C.R., Whitehead G.: *Substrate oxidation during acute exercise and with exercise training in lean and obese women.* Eur. J. Appl. Physiol. 85, 68-73, 2001.
25. Kim J.Y., Hickner R.C., Cortright R.L., Dohm G.L., Houmard J.A.: *Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle.* Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 279, E1039-E1044, 2000.
26. Krude H., Biebermann H., Luck W., Horn R., Brabant G., Gruters A.: *Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutation in humans.* Nat. Gen. 19, 155-157, 1998.
27. Krude H.: Biebermann H., Schnabel D., Tansek M.Z., Theunissen P., Mullis P.E., Gruters A.: *Obesity due to proopiomelanocortin deficiency: three new cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH4-10.* J. Clin. Endocrinol. Metab. 88, 4633-4640, 2003.
28. Levine J.A., Lanningham-Foster L.M., McCrady K., Krizan A.C., Olson L.R., Kane P.H., Jenen M.D., Clark M.M.: *Interindividual variation in posture allocation: possible role in human obesity.* Science 307, 584-86, 2005.
29. Maes H.H., Neale M.C., Eave L.J.: *Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity.* Behav. Genet. 27, 325-351, 1997.
30. Mirabelli D., Chiusolo M., Ferrante D., Balzola F., Merletti F., Petroni M.L.: *Long-term Mortality in a Cohort of Severely Obese Persons in Italy.* Obesity 16 (8): 1920-1925, 2008.
31. Montague C.T., Farooqi I.S., Whitehead J.P., Soos M.A., Rau H., Wareham N.J., Sewter C.P., Digby J.E., Mohammed N., Hurst J.A., Cheetham C.H., Earley A.R., Barnett A.H., Prin J.B., O'Railly S.: *Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans.* Nature 387, 903-908, 1997.
32. Oopert J.M., Vohl M.C., Chagong M.: *DNA polymorphism in the uncoupling protein (UCP) gene and human body fat.* Int. J. Obesity 18, 526-531, 1994.
33. Prentice A.M.: *Alcohol and obesity.* Int. J. Obes. 19 (Suppl. 5), S44-S50, 1995.
34. Qi L., Shen H., Larson I., Barnard J.R., Schaefer E.J., Ordovas J.M.: *Gender-specific association of a perilipin gene haplotype with obesity risk in a white population.* Obes. Res. 12, 1758-1765, 2004.
35. Sjoström L., Narbro K., Sjoström C.D., Karason K. et al.: *Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects.* N. Eng. J. Med. 357, 8-15, 2007.
36. Stubbs R.J., Habron C.G., Murgatroyd P.R., Prentice A.M.: *Covert manipulation of dietary fat and energy density: effect on substrate flux and food intake in men eating ad libitum.* Am. J. Clin. Nutr. 62, 316-329, 1995.
37. Stunkard A.J., Foch T.T., Hrubec Z.: *A twin study on human obesity.* JAMA 256, 51-54, 1986.
38. Stunkard A.J., Harris J.R., Pederens N.L., McClearn G.E.: *The body-mass index of twins who have been reared apart.* N. Engl. J. Med. 322, 1483,1487, 1990.
39. Sturm R.: *Increases in morbid obesity in the USA: 2000-2005.* Public Health 121, 492-496, 2007.
40. Tataranni P.A., Larson D.E., Ravussin E.: *Body fat distribution and energy metabolism in obese men and women.* J. Am. Coll. Nutr. 13, 569-574, 1994.

41. Thyfault J.P., Kraus R.M., Hickner R.C., Howell A.W., Wolfe R.R., Dohm G.L.: *Impaired plasma fatty acid oxidation in extremely obese women*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 287, E1076-E1081, 2004.
42. Toubro N., Christensen N.J., Astrup A.: *Reproducibility of 24-h energy expenditure, substrate utilization, and spontaneous physical activity in obesity measured in a respiration chamber*. Int. J. Obesity 19, 544-549, 1995.
43. Walder K., Norman R., Hanson R.L.: *Association between uncoupling protein polymorphism (UCP2-UCP-3) and energy metabolism obesity in Pima Indians*. Hum. Mol. Genetics 7, 1431-1435, 1998.
44. Weyer C., Snitker S., Rising R., Bogardus C., Ravussin E.: *Determinants of energy expenditure and fuel utilization in man: effects of body composition, age, sex, ethnicity and glucose tolerance in 916 subjects*. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 23, 715-722, 1999.
45. Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold F., Friedman J.M.: *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature 372, 425-432, 1994.
46. Zurlo F., Lillioja, Epoito-Del Puente A., Nyomba B.L., Raz I., Saad F., Winburb B., Knowler W.C., Bogardus C., Ravussin E.: *Low ratio of fat to carbohydrate oxidation as predictor of weight gain: study of 24-h RQ*. Am. J. Physiol. 259, E650-657, 1990.

**PRESENTAZIONE DEL LIBRO**  
**“ALESSANDRO RIBERI**  
**Un mito della medicina torinese dell’800”**

*A. Angeli*

Clinica Medica Generale - Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche  
Università degli Studi di Torino

Illustri Soci dell’Accademia, cari colleghi e amici, signore e signori, sono molto onorato dell’invito del nostro Presidente a prendere per primo la parola in quest’evento, dedicato alla più recente opera del prof. Dianzani, straordinario e infaticabile cultore della storia medica torinese. Sono stato dapprima incuriosito, poi interessato e infine appassionato da questo libro, che è riduttivo definire una biografia. Sin dal primo approccio, si rimane ammirati dall’analitica, direi puntigliosa documentazione allegata, che testimonia con tutta evidenza l’impegno certosino e il difficile lavoro di recupero archivistico dell’autore. Ma anche la sua passione civile nel far rivivere un’epoca e una società ricche di fermenti culturali e di protagonisti spesso misconosciuti.

In quest’occasione verranno focalizzati dagli altri relatori gli aspetti innovativi dell’opera di Alessandro Riberi, chirurgo clinico all’avanguardia dei tempi, fondatore della nostra Accademia, pioniere indiscusso della Sanità Militare, medico a tutto campo capace di intuire in tempi difficili la complementarietà fra chirurgia e medicina. Verranno focalizzati anche i rapporti di Riberi con la dinastia sabauda e con personaggi di spicco nella Torino risorgimentale. Per quanto mi riguarda, vorrei ritagliarmi un piccolo spazio più “leggero”, che mi auguro serva di introduzione anche al Riberi privato, al suo carattere. Uno spazio nel quale non mancano ricordi personali. Riguardano, questi ricordi, gli anni ormai lontani della giovinezza. Ero un liceale saluzzese, immaturo ma pieno di speranze e ideali, che risaliva volentieri l’alta Val Maira e si appassionava a quei panorami, alle montagne, a quei borghi poveri di risorse ma così ricchi di storia e arte.

Stropo, il paese natale di Riberi, che ospita oggi il suo monumento più significativo (così bene descritto nel libro) era un luogo emblematico. Arroccato sul pendio tra faggi, larici, prati e pascoli, sorvegliato dall’alto dalla piccola chiesa di San Pietro, familiarmente chiamata San Peyre, rappresentava



quasi un mondo in disparte, fuori dalle “comodità” della pianura, ignaro del progresso mediatico che iniziava negli anni '50 con le prime trasmissioni televisive. E proprio la chiesa di San Peyre sembrava raccontare la Valle Maira più segreta, impregnata della tradizione occitana, ricca di tesori nascosti: si guardava giù dallo sperone roccioso a strapiombo sulla valle e si entrava in uno scrigno tappezzato di affreschi tardo-gotici di straordinario fascino, con i Re Magi storditi giovanotti e una Natività ingenua dove la Madonna emergeva dalle coperte e lenzuola ben tese del letto di una locanda. Poco oltre Stroppio, la parrocchiale di Elva, integrata perfettamente nel grandioso panorama, lasciava stupefatti con lo splendore del capolavoro pittorico di un maestro che allora veniva indicato come il Maestro di Elva e che oggi è riconosciuto in Hans Clemer.

Mi piace pensare che la cultura e la tradizione occitane abbiano avuto un ruolo importante nella determinazione di Riberi ad affermarsi, con pieno merito, in una società cittadina così “lontana” dalle sue baite di montagna. La scalata sociale come una scalata di quelle cime ieratiche e solenni che nella sua infanzia vedeva chiudere l’orizzonte a occidente. Rigore morale, vita quasi ascetica, razionalità di intelletto, lavoro duro quotidiano: sono scelte che hanno consentito a una piccola comunità isolata di mantenere nei secoli una cultura e una lingua, quelle occitane, non a caso definite un esempio di integrazione europea. E nel recente fervore di recupero della sua storia e delle sue tradizioni, la cultura occitana non si è dimenticata di Riberi. Una sua commemorazione, ancorché breve, è stata pubblicata nel 2005, e molto opportunamente menzionata da Dianzani. Va anche sottolineato come l’autore sia Mariano Allocco, già Presidente della Comunità montana Valle Maira e principale ideatore e animatore di “Espaci Occitani”, progetto istituzionale con sede a Dronero, che ha come obiettivo la promozione culturale e linguistica delle valli occitane.

Vorrei adesso dire del secondo motivo personale, che ha accentuato l’interesse per questo libro, man mano che procedevo con la lettura. Poco tempo fa, ho recensito la biografia, appena pubblicata negli Stati Uniti, di un altro grande chirurgo, assai più famoso nel mondo di Riberi, e anche assai più vicino ai nostri giorni, Harvey Cushing. Così come Riberi è stato definito da Dianzani un mito della medicina torinese dell’800, Cushing potrebbe essere definito un mito della medicina americana del primo ‘900. Dell’era del jazz, a ben vedere, degli anni ruggenti oggetto di tanta letteratura: una stagione di grande pulsione dinamica, per gli ambienti scientifici e intellettuali d’oltre Oceano.

Cosa può accomunare Riberi e Cushing, due personalità apparentemente così diverse e lontane, inserite in momenti storici e socio-culturali per molti aspetti divergenti, la Torino sabauda e la Baltimora rampante? Stranamente e curiosamente, non pochi aspetti della loro vita. Innanzitutto, l'origine e la prima educazione, in famiglie modeste e "puritane", che dovevano affrontare rilevanti problemi economici per dare istruzione ai figli più dotati. E poi le qualità che permisero di emergere come chirurghi al vertice dei rispettivi ambienti universitari: capacità lavorativa, sapiente verifica di ogni conoscenza disponibile, applicazione coraggiosa di nuove tecniche, rapidità decisionale, dialettica vincente, ambizione di successo. Per entrambi, l'intuizione lungimirante dell'inscindibile binomio progresso chirurgico-progresso medico-scientifico. Per entrambi, una scalata professionale e sociale sino alla fama, all'ammirazione dei contemporanei, agli articoli quasi agiografici della stampa. Cushing è stato paragonato al *great Gatsby*, il personaggio letterario di Francis Scott Fitzgerald, per l'accumulo di ricchezze e per il successo non disgiunto da spregiudicati e altezzosi comportamenti. Anche Riberi divenne molto ricco, e la sua indisponibilità ad accorrere al capezzale di Cavour morente può ritenersi altezzosa, se si dà credito alle cronache dei tempi che ci riferisce Dianzani. E infine i mesi estremi della vita, trascorsi per entrambi tristemente, in sostanziale solitudine, con frequenti fasi di depressione e di distacco orgoglioso dall'Università, dai colleghi e dagli allievi, quasi presaghi di onoranze funebri caratterizzate da solennità e partecipazione troppo appariscenti per non sembrare forzate, e magari solo esteriori.

Mi ritrovo a pensare che Riberi, in quei giorni finali di dolore, consapevole della morte imminente, riandasse con la mente e il cuore colmi di nostalgia ai luoghi della sua infanzia, alle piccole chiese e ai piccoli cimiteri di montagna della sua Val Maira, e ai funerali di lassù, così diversi da quelli che l'avrebbero onorato a Torino. Rivivo l'emozione suscitata da un quadro, guarda caso di un altro grande occitano, nativo di Acceglio, il paese dopo Stroppo in cima alla Val Maira. È un quadro di Matteo Olivero, che qualche anno or sono il Comune di Cuneo ripropose come capolavoro emblematico con la bella iniziativa "Viaggio intorno all'opera". Matteo Olivero, amico di Pellizza da Volpedo, suicida nel 1932, fu a lungo a Parigi ammirato dalla critica e dal pubblico per le tele su paesaggi e gente delle sue montagne ("il pittore della neve"). L'opera in questione è "Funerali a Casteldelfino", ed è indimenticabile per il messaggio di dignità austera, inviatoci con le nere sagome, piccole e curve, di uomini "nati al sacrificio" in un paesaggio che sa coniugare struggente dolcezza e opprimente ostilità.

**BREVI CONSIDERAZIONI  
SUL TEN. GEN. (ME) ALESSANDRO RIBERI**

*Brig. Gen. A. Vecchione*

Direttore Centro Studi e Ricerche di Sanità e Veterinaria - Roma

Key words: *Alessandro Riberi*  
*Sanità Militare*

**Abstract:**

This brief paper aims to commemorate the eminent personality of Alessandro Riberi, who signed incise the passage to a coherent and integrated organization of the School of Medicine and Surgery and the Army Sanitary.

It is of common knowledge that the military army constituted the core element of a nation force in up until the XIX century; that is why the strength, the physique and the wellness of soldiers was so crucial. Though, the organization of the military force in Italy did not include doctors as a specialized corps and their services were irregularly assigned to the army according to the contingent needs of the nation. With the mutations of war engagement of the XIX century, military sanitarian problematics included also those relatives to hygiene similar to the ones of public medicine; this has made necessary the institution of new dedicated sanitarian apparatus.

In the Regno di Sardegna, this phase has been initiated with the Restoration and the rise of Vittorio Emaunuele and, successively, Carlo Alberto. In this period the renewing work of Alessadro Riberi taked place, giving him the right to be considered as the father of Military health board. This paper wants to stress the undertook actions and evidence the ideals that has been the base of them.

**Riassunto:**

Questo breve articolo vuole commemorare l'eminente personalità di Alessandro Riberi il quale ha segnato il passaggio verso una coerente integrazione della Sanità Militare nel periodo di riunificazione delle facoltà di chirurgia e medicina. È conoscenza comune che antecedentemente al XIX secolo l'esercito rappresentava un elemento significativo per il prestigio e l'economia di una nazione; da questo assunto ne derivava l'importanza della selezione e dell'integrità della salute dei militari. Nonostante questo l'organizzazione militare italiana non includeva medici organicamente inseriti

in un Corpo autonomo, bensì i loro servizi erano offerti in modo discontinuo al bisogno. Con il cambiamento delle regole di guerra avvenuto nel XIX secolo si inseriscono nelle problematiche sanitarie militari anche quelle relative all'igiene che presentavano analogie con la medicina pubblica; ciò rendeva necessario la costituzioni di apparati sanitari dedicati. Nel Regno di Sardegna questa fase viene intrapresa al momento della Restaurazione con l'avvento di Vittorio Emanuele I e successivamente con Carlo Alberto. In questo periodo si inserisce l'opera rinnovatrice di Riberi che a buon titolo può fregiarsi di padre fondatore della Sanità Militare. Vengono pertanto tracciate le azioni intraprese e evidenziate gli ideali che sono state alla loro base.

## INTRODUZIONE

Alessandro Riberi, pur rappresentando per la Sanità Militare un'icona di assoluto riferimento, non ha dato luogo a approfondite ricerche storiografiche interne che ne analizzino nei dettagli la sua specifica opera in questo campo.

Scarsi sono i documenti reperibili sulla sua figura militare, che possono essere pertanto limitati all'opera del Marchiandi<sup>(6)</sup> e alla celebrazione tenuta dal Menonna<sup>(7)</sup> in occasione del centenario della sua morte.

Non mi risulta tuttavia difficile affermare che con lui la Sanità Militare acquisì nuova e positiva considerazione agli occhi dell'opinione pubblica.

La medicina militare per molti secoli si è limitata alla presenza dei chirurghi inseriti nelle fila degli eserciti ma già nel XVIII secolo era fiorente la letteratura che trattava le malattie castrensi e che ne analizzava con sistematicità e metodo scientifico i problemi posti alla medicina nella pratica militare<sup>(4)</sup>. Le epidemie di tifo castrense e le malattie legate al dilagante fenomeno della prostituzione erano i principali eventi morbosi che colpivano le truppe<sup>(10)</sup>. Al medico militare spettava il difficile compito di conservare la salute dell'Esercito, che all'epoca rappresentava organo vitale di una nazione in quanto fonte di ricchezza di un popolo.

L'architettura attuale del complesso sistema di sanità pubblica deve molto al pensiero di Johann Peter Frank (1745-1821), che gettò le fondamenta e tracciò le linee di crescita delle dottrine di igiene politica.

Nell'Ottocento, in concomitanza con le incipienti e straordinarie trasformazioni scientifiche e sociali, nonostante la medicina non avesse ancora gli strumenti e l'attitudine mentale per dimostrare e comprendere i momenti eziologici delle malattie infettive, l'igiene militare si affermava di pari passo con le incalzanti acquisizioni della polizia medica<sup>(9)</sup>. Con essa si avanzavano ipotesi che avvaloravano dottrine politiche volte alla regolamentazione; queste norme, seppur non del tutto efficaci, costituivano il primo passo alla prevenzione. L'igiene militare può pertanto essere riconosciuta come emanazione della cosiddetta "medicina politica" o della "medicina civile".

Con il secolo XIX inoltre il cambiamento delle regole della guerra aprono nuove prospettive alla branca speciale dell'igiene militare; essa, partendo dai ragionamenti della medicina pubblica, allargava l'orizzonte delle sue applicazioni pratiche verso le speciali necessità della vita dei soldati<sup>(2)</sup>.

In Piemonte già all'epoca della reggenza di Maria Cristina di Savoia nel 1644 era in vigore un rudimentale ordinamento dei servizi sanitari militari che prevedeva l'istituzione di piccole infermerie presidiarie; successivamente

l'interesse era stato focalizzato prevalentemente sull'organizzazione degli ospedali campali in tempo di guerra, periodo in cui i medici e chirurghi venivano ingaggiati con contratti che potevamo definire "a termine" poiché alla fine dell'esigenza venivano licenziati. Durante il tempo di pace, invece, qualora le infermerie presidiarie non fossero in condizione di fornire i servizi richiesti, i militari accedevano agli ospedali civili.

Con l'avvento di Napoleone, insieme alla riorganizzazione del reclutamento delle truppe e dell'esercito si semplificò anche l'attività sanitaria verso i soldati attraverso l'abolizione delle infermerie; i militari, pertanto, afferivano direttamente alle strutture civili ove erano istituiti reparti a loro dedicati.

## **DALLA RESTAURAZIONE ALLE RIFORME DELLA SANITÀ MILITARE**

Nel 1815 Vittorio Emanuele I riacquisì il trono e mise in atto la restaurazione cancellando tutte le disposizioni napoleoniche e reintroducendo le costituzioni sabaude del 1770; da quest'opera tuttavia, seppur in parte, fu escluso il settore militare. Tale scelta fu determinata dalla necessità di liberarsi dalla pressante protezione austriaca. Nell'opera di riorganizzazione dell'Esercito Sabauda vennero istituiti tra l'altro gli ospedali reggimentali; quello di Torino veniva allocato nell'ex convento dei Padri Missionari nella zona d'angolo fra l'attuale piazza Solferino e via Arsenale. Questo intervento organizzativo era tuttavia alquanto lacunoso e privo di regole uniformi, come dimostra il fatto che il personale sanitario non venisse integrato nelle forze armate, né ad esso fosse fornita una specifica uniforme identificativa.

Con l'avvento di Carlo Alberto già il 6 ottobre 1831, a meno di sei mesi dalla sua ascesa al trono vennero emanati il nuovo regolamento per il Corpo di Stato Maggiore, con cui il Re intendeva centralizzare e ridistribuire le competenze, e il riordinamento della fanteria. Il reclutamento delle truppe veniva stabilito che fosse effettuato con un sistema misto che si rifaceva a quello francese, che ricorreva alla coscrizione a sorte ("militari provinciali"), e a quello prussiano, che si alimentava con volontari ("militari d'ordinanza"); la prima modalità avrebbe dato modo di aumentare significativamente il numero delle forze, mentre il secondo avrebbe permesso il miglioramento della qualità dei reparti in armi. L'attività riformatrice del Re ebbe modo di cimentarsi anche nello specifico campo della sanità; con regio viglietto del 24 dicembre 1831 istituì al posto degli Ospedali Reggimentali (di cui tuttavia rimanevano in funzione quelli dei Reali Carabinieri, dei reggimenti di cavalleria e dei reggimenti ubicati in Sardegna) gli Ospedali Divisionali

nelle sedi ove erano ubicati i Comandi di Divisione, che venivano, a seconda della composizione delle loro forze, classificati di prima classe (Torino, Genova, Alessandria) o di seconda classe (Chambery, Nizza, Cuneo, Novara). Questa nuova organizzazione permetteva un migliore controllo e razionalizzazione del servizio e in contempo una certa uniformità di trattamento degli infermi. L'ospedale Divisionale di Torino veniva allocato nel Quartiere San Daniele. Il 22 dicembre 1832, nell'ambito della sua opera riformatrice, Carlo Alberto emanava un nuovo Regio viglietto con cui costituiva il Consiglio Superiore Militare di Sanità con lo scopo di coordinare indirizzare e controllare il servizio sanitario dell'armata; tra i compiti affidati al Consiglio erano evidenziati tra l'altro i principi di economia del bene comune e la necessità di predisporre un progetto di istruzione del personale specie nei confronti del servizio di chirurgo maggiore e in seconda e degli allievi. I membri di tale Consiglio venivano prescelti dopo valutazione del loro valore professionale. Il Consiglio Superiore Militare di Sanità era composto da sette membri di cui 5 ordinari (Medico Generale d'Armata, con funzioni di Presidente, Chirurgo Generale d'Armata, con funzioni di Vicepresidente, Medico e Chirurgo Ispettore, Segretario) e 2 straordinari (Chirurgo Generale in seconda e Chimico farmaceutico). Il primo Presidente fu Gillio, già Preside della Facoltà di Medicina dell'Università di Torino, medico della Cittadella, Ispettore generale degli Ospedali Militari e Medico Generale. Il Consiglio si adoperò alacremente già dall'inizio ai compiti affidatogli, che portarono nel 1833 all'emanazione delle "Sovrane determinazioni portanti sul riordinamento del personale sanitario per l'armata di terra nonché il regolamento di servizio che disciplina l'amministrazione per gli ospedali militari", in cui vengono prese in considerazione tutte le problematiche del caso fra cui l'alimentazione degli ammalati, l'organico, la ripartizione delle infermerie (per i febbricitanti, per i feriti, per i malati chirurgici, per i sifilitici, per gli scabbiosi, per i malati contagiosi, per i detenuti e prigionieri di guerra), le uniformi, la modulistica, la formazione e le modalità di accesso agli Ospedali Militari o, in assenza di essi, a quelli Civili<sup>(3)</sup>.

L'azione riformatrice in campo sanitario militare di Riberi ha da questo momento la massima visibilità.

Prima di analizzarla occorre tuttavia evidenziare come il periodo storico in cui Riberi operò non fu soltanto caratterizzato dal mutare del pensiero scientifico, ma anche e principalmente sconvolto dal propagarsi delle idee rivoluzionarie esportate da Napoleone che influirono in modo determinante anche sulla vita dell'autore.

La restaurazione, avvenuta dopo Lipsia, con lo scopo di riportare al *quo ante* l'organizzazione dello Stato Sabauda, non poté frenare il germe del rinnovamento che ormai aveva attecchito negli animi dei dotti.

Sappiamo che gran parte dell'opera del Riberi ruota attorno alla riunificazione delle facoltà di Medicina e Chirurgia nel convincimento già da Lui espresso all'esame di aggregazione al Collegio di chirurgia nel 1816 che *“non minus chirurgo in medicina quam chirurgia medico est”*<sup>(7)</sup>. Questa opinione fu condivisa con il suo maestro e predecessore Lorenzo Geri, allora Professore di Chirurgia, che affermava: *“l'atto operativo è la seconda parte di un immenso lavoro intellettuale, di cui la prima, più sublime, consiste nell'esatta diagnosi della malattia, a comporre la quale tutte le forze della mente concentransi e tutta la scienza medica è in moto”*. Egli inoltre nella vita come nella pratica medica asseriva che *“non conveniva mai demolire la parte dell'edificio da altri innalzata, ma portarvi di continuo qualche pietra”*<sup>(1)</sup>.

L'incidenza delle regole importate da Napoleone avrebbe tuttavia segnato in modo diverso la vita del Riberi il quale, usufruendo per fortuna di noi tutti e della scienza medica della norma della “surrogazione”, riuscì ad evitare la coscrizione al servizio militare che lo avrebbe potuto portare anche a morte sui campi di battaglia<sup>(1)</sup>. La sua avventura militare parte quindi non dal 1813, come la sorte avrebbe voluto, ma dal 1825, quando un fortuito evento lo portò in Piazza S. Carlo ad assistere alla caduta da cavallo del figlio unico del ministro francese Rogé de Chollet nel giorno della sua laurea; egli, esanime al suolo, fu soccorso e curato con successo da Riberi<sup>(5)</sup>.

Con questo atto Egli si attirò i favori e la riconoscenza del prestigioso padre tanto da riuscire ad ottenere da parte di Carlo Felice la nomina a Professore sostituto di Chirurgia e, con decreto del 2 marzo 1825, di Chirurgo Maggiore della 4ª Compagnia delle Guardie Reali del Corpo del Re. Questo accadde in un momento in cui la condivisione alle aspirazioni di libertà e di unità patria che lo avevano spinto ad iscriversi alla “Federazione Italiana” e a dar aiuto ai partecipanti dei moti del 1821 per la concessione della Costituzione, sembrava inibirlo ad incarichi di prestigio in Facoltà<sup>(7)</sup>.

La doppia opportunità di funzioni fu abilmente sfruttata, per cui le carriere universitarie e militare si possono considerare come parallelamente percorse fino ai loro apici.

L'introduzione a Corte rappresentò l'occasione per rendere servigi ai funzionari di corte e ai nobili e, non ultimo, al Re stesso. Come in precedenza, la professionalità e l'intelligenza di Riberi ebbero modo di porlo in condizione di acquisire ulteriori privilegi fino a diventare Chirurgo della Casa Reale e, all'avvento di Carlo Alberto, dello stesso Re. In questa veste ebbe la



capacità non solo di accrescere il suo prestigio personale nello specifico campo professionale, ma anche di incidere in modo significativo nelle scelte politiche.

Alla positiva considerazione del Re, che ben conosceva di Riberi le capacità professionali, il rigore morale, il disinteresse per gli onori, le abitudini di vita spartane, la dedizione al dovere e la pratica caritatevole verso gli umili, si deve la nomina a Presidente del Consiglio Superiore Militare di Sanità; essa ebbe luogo con Decreto del 18 luglio 1843, nel quale, ad avvalorare la scelta, venivano evidenziati non solo i meriti professionali e i titoli accademici ma anche il desiderio espresso dallo stesso Riberi di apportare miglioramenti al Servizio Sanitario Militare.

Si può con certezza affermare che l'intendimento manifestato fu testimoniato dall'operato.

Nei 18 anni in cui ricoprì l'incarico di Presidente del Consiglio Superiore Militare di Sanità egli apportò tali significativi cambiamenti per cui, a buon titolo, strappando tale attributo a Gillio che dalla sua costituzione ne aveva ricoperto la carica, può essere considerato il vero fondatore della Sanità Militare.

Nell'ambito del Consiglio Superiore Militare di Sanità Riberi era stato già in precedenza inserito come Chirurgo Maggiore delle Guardie del Corpo del Re; da questa posizione aveva potuto avere una finestra privilegiata per valutare le carenze del servizio e le possibilità su cui poter incidere.

Il filo conduttore dell'opera riformatrice introdotta dal Riberi nella Sanità Militare può, a mio parere, essere ben compreso dall'affermazione del principio secondo cui spetta allo Stato l'obbligo di tutelare nel miglior modo possibile il soldato, poiché “[...] *se ciascuno può nell'ordine civile prescegliere quel medico, in cui suppone più cognizioni e maggiore esperienza, essendo invece imposto il Medico al soldato incombe al Governo di restare a questo malleatore della sua abilità*”<sup>(7)</sup>. Memore dei convincimenti già espressi nella sua tesi di laurea in chirurgia e coerente al suo motto “*etsi omnes ego non*”<sup>(1)</sup> il suo primo impegno nella ristrutturazione del Corpo Sanitario Militare fu quello di qualificare e ricostruire la reputazione dei medici militari. La necessità di fondere in un'unica Facoltà i Collegi di medicina e chirurgia secondo il modello francese era da sempre stato il problema che assillava Riberi che, nel 1844 in virtù delle grazie acquisite dal Re e del suo potere personale, riuscì a compiere almeno in parte il suo progetto nonostante le resistenze interne ed esterne al mondo medico. Le discussioni intervenute successivamente portarono a modifiche che tuttavia, anche in virtù della nomina di Riberi prima a membro del Parlamento elettivo nel 1848 e, successivamente nel

1849, a Senatore di nomina Regia, non riuscirono a scardinare il concetto di unicità della Facoltà. Partendo da questi presupposti ben si comprende la volontà di imporre la doppia laurea ai medici militari allora in servizio e ai nuovi medici il possesso della laurea in Medicina e Chirurgia. Infatti, già il 5 settembre 1843, a soli due mesi dalla sua nomina a Presidente del Consiglio Superiore Militare di Sanità, fece emanare un Regio Decreto con il quale veniva resa obbligatoria per i chirurghi militari la laurea in medicina qualora volessero concorrere alla qualifica di chirurgo di prima classe. Questa norma non apportò tuttavia i significativi e auspicati miglioramenti in quanto nei reparti di truppa permanevano esclusivamente chirurghi e negli ospedali i medici-chirurghi che già di fatto vi erano in servizio. In considerazione di ciò e del fermo convincimento dell'unicità delle due lauree ottenne che con il successivo Regio Decreto 30 ottobre 1850 fosse resa obbligatoria la doppia laurea per i medici e i chirurghi militari; essi da allora hanno assunto come nome esclusivo quello di Medici Militari.

La sua riforma si muove in un arco temporale assai ampio che ha traghettato l'ordinamento voluto dalla riforma carloalbertina fino all'unificazione nazionale. Le avversità e le resistenze opposte al cambiamento determinate dalla sua persona e dall'impostazione data al servizio non furono poche; infatti, obbligare i vecchi medici militari a frequentare corsi di otto mesi per acquisire il titolo mancante e di sottostare ad una successiva valutazione per esame non poteva non rappresentare motivo di ostracismo di tali figure. Le novità introdotte tuttavia dovevano ben presto far ricredere anche i più riottosi che il cammino intrapreso, pur comportante disagi temporanei, avrebbe riscosso privilegi inaspettati. Con il riordinamento, al personale medico venne riconosciuta ed elevata l'assimilazione ai gradi militari, così come la necessità di provvedere al loro miglioramento culturale attraverso l'istituzione di Biblioteche presso gli Ospedali Militari ove dovevano essere tenute periodiche conferenze di aggiornamento. Non meno importante fu l'opera di Riberi nel volere il reclutamento dei medici attraverso concorso con criteri di selezione posti al vaglio del Consiglio Superiore Militare di Sanità; tale atto, oltre che dare giusto riscontro meritocratico, permetteva ai medici l'accesso ai gradi di maggior prestigio personale svincolati da autoritaristici favori dei Comandanti. Da quel momento quindi le progressioni di carriera si ebbero attraverso un combinato che riconosceva i comprovati meriti professionali, le anzianità e le vacanze organiche.

In seguito ai disservizi riscontrati nella 1<sup>a</sup> Guerra d'Indipendenza del 1848, ove aspri e negativi giudizi si erano abbattuti sull'organizzazione sanitaria militare e sui medici o ancor più sui chirurghi, il Riberi, posto al centro di

tali contestazioni, riuscì con maestria a capovolgere in suo favore le critiche, tanto da svincolare in operazioni di guerra la dipendenza dei medici dai Comandanti facendola ricadere su un Medico Capo all'uopo nominato e ad avere un'ulteriore mandato per riorganizzare la Sanità Militare.

Nell'opera di promozione del Medico Militare deve essere tra le più significative essere annoverata la fondazione del "Giornale di Medicina Militare" che, autorizzato dal Ministero della Guerra con dispaccio dell'allora 11 luglio 1851, viene ancora pubblicato e racconta le esperienze, le conquiste e le ricerche della medicina militare. Nell'opera di formazione del personale sanitario non può essere altresì dimenticata l'istituzione presso l'Ospedale Militare di Torino di una compagnia di "infermieri militari", composta da 60 uomini, i quali dovevano "esercitarsi nel servizio delle ambulanze, nel modo di trasportare i feriti sul campo, dare ai medesimi un pronto soccorso ed applicare i primi apparecchi e fasciature adatte al vario genere di lesioni o ferite"

Riberi incise anche nel trasferimento dell'Ospedale Divisionale di Torino dal Quartiere San Daniele, area in cui per motivi di carattere difensivo-militare e di carattere economico-urbanistico si era stabilito di allontanare le truppe, all'edificio costruito per ospitare le Canonichesse Lateranensi di Sant'Agostino ubicato tra le attuali via Giolitti, via Accademia Albertina, via s. Massimo e Via Santa Croce; tale collocazione, nelle vicinanze dell'Ospedale San Giovanni Battista gli permetteva infatti di svolgere con maggiore diligenza le sue funzioni di Presidente del Consiglio Militare di Sanità e di agevolare la didattica dei medici militari.

Non disconosce l'importanza dei veterinari a cui competeva il controllo degli alimenti e della salute degli animali, allora alquanto importanti per le operazioni militari, e volle regolamentare il servizio farmaceutico creando a Torino un Laboratorio Generale Chimico Farmaceutico Militare. Questo rappresentò l'embrione da cui avrà sviluppo successivamente e con varie denominazioni l'attuale Stabilimento Chimico Farmaceutico Militare che dal 28 ottobre 1931 ha sede in Firenze, via Reginaldo Giuliani n° 201. Sia i veterinari sia i farmacisti, prima d'allora confinati al grado di subalterni, ebbero dalla riforma l'elevazione al rango di ufficiali; inoltre la loro dipendenza passò al Consiglio Superiore Militare di Sanità. Il riconoscimento delle professionalità dei veterinari e farmacisti fu a tal punto da lui promosso tanto da dar loro visibilità anche all'interno del Consiglio Superiore Militare di Sanità ove con la riforma determinata con il R.D. 9 giugno 1953 fu stabilita una sua nuova composizione in cui accanto ad un Presidente venivano inseriti tre ispettori (un medico, un veterinario e un farmacista) ed un segretario. Oltre a questi benefici Riberi ottenne per i medici militari retribuzioni più vantaggiose;

questo incremento stipendiale, pur attirandogli alcune critiche in quanto ritenuto plausibile prodotto di un interesse privato (anche il Presidente del Consiglio superiore riceveva un significativo incremento degli emolumenti), diede modo di dimostrare ulteriormente la sua statura morale; infatti egli vi rinunciò e poiché gli fu opposto diniego decise di destinarlo al Giornale di Medicina Militare. Al fine di rendere più appetibile e portare lustro al Servizio, istituì da parte dell'Autorità Militare un premio di 600 lire al miglior laureato in medicina e chirurgia e dal 1856 il conferimento di un premio in denaro di 1000 lire per i Medici Militari e della Regia Marina autori di lavori su argomenti messi a concorso dal Consiglio Superiore di Sanità Militare.

Le positive ricadute della riforma con l'organizzazione dei servizi sanitari in guerra (ambulanze divisionali, ospedali di linea, ospedali delle retrovie, strumentari chirurgici, ecc.) ebbero modo di essere sperimentate sul campo nella Guerra di Crimea del 1855 ove Capo del Servizio Sanitario d'Armata era il Colonnello Medico Capo Comisetti. In tale occasione si ebbe la riprova di come uno strumento sanitario organizzato coerentemente alle sue finalità potesse ridurre in modo significativo le perdite e migliorare l'operatività delle truppe.

La riforma di Riberi poté considerarsi conclusa nel 1885 quando entrarono in vigore le norme definitive; con esse veniva data maggiore dignità ai medici militari, che da allora venivano equiparati ai gradi degli Ufficiali dell'Esercito fino a portare al rango di Generale il Presidente del Consiglio Superiore e a quello di Colonnello l'Ispettore Generale.

La vita di Riberi ebbe fine il 18 novembre 1861; anche in questa occasione si ebbe modo di constatare l'amore che lo aveva legato alla Sanità Militare; infatti nel suo testamento disponeva che il premio in denaro di 1000 lire previsto per i Medici Militari e della Regia Marina, come già sopra citato, fosse concesso ogni venti mesi e tratto dalle rendite scaturite dal suo patrimonio; oltre a ciò dispose il pagamento dei depositi degli esami speciali di Medicina e Chirurgia degli allievi addetti come scrivani al Consiglio Superiore di Sanità e la donazione di un Napoleone d'oro a ogni soldato di servizio presso il Consiglio Superiore di Sanità.

A memoria delle benemerenzze acquisite rimangono tra l'altro sei monumenti, di cui cinque in Torino e una nella natia Stroppo, e la denominazione dell'attuale Dipartimento Militare di Medicina Legale di Torino; esso, frutto delle varie riconfigurazioni dei nosocomi militari, è localizzato nella zona d'angolo tra C.so IV Novembre e via Barletta all'interno di quello che fu l'allora Ospedale Militare Principale inaugurato con i massimi onori nel 1914 e costruito all'epoca con i criteri di architettura sanitaria d'avanguardia.

## CONCLUSIONE

Alessandro Riberi rappresenta per il Corpo Sanitario militare un'icona che seppur da considerarsi irraggiungibile è incentivo al miglioramento, come bene esprime uno dei suoi ammonimenti: "La scienza progredisce. Per essa il risultato conseguito è raramente definitivo ed inappellabile: un progresso compiuto ad altro non serve se non a preparare la via ad un nuovo progresso. Nella scienza si avanza senza posa verso limiti i quali, una volta raggiunti alla maniera delle ombre erranti di Virgilio, si allontanano sempre più: essa infine offre, secondo il bel concetto di un profondo pensatore, come una specie di immagine dell'infinito in azione. Grande lezione è cotesta per coloro che, troppo devoti a Finazio, pretendono cominciarla da capo e stimano il suo passato non esistere fuorché nelle loro opere, ed il suo avvenire racchiudersi tutto quanto nelle loro dottrine! Chi trovò, e chi troverà mai i limiti oltre i quali non sia lecito all'uomo spingersi?"<sup>(8)</sup>.

## BIBLIOGRAFIA

1. Allocco M.: *Il commendator Alessandro Riberi*. <[http://www.paratge.it/valadas/pace/al\\_riberi.htm](http://www.paratge.it/valadas/pace/al_riberi.htm)>. Accessed 10 Dicembre, 2007. Paratge dins las Valadas. Laboratori Politic Occitan.
2. Armocida G., Gorini I., editors: *La polizia medica militare tra Annibale Omodei e Giovanni Nepomuceno d'Isfordink*. Atti Del I Convegno Di Storia Della Sanità Militare, 8-9 Novembre 2003, Calenzano (FI). Errepi Centrocopie, 2003.
3. Bassignana P.L. (ed.): *L'ospedale Militare. Una Risorsa Per Torino*. I ed. Torino, pag.13-46, Torino Incontra, Centro Congressi, 2006.
4. Canarini A.: *Due igienisti militari italiani del secolo XVII*. G. Med. Mil. (1-2), 1931.
5. Fumagalli C.: *Cenni biografici di alcuni illustri chirurghi del corrente secolo*. Ann. Univ. Med. 68 (610): 176-181, 1864.
6. Marchiandi P. Cav.: *Elogio Necrologico Del Commendatore Alessandro Riberi, Medico Di S.M. e Reale Famiglia, Senatore Del Regno e Professore Di Medicina Operativa Nella R. Università Di Torino*. Tip. G. Favale, 1-59, 1862.
7. Menonna G.: *Nel centenario della morte di Alessandro Riberi, fondatore del corpo sanitario militare*. Suppl. al Giornale di Medicina Militare 3: 1-43, 1961.
8. Montaldo S. (ed.): *L'ospedale Militare. Una Risorsa Per Torino*. I ed. Torino, pag. 47-73, Torino Incontra Centro Congressi, 2006.
9. Omodei A.: *Sistema Di Polizia Medico-Militare*. I ed. Vigevano, 1807.
10. Porzio L.: *De Militis in Castris. Sanitate Tuenda*. II ed. Napoli, Ex Typ. F. Mosca, 1728.

## IL RIBERI DI DIANZANI

*C.A. Viano*

Professore Emerito dell'Università degli Studi di Torino

Mario Umberto Dianzani è diventato nostro concittadino nel 1965, chiamato dalla nostra Università a ricoprire la cattedra che era stata di Giulio Bizzozero. Giunse tra noi nel pieno vigore della sua attività di ricerca scientifica, che avrebbe continuato nel nostro Ateneo; ma ben presto diventò anche un esponente della vita pubblica, come Preside della Facoltà di Medicina, Rettore dell'Università, Presidente dell'Accademia di Medicina, membro del Consiglio Universitario Nazionale e del Consiglio Superiore della Sanità, riuscendo così a dare il proprio contributo alle istituzioni cittadine e a rappresentare le istanze torinesi in sede nazionale. Tutto ciò è noto e fa parte del personaggio pubblico. Ma c'è un'altra via attraverso la quale Dianzani si è fatto nostro concittadino e anzi ci ha aiutato a capire la nostra città e la sua tradizione culturale.

Con grande senso di responsabilità, Dianzani ha preso sul serio la successione a Bizzozero, come se la cosa gli imponesse obblighi supplementari, rispetto a quelli connessi alle sue funzioni. Infatti non soltanto si è dedicato a ricerche scientifiche che dovevano tener viva la tradizione di studi inaugurata a Torino da Bizzozero, ma si è messo a ricostruire la storia della cultura medica torinese, per cercare le fila di una lunga vicenda, in cui si inquadrava la venuta a Torino dell'illustre scienziato di cui era successore. Così, senza interrompere il proprio lavoro di scienziato, cui continua a dedicarsi, Dianzani si è inventato un secondo mestiere, diventando uno storico di professione. Dianzani ha sempre amato la cultura umanistica e ha coltivato il gusto per i segni del tempo, che spingono indietro i nostri orizzonti e danno profondità al nostro sapere. Quando gli si parla, egli fa rivivere le famiglie della medicina italiana, come se dispiegasse una rete, che fa della comunità scientifica non soltanto un concetto, ma una realtà viva, in cui si muovono persone e nella quale si tramandano nozioni e competenze, ma anche ricordi di personaggi.

Andando oltre gusti e ricordi personali, Dianzani si è fatto storico per tener vivo il ricordo di una particolare tradizione, di cui, succedendo a Bizzozero, si sentiva erede, e per restituire alla città, che era diventata la sua, un pezzo importante della sua storia. Alla storia della medicina torinese ottocentesca Dianzani ha dedicato tre volumi, pubblicati dall'Accademia di Medicina: *La medicina torinese fra vitalismo e positivismo : un dramma in Accademia, 150*

*anni fa: Casimiro Sperino e la sifilizzazione nel 1999; La medicina torinese fra vitalismo e positivismo: Alessandro Sella: un medico pratico, colto e appassionato nel 2001 e La medicina torinese fra vitalismo e positivismo: la vittoria del positivismo (da Moleschott a Bizzozero) del 2003. A questi si aggiunge ora una nuova monografia, Alessandro Riberi. Un mito della medicina torinese dell'800, pubblicato anch'esso dall'Accademia di Medicina.*

Concludendo quest'opera Dianzani dichiara di avere «intrapreso questa ricerca su Riberi per verificare se egli fosse davvero un monumento», senza fidarsi «dei necrologi sempre laudativi, e sempre poco obbiettivi» e di avere «voluto risalire alle fonti» (p. 267). Dicevamo di Dianzani fattosi storico: ecco, questo è il primo passo, risalire alle fonti, cosa che egli ha fatto con estrema pazienza e scrupolo. Riberi è un cognome diffuso, soprattutto nel territorio dal quale Alessandro Riberi e la sua famiglia venivano, e non è neppure scritto sempre nello stesso modo. I nomi propri, che servirebbero a identificare i personaggi, si ripetono e fanno crescere la confusione. Né la comunanza del cognome è di per sé un indice di parentela. Dianzani non si è perso d'animo e soprattutto non si è perduto nel labirinto delle relazioni familiari e degli intrecci di interesse. Ha cercato i documenti originali, muovendosi con grande disinvoltura negli archivi e pubblicando in appendice una ricca messe di documenti inediti. La passione per le vicende umane accompagnata alla precisione, forse ereditata dal mestiere di biologo e di sperimentatore, hanno permesso a Dianzani di ricostruire la storia di una famiglia piemontese significativa tra la fine del Settecento e l'Ottocento.

Riberi era «nato contadino e montanaro, sostanzialmente povero» (p. 267), in una famiglia di piccoli proprietari e di notai di paese, che aveva conosciuto alti e bassi, ma mai una vera ricchezza. Il padre di Alessandro si indebita, andando oltre le proprie capacità economiche rimastegli, dopo aver speso molto denaro per evitare il servizio militare ai figli e per provvedere alla loro educazione. Quella che Dianzani ricostruisce è la storia di una piccola società del contado, messa a dura prova dalle morti precoci, nella quale le sventure naturali e le difficoltà economiche si ripercuotono su una vasta rete familiare e sulle generazioni future, in cui agisce un sistema di credito impreciso, rischioso, reso più costoso dalle continue liti legali che suscita. In questa realtà Riberi si comporta con la durezza che è propria dell'ambiente, necessaria per non essere sopraffatto. «Forse profitto per arricchirsi delle condizioni miserevoli del padre e del fratello» (p. 267) – osserva Dianzani –; ma solo così poteva emergere da una situazione nella quale bastava una malattia, un parente litigioso o una guerra per essere travolti. Diventato ricco, Riberi «spese una parte dei beni accumulati nella beneficenza e nell'assistenza, ma pensò anche



alla sua famiglia» lasciando «erede dei beni torinesi il figlio» di un «fratello, e dei beni di Stroppio gli altri fratelli» (p. 267). Con l'«anima del montanaro» tormentato dalla «ristrettezza dell'ambiente da cui proveniva», tuttavia «volò ben più alto, e rese, col testamento, alla famiglia molto di più di quanto gli avesse tolto» (p. 268). C'è una sorta di redistribuzione nell'economia in cui Riberi si muoveva, una redistribuzione non pianificata e neppure progettata come tale, una specie di mano invisibile, ma aleatoria e inaffidabile.

La storia familiare di Riberi si intreccia, nella narrazione di Dianzani, con quella più ampia del Piemonte. Riberi si avvia infatti agli studi medici nel Piemonte napoleonico. I medici torinesi avevano avuto una parte di rilievo nei cambiamenti introdotti dai francesi che, già in età repubblicana, avevano occupato il Piemonte. Il Piemonte aveva partecipato alla crescita del sapere scientifico, verificatasi nell'Europa settecentesca, ma aveva sterilizzato i fermenti culturali illuministici, che avevano accompagnato quel processo, conservando istituzioni non al passo con i tempi. Quando arrivarono, i francesi puntarono soprattutto sui medici, per rinnovare le istituzioni culturali, in particolare l'università, ancora dominata dal clero. Napoleone in parte ripristinò la tradizione, ma consolidò anche alcune delle innovazioni: Dianzani ricorda soprattutto l'unificazione del Collegio di Medicina e di quello di Chirurgia, che metteva fine alla discriminazione dei chirurghi. Riberi si formò così in un ambiente ricco di stimoli intellettuali, nel momento in cui la medicina diventava un importante fattore di rinnovamento sociale.

La restaurazione del 1814 interruppe questo processo e cercò di riportare in vita le vecchie istituzioni, reintroducendo, tra l'altro, la separazione di Medicina e Chirurgia. Ma medici e scienziati che erano stati protagonisti del rinnovamento contribuirono a tener vivo il ricordo di quella stagione, anche sfidando la sospettosa sorveglianza delle autorità. Dianzani dà un quadro dettagliato e illuminante della scuola medica e chirurgica torinese e dei modi nei quali essa conserva il meglio delle conquiste moderne e delle riforme rivoluzionarie e napoleoniche. Un momento drammatico è segnato dai moti del 1821, ai quali Riberi non partecipò direttamente, anche se si espone, prestando aiuto a persone compromesse. Ma fu proprio l'ambiente medico che permise a Riberi di inserirsi lo stesso nelle istituzioni sanitarie, entrando nel Collegio di Chirurgia. Ormai ben insediato nell'università, Riberi entrerà, con Carlo Alberto re, nella medicina militare e in quella della casa regnante. Forte di queste posizioni, diventerà non soltanto un rappresentante eminente della scienza medica, ma un membro influente delle istituzioni del Regno di Sardegna, vicino ai potenti e artefice dell'organizzazione della medicina pubblica, in primo luogo della sanità militare. Studiando Riberi, Dianzani ricostruisce un

percorso attraverso il quale i fermenti settecenteschi sono sopravvissuti alla restaurazione e sono riusciti a dare i loro frutti nell'Italia ottocentesca. Sarebbe interessante un parallelo con Amedeo Avogadro, più importante di Riberi per l'originalità delle idee, anche se meno di lui ha influito sulla vita pubblica del paese: Avogadro e Riberi sono passati entrambi attraverso il travaglio della Restaurazione ed entrambi sono riusciti a trasmettere qualcosa di ciò che avevano ricevuto dal grande rinnovamento dell'inizio del secolo.

Avogadro e Riberi: un nome rimasto nella storia della fisica e della chimica e un nome rimasto nelle nostre istituzioni sanitarie e nella memoria cittadina. Dianzani aveva davanti a sé soltanto monumenti, letterari e materiali, di Riberi e, da vero storico, si è armato di scrupolosa diffidenza, cercando di interrogare il suo personaggio dopo averlo fatto scendere dai piedistalli sui quali era stato collocato. Alla fine ha dovuto riconoscere che era impossibile fare di lui un grande scienziato, come Avogadro appunto, perché gli mancava l'originalità delle idee. Ma Riberi era uomo delle istituzioni, aggiornato e attento a ciò che poteva avere conseguenze significative e poteva incidere sull'organizzazione della medicina. Molto presto aveva incominciato a studiare le infezioni chirurgiche, che costituivano un problema per gli ospedali: ancora privo di una teoria valida dell'infezione, si affidava alla pratica sperimentale, non esitando a iniettare a se stesso l'essudato di piaghe chirurgiche. La sperimentazione su se stessi era una pratica non del tutto inconsueta, sulla quale Dianzani ha scritto pagine memorabili nella monografia su Sperino. Come Dianzani osserva esplicitamente e dimostra accuratamente, Riberi era un organizzatore capace, abile nell'istituire squadre di collaboratori, sempre presente quando occorreva, preciso nel prendere nota delle esperienze fatte e nel renderle pubbliche, facendone materia di insegnamento, audace nell'affrontare casi difficili. Dianzani racconta come per giorni si sia avvicinato con i suoi collaboratori per bloccare manualmente una emorragia dell'arteria femorale e illustra ampiamente gli interventi più audaci nella chirurgia urologica e in quella oculistica. Assente la chirurgia addominale, troppo esposta alle infezioni, Dianzani ricorda gli interventi pionieristici nella chirurgia plastica e ricostruttiva, l'uso tempestivo del disinfettante e quello dell'etere come anestetico.

La vena narrativa, che rende attraenti i libri di Dianzani, ci dà quadri di grande effetto, nei quali è ricostruita la morte di tre grandi personaggi: il re Carlo Alberto, il duca di Genova, fratello di Vittorio Emanuele II e il Conte di Cavour. Sono tre casi clamorosi, l'ultimo dei quali ha lasciato un'ombra su Riberi. Angelo Maffoni, il medico chiamato a consulto al letto di Cavour, aveva diagnosticato una febbre terzana e gli aveva fatto assumere del chinino:

poteva essere la strada giusta, anche se non si conosceva il meccanismo della malaria, che probabilmente Cavour aveva contratto durante i soggiorni nella tenuta vercellese. Ma su richiesta dello stesso Cavour, che riteneva di avere una congestione alla testa, il medico curante gli aveva praticato dei salassi, e lo stesso Vittorio Emanuele II, venuto a trovarlo, aveva consigliato altri salassi. Riberi, chiamato nel frattempo, si oppose per il momento ai salassi suggeriti dal re, ma tolse il chinino e si avventurò in una diagnosi che riprendeva lo spunto dato da Cavour stesso, parlando di infiammazione alla base del cervello, elevata pressione, gotta ereditaria e sforzo mentale, che non trovava sfogo per la necessità, in cui il paziente si trovava, di esercitare la diplomazia. Dato ordine di nutrire l'ammalato con minestrina e vino e rinviati i salassi suggeriti dal re, Riberi sparì, evitando di accorrere al capezzale del malato, quando la situazione precipitò, con la scusa di un intervento chirurgico in corso; eppure avrebbe potuto farsi sostituire, visto che disponeva di una squadra efficiente.

Al di là dell'episodio drammatico e del suo esito non proprio onorevole, Dianzani mette in luce le condizioni oggettive della medicina del tempo, la sua impotenza diagnostica e terapeutica, dovuta in modo rilevante alla mancanza di un'adeguata base teorica. La lacuna teorica era colmata da conoscenze presunte, nel caso di Riberi dalle dottrine vitalistiche, che egli condivideva con gran parte della cultura medica torinese e italiana. Il limite più grave di Riberi era non tanto l'adesione a quelle dottrine, quanto non aver scorto in tempo che un altro modo di affrontare la biologia era ormai alle viste. Riberi chiude così un periodo della medicina torinese, un periodo in cui egli diede contributi importanti come chirurgo e come organizzatore sanitario; dopo di lui si annuncia l'inizio del positivismo, inaugurato dalla chiamata a Torino di Moleschott e culminato con la presenza di Bizzozero. L'età del positivismo è una stagione splendida della cultura torinese, che si apre alla scienza internazionale e che vede il concorso di molte discipline, dalla biologia alla fisica e alla matematica, campi nei quali si toccano punti altissimi, anche con la collaborazione di scienziati con competenze diverse; e la cosa dà frutti particolarmente importanti proprio in medicina, nella quale si sperimenta l'applicazione della tecnologia alla diagnosi e alla terapia.



*Tesi di Laurea candidate per il*  
**PREMIO FONDAZIONE FERRERO ONLUS**  
*Anno Accademico 2006/2007*

*Candidato:* Miryam CARECCHIO  
*Relatore:* Prof. Francesco MONACO  
*Titolo:* **Studio dei meccanismi infiammatori nella malattia di Alzheimer: ruolo di osteopontina**

*Candidato:* Chiara MERLO  
*Relatore:* Prof. Mario MOLASCHI  
*Titolo:* **Prevalenza ed impatto clinico dell'effetto whitecoat in soggetti anziani sottoposti a screening cognitivo**

*Candidato:* Marco RAVAZZOLI  
*Relatore:* Prof. Giovanni Carlo ISAIA  
*Titolo:* **Effetti biologici dell'alendronato sui linfociti T nell'osteoporosi postmenopausale**

*Tesi di Laurea vincitrice del*  
**PREMIO FONDAZIONE FERRERO ONLUS**  
*Anno Accademico 2006/2007*

*Candidato:* Marco RAVAZZOLI

*Relatore:* Prof. Giovanni Carlo ISAIA

*Titolo:* **Effetti biologici dell'alendronato sui linfociti T  
nell'osteoporosi postmenopausale**

*Tesi di Laurea candidate per il*  
**PREMIO IN MEMORIA DEL DOTT. ITALO ARNEODO**  
*Anno Accademico 2006/2007*

*Candidato:* Nadia BONELLI

*Relatore:* Prof. Ezio GHIGO

*Titolo:* **Valutazione dell'incidenza di alterazioni tiroidee dopo coronografia con mezzo di contrasto iodato**

*Candidato:* Laura BRUNO

*Relatore:* Prof. Paolo GALLINARO

*Titolo:* **La rete del trauma in Piemonte: potenzialità ed evoluzione del CTO verso lo sviluppo di un Trauma Center**

*Candidato:* Andrea CASTELLI

*Relatore:* Prof. Gianluca GAIDANO

*Titolo:* **Marcatori farmacogenetici del linfoma diffuso a grandi cellule B**

*Candidato:* Silvia CINARDI

*Relatore:* Prof. Guglielmo RAMIERI

*Titolo:* **Il risultato estetico della chirurgia ortognatica nel giudizio di addetti professionali, pazienti e persone comuni. Uno studio cieco basato su scansioni ottiche 3D**

*Candidato:* Paolo GARRONE  
*Relatore:* Prof. Imad SHEIBAN  
*Titolo:* **Trattamento percutaneo della malattia coronarica del tronco comune non protetto: impatto del diabete mellito sui risultati a breve e lungo termine**

*Candidato:* Corrado MAGNINO  
*Relatore:* Prof. Franco VEGLIO  
*Titolo:* **Studio morfologico e funzionale del ventricolo destro nell'iperaldosteronismo primitivo**

*Candidato:* Chiara MERLO  
*Relatore:* Prof. Mario MOLASCHI  
*Titolo:* **Prevalenza ed impatto clinico dell'effetto white-coat in soggetti anziani sottoposti a screening cognitivo**

*Candidato:* Alice MONZANI  
*Relatore:* Prof. Giuseppina ODERDA  
*Titolo:* **La grelina nella mucosa gastrica del bambino**

*Candidato:* Francesco PANERO  
*Relatore:* Prof. Paolo CAVALLO PERIN  
*Titolo:* **Epidemiologia del diabete mellito tipo 2: lo studio di Torino**



*Candidato:* Elisabetta PUGLISI  
*Relatore:* Prof. Franco VEGLIO  
*Titolo:* **Studio della funzione striale sinistra nell'ipertensione arteriosa essenziale**

*Candidato:* Marco RAVAZZOLI  
*Relatore:* Prof. Giovanni Carlo ISAIA  
*Titolo:* **Effetti biologici dell'alendronato sui linfociti T nell'osteoporosi postmenopausale**

*Candidato:* Maria Teresa RICCI  
*Relatore:* Prof. Barbara PASINI  
*Titolo:* **Ruolo del gene APC nella predisposizione al tumore della mammella**

*Candidato:* Elisa RIVETTI  
*Relatore:* Prof. Ugo RAMENGGHI  
*Titolo:* **Piastrinopenie acute in età pediatrica. Nuovi approcci terapeutici**

*Candidato:* Luca ROLLERO  
*Relatore:* Prof. Paolo GALLINARO  
*Titolo:* **Alterazioni metaboliche e nutrizionali nel paziente polifrattrato. Effetti dei supplementi nutrizionali**

*Candidato:* Anna SURBONE

*Relatore:* Prof. Paolo ZOLA

*Titolo:* **Studio farmacocinetico-clinico preliminare sulla somministrazione di eparina a basso peso molecolare e dosaggio sierico di HGF nelle pazienti affette da tumore maligno epiteliale dell'ovaio**

*Candidato:* Elisa TESTA

*Relatore:* Prof. Franco VEGLIO

*Titolo:* **Ruolo del profilo retinico nella farmacoterapia dell'ipertensione arteriosa essenziale**

*Tesi di Laurea vincitrici del*  
**PREMIO IN MEMORIA DEL DOTT. ITALO ARNEODO**  
*Anno Accademico 2006/2007*

*Candidato:* Francesco PANERO

*Relatore:* Prof. Paolo CAVALLO PERIN

*Titolo:* **Epidemiologia del diabete mellito tipo 2:  
lo studio di Torino**

*Candidato:* Maria Teresa RICCI

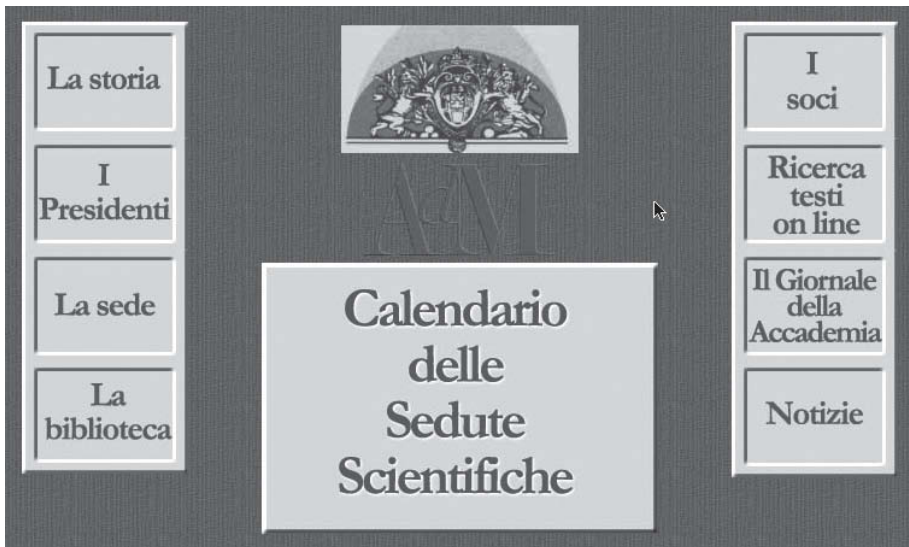
*Relatore:* Prof. Barbara PASINI

*Titolo:* **Ruolo del gene APC nella predisposizione al tumore  
della mammella**



*SITO WEB*  
*dell'Accademia di Medicina di Torino*

**www.accademiadimedicina.unito.it**





*Norme redazionali per la pubblicazione sul  
"Giornale dell'Accademia di Medicina di Torino"*

(in vigore dal 2008)

- a) Il Giornale dell'Accademia di Medicina di Torino pubblica lavori relativi ad argomenti trattati durante le sedute scientifiche, editoriali su invito e, a giudizio del Comitato di Redazione, anche articoli scientifici liberamente inviati da Soci e da non Soci. Se relativi ad argomento trattato durante una seduta scientifica, questi devono essere consegnati al Segretario Generale in occasione della medesima. I lavori, in italiano o in inglese, devono essere trasmessi al Segretario Generale su supporto elettronico in file Word, contenuti in una lunghezza massima di 25.000 battute (spazi inclusi) e corredati da un massimo di 10 tabelle o figure (in bianco e nero). Testi più estesi devono essere autorizzati dal Segretario Generale. Le figure e le tabelle, numerate progressivamente e separatamente con numeri arabi, devono essere richiamate nel testo. Le rispettive didascalie devono essere riportate separatamente su una pagina a parte ed al termine del lavoro.
- b) Nella prima pagina di ogni lavoro devono essere indicati i Nomi (per esteso) ed i Cognomi degli Autori, le relative affiliazioni, l'indirizzo postale e mail dell'Autore principale, 1-5 parole chiave in italiano ed in inglese, un riassunto in italiano ed in inglese, ciascuno di lunghezza non superiore a 2200 caratteri (spazi inclusi).
- c) Nella bibliografia le singole voci devono essere indicate in ordine alfabetico, numerate progressivamente e devono essere redatte secondo le seguenti modalità:
- 1) Citazione di un articolo: Cognome e Iniziale del nome di tutti gli Autori, due punti, Titolo dell'articolo, punto, abbreviazione del Titolo della rivista, anno, punto e virgola, volume, due punti, prima ed ultima pagina.

Esempio:

Williard WC, Hajdu SI, Casper ES, Brennan MF: Comparison of amputation with limb-sparing operations from Adult soft tissue sarcoma of the extremity. Ann. Surg. 1992; 215: 269-275.

- 2) Citazione di un intero volume: Cognome e Iniziale del nome di tutti gli Autori, due punti, Titolo del volume, punto, Casa Editrice, anno, Luogo della stampa.

Esempio:

Bianchi P, Verdi S: Le malattie del metabolismo Minerale. Guida pratica alla gestione operativa. Ed. Centro Scientifico Editore, 2000, Torino.

- 3) Citazione di un capitolo di un libro: Cognome e Iniziale del nome di tutti gli Autori, due punti, Titolo del capitolo, punto, "Titolo del volume", anno, due punti, pagina iniziale e finale, Casa Editrice, Luogo della stampa.

Esempio:

Bianchi P, Verdi S, Rossi GC: Psychological and Psychopatological aspects of Anorexia in the elderly patients. In "Sedentary life and Nutrition", 1990: 81-88, Raven Press Ed, New York.

Nel testo i riferimenti bibliografici devono essere numerici e riportati in parentesi tonde: se più di uno, devono essere separati da una virgola

- d) L'Autore deve specificare se desidera gli estratti ed in quale numero. Il relativo costo è a carico del richiedente.



*INDICE DEGLI AUTORI*

Aimetti M.	52	Ledda-Columbano G.M.	140
Allaix M.E.	267	Mandili G.	83
Angeli A.	37, 318	Marangella M.	97
Arcidiacono T.	117	Merlo F.	304
Avagnina S.	304	Mietta S.	171
Barbero G.	83	Moretti V.	156
Bellagamba F.	156	Morino M.	267
Bergia R.	171	Paleari M.A.	156
Berta L.	235	Palmo A.	304
Berutti E.	62	Paloschi V.	117
Biasion R.	117	Pasqualini D.	62
Bommarito L.	171	Pernigotti L.M.	278
Borgogna C.	184	Perra A.	140
Caldart M.	267	Persico A.	125
Canaparo R.	235	Pibiri M.	140
Carossa S.	68	Poli G.	31, 43
Catalano M.G.	235	Rigardetto R.	125
Columbano A.	140	Rimonda R.	267
D'Amelio P.	220	Rolla G.	171
Destefanis P.	83	Scaroina F.	46
Erovigni F.	68	Serpe L.	235
Ferrero A.	206	Simbula G.	140
Fontana D.	83	Simbula M.	140
Frairia R.	235	Soldati L.	117
Gandione M.	125	Sulas P.	140
Garrone C.	267	Terranegra A.	117
Gassino G.	75	Turrini F.	83
Gilli G.	256	Valfrè F.	156
Giribaldi G.	83	Vecchione A.	321
Isaia G.C.	220	Vezzoli G.	117
Kowalik M.A.	140	Viano C.A.	333

Pubblicazione effettuata con il contributo del  
*Ministero per i Beni e le Attività Culturali*

Autorizzazione del Tribunale di Torino n. 477  
Finito di stampare nel mese di Novembre 2008

Stampato da: Tipografia Bodrato s.n.c.  
Via Vanchiglia 31 - 10124 Torino - Tel. 011.817.71.44