

Volume LXII - Nuova Serie  
ANNO ACCADEMICO 2017-2018 303° DALLA FONDAZIONE

2017-2018

N. 2  
Aprile  
Giugno  
2018

[www.attidellaaccademialancisiana.it](http://www.attidellaaccademialancisiana.it)  
[www.accademia-lancisiana.it](http://www.accademia-lancisiana.it)

**Atti della**

**Accademia**

**Lancisiana**

*Aspicis Effigiem  
Arce si qua mentem pingere adest  
Conatibus eloquio medica quantum eminet arte  
Dexteram tu poterit reddere scripta docent.*

RIVISTA MEDICO-SCIENTIFICA



## **Periodico trimestrale**

Anno Accademico 2017-2018: 303° dalla fondazione  
Vol. LXII – n. 2 – Aprile-Giugno 2018

### *Proprietà*

ACCADEMIA LANCISIANA  
Borgo Santo Spirito, 3  
00193 Roma  
lancisi@aruba.it  
www.accademia-lancisiana.it

© Accademia Lancisiana

### *Direttore Responsabile:*

Franco Salvati

### *Comitato Scientifico:*

Laura Gasbarrone, Pierluigi Antignani, Raoul Borioni, Giovanni Minardi

### *Segreteria di Redazione:*

Chiara Abruzzini e Valentina Carelli

### *Redazione*

Borgo Santo Spirito, 3  
00193 Roma  
Telefono 06.68978137 – Fax 06.6867828

**Autorizzazione Tribunale di ROMA n. 9191 del 7 maggio 1963**

*I diritti di traduzione, di memorizzazione elettronica,  
di riproduzione e di adattamento anche parziale,  
con qualsiasi mezzo, sono riservati per tutti i Paesi.*

Ai sensi della legge n. 675 (tutela dati personali) si garantisce la massima riservatezza dei dati personali forniti e la possibilità di richiederne gratuitamente la rettifica o la cancellazione, o di opporsi al trattamento dei dati che riguardano, scrivendo a: Accademia Lancisiana, Borgo Santo Spirito, 3 – 00193 Roma.

# INDICE

## ECM “Universo fegato”

Moderatori: Giuseppe Cerasari, Giuseppe Maria Ettore, Giovanni Gasbarrini

---

Prima giornata: “Steatosi epatica: approccio integrato”

**9 gennaio 2018**

Moderatore: Giuseppe Cerasari

*II-67*

## ECM “Universo fegato”

Moderatori: Giuseppe Cerasari, Giuseppe Maria Ettore, Giovanni Gasbarrini

---

Seconda giornata: “Epatocarcinoma: dall’alcoolizzazione al trapianto”

**16 gennaio 2018**

Moderatore: Giuseppe Maria Ettore

Lettura Magistrale: “Gestione dell’HCC nel pre-trapianto: ruolo della Diagnostica per Immagini”

*II-68*

*V. Schininà, M. Cristofaro, F. Di Stefano, N. Fusco, A. Petrone, E. Pianura, E. Busi Rizzi*

“Ruolo della Medicina Nucleare nell’epatocarcinoma”

*II-72*

*R. Sciuto*

“HCC su malattie virali: dalla diagnosi al trapianto”

*II-78*

*U. Visco Comandini*

“Hcc su epatopatie non virali: dalla diagnosi al trapianto”

*II-81*

*A. Pellicelli*

“La valutazione psicologica nell’ambito dei Trapianti”

*II-86*

*M. Rocco, A. Santi, G. Prinzi, E. Campagna, C. Melia*

“Trapianto epatico negli alcolisti”

*II-89*

*S. Polchi*

“Chirurgia: resezioni epatiche open”

*II-94*

*R. L. Meniconi*

- “La chirurgia laparoscopica epatica per HCC: ieri, oggi e domani” II-96  
*N. Guglielmo, M. Colasanti, A. Scotti, P. Lepiane, G. Vennarecci,  
 R. L. Meniconi, A. Campanelli, M. Maritti, M. Antonini, G. M. Ettore*
- “Il trapianto di fegato per epatocarcinoma” II-100  
*G. Vennarecci, N. Guglielmo, P. Lepiane, M. Colasanti, R. L. Meniconi,  
 A. Campanelli, M. Burocchi, A. Scotti, M. Antonini, G. M. Ettore*
- “Chirurgia nei Trapiantati” II-108  
*P. Lepiane*
- “Epatocarcinoma (HCC) e MELD” II-110  
*G. Fedeli, M. R. Starace*

## ECM “Universo fegato”

Moderatori: Giuseppe Cerasari, Giuseppe Maria Ettore, Giovanni Gasbarrini

---

Terza giornata: “Attualità nella Encefalopatia Epatica. **23 gennaio 2018**  
 Clinica, diagnosi, terapia”

Moderatore: Giovanni Gasbarrini

- “Il Microbiota Intestinale: un protagonista nell’asse Entero-Epatico” II-112  
*G. Gasbarrini, C. Mosoni, F. Bonvicini*
- “Il Microbiota Intestinale e le sue funzioni nel normale e nelle  
 Patologie Intestinali ed extra-Digestive” II-122  
*G. Ianaro*
- “Nuovi aspetti della Encefalopatia Epatica: influenza dei flussi  
 intracranici e della ipertensione” II-124  
*F. R. Ponziani*
- “I quadri di Encefalopatia correlati all’abuso di alcol” II-128  
*Gabriele A. Vassallo*
- “Caso Clinico: quale tipo di Encefalopatia?” II-132  
*C. Mosoni, G. Gasbarrini*
- “Treatment of Clostridium difficile infection: focus on faecal  
 microbiota transplantation” II-136  
*G. Cammarota, G. Ianaro*

**Conferenza**

**6 febbraio 2018**

---

Detergenza e Termalismo nella storia della Dermatovenereologia

*II-139*

*L. Valenzano*

**Conferenza**

**6 marzo 2018**

---

Dal Laboratorio alla Clinica: le nuove scienze bio-mediche  
tra etica, creatività e tecnologia

*II-147*

*F. Belli*



**ECM "Universo Fegato"**

**9 gennaio 2018**

**Moderatori: Giuseppe Cerasari, Giuseppe Maria Ettore, Giovanni Gasbarrini**

---

**Prima giornata: "Steatosi epatica: approccio integrato"\***

Moderatore: Giuseppe Cerasari

\*Testo non disponibile per mancata consegna da parte degli Autori

**Moderatori: Giuseppe Cerasari, Giuseppe Maria Ettore, Giovanni Gasbarrini**

---

**Seconda giornata: "Epatocarcinoma: dall'alcoolizzazione al trapianto"**

Moderatore: Giuseppe Maria Ettore

**Gestione dell'HCC nel pre-trapianto: ruolo della Diagnostica per Immagini**

**V. Schininà, M. Cristofaro, F. Di Stefano, N. Fusco, A. Petrone, E. Pianura, E. Busi Rizzi**

Nel management dell'HCC la Diagnostica per Immagini ha un ruolo cruciale per:

1. Individuare la comparsa di nodulo epatico
2. Caratterizzare il nodulo epatico
3. Quantificare le alterazioni epatiche
  - Dimensioni
  - Numero
  - Invasione vascolare
  - Metastasi
  - Ipertensione portale
4. Indirizzare il trattamento

Tutte le società scientifiche sono d'accordo nel monitorare le nuove lesioni nodulari epatiche come riportato nella tabella 1<sup>1</sup>. È pertanto fondamentale instaurare un programma di sorveglianza ecografico finalizzato alla diagnosi precoce, allo scopo cioè di identificare HCC con diametro < 2 cm, quando il rischio di invasione microvascolare e di lesioni satelliti è ancora molto basso.

Per questo scopo viene utilizzata l'ecografia che è l'indagine non invasiva di prima scelta ma operatore dipendente e vengono eseguiti controlli con tempi diversi in relazione alla patologia di base come di seguito riportato<sup>1, 2</sup>:

Ogni 3 mesi: dopo resezione o terapie ablative e noduli <1cm

- Ogni 6 mesi:
- 1) cirrosi Child-Pugh A e B
  - 2) cirrosi Child-Pugh C in attesa OLT
  - 3) non cirrotici HBV con epatite attiva o familiarità HCC
  - 4) non cirrotici con epatite cronica C e fibrosi F3

Ogni 12 mesi: tutte le altre epatopatie croniche.

Nell'identificazione delle lesioni epatiche l'ecografia però rispetto ad altre metodiche ha un ampio range di sensibilità che oscilla dal 21% al 72%<sup>3</sup> e raggiunge la specificità dell'83-96% con la somministrazione del mezzo di contrasto (mdc) endovena (ev).

Un ruolo di sicura accuratezza diagnostica è affidato a tomografia computerizzata (TC) e risonanza magnetica (RM) con mdc anche se nel 22% dei casi vi è discordanza tra le due metodiche<sup>4</sup>.

La RM con mdc ev rappresenta comunque l'indagine più affidabile e questo perché: non utilizza radiazioni ionizzanti, è più specifica della TC, è multiparametrica, non ha gli effetti allergici dovuti al mdc con Iodio della TC. Inoltre con l'uso del mdc epatospecifico consente di acquisire una fase in più rispetto alla TC, nella quale le lesioni neoplastiche appaiono ipointense.

Infatti le lesioni ipointense in fase epatospecifica soprattutto se > 1 cm, anche in assenza di comportamento post contrastografico dinamico tipico di HCC o di altre caratteristiche sospette, debbono essere considerate precancerose.

L'HCC si presenta spesso in fase venosa con una capsula/pseudocapsula che in RM si presenta ipointensa in T1 di base, ben evidente nelle fasi post contrastografiche venose per la persistente impregnazione. La capsula è composta da componenti fibrose e piccoli vasi che intrappolati nella fibrosi determinano il ring enhancement. La presenza di capsula peritumorale potrebbe essere una barriera per la diffusione del tumore<sup>5</sup>.

Secondo alcuni autori la percentuale di recidiva di HCC entro 5 aa è del 70% in coloro che hanno subito una resezione chirurgica e del 25% in coloro che hanno avuto il trapianto epatico<sup>6,7</sup>.

Il maggior fattore di rischio per la precoce recidiva di HCC è la presenza di invasione microvascolare che non può essere individuata tramite biopsia e se ne ha certezza solo mediante il pezzo operatorio, da qui l'importanza dei segni radiologici. Individuare l'invasione microvascolare è importante per scegliere il trattamento terapeutico migliore, ottimizzare le risorse verso coloro che hanno basso rischio di recidiva ed è clinicamente rilevante nel caso di criteri estesi per il trapianto<sup>8</sup>.

Recentemente alcuni autori hanno sostenuto che la nuova terapia antivirale ad azione diretta potrebbe accelerare la comparsa di de novo HCC e le recidive in pazienti con cirrosi con un tempo medio di latenza dalla fine della terapia di circa 3 mesi, inoltre l'HCC sviluppato dopo terapia può presentare un pattern aggressivo con segni di microinvasione vascolare anche se di dimensioni <2 cm. Questi autori suggeriscono pertanto un monitoraggio ecografico dei pazienti con cirrosi HCV relata alla fine della terapia e durante il primo mese nel tentativo di identificare la lesione prima che compaiano i segni di micro invasione vascolare.

Varie sono in letteratura le ipotesi per le quali questa nuova ed efficace terapia accelererebbe la comparsa di HCC: tra queste l'alterata regolazione della risposta antitumorale dopo il decremento della carica virale, la perturbazione dell'immunosorveglianza e infine la riduzione dell'infiammazione dopo l'eliminazione del virus che potrebbe favorire la progressione del tumore<sup>9,10</sup>.

Per contro secondo altri autori tale tendenza non troverebbe riscontro con la somministrazione della terapia antivirale diretta la quale in realtà riducendo la mortalità

conseguente al progressivo declino della funzionalità epatica, espanderebbe il tempo di esposizione al rischio di HCC.

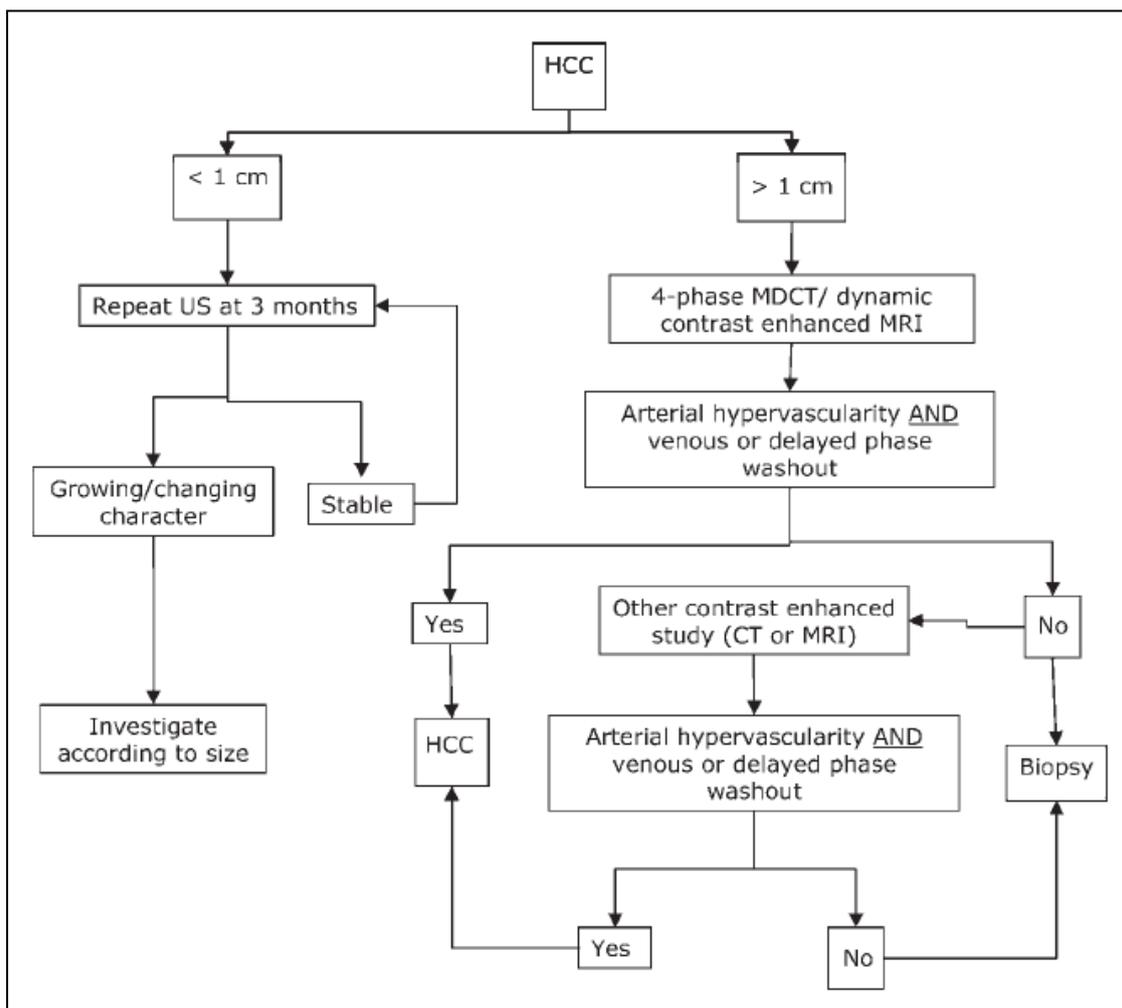
I segni di diagnostica per immagini più accreditati di invasione microvascolare sono legati alla presenza nell'HCC di margini non lisci, enhancement peritumorale, arteriole intratumorali e - assenza segno dell'alone. Questi segni sono accreditati di VPP 63 - 83 %, VPN 69 - 88 %, sensibilità 57,9 - 80,5 % e specificità 72 - 85,3 %, indipendentemente dalle dimensioni del tumore (<5 - >5 cm)<sup>5-12</sup>.

In conclusione la diagnostica per immagini svolge un ruolo cruciale nell'individuazione dell'HCC. La RM è la tecnica più sensibile nell'identificazione dell'HCC e la più specifica nella sua caratterizzazione e la presenza di nodulo ipointenso in fase epatospecifica può rappresentare il primo segno di eterotrasformazione ed è identificabile nel 90% dei casi di HCC.

La TC si conferma tecnica di elezione nella stadiazione dell'HCC.

Appare particolarmente importante individuare con accuratezza i segni di microinvasione vascolare per avviare il paziente al miglior trattamento terapeutico.

Tab.1: Monitoraggio delle lesioni nodulari epatiche



## BIBLIOGRAFIA

1. Bruix J, Sherman M. American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 2011; 53: 1020-2.
2. Schraml C, Kaufmann S, Rempp H, et al. Imaging of HCC-Current State of the Art. *Diagnostics (Basel)* 2015; 5: 513-45.
3. Zech CJ, Bartolozzi C, Bioulac-Sage P, et al. Consensus report of the Fifth International Forum for Liver MRI. *Am J Roentgenol* 2013; 201: 97-107.
4. Gomaa AI, Khan SA, Leen EL, et al. Diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1301-14.
5. Zhao H, Hua Y, Lu Z, et al. Prognostic value and preoperative predictors of microvascular invasion in solitary hepatocellular carcinoma  $\leq 5$  cm without macrovascular invasion. *Oncotarget* 2017; 8: 61203-14.
6. Bruix J, Gores GJ, Mazzaferro V. Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives. *Gut* 2014; 63: 844-55.
7. Llovet JM, Schwartz M, Mazzaferro V. Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 181-200.
8. Huang C, Zhu XD, Ji Y, et al. Microvascular invasion has limited clinical values in hepatocellular carcinoma patients at Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) stages 0 or B. *BMC Cancer* 2017; 17: 58.
9. Renzulli M, Buonfiglioli F, Conti F, et al. Imaging features of microvascular invasion in hepatocellular carcinoma developed after direct-acting antiviral therapy in HCV-related cirrhosis. *Eur Radiol* 2018; 28: 506-13.
10. Wörns MA, Galle PR, Zeuzem S et al. Drug Treatment for Chronic Hepatitis C Infection and Cancer Risk. *Dtsch Arztebl Int* 2017; 114: 597-602.
11. Cucchetti A, D'Amico G, Trevisani F et al. Effect of direct-acting antivirals on future occurrence of hepatocellular carcinoma in compensated cirrhotic patients. *Dig Liver Dis* 2017; pii: S1590-8658(17)31255-0.
12. Zheng J, Chakraborty J, Chapman WC et al. Preoperative Prediction of Microvascular Invasion in Hepatocellular Carcinoma Using Quantitative Image Analysis. *J Am Coll Surg* 2017; 225: 778-88.

Vincenzo Schininà, Massimo Cristofaro, Federica Di Stefano, Nicoletta Fusco, Ada Petrone, Elisa Pianura, Elisa Busi Rizzi

Diagnostica per Immagini, Istituto Nazionale delle Malattie Infettive IRCCS L. Spallanzani, Roma

Per la corrispondenza: [vincenzo.schinina@inmi.it](mailto:vincenzo.schinina@inmi.it)

# Ruolo della Medicina Nucleare nell'epatocarcinoma

**R. Sciuto**

## Introduzione

La Medicina Nucleare ha un ruolo importante nella gestione clinica dell'epatocarcinoma (HCC) sia in ambito diagnostico che terapeutico, rappresentando un modello ideale di applicazione teranostica nel contesto della medicina di precisione. La moderna medicina di precisione richiede infatti una ricerca continua verso una diagnosi più accurata e terapia più personalizzate. I radiofarmaci, in questo contesto diventano uno strumento essenziale, in quanto costituiscono, grazie al meccanismo di biodistribuzione molecolare, un sistema unico di tracciabilità della espressione di biomarker o di modelli biologici che caratterizzano la malattia tumorale e le sue variazioni fenotipiche nel tempo. Una stessa molecola radiomarcata può essere utilizzata sia per il riconoscimento iniziale di biomarkers che per guidare una Target Therapy o per monitorare la risposta.

Inoltre l'evoluzione tecnologica in Medicina Nucleare mediante PET/CT e SPET/CT, unitamente alla disponibilità di vari radiofarmaci innovativi permette una sempre più accurata caratterizzazione biologica della maggior parte delle neoplasie integrandosi perfettamente con lo studio e la validazione preclinica e clinica di sistemi biologici. Le terapie possono così essere selezionate direttamente sulla base dell'imaging che rivela l'espressione del biomarker e determina se un trattamento può essere efficace, eliminando trattamenti non necessari o non appropriati nel singolo caso e ottimizzando il piano terapeutico per singolo paziente in ogni fase della malattia.

Nel caso dell'HCC le applicazioni più importanti della Medicina Nucleare sono l'utilizzo della PET a scopo prognostico e la terapia radioembolizzante.

## Ruolo della PET nell'HCC

La PET è uno strumento diagnostico non invasivo ben collaudato per la stadiazione e il monitoraggio della chemioterapia o radioterapia di diverse neoplasie. Il tracciante più comunemente usato in oncologia è il  $^{18}\text{F}$ -fluorodesossiglucosio ( $^{18}\text{F}$ -FDG), che è un analogo del glucosio. Il  $^{18}\text{F}$ -FDG viene captato dalle cellule tumorali con lo stesso meccanismo del glucosio. Nel normale tessuto epatico, l'attività dell'enzima glucosio-6-fosfatasi, che converte il FDG-6-P a FDG è alto, mentre è molto basso nelle metastasi epatiche con conseguente aumento della captazione di FDG. Nell'HCC, al contrario, l'attività dell'enzima varia notevolmente: noduli di HCC ben differenziati hanno un'attività enzimatica che è paragonabile al normale tessuto epatico. Pertanto, i tumori di basso grado tendono ad avere una captazione di FDG simile al normale circostante tessuto epatico, portando a un basso valore di captazione. Al contrario, nelle forme scarsamente differenziate di HCC la captazione di FDG è alta.

Pertanto la PET con  $^{18}\text{F}$ -FDG non è attualmente raccomandata come strumento diagnostico di prima linea nel sospetto di HCC avendo solo una modesta sensibilità (inferiore al 50%) ma può essere utile per l'identificazione e il monitoraggio delle lesioni da HCC da moderate a scarsamente differenziate, nelle forme di HCC in stadio avanzato e nelle metastasi extraepatiche e fornire preziose informazioni prognostiche per la chirurgia, il trapianto e le cure palliative dei tumori epatici<sup>1, 2</sup>.

La PET con  $^{18}\text{F}$ -FDG ha inoltre un ruolo ampiamente comprovato in ambito prognostico. Infatti è stato recentemente dimostrato che l'intensità di captazione del  $^{18}\text{F}$ -FDG misurata tramite un parametro semiquantitativo di captazione (standard uptake value o SUV) correla con un comportamento biologico aggressivo e con un outcome sfavorevole<sup>3, 4</sup>. Una recente meta-analisi, analizzando i risultati di 22 studi in una popolazione globale di 1721 pazienti, ha evidenziato come un alto rapporto fra il SUV misurato nell'area tumorale e il SUV misurato nel fegato sano è associato a una diminuzione significativa della sopravvivenza globale (OS) e della sopravvivenza libera da malattia (PFS) con un Hazard ratio [HR] rispettivamente di 2.04; 95% CI 1.50-2.79; ( P = 0.000) e 7.17; 95% CI 3.58-14.36; P = 0.000)<sup>5</sup>.

Basandosi su queste considerazioni il ruolo prognostico della  $^{18}\text{F}$ -FDG PET è stato studiato anche nei pazienti con HCC candidati al trapianto. Numerosi studi hanno dimostrato che la  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET è molto utile per identificare i pazienti con HCC idonei al trapianto oltre i criteri standard, suggerendo che la  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET dovrebbe essere implementata nel processo decisionale pre-trapianto al fine di espandere in sicurezza i criteri di selezione dell'HCC e il pool di destinatari del fegato idonei. Negli ultimi anni, diversi gruppi di trapianti sono stati in grado di dimostrare che il  $^{18}\text{F}$ -FDG fornisce informazioni utili sulla vitalità del tumore metabolico e sull'outcome post-trapianto. La positività alla PET è stata dimostrata correlare con la presenza di caratteristiche istopatologiche sfavorevoli, come la invasione microvascolare e il rischio di recidiva tumorale.

Una recente analisi retrospettiva su 116 trapianti ha evidenziato che nel set di pazienti trapiantati in base a criteri up-to seven la recurrence free survival (RFS) era significativamente migliore nei casi PET-negativi (94.9%) rispetto a quelli PET-positivi (48.3%; p < 0.001). La positività della PET è stata identificata come l'unico predittore clinico indipendente di recidiva del tumore in pazienti oltre ai criteri up-to-seven (HR = 19.25; p < 0,001)<sup>6</sup>.

Nonostante la mancanza di studi clinici prospettici, sembra esserci sufficiente evidenza che la  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET possa identificare pazienti idonei a trapianto di fegato perché, pur presentando stadi avanzati del tumore, hanno un comportamento meno aggressivo. Seguendo rigorosamente gli standard stabiliti di assegnazione del fegato basato su criteri macromorfologici, questi pazienti sono attualmente esclusi dal trapianto e, quindi, da una grande opportunità di cura. Sulla base dei dati presentati in una recente review, è stato suggerito un algoritmo di selezione semplificato che combini le caratteristiche morfometriche con la  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET per migliorare i risultati del trapianto epatico sia nei pazienti che rientrano nei criteri standard sia in quelli che non vi rientrano<sup>7</sup>.

L'esperienza acquisita presso la Medicina Nucleare dell'Istituto Regina Elena su una casistica di 36 pazienti con HCC in stadio BCLC B e C in fase di valutazione per trattamento radioembolizzante conferma il valore prognostico della  $^{18}\text{F}$ -FDG PET. Infatti valutando la correlazione fra due parametri semiquantitativi SUV max e rapporto di captazione Tumore / Non tumore (T/NT) e la PFS in questi pazienti si è evidenziato una correlazione significativa con entrambi questi parametri HR SUV = 3.47 (CI95% 1.38-8.72, p = 0.008) ; HR T/NT = 4.12 (CI95% 1.56-10.83, p = 0.004). Applicando però un modello di analisi multivariata soltanto il parametro T/NT è stato confermato un parametro prognostico indipendente. Utilizzando un modello di ROC analysis sono stati evidenziati come cut-off ottimali valori di SUV max pari a 4.3 e di T/NT pari a 1.9.

Utilizzando questi cut-off la PFS a due anni era significativamente migliore nei pazienti con valori di SUV (Fig. 1) e di T/NT inferiori ai cut-off individuati (Fig. 2).

Sulla base dei dati disponibili e della esperienza personale, la  $^{18}\text{F}$ -FDG PET si pone quindi come metodica non invasiva di importanza fondamentale nella caratterizzazione biologica dell'epatocarcinoma e con importante ruolo prognostico applicabile nella selezione dei pazienti candidabili a trapianto epatico.

## **Ruolo della radioembolizzazione nell'HCC**

La radioembolizzazione epatica con microsfere di resina marcate con  $^{90}\text{Y}$  iniettate in arteria epatica ( $^{90}\text{Y}$ -RE) è un trattamento locoregionale che si è diffuso negli ultimi dieci anni e che si è dimostrato molto efficace in numerosi studi clinici nel trattamento dell'epatocarcinoma (HCC) in stadio intermedio e avanzato non suscettibile di trattamento chirurgico<sup>8,9</sup>. La  $^{90}\text{Y}$ -RE è ormai inserita nelle principali Linee Guida Internazionali (NCCN, ESMO) e Nazionali (Raccomandazioni Multisocietarie patologia epatobiliare Italiane) come trattamento sia di prima che di seconda linea in HCC non operabili stadio BCLC B e C o come trattamento neoadiuvante per l'intervento chirurgico o per il trapianto di fegato nell'ambito di protocolli di downstaging e bridging.

La radioembolizzazione epatica, conosciuta e definita in vari modi tra cui SIRT (selective internal radiotherapy), TARE (TransArterial RadioEmbolization) o terapia intra-arteriosa con radionuclidi, consiste nell'infusione di microsfere marcate con  $^{90}\text{Y}$  direttamente in arteria epatica in corso di angiografia.

Questa modalità di trattamento minimamente invasivo combina i vantaggi della terapia radiometabolica, grazie alle radiazioni beta erogate dall'  $^{90}\text{Y}$  e dell'effetto embolico determinato dal deposito di milioni di microsfere biodegradabili nella microvascolarizzazione neoplastica.

Il razionale della fissazione selettiva delle microsfere sul tumore deriva da aspetti anatomici e fisiologici del tessuto epatico. La tecnologia sfrutta infatti il fatto che il tessuto fegato sano porta oltre il 70% del suo sangue dalla vena porta, mentre i tumori epatici > 3 mm derivano il 90% della loro alimentazione ematica dall'arteria epatica. Posizionando quindi le microsfere marcate da  $^{90}\text{Y}$  in rami dell'arteria epatica, si può somministrare al tumore un'alta dose di radiazioni con un minimo danno al parenchima epatico sano<sup>10,11</sup>.

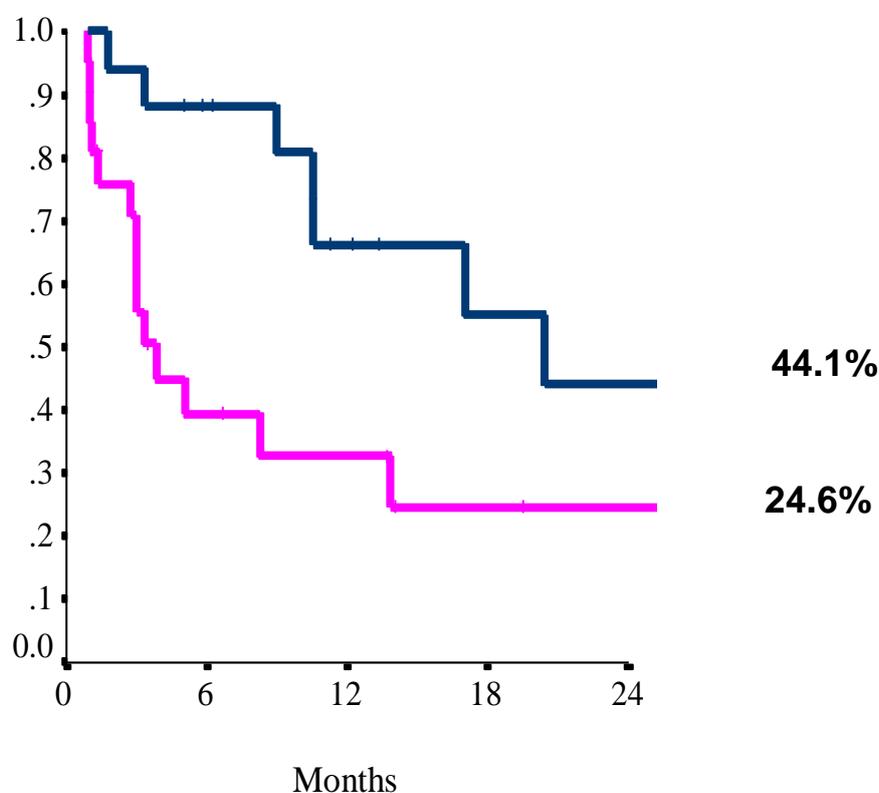
Il rateo di risposte varia dal 40% all'80% con una progression free epatica media nel range di 6 - 8 mesi ed un'ottima tollerabilità. La tossicità è prevalentemente epatica con un'incidenza che varia da 1% al 36.5% in funzione di diverse variabili (n° di trattamenti ricevuti, performance status, CHILD ecc.)

L'efficacia e la sicurezza di <sup>90</sup>Y-RE dipendono da numerosi fattori specifici per ogni paziente, tra cui la distribuzione del flusso arterioso epatico, la vascolarizzazione del tumore, l'integrità funzionale del parenchima epatico non implicato e le relative radio sensibilità di entrambi i tessuti. Un fattore non trascurabile è inoltre l'esperienza del Team dedicato e le facilities disponibili.

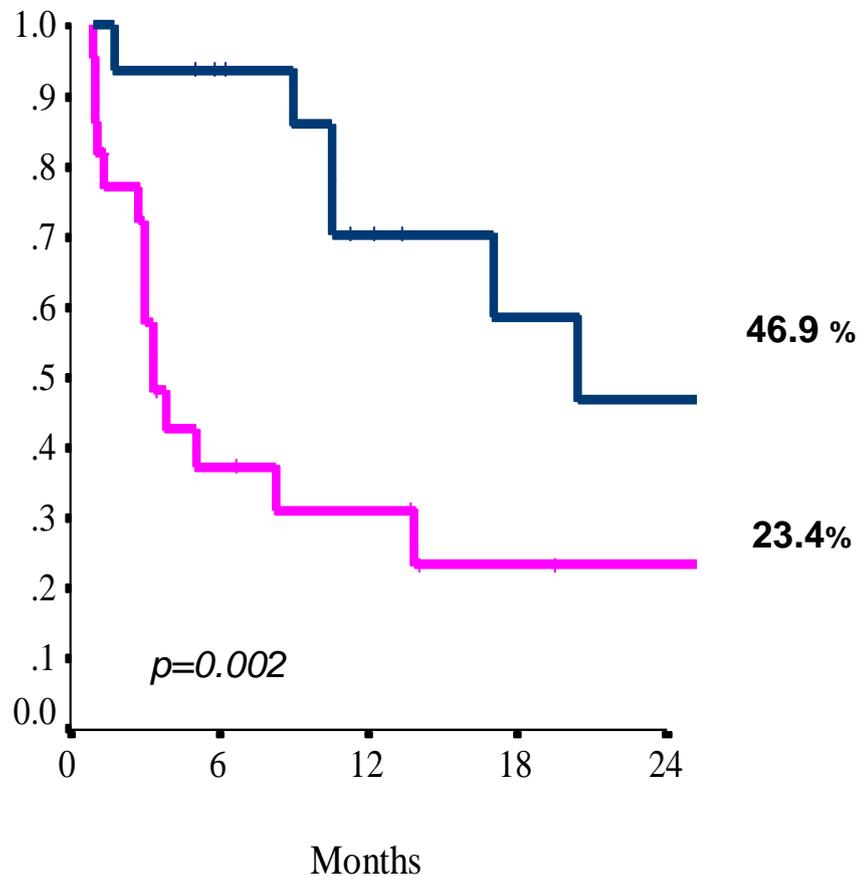
Infatti l'efficacia del trattamento è strettamente correlata alla precisione con cui viene definito il piano terapeutico sulla base delle diverse informazioni ricavate dalle varie tecniche di imaging: informazioni morfometriche (TAC e RMN), informazioni di aggressività biologica (PET); informazioni vascolari (angiografia), simulazione di biodistribuzione (scintigrafia con macro-aggregati marcati con <sup>99m</sup>Tc); biodistribuzione effettiva delle microsfere marcate con <sup>90</sup>Y.

L'integrazione delle diverse informazioni derivanti da un imaging multimodale ottenuto con tecnologia avanzata è cruciale per la definizione di un piano terapeutico personalizzato e per lo sviluppo di modelli predittivi di risposta.

**Fig. 1:** Curve di PFS in base al SUV max registrato alla PET basale pre-trattamento di radioembolizzazione epatica. Linea blu i pazienti che mostravano valori di SUV < 4.3; linea rosa i pazienti che mostravano valori di SUV max > 4.3



**Fig. 2:** Curve di PFS in base al T/NT registrato alla PET basale pre-trattamento di radioembolizzazione epatica. Linea blu i pazienti che mostravano valori di T/NT < 2; linea rosa i pazienti che mostravano valori di T/NT max > 2.



### BIBLIOGRAFIA

1. Trojan J, Schroeder O, Raedle J, et al. Fluorine-18 FDG positron emission tomography for imaging of hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 3314–9.
2. Kawamura E, Shiomi S, Kotani K, et al. Positioning of 18F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography imaging in the management algorithm of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2014; 29: 1722–7.
3. Cillo U, Giuliani T, Polacco M, Herrero Manley LM, Crivellari G, Vitale A. Prediction of hepatocellular carcinoma biological behavior in patient selection for liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2016 ; 22: 232–52.
4. Cho KJ, Choi NK, Shin MH, Chong AR. Clinical usefulness of FDG-PET in patients with hepatocellular carcinoma undergoing surgical resection. *Ann Hepatobiliary Pancreat Surg* 2017; 21: 194-8.

5. Sun DW, An L, Wei F, et al. Prognostic significance of parameters from pretreatment (18)F-FDG PET in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Abdom Radiol (NY)* 2016; 41: 33-41.
6. Kornberg A, Witt U, Schernhammer M, et al. Combining 18F-FDG positron emission tomography with Up-to-seven criteria for selecting suitable liver transplant patients with advanced hepatocellular. *Sci Rep* 2017; 7: 14176.
7. Kornberg A, Schernhammer M, Friess H. 18F-FDG-PET for Assessing Biological Viability and Prognosis in Liver Transplant Patients with Hepatocellular Carcinoma. *J Clin Transl Hepatol* 2017; 5: 224–34.
8. Mahnken AH. Current status of transarterial radioembolization. *World J Radiol* 2016; 8: 449-59. doi: 10.4329/wjr.v8.i5.449.
9. Salem R, Lewandowski RJ, Mulcahy MF, et al. Radioembolization for hepatocellular carcinoma using Yttrium-90 microspheres: a comprehensive report of long-term outcomes. *Gastroenterology* 2010; 138: 52-64.
10. Lewandowski RJ, Salem R. Yttrium-90 Radioembolization of Hepatocellular Carcinoma and Metastatic Disease to the Liver. *Seminars in Interventional Radiology* 2006; 23: 64–72.
11. Geschwind JFH, Salem R, Carr BI, et al. Yttrium-90 Microspheres for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *J Gastroenterology* 2004; 127: 194-205.

Dott.ssa Rosa Sciuto, UOSD Medicina Nucleare – IRCCS Istituto Nazionale Tumori Regina Elena, Roma

Per la corrispondenza: [rosa.sciuto@ifo.gov.it](mailto:rosa.sciuto@ifo.gov.it)

# HCC su malattie virali: dalla diagnosi al trapianto

## U. Visco Comandini

### Epidemiologia

L'epatocarcinoma (HCC) è un tumore maligno delle cellule parenchimali del fegato e nel mondo rappresenta la quinta causa di cancro nei maschi (7%) e la terza (8%) nella fascia di età che va dai 50 ai 69 anni.

La sua comparsa risulta estremamente rara su di un fegato sano, mentre il tasso di incidenza anno varia tra lo 0.2% ed il 0.5% nei soggetti affetti da epatite virale cronica, e sale fino al 2-3% in quelli che presentano una fibrosi elevata e cirrosi epatica conclamata.

I tassi di incidenza sono più elevati nel sesso maschile di 2-4 volte e nelle etnie Africane ed Asiatiche. La sopravvivenza a 5 anni dei malati con epatocarcinoma non trattato è solo del 7%. Il World Cancer Report del 2014 riporta una stima di 782.000 nuovi casi/anno, di cui più della metà insorti in Cina, un quarto circa in India, Estremo oriente ed Asia Centrale, e solo l'8% in Europa<sup>1</sup>.

### Eziologia

L'Eziologia dell'HCC è multifattoriale e molto variabile nelle diverse regioni del mondo. La maggiore causa di insorgenza è legata alle infezioni da virus epatotropi quali HBV e HDV, in particolare in Africa ed Asia, e HCV, in particolare in Giappone, Europa, Stati Uniti e Sud-est asiatico. Tra le cause non virali giocano un ruolo rilevante i fattori ambientali, principalmente le aflatossine prodotte da miceti che contaminano i cereali nei silos, le microcistine, tossine prodotte dalle alghe che contaminano l'acqua potabile ed il consumo di alcol. Fattori emergenti, nel mondo occidentale sono la steatosi e la steatoepatite.

### Infezione da HBV ed HCC

L'infezione da HBV rappresenta la causa di circa l'80% dei casi di HCC mondiali. Considerando che circa il 5% della popolazione mondiale è infettato da questo virus (350 milioni di persone), il rischio di sviluppare HCC in questi soggetti durante la vita è stimato del 10-25%<sup>1</sup>. Esistono infatti diverse evidenze epidemiologiche che confermano l'associazione tra HBV e HCC. Le aree del mondo con elevata mortalità per HCC hanno anche alta prevalenza di HBV. La cirrosi è strettamente correlata all'infezione cronica da HBV, ed almeno l'80% degli HCC insorgono su cirrosi. Diversi studi caso controllo, effettuati in tutti i continenti, hanno confermato che l'infezione cronica da HBV è da 5 a 65 volte più frequente nei soggetti con HCC. Inoltre diversi studi prospettici su portatori cronici di HBV hanno mostrato un rischio relativo molto elevato di sviluppare HCC rispetto ai non infetti, con una incidenza dello 0.5% anno contro lo 0.005%.

Nell'ambito poi delle persone con infezione cronica da HBV, la presenza sierica dell'antigene "e" aumenta il rischio di sviluppare HCC di quasi 100 volte<sup>2</sup>. Tale rischio è inoltre direttamente proporzionale al livello di viremia HBV<sup>3</sup>. Anche la coinfezione con virus HDV, che sovrainfetta esclusivamente i soggetti HBsAg positivi, rappresenta un maggior rischio di sviluppare HCC<sup>4</sup>.

Per fortuna, diverse strategie sanitarie si sono dimostrate in grado di ridurre il rischio di sviluppare HCC, in primis la vaccinazione per HBV<sup>5</sup>.

Le attuali terapie antivirali orali per HBV sono in grado di sopprimere la replicazione virale, e questa soppressione a sua volta riduce significativamente il rischio di sviluppare HCC<sup>6</sup>.

### Infezione da HCV ed HCC

L'infezione da HCV interessa l'1% della popolazione mondiale (71 milioni) ed è la principale causa di HCC nei paesi a bassa prevalenza di infezione da HBV<sup>7</sup>. L'OMS stima che 1.750.000 persone hanno contratto HCV nel 2015, e circa il 3% di loro svilupperà un HCC durante la vita<sup>1</sup>.

A differenza di HBV, una carica virale HCV elevata non è associata ad un maggior rischio di sviluppare HCC, e questo insorge quasi esclusivamente nei pazienti con cirrosi o fibrosi avanzata.

Dal 2015 in Italia abbiamo a disposizione i nuovi farmaci anti-HCV orali ad azione diretta (DAA). Esistono diverse associazioni farmacologiche possibili, adatte praticamente a tutte le tipologie di pazienti, che riescono ad ottenere dei tassi di guarigione virologica (Sustained Virological Response, o SVR) superiori al 96%. Questi farmaci sono dispensabili in Italia a tutti i pazienti da parte di Centri Autorizzati, dopo una domanda di elegibilità da richiedere all'AIFA ed al Servizio Sanitario Regionale.

A partire dal 2016 sono uscite diverse pubblicazioni che evidenziavano un aumento delle ricorrenze di HCC dopo aver ottenuto una guarigione virologica con i nuovi farmaci<sup>8</sup>, con caratteristiche radiologiche di aggressività e tendenza all'invasione microvascolare<sup>9</sup>. Questo dato non è stato confermato da altri studi e possiamo oggi solo concludere che l'argomento della recidiva di HCC (e non la nuova insorgenza) dopo terapia anti HCV è ancora dibattuto.

Emerge invece in modo chiaro, che la guarigione da HCV ottenuta con i nuovi farmaci riduce l'insorgenza di HCC in chi non l'ha mai riscontrato in precedenza<sup>10</sup>, anche se nei pazienti cirrotici il rischio di HCC, almeno nei primi anni, resta ancora elevato<sup>11</sup>.

### **BIBLIOGRAFIA**

1. World Cancer Report 2014. Edited by Stewart BW, Wild CW. ISBN (PDF) 978-92-832-0443-5.
2. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22707 men in Taiwan. Lancet 1981; 2: 1129-33.

3. Chen CJ, Yang HI, Su J, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006; 295: 65-73.
4. Fattovich G, Giustina G, Christensen E, et al. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep). *GUT* 2000; 46: 420-6.
5. Chang MH, You SL, Chen CJ, et al. Decreased incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B vaccines: a 20 year follow-up study. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 1348-55.
6. Di Marco V, Lo Iacono O, Cammà C, et al. The long-term course of chronic hepatitis B. *Hepatology* 2004; 40: 884-91.
7. Hutin JF. Epidemiology of HCV. Global hepatitis report 2017. WHO, EASL 2017.
8. Reig M, Mariño Z, Perelló C et al. Unexpected high rate of early tumor recurrence in patients with HCV-related HCC undergoing interferon-free therapy. *J Hepatol* 2016; 65: 719-26.
9. Renzulli M, Buonfiglioli F, Conti F et al. Imaging features of microvascular invasion in hepatocellular carcinoma developed after direct-acting antiviral therapy in HCV-related cirrhosis. *Eur Radiol* 2018; 28: 506-13.
10. ANRS collaborative HCC group. Direct acting antiviral therapy and tumor recurrence after liver transplantation for hepatitis C-associated hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2016; 65: 859-60.
11. Romano A, Capra F, Piovesan S, et al. Incidence and pattern of “De Novo” hepatocellular carcinoma in HCV patients treated with oral DAAs. Abstract 19. In: 67<sup>th</sup> Meeting of AASLD, 2016 Nov 11-15; Boston (MA). *Drugs Today* 2016; 52: 673-80.

Dott. Ubaldo Visco Comandini

Dirigente Medico U.O.C. Malattie Infettive – Epatologia, INMI “Lazzaro Spallanzani” IRCCS, Roma

Per la corrispondenza: [ubaldo.viscocomandini@inmi.it](mailto:ubaldo.viscocomandini@inmi.it)

# Hcc su epatopatie non virali: dalla diagnosi al trapianto

## A. Pellicelli

### Introduzione

Sebbene infezioni virali croniche come l'Epatite B (HBV) e l'epatite C siano importanti fattori di rischio per epatocarcinoma (HCC) in particolare quando sia anche presente una cirrosi epatica, altre cause di epatopatia non virale possono favorire l'insorgenza dell'HCC.

Cause non virali di Epatocarcinoma sono riportate in **Tabella1**.

CAUSE NON VIRALI FAVORENTI HCC	PATOGENESI
NAFLD/NASH	Stress Ossidativo, TLR attivazione iperespressione NF-kB Attivazione JNK
Diabete	Stress ossidativo
Obesità	Stress ossidativo
Alcool	Indiretto (cirrosi) e DNA metilazione
Emocromatosi	Indiretto (cirrosi) Stress ossidativo
Contraccettivi orali	Promotori oncogenesi
Malattia di Wilson	Indiretto (cirrosi)
Epatite Autoimmune	Indiretto (cirrosi)
Alfatossina B1	Mutazione codone 249
Alfa1 antitripsina	Indiretto (cirrosi)
Agenti Chimici (N nitroso, Thorotrast)	Inattivazione di geni oncosoppressori

**Tabella 1**

Mentre nel caso della malattia di Wilson, dell'abuso alcolico e dell'emocromatosi la comparsa di un HCC è dipendente dalla presenza della cirrosi epatica, nel caso della steatoepatite non alcolica (NASH), del danno da agenti chimici o da estrogeni più fattori diversi dalla cirrosi possono concorrere alla comparsa di un HCC. Pertanto è di estrema importanza prendere atto di come l'HCC possa insorgere anche su di un fegato non cirrotico.

La NASH è caratterizzata istologicamente dalla presenza di micro e macrovacuoli di grasso a livello del lobulo epatico associata ad infiltrato linfomonocitario non esclusivo della

zona 3 del lobulo epatico che testimonia una successiva fase infiammatoria. La fibrosi epatica è un processo progressivo ed è l'esito di un danno continuativo nel tempo.

L'HCC pertanto nel caso della NASH può insorgere su di un fegato affetto sia da una epatopatia cronica che da una cirrosi. Il tipico paziente con NASH non cirrotico che presenta un HCC è di età >60, di sesso maschile (M>F) e affetto da sindrome metabolica. La sindrome metabolica è alla base della NASH. La definizione della sindrome metabolica è riportata nella **Tabella 2**.

FATTORI DI RISCHIO	DEFINIZIONE LIVELLI
<b>OBESITA' ADDOMINALE</b>	CIRCONFERENZA VITA
-Uomini	>102 CM
-Donne	>88 cm
<b>TRIGLICERIDI</b>	>150 mg/dL
<b>HDL colesterolo</b>	<40
-Uomini	<50
-Donne	
<b>PRESSIONE ARTERIOSA</b>	≥130/85
<b>GLUCOSIO A DIGIUNO</b>	≥110

**Tabella 2**

È stato ampiamente dimostrato come i fattori di rischio per la sindrome metabolica siano singolarmente associati ad un maggiore rischio di sviluppare l'HCC.

## OBESITÀ

L'Obesità è associata a diversi tipi di neoplasia compreso l'HCC. Differenti studi clinici hanno messo in evidenza come vi sia un'alta incidenza di HCC in pazienti con BMI elevato<sup>1,2</sup>.

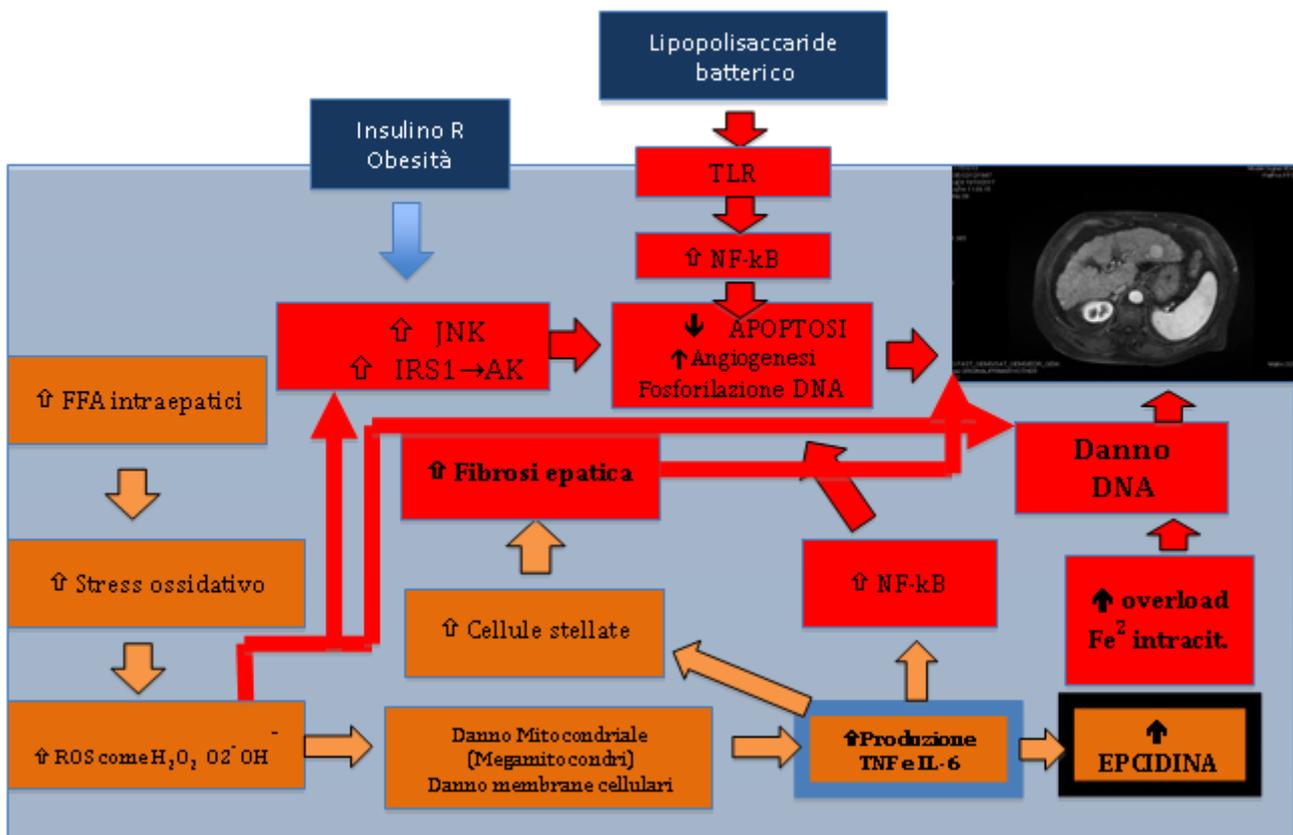
## DIABETE

Il diabete e l'insulino resistenza fanno parte della sindrome metabolica e sono entrambi fattori di rischio indipendenti per l'insorgenza di HCC. El Serag et al. hanno



TNFalfa ed IL-6. I ROS sono in grado di produrre una perossidazione dei lipidi di membrana con danno mitocondriale e cellulare. Di contro un aumento delle citochine e quindi lo stimolo infiammatorio che ne deriva è in grado di indurre un aumento della produzione di Epcidina. L'aumento della Epcidina è in grado di ridurre sia l'assorbimento intestinale del ferro inibendo la Ferroportina (trasportatore del ferro transmembrana) ma anche di ridurre l'efflusso del ferro dagli epatociti e dai macrofagi. Tale meccanismo aumenta in modo esponenziale la concentrazione del  $Fe^{2+}$  all'interno dell'epatocita. I valori aumentati sierici della Ferritina sono espressione del sovraccarico di ferro all'interno degli epatociti.

I meccanismi sopra riportati in maniera semplicistica sono alla base della patogenesi della NASH. Come questi meccanismi patogenetici si traducano in un aumentato rischio di sviluppare un HCC in assenza di cirrosi dell'organo sono illustrati nella **Figura 2**.



**Figura 2**

Si evidenzia dalla **figura 2** come lo stress ossidativo ed in particolare la produzione di un eccesso di ROS sia di per sé in grado di attivare una chinasi denominata JNK (c-jun aminoacid chinasi), un fattore nucleare implicato nella riduzione dell'apoptosi cellulare. Il JNK è attivato anche tramite in modo indiretto dall'insulino resistenza.

L'insulino resistenza e la conseguente iperinsulinemia è in grado mediante il recettore IRS1 di attivare una altra chinasi denominata Proteinchinasi B (AKT). Tale protein chinasi (AKT) è in grado di aumentare la produzione della Ciclina D1 e over-

esprimere il recettore per il PDGF-C (Platelet derived factor C). Questi ultimi due fattori favoriscono la replicazione cellulare e l'epatocarcinogenesi.

Lo stress ossidativo intracellulare inoltre determina una sovra produzione di citochine infiammatorie come il TNF alfa e IL-6. Tali citochine incrementano la produzione di Epcidina realizzando un sovraccarico del ferro intraepatocitario e quindi un danno del DNA mediato da eccesso di Ferro favorente mutazioni in senso neoplastico. Inoltre l'iperproduzione delle citochine è in grado di aumentare la produzione del fattore nucleare NF-kB. L'espressione anomala del fattore NF-kB (eccesso) è associato all'insorgenza di vari tipi di neoplasie. I lipopolisaccaridi batterici di derivazione intestinale favoriti dalla traslocazione e che pervengono al fegato tramite la vena porta attivano il Toll like receptor (TLR) in grado anch'esso di iperattivare il fattore nucleare NF-kB.

Tali eventi complessi possono nel paziente con NASH determinare una aumentato rischio di epatocarcinogenesi anche se fattori genetici tipici dell'individuo sono necessari per estrinsecare dal punto di vista fenotipico l'HCC.

## BIBLIOGRAFIA

1. Møller H, Mellemgard A, Lindvig K, Olsen JH. Obesity and cancer risk: a Danish record-linkage study. *Eur J Cancer* 1994;30A:344-50.
2. Oh SW, Yoon YS, Shin SA. Effects of excess weight on cancer incidences depending on cancer sites and histologic findings among men: Korea National Health Insurance Corporation Study. *J Clin Oncol* 2005;23(21):4742-54E1.
3. Serag HB, Hampel H, Javadi F. The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: a systematic review of epidemiologic evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 369-80.
4. Sorrentino P, D'Angelo S, Ferbo U, Micheli P, Bracigliano A, Vecchione R. Liver iron excess in patients with hepatocellular carcinoma developed on non-alcoholic steato-hepatitis. *J Hepatol* 2009; 50: 351-7.

Dott. Adriano Pellicelli

Direttore U.O.C. Malattie del Fegato. Dipartimento Interaziendale Trapianti.

Azienda Ospedaliera San Camillo-Forlanini Roma.

Per la corrispondenza: a.pellicelli@scf.gov.it

# La valutazione psicologica nell'ambito dei Trapianti

**M. Rocco, A. Santi, G. Prinzi, E. Campagna, C. Melia**

Negli ultimi anni per gli psicologi che si occupano di trapianti d'organo è risultata evidente la necessità di condividere le esperienze, i dubbi, i protocolli attuati con i colleghi che lavorano negli altri Centri Trapianti Italiani. Questo ha portato alla costituzione nel 2007 della S.I.Psi.T.O., Società scientifica che riunisce le professionalità di area psicologica e psichiatrica che operano nell'ambito dei trapianti.

S.I.Psi.T.O. raccoglie l'esperienza del Gruppo di Lavoro Italiano sugli Aspetti Psicologici e Psichiatrici dei trapianti d'Organo (GLIPsiTO). Costituitosi nel dicembre 1999, nel corso degli anni ha risposto all'esigenza di dare spazio ad un confronto tra gli operatori di area "PSY" dei maggiori Centri Trapianto del nostro Paese, in vista della definizione di una pratica psicologico-psichiatrica protocollata, condivisa e omogenea.

Tale attività ha portato alla elaborazione di Linee di Indirizzo sull'intervento psicologico in area trapianti, che sono state recepite dal Centro Nazionale Trapianti nel 2005 e inviate ai Centri di Trapianto per garantire secondo i criteri stabiliti delle modalità e degli standard assistenziali omogenei su tutto il territorio nazionale.

La S.I.Psi.T.O., nell'ambito dell'ultima Conferenza di Consenso tenutasi a Bergamo il 17 maggio 2017, ha presentato diverse raccomandazioni in ambito psicologico che sono state votate per aggiornare le linee guida. Ma tra le raccomandazioni approvate quella che maggiormente ci interessa oggi è che **“la valutazione psicologica è obbligatoria per i pazienti che effettuano un trapianto “salvavita” ovvero cuore- fegato- polmone”**.

Cerchiamo allora di capire meglio che cosa è la valutazione psicologica, a che cosa serve e perché deve essere eseguita in ambito trapiantologico.

La **valutazione psicologica** è una attenta analisi di tutte le caratteristiche della vita mentale di una persona. È un processo multidimensionale che si basa su fonti diverse: dai colloqui con il paziente all'osservazione del suo comportamento e dalle sue reazioni emotive.

Come in medicina esiste una anatomia e una fisiologia del corpo umano così, simbolicamente, nella nostra psiche esistono delle strutture psichiche che corrispondono all'anatomia e delle funzioni psichiche che corrispondono alla fisiologia.

Nella valutazione psicologica osserviamo oltre alle strutture psichiche anche le varie funzioni che svolgono.

La struttura di cui illustreremo alcuni elementi è quella dell'Io.

Alla persona vengono attribuite un insieme di **funzioni mentali di base**<sup>1</sup>:

- Capacità di regolazione, attenzione e apprendimento  
(Fattori costituzionali – memoria – attenzione – intelligenza globale)
- Capacità di relazioni e di intimità  
(Profondità)
- Qualità dell'esperienza interna  
(Livello di sicurezza e rispetto di sé)

- Capacità di formare rappresentazioni interne  
(Rappresentazioni del mondo e delle persone che abbiamo nella nostra testa)
- Capacità di differenziazione e integrazione  
(delle rappresentazioni interne)
- Capacità di autosservazione  
(Insight)
- Capacità di costruire o ricorrere ad ideali interni  
(Senso morale)

Alla struttura dell'Io vengono attribuite delle funzioni<sup>2</sup>:

- Esame di realtà
- Giudizio
- Senso di realtà
- Regolazione e controllo delle spinte, affetti e impulsi
- Relazione d'oggetto
- Processi di pensiero
- Regressione adattiva al servizio dell'Io
- Funzione difensiva
- Attività autonoma
- Attività sintetico-integrativa
- Padronanza –competenza

Abbiamo accennato alla funzione difensiva dell'Io che protegge da esperienze spiacevoli sia interne, come pulsioni e stati affettivi troppo intensi, che esterne, come realtà angoscianti. Quindi attraverso l'uso di un meccanismo di difesa l'Io si difende da un possibile squilibrio.

Un elenco dei meccanismi di difesa tratto da Fenichel<sup>3</sup>:

- SUBLIMAZIONE
- NEGAZIONE
- PROIEZIONE
- INTROIEZIONE
- REPRESSIONE
- FORMAZIONE REATTIVA
- ANNULLAMENTO
- ISOLAMENTO
- REGRESSIONE

Questi sono solo alcuni degli aspetti che vengono presi in considerazione nel corso di una valutazione psicologica che normalmente si articola nel corso di alcuni colloqui clinici e con l'ausilio di test psicodiagnostici.

Quindi, la valutazione psicologica non si pone l'obiettivo di formulare semplicemente una diagnosi psichiatrica, ma di arrivare ad una diagnosi dimensionale e funzionale della personalità comprensiva delle risorse positive e delle energie psichiche disponibili, per **comprendere il funzionamento globale** della persona, al fine di **migliorarne la qualità di vita** e mettere in atto le **modalità di intervento psicologico più efficaci**.

Quindi “perché fare la valutazione psicologica nel percorso trapiantologico”?

Sappiamo che il trapianto di fegato è un intervento chirurgico ad alto impatto emotivo, che necessita di una buona compliance e di un buon sostegno sociale e familiare.

Quindi solo attraverso una accurata valutazione psicologica possiamo capire qual è la struttura psichica di quel determinato paziente e possiamo, di conseguenza, decidere che intervento psicologico mettere in atto e con quali obiettivi.

## BIBLIOGRAFIA

1. Lingiardi V, Del Corno F. PDM. Manuale Diagnostico Psicodinamico. Milano: Raffaello Cortina, 2008.
2. Bellak L, Small L. Psicoterapia d'urgenza e psicoterapia breve. Roma: Il Pensiero Scientifico, 1983.
3. Fenichel O. Trattato di psicoanalisi delle nevrosi e delle psicosi. Roma: Astrolabio-Ubaldini, 1934.

Dott.ssa Manuela Rocco, Dott. Alberto Santi, Dott.ssa Giulia Prinzi, Dott.ssa Elena Campagna, Dott.ssa Chiara Melia.

UOSD Psicologia – Area Trapianti, Azienda Ospedaliera San Camillo-Forlanini, Roma

Per la corrispondenza: mrocco6@gmail.com

# Trapianto epatico negli alcolisti

## S. Polchi

L'ambulatorio alcologico segue dal 2003 pz affetti da dipendenza alcolica per percorsi di disintossicazione e riabilitazione.

Da alcuni anni segue anche pazienti alcolisti o supposti tali che vanno al trapianto epatico.

La storia insegna come siano state formulate diverse teorie e quindi intrapresi diversi approcci terapeutici in relazione ad un fenomeno così vasto quale l'alcolismo.

Il modello moralistico considerava il bere un vizio per cui l'alcolista era visto come un soggetto da rifiutare e non da curare. Intorno agli anni 50 si cominciò a sostenere la genesi multifattoriale del problema alcol. In tempi più recenti l'alcolismo è stato definito come una malattia cronica associata a un disturbo bio-psico-sociale capace di produrre nell'individuo una sofferenza multidimensionale

La diagnosi precisa del problema o della patologia alcol-correlata permette di intraprendere un trattamento che aiuti il paziente a smettere di bere e a modificare il proprio stile di vita. I pazienti affetti da cirrosi alcolica che necessitano per la loro grave condizione clinica di un trapianto di fegato, in tutti i centri trapianti vengono inviati a valutazione alcologica, rimane il grande problema relativo alla definizione di criteri biologici, psichici, sociali in grado di identificare fattori di rischio di recidiva alcolica nel post trapianto (considerando la cronicità della malattia alcolismo).

### Strategia del counselling

La valutazione alcologica dovrebbe avvenire nel corso di più colloqui, il così detto Counselling medico-alcologico. La valutazione del paziente inizia con una visita medica da cui l'alcologo trae molte informazioni sulla storia di alcolismo del paziente.

Si procede a mettere in atto negli incontri le tecniche del counselling medico-alcologico volte a creare empatia con un paziente difficile, il più delle volte in atteggiamento di difesa e non accettante il tipo di valutazione. Di fondamentale importanza nel procedere degli incontri è far emergere se da parte del candidato al trapianto è stata acquisita o se vi siano le potenzialità per cui possa essere acquisita la coscienza del proprio stato di dipendente da alcol o se la motivazione che supporta l'astinenza alcolica, ed eventualmente l'apparente nuovo stile di vita, sia dettato dall'evento malattia e dalla prospettiva di arrivare al trapianto di fegato.

La profonda e consapevole accettazione da parte del paziente della sua dipendenza da alcol è fondamentale per proseguire un percorso di riabilitazione alcologica. Quest'ultimo punto trova assolutamente d'accordo alcologi di differenti Centri e lo si ritiene un fondamentale predittivo di un più basso rischio di recidiva alcolica post trapianto.

Nel corso dei counselling alcologici si deve cercare di far nascere nel paziente una motivazione valida per non bere e per desiderare un cambiamento di vita spostando l'attenzione su altri progetti che non siano solo il trapianto di fegato.

La maggior parte dei Centri trapianto richiede un periodo di astinenza alcolica di 6 mesi come condizione primaria per inserire il paziente in lista d'attesa. Molti centri, soprattutto all'estero, richiedono un percorso di riabilitazione alcolica attiva, ciò permetterebbe di inserire questi pazienti nei gruppi motivazionali che vanno a potenziare la consapevolezza e la collaboratività. Nel percorso riabilitativo potrebbero essere monitorizzati frequentemente quegli indici biumorali ed esami specifici che permetterebbero di comprovare l'astinenza alcolica con ragionevole affidabilità.

Un controllo più pressante dei pazienti porterebbe anche ad un controllo degli abusi, cosa molto importante perché spesso nei pazienti che vengono seguiti per eventuale trapianto epatico vi sono storie di polidipendenze, soprattutto cocaina.

La positività alla cocaina dovrebbe essere motivo di esclusione dal trapianto epatico, non per un atteggiamento punitivo o moralistico, ma semplicemente perché la guarigione di un paziente cocainomane è estremamente difficoltosa. I pazienti con uso di cocaina presentano disturbi umorali e comportamentali che li rendono pazienti poco affidabili ed inoltre è poco pensabile che un uso di cocaina non riporti ad assunzione di alcol.

Un'analisi retrospettiva ha utilizzato come indici prognostici positivi, cioè associati al mantenimento dell'astinenza alcolica:

Accettazione consapevole del proprio alcolismo

Potenziamento della motivazione e autostima

Miglioramento delle relazioni sociali

Un lavoro

Una residenza stabile

Il non vivere solo

Possibile riconquista di una stabilità affettiva

### **Classificazione secondo GISH R.A. per predire il RECIDIVISMO**

Tre gruppi di rischio:

LIEVE

MODERATO

ALTO

**I GRUPPO** – Soggetti giudicati idonei al trapianto, con periodo di astinenza alcolica superiore a 6 mesi e con:

buon supporto sociale

assenza di patologie psichiatriche gravi

assenza di insuccessi in programmi di riabilitazione alcolica e che avevano firmato un contratto di accettazione del percorso riabilitativo

assenza di stupefacenti

**II GRUPPO** – Soggetti che avevano un periodo di astinenza e di verifica inferiore ai 6 mesi e con:

precedenti insuccessi in programmi riabilitativi

supporto sociale minimale

Questi pazienti in alcuni centri venivano momentaneamente sospesi dalla valutazione e seguiti con un programma serio riabilitativo; in caso di mantenimento dell'astinenza e di collaboratività, venivano successivamente inseriti in lista

**III GRUPPO** – Soggetti che avevano un periodo di astinenza e di verifica inferiore ai 6 mesi e con precedenti insuccessi in programmi riabilitativi

supporto sociale minimale

Questi pazienti in alcuni centri venivano momentaneamente sospesi dalla valutazione e seguiti con un programma serio riabilitativo; in caso di mantenimento dell'astinenza e di collaboratività, venivano successivamente inseriti in lista III GRUPPO – Soggetti ad alto rischio e pertanto esclusi dal trapianto. Questi pazienti dimostravano:

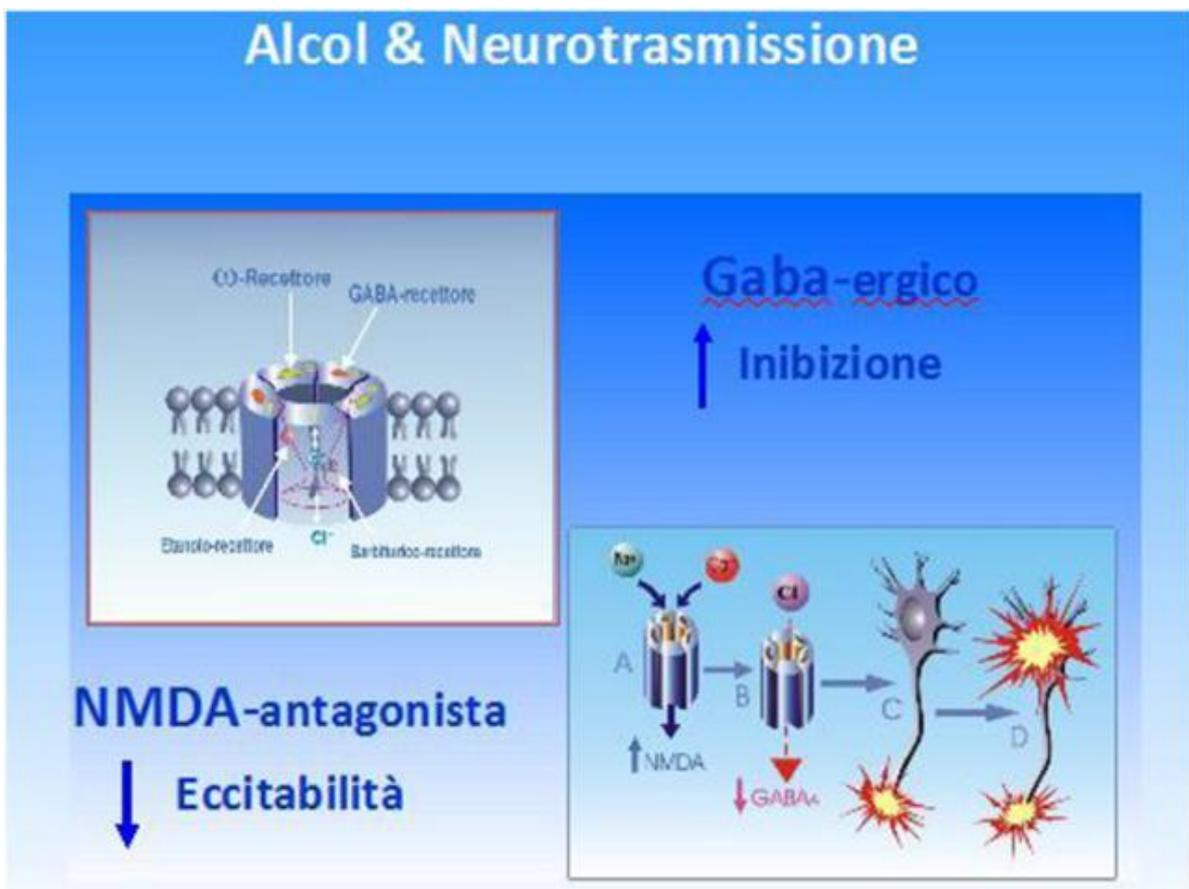
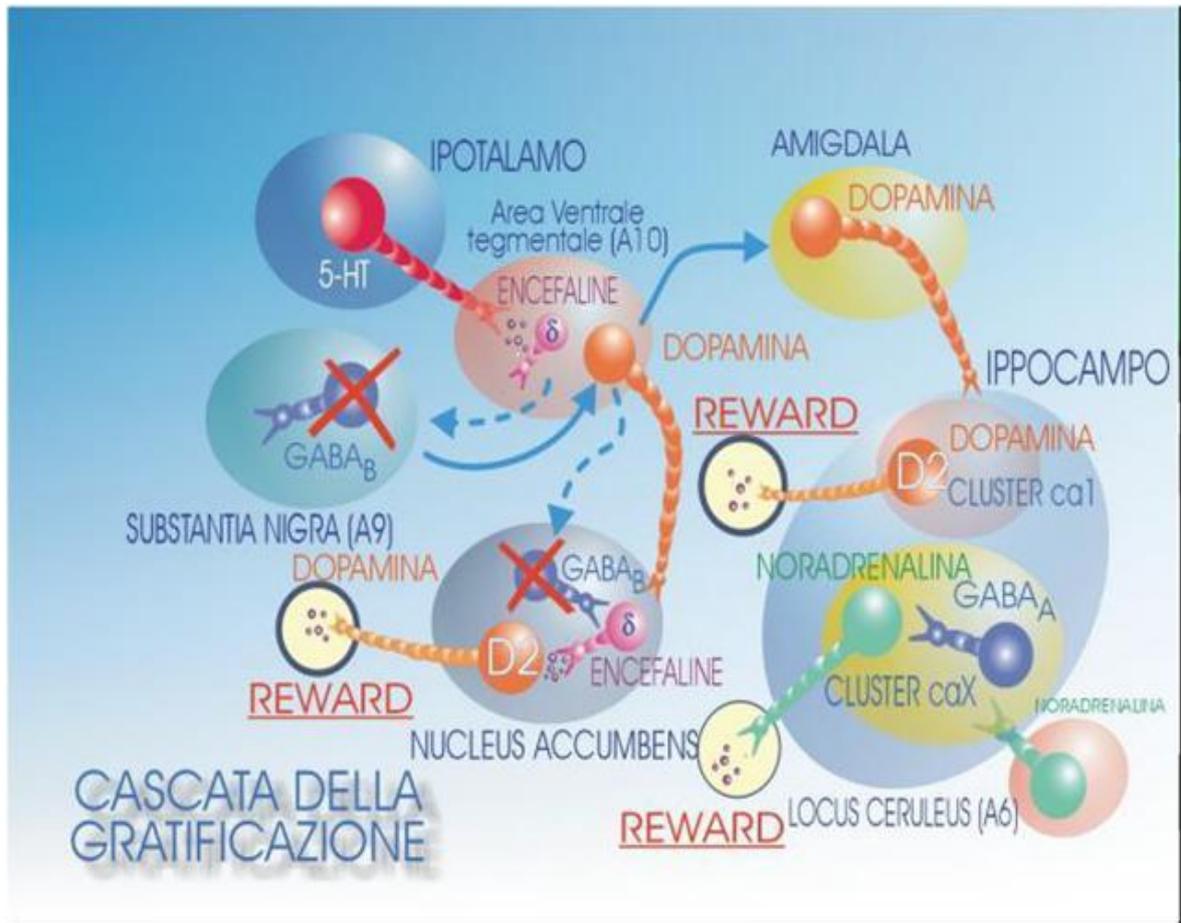
periodi di astinenza non documentabili o inferiori ad un mese, più ricadute durante il percorso e negazione di tali ricadute

rifiuto a firmare un contratto per un programma riabilitativo

assenza di supporto sociale

uso di sostanze stupefacenti

gravi malattie psichiatriche



Le figure mostrano l'effetto dell'alcol nel funzionamento neurotrasmettitoriale a livello cerebrale, ossia il sovvertimento che l'uso dell'alcol, assunto per molti anni, causa nella produzione dei mediatori chimici:

GABA

GLUTAMMATO

DOPAMINA

SEROTONINA

L'alterata produzione dei mediatori chimici comporta un'alterazione della chimica del cervello e tali modificazioni si traducono in una alterata percezione delle emozioni e del pensiero ad esse associato, induce profonde alterazioni sul versante comportamentale e solo una riabilitazione seria, che spesso preveda anche un apporto farmacologico e, ovviamente, l'astinenza alcolica prolungata, porta nel tempo ad un riassetto della situazione.

Queste modificazioni che avvengono per il protratto uso di alcol, semmai occorresse, servono a sottolineare quanto la dipendenza da alcol sia una malattia estremamente grave.

Dott.ssa Sandra Polchi

Ambulatorio e Day-hospital Malattie Alcolcorrelate, Azienda Ospedaliera San Camillo-Forlanini

Per la corrispondenza: [polchisandra@gmail.com](mailto:polchisandra@gmail.com)

# Chirurgia: resezioni epatiche open

## R. L. Meniconi

La chirurgia rappresenta attualmente il trattamento curativo di scelta dell'epatocarcinoma (HCC). Tuttavia, al momento della diagnosi solo il 20% dei pazienti risulta resecabile, con una sopravvivenza globale e libera da malattia a 5 anni del 56% e 23%, rispettivamente<sup>1</sup>. I fattori che influenzano la prognosi di questi pazienti sono correlati alle caratteristiche del paziente stesso (replicazione virale, funzionalità epatica), alla tipologia di tumore (dimensioni, numero, grading, invasione vascolare) e al tipo di chirurgia. La chirurgia dell'epatocarcinoma si fonda su tre principi fondamentali: 1) il margine chirurgico di resezione, che deve essere sempre maggiore di 2 cm come dimostrato da numerosi Autori in quanto garanzia di migliore sopravvivenza globale<sup>2</sup>; 2) le resezioni anatomiche, da preferire a quelle non anatomiche (o "wedge") in quanto garantiscono l'asportazione del peduncolo vascolare corrispondente e quindi una maggiore sopravvivenza libera da malattia<sup>3</sup>; 3) la scelta, quando possibile, di un approccio anteriore in caso di epatectomie maggiori, specialmente in caso di voluminosi HCC, senza pertanto mobilitare il fegato ed evitare manipolazioni del tumore stesso.

Dal punto di vista tecnico, la chirurgia aperta del fegato consta di alcuni passaggi fondamentali. L'incisione ideale per accedere alla regione dell'ipocondrio destro è rappresentata da quella sottocostale destra a J, come descritta da Makuuchi, ma vi sono altre incisioni quali la bisottocostale, la Rio-Branco o a Mercedes che vengono eseguite a seconda della morfologia del paziente e del tipo di intervento. I divaricatori sottocostali tipo Rochard o Takasago consentono una eccellente esposizione del campo operatorio attraverso le loro valve. La mobilitazione del fegato è il primo passaggio da eseguire, a meno che non si sia optato per l'approccio anteriore, in quanto permette di esteriorizzare il fegato e lussarlo dalla sua loggia. L'ecografia intraoperatoria eseguita con sonde lineari o convesse, è fondamentale in chirurgia epatica e permette di visualizzare piccoli noduli di HCC non visibili all'imaging preoperatorio e alla palpazione bimanuale. Essa consente inoltre di valutare il flusso arterioso, portale e sovra epatico costantemente. Una volta deciso il tipo di resezione, si passa alla preparazione del peduncolo epatico ed eventualmente alla manovra di Pringle che consente il clampaggio dell'intero peduncolo qualora si vogliano ridurre le perdite ematiche durante la transezione. In alcuni casi si preferisce eseguire un clampaggio selettivo dei peduncoli destro o sinistro, oppure nei casi più complessi si può optare per l'esclusione vascolare totale del fegato andando a clampare anche le vene sovra epatiche. La tecnica di transezione del fegato è variata molto negli anni. Alle origini della chirurgia epatica, il parenchima veniva dissezionato attraverso la digitoclasia oppure la Kellyclasia che permetteva di isolare i peduncoli vascolari minori dal parenchima epatico che poi venivano legati e sezionati selettivamente. Attualmente vi sono diversi dispositivi quali il dissettore a ultrasuoni, il CUSA e la pinza bipolare che consentono di eseguire transezioni più precise e meno emorragiche. I peduncoli maggiori (portali o sovra epatici) vengono invece sezionati attraverso suturatrici vascolari, oppure suture in polipropilene.

Per quanto riguarda la scelta sul tipo di approccio chirurgico tra quello tradizionale (open) e quello mini invasivo, attualmente non esistono studi randomizzati che possano comparare le due metodiche. Una recente metanalisi che ha incluso 15 studi retrospettivi per un totale di 1238 pazienti, ha comparato i risultati a breve e lungo termine dopo chirurgia open vs laparoscopica, individuando un vantaggio per la chirurgia laparoscopica in termini di morbilità postoperatoria e perdite ematiche<sup>4</sup>. Tuttavia, la maggior parte delle resezioni laparoscopiche incluse negli studi erano epatectomie minori tra cui lobectomie sinistre e resezioni atipiche per noduli sottoglissoniani. Tali limiti negli studi sono stati sottolineati anche in un'enorme survey francese che ha analizzato più di 44000 resezioni epatiche individuando nella tecnica laparoscopica il limite di essere spesso eseguita per noduli piccoli oppure come semplici biopsie, mentre le epatectomie maggiori venivano eseguite quasi sempre in open<sup>5</sup>.

Nella nostra casistica, dal 2007 al 2017 presso il Polo Ospedaliero Interaziendale Trapianti dell'ospedale San Camillo-Forlanini di Roma, sono state eseguite 364 resezioni epatiche per HCC di cui open 245 (67.4%) e laparoscopiche 119 (32.6%) confermando i risultati riportati in letteratura a favore della laparoscopia per quanto riguarda le resezioni minori, mentre la chirurgia epatica open è stata riservata prevalentemente alle epatectomie maggiori (emiepatectomie, trisettorietomie, ALPPS), associate o meno a gesti vascolari maggiori (trombectomie portali, sovra epatiche, patch vascolari).

## BIBLIOGRAFIA

1. Torzilli G, Belghiti J, Kokudo N, et al. A snapshot of the effective indications and results of surgery for hepatocellular carcinoma in tertiary referral centers: is it adherent to the EASL/AASLD recommendations?: an observational study of the HCC East-West study group. *Ann Surg* 2013; 257: 929-37.
2. Shi M, Guo RP, Lin XJ, et al. Partial hepatectomy with wide versus narrow resection margin for solitary hepatocellular carcinoma: a prospective randomized trial. *Ann Surg* 2007; 245: 36-43.
3. Hasegawa K, Kokudo N, Imamura H, et al. Prognostic impact of anatomic resection for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 2005; 242: 252-9.
4. Yin Z, Fan X, Ye H, Yin D, Wang J. Short- and long-term outcomes after laparoscopic and open hepatectomy for hepatocellular carcinoma: a global systematic review and meta-analysis. *Ann Surg Oncol* 2013; 20: 1203-15.
5. Farges O, Goutte N, Dokmak S, Bendersky N, Falissard B. ACHBT French Hepatectomy Study Group. How surgical technology translates into practice: the model of laparoscopic liver resections performed in France. *Ann Surg* 2014; 260: 916-21.

Dott. Roberto Luca Meniconi  
Polo Ospedaliero Interaziendale Trapianti  
UOC Chirurgia Generale e Trapianti d'Organo  
Azienda Ospedaliera San Camillo-Forlanini

Per la corrispondenza: roberto.meniconi@gmail.com

## La chirurgia laparoscopica epatica per HCC: ieri, oggi e domani

**N. Guglielmo, M. Colasanti, A. Scotti, P. Lepiane, G. Vennarecci, R. L. Meniconi, A. Campanelli, M. Maritti, M. Antonini, G. M. Ettore**

Gli albori della chirurgia epatica laparoscopica risalgono agli inizi degli anni '90 con le primissime pubblicazioni nel 1991 e nel 1992<sup>1, 2</sup>. *Gagner et al.*<sup>3</sup> pubblicò nel 1992 i primi 2 casi di epatectomia laparoscopica: si trattava di 2 pazienti che erano stati sottoposti a resezione atipica rispettivamente per iperplasia nodulare focale e per metastasi da primitivo coloretale. *Azagra et al.*<sup>4</sup> pubblicò nel 1993 il primo caso di epatectomia anatomica laparoscopica (si trattava di una lobectomia sinistra). *Cherqui et al.*<sup>5</sup> riportava nel 2000 la prima serie di 30 pazienti sottoposta a epatectomia laparoscopica in uno studio che aveva come endpoint primario dimostrare la fattibilità e riproducibilità dell'approccio mininvasivo laparoscopico evidenziando le giuste indicazioni e i limiti stessi della procedura. Negli anni successivi la chirurgia laparoscopica epatica ha avuto diversi ostacoli nella diffusione in virtù delle difficoltà tecniche e della lunga *learning curve* rispetto alla chirurgia epatica open tradizionale ma nello stesso tempo venivano evidenziati già nei primi lavori i vantaggi: le ridotte perdite ematiche, la minore morbidità postoperatoria, le degenze più corte e l'impatto cosmetico cicatriziale. Nel 2016 veniva pubblicata da *Ciria et al.*<sup>6</sup> un'ampia review di chirurgia epatica laparoscopica prendendo in considerazione circa 9000 casi di ben 463 lavori pubblicati (il 65% per tumori maligni e il 35% per tumori benigni). In questa metanalisi viene realizzata un confronto case-matched con 2900 casi di epatectomie con approccio tradizionale open, dimostrando che nei pazienti operati in laparoscopia si aveva meno mortalità e morbidità, meno perdite ematiche, meno trasfusioni e degenze più brevi. Dal suddetto lavoro emerge che la principale indicazione all'approccio laparoscopico è il carcinoma epatocellulare (HCC). Una recente metanalisi di *Komorowski et al.*<sup>7</sup> che include 16 studi descrittivi (927 epatectomie laparoscopiche e 1049 open) mostra gli stessi risultati evidenziando soprattutto le minori perdite ematiche e meno complicanze post-operatorie; l'unico aspetto negativo è un maggior rischio di resezioni con infiltrazione neoplastica dei margini. Nelle prime serie pubblicate emerge fin da subito che l'indicazione principale per l'approccio laparoscopico è l'HCC, soprattutto su epatopatia cronica. Nel 2008 si svolgeva a Louisville la prima consensus mondiale di chirurgia epatica laparoscopica (CEL) con la quale veniva sancita la fattibilità e sicurezza della CEL e venivano pubblicate le seguenti conclusioni:

- le giuste indicazioni sono i pazienti con lesioni uniche, con diametro fino a 5cm, con localizzazione nei segmenti periferici da S2 a S6;
- l'approccio laparoscopico è uno "standard practice" per la lobectomia sinistra (segmenti S2 e S3);
- le epatectomie maggiori possono essere affrontate con approccio laparoscopico ma solo in centri con esperienza maggiore in chirurgia laparoscopica;
- la conversione non va considerata come un fallimento ma come un'opzione tecnica

in caso di resezioni difficoltose, tempi troppo lunghi e soprattutto per la sicurezza del paziente;

- in caso di sanguinamento maggiore bisogna cercare di controllare la fonte del sanguinamento e non precipitarsi sulla conversione in chirurgia open<sup>8</sup>.

Nel 2014 si è svolta a Morioka la seconda consensus mondiale sotto forma di “jury conference”, ovvero con esperti di chirurgia epatica open e laparoscopica messi a confronto come in un processo giuridico. Le conclusioni sono state che, pur mancando un gran livello di “evidence” in letteratura, le epatectomie minori laparoscopiche sono uno *standard practice* mentre per quelle complesse l’approccio laparoscopico è ancora in una fase esplorativa<sup>9</sup>. Il ruolo della laparoscopia nel management dell’HCC è passato dal semplice staging alle epatectomie sempre più complesse con un interesse sempre più crescente per la sicurezza e fattibilità tecnica dell’approccio mininvasivo soprattutto nei pazienti con HCC su cirrosi. *Cheung et al.*<sup>10</sup> ha pubblicato uno dei primi studi comparativi confrontando un gruppo di 110 epatectomie laparoscopiche con un altro di 330 con approccio open per HCC su cirrosi, mediante un’analisi con propensity score. In questo studio, il gruppo laparoscopico presentava minori perdite ematiche, tempi chirurgici più brevi e degenze più corte. La *overall survival* era di 136 mesi versus i 120 mesi del gruppo open. La *disease-free survival* era di 66 mesi nel gruppo laparoscopico e di 52 mesi in quello open. Questo studio dimostra in maniera chiara che l’approccio laparoscopico per HCC su cirrosi è una procedura sicura con dei benefici maggiori anche sul piano oncologico. Un’aspetto molto interessante della laparoscopia è la potenzialità di estendere l’indicazione chirurgica nei pazienti con cirrosi associata ad ipertensione portale in virtù di alcune peculiarità tecniche: ridotto apporto di liquidi, preservazione dei circoli collaterali in caso di ipertensione portale evitando le ampie cicatrici della chirurgia open, minore manipolazione del parenchima epatico e minore stress respiratorio. Un altro aspetto vantaggioso dell’approccio laparoscopico è di facilitare le ri-resezioni o il trapianto in caso di recidiva per le ridotte aderenze. *Yoon et al.*<sup>11</sup> ha pubblicato recentemente un lavoro in cui confronta un gruppo di epatectomie destre laparoscopiche con uno di epatectomie open, eseguite all’Asian Medical Center a Seoul: non ci sono differenze statisticamente significative tra l’approccio laparoscopico e quello open per quanto riguarda il tasso di complicanze, l’*overall survival* e la *disease-free survival*. Come già detto in precedenza, l’approccio laparoscopico riduce la formazione di aderenze post-operatorie. Lo studio di *Laurent et al.*<sup>12</sup> mostra bene quest’aspetto confrontando 2 gruppi di trapianto di fegato dopo resezione epatica open e laparoscopica. Il trapianto dopo epatectomia laparoscopica presenta minori perdite ematiche, meno trasfusioni e tempi operatori più corti, pertanto per un paziente con HCC su cirrosi che rientra in un’ottica trapiantologica di “salvage” in caso di recidiva è preferibile l’approccio laparoscopico. Il lavoro di *Kanazawa et al.*<sup>13</sup> confrontando l’approccio open e quello laparoscopico per HCC su cirrosi, dimostra che l’incidenza di ascite post-operatoria è più alta (71% vs 11%) per i pazienti sottoposti a laparotomia. La laparoscopia permette la preservazione degli shunt porto-sistemici e in alcuni casi del legamento rotondo nonché minori perdite ematiche e meno trasfusioni per le seguenti ragioni: lo pneumoperitoneo che “comprime” i vasi sanguinanti, la magnificazione delle immagini laparoscopiche che permette un’emostasi più accurata e lo strumentario sempre più tecnologico<sup>13, 14</sup>. Le perdite ematiche sono un fattore prognostico

importante in tutte le serie pubblicate<sup>15</sup>. *Zhong et al.*<sup>16</sup> ha realizzato una metanalisi di tutti i trials randomizzati controllati che comparano epatectomie laparoscopiche e con approccio open per HCC (10 studi con un totale di 2275 pazienti): il 90% dei pazienti ha un nodulo singolo e nell'84% dei casi viene eseguita un'epatectomia minore. Questa metanalisi dimostra che i pazienti nel gruppo laparoscopico hanno una sopravvivenza a 5 anni maggiore del gruppo con chirurgia open ma un medesimo tasso di recidiva. Questa conclusione riflette probabilmente la minore manipolazione tissutale e quindi una minore potenziale disseminazione ematogena delle cellule maligne utilizzando un approccio "no touch" anteriore tipico della laparoscopia. Oggi la chirurgia laparoscopica per l'HCC su cirrosi ha un ruolo importante sia per la sicurezza che per i risultati oncologici dimostrati dalla letteratura degli ultimi anni. Le epatectomie minori con approccio laparoscopico sono ormai realizzate dalla maggior parte dei centri mentre quelle maggiori sono in progressivo aumento ma riservate solo a gruppi con esperienza maggiore in chirurgia laparoscopica ed epatica. La chirurgia laparoscopica non è solo uno strumento in più per il chirurgo epatico ma presuppone l'acquisizione di skills peculiari, necessitando di un'appropriata curva di apprendimento e lo svilupparsi di società internazionali che garantiscano degli standard formativi.

#### **BIBLIOGRAFIA:**

1. Reich H, McGlynn F, DeCaprio J, Budin R. Laparoscopic excision of benign liver lesions. *Obstet Gynecol* 1991; 78: 956-8.
2. Katkhouda N, Fabiani P, Benizri E, Mouiel J. Laser resection of a liver hydatid cyst under videolaparoscopy. *Br J Surg* 1992; 79: 560-1.
3. Gagner M, Rheault M, Dubuc J. Laparoscopic partial hepatectomy for liver tumor. *Surg Endosc* 1992; 6: 97-8.
4. Azagra JS, Goergen M, Gilbert E, Jacobs D. Laparoscopic anatomical (hepatic) left lateral segmentectomy-technical aspects. *Surg Endosc* 1996; 10: 758-61.
5. Cherqui D, Husson E, Hammoud R, et al. Laparoscopic liver resections: a feasibility study in 30 patients. *Ann Surg* 2000; 232: 753-62.
6. Ciria R, Cherqui D, Geller D, Briceno J, Wakabayashi G. Comparative short term benefits of laparoscopic liver resection: 9000 cases and climbing. *Ann Surg* 2016; 263: 761-77.
7. Komorowski AL, Mituś JW, Wysocki WM, Bała MM. Laparoscopic and open liver resection - a literature review with meta-analysis. *Arch Med Sci* 2017; 13: 525-32. doi: 10.5114/aoms.2015.55545. Epub 2016 Dec 13.
8. Buell JF, Cherqui D, Geller DA, et al. World Consensus Conference on Laparoscopic Surgery. The international position on laparoscopic liver surgery: The Louisville Statement, 2008. *Ann Surg* 2009; 250: 825-30.
9. Wakabayashi G, Cherqui D, Geller DA, et al. Recommendations for laparoscopic liver resection: a report from the second international consensus conference held in Morioka. *Ann Surg* 2015; 261: 619-29.
10. Cheung TT, Dai WC, Tsang SH, et al. Pure Laparoscopic Hepatectomy Versus Open Hepatectomy for Hepatocellular Carcinoma in 110 Patients With Liver Cirrhosis: a

Propensity Analysis at a Single Center. *Ann Surg* 2016; 264: 612-20.

11. Yoon Y-I, Kim K-H, Kang S-H, et al. Pure laparoscopic versus open right hepatectomy for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: a propensity score matched analysis. *Ann Surg* 2017; 265: 856-63.
12. Laurent A, Tayar C, Andréoletti M, Lauzet JY, Merle JC, Cherqui D. Laparoscopic liver resection facilitates salvage liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2009; 16: 310-4.
13. Kanazawa A, Tsukamoto T, Shimizu S, et al. Impact of laparoscopic liver resection for hepatocellular carcinoma with F4-liver cirrhosis. *Surg Endosc* 2013; 27: 2592-7.
14. Nguyen KT, Marsh JW, Tsung A, et al. Comparative benefits of laparoscopic vs open hepatic resection: a critical appraisal. *Arch Surg* 2011; 146: 348.
15. Jarnagin WR, Gonen M, Fong Y, et al. Improvement in perioperative outcome after hepatic resection: analysis of 1,803 consecutive cases over the past decade. *Ann Surg* 2002; 236: 397.
16. Zhong JH, Peng NF, Gu JH, Zheng MH, Li LQ. Is laparoscopic hepatectomy superior to open hepatectomy for hepatocellular carcinoma? *World J Hepatol* 2017; 9: 167-70.

Nicola Guglielmo, Marco Colasanti, Andrea Scotti, Pasquale Lepiane, Giovanni Vennarecci, Roberto Luca Meniconi, Alessandra Campanelli, Micaela Maritti, Mario Antonini, Giuseppe Maria Ettore

Chirurgia Generale e trapianti d'organo

Polo Ospedaliero Interaziendale Trapianti

Azienda Ospedaliera San Camillo- Forlanini, Roma

Per la corrispondenza: [GmEttore@scamilloforlanini.rm.it](mailto:GmEttore@scamilloforlanini.rm.it)

## **Il trapianto di fegato per epatocarcinoma**

**G. Vennarecci, N. Guglielmo, P. Lepiane, M. Colasanti, R. L. Meniconi, A. Campanelli, M. Burocchi, A. Scotti, M. Antonini\*, G. M. Ettore**

Il trapianto di fegato è attualmente considerato in pazienti selezionati il miglior trattamento con potenzialità curative per il carcinoma epatocellulare non resecabile (HCC) e contemporaneamente per la sua condizione predisponente: la cirrosi epatica. Le prime esperienze di trapianto per HCC in giro per il mondo mostrarono risultati decisamente deludenti. Le prime serie di Starzl, negli Stati Uniti, mostrarono sopravvivenze non superiori al 40%, con elevati tassi di recidiva<sup>1,2</sup>. Calne, in Inghilterra, ottenne solo un 6% di sopravvivenza oltre i 5 anni nei 50 pazienti sottoposti a trapianto per HCC<sup>3</sup>. In Germania, allo stesso modo, Pichlmayr presentò il 20.4% di sopravvivenza attuariale a 5 anni su 52 pazienti trapiantati per epatoma<sup>4</sup>. Nel primo report dello European Liver Transplant Registry (ELTR) l'HCC mostrò i peggiori risultati tra le varie cause di trapianto, con il 30.8% di sopravvivenza a 2 anni<sup>5</sup>. Tali dati spinsero molti centri a non trapiantare più i pazienti neoplastici, o a selezionarli in base all'estensione della loro patologia. Tuttavia, non esisteva un criterio di selezione per l'HCC universalmente riconosciuto. Nel 1996, Mazzaferro et al. proposero i cosiddetti criteri di Milano (Milan Criteria, MC), basando la selezione dei pazienti da trapiantare in base ai parametri morfologici del tumore (lesione singola di dimensioni  $\leq 5$  cm o fino a 3 lesioni ciascuna con dimensioni  $\leq 3$  cm, in assenza di metastasi a distanza e di infiltrazione macrovascolare)<sup>6</sup>. In questo studio condotto su 48 pazienti affetti da HCC non resecabili su cirrosi sottoposti a trapianto epatico da donatore cadavere, venne evidenziata una mortalità totale del 17%. La recidiva tumorale si osservò solo nell'8%. I 35 pazienti che rientravano entro i MC mostrarono sopravvivenze globali e libere da malattia a quattro anni rispettivamente dell'85% e del 92%, mentre i 13 pazienti oltre i criteri (27% del totale), mostrarono sopravvivenze rispettivamente del 50% e del 59%. Grazie a questi risultati incoraggianti, numerosi centri incominciarono ad adottare i MC per selezionare i candidati al trapianto, ed oggi essi, dopo essere stati validati in tutto il mondo, vengono utilizzati da numerosissimi centri trapiantologici, fornendo tassi di recidiva di HCC che si attestano attorno al 10% e sopravvivenze globali a cinque anni del 70-90%, valori sovrapponibili a quelli per trapianto di fegato per patologie non tumorali<sup>7, 8</sup>. Oggi, inoltre, i MC sono stati adottati come strumento per determinare la priorità al trapianto nel sistema di allocazione di organi statunitense, l'UNOS (Union Network Organ Sharing)<sup>9</sup>, ed inseriti all'interno di sistemi di stadiazione o logaritmi terapeutici come il TNM (Tumor Node Metastasis)<sup>10</sup> ed il Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)<sup>11</sup>. Tuttavia, nonostante i risultati eccellenti, i MC presentano un importante problema di base: essi determinano una selezione molto severa dei pazienti, escludendo molti di essi dalla possibilità di usufruire di una terapia potenzialmente curativa come il trapianto epatico. In un'analisi effettuata nel triennio 1996-1998 sulla popolazione statunitense, El-Serag et al. mostrarono come solo il 12% dei pazienti con HCC venissero trattati con intento curativo (trapianto o resezione), con sopravvivenze a tre anni superiori al 50%, mentre tutti gli altri erano destinati a trattamenti palliativi o a nessun trattamento, con sopravvivenze a tre anni inferiori al

10%<sup>12</sup>. Oltre al suddetto rischio di non essere ritenuti idonei per il trapianto, anche i pazienti inseriti in lista d'attesa nei centri che adottano la politica di allocazione d'organo basata sui MC corrono il rischio di non poter usufruire di questa terapia: questo perché, durante l'attesa per il trapianto, il tumore può aumentare di dimensioni e superare i criteri, e quindi il paziente viene escluso dalla lista (drop-out). Nel 1999 Llovet et al., del gruppo di Barcellona, evidenziarono questo problema<sup>13</sup>: nel loro lavoro essi compararono 77 pazienti sottoposti a resezione epatica con 87 pazienti trapiantati tra il 1989 ed il 1997, mostrando sopravvivenze intention-to-treat a 5 anni rispettivamente del 51% e del 69%. Valutando tuttavia i fattori di rischio nei pazienti resecati, gli autori osservarono come pazienti ben selezionati per la chirurgia resettiva (bassi livelli di bilirubina, assenza di ipertensione portale) presentassero una sopravvivenza a 5 anni del 74%. Valutando poi le sopravvivenze a 2 anni dei due gruppi di trapiantati nel periodo 1989-1995 (no MC, 0 drop-out in lista) e nel periodo 1996-1997 (utilizzo dei MC, 8 drop-out in lista), le sopravvivenze risultarono essere l'84% ed il 54% rispettivamente. Perciò, paradossalmente, i pazienti trapiantati con i MC mostrarono sopravvivenze intent-to-treat peggiori dei pazienti resecati! Il motivo di questo apparente paradosso è chiaramente da ricercare nella carenza di organi da trapiantare e quindi nei lunghi tempi di attesa che i pazienti hanno in lista, fatto che determina il loro drop-out. Per risolvere tale problema, si percorrono oggi tre diverse strategie:

1. l'utilizzo di donatori viventi o di donatori cadaveri non-standard (ad esempio a cuore non battente, non-heart beating donors);
2. l'uso di terapie che facciano da ponte al trapianto (bridge therapy), come la resezione epatica o terapie locoregionali come la termoablazione e la chemioembolizzazione (tali terapie, quando il paziente supera i MC, vengono dette di downstaging, perché riportano il paziente entro i criteri di trapiantabilità);
3. allargamento dei criteri con utilizzo di politiche meno conservative. Il razionale di quest'ultimo punto è da ricercare nel fatto che gli MC siano stati concepiti per prevedere buoni risultati nei pazienti che soddisfano i criteri stessi, ma non per predire prognosi sfavorevoli nei pazienti che li superano<sup>14</sup>. In altri termini, esiste una quota di pazienti fuori dai MC che potrebbe comunque ottenere risultati accettabili in termini di sopravvivenza dopo trapianto di fegato tramite l'utilizzo di politiche più liberali.

I primi a proporre criteri allargati furono Yao et al., dell'Università della California, San Francisco (UCSF)<sup>15</sup>. I criteri UCSF si basano anch'essi unicamente su parametri morfologici (lesione singola  $\leq 6.5$  cm, o al massimo 3 noduli con il maggiore  $\leq 4.5$  cm ed il diametro tumorale totale  $\leq 8$  cm, in assenza di metastasi e di invasione macrovascolare). Nel loro lavoro, Yao e coll. analizzarono retrospettivamente 70 pazienti sottoposti a trapianto di fegato per HCC in un periodo di 12 anni. I pazienti che rispettavano i nuovi criteri (60 pazienti, 86%) presentarono sopravvivenze globali ad 1 e 5 anni pari al 90% ed al 75.2%, rispettivamente, mentre i pazienti fuori dai criteri UCSF (10 pazienti, 14%) mostrarono il 50% di sopravvivenza ad 1 anno. Tali risultati suggerirono come un modesto incremento dei criteri non determinasse un importante decremento nelle sopravvivenze. Tuttavia, varie critiche vennero mosse a questo lavoro, prima delle quali fu quella di aver valutato lo staging tumorale in base ai dati radiologici e non a quelli anatomo-patologici: nel 2007 Yao pubblicò un nuovo lavoro nel quale confermava la

validità del suo modello anche se applicato a parametri pre-operatori<sup>16</sup>. Tuttavia, i criteri UCSF non vengono ancora riconosciuti universalmente da tutti i centri: in vari studi europei e statunitensi sono emersi alcuni limiti relativi a questi criteri<sup>17, 18</sup>. Ad esempio, in un ampio studio multicentrico condotto su 479 pazienti candidati a trapianto epatico per HCC in Francia dal 1985 al 1998, Decaens e coll. valutarono il ruolo dei criteri UCSF sia in base alle caratteristiche tumorali pre-trapianto che a quelle anatomo-patologiche post-trapianto. In base ai risultati ottenuti, i pazienti oltre i MC ma entro i criteri UCSF (cioè quelli che effettivamente hanno beneficiato dell'allargamento dei criteri) risultarono essere solo il 10% in base ai dati radiologici, e l'8% in accordo con l'analisi dei fegati prelevati. Inoltre, valutando le sopravvivenze "intent-to-treat" in base ai dati pre-trapianto, i pazienti oltre i MC ma entro i criteri UCSF presentarono sopravvivenze a 5 anni pari al  $45.6 \pm 7.8\%$ , contro il  $60.1 \pm 3.0\%$  dei pazienti entro i MC, evidenziando quindi sopravvivenze inferiori al 50%<sup>19</sup>. Partendo dai risultati ancora decisamente discordanti relativi ai criteri UCSF, vari Autori hanno proposto nuovi criteri, con l'intento di aumentare l'effettiva quota di pazienti trapiantabili. Molti di questi criteri si basano unicamente su una combinazione di dati morfologici, come i MC ed i criteri UCSF (dimensione tumorale, numero di lesioni, volume tumorale). Riportiamo di seguito un elenco di questi criteri:

- 2001: Clinica Universitaria de Navarra (CUN) = 1 HCC  $\leq 6$  cm o  $\leq 3$  HCC  $\leq 5$  cm<sup>20</sup>
- 2005: Sapienza Università di Roma = diametro tumorale totale  $\leq 8$  cm senza restrizione di numero<sup>21</sup>
- 2007: Dallas = 1 HCC  $\leq 6$  cm o  $\leq 4$  HCC  $\leq 5$  cm<sup>22</sup>
- 2007: Tokyo =  $\leq 5$  HCC  $\leq 5$  cm<sup>23</sup>
- 2007: Kyoto =  $\leq 10$  HCC  $\leq 5$  cm<sup>24, 25</sup>
- 2008: Asan =  $\leq 6$  HCC  $\leq 5$  cm<sup>26</sup>
- 2008: Valencia =  $\leq 3$  HCC  $\leq 5$  cm con diametro tumorale totale  $\leq 10$  cm<sup>27</sup>
- 2008: TTV = volume tumorale totale  $\leq 115$  cm<sup>3</sup><sup>28</sup>.

Oltre agli aspetti morfologici, anche gli elementi di tipo bio-molecolare, come l'invasione vascolare, l'alfafetoproteina (AFP) ed il grading tumorale, ricoprono un ruolo molto importante come indici di aggressività biologica dell'HCC e come parametri predittivi di recidiva tumorale e di selezione dei pazienti per il trapianto. L'invasione microvascolare in molti studi è risultata essere il più importante fattore di rischio per recidiva tumorale<sup>29, 30</sup>, con un rischio di ricomparsa di HCC dopo trapianto aumentato fino a 15 volte<sup>31</sup>. Inoltre, nonostante dopo l'introduzione dei MC il numero e le dimensioni dei tumori si siano ridotti, i tassi di invasione microvascolare sono rimasti stabili (21-24%)<sup>32</sup>. Già nel 2000 Marsh, del gruppo di Pittsburgh, propose di modificare il TNM dell'HCC non solo in funzione delle dimensioni e della distribuzione uni- o bilobare, ma anche della presenza di invasione microvascolare<sup>33</sup>. Purtroppo il limite di questo parametro è che esso viene diagnosticato solo all'esame anatomopatologico e che quindi non può essere determinato preoperatoriamente; di conseguenza, il suo impiego nei criteri di selezione al trapianto non è praticabile. L'AFP rappresenta uno dei migliori parametri predittivi di invasione microvascolare utilizzati e ne rappresenta dunque un surrogato<sup>34</sup>. In un ampio studio condotto comparando 15.906 pazienti trapiantati per HCC tra il 1997 ed il 2002 con 19.404 pazienti sottoposti a trapianto tra il 2002 ed il 2007 negli Stati Uniti (dati UNOS), l'AFP

serica > 455 ng/mL risultò essere, assieme al MELD score > 20, il più importante carattere predittivo di mortalità dopo trapianto, con un rischio aumentato di 2.15 volte di decesso nei pazienti con questi valori<sup>35</sup>. L'AFP si correla inoltre con il grado di aggressività dell'HCC<sup>36</sup>, ed il dosaggio dell'AFP mRNA è stato proposto come marker di disseminazione ematica dell'HCC, mostrando una correlazione evidente con l'invasione vascolare e con la scarsa differenziazione tumorale<sup>37, 38</sup>. Per questo motivo, alcuni autori hanno incorporato l'AFP all'interno dei loro criteri di selezione:

- 2007: Seul = HCC ≤ 5 cm senza restrizione di numero ed AFP ≤ 400 ng/ml<sup>39</sup>
- 2009: TTV/AFP = TTV ≤ 115 cm<sup>3</sup> ed AFP ≤ 400 ng/ml<sup>40</sup>.

In quest'ultimo lavoro, Toso e coll. analizzarono i dati UNOS riguardanti 6478 pazienti sottoposti a LT negli Stati Uniti dal 2002 al 2008, mostrando come solo il volume tumorale totale (Total Tumoral Volume, TTV) e l'AFP fossero risultati variabili indipendenti e predittivi di sopravvivenza per il paziente, con un rischio 2 volte aumentato di mortalità per i pazienti fuori dai criteri proposti. Il grading tumorale rappresenta un altro parametro di estrema importanza: Kirimlioglu et al.<sup>41</sup> evidenziarono come, nonostante le piccole dimensioni, fino al 15% degli HCC sviluppasse aggressività biologica dopo LT. Klintmalm, analizzando 422 pazienti sottoposti a LT, mostrò come, in tumori ben differenziati, le dimensioni tumorali e l'invasione vascolare non peggiorassero le sopravvivenze o i tassi di recidiva, mentre il grading risultò essere l'unico fattore prognostico ad emergere dall'analisi statistica<sup>42</sup>. Nel 2004, Cillo e coll., del gruppo di Padova, presentarono uno studio nel quale venne messo in evidenza che parametri come il TNM ed i MC fossero meno abili nel predire la sopravvivenza nei pazienti ed i tassi di recidiva dell'HCC rispetto al grading tumorale: 33 pazienti con HCC diagnosticati preoperatoriamente con grading bene o moderatamente differenziato vennero comparati con 15 pazienti con diagnosi incidentale di HCC. Nonostante il 38% dei pazienti fosse fuori dai MC, a 5 anni la sopravvivenza globale fu del 75%, mentre quella libera malattia fu del 92%, con sole 3 recidive (6%)<sup>43</sup>. Nel 2008, Zheng e coll., del gruppo di Hangzhou, proposero un nuovo modello, nel quale combinarono aspetti morfologici, AFP e grading: diametro tumorale totale ≤ 8 cm o, se > 8 cm, grading bene o moderatamente differenziato + AFP ≤ 400 ng/ml<sup>44</sup>. Con una felice intuizione, Mazzaferro rappresentò questa pluralità di criteri proposti nei vari centri in giro per il mondo come una sorta di metropolitana globale, il costo del cui biglietto (il Metroticket, appunto) aumentava con l'allontanarsi dai MC. In altre parole, più lungo il viaggio dai limiti convenzionali (ad esempio, più grandi il numero o le dimensioni di un tumore), e maggiore il prezzo da pagare del biglietto (e cioè riduzione delle sopravvivenze dei pazienti)<sup>14</sup>. Questo spinse verso la creazione di un progetto che, avviatosi nel 2006, portò alla raccolta multicentrica di dati riguardanti pazienti fuori dai MC: il risultato di questo lavoro fu la nascita dei criteri up-to-seven. Nel 2009 Mazzaferro e coll. presentarono i risultati di questo studio riguardante 1112 pazienti trapiantati in 36 centri per HCC oltre i MC. La sopravvivenza dell'intera popolazione a 5 anni fu del 53.6%; tuttavia, in una popolazione selezionata di 283 pazienti che superavano i MC ma che però, in assenza di invasione microvascolare, rispettassero i cosiddetti criteri up-to-seven (HCC con sette come somma del diametro del tumore più grande + il numero delle lesioni), la sopravvivenza globale a 5 anni risultò pari al 71.2%, risultato sovrapponibile a quello ottenibile con pazienti entro i MC<sup>45</sup>. Tuttavia occorre ricordare che il parametro prognostico fondamentale dell'invasione microvascolare, può essere ottenuto solo a trapianto

effettuato e quindi i cosiddetti criteria up-to-seven sembrano essere piuttosto illusivi e ben poco pratici<sup>46</sup>. Nel 2009 Toso et al. proposero un lavoro nel quale analizzarono una popolazione tratta dall'Alberta Cancer Registry di 270 pazienti con la diagnosi di HCC, valutando come i 12 criteri allargati analizzati nel loro studio incidessero effettivamente nell'aumentare il volume dei pazienti da trapiantare per HCC. La percentuale di incremento dei potenziali pazienti trapiantabili mostrò un ampio range (12-63% rispetto ai MC). Alcuni criteri, come quelli di Seul (12%), quelli di Valencia (16%), quelli TTV/AFP (20%) o quelli UCSF (20%), risultarono molto conservativi.

I criteri Hangzhou risultarono essere quelli meno conservativi (63%)<sup>47</sup>. Tuttavia, come riportato dallo stesso Toso nel suo lavoro, l'utilizzo di criteri allargati necessita che le sopravvivenze ed i tassi di recidiva dei pazienti che li rispettano siano accettabili (almeno superiori al 50% a 5 anni) e stabili. Ad oggi, tuttavia, nessuno dei criteri allargati proposti è stato unanimemente riconosciuto come valido sostituto dei MC.

## BIBLIOGRAFIA

1. Iwatsuki S, Gordon RD, Shaw BW Jr, Starzl T. Role of liver transplantation in cancer therapy. *Ann Surg* 1985; 202: 401-7.
2. Yokoyama I, Todo S, Iwatsuki S, Starzl TE. Liver transplantation in the treatment of primary liver cancer. *Hepatology* 1990; 37: 188-93.
3. O'Grady JG, Polson RJ, Rolles K, et al. Liver transplantation for malignant disease: results in 93 consecutive patients. *Ann Surg* 1988; 207: 373-9.
4. Ringe B, Wittekind C, Bechstein WO, et al. The role of liver transplantation in hepatobiliary malignancy: a retrospective analysis of 95 patients with particular regard to tumor stage and recurrence. *Ann Surg* 1989; 209: 88-98.
5. Bismuth H, Castaing D, Ericzon BG, et al. Hepatic transplantation in Europe. First Report of the European Liver Transplant Registry. *Lancet* 1987; 19: 674-6.
6. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 693-9.
7. Jonas S, Bechstein WO, Steinmuller T, et al. Vascular invasion and histopathologic grading determine outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Hepatology* 2001; 33: 1080-6.
8. Rossi M, Merli M, Lai Q, et al. Outcome after liver transplantation in patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Transplantation Proceedings* 2007; 39: 1895-7.
9. Yoo HY, Patt CH, Geschwind JF, et al. The outcome of liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the United States between 1988 and 2001: 5-year survival has improved significantly with time. *J Clin Oncol* 2003; 2: 4265-7.
10. Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al. AJCC. Cancer staging handbook. TNM liver classification. American Joint Committee (AJCC) on cancer staging manual. 6th edn. New York: Springer-Verlag, 2002, pp. 131-44.
11. Llovet JM, Brú C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 329-38.

12. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States. *Gastroenterology* 2004; 127: S27-34.
13. Llovet JM, Fuster J, Bruix J. Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation. *Hepatology* 1999; 30: 1434-40.
14. Mazzaferro V. Results of liver transplantation: with or without Milan criteria? *Liver Transpl* 2007; 13: S44-S47.
15. Yao FY, Ferrell L, Bass NM, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. *Hepatology* 2001; 33: 1394-1403.
16. Yao FY, Xiao L, Bass NM, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: validation of the UCSF-expanded criteria based on preoperative imaging. *Am J Transplant* 2007; 7: 2587-96.
17. Leung JY, Zhu AX, Gordon FD, et al. Liver transplantation outcomes for early-stage hepatocellular carcinoma: results of a multicenter study. *Liver Transpl* 2004; 10: 1343-54.
18. Fernández JA, Robles R, Marin C, et al. Can we expand the indications for liver transplantation among hepatocellular carcinoma patients with increased tumor size? *Transplant Proc* 2003; 35: 1818-20.
19. Decaens T, Roudot-Thoraval F, Hadni-Bresson S, et al. Impact of UCSF criteria according to pre- and post-OLT tumor features: analysis of 479 patients listed for HCC with a short waiting time. *Liver Transpl* 2006; 12: 1761-9.
20. Herrero JI, Sangro B, Quiroga J, et al. Influence of tumor characteristics on the outcome of liver transplantation among patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2001; 7: 631-6.
21. Merli M, Nicolini G, Gentili G, et al. Predictive factors of outcome after liver transplantation in patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Transpl Proc* 2005; 37: 2535-40.
22. Onaca N, Davis GL, Goldstein RM, et al. Expanded criteria for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma: a report from the International Registry of Hepatic Tumors in Liver Transplantation. *Liver Transpl* 2007; 13: 391-9.
23. Sugawara Y, Tamura S, Makuuchi M. Living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Tokyo University series. *Dig Dis* 2007; 25: 310-2.
24. Takada Y, Ito T, Ueda M, et al. Living donor liver transplantation for patients with HCC exceeding the Milan criteria: a proposal of expanded criteria. *Dig Dis* 2007; 25: 299-302.
25. Ito T, Takada Y, Ueda M, et al. Expansion of selection criteria for patients with hepatocellular carcinoma in living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2007; 13: 1637-44.
26. Lee SG, Hwang S, Moon DB, et al. Expanded indication criteria of living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma at one large-volume center. *Liver Transpl* 2008; 14: 935-45.
27. Silva M, Moya A, Berenguer M, et al. Expanded criteria for liver transplantation in patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2008; 14: 1449-60.

28. Toso C, Trotter J, Wei A, et al. Total tumor volume predicts risk of recurrence following liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2008; 14: 1107-15.
29. Zou WL, Zang YJ, Chen XG. Risk factors for fatal recurrence of hepatocellular carcinoma and their role in selecting candidates for liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008; 7: 145-51.
30. Lai Q, Merli M, Ginanni Corradini G, et al. Predictive factors of recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation: a multivariate analysis. *Transpl Proc* 2009; 41: 1306-9.
31. Durand F, Belghiti J. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: should we push the limits? *Liver Transpl* 2003; 9: 697-9.
32. Onaca N, Davis GL, Jennings LW, et al. Improved results of transplantation for hepatocellular carcinoma: a report from the international registry of hepatic tumors in liver transplantation. *Liver Transpl* 2009; 15: 574-80.
33. Marsh JW, Dvorchik I, Bonham CA, Iwatsuki S. Is the pathologic TNM staging system for patients with hepatoma predictive of outcome? *Cancer* 2000; 88: 538-43.
34. Shah SA, Tan JC, McGilvray ID, et al. Accuracy of staging as a predictor for recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Transplantation* 2006; 81: 1633-9.
35. Ioannou GN, Perkins JD, and Carithers RL. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: impact of the MELD allocation system and predictors of survival. *Gastroenterology* 2008; 134: 1342-51.
36. Yang SH, Suh KS, Lee HW, et al. A revised scoring system utilizing serum alphafetoprotein levels to expand candidates for living donor transplantation in hepatocellular carcinoma. *Surgery* 2007; 141: 598-609.
37. Cillo U, Navaglia F, Vitale A, et al. Clinical significance of alpha-fetoprotein mRNA in blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta* 2004; 347: 129-38.
38. Cillo U, Vitale A, Navaglia F, et al. Role of blood AFP mRNA and tumor grade in the preoperative prognostic evaluation of patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6920-5.
39. Kwon CH, Kim DJ, Han YS, et al. HCC in living donor liver transplantation: can we expand the Milan criteria? *Dig Dis* 2007; 25: 313-9.
40. Toso C, Asthana S, Bigam DL, et al. Reassessing selection criteria prior to liver transplantation for hepatocellular carcinoma utilizing the scientific registry of transplant recipients database. *Hepatology* 2009; 49: 832-8.
41. Kirimlioglu H, Dvorchick I, Ruppert K, et al. Hepatocellular carcinomas in native livers from patients with orthotopic liver transplantation: biologic and therapeutic implications. *Hepatology* 2001; 34: 502-10.
42. Klintmalm GB. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a registry report of the impact of the tumor characteristics on outcome. *Ann Surg* 1998; 228: 479-90.
43. Cillo U, Vitale A, Bassanello M et al. Liver transplantation for the treatment of moderately or well-differentiated hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 2004; 239: 150-9.

44. Zheng SS, Xu X, Wu J, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Hangzhou experiences. *Transplantation* 2008; 85: 1726-32.
45. Mazzaferro V, Llovet JM, Miceli R, et al. Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis. *Lancet Oncol* 2009; 10: 35-43.
46. Sotiropoulos GC, Molmenti EP, Lang H. Milan criteria, up-to-seven criteria, and the illusion of a rescue package for patients with liver cancer. *Lancet Oncol* 2009; 10: 207-8.
47. Toso C, Kneteman NM, Shapiro AMJ, Bigam DL. The estimated number of patients with hepatocellular carcinoma selected for liver transplantation using expanded selection criteria. *Transpl Int* 2009; 22: 869-75.

Giovanni Vennarecci, Nicola Guglielmo, Pasquale Lepiane, Marco Colasanti, Roberto Luca Meniconi, Alessandra Campanelli, Mirco Burocchi, Andrea Scotti, Giuseppe Maria Ettore.

Chirurgia Generale e Trapianti d'Organo

Polo Ospedaliero Interaziendale Trapianti

Azienda Ospedaliera San Camillo- Forlanini, Roma

Mario Antonini\*, Terapia Intensiva, Ospedale Lazzaro Spallanzani, POIT, Roma.

Per la corrispondenza: [GVennarecci@scamilloforlanini.rm.it](mailto:GVennarecci@scamilloforlanini.rm.it)

# Chirurgia nei Trapiantati

## P. Lepiane

La chirurgia nei pazienti trapiantati può essere precoce nell'immediato post-trapianto, prevalentemente per episodi emorragici, trombosi della vena porta o deiscenze anastomotiche biliari, o tardiva per la comparsa di tumori ex-novo, complicanze biliari tardive e difetti di parete (ernie e laparoceli).

Un evento emorragico cospicuo post-operatorio richiede il più delle volte una chirurgia immediata, finalizzata appunto al controllo dell'emorragia stessa e ad evitare complicanze cardiocircolatorie serie e talvolta fatali; talvolta la chirurgia può essere differita e volta alla risoluzione di ematomi addominali o a carico del fegato trapiantato od ancora in sede peri- o retro epatica che potrebbero compromettere la funzionalità del graft per fenomeni compressivi e/o per il formarsi di ascessi. Ovviamente in questi casi, e quando possibile, si cerca sempre di eseguire un trattamento conservativo (radiologico interventistico) per non esporre il paziente stesso ad ulteriori stress chirurgici reiterati. A tal proposito, c'è da sottolineare che fortunatamente la maggior parte delle complicanze arteriose post-trapianto (trombosi, stenosi, kinking), oltre ad una loro individuazione precoce (importantissima una stretta collaborazione chirurgo-radiologo), richiedono molto spesso un trattamento conservativo (posizionamento di stent) nelle stenosi tardive; raramente bisogna ricorrere alla chirurgia con resezione-anastomosi. Ciò si rende necessario al fine di scongiurare la formazione di ascessi biliari determinati dall'alterata vascolarizzazione dell'albero biliare stesso in conseguenza del ridotto apporto vascolare arterioso a tale livello, determinato dalla stenosi.

Per quanto riguarda i difetti di parete (ernie e laparoceli), i pazienti trapiantati registrano un'alta incidenza di tali patologie, a causa soprattutto dell'aumento volumetrico della cavità addominale per la presenza di copiosi versamenti ascitici a cui questi pazienti vanno incontro per l'epatopatia cronica ed il conseguente scompenso epatico, e che determinano un lento e progressivo indebolimento delle fasce muscolari ed il cedimento della parete che si osserva a breve distanza dopo il trapianto. A ciò consegue la formazione di voluminosi laparoceli a livello dell'incisione chirurgica che richiedono quasi sempre una correzione chirurgica. La correzione chirurgica prevede nella gran parte dei casi, l'utilizzo di reti biologiche<sup>1</sup> che, oltre a garantire un'ottima tenuta, sono ben tollerate dai pazienti e sono per lo più totalmente riassorbibili. Inoltre i pazienti in attesa di trapianto, per le cause di cui sopra, sono soggetti alla formazione di importanti ernie ombelicali che vengono trattate o prima del trapianto, quando sono in fase di buon compenso epatico per evitare che s'intasino o peggio ancora si strozzino, o subito dopo il trapianto, quando la risoluzione dell'ascite ne determina la formazione.

Inoltre c'è da dire che, in alcuni casi, la chiusura dell'addome non è immediatamente possibile subito dopo il trapianto, soprattutto nei pazienti gravemente scompensati che hanno una distensione intestinale importante o ancora quando le dimensioni del fegato trapiantato, alcune volte più grande rispetto alla capacità contenitiva

della cavità addominale<sup>2</sup>, rende necessario un “second look chirurgico” per la sintesi della parete a distanza di almeno 48/72 ore dal trapianto. Attualmente i nuovi orientamenti prevedono una chiusura progressiva della cavità addominale con un sistema a pressione negativa, per evitare di esporre il paziente ad una sindrome compartimentale conseguente anche fatale.

Certamente interessante è ancora il ruolo della chirurgia epatica, nei pazienti trapiantati, nei casi in cui si sviluppano recidive o nuovi epatocarcinomi nel graft ed ancora metastasi epatiche da neoplasie sviluppatesi in altre sedi. Com'è infatti noto, i trapiantati a causa del loro regime immunosoppressivo, possono sviluppare tumori ex novo (es. tumori del colon)<sup>3</sup>, tumori del distretto orofaringeo (abbastanza frequenti), neoplasie dell'apparato linfoemopoietico ed anche metastasi in sedi extraepatiche (es. surrene)<sup>4</sup>. L'approccio chirurgico per tali situazioni può essere di tipo tradizionale “a cielo aperto” o addirittura minivasivo laparoscopico; infatti la presenza di un'ampia cicatrice chirurgica, il più delle volte sottocostale bilaterale, non rappresenta una controindicazione all'utilizzo della tecnica mini invasiva.

### **BIBLIOGRAFIA**

1. Vennarecci G, Mascianà G, De Werra E, et al. Effectiveness and versatility of biological prosthesis in transplanted patients. *World J Transplant* 2017; 7: 43-8.
2. Levesque E, Duclos J, Ciaccio O, Adm R, Castaing D, Vibert E. Influence of larger graft weight to recipient weight on the post-liver transplantation course. *Clin Transplant* 2013; 27: 239-47.
3. Darnis B, Poncet G, Robert M. Laparoscopic total colectomy for ulcerative colitis after liver transplantation is feasible. *J Minim Access Surg* 2017; 13: 222-4.
4. Jalbani IK, Nazim SM, Tariq MU, Abbas F. Adrenalectomy for solitary metastasis of Hepatocellular carcinoma post liver transplantation: case report and literature review. *Pak J Med Sci* 2016; 32: 1044-6.

Dott. Pasquale Lepiane

UOC Chirurgia Generale e Trapianti, Azienda Ospedaliera San Camillo-Forlanini/I.M.N.I.  
“L. Spallanzani”, Roma

Per la corrispondenza: PLepiane@scamilloforlanini.rm.it

# Epatocarcinoma (HCC) e MELD

## G. Fedeli, M. R. Starace

Il trapianto di fegato è attualmente considerato, in pazienti selezionati, il miglior trattamento con potenzialità curative, nel carcinoma epatocellulare e, contemporaneamente per la condizione che lo predispone.

I potenziali candidati a trapianto per epatocarcinoma (HCC) non resecabile, devono avere determinate caratteristiche.

Devono rientrare nei cosiddetti “criteri di Milano” per trapiantabilità:

- Singolo nodulo di HCC < 5 cm
- Massimo 3 noduli di HCC, di cui ciascuno < 3 cm (neoplasia multifocale)
- Assenza di metastasi extraepatiche
- Assenza di invasione vascolare neoplastica dei principali rami venosi intraepatici o extraepatici, confermata o sospetta alle valutazioni.

I criteri di Milano costituiscono gli unici parametri validati da studi prospettici e dalla esperienza dei vari centri trapianto. La loro applicazione comporta una sopravvivenza del paziente a 5 anni pari al 70%, ed una percentuale di recidiva di tumore inferiore al 25%.

Per downstaging si intende la riduzione volumetrica di HCC, originariamente considerato al di fuori dei criteri di Milano per trapiantabilità. Può essere eseguito con più trattamenti, tali da riportare l'HCC all'interno dei criteri di trapiantabilità.

Il downstaging può essere ottenuto sia con trattamenti singoli, che con l'integrazione di varie metodiche. Tali metodiche possono essere di tipo chirurgico, radiologico o farmacologico.

Nel trattamento farmacologico viene usato il sorafenib, farmaco di ultima generazione; agisce sulle cellule tumorali e vascolari, rallenta la velocità di crescita delle cellule e blocca l'afflusso di sangue alle cellule stesse. Solitamente viene somministrato due volte al giorno, lontano dai pasti o con pasti a basso contenuto di grassi.

La chemioembolizzazione (TACE), viene eseguita dal medico radiologo interventista, il quale somministra il farmaco chemioterapico direttamente nel tumore, attraverso l'inserimento di un catetere nella arteria nutritiva della neoplasia.

La radioterapia selettiva interna intraepatica (SIRT) viene eseguita con l'immissione di radioisotopi direttamente in arteria epatica; vengono usate delle microsferiche di dimensioni di 25 micrometri di ittrio-90, che si spostano all'interno dei vasi epatici e raggiungono anche i capillari più piccoli. Le cellule che si trovano in prossimità del tumore subiscono danni molto limitati.

Il MELD (Mayo End Stage Liver Disease) è un punteggio proposto dalla Mayo Clinic per valutare la sopravvivenza dei pazienti con cirrosi e insufficienza epatica. La formula per il calcolo del punteggio è un logaritmo complesso che necessita di alcuni

parametri: valore ematico della creatinina, della coagulazione (INR), della bilirubina totale e per il calcolo del MELD Sodio (Na) anche della sodiemia.

Il paziente in lista trapianti viene inserito nella lista unica trapianti regionale su un programma, che per la nostra regione si chiama LURTO (Lista Unica Regionale Trapianti Organi). LURTO gestisce le “liste d’attesa” per il trapianto d’organi (Rene, Rene-Pancreas, Cuore, Fegato, Polmone) e la conseguente funzione di allocazione degli organi in presenza di un potenziale donatore. L’assegnazione degli organi avviene secondo il principio della identità/compatibilità di gruppo sanguigno e HLA, urgenza clinica, tempo di attesa ed altri parametri personalizzabili secondo le regole regionali, interregionali e/o nazionali. I pazienti vengono iscritti dal CRT Lazio nella Lista Unica del SIT nel momento in cui viene trasmessa dal Centro Trapianto di Fegato la cartella di iscrizione completa dei dati obbligatori. Ogni Centro Trapianto di Fegato attribuisce ad ogni paziente un punteggio per la classificazione dello status clinico: MELD/PELD, MELDNa, MELD Regione. Il requisito minimo per l’immissione in lista e per il trapianto è MELDNa > 15. L’Algoritmo di Allocazione, che utilizzerà il CRT Lazio, sarà applicato solo ai pazienti con un valore di MELD Na > 15. Per i pazienti con diagnosi di epatocarcinoma (HCC) il punteggio assegnato varia a seconda della stadiazione T: HCC T1: sono iscritti con il valore del MELD Na; HCC T2 sono iscritti con punteggio MELD Reg 18 e avranno un incremento 1 punto/mese “dopo il terzo mese” sino ad un valore massimo di 24 punti; HCC downstaging sono iscritti con punteggio iniziale di MELD Reg 21 con un incremento 1 punto/mese sino ad un valore massimo di 24 punti. Se un paziente iscritto con HCC T2 ha un valore MELD Na superiore al valore MELD per HCC, il MELD Reg sarà dettato dal MELD Na.

Nel 2015 il Centro Nazionale Trapianti, in accordo con le altre figure mediche che si occupano di trapianto di fegato, ha definito un nuovo sistema allocativo che eliminasse le disomogeneità esistenti in Italia relativamente all’assegnazione del fegato. È stato creato un sistema di punteggio unico per ogni paziente italiano in lista di attesa di trapianto di fegato che prende il nome ISO SCORE (Italian Score for Organ allocation in liver transplantation) che fornisce un criterio di priorità a tutte quelle condizioni cliniche considerate come “eccezioni al MELD” e agli epatocarcinomi, soprattutto quando insorti su uno stadio di cirrosi compensata. Per il calcolo dell’ISO SCORE è necessario inserire il dosaggio ematico dell’alfafetoproteina. Il sistema è stato reso operativo dal 1 gennaio 2016 in alcune regioni, Veneto, Sicilia ed Emilia Romagna. Le altre regioni sono state sollecitate ad adeguarsi nello scorso anno.

### **BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE**

Burra P, Gambato M. La gestione della lista d’attesa per trapianto di fegato. Trapianti 2008; 12: 85-104.

Colombo M, Sangiovanni A. Epatocarcinoma. Rec Prog Med 2016;107: 386-94.

CRTL – Regolamento Programma Regionale Trapianto di Fegato V.06.2016.

Lettera del Direttore CNT Dr. Alessandro Nanni Costa, Prot. 447/CNT2017

Giuseppina Fedeli, Maria Rina Starace, Az. Osp. San Camillo-Forlanini, Roma

Per la corrispondenza: g.fedeli@scf.gov.it; m.starace@scf.gov.it

ECM "Universo Fegato"

23 gennaio 2018

Moderatori: Giuseppe Cerasari, Giuseppe Maria Ettore, Giovanni Gasbarrini

---

Terza giornata: "Attualità nella Encefalopatia Epatica: clinica, diagnosi, terapia"

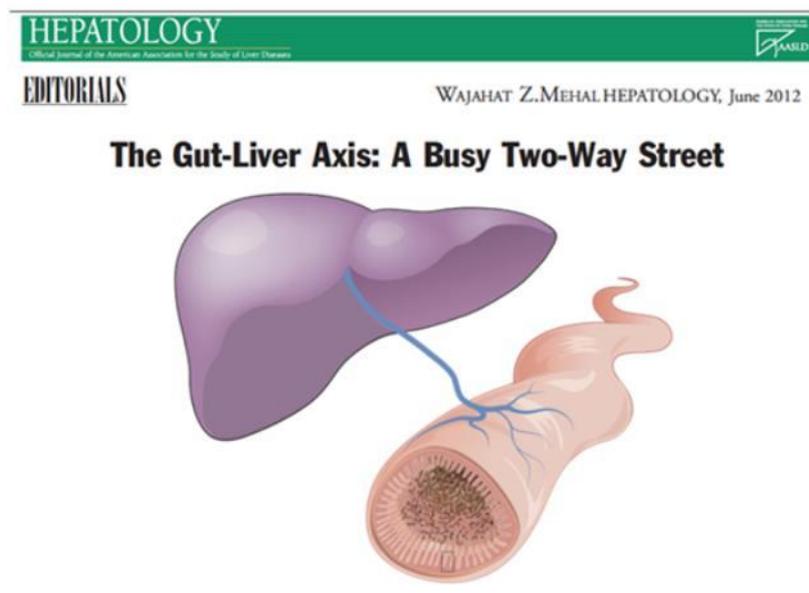
Moderatore: Giovanni Gasbarrini

## Il Microbiota Intestinale: un protagonista nell'asse Entero-Epatico

**G. Gasbarrini, C. Mosoni, F. Bonvicini**

Ormai da molti anni sono stati studiate le vie di comunicazione ematica, linfatica e nervosa fra intestino e fegato e i meccanismi fisiopatologici che legano i due organi, che vanno così a far parte di un unico apparato: quello digestivo. Entrambi gli organi, con le loro funzioni, interferiscono in maniera determinante sull'attività l'uno dell'altro, sia nella salute, sia nella malattia<sup>1</sup>.

Fino ad alcuni anni fa, si riteneva che la maggior via di comunicazione fosse rappresentata dal circolo portale, influenzato in particolare in caso di disfunzione epatica, ma anche negli alterati assorbimento e secrezione intestinali<sup>2</sup>.



---

G. Gasbarrini, C. Mosoni, F. Bonvicini - "Il Microbiota Intestinale: un protagonista nell'asse Entero-Epatico"

Già dagli anni '70, con l'approfondimento delle ricerche, in particolare riguardanti i meccanismi di controllo dell'assorbimento, dell'elaborazione e della attività immunologica di entrambi gli organi, sono assai aumentate le nozioni sulla genesi della patologia epatica e intestinale e sulla correlazione che esiste fra questi due organi<sup>3-5</sup>.

Si tratta ora di comprendere se esista, fra i due organi, un "protagonista", che interferisce sulle attività funzionali dell'altro, e se entrambi siano punti di arrivo di tipo "terminale", o, piuttosto, luoghi di partenza di stimoli che si ripercuotono sulla maggior parte degli altri organi ed apparati, ed in particolare quelli emopoietici, nervoso centrale o periferico, artro-muscolare, cutaneo, cardiovascolare, ecc.

Molti anni fa sono state condotte ricerche sulle influenze della flora batterica intestinale sulla funzione del fegato, ed in particolare sulla tipologia della secrezione biliare<sup>6-7</sup>, con particolare attenzione ai meccanismi di produzione dei calcoli e sul loro possibile controllo e trattamento<sup>8-9</sup>.

**CAUSE NOTE DELLA CALCOLOSI COLESTERINICA DELLA COLECISTI**

genetica  
dieta-obesità, digiuno, NPT.....  
fattori ambientali: estro progestinici, ipocolesterolemizzanti....  
**flora batterica intestinale: 7- $\alpha$  idrossilasi**



**De-idrossilazione e de-coniugazione** dei Sali biliari primari glico/tauro colico e chenodesossicolico a **secondari** desossicolico e litocolico. Litocolico in prevalenza eliminato con le feci. Riassorbimento degli acidi biliari nel circolo entero-epatico

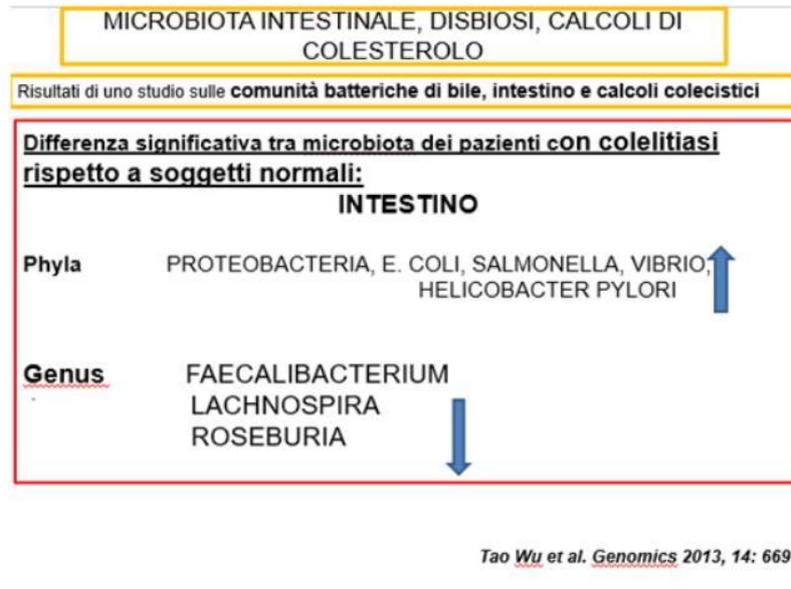
**CONCETTO DI BILE LITOGENA: The quaternary system lecithin, bile salts, cholesterol, water.** Bourges M et al. Biochim Biophys Acta 1967.  
**The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man.** Admirand WH et al. J clin Invest 1968

**MICROBIOTA E CALCOLOSI COLESTERINICA DELLA COLECISTI**  
Evidenze sperimentali

- Alterazione del microbiota intestinale CAUSA variazione del peso/volume della colecisti
- CCK (colecistochinina) e FGF (fibroblast growing factor) sono ormoni secreti nell'intestino e regolano svuotamento e riempimento della colecisti.
- La secrezione di CCK è stimolata dalla attivazione della risposta immunitaria innata, regolata dal microbiota .

- MICROBIOTA ALTERATO →
- ALTERATA MOTILITA DELLA COLECISTI →
- INFIAMMAZIONE LOCALE →
- ACCUMULO GEL DI MUCINE →
- FORMAZIONE NUCLEO DEL CALCOLO

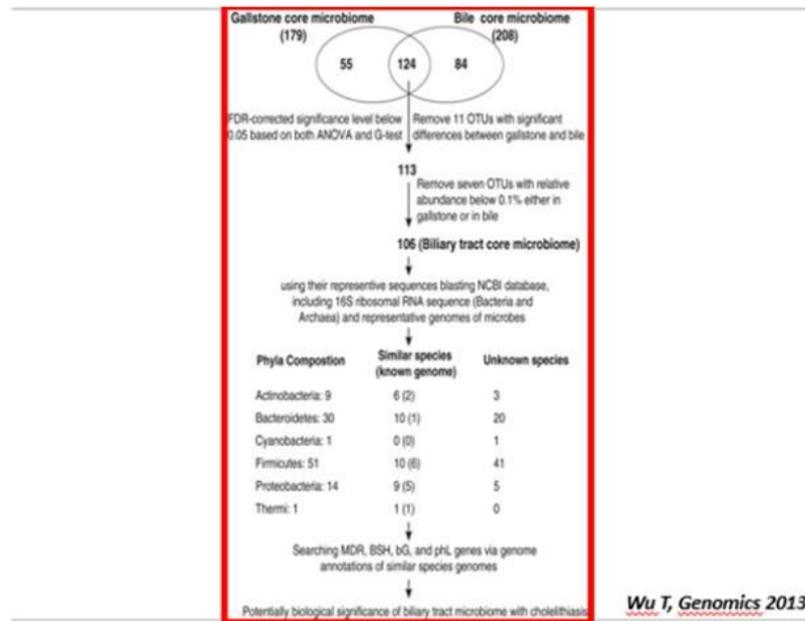
da MIT e Harvard Medical School: JJ Fremont-Rahlet et al. Plos one, 2013  
An analysis of the role of the indigenous microbiota in cholesterol gallstone pathogenesis



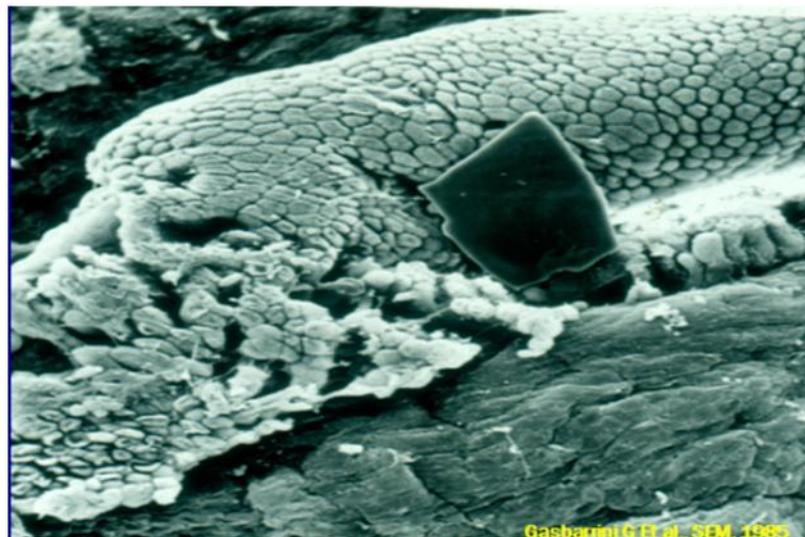
Queste ricerche sono state anche di recente validate<sup>9</sup>.



In particolare, sono stati studiati i germi che maggiormente interferiscono sul processo di litogenesi, in correlazione con la situazione genetica<sup>9</sup>.



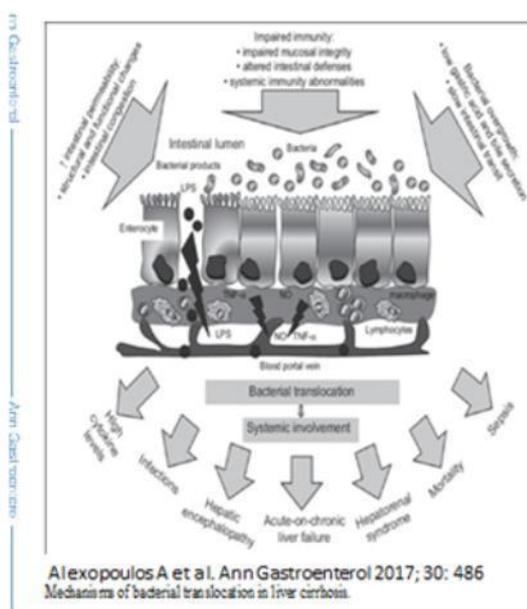
Sul piano clinico, ad esempio, si possono verificare le cosiddette “transaminiti”<sup>10-12</sup> e cioè quei fenomeni di più o meno moderata epatocitonecrosi, spesso associata ad altrettanto lieve colestasi, associata a qualche segno di infiammazione della fase precoce, che si verifica nelle prime fasi di formazione degli addensamenti biliari, che inducono al medico di medicina generale una perplessità diagnostica, e nella quale l’azione del microbiota dell’intestino può correlarsi con quella dei germi presenti nella bile.



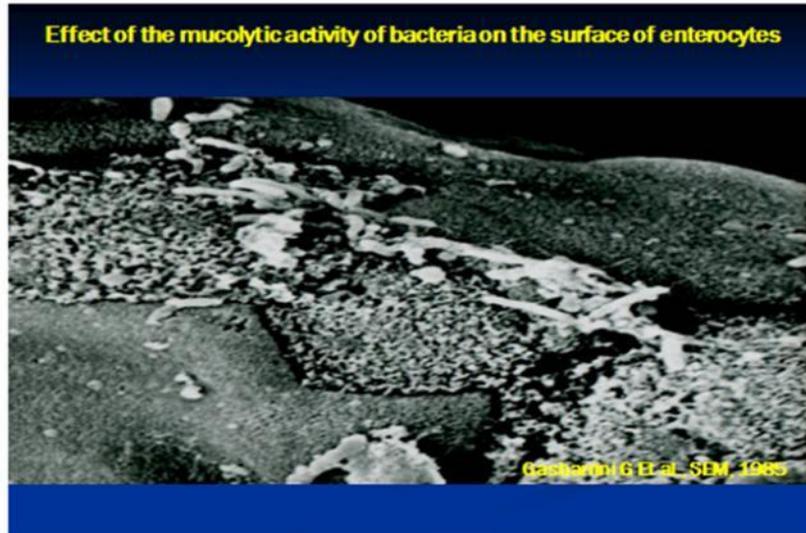
Un altro evento patofisiologico, studiato negli anni '70 e dominante nell’asse entero-epatico, è rappresentato dalla cosiddetta “traslocazione batterica”<sup>13</sup>.

<p><b>LA TRASLOCAZIONE BATTERICA</b>  <b>LA PRIMA DESCRIZIONE DEL FENOMENO RISALE AL 1979:</b>  <i>Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract in the mesenteric lymph nodes and other organs in gnotobiotic mouse model. Infect Immun 1979; 23:403.</i></p>
<p><b>Migrazione di microrganismi viventi</b> o di endotossine batteriche (<i>Lipopolisaccaridasi batterica, peptidoglicani, lipopeptidi</i>) <b>dal lume intestinale alla circolazione mesenterica sistemica VERSO I LINFONODI MESENTERICI, o ALTRA SEDE extraintestinale.</b></p>
<p><b>Fattori predisponenti nella cirrosi epatica:</b>  aumento della <b>permeabilità intestinale</b> (dovuta anche a alterazioni del microcircolo per l'ipertensione portale),  <b>deficit immunitario</b> (IgA, GALT),  <b>contaminazione batterica del tenue.</b></p>
<p><b>Batteri coinvolti :</b>  Enterobacteriaceae: <i>Escherichia coli</i>, <i>Klebsiella spp</i>, Enterococchi, Streptococchi.  Rari gli anaerobi  <b>Complicanze:</b> infezioni, <u>insuff</u> epatica acuta su cronica, encefalopatia epatica, s. <u>epato</u>-renale,  Peritonite Batterica Spontanea, instabilità emodinamica, prognosi severa.</p>

Una significativa raffigurazione dell'azione dei germi del lume intestinale nell'attraversamento della barriera mucosa intestinale indica l'importanza delle giunzioni terminali intra-epiteliali e delle cellule M nel controllo di tale passaggio<sup>14</sup>.



Questo fenomeno è facilmente riconoscibile studiando quanto avviene nell'intestino tenue quando si hanno fenomeni di riduzione dello strato di muco che protegge gli enterociti dal contatto con i germi, con ampie possibilità di interferenza del microbiota sull'attività delle cellule di pattugliamento della mucosa intestinale che vanno ad aggiungersi, in maniera determinante, al semplice rapporto che scaturisce dalla sensorialità dei prolungamenti trans-barriera mucosa delle cellule stellate della parete intestinale.



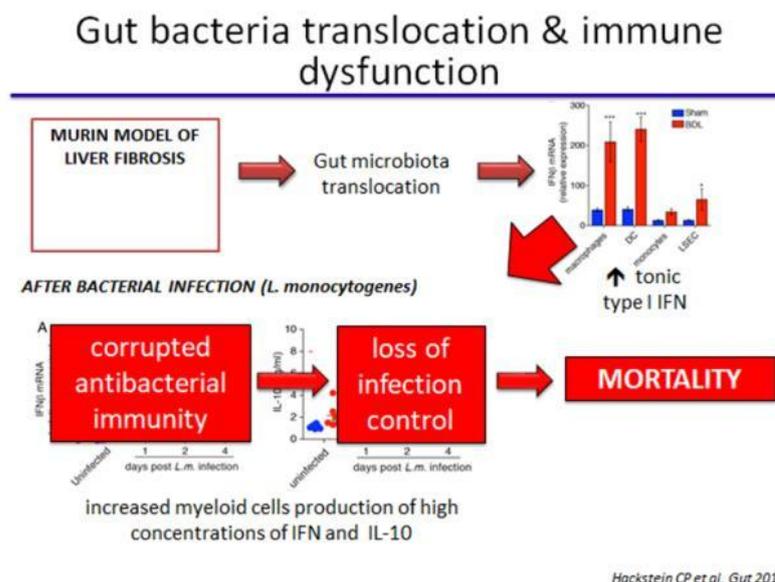
C'è da chiedersi ora più specificamente:

- 1) Esiste una diversità del microbiota intestinale presente nei soggetti normali rispetto a quelli con patologia epatica?
- 2) Può la malattia di fegato essere la causa di alterazioni del microbiota intestinale?
- 3) Può il microbiota intestinale “patologico” (“contaminazione batterica” intestinale) o, meglio, “non equilibrato” (“disbiosi” intestinale), essere causa di patologia epatica?

Per rispondere a queste domande è importante valutare se le infezioni nei pazienti con cirrosi sono una importante causa di morte. Ebbene, questo si verifica nel 30-50% dei casi<sup>15</sup>, ma queste coinvolgono il microbiota intestinale?

Le malattie del fegato sono coinvolte da un danno delle cellule immunologiche residenti, la flora batterica si incrementa in condizioni di ridotta secrezione acida, l'immunità mucosale e sistemica ne subisce alterazioni che dipendono anche dalla inadeguata motilità e permeabilità intestinale.

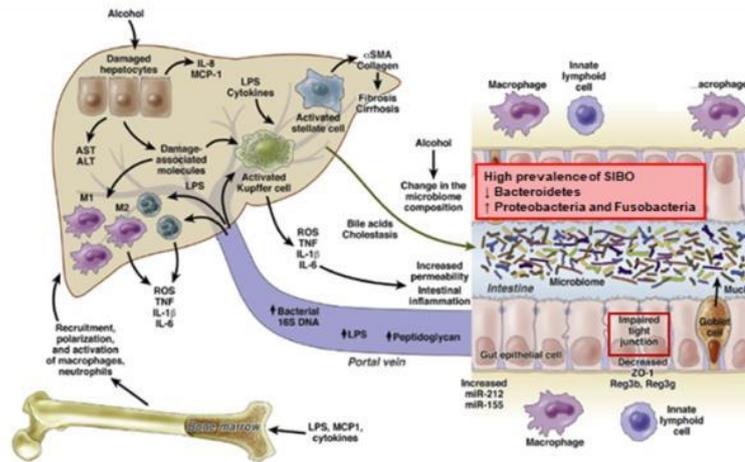
La traslocazione batterica correla con la disfunzione immunologica<sup>16</sup>.



Questi fenomeni si verificano soprattutto nelle complicanze più tipiche della cirrosi, quali: l'ascite, specie se si associa una peritonite batterica spontanea, l'ipertensione portale e l'encefalopatia epatica<sup>17</sup>.

La tipologia e l'attività del microbiota possono essere una delle cause più importanti del danno pluriorganico indotto dall'assunzione dell'alcol<sup>18, 19</sup>.

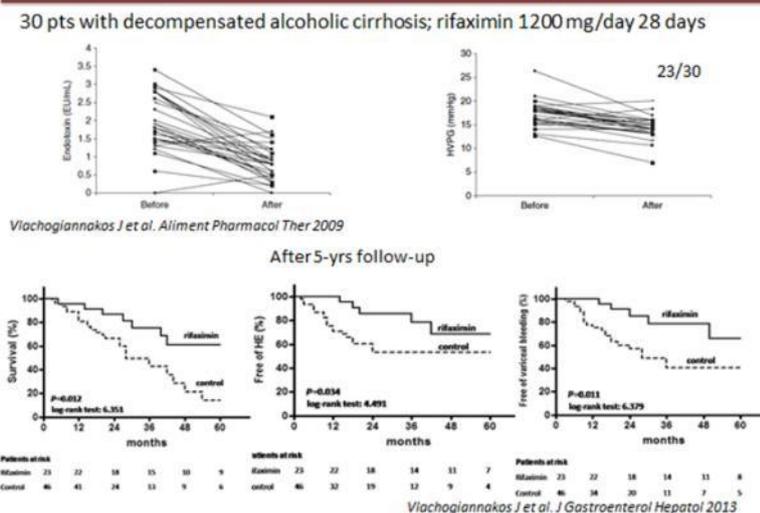
## Microbiota and ethanol related liver disease



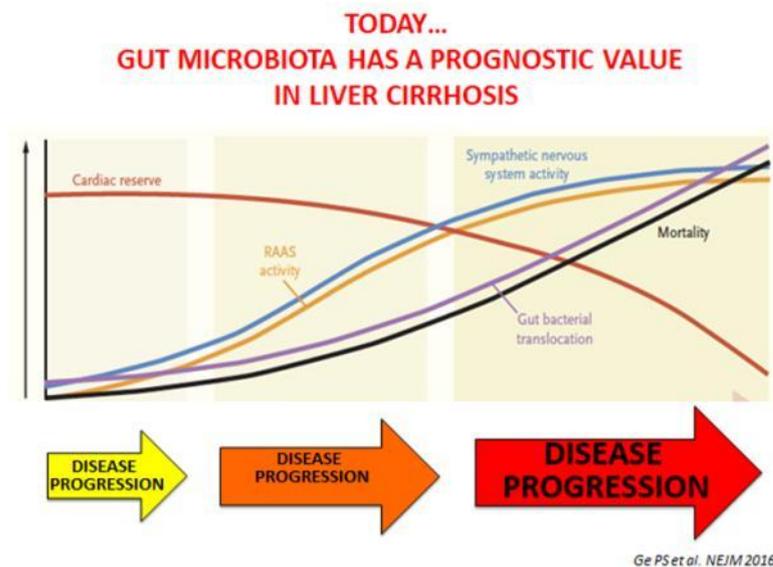
Szabo G, *Gastroenterology* 2015  
Hartmann et al. *Alcohol Clin Exp Res* 2015

Per quanto si riferisce in particolare all'ipertensione portale, numerose sono state le ricerche che dimostrano come il microbiota influisce nella genesi della emodinamica enteroepatica<sup>20</sup>.

## Gut microbiota and hemodynamics

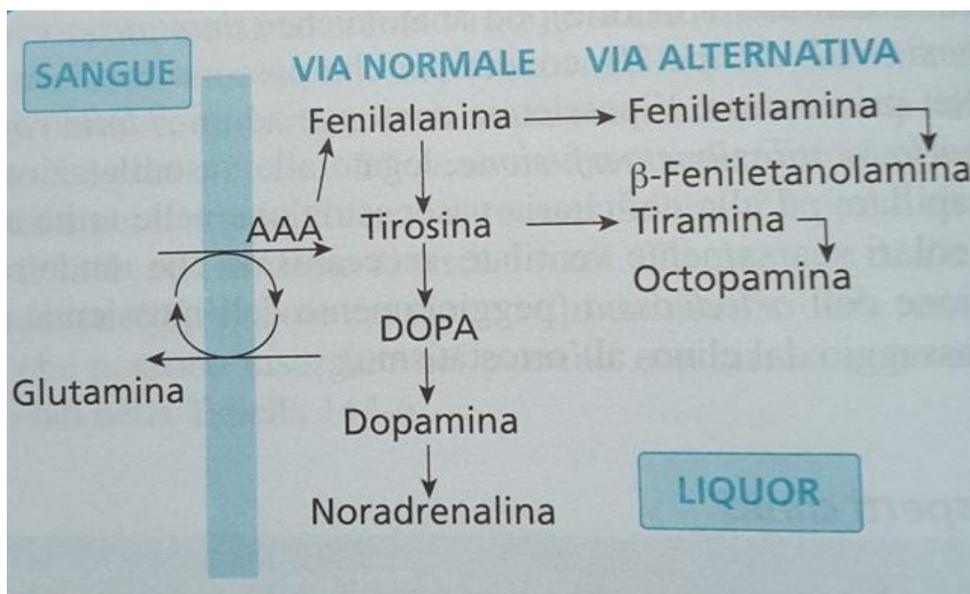


È stato in particolare dimostrato come lo studio del microbiota intestinale può rappresentare un fenomeno prognostico nella cirrosi epatica<sup>21</sup>.



Per quanto si riferisce all'encefalopatia epatica, questa può essere definita come una sindrome neuropsichiatrica caratterizzata da alterazioni cognitive, emotivo-affettive, comportamentali e della motilità fine. La sua patogenesi è complessa e non completamente chiarita, ma un ruolo fondamentale è giocato dalla ridotta detossificazione epatica di sostanze neurotossiche provenienti dall'intestino e quindi dall'azione della flora batterica intestinale.

Attraverso meccanismi spiegati nella figura il quadro clinico della sindrome si verifica in grado diverso.



Tab. 144-7. Stadiazione dell'encefalopatia epatica secondo West-Haven

Grado di Encefalopatia	Stato di coscienza	Funzione intellettuale	Personalità comportamento	Alterazioni neuromuscolari
<b>Grado I</b>	Sonnolenza Insonnia Inversione ritmo nictemerale	Difficoltà di calcolo Difficoltà di concentrazione	Euforia/depressione Vacuità Irritabilità	Tremore Incoordinazione Scrittura alterata Asterixis
<b>Grado II</b>	Risposte rallentate agli stimoli Letargia Iniziale disorientamento	Perdita della nozione del tempo Amnesia Grave difficoltà di calcolo	Disinibizione Alterazioni della personalità Ansietà/apatia Comportamento inappropriato	Linguaggio disarticolato Iporeflessia Atassia
<b>Grado III</b>	Disorientamento Stato confusionale Stupore (risvegliabile)	Perdita della nozione dello spazio Incapacità di calcolo	Comportamento bizzarro Episodi di violenza Paranoia	Iperreflessia Nistagmo Clono Segno di Babinski Rigidità
<b>Grado IV</b>	Incoscienza	Assente	Assente	Dilatazione pupillare Opistotono Coma

A questa nostra presentazione seguiranno quelle degli altri partecipanti al convegno, che possono essere così indicizzate:

- G. Ianiro: il microbiota intestinale
- G. A. Vassallo: encefalopatia correlata ad abusi di alcol
- F. R. Ponziani: nuovi aspetti dell'encefalopatia epatica: influenza dei flussi intracranici e dell'ipertensione
- C. Mosoni: caso clinico: quale tipo di encefalopatia?
- G. Cammarota: il trapianto di microbiota intestinale.

## BIBLIOGRAFIA

1. Zocco MA, Garcovich M, Ponziani FR. Malattie del fegato. In: Gasbarrini A. Il Microbiota Intestinale – il 4° organo dell'apparato digerente – composizione, funzioni e patologie correlate. Roma: Verduci Editore, 2013; 25-31.
2. Mehal WZ. The gut-liver axis: a busy two-way street. *Hepatology* 2012; 55: 1647-9.
3. Gasbarrini G, Morelli A. Malattie del fegato, delle vie biliari e del pancreas. In: Trattato di Medicina Interna. Padova: Piccin, 2010. Vol. 9.
4. Bonvicini F, Gautier A, Gardiol D, Borel GA. Cholesterol in acute cholestasis induced by tauro lithocholic acid. A cytochemical study in transmission and scanning electron microscopy. *Lab Invest* 1978; 38: 487-95.
5. Gasbarrini G. Le membrane epatocitarie in condizioni normali, nella colestasi extra-epatica sperimentale e dopo trattamento in vitro con acido desossicolico: studio ultrastrutturale e biochimico. In: Riunione Monotematica AISF 1977. Trasferimento epato-biliare degli anioni organici. Trieste, 27 maggio 1977; 29.
6. Bourgès M, Small DM, Dervichian DG. Biophysics of lipid associations. 3. The quaternary systems lecithin-bile salt-cholesterol-water. *Biochim Biophys Acta* 1967; 144 :189-201.

G. Gasbarrini, C. Mosoni, F. Bonvicini - "Il Microbiota Intestinale: un protagonista nell'asse Entero-Epatico"

7. Admirand WH, Small DM. The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man. *J Clin Invest* 1968; 47: 1043-52.
8. Fremont-Rahl JJ, Zhongming GE, Umana C, et al. An analysis of the role of the indigenous microbiota in cholesterol gallstone pathogenesis. *PLoS ONE* 2013; doi.org/10.1371/journal.pone.0070657.
9. Wu T, Zhang Z, Liu B, et al. Gut microbiota dysbiosis and bacterial community assembly associated with cholesterol gallstones in large-scale study. *BMC Genomics* 2013; 14: 669.
10. Madan K, Batra Y, Panda SK, et al. Role of polymerase chain reaction and liver biopsy in the evaluation of patients with asymptomatic transaminitis: implications in diagnostic approach. *J Gastroenterol Hepatol* 200;19: 1291-9.
11. Dujovne CA. Side effects of statins: hepatitis versus "transaminitis"-myositis versus "CPKitis". *Am J Cardiol* 2002; 89: 1411-3.
12. Charles EC, Olson KL, Sandhoff BG, McClure DL, Merenich JA. Evaluation of cases of severe statin-related transaminitis within a large health maintenance organization. *Am J Med* 2005; 118: 618-24.
13. Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in gnotobiotic mouse model. *Infect Immun* 1979; 23: 403-11.
14. Alexopoulou A, Agiasotelli D, Vasilieva LE, Dourakis SP. Bacterial translocation markers in liver cirrhosis. *Ann Gastroenterol* 2017; 30: 486-97.
15. Fagioli S, Colli A, Bruno R, et al. Management of infections pre- and post- liver transplantation: report of an AISF consensus conference. *J Hepatol* 2014; 60: 1075-89.
16. Hackstein CP, Assmus LM, Welz M, et al. Gut microbial translocation corrupts myeloid cell function to control bacterial infection during liver cirrhosis *Gut* 2017; 66: 507-18.
17. Tuomisto S, Pessi T, Collin P, Vuento R, Aittoniemi J, Karhunen PJ. Changes in gut bacterial populations and their translocation into liver and ascites in alcoholic liver cirrhotics. *BMC Gastroenterol* 2014; doi: 10.1186/1471-230X-14-40.
18. Szabo G. Gut-liver axis in alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 2015; 148: 30-6.
19. Hartmann P, Seebauer CT, Schnabl B. Alcoholic liver disease: the gut microbiome and liver cross talk. *Alcohol Clin Exp Res* 2015; 39: 763-75.
20. Vlachogiannakos J, Viazis N, Vasianopoulou P, Vafiadis I, Karamanolis DG, Ladas SD. Long-term administration of rifaximin improves the prognosis of patients with decompensated alcoholic cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2013; 28: 450-5.
21. Ge PS, Runyon BA. Treatment of Patients with Cirrhosis. *N Engl J Med*. 2016; 375: 767-77.

Prof. Giovanni Gasbarrini, Professore Emerito di Medicina Interna, Università Cattolica del Sacro Cuore, Policlinico Gemelli, Roma

Dott.ssa Carolina Mosoni, Istituto di Medicina Interna, Gastroenterologia e Malattie del Fegato, Università Cattolica del Sacro Cuore, Policlinico Gemelli, Roma

Dott.ssa Fiorenza Bonvicini, Istituto di Semeiotica Medica, Università degli Studi di Bologna

Per la corrispondenza: g.gasb@libero.it

# Il Microbiota Intestinale e le sue funzioni nel normale e nelle Patologie Intestinali ed extra-Digestive

## G. Ianiro

Il corpo umano è abitato da circa cento trilioni di microrganismi che, in condizioni fisiologiche, vivono in un rapporto di simbiosi con l'uomo, e costituiscono il cosiddetto "microbiota" umano. Il microbiota colonizza virtualmente ogni superficie del corpo umano che sia esposta all'ambiente esterno, come la cute, le vie respiratorie, l'apparato urogenitale e l'apparato digerente. Quest'ultimo è il distretto maggiormente colonizzato dal microbiota umano, accogliendone più del 70% del totale.

Il microbiota intestinale è composto per la gran parte da batteri, ma anche virus (specialmente batteriofagi, ovvero virus degli stessi batteri), funghi, protozoi, e altri microrganismi. Una serie sempre più cospicua di studi sta evidenziando come questi componenti minori (in particolare virus e funghi) abbiano un ruolo chiave nella patogenesi di diverse malattie (es. le malattie infiammatorie croniche intestinali).

Per capire la complessità del microbiota intestinale, basti pensare che esso complessivamente conta un patrimonio genetico di più di 3.3 milioni di geni, un'enormità, se consideriamo che il corredo genetico umano è di circa 33000 geni. Inoltre, è proprio il microbiota a rendere speciale e unico ciascun individuo, più dei suoi geni umani: infatti, due individui condividono il 99.9% del genoma umano, ma solo il 10-20% di quello microbico.

In condizioni fisiologiche, il microbiota intestinale svolge una serie di funzioni fondamentali per l'organismo umano, incluse una funzione di barriera contro i patogeni e gli agenti tossici, una funzione di stimolazione e modulazione del sistema immune (in particolare in età infantile), una funzione metabolica (in quanto regola il metabolismo di molti nutrienti e anche di farmaci) e una funzione di sintesi di diverse sostanze (es. alcune vitamine).

La composizione del microbiota intestinale è influenzata da diversi fattori, sia fisiologici (es. età, dieta, abitudini di vita, tipo di parto o di allattamento) che patologici (infezioni, interventi chirurgici, l'utilizzo di determinati farmaci quali antibiotici, chemioterapici, o inibitori di pompa protonica).

In condizioni di salute le varie componenti del microbiota sono in equilibrio fra di loro, e cooperano per svolgere le suddette funzioni necessarie all'uomo; tale condizione viene definita eubiosi. Quando degli insulti esterni (quali i fattori patologici descritti sopra) alterano il nostro microbiota, tale armonia viene persa, e si passa ad uno stato di squilibrio, chiamato disbiosi, ovvero l'alterazione del microbiota intestinale.

Un numero sempre maggiore di evidenze suggerisce che le alterazioni del microbiota intestinale siano fortemente implicate nello sviluppo di numerose malattie, come le infezioni intestinali (es. infezione da *Clostridium difficile*), la sindrome dell'intestino

irritabile, malattie infiammatorie intestinali, sindrome metabolica, l'obesità e i tumori dell'apparato digerente. Inoltre, studi recenti dimostrano come dei particolari profili di microbiota intestinale (con prevalenza di alcuni microbi rispetto ad altri) favoriscano o meno la risposta a farmaci immunoterapici in pazienti oncologici.

Esistono diverse opzioni terapeutiche per modulare il microbiota alterato e far ripristinare la condizione di eubiosi. Esse comprendono l'attività fisica e l'approccio dietoterapico (ricordiamo che la dieta è il più potente modulatore del microbiota intestinale, che viene modificato già dopo pochi giorni dopo un cambiamento di regime dietetico), utilizzo di antibiotici (basti pensare agli antibiotici, es. rifaximina, utilizzati nella modulazione di patologie correlate alla disbiosi, come la sovracrescita batterica dell'intestino tenue oppure l'encefalopatia epatica), e/o probiotici (microrganismi vivi che, una volta ingeriti in adeguate quantità, hanno la potenzialità di esercitare funzioni benefiche per l'organismo), e, infine, il trapianto di microbiota intestinale (ovvero l'infusione di microbiota intestinale proveniente da donatore sano nell'intestino di un paziente che abbia una malattia legata all'alterazione del microbiota intestinale), che al momento è utilizzato in pratica clinica per l'infezione recidivante da *C. difficile* (date le solide evidenze di efficacia), e viene sperimentato in altre patologie correlate alla disbiosi (es. colite ulcerosa, sindrome metabolica o encefalopatia epatica), con risultati sempre più promettenti.

Dott. Gianluca Ianiro, Istituto di Medicina Interna e Gastroenterologia, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

Per la corrispondenza: [gianluca.ianiro@unicatt.it](mailto:gianluca.ianiro@unicatt.it)

# Nuovi aspetti della Encefalopatia Epatica: influenza dei flussi intracranici e della ipertensione

**F. R. Ponziani**

Nell'individuo sano il circolo cerebrale è protetto dalle eventuali alterazioni della circolazione sistemica grazie all'autoregolazione<sup>1</sup>, che mantiene costante il flusso cerebrale in presenza di variazioni della pressione di perfusione comprese fra 60 e 150 mmHg. Nel cirrotico esiste invece un disturbo dell'autoregolazione cerebrale<sup>2</sup>, particolarmente marcato nei pazienti con encefalopatia epatica e/o ipotensione<sup>3</sup>, per cui la circolazione cerebrale di questi pazienti risente delle alterazioni dell'emodinamica sistemica.

Guevara<sup>4</sup> ha misurato mediante Doppler transcranico l'indice di resistenza dell'arteria cerebrale media in un gruppo di pazienti cirrotici senza e con ascite e lo ha confrontato con l'indice di resistenza renale e con il comportamento dei principali fattori vasoattivi endogeni. L'indice di resistenza aumentava progressivamente passando dal gruppo di controllo, ai pazienti senza ascite e a quelli con ascite, raggiungendo i valori più elevati nel sottogruppo con insufficienza renale. Analizzando i dati in relazione al grado di compromissione epatica, l'indice di resistenza cerebrale è risultato normale nei pazienti in classe A di Child e significativamente aumentato in quelli in classe B e C. Il comportamento dell'indice di resistenza cerebrale era analogo a quello dell'indice di resistenza renale e correlato direttamente con i livelli plasmatici di renina e noradrenalina ed inversamente con la pressione arteriosa.

Nel paziente cirrotico con riduzione della funzione epatica ed alterazioni dell'emodinamica sistemica si ha quindi un aumento delle resistenze cerebrovascolari ed una riduzione della perfusione cerebrale. La vasocostrizione cerebrale può essere interpretata come la risposta di questo distretto circolatorio alla riduzione del volume plasmatico efficace che caratterizza la malattia ed alla conseguente attivazione dei principali sistemi vasocostrittori endogeni. Il rilievo di un ulteriore incremento dell'indice di resistenza in risposta all'incremento del flusso splancnico indotto dal pasto<sup>5</sup> è in accordo con quest'interpretazione. La riduzione del flusso cerebrale in corso di cirrosi è stata confermata da numerosi Autori, che hanno utilizzato varie metodiche di misura, dirette ed indirette, anche se non mancano risultati contrastanti<sup>6</sup>.

I pazienti cirrotici con encefalopatia epatica subclinica o episodica presentano un'ulteriore riduzione del flusso cerebrale<sup>7-10</sup>, come dimostrato dal confronto con pazienti cirrotici senza encefalopatia e da misurazioni longitudinali nello stesso paziente. Il significato fisiopatologico di questo rilievo non è noto: nell'encefalopatia epatica vi è una riduzione del metabolismo cerebrale sufficiente di per sé a determinare la riduzione del flusso. D'altra parte la possibilità che la riduzione del flusso cerebrale rivesta significato patogenetico non può essere esclusa a priori. La riduzione del flusso cerebrale aumenta peraltro il rischio d'ischemia cerebrale nei pazienti sottoposti a trapianto di fegato<sup>11</sup>. Nel paziente con encefalopatia epatica è stato valutato, su casistica peraltro generalmente limitata, anche il

flusso cerebrale distrettuale, in genere utilizzando la PET e la SPECT. Questi studi hanno evidenziato una riduzione dell'apporto ematico alle aree corticali ed in particolare alla regione frontale e prefrontale ed un suo aumento (per alcuni solo relativo) a livello del talamo, del lobo caudato, del cervelletto e soprattutto dei gangli della base<sup>12-15</sup>.

Altri autori<sup>12</sup> hanno osservato come la riduzione del flusso fosse più marcata in corrispondenza del giro cingolato, altri ancora indicano nell'ippocampo la regione cerebrale maggiormente ipoperfusa<sup>16</sup>.

La riduzione del flusso cerebrale correla con il deficit neurocognitivo<sup>14</sup>;

Lo studio del metabolismo cerebrale effettuato mediante misurazione dell'utilizzo cerebrale di glucosio (Fluoro-Deossiglucosio) tramite PET in soggetti con encefalopatia minima ha fornito rilievi contrastanti in rapporto alla tecnica utilizzata: decremento della utilizzazione del glucosio nelle aree corticali con relativo aumento nelle regioni sottocorticali e cervelletto; successivamente una selettiva diminuzione del flusso cerebrale nelle aree occipitale e inferotemporale<sup>12</sup> e riduzione diffusa dell'utilizzo di glucosio nelle aree corticali e sottocorticali<sup>15</sup>.

Alcuni studi presenti in letteratura hanno dimostrato una correlazione negativa tra la presenza di HE e il flusso ematico cerebrale (CBF) valutato con l'utilizzo del ecocolordoppler transcranico (TCD)<sup>8,9</sup>.

Questi studi hanno mostrato che la velocità media di flusso cerebrale, indicatore di CBF, è ridotta in pazienti con epatopatia cronica<sup>8,9</sup>. In particolare, Dillon ha riportato che la velocità media di flusso cerebrale è ridotta nei pazienti cirrotici avanzati senza encefalopatia rispetto ai controlli normali<sup>16</sup>. In contrasto, Lagi non ha dimostrato alcuna differenza nella velocità media di flusso tra pazienti cirrotici con ascite e controlli sani<sup>2</sup>. Katz et al. hanno dimostrato che i pazienti con epatopatia cronica avevano punteggi più bassi ai test psicometrici e velocità media di flusso dell'arteria cerebrale media inferiore a confronto con controlli sani<sup>9</sup>. Altri autori suggerivano che in pazienti cirrotici gli indici di resistenza cerebrali vascolari (indice di resistenza, RI e l'indice di pulsatilità, PI) sono i migliori indicatori di alterazioni emodinamiche cerebrali e strettamente correlati con la gravità della cirrosi, l'encefalopatia epatica<sup>8</sup> e l'ascite<sup>4</sup> soprattutto a causa della scarsa riproducibilità della misurazione della velocità del flusso cerebrale che è influenzata dall'angolo di insonazione<sup>8</sup>. Inoltre, in questa popolazione, PI e RI cerebrale sembrano essere correlati ad ammoniemia e albuminemia<sup>8</sup>.

La fisiopatologia riguardante l'aumentata resistenza vascolare cerebrale nell'encefalopatia epatica non è stata chiarita. Non è noto se l'encefalopatia epatica provoca un aumento della resistenza vascolare cerebrale, o è l'alterazione dell'emodinamica vascolare cerebrale a contribuire all'encefalopatia epatica. È stato ipotizzato che l'ammoniaca svolge un ruolo importante nella scomparsa dell'autoregolazione del CBF, nell'aumento della pressione endocranica e nella comparsa dell'edema cerebrale<sup>17</sup>. Quest'ultimo può contribuire a un'aumentata resistenza vascolare cerebrale<sup>8</sup>.

Alcuni studi dimostrano che RI e PI sono più attendibili della velocità media di flusso nel rilevare alterazioni di flusso ematico cerebrale, soprattutto a causa della scarsa

riproducibilità della misurazione della velocità del flusso cerebrale che è influenzata dall'angolo di insonazione<sup>8</sup>. Allo stato attuale non ci sono dati in letteratura riguardanti la variazione dei parametri emodinamici cerebrali dopo il trattamento dell'EE. Non ci sono inoltre studi sulla prevalenza di disfunzione endoteliale in pazienti con e senza MHE e dopo trattamento con rifaximina.

## BIBLIOGRAFIA

1. Fog M. Cerebral circulation. The reaction of the pial arteries to a fall in blood pressure. Arch Neurol Psychiatry 1937; 37: 351-64.
2. Lagi A, La Villa G, Barletta G, et al. Cerebral autoregulation in patients with cirrhosis and ascites. A transcranial Doppler study. J.Hepatol 1997; 27: 114-20.
3. Strauss GI, Hansen BA, Herzog T, Larsen FS. Cerebral autoregulation in patients with end-stage liver disease. Eur J Gastroenterol Hepatol 2000; 12: 767-71.
4. Guevara M, Bru C, Gines P, et al. Increased cerebrovascular resistance in cirrhotic patients with ascites. Hepatology 1998; 28: 39-44.
5. Sugano S, Yamamoto K, Atobe T, et al. Postprandial middle cerebral arterial vasoconstriction in cirrhotic patients. A placebo, controlled evaluation. J Hepatol 2001; 34: 373-7.
6. Larsen FS. Cerebral circulation in liver failure: Ohm's law in force. Semin Liver Dis 1996; 16: 281-92.
7. Testa R, Rodriguez G, Arvigo F, et al. Cerebral blood flow and plasma free tryptophan in cirrhotics with and without hepatic encephalopathy. Ital J Neurol Sci 1989; 10: 415-21.
8. Kawakami M, Koda M, Murawaki Y, Kawasaki H, Ikawa S. Cerebral vascular resistance assessed by transcranial color Doppler ultrasonography in patients with chronic liver diseases. J Gastroenterol Hepatol 2001; 16: 890-7.
9. Katz JJ, Mandell MS, House RM, Bilir BM, Barton B, Zamudio S. Cerebral blood flow velocity in patients with subclinical portal-systemic encephalopathy. Anesth Analg 1998; 86: 1005-9.
10. Almdal T, Schroeder T, Ranek L. Cerebral blood flow and liver function in patients with encephalopathy due to acute and chronic liver diseases. Scand J Gastroenterol 1989; 24: 299-303.
11. Philips BJ, Armstrong IR, Pollock A, Lee A. Cerebral blood flow and metabolism in patients with chronic liver disease undergoing orthotopic liver transplantation. Hepatology 1998; 27: 369-76.
12. Lockwood AH, Yap EW, Rhoades HM, Wong WH. Altered cerebral blood flow and glucose metabolism in patients with liver disease and minimal encephalopathy. J Cereb Blood Flow Metab 1991; 11: 331-6.
13. Lockwood AH, Murphy BW, Donnelly KZ, Mahl TC, Perini S. Positron-emission tomographic localization of abnormalities of brain metabolism in patients with minimal hepatic encephalopathy. Hepatology 1993; 18: 1061-8.
14. Trzepacz PT, Tarter RE, Shah A, Tringali R, Faett DG, Van Thiel DH. SPECT scan and cognitive findings in subclinical hepatic encephalopathy. J Neuropsychiatry Clin Neurosci 1994; 6 : 170-5.

15. Burra P, Dam M, Chierichetti F, et al. 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography study of brain metabolism in cirrhosis: effect of liver transplantation. *Transplant Proc* 1999; 31: 418-20.
16. Dillon JF, Plevris JN, Wong FC, et al. Middle cerebral artery blood flow velocity in patients with cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7: 1087–91.
17. Blei AT, Olafsson S, Therrien G, Butterworth RF. Ammonia-induced brain edema and intracranial hypertension in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology* 1994; 19:1437-44.

Dott.ssa Francesca Romana Ponziani, Istituto di Medicina Interna e Gastroenterologia, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

Per la corrispondenza: francesca.ponziani@gmail.com

# I quadri di Encefalopatia correlati all'abuso di alcol

## G. A. Vassallo

L'Alcol Use Disorders è una patologia cronica e recidivante caratterizzata dall'abuso compulsivo e dannoso di alcol, da dipendenza psicologica e fisica, che secondo le stime della Organizzazione Mondiale della Sanità causa ogni anno circa 2.5 milioni di morti in tutto il mondo. L'abuso cronico di alcol è responsabile di danno d'organo principalmente a livello dell'apparato gastroenterico, cardiovascolare e a livello del sistema nervoso. A livello del sistema nervoso centrale l'abuso di alcol è responsabile di diversi quadri di encefalopatia.

La sindrome di Wernicke-Korsakoff è caratterizzata dalla concomitante presenza dell'encefalopatia di Wernicke e della sindrome di Korsakoff. L'encefalopatia di Wernicke è un'emergenza neurologica, caratterizzata da stato confusionale acuto associato ad oftalmoplegia, nistagmo e alterazioni della deambulazione, che se non trattato tempestivamente evolve verso un quadro clinico irreversibile caratterizzato da disorientamento, deficit della memoria a breve termine e confabulazione denominato sindrome di Korsakoff. Tali quadri non rappresentano due diverse entità ma un continuum e la causa di tali quadri è il deficit di tiamina e l'effetto tossico diretto dell'alcol. La diagnosi di encefalopatia di Wernicke è principalmente clinica e si basa sui criteri di Caine. Bassi livelli ematici di tiamina, acidosi lattica, elevati livelli ematici di piruvato e ridotta attività della trans-chetolasi supportano la diagnosi di deficit di tiamina, ma non sempre risultano disponibili nella pratica clinica. La RM del cranio è l'esame radiologico di riferimento per la diagnosi di tale quadro, e documenta la presenza di iperintensità nelle sequenze T2 e FLAIR a livello del talamo, corpi mammillari ed area periaqueduttale<sup>1</sup>. Il trattamento dell'encefalopatia di Wernicke si basa sulla somministrazione di alte dosi di Tiamina (500 mg i.m. o e.v. tre volte al giorno) per almeno 2-3 giorni, e in caso di beneficio clinico bisogna continuare tale trattamento a dosaggio ridotto (250-300 mg/die) fino alla regressione della sintomatologia e poi con la supplementazione orale (30 mg/die) per i mesi a seguire<sup>1</sup>. La supplementazione di Tiaminina e.v. è più efficace rispetto alla somministrazione per os, poiché i pazienti in fase attiva presentano malassorbimento. Al fine di prevenire l'insorgenza di tale quadro, la somministrazione profilattica di Tiamina 250 mg/die i.m. o e.v. per 3-5 giorni è indicata in tutti i pazienti con sindrome astinenziale grave, epatopatia avanzata o con evidenti segni di malnutrizione. In particolare la tiamina deve essere somministrata prima o in concomitanza della somministrazione di soluzioni glucosate, poiché la somministrazione di glucosio incrementa il fabbisogno di tiamina esacerbando o slatentizzando i sintomi della encefalopatia di Wernicke<sup>1</sup>.

L'abuso cronico di alcol è anche responsabile della degenerazione cerebellare alcolica<sup>2</sup>, della Sindrome di Marchiafava-Bignami<sup>3</sup> e della Demenza Alcolica<sup>4</sup>.

La Beer Potomania è una condizione clinica caratterizzata dall'insorgenza di stato confusionale, associata ad iponatremia, ipokaliemia, bassi livelli di azoto ureico e ridotta escrezione di sodio. I principali fattori di rischio sono il consumo di alcol con pattern di Binge Drinking, lo scarso apporto nutritivo e la presenza di una condizione che determina

deplezione di sodio (vomito o diarrea)<sup>5</sup>. Il trattamento di tale condizione si basa sulla somministrazione di soluzione di cloruro di sodio ipertonica se il paziente è asintomatico, o sulla restrizione idrica e sul buon supporto nutrizionale se il paziente è asintomatico<sup>5</sup>.

La sindrome da astinenza da alcol è una condizione che colpisce i pazienti con Alcohol Use Disorders che improvvisamente interrompono o diminuiscono bruscamente il consumo alcolico. L'abuso cronico di alcol determina, a livello cerebrale, una down-regulation del recettore GABA e una up-regulation del recettore NMDA. Quando un soggetto interrompe o riduce bruscamente il consumo di alcol, viene meno l'azione dell'alcol su tali recettori, determinando uno stato di ipereccitabilità cerebrale, che si manifesta clinicamente con ansia, irritabilità, agitazione, tremore, tachicardia, ipertensione arteriosa e iperreflessia. Tali sintomi, di solito insorgono 6-24 ore dopo l'assunzione dell'ultimo drink e generalmente regrediscono in 2-7 giorni. Talvolta traumi, stress, infezioni intercorrenti, malnutrizione, ma anche un trattamento farmacologico non adeguato, possono far progredire la sindrome da astinenza da alcol verso la sua complicanza più drammatica, il delirium tremens che si manifesta con convulsioni, allucinazioni visive e/o uditive, ed obnubilamento del sensorio fino al coma. Tale quadro rappresenta una seria complicanza essendo caratterizzata da elevate morbilità e mortalità. L'entità della sindrome d'astinenza alcolica viene valutata sulla base del punteggio della scala di valutazione CIWA-Ar (Clinical Institute Withdrawal Assessment for Alcohol Scale), che assegna un punteggio alla gravità dei sintomi. Un punteggio secondo tale scala uguale od inferiore 8 corrisponde alla sindrome d'astinenza lieve che non necessita di un trattamento farmacologico, un punteggio tra 9 e 15 corrisponde alla sindrome d'astinenza moderata che necessita di un trattamento farmacologico, infine, un punteggio maggiore di 15 corrisponde alla sindrome d'astinenza grave che necessita dell'ospedalizzazione<sup>6</sup>.

Il trattamento della sindrome d'astinenza alcolica, oltre al supporto mediante soluzioni polielettrolitiche reidratanti e alla somministrazione di tiamina e altre vitamine del gruppo B, prevede la somministrazione di benzodiazepine. L'utilizzo di benzodiazepine a lunga durata d'azione (diazepam, clonazepam e clordiazepossido), fornisce una maggiore protezione contro le convulsioni e il delirium tremens, tuttavia l'utilizzo di benzodiazepine a durata d'azione intermedia (lorazepam, oxazepam) è più sicura nei pazienti con epatopatia avanzata<sup>7</sup>. Esistono due modalità di somministrazione delle benzodiazepine: al bisogno (symptom-triggered) o con schema predefinito (fixed-dose). Lo schema al bisogno è più sicuro nei pazienti con epatopatia avanzata. Nel caso si utilizzi lo schema terapeutico predefinito, dal 4° giorno bisogna ridurre la posologia del 25 % ogni 24 h. I principali effetti collaterali della somministrazione delle benzodiazepine sono la sedazione, il deficit di memoria e la depressione dei centri del respiro. Qualora, la somministrazione di benzodiazepine a dosaggio pieno non assicuri la completa risoluzione, è possibile associare ulteriori farmaci per controllare tali sintomi. L'aloiperidolo può essere utilizzato per trattare l'agitazione e le allucinazioni, sebbene tale farmaco possa abbassare la soglia per lo sviluppo di convulsioni. In caso di ipertensione e tachicardia persistenti può essere utile la somministrazione di clonidina o di beta-bloccanti, soprattutto in pazienti affetti da cardiopatia ischemica. La carbamazepina e la fenitoina possono essere utilizzati in caso di convulsioni persistenti. In considerazione dell'elevato rischio di sviluppo di dipendenza da benzodiazepine, rischio ancora maggiore nel paziente affetto da alcol-dipendenza, sono stati proposti nuovi farmaci nel trattamento della sindrome da astinenza da alcol, ma

attualmente non ci sono studi conclusivi<sup>6</sup>.

L'intossicazione acuta alcolica è una condizione clinica potenzialmente pericolosa che si sviluppa in seguito all'ingestione di elevate quantità di alcol. I sintomi dell'intossicazione acuta alcolica sono generalmente correlati ai valori di alcolemia. Per valori di alcolemia compresi tra 50 mg/dl e 100 mg/dl l'effetto dell'etanolo è principalmente euforizzante. Il paziente risulta logorroico, disinibito, con andatura barcollante e con diminuita capacità percettiva ed incapacità ad affrontare situazioni impreviste. Per valori di alcolemia maggiori (100-200 mg/dl) l'effetto dell'etanolo è principalmente depressivo sul Sistema Nervoso Centrale, con rallentamento globale delle capacità percettive e di comprensione del soggetto, cambiamenti di umore e di personalità, atassia, incoordinazione, iperreflessia, nistagmo. Per valori di alcolemia superiori a 200 mg/dl si verificano amnesia, diplopia, disartria, ipotermia e sintomi gastrointestinali come nausea e vomito. Il rischio di depressione respiratoria ed arresto è elevato per alcolemie superiori ai 400 mg/dl, mentre la morte sopraggiunge generalmente per alcolemie superiori a 500 mg/dl<sup>8</sup>. La quantità di alcol ingerito non è l'unico fattore in grado di determinare la severità dell'intossicazione acuta alcolica. Infatti, anche altri fattori svolgono un importante ruolo, come ad esempio il peso corporeo, l'età del paziente, la tolleranza individuale all'alcol, la percentuale di alcol contenuta nella bevanda, il tempo di ingestione della bevanda e la concomitante assunzione di altre sostanze<sup>8</sup>. La diagnosi di intossicazione acuta da alcol si basa sul riscontro di elevati valori di etanolemia. Il trattamento dell'intossicazione acuta alcolica dipende dalla presentazione clinica del paziente. Nei casi di grave compressione dello stato di coscienza è opportuno valutare la pervietà delle vie aeree, monitorare la funzionalità respiratoria, posizionare il paziente in decubito laterale per prevenire il pericolo di aspirazione, e posizionare un accesso venoso. Nei casi meno gravi può essere sufficiente monitorare il paziente e attendere la completa metabolizzazione dell'alcol. Il trattamento è principalmente di supporto e consiste nell'idratazione (mediante infusioni di soluzioni cristalloidi e glucosate), nella prevenzione dell'encefalopatia di Wernicke (somministrazione di tiamina ed altre vitamine del gruppo B) e nella correzione di eventuali alterazioni elettrolitiche e metaboliche. La somministrazione di metadoxina (300-900 mg/die) riduce in maniera significativa l'emivita dell'etanolo, con un più rapido miglioramento delle condizioni cliniche e una più rapida riduzione della sintomatologia comportamentale dovuta all'intossicazione alcolica. Dopo la stabilizzazione dei parametri vitali e la regressione dei sintomi dell'intossicazione acuta alcolica, i pazienti devono essere monitorati almeno nelle 72 ore successive al raggiungimento di un'alcolemia pari a 0 mg/dl<sup>8</sup>.

Il gold standard del trattamento dei paziente affetti da encefalopatia correlata all'abuso di alcol è la totale astensione dal consumo di bevande alcoliche. Il trattamento di disassuefazione da alcol è costituito da un programma terapeutico articolato, con l'utilizzo di strumenti di tipo psicologico e farmacologico. L'intervento psicosociale si avvale del counseling, della psicoterapia e dei gruppi di auto-aiuto. Il counseling è un intervento psicologico globale volto a individuare e risolvere il problema del paziente. La psicoterapia comprende numerosi approcci, tra cui la terapia di supporto, l'approccio psicodinamico, la terapia "coping-skill" e in particolare la terapia motivazionale risultata particolarmente efficace nel trattare tali pazienti. Infine i gruppi di auto-aiuto comprendono i gruppi di Alcolisti Anonimi, composti da pazienti alcolisti sia in fase attiva che in remissione, e i Club

degli Alcolisti in trattamento. La filosofia dei gruppi di Alcolisti Anonimi è basata sull'intervento di auto-aiuto inteso come scambio interattivo di esperienze vissute, che da un lato aiutano l'alcolista attivo a iniziare l'astinenza e dall'altro aiutano l'alcolista in remissione a rafforzare a propria motivazione a mantenere l'astinenza stessa. I Club di Alcolisti in trattamento sono organizzati secondo un "approccio ecologico-sociale ai problemi alcol-correlati e complessi", con una forte enfasi sulle potenzialità di mutuo sostegno fra le famiglie con problemi alcol-correlati.

I principali farmaci utilizzati per il trattamento della dipendenza da alcol si dividono in due gruppi: farmaci ad azione di avversione-interdizione e farmaci anti-craving. Alla prima categoria appartiene il disulfiram. Riguardo i farmaci anti-craving, quelli attualmente approvati dalla FDA, per il trattamento dell'alcohol use disorder, sono il naltrexone (formulazione orale e intramuscolo) e l'acamprosato<sup>9</sup>; in Europa l'EMA ha recentemente approvato il nalmefene come farmaco per la riduzione del consumo di alcol nei pazienti con alcohol use disorder. Altri farmaci anticraving approvati sono il sodio oxibato (in Italia ed Austria)<sup>10</sup> e il baclofen (temporaneamente approvato in Francia)<sup>11</sup>. Tra tali farmaci quelli di prima scelta nei pazienti con comorbidità neurologiche sono l'acamprosato e il baclofen.

## BIBLIOGRAFIA

1. Sechi G, Serra A. Wernicke's encephalopathy: new clinical settings and recent advances in diagnosis and management. *Lancet Neurol* 2007; 6: 442-55
2. Hillbom M, Muuronen A, Holm L, Hindmarsh T. The clinical versus radiological diagnosis of alcoholic cerebellar degeneration. *J Neurol Sci* 1986; 73: 45.
3. Estruch R, Nicolás JM, Salamero M, et al. Atrophy of the corpus callosum in chronic alcoholism. *J Neurol Sci* 1997; 146: 145.
4. Gazdzinski S, Durazzo TC, Mon A, et al. Cerebral white matter recovery in abstinent alcoholics—a multimodality magnetic resonance study. *Brain* 2010; 133: 1043.
5. Hilden.T, Svendsen TL. Electrolyte disturbances in beer drinkers. A specific "hypo-osmolality syndrome". *Lancet* 1975; 2: 245.
6. Mirijello A, D'Angelo C, Ferrulli A, et al. Identification and management of alcohol withdrawal syndrome. *Drugs* 2015; 75: 353-65.
7. European Association for the Study of Liver. EASL clinical practical guidelines: management of alcoholic liver disease. *J Hepatol* 2012; 57: 399-420.
8. Vonghia L, Leggio L, Ferrulli A, et al. Acute alcohol intoxication. *Eur J Intern Med* 2008; 19: 561-7.
9. Addolorato G, Mirijello A, Leggio L, et al. Management of alcohol dependence in patients with liver disease. *CNS Drugs* 2013; 27: 287-99.
10. Mirijello A, Caputo F, Vassallo G, et al. GABAB Agonists for the Treatment of Alcohol Use Disorder. *Curr Pharm Des* 2015; 21: 3367-72.
11. Addolorato G, Leggio L, Ferrulli A, et al. Effectiveness and safety of baclofen for maintenance of alcohol abstinence in alcohol-dependent patients with liver cirrhosis: randomised, double-blind controlled study. *Lancet* 2007; 370: 1915–22.

Dott. Gabriele A. Vassallo, Istituto di Medicina Interna e Gastroenterologia, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

Per la corrispondenza: gabriele.vassallo86@libero.it

# Caso Clinico: quale tipo di Encefalopatia?

**C. Mosoni, G. Gasbarrini**

## Introduzione:

Con il termine di encefalopatia si intende una vasta gamma di patologie a carico del sistema nervoso centrale, determinate da processi tossici, metabolici, infettivi, neoplastici e degenerativi. Le manifestazioni cliniche sono variegata e interessano l'ambito neurologico e psichiatrico; così come la diagnosi, la terapia e la prognosi, sono fortemente influenzate dalla causa scatenante. È inoltre importante considerare che varie tipologie di encefalopatia possono coesistere nel medesimo paziente.

## Caso clinico:

Il caso clinico di seguito trattato riguarda una paziente donna, di 52 anni, giunta in pronto soccorso per amnesia e confusione mentale insorte nel corso di alcuni giorni. La paziente era una fumatrice di circa 15 sigarette/die e aveva una lunga storia di **abuso alcolico** (8-10 unità alcoliche/die per 20 anni), interrotto circa un mese prima. Era inoltre recentemente stata vittima di un incidente stradale, privo di conseguenze.

Alla visita la paziente si mostrava sonnolenta e disorientata nel tempo e nello spazio, tachipnoica e con pressione arteriosa, frequenza cardiaca e saturazione di ossigeno nella norma. Non si rilevava nulla di patologico all'esame obiettivo toracico e cardiologico, mentre all'esame obiettivo dell'addome emergeva un fegato di consistenza aumentata, palpabile a circa un centimetro dall'arcata costale. La milza era palpabile a livello dell'arcata costale. Dal punto di vista neurologico non emergevano deficit focali, ma era evidente la presenza di *asterixis*. Da segnalare la presenza di numerosi *spider naevi* sovra-diaframmatici e di edemi declivi lievemente improntabili agli arti inferiori.

Sono stati eseguiti esami ematochimici, che mostravano un innalzamento di MCV (101.2 fL), AST (52 UI/L), GGT (169 UI/L), INR (2,1) e ammoniemia (149 gamma/dL) ed una riduzione della conta piastrinica ( $94 \times 10^9/L$ ) e dell'albuminemia (28 g/L). I markers per HCV e HBV e l'alcolemia sono risultati negativi.

Venivano inoltre eseguiti una ecografia dell'addome (che documentava fegato aumentato di dimensioni, ad ecostruttura disomogenea, finemente irregolare, privo di lesioni focali, vena porta di calibro aumentato, pervia, con flusso epatoporto e milza di dimensioni aumentate, senza versamento libero endoaddominale) ed un'elastografia epatica, con 13.5 KPa di rigidità.

La paziente ha dunque ricevuto diagnosi di **cirrosi epatica** potus-relata di stadio B8 secondo la classificazione di Child-Pugh, complicata da encefalopatia epatica di grado II secondo i criteri di West-Haven.

Al momento del pasto, la paziente ha riferito di essere affetta da **malattia celiaca** da circa 10 anni, nei quali però ha seguito in maniera irregolare la dieta aglutinata, soprattutto nelle settimane precedenti.

È stato dunque ipotizzato che parte della sintomatologia lamentata dalla paziente fosse attribuibile al consumo di glutine, che può portare alla comparsa di sintomi neurologici in alcuni pazienti celiaci. È infatti noto che in una minoranza di pazienti celiaci il consumo di glutine può determinare la comparsa di manifestazioni neurologiche severe, come atassia e neuropatia periferica. Se queste manifestazioni sono nel complesso rare, ancora in attesa di validazione sono condizioni psicopatologiche e alterazioni neurologiche minori che si manifestano in una importante parte dei pazienti celiaci, come lievi danneggiamenti transitori alla memoria, alla attenzione e rallentamenti nelle funzioni cognitive («brain fog»). Questi sintomi solitamente migliorano dopo 12 mesi di dieta aglutinata. Il meccanismo patologico non è ancora ben definito, ma non sembra correlato direttamente all'esposizione al glutine<sup>1</sup>. Altre manifestazioni neurologiche attribuite al consumo di glutine in pazienti celiaci sono state la schizofrenia, l'ansia, la depressione maggiore, l'ipoperfusione cerebrale<sup>2-4</sup>.

Dopo aver escluso che la paziente avesse presentato i principali fattori favorevoli all'encefalopatia epatica, tra cui la stipsi, il sanguinamento gastrointestinale, le patologie renali, la disidratazione, le alterazioni elettrolitiche e le infezioni, è stata presa in considerazione la possibilità che la encefalopatia epatica presente nella paziente potesse essere correlata ad una situazione di **disbiosi intestinale**, frequente sia nei pazienti cirrotici sia nella celiachia, e che potrebbe aver determinato l'innalzamento dell'ammoniemia.

Il microbiota intestinale infatti influenza il sistema nervoso centrale in molti modi: innanzitutto attraverso il sistema immunitario, in quanto componenti strutturali dei batteri determinano una stimolazione di basso grado del sistema immunitario innato; un'eccessiva stimolazione dovuta a stati di disbiosi potrebbe produrre un'infiammazione del SNC. Inoltre, proteine batteriche potrebbero cross-reagire con antigeni umani e stimolare risposte disfunzionali nel sistema immunitario adattativo. Enzimi batterici potrebbero produrre metaboliti neurotossici (ammonio, D-lattato). I batteri intestinali possono produrre ormoni e neurotrasmettitori identici a quelli prodotti dall'uomo. Infine i batteri stimolano direttamente i neuroni afferenti del sistema nervoso enterico e mandano segnali al cervello tramite il nervo vago. Questi processi potrebbero avere un effetto sulla memoria, sull'umore, sulle funzioni cognitive e hanno un'utilità terapeutica in un ampio range di disordini, tra cui la sindrome da "fatigue" cronica, la fibromialgia e la sindrome delle gambe senza riposo<sup>5</sup>.

La paziente è stata trattata con lattulosio, aminoacidi ramificati e dieta aglutinata. Alla scomparsa della sintomatologia, è stata dimessa in condizioni stabili con l'indicazione a seguire una dieta aglutinata, mantenere la totale astensione dalle bevande alcoliche, iniziare una terapia preventiva per encefalopatia epatica con Lattulosio e eseguire un regolare follow up alcologico ed epatologico.

Circa una settimana dopo la dimissione, la paziente ritornava in ospedale, a causa dell'insorgenza di tachicardia e perdita di conoscenza, non accompagnata da sintomi prodromici.

Episodi simili si erano verificati anche alcuni anni prima, ma la paziente non aveva eseguito esami strumentali specifici.

È stata sottoposta ad un ECG, che ha permesso la diagnosi di **Sindrome di Brugada**, trattata con il posizionamento di un defibrillatore impiantabile (ICD), per la prevenzione dello sviluppo di aritmie maligne con alterazioni acute ed importanti della funzionalità cerebrale.

Nei mesi successivi, la paziente ha presentato ulteriori episodi di confusione mentale, spesso con ammoniemia negativa; è stata presa in considerazione la possibilità che la paziente avesse sviluppato un'encefalopatia di Wernicke, tuttavia la mancata risposta al trattamento con tiamina e l'assenza di caratteristiche alterazioni di segnale alla Risonanza Magnetica hanno portato ad escludere tale patologia. Nei mesi successivi il quadro di encefalopatia epatica di cui soffriva la paziente si è stabilizzato, non essendo più responsivo alle terapie nonostante l'aggiunta della Rifaximina.

Per la gestione terapeutica della paziente è stato preso in considerazione il trapianto di microbiota intestinale, basandosi su alcune evidenze:

- Dati molto promettenti suggeriscono che il trapianto di microbiota fecale possa rivestire un ruolo importante nel trattamento dell'encefalopatia epatica: è stato descritto che un paziente di 57 anni affetto da encefalopatia epatica di grado I-II, su una cirrosi epatica alcol e HCV relata, che aveva in precedenza risposto al trattamento con rifaximina e lattulosio ma non poteva più permetterselo, ha tratto benefici dal trapianto di microbiota<sup>6</sup>.
- Numerosi studi suggeriscono che il trapianto di microbiota fecale possa avere un ruolo in vari disordini gastrointestinali associate ad alterazioni del microbiota intestinale<sup>7</sup>.
- Non c'è ancora alcuna evidenza che la modulazione del microbiota intestinale possa apportare dei benefici nei sintomi neuropsichiatrici che possono verificarsi nei pazienti celiaci che consumano glutine, tuttavia il trapianto di microbiota intestinale è stato eseguito per un'infezione da Clostridium Difficile recidivante in una paziente affetta da malattia celiaca di tipo II refrattaria, con risoluzione della sintomatologia e del danno istologico ai villi intestinali<sup>8</sup>.

## BIBLIOGRAFIA

1. Yelland GW. Gluten-induced cognitive impairment ("brain fog") in coeliac disease. J Gastroenterol Hepatol 2017; 32 (Suppl 1): 90-3.
2. Addolorato G, Leggio L, D'Angelo C, et al. Affective and psychiatric disorders in celiac disease. Dig Dis 2008; 26: 140-8.
3. Leggio L, Abenavoli L, D'Angelo C, et al. Gluten-related cerebral hypoperfusion and neurologic disorders in coeliac patients. Aliment Pharmacol Ther 2004; 20: 821-2.
4. Abenavoli L, Leggio L, Di Giuda D, et al. Neurologic disorders in patients with celiac disease: are they mediated by brain perfusion changes? Pediatrics 2004; 114: 1734.
5. Galland L. The gut microbiome and the brain. J Med Food 2014; 17: 1261-72.

6. Kao D, Roach B, Park H, et al. Fecal microbiota transplantation in the management of hepatic encephalopathy. *Hepatology* 2016; 63: 339-40.
7. Cammarota G, Ianiro G, Tilg H, et al. European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut* 2017; 66: 569-580.
8. Van Beurden YH, van Gils T, van Gils NA, et al. Serendipity in refractory celiac disease: full recovery of duodenal villi and clinical symptoms after fecal microbiota transfer. *J Gastrointest Liver Dis* 2016; 25: 385-8.

Dott.ssa Carolina Mosoni, Istituto di Medicina Interna, Gastroenterologia e Malattie del Fegato, Università Cattolica del Sacro Cuore, Policlinico Gemelli, Roma

Prof. Giovanni Gasbarrini, Professore Emerito di Medicina Interna, Università Cattolica del Sacro Cuore, Policlinico Gemelli, Roma

Per la corrispondenza: [carolina.mosoni@outlook.it](mailto:carolina.mosoni@outlook.it)

# Lettura Magistrale: Treatment of *Clostridium difficile* infection: focus on faecal microbiota transplantation

**G. Cammarota, G. Ianiro**

Among different clinical pictures of *Clostridium difficile* infection (CDI), severe disease represents a therapeutic conundrum in clinical practice, for several reasons. First, classical treatment options appear to be still unsatisfactory. As pointed out in a recent Cochrane review, the efficacy of antibiotics in severe CDI has not yet been established, because most available studies excluded this subgroup of patients. Surgery, usually considered when antibiotic therapy is failing, is known to reduce the risk of death in the short-term period, but it is jeopardised by high rates of morbidity and mortality in the long run.

The incidence of multiply recurrent CDI episodes following an initial infection is increasing, because of the lack of currently available therapeutic options to recover the microbiota and prevent a new episode. After treatment of an initial episode of CDI, the chance of a recurrence within 8 weeks is 15–25%; for a patient with 1–2 previous recurrences, the risk of further recurrences is 40–65%. A recent analysis showed that relative to CDI, the multiple recurrent CDI incidence has disproportionately increased, indicating a rising demand for prevention of recurrent CDI. Interestingly, the increase in recurrent CDI incidence was independent of known risk factors for CDI.

Faecal Microbiota Transplantation (FMT) appears to be a powerful treatment option against recurrent CDI<sup>1</sup>. After publication of the first randomized trial showing the efficacy of FMT in patients with recurrent CDI, it has been legitimised as a standard therapy for this condition, after failure of antibiotic therapy alone to prevent recurrent CDI, both in European and in American guidelines for the management of CDI. Less evidence exists on the role of FMT as a direct therapy for severe CDI refractory to antibiotic treatment. In this scenario, FMT is not applied to prevent recurrent disease, but in the actual management of severe disease refractory to antibiotic therapy, by combatting toxin producing *C. difficile* directly. To date, FMT was shown to be effective not only in studies mixing patients with different levels of disease severity, but also in several cohorts including only patients with severe CDI.

## THE BURDEN OF CLOSTRIDIUM DIFFICILE INFECTION

*Clostridium difficile* (recently re-classified as *Clostridioides difficile* based on phenotypic, chemotaxonomic and phylogenetic analyses<sup>2</sup> - for simplicity and consistency with previous literature *C. difficile* will be used in this paper - is an anaerobic, spore-producing bacterium responsible for CDI. *C. difficile* spores are ubiquitous in the environment. *C. difficile* is a human pathogen but can also infect and cause disease in animals that can enter the food chain; however, the relevance of foodborne transmission in human disease is unclear.

## Diagnosis of infection

The diagnosis of CDI is based on a combination of signs and symptoms, confirmed by microbiological evidence of *C. difficile* toxin and toxin-producing *C. difficile* in stools, in the absence of another cause. Although colonoscopic or histopathological findings of pseudomembranous colitis are also considered as specific for CDI, there are reports that other microorganisms can cause similar findings. No single commercial test can be used as a stand-alone test for diagnosing CDI because of inadequate positive predictive values at low CDI prevalence. Therefore, the use of a two-step algorithm is recommended. This algorithm should start with either a nucleic acid amplification test (NAAT) to the presence of toxin genes or an enzyme-immunoassay to the glutamate dehydrogenase of *C. difficile* (GDH EIA). Samples with a positive first test result should be tested further with an assay to detect free toxins in faeces. An alternative algorithm is to screen samples with both a GDH and toxin A/B EIA<sup>3</sup>.

## Epidemiology

*C. difficile* is the main causative agent of antibiotic-associated and healthcare acquired diarrhoea in humans, but there is also an increasing realisation that CDI can occur in subjects not recently exposed to healthcare interventions or antibiotics. Since the early 2000s, the epidemiology of CDI has changed dramatically, reflected by an increasing incidence, increasing number of recurrences after antibiotic therapy, and an increased mortality. These changes have been driven to a major degree by the emergence and epidemic spread of two novel strains, known as PCR ribotype 027 and PCR ribotype 078. Currently, the epidemiology of CDI is complex and varies considerably across countries in Europe. Some countries (UK) have had major epidemics of CDI due to type 027 and successful control programs, whereas others (e.g. Germany, Eastern Europe) are currently confronted with epidemics associated with hypervirulent strains. The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) has recognised the urgency of the CDI threat by recommending that all EU countries institute surveillance.

## Costs and burden

CDI is associated with high healthcare costs due primarily to prolonged hospitalisation of CDI patients. In the USA in 2013, the Centers for Disease Control (CDC) identified *C. difficile* as one of the top three antibiotic resistant threat pathogens. Estimated 30-day mortality rates for CDI range from 6 to 16%. The US (CDC) estimated that almost 500,000 patients had CDI, with 29,000 attributable deaths in the United States in 2011<sup>4</sup>. With an ageing population across Europe, CDI is likely to remain a significant threat to public health, which requires a major coordinated and sustained effort to reduce patient morbidity, mortality, and healthcare and societal costs. The first ECDC point-prevalence survey in 2011 and 2012 estimated that ~124,000 patients developed health-care-associated CDI within the European Union each year<sup>5</sup>. The total direct cost of CDI to the European Union in 2006 was estimated at €3 billion per year. Assuming a 3% annual inflation rate, this approximates to >4 billion € in 2015. The cost will further significantly increase, since the European Union has predicted that the demographic old-age dependency ratio (the ratio of those aged >65 years old to those aged 15–64 years) will increase from 27.8 to 50.1% between 2013 and 2060.

## Conclusions

FMT has been implemented as a highly effective treatment against recurrent CDI, providing a significant advantage over treatment with classical antibiotics alone. FMT has also been shown to be a potential salvation therapy for a severe presentation of CDI with a reduction of the need for emergency surgery (and related complications). FMT is only occasionally applied in the setting of severe CDI refractory to antibiotic treatment, and only few centers have sufficient experience. Both the dissemination of FMT centres and the design of face-to-face trials of FMT with surgery are advocated to assess the efficacy of FMT in the setting of severe CDI.

## REFERENCES

1. Cammarota G, Ianiro G, Tilg H, et al. European FMT Working Group. European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *GUT* 2017; 66: 569-80.
2. Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe* 2016; 40: 95-9.
3. Crobach MJ, Planche T, Eckert C, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22 Suppl 4: S63-81.
4. Smits WK, Lyras D, Lacy DB, Wilcox MH, Kuijper EJ. *Clostridium difficile* infection. *Nat Rev Dis Primers* 2016; 2: 16020.
5. European Centre for Disease Prevention and Control. Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals 2011–2012. *ECDU*. 2013; <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/healthcare-associated-infections-antimicrobial-use-PPS.pdf>. Last access on 18 September 2017.

Prof. Giovanni Cammarota, Dott. Gianluca Ianiro, Internal Medicine, Gastroenterology and Liver Unit, Gastroenterology Area, Fondazione Policlinico Universitario Gemelli, Università Cattolica del Sacro Cuore, Rome, Italy

Correspondence: [giovanni.cammarota@unicatt.it](mailto:giovanni.cammarota@unicatt.it)

**Conferenza****6 febbraio 2018**

---

**Detergenza e Termalismo nella storia della Dermatovenereologia****L. Valenzano**

Fin dalle sue origini, l'essere umano si è sempre molto interessato ai fenomeni e agli elementi naturali come sole, acqua, clima e successivamente al modo con cui poterne fare uso, scoprendo così i benefici di bagni, grotte termali, fanghi, fumarole, solfatore etc.

Le tracce più antiche di questo rapporto fra uomo e natura erano già presenti nelle antiche civiltà assiro-babilonesi, ebraiche, indiane e cinesi etc. Per Egiziani, Greci, Fenici e molti altri sorgenti, fiumi e laghi erano considerati luoghi di culto ed in particolare le acque ritenute sacre in quanto utili, indispensabili e dotate di proprietà terapeutiche. Anche alcuni grandi fiumi quali Nilo, Giordano e Gange erano ritenuti sacri perché capaci di sanare molte malattie e gravi disagi spirituali, credenza ancora oggi diffusa fra alcuni popoli.

Presso gli Egizi l'acqua era stata identificata con la figura del Dio Sobek ed il sole con quella del Dio Ra. Le donne egiziane erano solite porre una grande attenzione alla detergenza e ai bagni ed in particolare la loro toeletta era finalizzata, non solo alla cura e igiene del corpo, alla salute e alla bellezza estetica, ma anche a scopi religiosi e funerari. La stessa regina Cleopatra sembra che ricorresse frequentemente a bagni di vapore e ai fanghi del Mar Morto.

Nell'antica Grecia il sommo Talete considerava l'acqua come *archè* (generatore del cosmo) e Igea, figlia di Asclepio (Dio della medicina) e sorella di Panacea (Dea della guarigione) era venerata come Dea della salute e della pulizia. La detergenza, i bagni, l'igiene e la cura del corpo erano finalizzati alla purificazione, alla fortificazione e al piacere. Tali intenti erano stati già suffragati dalle intuizioni di importanti personaggi del V sec a.C.: Alcmeone di Crotona che nel suo trattato *Natura* sottolineava l'utilità dell'acqua e della detersione per la conservazione della salute; Empedocle di Agrigento che aveva elaborato la teoria della «*respirazione cutanea*», considerando la cute «*sucedanea dei polmoni*» e postulando quindi uno scambio di particelle minutissime (molecole gassose) fra l'esterno e l'interno dell'organismo attraverso i pori della pelle. Questo fondamentale concetto veniva poi ripreso ed ampliato da Filistione di Locri, pitagorico, discepolo di Empedocle e amico di Platone, a lungo attivo presso la corte di Dionisio II di Siracusa. Questo grande esponente della medicina magno-greca confermava che la respirazione avvenisse attraverso i pori cutanei e per questo consigliava di detergere spesso e a fondo la pelle. Certamente la più autorevole esperienza ci viene da Ippocrate, "padre della medicina", nato e vissuto nell'Isola di Coa, nei pressi di una famosa sorgente naturale. Nel suo trattato *Sulle arie, sulle acque e sui luoghi*, parla chiaramente di una "materia peccans"

che deve fuoriuscire dal corpo e che è bene non contrastare, bensì eliminare con ripetuti bagni e abluzioni. Galeno di Pergamo (I sec. d.C.) in alcuni dei suoi 400 libri, descriveva molte malattie cutanee. Fra queste la gonorrea o blenorragia, da lui definita «*fuoriuscita di liquido seminale corrotto*» e che quindi poteva giovare di lavaggi e frequenti irrigazioni locali. Areteo di Cappadocia (I sec. d.C.), che per primo aveva dato il nome al diabete, nel corso di questa patologia rilevava la più frequente insorgenza di molte malattie cutanee squamose e l'efficacia di accurati bagni ripetuti e prolungati.

Gli antichi Romani ben presto avevano compreso l'essenziale ruolo dell'elemento acqua nella conservazione di un'ottimale salute. Ne resta indicativo il loro più antico acquedotto, quello dell'Aqua Apia del 312 a.C., voluto dal censore Gaio Plauzio Venocce e completato da Appio Claudio Cieco, che appunto a tale opera monumentale ha dato il suo nome. Molte altre acque furono in seguito convogliate negli acquedotti romani ricorrendo a sorgenti limitrofe o anche lontane. Di questo patrimonio idrico, oltre all'indispensabile impiego domestico, era possibile usufruire anche in luoghi dedicati come le terme. In queste strutture ci si poteva lavare, cospargere di essenze ed oli, alternare bagni bollenti a quelli gelati, effettuare saune, massaggi, esercizi fisici ed anche conversare, discutere di politiche e trattare affari, in un'atmosfera certamente rilassante e benefica. Per queste opportunità le terme erano sempre molto frequentate e particolarmente considerate sorgenti di benessere e rimedio per i più diversi mali. Nel periodo di massimo splendore, Agrippa aveva censito addirittura centosettanta terme, di cui dodici pubbliche e le altre private. Con la realizzazione di queste grandiose opere, i romani concettualmente erano riusciti a combinare il ginnasio greco con il bagno a vapore egizio e arabo, e questo modello lo avevano poi esportato in tutte le regioni dell'Impero. Un aspetto originale e importante è certamente l'apertura delle terme nel 31 a.C. anche alle donne, seppur in giorni prefissati e in locali separati da quelli degli uomini; come pure le tariffe molto basse che ne facilitavano la fruizione da parte di tutti i ceti sociali. I vantaggi del bagno ossia calore, pressione idrostatica, galleggiamento, erano ricercati per stimolare il metabolismo, l'apparato cardiovascolare, la respirazione e la sudorazione, con finalità terapeutiche, preventive e riabilitative. Plinio, Galeno e Celso per primi avevano indagato il rapporto fra le caratteristiche chimico-fisiche dell'acqua e le loro azioni terapeutiche. Emblematica la scoperta delle acque albule di Tivoli, predilette e molto frequentate anche da illustri personaggi. Virgilio ne aveva parlato nell'Eneide, Adriano e Nerone ne erano abituali frequentatori e il divo Augusto era solito recarvisi per alleviare i dolori reumatici. Livia, Ottavia e Giulia "le donne di Augusto", curavano la loro salute e bellezza presso le terme di Agrippa in Campo Marzio. Plinio riferiva che i legionari, al ritorno dalle Campagne di Guerra, venivano obbligatoriamente inviati alle Terme sulfuree per un periodo non inferiore ai quindici giorni.

I benefici di queste terme hanno resistito nel tempo tanto che ancora oggi sono molto frequentate per la cura di neuroartropatie e numerose dermopatie quali dermatite seborroica, psoriasi ed eczemi. Fra le terme urbane, quelle di Traiano, Caracalla e Diocleziano, erano le più importanti e richieste. I romani prediligevano molto anche quelle del Golfo di Napoli, Pompei, Pozzuoli, Baia e Ischia. Nei Campi Flegrei della Campania venivano sfruttati i vapori bollenti delle sorgenti, utili per la sudorazione e la relativa eliminazione dei "cattivi umori" attraverso i pori della pelle. Plinio il Vecchio (23-79) nella

suo opera *Naturalis Historia*, parla di «*fontium plurimorum natura mira est fervore, idque etiam in iugis Alpium*», riferendosi particolarmente alle acque termali di Bormio.

Con il declino dell'impero romano e le vicissitudini politiche e belliche ed ancor più con la comparsa della religione cristiana e il suo rigore moralistico, le terme, ormai considerate luoghi di perdizione e lussuria, divennero un simbolo pagano da rinnegare ed ostacolare. Furono perciò abbandonate, trascurate e indifese dalle invasioni barbariche. In pratica per tutto il medioevo prevalse un vero e proprio "rifiuto del corpo" e delle sue attenzioni, poi riprese dal grande Federico II, lo "stupor mundi". Infatti solo nei primi anni dell'alto medioevo ci fu un rinnovato interesse per le terme, che vennero perciò rivalutate e restaurate con la riscoperta di nuove sorgenti quali Montecatini, Salsomaggiore ed Abano, peraltro già conosciute nelle epoche precedenti. Anche importanti esponenti della medicina araba si sono occupati di detergenza e termalismo. Avicenna (980 – 1037), Averroè (1126 – 1198) e molti altri sono stati promotori del "bagno turco" o "hammam", espressione della sintesi fra terme romane e tradizione ottomana. I bagnanti, seduti su marmo o pietra, avvolti da una calda nebbia, inalavano vapori decongestionanti le vie respiratorie, mentre l'aumentata sudorazione favoriva l'espulsione delle tossine. Il bagno, con le sue proprietà tonificanti e rilassanti, rendeva la pelle più morbida e liscia, leniva tensioni e dolori, migliorando così l'aspetto e l'efficienza fisica. La summa della cultura e sensibilità greca, latina, araba ed ebraica trovava la sua significativa rappresentazione nell'XI sec. in Trotula de Ruggero "sapiens matrona et mulier sapientissima", brillante esponente della Scuola Medica Salernitana. Questa famosa donna-medico era fautrice di cure, lavande e bagni termali specie nelle donne gravide e nei bambini. Nel suo trattato *De ornatu mulierum* parla ampiamente di cosmesi e nel suo *De passionibus mulierum* addirittura di malattie veneree. Con questo poliedrico personaggio e le altre "mulieres salernitanae" si affermava il concetto che la salute delle donne fosse affidata esclusivamente a mani femminili propense alle cure estetiche e termali. Ciò forse rappresenta l'inizio di quella "medicina di genere", oggi sempre più di stringente attualità. Un altro grande esponente della Scuola Medica salernitana è Petrocello (1035 – 1050), che nella sua "Pratica petrocelli Salernitani" sosteneva i vantaggi della terapia idropinica: «*Spongias in aqua frigida expressa in gutture appone...ad faciem lentiginosa, in corio capitis*». Sempre nello stesso periodo, Costantino l'africano (1020 - 1087), esponente della sintesi delle culture greca, bizantina e araba, con il suo «*expellit natura in corporis exteriora*» intuiva che la natura in molti casi tendeva a portare in superficie gli umori corrotti. Questo antesignano della dermatologia considerava le dermopatie come manifestazioni esterne causate da umori cattivi e indicava per la loro cura lavaggi e cure topiche per purificare il corpo. E Ruggero Frugardo (seconda metà XII secolo – 1195), valente medico della Scuola di Parma, nella sua *Rogerina* descriveva imprecisati «*umori reumatici dell'asta*», nonché accennava a lupus, verruche, morfea, tigne e altre dermopatie che potevano giovare delle acque solforate.

Lo studio delle acque e dei galenici, in sintonia con il processo di mitizzazione della figura di Federico II di Svevia, era intento di molti saggi e naturalisti.

Fra questi spicca Pietro da Eboli (1150 – 1220), che ampiamente illustrava il Balneum Sudatorium (Agnano), il Balneum Sulphatarae e il Balneum Tripergulae e le loro

relative specificità. Michele Scoto (1175 – 1232), medico di Federico II, per evitare contagi venerei, raccomandava di «*lavare bene se stessi e la donna prima del coito e subito dopo*». Michele Savonarola (1385 – 1468), nonno del più famoso Girolamo e molto studioso delle Terme di Abano, scriveva *De Balneis Thermis naturalibus*, nel quale analizzava le caratteristiche delle acque sulfuree con tracce di calce e allume, e le loro peculiari proprietà. Pietro Curiali (XIV sec.), medico dei Visconti e docente a Padova e Bologna nel suo *Liber de Balneis Burmi*, descriveva le virtù terapeutiche delle acque di Bormio. Bartolomeo Montagnana (1380 – 1460), pioniere della crenoterapia, elaborò nel 1497 un significativo testo *De Balneis*, vera pietra miliare nel cammino del termalismo.

Nel Rinascimento veniva universalmente acclarato il fondamentale “concetto umorale”, secondo cui l'acqua, specie se ingerita, era in grado di contrastare ed eliminare gli umori nefasti nei più diversi distretti corporei. Questa depurazione dell'organismo serviva a migliorare i sintomi e a guarire le malattie. Forse nasceva così l'importante concetto di “medicalizzazione delle acque”, principio ancora oggi da molti discusso e non da tutti accettato.

In questi anni si scopriva il Nuovo Mondo e compariva sulla scena il “mal napoletano”, la temibile sifilide, che rapidamente si espandeva e terrorizzava tutti, suggerendo le più fantasiose terapie. Oltre a bagni e applicazioni del Legno Santo o di Guaiaco, ritenuto efficace perché proveniente dalle Antille, luogo di origine della malattia, furono introdotte le fumigazioni di Cinabro, le relative Botti di Modica e le immersioni nelle più diverse sostanze. Di fronte a questo inspiegabile ed inarrestabile morbo, Gaspar Torella (1450 – 1512) nel suo *Tractatus cum consultis Pudendagram, seu morbum gallicum* del 1497, si limitava a consigliare: «*se il pene risulta ulcerato dopo un rapporto con una donna infetta è necessario lavarlo bene con sapone delicato*». Girolamo Fracastoro (1476 – 1553), “gigante della venereologia”, celeberrimo autore del *Syphilis sive morbus gallicus*, nel suo *De contagionibus - contagiosis morbis, eorum curatione*, ne trattava approfonditamente descrivendola nei dettagli. Parlava anche di *psora* (scabbia, lebbra, psoriasi) e di molte altre dermopatie, soffermandosi sulle relative pratiche idropiniche, purificatrici e depurative. Un altro “gigante della dermatologia”, Girolamo Mercuriale (1530 – 1606), nel suo *De arte gymnastica* del 1569, illustrava i rapporti fra attività fisica e stato di salute ed ancor più nel *De morbis cutaneis* del 1572, primo trattato di dermatologia nel mondo, presentava una trattazione sistematica delle malattie cutanee osservandole anche dal punto di vista estetico, cosmetico e igienico e, ancor più, nel *De decoratione* del 1585 forniva anche chiare note di balneoterapia e cosmetologia.

Purtroppo però si diffondevano anche pareri opposti e immotivati timori dilaganti nei confronti dell'uso delle acque stesse. Papa Gregorio VI criticava persino i bagni igienici definiti come «*voluttuosi*». Taluni sostenevano che l'acqua potesse infiltrarsi nella pelle e causare la debolezza dei rivestimenti corporei, che il bagno debilitasse forze e virtù del corpo e persino che le acque e le stufe diffondessero la sifilide.

Nonostante questi errori interpretativi, pregiudizi e assurdità, il cammino del termalismo procedeva spedito.

Il grande Gabriele Falloppio (1523 – 1562), oltre ad essersi occupato di anatomia, ci lasciava un importante trattato sui bagni e sulle acque termali (Montecatini). Il filosofo e

scrittore francese Michel Eyquem de Montaigne (1533 – 1592), accanito viaggiatore alla ricerca di “un’acqua miracolosa” per risolvere i suoi mali, approdava più volte in Toscana ed in particolare alle Terme di Lucca, di cui era un convinto sostenitore. Un esimio medico calabrese, Giulio Iasolino (1538 – 1622), redigeva il primo trattato di idrologia medica *De’ rimedi naturali che sono nell’Isola di Ischia*, edito a Napoli nel 1588, in cui descriveva bagni, sudatori, arene calde e altre diverse modalità di cura con le acque. In particolare catalogava le acque termali ischitane di cui si mostrava profondo conoscitore. Santorio Santorio (1561 – 1636), riprendendo le idee di Empedocle, Filistione e Ippocrate, per cui il corpo «*inspira ed espira*», sosteneva la «*perspiratio sensibilis et insensibilis*» e quindi l’importanza di bagni caldi, sudorazione e diaforetici.

Guido Cesare Baricelli (1574 – 1638), nella sua opera in 4 volumi *De hydronosa natura sive de sudore umani corporis*, approfondiva la natura e la terapia della sudorazione umana.

Il Settecento, “secolo dei lumi”, parlava di un “principio vivificatore”, specifico per le diverse fonti termali e soprattutto non imitabile o sostituibile da preparati di altra natura. Nell’Illuminismo quindi si raccomandava un’accurata pulizia per liberare la pelle dallo sporco che poteva bloccare le funzioni superficiali, la liberazione dei pori per dinamizzare il corpo, la ripetuta detergenza per favorire l’espulsione degli umori ed una grande attenzione ai flussi sanguigni e alla salubrità dell’aria. Da ciò derivava la ripresa dei bagni privati e termali soprattutto nelle classi più agiate. La nobiltà riscopriva così il termalismo che diveniva sempre più praticato assumendo i caratteri di un fenomeno sociale tra cura del corpo e abitudine di vita. Nascevano in quel tempo gli stabilimenti termali di San Pellegrino, Recoaro, Monte Catini e Salsomaggiore, ambiti luoghi di cura, riposo e ricreazione.

Una vera e propria “sublimazione della detergenza e del termalismo” è rappresentata dall’ambizioso progetto voluto da Benedetto XIII nel 1725 e dedicato a «*neglectis rejectisque ab omnibus prurigine lepra et scabie in capite laborantibus...*». Si trattava dell’Ospedale dermosifilopatico di Santa Maria e San Gallicano, “l’ospedalone”, che fu il primo e unico nosocomio al mondo esclusivamente dedicato alle malattie della pelle ed ancora oggi molto attivo. Prima di procedere alla sua realizzazione fu scelto un idoneo terreno in Trastevere ai piedi del Gianicolo, sulla cui sommità si trovava un’importante fontana, punto di arrivo di un grande acquedotto che convogliava le salubri acque sorgive dall’agro braccianense e da altre zone limitrofe. Nel favoloso progetto, realizzato da Raguzzini, era stato previsto un abbondante flusso corrente di acqua per tutte le necessità dell’ospedale ed in particolare, attraverso una specifica canalizzazione, la distribuzione dell’acqua ad ogni singolo letto di degenza. In tal modo il paziente poteva autonomamente, oltre a fruire delle proprietà dell’acqua bevendola e lavandosi, anche liberarsi dei suoi rifiuti direttamente scaricati nelle fogne dell’adiacente Tevere. Il rigoroso regolamento dell’ospedale prevedeva, per la cura dei malati, preventivi lavaggi e prolungati bagni in idonee vasche marmoree, specifici impacchi, l’assunzione delle acque con tempi e modalità precise, nonché il loro impiego per la realizzazione di originali galenici, rimasti veri e propri monumenti terapeutici nella storia della dermatovenereologia. Molti dei Direttori che si sono succeduti alla guida del nosocomio (Casimiro Manassei, Domenico Maiocchi, Gaetano Ciarrocchi etc.) sono stati convinti cultori e propugnatori delle

terapie termali. Vincenzo Chiarugi (1759 – 1820) primo Cattedratico di Dermatologia in Italia, nel suo *Saggio sulle malattie cutanee sordide* (1799), affermava che le malattie croniche eruttive (tumori, ulcere, squame, croste ed altre) «*deturpando la superficie del corpo, lo rendono orrifico ed abominevole*» e che quindi per la loro cura potevano essere utili detersioni, impacchi, lavaggi, abluzioni etc. Come pure dava «estrema importanza alla pulizia e alla cura dei malati cutanei...i quali dovevano usufruire di bagni caldi, freddi, medicati e di vapore». Un originale e poliedrico personaggio, Francesco Nicola Maria Andria (1747 –1814), scriveva nel 1775 il suo stimato e più volte riedito *Trattato delle acque minerali*, delle quali analizzava a fondo composizione e proprietà. Si tratta di un'importante opera di crenologia che costituisce un vero progresso sulla conoscenza delle proprietà e dell'uso terapeutico, diversificati per ogni singola malattia. Giuseppe Pasta (1742 – 1823), esperto di idrologia, nel suo importante lavoro *Delle acque minerali del Bergamasco* (1788) raccomandava l'impiego di dette acque anche per la cura delle malattie della pelle e di quelle veneree.

Da qui alle nuove visioni dell'Ottocento il passo risulta breve.

In questo periodo comparivano importanti pubblicazioni e trattati di igiene.

Si affermava il ruolo funzionale della detergenza e del termalismo al fine di assicurare o migliorare il funzionamento della pelle e dell'organismo. Ciò anche in base al diffuso "allarme microbico" secondo il quale la pelle conteneva germi nascosti e la loro trasmissione poteva avvenire per contatti diretti, soprattutto manuali. Era nozione comune infatti che il bagno riducesse il numero dei germi sulla pelle e che la detergenza annullasse l'infezione e rafforzasse gli organi, secondo la "teoria dell'ossigenazione della pelle".

Il seppur ancor non ben definito concetto di una generica azione chimico-farmacologica delle acque, promuoveva l'idrologia a vera e propria disciplina scientifica, realizzando le indicazioni di Morgagni, Redi, Spallanzani, Galvani e di molti altri scienziati. Fra questi anche autorevoli dermovenereologi hanno contribuito efficacemente all'affermazione del Termalismo. Domenico Barduzzi (1847 - 1929), primo docente di Dermosifilopatia nel 1883 a Pisa, era un convinto assertore della necessità di una stretta vigilanza chimica e batteriologica delle acque. Cultore dell'idrologia e dell'idroterapia, divenne nel 1885 Direttore delle terme di San Giuliano. E il suo successore, Celso Pellizzari (1851 - 1925), anch'esso studioso di acque e radiazioni solari, fondò nel 1905 l'Istituto Fototerapico di Firenze.

Nell'Ottocento, "secolo d'oro della Dermatologia", si affermavano in Europa i più grandi esponenti della nostra disciplina: Robert Willan (Inghilterra 1751 – 1812) che classificava le malattie cutanee, Ferdinand Von Hebra (Vienna 1816 - 1880) primo cattedratico di dermatologia nel 1848, Louis Alibert (Parigi 1768 - 1837) definito "padre della dermatologia francese...ed europea", tutti convinti sostenitori delle pratiche della detergenza e del termalismo.

I loro allievi successori raccoglievano la preziosa eredità e proseguivano l'opera intrapresa.

Nel Novecento ricerche, studi e pubblicazioni nelle varie nazioni europee contribuivano ad approfondire le proprietà e i vantaggi del termalismo.

Ne è testimonianza anche l'imponente trattato *La pratique dermatologique: traité de dermatologie appliquée* (1900-1904) di Ernest Besnier, Louis-Anne-Jean Brocq e L. Jacquet, ancora oggi considerato "la Bibbia della dermatologia". Sul piano pratico Brocq nel suo *Précis de pratique en dermatologie* (1921), prescriveva ai suoi pazienti dell'Hospital Saint Louis di Parigi il lavaggio delle zone glabre con sapone e acqua piovana o bollita, 1/2 bagni tiepidi per settimana, il lavaggio dei capelli ogni 2/3 settimane e la regolare frequentazione delle terme.

In Italia Maiocchi proclamava «*la fine dell'illuminata empiria dei vecchi cultori delle cure idrologiche*» e sosteneva ricerche sperimentali farmacologiche per definire organi bersaglio e meccanismo d'azione di tutte le acque termali.

La scoperta del fenomeno della dissociazione ionica e la comprovata presenza in talune acque di gas rari, di sostanze chimiche o di radioattività, permetteva di definire l'acqua termale un «*complesso organismo vivente seppur in un equilibrio instabile*».

Ormai le terme venivano concettualmente considerate presidi medici e le loro acque rimedi farmaceutici efficaci.

Marcello Comel (1902-1995), cultore e originale fautore dell'idrologia medica, parlava di terapia idrologica oligometallica ed elaborava un *Saggio di Idrologia Funzionale*. E su questa stessa scia poi procedevano illustri dermatologi quali Mian, Agostini, Cervadoro, Cristofolini e molti altri, ancora oggi attivi ed operanti.

Analogamente la luce solare, da sempre amata e ricercata, assumeva un ruolo strategico nella pratica talassoterapica per la cura di molte malattie cutanee e generali, rachitismo, malattie tubercolari etc., ma soprattutto per la cura della pelle.

L'immersione dell'intero corpo o delle singole zone malate (balneo-terapia) risultava indicata in molte malattie cutanee come psoriasi, eczemi, dermatiti seborroiche e atopiche, acne rosacea, lichen planus, sindromi pruriginose, foruncolosi, micosi, orticarie, intertrigini e molte altre.

L'acqua termale associata a radiazioni ultraviolette (balneo- foto-terapia) esercitava proprietà antinfiammatorie, antiossidanti e antipruriginose, particolarmente utili nelle dermatiti in genere e negli esiti di ustioni.

I fanghi a base di argilla, raccolta nei crateri naturali o maturate in apposite vasche, per il suo calore e i meccanismi di scambio diversi a seconda delle sue componenti, si dimostravano anch'essi utili in ambito dermatologico.

Negli ultimi tempi, nel più ampio orizzonte di Dermatologia cosmetologica, l'azione detergente, levigante e decongestionante di talune acque e comunque del termalismo in genere, appare sempre più indicata anche per le pelli sane al fine di un loro buon mantenimento o miglioramento. Da ciò deriva il crescente ricorso al loro uso topico sotto le più svariate forme di bagni, immersioni, idromassaggi, docce filiformi, nebulizzazioni etc. Anche molto richiesti i fanghi termali e le maschere di argilla che applicate sulla cute si essiccano e, con la loro azione assorbente e relativa perdita di acqua, svolgono un effetto peeling meccanico e quindi un'esfoliazione dello strato corneo superficiale, utile per ottenere una nuova superficie più levigata e luminosa.

I bagni sulfurei salsobromiodidici, in grado di stimolare il microcircolo e l'attivazione della termoregolazione, favoriscono la lipolisi e quindi vengono consigliati anche per i temuti e frequenti processi lipodistrofici e cellulitici.

Il termalismo oggi, in ambito dermocosmetologico, non è più impiegato solo per la cura delle dermatopatie, ma anche per il trattamento degli inestetismi e sempre più per il buon mantenimento della salute della pelle e la prevenzione del suo invecchiamento (antiaging).

In conclusione, dopo una lunga e gloriosa storia e le molteplici vicissitudini della detergenza e del termalismo, dobbiamo constatare che oggi al classico termalismo terapeutico, “sociale” e perciò “assistito” dallo Stato, si affianca sempre di più un “termalismo cosmetologico” o del benessere. Ciò alla ricerca di una migliorata estetica e di un globale equilibrio psicofisico, come anche recentemente è stato affermato da Gervadoro G., Strani G. e Cervadoro E. nel loro lavoro *Dermatologia e termalismo*, pubblicato su *Il Dermatologo* nel Marzo 2017.

Prof. Luigi Valenzano, già Primario Dermatologo Istituto Dermatologico San Gallicano, Roma

Per la corrispondenza: valenzano@tiscali.it

Conferenza

6 marzo 2018

---

## Dal Laboratorio alla Clinica: le nuove scienze bio-mediche tra etica, creatività e tecnologia

**F. Belli**

Le biotecnologie costituiscono una delle frontiere estreme della ricerca e stanno trasformando per sempre la scienza e il nostro modo di intendere la natura e noi stessi; pongono straordinarie sfide culturali, politiche e sociali, come l'accesso ai dati genetici, le nuove prospettive della terapia attraverso la medicina personalizzata, le applicazioni sempre più sofisticate della ricerca di base, dal laboratorio, alla clinica. In particolare, la genetica oggi coinvolge ogni aspetto della nostra vita, dalla medicina all'alimentazione, dall'agricoltura alle indagini poliziesche e forensi; le sue applicazioni pratiche "creano" nuove terapie. A livello etico, filosofico e psicologico, ne scaturisce una congerie di argomenti su cui si concentra un acceso dibattito: attrazione o repulsione verso la prospettiva di conoscere tutti i segreti del nostro genoma, ambizioni di immortalità, vita sintetica o artificiale, ricerca di DNA di esseri estinti, clonazione e nuove modalità riproduttive, cibi transgenici; sono tutti temi che dobbiamo imparare ad affrontare con razionalità e senso di responsabilità, senza lasciarci prendere da entusiasmi acritici o da paure immotivate<sup>1</sup>. Fino all'ultima frontiera: l'editing e la manipolazione del nostro e di altri genomi. In quest'ambito, CRISPR-Cas9, introdotta solo 4 anni fa, si propone già come una metodica di riferimento per semplicità, precisione ed economicità, superiore alle altre finora utilizzate e dalle enormi potenzialità anche nella pratica clinica<sup>2</sup>; messa a punto nelle impostazioni teoriche da J. Doudna, grande esperta in RNA e dalla microbiologa E. Charpentier, è stata impiegata ben presto in sperimentazioni sulle cellule eucariotiche, comprese quelle umane, grazie al lavoro di F. Zhang<sup>3</sup>, già famoso per aver ideato l'optogenetica e di G. Church<sup>4</sup>, biologo visionario e futurista. Questi ricercatori, indicati come prossimi premi Nobel, si sono comunque avvalsi di precedenti, fondamentali osservazioni di altri non meno importanti scienziati, a iniziare da F. Mojica<sup>5</sup>, cui si deve la prima osservazione in un batterio, *Haloflex mediterranei*, e poi in altre specie di batteri e archeobatteri, di sequenze ripetute di origine virale, un archivio connesso con la difesa immunitaria, poi denominato da lui stesso CRISPR.

Dopo soli 18/24 mesi dalla comparsa ufficiale di CRIPR-Cas9 sulle principali riviste scientifiche, sono stati pubblicati da ricercatori cinesi i primi due articoli riguardo l'utilizzo della nuova tecnica su cellule germinali umane: era quasi inevitabile che prima o poi apparissero reports di esperimenti, con le nuove tecniche di editing genetico, sulle cellule embrionali e germinali umane, dunque in grado di indurre modificazioni ereditabili dalla progenie e teoricamente irreversibili. I due studi, che riporteremo più avanti in dettaglio,

non hanno dato i risultati sperati; riguardavano, il primo, la possibilità di prevenire le mutazioni responsabili delle talassemie, il secondo, di replicare nel gene codificante il corecettore CCR5 dei linfociti una rara mutazione che rende le cellule resistenti all'infezione da HIV. Ma tanto è bastato per rinfocolare polemiche e dibattiti sulle sperimentazioni nelle cellule staminali ed embrionali umane, come già avvenuto in passato con l'introduzione di nuove procedure (DNA ricombinante, clonazione).

CRISPR è comunque ritenuta la maggior innovazione biotech dai tempi della PCR<sup>6</sup>: ci chiediamo se sia una scoperta o un'invenzione, un processo naturale o una piattaforma tecnologica, dato che in definitiva è un'arma di difesa dei batteri dalle infezioni; non è una differenza di poco conto, perché alla sua definizione sono legati brevetti, premi e un giro vorticoso di denaro. Rimane, indiscutibile, la creatività degli scienziati, che sono stati in poco tempo capaci di applicarla alle cellule eucariotiche in migliaia di impieghi: fondamentale è che coloro i quali si aggiudicheranno i diritti di proprietà intellettuale, li facciano sempre valere nella ricerca pubblica.

Rimangono, per ora inconciliabili, da una parte la visione secondo cui il lavoro dei genetisti segna un progresso, dall'altra l'opinione che sia solo il più recente esempio di "hybris"<sup>a</sup> scientifica, una colpa che ci condurrà in modo inevitabile ad una catastrofe morale, fisica ed ecologica<sup>7</sup>.

Ma come siamo arrivati a questo punto della ricerca, dei successi scientifici, ma anche delle polemiche? Facciamo un po' di storia.

## STORIA

**Seconda metà dell'ottocento.** G. Mendel pubblica nel 1866 il saggio comprensivo dei suoi studi sull'ereditarietà, sintetizzati in 3 leggi generali: principio di segregazione, assortimento indipendente, principio di dominanza e puntualizza il metodo statistico con cui formulare e prevedere i risultati degli incroci. Mendel, a differenza di altri percorsi di ricerca, non ha predecessori: *"è stato il primo a concepire in maniera del tutto originale un approccio sperimentale geniale per risolvere il problema dell'eredità"*<sup>8</sup>; idea e applica 3 percorsi di ricerca innovativi e originali: separazione concettuale dei meccanismi ereditari da quelli dello sviluppo; metodi probabilistici e statistici per stabilire i rapporti numerici tra i componenti di una progenie; scelta dell'organismo modello più adatto per lo studio dell'eredità.

---

<sup>a</sup>ὕβρις: «insolenza, tracotanza», nella cultura greca antica è la personificazione della prevaricazione dell'uomo contro il volere divino; è la colpa per la quale Prometeo viene punito in eterno<sup>9</sup>.

Nelle opere di Mendel rintracciamo i concetti di fattori ereditari (poi chiamati geni), genotipo e fenotipo, dominante e recessivo, omozigosi ed eterozigosi, eredità mono/polifattoriale. Sono studiati e differenziati gli ibridi in costanti e variabili.

Il lavoro di Mendel non fu all'epoca apprezzato e diffuso, anzi persino osteggiato e cadde nell'oblio per circa quarant'anni.

Mendel lesse le opere di Darwin (non viceversa), senza accorgersi della complementarità di molti spunti. Darwin studiò le piccole variazioni continue e quantitative, che non manifestano le proporzioni mendeliane; aveva in mente una teoria dell'ereditarietà per mescolamento (sbagliata) e non possedeva una formazione statistico-matematica, che gli consentisse di interpretare i dati ottenuti mediante incroci con la stessa chiarezza mendeliana.

Sul finire del secolo, viene dimostrato il ruolo della meiosi come processo fondamentale nella riproduzione sessuale; nel 1876 A. Weismann propone la distinzione tra cellule somatiche e germinali e afferma che il materiale genetico che si trasmette nelle generazioni è contenuto nel nucleo; nel 1879 W. Fleming, impiegando coloranti specifici per il nucleo, individua i cromosomi.

**1900-1940.** Nel 1900 tre botanici, H. De Vries, C. Correns e E. Tschermak riscoprono il lavoro di Mendel caduto quasi nell'oblio; H. De Vries descrive e introduce il termine mutazione. Si intensificano gli studi sulla struttura del nucleo cellulare, i caratteri mendeliani sono associati ai cromosomi, ove vengono localizzati e allineati i geni, depositari delle manifestazioni fenotipiche; le leggi di Mendel sono integrate nella visione evuzionistica darwiniana, dando origine ai programmi di ricerca di sintesi moderna.

Sono scoperte e studiate numerose mutazioni; abbiamo i primi riscontri di patologie ereditarie connesse con anomalie genetiche: nel 1902 L. Cuenot dimostra che nei topi l'albinismo è un carattere mendeliano recessivo e A. E. Garrod dimostra la prima malattia genetica umana ereditaria, l'alcaptonuria, trasmessa anch'essa con un carattere mendeliano recessivo.

Nel 1902 W. Bateson, all'epoca il maggior esperto delle relazioni tra variabilità ed evoluzione, chiama la scienza che studia l'ereditarietà "genetica" e dà impulso alla biologia cellulare; introduce il concetto di allele. Contemporaneamente, T. H. Morgan, considerato il fondatore della genetica moderna, inizia ad analizzare i cromosomi e la dislocazione dei fattori ereditari (geni); introduce i concetti di linkage e crossing-over, fonda la citologia genetica; è tra i primi a condurre esperimenti su *Drosophila melanogaster*, ove dimostra il 1° carattere legato al sesso, il colore degli occhi, che dipende da geni presenti o assenti nei cromosomi sessuali, che codificano per proteine legate a pigmenti della retina.

Nel 1910 W. L. Johannsen definisce i termini di gene, genotipo e fenotipo e differenzia i caratteri ereditari legati a uno o più geni (eredità mono/poligenica).

Nel 1926 H. J. Muller afferma: *"il gene è la base della vita, un concetto unificante che determina la dinamica cellulare e le cui modificazioni, rigidamente riproducibili nei processi ereditari, sono la base dell'evoluzione darwiniana"*<sup>10</sup>. In precedenza aveva scoperto gli effetti mutageni delle radiazioni, mentre C. Auerbach dimostrava la mutagenesi da iprite e altre sostanze chimiche.

Negli anni '30 G. W. Beadle, E. L. Tatum e B. Ephrussi approfondiscono le funzioni

dei geni nel campo della biochimica e raccordano quest'ultima con la genetica: ogni reazione biochimica è controllata da uno o più specifici geni e ogni gene contiene l'informazione per la sintesi di un enzima. A. Sturtevant inizia la mappatura dei geni sui cromosomi di *Drosophila* e T. S. Painter (1934) su quelli umani. S. Benzer, studiando i fagi, afferma che i geni sono formati da numerose sub-unità: pur senza conoscerli, preconizza i nucleotidi. Nel 1940 B. McClintock scopre i trasposoni.

Negli anni prima della guerra assistiamo ad un grande sforzo dottrinale per legare genetica ed evoluzione: protagonisti sono E. Mayr nelle scienze naturali, G. G. Simpson in paleontologia, J. B. Sanderson-Haldane e S. Whright in analisi statistica, J. Huxley che propone la "sintesi moderna"; vengono pubblicate opere fondamentali, quali *"The genetical theory of natural selection"*, di R. Fisher, 1930; *"Genetics and the origin of species"*, di T. Dobzhansky, 1937, ma soprattutto *"What is the life"*, del fisico E. Schrödinger, 1938, che può essere considerato l'incipit delle moderne scienze bio-mediche; si affrontava l'organizzazione cellulare da un punto di vista fisico, pur riconoscendone dei limiti: una cellula vivente ha in se un ordine che risponde a leggi della natura. Schrödinger era convinto che i cromosomi contengono un codice cifrato con scritto l'intero disegno dello sviluppo dell'individuo e le basi dell'ereditarietà e che tale codice è semplice come quello binario o l'alfabeto Morse<sup>11</sup>.

**Anni '40: non solo guerra.** F. Griffith ipotizza che negli streptococchi la trasmissione dei caratteri ereditari è insita in un'unica molecola, sconosciuta; nel 1944 O. Avery, C. McLeod e M. McCarthy individuano questa molecola nel DNA, non solo nei batteri, ma nella quasi totalità degli esseri viventi. I fisici L. Pauling e E. Schrödinger portano un grande contributo alla comprensione della struttura del DNA, utilizzando metodiche di loro competenza.

E. Chargaff dimostra i rapporti quantitativi fra le 4 basi azotate, ponendo le basi per la comprensione dell'accoppiamento adenina/timina e citosina/guanina. I tempi sono ormai maturi per identificare ed interpretare il codice molecolare della vita e le basi strutturali dell'ereditarietà.

**Anni '50.** R. Franklin e M. Wilkins nel 1951-52 ipotizzano la struttura elicoidale del DNA, quale appare in immagini, ormai divenute storiche, ottenute mediante diffrazione ai raggi X dalla stessa Franklin e da L. Pauling. L'anno successivo, nel numero del 25 Aprile 1953 di *Nature*, compare il lavoro epocale di J. Watson e F. Crick<sup>12</sup> in cui è descritto il modello a doppia elica del DNA: è la pietra miliare per le scienze bio-mediche, tale da segnare uno spartiacque definitivo fra ciò che si sapeva prima e quanto verrà compreso dopo questa dimostrazione.

Nasce la biologia molecolare, che sposta il focus degli studi da un piano prettamente chimico-fisico, strutturale, alla comprensione di "come funziona" il codice genetico; emerge *"l'esistenza di oggetti (organismi) naturali dotati di un progetto, di un programma, risultato della storia evolutiva"*<sup>13</sup>.

Dopo il 1951 sono clonate e immortalizzate le prime cellule, le famose "HeLa": saranno utilizzate in 11.000 brevetti per vaccini, farmaci, test diagnostici e genetici, ricerche in oncologia, virologia, etc.

Nel 1954 F. Crick dimostra che una delle due eliche del DNA può essere lo stampo per una molecola complementare, svelando così il meccanismo di auto/replicazione dell'acido nucleico. Nel 1956 F. Crick, S. Brenner, L. Barnett e R. J. Watts-Tobin scrivono: *“La specificità dei sistemi biologici è determinata esclusivamente dall'informazione contenuta negli acidi nucleici, la quale, letta attraverso un codice, passa alle proteine, ma mai viceversa. Abbiamo decifrato tale codice: la corrispondenza fra una tripletta di basi nucleotidiche (codone) e uno specifico aminoacido oppure un segno di punteggiatura nel messaggio genetico. Questo codice è universale, è lo stesso in tutti gli organismi conosciuti, il che costituisce un'ulteriore dimostrazione della validità della teoria darwiniana dell'evoluzione”*<sup>14</sup>. A fine decennio M. W. Nirenberg e coll. dimostrano la trascrizione e la traduzione dell'informazione genetica dal DNA, all'RNA alle proteine, mentre S. Luria e M. Belbruck analizzano i geni a livello sub-microscopico, mediante la cristallografia.

**Anni '60.** F. Jacob, J. Monod e A. Pardee (1961) studiano i meccanismi di regolazione genica<sup>15</sup>; i geni sono gli stessi in tutte le cellule di un organismo, ma varia la loro espressione (attivazione o repressione, con diversi gradi di variabilità), il che conduce alla differenziazione morfo-funzionale delle stesse cellule in più citotipi. Sono evidenziati gli aspetti funzionali dei geni, le gerarchie funzionali, il grado di espressione nel determinismo del differenziamento cellulare e dell'acquisizione di funzioni specifiche.

S. Brenner studia ed espone i principi dell'apoptosi.

Nasce l'epigenetica, che studia *“le relazioni tra patrimonio ereditario e le variazioni prodotte dall'influenza delle condizioni ambientali, spostando l'accento dalla sequenza agli eventi cellulari che controllano, modulano e regolano l'espressione dei geni, anche in risposta a stimoli ambientali”*<sup>1</sup>. In pratica, si occupa di tutti i cambiamenti di espressione e regolazione dei geni che non implicano modifiche della sequenza primaria del DNA, bensì della componente proteica del cromosoma. Alcune di queste modifiche possono ereditarsi per più generazioni.

**Anni '70.** E' un decennio di grandi innovazioni tecnologiche: tante conoscenze teoriche precedentemente acquisite vengono tradotte in applicazioni pratiche attraverso metodologie decisamente rivoluzionarie; nel 1975 G. Koehler e C. Milstein ottengono i primi anticorpi monoclonali<sup>16</sup>; F. Sanger mette a punto le tecniche per il sequenziamento del DNA<sup>17</sup>: nel 1980 avrà il suo secondo Nobel, il primo lo aveva ricevuto nel 1968 per la determinazione della sequenza dell'insulina; sono condotti esperimenti preliminari di clonazione, terapeutica o riproduttiva.

Momento topico è l'introduzione, con le prime applicazioni, della tecnologia del DNA ricombinante: permette di “creare” sequenze di DNA che non esistono in natura, assemblando frammenti anche eterogenei, persino da specie differenti (non esistono barriere specie-specifiche per il funzionamento di un gene), mediante enzimi di restrizione e polimerizzazione (W. Arber e H. O. Smith); ceppi di *E. coli* accolgono nuovi geni che codificano per proteine sintetiche: vaccini, ormoni (somatostatina, insulina, EPO), farmaci (interferone), fattori della coagulazione. S. Cohen e H. Boyer ottengono i primi organismi OGM (in *E. coli* innestano geni di stafilococchi e anfibi e la progenie è capace di duplicarsi).

Nel 1976 R. Dawkins pubblica “Il gene egoista” (*“I geni non sono agenti morali, la loro apparente volontà di affermazione è il risultato di quel gioco di probabilità che è la selezione naturale”*)<sup>18</sup>.

**Anni '80.** Nel 1983 K. B. Mullis mette a punto la PCR, Polymerase Chain Reaction<sup>19</sup>. Sono “creati” i primi animali (in particolare topi) transgenici: dopo 20 anni ne saranno sequenziati anche i genomi.

S. J. Gould, uno dei massimi pensatori scientifici della nostra epoca, enuncia le 3 teorie fondamentali della nuova biologia: “Evo-Devo”, “Punctuated equilibria”, “Exaptation”<sup>20</sup>.

**Anni '90.** Il pensiero di Gould e altri scienziati innovativi, dà impulso alla “Biologia evuzionistica”, applicando i principi e le più recenti scoperte della genetica all'evoluzione umana e animale. Un esempio sono i geni omeotici, in comune fra più specie, ancestrali, ereditati durante l'evoluzione delle specie, alla base di eventi fondamentali dello sviluppo; spesso mutazioni di questi geni sono alla radice, in diverse specie animali, della comparsa di nuovi caratteri (persino organi) o di nuove specializzazioni morfo-funzionali di strutture pre-esistenti, come il gene Pax6 nelle sue numerose varianti che è alla base della formazione di quasi tutti i tipi di occhio nei vertebrati (uomo incluso) e negli invertebrati.

A. Fire e C. C. Mello dimostrano sequenze regolatorie dei geni nel DNA non codificante.

Nasce la terapia genica: Il 1° intervento coronato da successo è del 1990, in un bambino affetto da S.C.I.D; nel 2016 una leucemia linfoide acuta sarà guarita ingegnerizzando i linfociti T. Oggi la base di ogni terapia genica consiste nell'introdurre nelle cellule bersaglio un tratto di DNA con i geni corretti al posto di quelli alterati (o assenti o comunque difettosi) mediante un vettore virale plasmidico; a seconda delle cellule interessate, parliamo di terapia genica somatica o germinale: in questo secondo caso la correzione introdotta si trasmetterà alla progenie.

**Clonazione.** Nell'ultima decade del '900 e ora nel nuovo millennio si hanno i primi risultati concreti di un complesso di studi che sfocia nella clonazione di esseri viventi. In realtà dobbiamo risalire al 1891 e alle pionieristiche indagini di H. Driesch sui ricci di mare (Napoli, stazione zoologica); nel 1938, H. Spemann condusse esperimenti per comprendere se il nucleo di una cellula differenziata fosse riprogrammabile al punto di ripercorrere un percorso evolutivo e differenziativo come una cellula uovo. Fra il 1940 e il 1960 furono eseguiti tentativi di transfer, veri e propri trapianti, di nuclei di cellule somatiche differenziate in cellule-uovo della stessa specie, private del nucleo; ricordiamo R. Briggs e T. J. King, che lavoravano sulla rana leopardo, J. Gurdon sul rospo africano. Lo stesso Gurdon e S. Yamanaka studiano in seguito la riprogrammazione cellulare e concepiscono le “cellule staminali indotte”: si riprogrammano cellule somatiche adulte e già differenziate; queste cellule, sdifferenziatesi, possono guidare lo sviluppo di un embrione che, una volta trapiantato in utero, si sviluppa in un nuovo individuo identico (clone) genetico di colui da cui è stata prelevata la cellula somatica.

1996: I. Wilmut e K. Campbell, a Edinburgo, annunciano di aver clonato la prima pecora, Dolly, partendo da una cellula somatica di adulto, prelevata dalla ghiandola

mammaria, riprogrammata e trasferita in una cellula uovo anucleata. Nel 1997 R. Yanagimachi procede alla clonazione di una topolina, Cumulina, cui seguiranno figli e nipoti per tre generazioni di cloni derivati dal primo esemplare. Negli anni successivi vengono clonati anfibi, topi e bovini partendo da cellule embrionali; nel 1999 in Italia è clonato un toro, Galileo. Ormai si clonano diverse specie di animali: per l'allevamento e la zootecnia, al fine di migliorarle elevando la qualità zootecnica, ma anche per scopi commerciali e ludici. La clonazione può sostituire le tecniche degli incroci e delle ibridazioni, impiegate per 10.000 anni dall'uomo per piante e animali: si producono cloni identici di quegli esemplari che si rivelano migliori e più adatti ad un determinato fine (OGM: Organismi Geneticamente Migliorati).

**Anni 2000.** Il 26 Giugno 2000 viene presentata la bozza del primo sequenziamento (quasi) completo del genoma umano; i dati furono pubblicati su *Science* e *Nature* nel febbraio 2001 (Human Genome Project); anche enti privati conducono a termine il sequenziamento del nostro genoma: tra questi, la "Celera Genomics" di C. Venter<sup>21</sup>. I geni umani sono circa 22.000. Al 2016, risultano sequenziali i genomi di 21.173 specie animali, viventi o estinti.

L'indagine archeo-paleontologica si avvale della ricerca del DNA antico; sono persino in corso tentativi di riportare in vita animali estinti (de-estinzione), invertendo molecolarmente il processo di estinzione.

C. Venter si dedica a produrre organismi sintetici (vita o biologia sintetica), riscrivendo, riprogettando e trapiantando in cellule viventi codici genetici sintetici. *"Oggi l'ingegneria genetica mediante operazioni di taglia, copia e ricuci riunisce sequenze di DNA differenti in modo da ottenere combinazioni di geni che non esistono in natura; le biotecnologie stanno entrando nell'era delle forbici molecolari a basso costo, rapide e precise, che permettono una vera e propria correzione delle bozze genetiche su larga scala o genome editing"*<sup>22</sup>. Venter ha ottenuto micoplasmi sintetici il cui genoma comprende circa 500 geni<sup>23</sup>.

**Sequenziamento.** Per molti anni le tecniche di sequenziamento hanno consentito di ricostruire solo brevi tratti di DNA, un po' più lunghi per RNA (tecnica EST, indicatore di sequenza espressa); quando i sequenziatori automatici sono progrediti, abbiamo assistito ad un vero e proprio boom del sequenziamento dei genomi, da quello umano a centinaia di altri esseri viventi, attuali e persino estinti. In successione, nel 1965 fu ricostruito un tRNA batterico e due anni dopo rRNA di *E. coli*; nel 1976 venne sequenziato il genoma di un virus a RNA, il batteriofago MS2 e nel 1977, ad opera di Sanger, di un virus a DNA, phi X 174, batteriofago di *E. coli*, contenente 5386 basi, che vent'anni dopo sarà riprodotto sinteticamente da Venter, dimostrando altresì come forma sintetica e forma naturale siano parimenti infettanti. Tra il 1995 e il 1997 Venter sequenzia il primo batterio (*H. influenzae*), il primo micoplasma, *genitalium*, che servirà da base per la cellula sintetica ottenuta nel 2010 e il primo *Archaea*, *Methanococcus jannaschii*. La metodica impiegata è "Genome Shotgun Sequencing", utilizzata anche nel 2000 per il genoma umano, insieme alla tecnica convenzionale di Sanger.

Va doverosamente segnalato che la distruzione di virus e altri microrganismi ormai

debellati, come il vaiolo, può non essere più definitiva: se ne sequenziamo il genoma e lo immagazziniamo in un database, rendiamo il patogeno praticamente immortale.

## **DALLE IBRIDAZIONI ALL'EDITING GENOMICO**

Per millenni, l'unico approccio al miglioramento di specie animali e vegetali sono stati gli incroci, ibridazioni "home-made": si mescolano i geni di due o più varietà parentali e tra le nuove generazioni, casuali, si scelgono le migliori e più idonee. Con l'ingegneria genetica si agisce solo sui geni bersaglio, ottenuti dalla stessa o altre specie; finora è rimasta una prassi d'élite, con le tecniche convenzionali (nucleasi a dita di zinco, TALEN), lunghe, complesse e costose, pur se applicabili anche alle cellule umane. Con il DNA ricombinante si è fatto un passo in avanti formidabile, anche se rimane il problema della giusta posizione in cui il gene corretto o modificato va a inserirsi. L'editing genomico dovrebbe superare anche questo ostacolo. Il codice genetico, oltre che letto e interpretato, può anche essere ri-scritto, con interventi tecnologici sull'informazione genetica e ricadute sia nella sequenza che, soprattutto, nella funzione; le tecniche di ingegneria genetica permettono di intervenire volontariamente e direttamente sia sulle cellule somatiche, che su quelle germinali e quindi sul patrimonio ereditario, sollevando enormi questioni etiche e sociali.

Per "genome editing" si intende l'insieme di tecniche che consentono di modificare i genomi direttamente attraverso un copia/incolla molecolare, senza introdurre geni esogeni, della stessa o di altre specie<sup>24</sup>.

## **L'ULTIMA FRONTIERA DELL'EDITING GENOMICO: CRISPR-Cas9**

CRISPR è l'acronimo di "Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats". Nasce come un sistema di difesa per i batteri: può essere definita come la biblioteca o l'archivio, la memoria genetica di precedenti infezioni virali, acquisita e posseduta da un batterio, un patrimonio proprio o ereditato dalle sue ascendenze; ogni nuova infezione da parte di un batteriofago arricchisce la biblioteca, inserendo la memoria genetica anche del nuovo aggressore, predisponendo e acquisendo una difesa immunitaria contro di esso ed eventuali, successive infezioni, dunque una immunità istituzionalmente adattativa. Circa il 50% dei batteri conosciuti possiede questo macchinario di difesa; ad esso è collegato un sistema di enzimi, detti Cas (o CRISPR associati), che hanno il compito di accumulare nel genoma batterico copie di quello estraneo, perlopiù virale, sotto forma di RNA complementare e di mobilizzarlo, tagliandolo e isolandolo, ogni qual volta sia necessario, in caso di nuova infezione da contrastare; se il confronto fra la sequenza conservata e quella del nuovo virus infettante risulta positivo, quest'ultima sarà distrutta. Nei batteri sono stati individuati 5 diversi sistemi CRISPR, ogni specie ne possiede uno. Il più diffuso e simile a quello riprodotto in laboratorio per l'editing genomico è tipo II.

CRISPR nei batteri funziona così. 1) Prima infezione: un batteriofago inietta il suo genoma nel batterio (DNA o RNA a seconda della specie virale, qui per brevità parliamo solo di DNA). 2) Acquisizione: sequenze di DNA virale sono riconosciute grazie a piccoli motivi adiacenti detti PAM, che il batterio non possiede e dunque percepite come

estranee, tagliate e inserite nella regione CRISPR del genoma batterico. 3) Nuova infezione del virus precedente: anch'esso inietta il suo DNA nel batterio. 4) Maturazione e intervento di Cas9: dopo la nuova infezione virale, si attivano la regione CRISPR ed una adiacente: sono prodotti l'enzima Cas9 e un piccolo RNA, trasc, e una serie di RNA complementari per ciascuna sequenza di genoma virale registrata in CRISPR, sotto forma di un lungo filamento di RNA complementare. Cas9 forma un complesso con trasc e con ciascun RNA virale. 5) Riconoscimento: Cas9 riconosce esclusivamente e taglia in modo specifico un DNA estraneo quando il batterio ha una copia di questa sequenza (registrata nell'RNA complementare) nel suo sito CRISPR. Cas9 riconosce la sequenza PAM sul DNA estraneo e, mediante due RNA guida, la sequenza più lunga che lui stesso taglia a una distanza precisa da PAM. 6) Distruzione: una volta distrutto, il DNA virale non può più essere utilizzato per produrre le proteine necessarie alla replicazione del virus<sup>25</sup>.

**CRISPR in laboratorio, un sistema di “editare” il genoma, RNA-programmabile<sup>26</sup>**. Abbiamo imparato a sfruttare quest'arma naturale per allestire forbici molecolari che tagliano nelle cellule il DNA in un target specifico. Contrariamente ai metodi precedenti per modificare il genoma, i quali richiedevano enzimi specifici in ciascuna situazione, il sistema CRISPR-Cas9 utilizza sempre la stessa proteina enzimatica, Cas9, per ogni sequenza molecolare: il solo strumento specifico da costruire ad ogni impiego è un RNA che guida l'enzima Cas9 nel punto del genoma da tagliare; ma gli RNA sono più facili da preparare e maneggiare sia degli enzimi che del DNA stesso. Ecco come si procede. A) Costruzione di un RNA guida a singolo filamento, ottenuto dalla fusione tra la sequenza di un RNA batterico (trascrRNA) e l' RNA specifico complementare alla sequenza del DNA bersaglio da tagliare. B) Accoppiamento dell' RNA guida con l'enzima Cas9 (strumento CRISPR-Cas9). C) Introduzione nella cellula dello strumento CRISPR-Cas9; l'enzima, mediante l' RNA guida, trova la sequenza del DNA bersaglio. D) Cas9 taglia i due filamenti di DNA in un sito preciso; il DNA può essere riparato per ricombinazione con un DNA omologo sintetizzato e iniettato nella cellula, o modificato (ingegnerizzato) a piacimento, togliendo, aggiungendo o cambiando nucleotidi, in modo da interferire su struttura e funzionalità di geni.

Prima dell'utilizzo di Cas9, per tagliare il DNA in punti specifici si impiegavano enzimi di restrizione o endonucleasi, che andavano preparati ogni volta “su misura”, affinché agissero nel sito desiderato: dopo il taglio, la molecola poteva essere riparata, modificata o lasciata senza il frammento eliminato e in questo modo si silenziavano, attivavano o reprimevano geni. Pertanto, occorreva un lavoro lungo e difficoltoso per arrivare specificamente al bersaglio. Cas9 invece è un enzima universale, che agisce in modo specifico grazie alla guida ad RNA cui si lega: il complesso percorre il DNA, si muove come se rimbalzasse su di esso, si ferma ad ogni sequenza (ripetizioni palindromiche) complementare all' RNA e taglia il genoma in quelle corrispondenze. Gli streptococchi (i batteri in cui il sistema CRISPR è stato maggiormente studiato) utilizzano due RNA-guida in coppia; si è pensato, per semplificare il lavoro, in laboratorio, di unire le due molecole in un unico filamento-guida, che ai test preliminari si è dimostrato ugualmente efficiente. Dunque, lo strumento CRISPR funziona legando la proteina Cas9

con due RNA uniti a formare un solo filamento. I primi bersagli delle applicazioni della CRISPR-Cas9 in laboratorio sono stati geni da disattivare, silenziare o modificare, introducendovi sequenze diversificate. Inoltre è possibile effettuare in una stessa cellula più modifiche geniche, accorciando notevolmente i tempi rispetto al passato.

In definitiva CRISPR presenta le seguenti caratteristiche e peculiarità, rispetto alle tecniche di editing genetico precedenti: versatilità; facilità di preparazione e programmazione; precisione: agisce nei punti esatti prescelti del genoma ove effettuare le modifiche; efficienza: la percentuale di cellule in coltura in cui si ottengono mutazioni, che con i metodi ed enzimi precedenti non superava il 10 %, con CRISPR-Cas9 può raggiungere l' 80%; ecologica: non genera OGM "sensu stricto", perché non introduce geni dall'esterno (organismi intra o cis-genici e non transgenici); accuratezza; ampia applicabilità; economicità.

Il numero di pubblicazioni su riviste indicizzate con reports di sperimentazioni impieganti CRISPR in vari campi è passato da 282 nel 2013, a più di 600 nel 2014, 1259 nel 2015, oltre 4000 nel 2016 e circa 9.500 nel 2017.

Ma il progresso tecnico in questo campo è vertiginoso: già si parla di CRISPR di II generazione; si utilizzano altri enzimi, come Cpf11, ottenuto dal batterio *Franciscella novicida*: le caratteristiche di semplicità, economicità e velocità della CRISPR non solo sono conservate, ma persino accentuate e si prospetta un utilizzo a breve su cellule umane<sup>27</sup>. E' stata anche messa a punto una variante della CRISPR-Cas9 in grado di agire e modificare l'RNA; autore dell'innovazione è F. Zhang, che ha presentato la "CRISPR-C2c2", anch'essa mutuata dai batteri, ove il sistema è impegnato nella difesa da virus a RNA, come i retrovirus<sup>28</sup>. E' in progetto di modificare sequenze di RNA codificante e non-codificante, in particolare queste ultime, che spesso agiscono sull'espressione di geni, in modo da regolare tipo e quantità di proteine codificate.

**Applicazioni e prospettive**<sup>6</sup>. Con il sistema CRISPR-Cas9 si sono già realizzate o sono in fase avanzata di studio diverse sperimentazioni; ne ricordiamo le principali, in medicina, ma non solo. Creazione di piante resistenti a parassiti e patogeni, ad esempio un frumento tenero resistente ai funghi; riproduzione in modelli animali di malattie umane, quali la malattia di Duchenne (mediante la ricognizione delle mutazioni specifiche nel gene della distrofina), la tirosinemia e altre malattie metaboliche; analisi a tappeto del genoma del topo, > 20.000 geni, inducendo mutazioni nell'ambito dell'immunità, della risposta infiammatoria e della produzione di citochine, sia per uno studio dell'immunologia di base che per eseguire raffronti con l'uomo; riduzione della colesterolemia nei topi, interferendo con la sintesi delle proteine di trasporto: questo studio sarà replicato a breve anche in clinica umana; produzione e riprogrammazione in vitro di cellule staminali (staminali indotte), provenienti da individui affetti da anemia falciforme, con catene emoglobiniche normali: è prossima la sperimentazione clinica in questa e in altre malattie genetiche del sangue, come l'emofilia; terapia genica dell' AIDS: induzione di mutazioni nei recettori CCR5 in modo che risultino inadatti all'ancoraggio del virus nelle cellule umane, bloccando quindi l'infezione. Viene riprodotta in tal modo una rara situazione che permette ai portatori di questa mutazione di resistere naturalmente all'infezione da HIV. Il passo successivo sarà quello di creare farmaci o, meglio, vaccini preventivi che inducano una situazione

immunologica protettiva in tutti i soggetti trattati, simulante questa rara mutazione vantaggiosa.

Riportiamo anche la prima applicazione in vivo della CRISPR nell'uomo: linfociti prelevati da un paziente con cancro del polmone, sono stati modificati, mediante CRISPR-Cas9, in modo da disattivare il gene che codifica per la proteina PD-1, che normalmente inibisce la risposta T verso cellule tumorali. I linfociti modificati, amplificati in coltura, sono poi stati reinfusi nel paziente, con l'obiettivo di incrementare la risposta immune verso la neoplasia. Preliminarmente il test è stato eseguito soprattutto per saggiare la sicurezza della procedura; presto verrà esteso in altre patologie oncologiche per valutarne anche l'efficacia.

Sono in progettazione programmi per diagnosi e terapie personalizzate, mediante sequenziamento del genoma; si possono così individuare mutazioni geniche che predispongono o correlano con determinate malattie, ma anche rendere una cura più mirata, ad personam, prevedendo la risposta, positiva o meno, ai farmaci. Ricordiamo inoltre le modifiche indotte, mediante CRISPR, nelle zanzare per renderle incapaci di trasmettere la malaria e altre malattie parassitarie: in questo modo si possono generare insetti sterili o non più in grado di veicolare i patogeni, caratteri trasmessi alle generazioni di zanzare successive che, replicandosi in maniera esplosiva, si diffonderebbero nell'ambiente, soppiantando quelle naturali vettrici (*Anopheles population eradication or replacement*). Modifiche etologiche di questa portata non sono consentite, per ora, in molti paesi.

In conclusione, diverse sono le sperimentazioni in progetto o già avviate, in patologia umana, che prevedono l'utilizzo della CRISPR per correggere uno o più geni simultaneamente; ricordiamo le patologie genetiche, rare o più frequenti, nelle quali si vuole intervenire: fibrosi cistica, distrofia muscolare, dislipidemie congenite, anemia falciforme, HIV (disattivazione o mimetizzazione dei recettori linfocitari), corea di Huntington, amaurosi congenita di Leber, distrofia corneale di Meesmann, tirosinemia tipo I. Interessante anche il progetto per ottenere uova ipoallergeniche da animali editati, ove coltivare vaccini specifici per bambini allergici. Ci chiediamo infine se con questo approccio hanno possibilità di cura anche le cosiddette "patologie epigenetiche", un settore ancora da esplorare ma ricco di prospettive, che dipendono dall'espressione dei geni e dal grado di attivazione o repressione.

**Il "bestiario" di CRISPR.** Sequenziando il genoma di numerosi animali, ne apprendiamo le caratteristiche, similitudini e divergenze con quello umano, il che ci consente di "specializzare" diverse specie di animali per lo studio di singole funzioni o patologie, dopo averne "editato" uno o più geni: il topo per il cancro, il furetto per l'influenza, il toporagno per la fisiologia del cervello, maiali, pecore e soprattutto scimmie per le malattie neurodegenerative come il m. di Parkinson, la SLA, la corea di Huntington, l'autismo, la sindrome di Rett. L'editing genetico si propone anche in studi di fattibilità per un ritorno agli xenotrapianti, bypassando le divergenze e incompatibilità immunologiche (eliminando dal DNA di un animale antigeni e sequenze virali, creando specie "immune-friendly-Virus free" e clonandole con organi trapiantabili).

Se da una parte introduciamo tecniche sempre più raffinate e precise per manipolare i genomi, dall'altra aumentano le istanze per tutelare i diritti degli animali e ridurre l'utilizzo in laboratorio; le sperimentazioni con i primati sono sempre più rare e osteggiate. Anche in questo settore si è affermata la cultura delle 3 R: Replacement, Reduction, Refinement.

**CRISPR e cellule embrionali: reports (e polemiche) sulle prime sperimentazioni.** Sono stati pubblicati i primi tentativi di manipolazione genetica di embrioni umani mediante CRISPR (Huang et al, 2015)<sup>29</sup>. Si trattava di embrioni giudicati inadatti per una gravidanza a termine e far nascere bambini, in quanto, pur prodotti con la procreazione assistita, erano portatori di errori genetici, un eccesso di cromosomi. Sono stati modificati i geni che controllano la sintesi delle catene emoglobiniche, al fine di correggere i difetti congeniti della stessa emoglobina che sfociano nella talassemia. Questa prima sperimentazione si è risolta in un fallimento, poiché in <5% degli embrioni trattati è stata dimostrata la correzione genica e solo in poche cellule; inoltre, la CRISPR ha provocato una serie di reazioni a catena con la comparsa nella maggioranza degli embrioni di ulteriori modificazioni geniche, né previste né desiderate, pertanto in questo caso si è rivelata meno precisa e affidabile di tecniche di editing genetico convenzionali. Lo stesso gruppo cinese che ha effettuato la sperimentazione conclude che è ancora prematuro, da un punto di vista tecnico e procedurale, l'utilizzo della CRISPR per correggere difetti genetici umani nelle cellule embrionali. Una seconda sperimentazione, ad opera di un altro gruppo cinese<sup>30</sup>, su embrioni umani ha riguardato l'induzione di una mutazione nel gene che codifica per il recettore CCR5, una delle porte d'entrata di HIV nei linfociti, in modo da replicare una rara situazione naturale, individuata in alcuni soggetti, che rende le cellule umane resistenti al virus, non in grado di ancorarsi al recettore. Esito, problemi e considerazioni di questa seconda sperimentazione sono stati sostanzialmente simili alla prima.

I lavori hanno sollevato un diluvio di polemiche, apparse in editoriali su *"Nature"* e *"Science"*, le riviste che per prime hanno divulgato la CRISPR; si discute sull'opportunità di utilizzare questa e ogni altra tecnica di editing genetico per manipolare embrioni umani, in assenza di una chiara normativa di regolazione internazionalmente approvata, da un punto di vista etico ma non solo, dato che la problematica coinvolge inevitabilmente tutta la ricerca di base e applicativa in genetica e biologia molecolare, nonché la gestione dei finanziamenti pubblici e privati. Sperimentazioni e pubblicazioni hanno passato l'esame del comitato etico cinese e della rivista *"Protein and Cell"*, ma non quello di *"Science"* e *"Nature"*, che, bloccando i lavori, chiedevano anche di non passare ad applicazioni cliniche e una moratoria di ogni ricerca in campo umano (Academy of Sciences, 2015), estendendo le une e l'altra a tutti i gruppi di studio.

Società Scientifiche e Comitati Etici internazionali chiedono di perfezionare da un punto di vista tecnologico la CRISPR, la cui potenza è tale da promuovere mutazioni in eccesso, indesiderate e oltre l'ambito progettato (almeno, in base a questi dati, in cellule staminali e/o embrionali ad elevate potenzialità differenziative); allo stesso tempo devono essere discussi tutti gli aspetti etici, vecchi e nuovi, relativi ad una eventuale sperimentazione su cellule e tessuti umani, da quelle germinali, agli embrioni, all'individuo maturo, con l'approvazione di una normativa universalmente accettata<sup>31</sup>. Solo allora si dovrebbe riprendere il discorso sull'applicabilità clinica; ma è probabile, anzi certo, che

diversi gruppi, nel silenzio dei laboratori, continuano a lavorare e sperimentare su cellule ed embrioni umani. Il punto cruciale in definitiva è nell'eventualità di utilizzare la CRISPR o altre tecniche di editing genetico per mutare le cellule germinali ed embrionali umane, inducendo variazioni trasmissibili: il dibattito coinvolge la metodologia (è sicura? attuabile? quali sono le ricadute e gli effetti collaterali?), i risvolti economici, ma soprattutto il punto di vista etico. In un summit internazionale convocato per discutere al riguardo, si sono avute posizioni contrastanti, alcune estreme, da chi vuole bloccare tutta la ricerca a chi al contrario consentire tutto, pochi scienziati hanno assunto atteggiamenti intermedi più concilianti<sup>32</sup>.

Il dibattito verte sulle possibili applicazioni in campo umano, la correzione di difetti genetici, ma anche i rischi che si possono correre e dei quali sappiamo ben poco, manipolando embrioni così precoci, di interferire su aspetti peculiari quali quelli cognitivi e mentali; infine le possibili interferenze, volute o indesiderate, sui caratteri fisici che potrebbero preludere alla creazione di individui programmati su misura se non addirittura superuomini. Insomma, vengono inevitabilmente rispolverati temi che già l'eugenetica del secolo passato aveva suscitato. In alcuni casi la tecnica è ancora poco sicura, introduce sì le mutazioni previste ma anche altre indesiderate, talora con un effetto a catena, incontrollate e incontrollabili. E' prioritario il miglioramento metodologico e la messa in assoluta sicurezza della procedura; superati questi steps, diverrà pressante una nuova normativa a livello internazionale, accompagnata da un serio e obiettivo dibattito etico.

## BIOLOGIA E CELLULE SINTETICHE

La biologia sintetica "crea" organismi con un genoma in tutto o in parte artificiale, assemblato in laboratorio, in grado di replicarsi; base fondamentale è un codice genetico minimo, che contenga i geni assolutamente indispensabili per la vita. Nel 2010 C. Venter annuncia di aver generato in laboratorio un micoplasma, Synthia, formato da un genoma totalmente artificiale, ottenuto assemblando geni di altri micoplasmi, impiantato in una cellula naturale anucleata: è stato chiamato *M. micoides Jcv1-syn 1.0*<sup>33</sup>.

Una versione modificata di Synthia, 3.0, prodotta nel 2016, funziona con soli 473 geni<sup>34</sup>: la cosiddetta "cellula minima"; è in grado di dividersi e moltiplicarsi. A differenza delle versioni precedenti, il genoma non è stato ottenuto unendo sequenze naturali o modificate di altri micoplasmi, ma riprogettandone uno nuovo e originale, completamente sintetico, dopo un lungo lavoro di selezione informatica. Altri gruppi hanno preparato anche acidi nucleici con altri nucleotidi: nel 2014 è stato prodotto un batterio con DNA a sei basi, capace di auto replicarsi.

La biologia sintetica implica inevitabili interessi commerciali, la fruizione delle tecnologie e dei brevetti sia nell'ambito del pubblico che del privato, con ricadute economiche (investimenti, utili, guadagni) anch'esse coinvolgenti sfere del pubblico e del privato.

Secondo Venter, *"le possibilità tecniche del genoma sintetico hanno come unico limite la nostra immaginazione"*<sup>21</sup>. L'uomo, macchina naturale a DNA, ha inventato sistemi

digitali in grado di leggere il suo e altrui DNA, così da modificarlo o creare nuove macchine sintetiche a DNA. Le questioni etiche sollevate dalla nuova biologia ripercorrono le stesse strade e interrogativi affrontati da Oppenheimer e colleghi all'inizio dell'era nucleare; oggi in più siamo di fronte ad altre situazioni, come i pericoli di un possibile terrorismo biologico e microbiologico.

Culture, arti e folklore hanno spesso delineato manifestazioni di vita sintetica: Golem della tradizione ebraica, homunculus di Paracelso, Frankenstein di M. Shelley, i Robot, i personaggi di Terminator, Blade runner, Avatar. La sinergia fra il mondo digitale, la tecnologia e la biologia potrebbe dischiudere straordinarie possibilità di creare molecole, organismi, persino specie totalmente nuove e di guidare il futuro dell'evoluzione: potremmo avere il dominio sulla natura, come auspicato già da Bacon. E' un potere enorme, che comporta il dovere, da parte degli "addetti ai lavori", di spiegarlo in modo che tutti possano comprenderlo, ma impone anche il suo impiego con assoluta responsabilità. Sotto l'incalzare dei mass-media, ci si chiede se la vita sintetica sia qualcosa di mostruoso, addirittura una minaccia e quali potrebbero essere le ripercussioni per l'umanità, la salute e l'ambiente.

Da un punto di vista prettamente metodologico, quando Venter ha "creato" il suo batterio sintetico, ha compreso che sbagliare una sola base su 1,1 milione di basi, può determinare la differenza tra vita e morte della cellula, successo o fallimento dell'esperimento; il percorso per riprodurre la vita sintetica è anche una scuola di precisione e accuratezza procedurali: quando ricreiamo cromosomi e geni, perché siano vitali e funzionanti, non sono praticamente ammissibili errori, se non nell'ordine di uno ogni 10.000 coppie di basi nelle forme microbiche, ancor più ristrette in quelle degli organismi superiori. In sintesi, il procedimento è: codice analogico chimico → codice digitale computerizzato → molecola DNA sintetica e assemblata → trapianto in una cellula del genoma ottenuto → creazione di una cellula vivente sintetica a copia di una naturale. La sintesi di cellule e tessuti sintetici è eseguita anche mediante stampanti 3D Next-Generation, che costruiscono organi come ossa, cellule staminali e tessuti embrionali da assemblare, proteomi e genomi; strati di cellule sintetiche e viventi, cresciute in coltura, vengono disposti su una matrice strutturale per formare un organo, un tessuto o un vaso.

Cellule batteriche, modificate o totalmente sintetiche, sono in preparazione in modo da ottenere, su scala industriale, organismi produttori di biocarburanti, anti-inquinanti, prodotti alimentari, depuratori biologici d'acqua, farmaci e vaccini, nuovi antibiotici; in quest'ultimo caso interessante appare la possibilità, già in fase avanzata di sperimentazione, di creare antibiotici coniugati con proteine formate anche da aminoacidi prodotti ex novo: i batteri, non riconoscendo le nuove molecole in quanto costituite da aminoacidi "alieni", non dovrebbero sviluppare resistenze.

## **VITA ARTIFICIALE O DIGITALE**

E' un termine che riserviamo solo ai sistemi digitali, informatici che tentano di produrre hardware e organismi simulanti la vita biologica, carbonica; sistemi che si evolvono liberamente entro l'ambiente digitale, a richiamo dell'evoluzione per selezione naturale nell'ambiente carbonico che ha generato la vita biologica sulla terra. E'

un'evoluzione digitale che “crea” complessità all'interno dell'ambiente digitale stesso, confrontabile ma non assimilabile per dimensioni e ricchezza di manifestazioni genotipiche alla vita organica<sup>22</sup>.

Nella sua visione meccanicistica, C. Venter considera la vita come un insieme di macchine biologiche guidate dal DNA, una sorta di software che dirige migliaia di “proteine robot”. Entriamo nell'era della progettazione biologica, mediante un codice digitale computerizzato, ideando nuove forme di vita, sintetizzando chimicamente il DNA e infine avviandolo a produrre e gestire un organismo vero e proprio. All'accusa di “giocare a fare Dio, con mire creative”, G. Church ribatte che *“gli scienziati oggi sono più ingegneri e tecnici che divinità; i genetisti non giocano al campionato degli dei”*<sup>35</sup>. Scienza e filosofia si sono sempre interrogate sui confini tra vita naturale e biologica, vita meccanica e vita artificiale. S. Benner afferma: *“Creare la vita artificiale sfida la nostra teoria per definire la vita stessa. Se la vita altro non è che un sistema chimico autosufficiente capace di evoluzione darwiniana, e se comprendiamo come la chimica possa sostenere l'evoluzione, allora dovremmo essere in grado di sintetizzare un sistema chimico artificiale capace di evoluzione darwiniana. Se ci riusciremo, le teorie alla base del nostro successo si saranno dimostrate efficaci. Al contrario, se non riusciremo ad ottenere una forma di vita artificiale dopo un tentativo di creare un sistema chimico, dovremo concludere che alla nostra teoria della vita manca qualcosa e che la vita, naturale o artificiale, non è solo un sistema chimico autosufficiente”*<sup>36</sup>.

Una vita artificiale digitalizzata, completa e autonoma, per ora, rimane nei film: Terminator, 2001 Odissea nello spazio, Matrix; vi sono molti limiti rispetto alla vita naturale, nella programmazione e nei risultati effettivi: non c'è distinzione tra genotipo e fenotipo; attualmente possiamo immaginare una sola organizzazione “molecolare”, tipo DNA, mentre nelle forme naturali abbiamo anche RNA, proteine, etc; l'energia si consuma presto; evoluzione ed esito della vita artificiale dipendono totalmente dalla pianificazione del programmatore. Il virologo N. Barricelli ha sintetizzato i limiti di questo percorso: *“Manca qualcosa se vogliamo spiegare la formazione di organi e facoltà così complesse come quelle degli organismi viventi. Non importa quanti cambiamenti apportiamo, numeri e files resteranno sempre tali e da soli non diverranno mai degli organismi viventi! Grazie al codice genetico la cellula è in grado di riprodursi: il vero automa naturale!”*<sup>37</sup>.

Nel 1950, il grande matematico A. Turing pensava che la vita artificiale potesse scaturire da complesse interazioni logiche all'interno di un computer; era in accordo con le tesi dei riduzionisti: la vita non è più di un complicato insieme di reazioni chimiche, sostenuta da un sistema informatico specifico per ogni soggetto<sup>38</sup>. In un futuro post-biologico c'è chi tenterà di produrre vita artificiale al di fuori della biologia, coniugando sistemi meccanici e modelli matematici. Creare la vita sarà il primo stadio: il passo decisivo consisterà nel creare organismi in grado di auto mantenersi e autoriprodursi o di evolvere autonomamente in altre forme di vita.

**Risultati raggiunti, prospettive e progetti.** Riguardano simulazioni di aspetti e funzioni parziali della vita, dall'espressione genica ai percorsi biochimici al funzionamento di singoli organi e apparati. In Europa va avanti il progetto “Uomo fisiologico virtuale”; dagli

anni '60 in USA si studia un modello virtuale cardiaco, che riguarda il battito, la contrazione e l'apertura/chiusura dei canali del calcio: da questi dati sono scaturiti i cuori artificiali impiantati e farmaci quali i calcio-antagonisti; la produzione di sangue artificiale; inoltre sono in corso diversi progetti per la creazione di circuiti neuronali e microcircuiti cerebrali.

Ma una cellula elettronica o virtuale non sa fare una cosa essenziale: la replicazione; questa è attualmente la sfida più impegnativa sulla quale stanno lavorando diversi gruppi di ricerca.

## CONCLUSIONI

Le recenti tecnologie di editing genetico e la manipolazione di cellule germinali hanno aperto scenari inediti per il futuro, primi passi che impongono riflessioni attente poiché non sappiamo dove ci porteranno e quali potrebbero essere le conseguenze. I mass-media si sono buttati a capofitto sui nuovi eventi, prospettando all'opinione pubblica un panorama di ricerca senza ritorno, una soglia simbolica ormai varcata (*"l'uomo sta ricreando se stesso?"*)<sup>39</sup>; ciò che in teoria può essere fatto, prima o poi qualcuno lo farà. I genetisti vedono gli ultimi progressi tecnologici e le recenti acquisizioni come tappe logiche e inevitabili di un processo iniziato con Mendel e Darwin, un viaggio lungo 150 anni alla scoperta dell'ereditarietà: abbiamo imparato struttura e funzioni del DNA, a sequenziare l'intero genoma e, conseguentemente, a poterlo modificare.

In passato, timori, catastrofismi e speranze si sono intrecciati anche su altri temi: OGM, fecondazione assistita, terapie geniche; oggi come allora, sentiamo pressante la necessità di arrivare ad una normativa chiara e largamente condivisa, base per ogni ulteriore ricerca e applicazione, soprattutto in campo clinico.

Per C. Venter tutta la ricerca genetica attuale e futura è inevitabile, così come la vita sintetica e artificiale, persino l'ingegneria della linea germinale; *"la nostra specie non si fermerà nel cercare di migliorare tratti valutati come positivi o eliminare il rischio di malattie o rimuovere dalle future generazioni ciò che oggi è percepito come negativo. Il problema, se mai, è di democrazia: chi e come avrà la possibilità di accedere all'editing? La domanda è quando, non se"*<sup>22</sup>. Ecco riaffacciarsi una serie di domande e problemi: un consenso comune e generalizzato sui confini tra normalità, variabilità e disabilità; quando e chi decide se una patologia è così grave da poter giustificare il ricorso all'editing; la mutevolezza delle malattie stesse, che nel tempo passano da una status di "condizione" ad uno di "patologia" (obesità); la democratizzazione della scienza, i cui benefici dovrebbero essere fruiti da tutti, per non contribuire ad accrescere le disuguaglianze sociali. A ben vedere, CRISPR ha solo riaperto un dibattito che riemerge ogni volta che "inventiamo" una nuova tecnologia e tocchiamo temi etici e filosofici oltreché scientifici: tutto questo non è forse la spia del nostro non saper decidere e legiferare, rimandare e polarizzarci su posizioni che, prima o poi, dovranno incontrarsi e confrontarsi, per il bene nostro ma soprattutto dei nostri figli?

Forse si sta attuando una transizione, un passaggio di specie da *"Homo sapiens"* ad *"Homo technologicus"*; la nostra è l'unica specie ad aver imboccato fino in fondo la strada della tecnologia, è come un'espansione dei corpi e delle menti. Già da tempo

abbiamo trasformato le nostre capacità di conoscenza e apprendimento, non più basate solo sull'imitazione e le idee di chi ci ha preceduto, ma anche sulla creatività e l'innovazione delle generazioni attuali e la trasmissione delle innovazioni a quelle future.

Le nuove biotecnologie ci offrono la possibilità di sognare una medicina, per il futuro, diversa, senz'altro migliore e più efficace; medici e ricercatori stanno "inventando" un modo nuovo di coniugare teoria e pratica clinica, legando e fondendo creatività, immaginazione e scienza. Importante è tuttavia non trascurare mai quella "humanitas" che rimane il principio portante della nostra professione. Non sappiamo bene come sarà il medico di domani e quanta tecnocrazia lo permeerà; questo monito di un grande storico della medicina ci sembra un giusto messaggio soprattutto per le future generazioni di medici: *"Per aiutare a nascere senza pericoli e a morire serenamente, per aiutare i sani e aver cura dei malati cronici, degli anziani, dei disabili, saranno sempre più necessari nuovi curanti, che porteranno la medicina a potenziare o recuperare, accanto alla ragion d'essere tecnologica, la vocazione antropologica che da sempre le appartiene"* (G. Cosmacini)<sup>40</sup>.

## BIBLIOGRAFIA

1. DNA. Il grande libro della vita da Mendel alla genomica. Catalogo della mostra omonima, 10 febbraio – 18 giugno 2017. Roma. Milano: Silvana Editoriale Scienze, 2017.
2. Doudna J, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014; 346: 1077-84.
3. Zhang F, Rann FA, Hsu PD, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Prot* 2013; 8: 2281–2308.
4. Church G, Regis E. *Regenesis. How synthetic biology will reinvent nature and ourselves.* New York: Basic Book, 2014.
5. Mojica FJM, Garrett RA. *Discovery and seminal developments in the CRISPR field.* Berlin: Springer Verlag, 2013.
6. Meldolesi A. *E l'uomo creò l'uomo.* Torino: Bollati Boringhieri, 2017.
7. Sandel MJ. *Contro la perfezione.* Milano: Vita e pensiero, 2014.
8. Pievani T. *Introduzione alla filosofia della biologia.* Bari: Laterza, 2005.
9. Eschilo. *Prometeo incatenato.* Milano: Feltrinelli, 2015.
10. Muller HJ. *Studies in genetics: the selected papers of H. J. Muller.* Bloomington: Indiana University Press, 1962.
11. Schrödinger E. *Che cos'è la vita?* Milano: Adelphi, 1995.
12. Watson J, Crick F. Molecular structure of nucleic acid. *Nature* 1953; 171: 737-8.
13. Watson J. *The double helix.* New York: Simon and Schuster, 1968.
14. Crick F, Brenner S, Barnett L, Watts-Tobin RJ. General nature of the genetic code for proteins. *Nature* 1961; 192: 1227-32.
15. Monod J. *Il caso e la necessità.* Milano: Mondadori, 2017.
16. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495-7.

- 17.Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 1975; 94: 441–8.
- 18.Dawkins R. *The selfish gene*. Oxford: Oxford University Press, 1976.
- 19.Mullis KB, Smith M. Nobel Lecture. *The Polymerase Chain Reaction*. [https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture.html](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture.html).
- 20.Gould SJ. *The structure of evolutionary theory*. Harvard: Belknap, 2002.
- 21.Venter JC. *Il disegno della vita*. Milano: Rizzoli, 2014.
- 22.Venter JC. *Life at the speed of light*. Lezione tenuta presso il “Trinity College of Dublin”, 12 Luglio 2012. [edge.org/conversation/what-is-life](http://edge.org/conversation/what-is-life).
- 23.Clyde A, Hutchison I. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science* 2016; 351: 1414-21.
- 24.Offord C. *Advances in genome editing*. New York: The Scientist, 2016.
- 25.Belli F. *I vaccini, oggi*. Roma: Aracne, 2017.
- 26.O’Connell MR, Oakes BL, Doudna J, et al. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. *Nature* 2014; 516: 263-6.
- 27.Gaudelli NM, Komor AC, Liu D et al. Programmable base-editing of A-T to G-C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 2017; 551: 464-71.
- 28.Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyed OO, et al. RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science* 2017; 358: 1019-27.
- 29.Liang P, Xu Y, Huang J, et al. CRISPR-Cas9/mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell* 2015; 6: 363-72.
- 30.Kang X, He W, Fan Y et al. Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *J Ass Reprod Gen* 2016; 33: 581-8.
- 31.Rufo E. *Il laboratorio della bioetica*. Roma: Ediesse, 2011.
- 32.Botti C, Rufo F. *Bioetica, discipline a confronto*. Roma: Ediesse, 2002.
- 33.Gibson DG, Glass JI, Venter JC, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* 2010; 329: 52-6.
- 34.Hutchison CA, Chuang RY, Noskov VN, et al. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science* 2016; 351: aad6253. doi: 10.1126/science.aad6253.
- 35.Church G. Perspective: Encourage the innovators. *Nature* 2015; 528: S7. doi:10.1038/528S7a.
- 36.Brenner S, Wopert L. *My life in science*. Austen: Friedberg and Lawrence, 2001.
- 37.Barricelli NA. Numerical testing of evolution theories. Part I: Theoretical introduction and basic tests. *Acta Biotheoretica* 1962; 16: 69-98.
- 38.Dyson G. *Turing’s cathedral: the origins of the digital universe*. London: Allen Lane, 2012.
- 39.Cassata F. *Eugenetica senza tabù. Usi e abusi di un concetto*. Torino: Einaudi, 2015.
- 40.Cosmacini G. *Il tempo della cura. Malati, medici, medicine*. Como: Nodolibri, 2016.

Prof. Francesco Belli, Docente di Immunologia Corso di Laurea in Biotecnologie

Università “La Sapienza”, Roma

Per la corrispondenza: [f.belli11@virgilio.it](mailto:f.belli11@virgilio.it)

## Norme da rispettare per la pubblicazione delle Relazioni sugli

### “Atti della Accademia Lancisiana”.

Gli "Atti" costituiscono il documento dell'attività scientifica dell'Accademia Lancisiana. Al tempo stesso sono un titolo di prestigio tale da promuovere riconoscimenti morali e contributi economici, indispensabili per la vita dell'Accademia, da parte degli Enti. È quindi impegno di tutti gli Accademici e i Soci che gli "Atti" riportino sempre il resoconto completo dell'attività scientifica svolta.

L'Accademia Lancisiana pubblica sugli "Atti" i testi delle relazioni dei Simposi, Conferenze e Comunicazioni tenute nel corso di ogni anno accademico. A norma dello Statuto dell'Accademia (Regolamento per la pubblicazione degli Atti, art. 5) «Chiunque svolga una relazione, una conferenza, una comunicazione è tenuto a pubblicarne il testo negli "Atti"».

I testi dovranno essere inediti, non consegnati contemporaneamente ad altre riviste scientifiche, ed il loro contenuto conforme alla legislazione vigente in materia etica della ricerca.

La responsabilità dell'osservanza di quanto sopra e quella del contenuto scientifico è esclusivamente degli Autori.

**Testi.** I lavori redatti in formato elettronico dovranno pervenire alla Segreteria dell'Accademia Lancisiana (e-mail: [lancisi@aruba.it](mailto:lancisi@aruba.it)) entro il giorno della Seduta e dovranno riportare: titolo, Autore/i, Istituzione presso cui il lavoro è stato svolto, indirizzo e-mail dell'Autore che si impegna a tenere la corrispondenza con la Rivista.

I Moderatori dei Simposi sono invitati a garantire che ogni Relatore si attenga alle presenti norme e a sollecitarli affinché inviino i testi delle rispettive relazioni entro i termini indicati.

La redazione si riserva il diritto di apportare al testo eventuali necessarie modifiche.

**Abbreviazioni e simboli.** Eccetto che per quelle standard (unità di misura, simboli chimici, matematici, statistici ecc.), l'uso delle abbreviazioni deve essere evitato. I termini ricorrenti nel testo possono essere abbreviati riportandoli una prima volta per intero e facendoli seguire dall'abbreviazione.

**Bibliografia.** Le voci bibliografiche devono essere numerate in ordine di citazione e riportate nel testo con *numero ad esponente*. Per gli acronimi delle riviste si faccia riferimento all'Index Medicus, indicandone, invece, il nome per intero ove non siano tra quelle citate. In caso di *bibliografia essenziale* seguire rigorosamente l'ordine alfabetico delle citazioni, senza alcuna numerazione.

Si usi lo stile più sotto esemplificato:

*Citazioni da riviste:* 1) Articoli standard (elencare tutti gli Autori quando siano sei o meno; se sono sette o più elencare solo i primi tre ed aggiungere et al.):

You CH, Lee KY, Chey RY, Menguy R. Electrogastrographic study of patients with unexplained nausea, bloating and vomiting. *Gastroenterology* 1980; 79: 311-4.

2) Autore non riportato: Coffee drinking and cancer of the pancreas [editoriale]. *BMJ* 1981; 283: 628.

*Citazioni da libri ed altre monografie:* 1) Capitoli di libri: Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganism. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, eds. *Pathologic physiology: mechanism of disease*. Philadelphia: Saunders, 1974; 457-72.

2) Atti di congressi: Harley NH. Comparing random daughter dosimetric and risk models. In: Gammage RB, Kaye SV, eds. *Indoor air and human health. Proceedings of the Seventh Life Sciences Symposium*, 1984 OcL 29-31; Knoxville (TN). Chelsea (MI): Lewis, 1985; 69-78.

**Tabelle e figure.** Le tabelle devono avere un breve titolo. Tabelle e figure non devono essere inserite nel testo di Word, ma allegate a parte come file grafici con le relative didascalie.

Per quanto non espressamente specificato nelle presenti norme si rimanda alle indicazioni fornite dall'*International Committee of Medical Journal Editors*, pubblicate su: *N Engl J Med* 1991; 324: 424-8 e *BMJ* 1991; 302: 338-41.

