

Volume LXVI - Nuova Serie  
ANNO ACCADEMICO 2021-2022 307° DALLA FONDAZIONE

2021-2022

N. 3  
Luglio  
Settembre  
2022

***Atti della***

***Accademia***

***Lancisiana***

*Aspicere illud  
Certe si qua mentem pingere ad  
Consilio, eloquio medica quantum eminet arte  
Dextera ni poterit reddere, scripta docent.*

RIVISTA MEDICO-SCIENTIFICA

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



## **Periodico trimestrale**

Anno Accademico 2021-2022: 307° dalla fondazione

Vol. LXVI - n. 3 - Luglio - Settembre 2022

### *Proprietà*

ACCADEMIA LANCISIANA ETS

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) e del GDPR UE 2016/679 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

**Conferenza**

**05 aprile 2022**

**Non solo COVID-19. Un mondo di infezioni: antiche e nuove, neglette ed emergenti, orfane e globalizzate**

*F. Belli*

III-233

---

**Celebrazione della Settimana per la Cultura**

**12 aprile 2022**

## **Conferenze**

Le opere di Avicenna e la loro illustrazione. Il manoscritto 121 della Biblioteca Lancisiana

III-261

*P. Ricca*

L'intuizione e l'impegno femminile nella salute umana

III-283

*R. Russo*

## **Premio Giovanni Maria Lancisi - Anno Accademico 2020-2021**

*Tesi di Laurea: "Personalized targeted therapy in diffuse intrinsic pontine glioma" (Sintesi)*

III-290

*A. Ceccarelli*

*Tesi di Laurea: "Combined physiological and biochemical approach for the prediction of abdominal aortic aneurysm growth in humans" (Sintesi)*

III-296

*P. Lapolla*

*Tesi di Laurea: "Il ruolo del sistema endocannabinoide nella Sclerosi Laterale Amiotrofica: uno studio clinico, elettrofisiologico e molecolare" (Sintesi)*

III-313

*C. Laurini*

*Tesi di Laurea: "Ruolo delle varianti nel numero di copie nel Disturbo dello Spettro Autistico" (Sintesi)*

III-320

*C. Micolonghi*

*Tesi di Laurea: "Analisi genica del Wnt signaling e dell'infiammazione nel tessuto osseo, Adiposo e muscolare di pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2 candidati ad artroprotesi d'anca" (Sintesi)*

III-340

*M. Pileri*





---

## Non solo COVID-19. Un mondo di infezioni: antiche e nuove, neglette ed emergenti, orfane e globalizzate

**F. Belli**

*“La medicina è una scienza sociale  
e la politica non è altro che  
medicina su larga scala”*  
Rudolf Virchow

Nel mondo occidentale, nei ricchi e socio-sanitariamente progrediti paesi del «nord del mondo», la pandemia COVID-19 si è diffusa all'improvviso e ha colto di sorpresa, mettendo a nudo fragilità strutturali, organizzative, culturali: un ottimismo miope in tema di sanità pubblica confinava tra le memorie delle generazioni passate i milioni di infettati, e di morti, a seguito di malattie infettive da patogeni, vecchi o nuovi, aggressivi. Si pensava che antibiotici, nuovi farmaci e vaccini avessero sconfitto per sempre gran parte delle malattie infettive. COVID-19 ha aperto (!) gli occhi (e la mente?...) a (quasi) tutti. Gli allarmi lanciati da epidemiologi e infettivologi, a seguito di numerosi segnali rilevati in tutto il mondo (piccoli e grandi focolai epidemici) erano rimasti inascoltati, sia dai singoli cittadini, sia dalle istituzioni preposte: nessuno era preparato, niente è stato preventivamente organizzato per affrontare una pandemia «globale» da nuovo virus. Sarebbe bastata la memoria storica e la conoscenza del passato per capire che non si trattava di «se», ma di «quando»: dopo aver scampato aviaria, suina, SARS, MERS, e altro, da 30 mesi siamo costretti a confrontarci con i fantasmi delle «pesti» di ieri,...e di oggi!

E abbiamo dovuto acquisire, e in fretta, consapevolezza dell'impatto che una

pandemia «globale» ha sulle società, la politica, l'economia. La fase calante, si spera, definitivamente, dell'epidemia COVID-19, grazie al miglioramento delle cure, alla gestione razionale del malato e dei contatti, alla prevenzione, alla campagna vaccinale, ci induce, dopo due anni di impasse, di tornare da un punto di vista clinico ed epidemiologico, a volgere il nostro sguardo su quanto interrotto a inizio 2020, alla situazione infettivologica globale. Faremo tutto questo sotto alcuni punti di vista peculiari:

- 1) Impatto dei cambiamenti climatici
- 2) Ruolo della «poverty»
- 3) Farmacoresistenze (antibiotici e antivirali)
- 4) Nuovi farmaci
- 5) Il problema «vaccini»: nuovi preparati e nuove tecnologie, copertura nel mondo. Per quanto riguarda temi quali le campagne e la propaganda contro i vaccini, il ruolo delle fake news, il negazionismo e l'avversione a vaccini vecchi e nuovi, rimandiamo alla nostra conferenza in Accademia del 2017<sup>1</sup>.

### **Note epidemiologiche**

Confrontando le principali cause di morte, valutate all'inizio del XX e del XXI secolo, nel mondo, registriamo come i decessi provocati da malattie infettive si sono oggi, dopo cento anni, più che dimezzati, passando dal 46.6% al 20.9%, mentre le malattie cardiovascolari (12.9% vs 30.4%) e le neoplasie (1.9% vs 22.8%) sono attualmente ai primi posti<sup>2</sup>. Tuttavia, mentre un secolo fa

non vi erano grandi differenze di incidenza e mortalità per malattie infettive fra le diverse aree geografiche, nel momento presente si sono acuite disuguaglianze e disparità, in conseguenza delle quali nel sud del mondo le popolazioni continuano ad ammalarsi e a morire per infezioni molto più che nell'emisfero boreale, anche, ma non solo, a causa del comparire di nuove patologie e dell'emergere di patogeni sconosciuti o più aggressivi.

Nella Tab. 1 abbiamo riportato le più diffuse malattie infettive (tubercolosi, malaria, HIV), con il rapporto mortalità/incidenza maggiormente elevato<sup>3</sup>; abbiamo escluso le epatiti B e C, in quanto epidemiologia e decorso sono oggi favorevolmente mutate, nel primo caso, dopo l'introduzione del vaccino, nel secondo, con gli antivirali anti-HCV di ultima generazione. Abbiamo invece inserito, per raffronto, i dati relativi la Dengue, per l'alta morbilità annua, e l'influenza, come esempio di infezione ricorrente stagionale.

Non dobbiamo dimenticare le disabilità come postumi susseguenti a numerose malattie infettive, in particolare a quelle definite (vedi oltre) "*Neglected Tropical Diseases*": Africa e sub-continente indiano sono le aree ove osserviamo maggiormente l'incidenza di queste infezioni, tanto nella fase acuta, quanto, come detto, nelle conseguenze invalidanti<sup>4</sup>. La tabella dedicata a queste patologie aiuterà a comprendere di quali infezioni "*neglected*" stiamo parlando.

Un dato interessante<sup>5</sup> emerge dalla tipologia e dal numero di infezioni unicusali registrate nei diversi paesi: Cina, larga parte del sud-est asiatico, Nigeria e numerosi paesi del centrafrica, Brasile ne denunciano attualmente una cifra superiore al centinaio, ma, a sorpresa, gli USA sono prossimi a questo valore, da rapportare alla diversità delle popolazioni ospitate e dai consistenti flussi migratori. L'Italia denuncia circa 70/80 diverse infezioni unicusali/l'anno.

Riportando la frequenza attuale delle malattie infettive su un planisfero, si ottiene un'immagine a piramide con l'apice coincidente con la zona equatoriale, la quale, assieme ai tropici, è caratterizzata dalla massima concentrazione quali-quantitativa di infezioni. Il confronto fra i due emisferi evidenzia invece una predominanza di patologie infettive in quello australe, circa i 3/5, sia per fattori socio-economici, che climatici: andamento di monsoni e alisei, del Niño, piovosità e umidità<sup>5</sup>. Sicuramente in aumento, e consistente, in tutto il mondo, le zoonosi e gli eventi di spillover, alla base di vecchie e nuove infezioni portate da vettori animali, anche a carattere pandemico e globale, come COVID-19 dimostra. Le nuove zoonosi originano e si verificano, prevalentemente, ma non solo, in Africa, Asia e sud-America, ma sono segnalate persino nelle zone artiche e sub-artiche, ove l'aumento di temperatura, lo scioglimento di ghiacci e permafrost, l'impatto di patogeni imprevisi con l'uomo e animali stanno creando una vera e propria nuova microbiologia, nel prossimo futuro tutta da indagare.

Conseguenze a tutto quanto fin qui sommariamente esposto sono, tra l'altro: l'attuale differenziazione dell'incidenza, delle disabilità provocate e della mortalità in rapporto alla posizione geografica dei diversi paesi, all'impatto del clima e suoi cambiamenti, allo status economico e socio-sanitario<sup>6</sup>; nei paesi LMICs si associano, amplificando le conseguenze l'un con l'altra, l'alta incidenza e mortalità per malattie infantili nell'infanzia, la scarsa copertura vaccinale, la bassa disponibilità di farmaci antimicrobici e disinfettanti essenziali, oltre, come vedremo, carenze prettamente sociali e organizzative. Persiste nel mondo odierno una ineguale aspettativa di vita, cui concorrono diverse cause, non ultima la diversità nella diffusione delle malattie infettive<sup>7</sup>.

<b>MALATTIA</b>	<b>NUMERO TOTALE CASI</b>	<b>NUOVI CASI / ANNO</b>	<b>MORTI/ ANNO</b>	<b>RAPPORTO % TRA MORTI E CASI</b>
<b>MALARIA</b>	600 milioni	200 milioni	600.000	0.013
<b>DENGUE</b>	50/100 milioni forme acute /l'anno		20.000	0.0002
<b>TUBERCOLOSI</b>	2 miliardi infetti	8,6 milioni forme attive	1,3 milioni	0.151
<b>INFLUENZA</b>	Stagionale: 4/5 milioni		375/500.000	0.093
<b>HIV</b>	38 milioni	2,3 milioni	1,6 milioni	0.695

**Tab. 1.** Le più diffuse malattie infettive, nel mondo, con il rapporto mortalità/incidenza più elevato. A raffronto, abbiamo aggiunto i dati annui relativi la Dengue e l'influenza.

### **Di quali infezioni stiamo parlando?**

Puntualizziamo e definiamo le patologie infettive di cui ci stiamo occupando. Oltre le forme più comuni, già illustrate nella Tab. 1, ma che includono anche le infezioni sessualmente trasmesse, le epatiti, quelle responsabili di gastroenteriti e sindromi diarroiche, tutte diffuse a livello planetario, sebbene perlopiù preminenti nelle zone tropico-equatoriali, rivolgiamo la nostra attenzione a 4 tipologie di malattie infettive, alcune delle quali inseribili in due o più dei seguenti gruppi.

**Orfane o rare:** infezioni poco frequenti, ma anche poco conosciute e studiate, spesso sottostimate per inadeguati mezzi diagnostici e di sorveglianza, prive o con scarse possibilità terapeutiche. Poco appetibili alla ricerca sperimentale e clinica, godono di bassissimi aiuti finanziari. Un elenco in continuo aggiornamento dell'O.M.S. ne conta attualmente circa 300.

**NTIDs (Neglected Tropical Infectious Diseases):** malattie che non godono dell'attenzione dovuta nella e dalla comunità, a carattere endemico, perlopiù diffuse in zone tropico-equatoriali, «della povertà», in LMICs, dimenticate, scarsamente studiate e

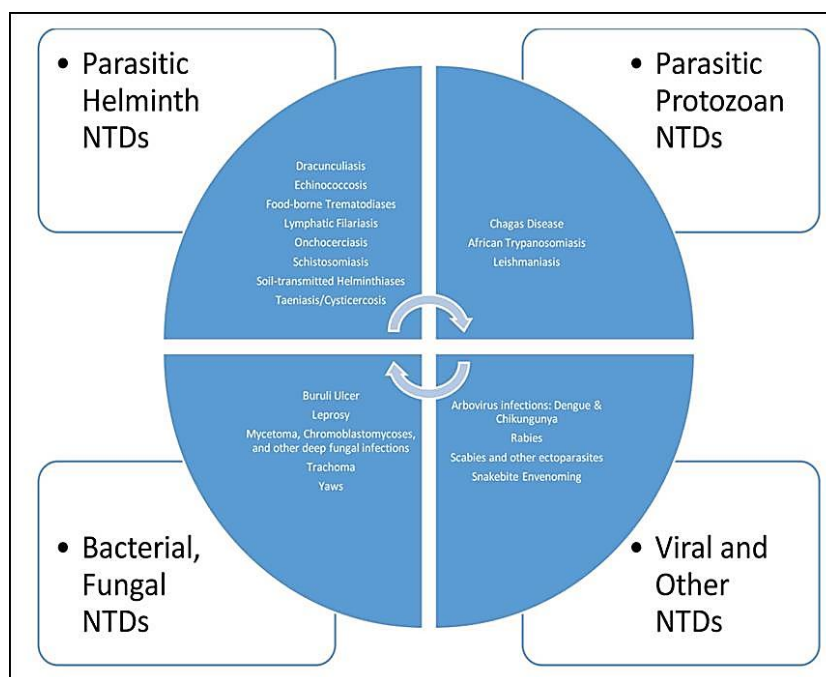
con fondi limitati o assenti. Colpiscono popolazioni sottoalimentate, con scarso accesso alle cure e inadeguata copertura vaccinale, prive di strutture socio-sanitarie efficienti. Spesso trattasi di zoonosi e infezioni trasmesse da animali. L'ultimo elenco aggiornato dall' O.M.S. ne include 20 (Tab. 2). L'impressione è che prossimamente la lista si arricchirà di ulteriori patologie infettive.

**(r)EID: (riemerging) or Emerging Infectious Diseases:** infezioni che aumentano col tempo o sono a rischio di incremento, causate da patogeni che erano scomparsi, o nuovi e sconosciuti. Trattasi sia di infezioni note ma che si diffondono in nuove aree geografiche, sia in incremento a causa di resistenze agli antibiotici o per il fallimento di misure contenitive di salute pubblica. La difficoltà di stabilire, in un dato periodo di tempo e in uno spazio geografico delimitato, qualcosa di relativo, condiziona la loro classificazione, tant'è che O.M.S., C.D.C. e N.Y.H. ne hanno diffuso elenchi differenti, in base a principi e parametri non uniformi; ad esempio, C.D.C. dà particolare enfasi al rischio, concreto o paventato, di infezioni diffuse a seguito di atti di bioterrorismo. Riportiamo

nella Tab. 3 le patologie infettive emergenti secondo C.D.C.

**Globalizzate:** per definizione epidemiche o pandemiche, travalicano dinamiche e caratteristiche esclusivamente biologiche, ma sono frutto di fenomeni complessi che investono la sfera ambientale, sociale, economica, politica e culturale. Il cambiamento

climatico, i fenomeni migratori, le crisi economiche, l'industrializzazione senza regole, i deficit alimentari e idrici condizionano lo stato di benessere, o meno, di un individuo o di una popolazione. Anche eventi storici e comportamenti «a rischio» facilitano insorgenza e diffusione, come accadde per le prime infezioni globalizzate dell'era moderna: Spagnola e HIV.



<b>PATOLOGIA</b>	<b>DATI STATISTICI ACCERTATI</b>
Oncocercosi	37 milioni di infetti, 99% in Africa
Filariasi linfatica	120 milioni di infetti, 40% in Africa
Schistosomiasi	200 milioni di infetti, 85% in Africa
Leishmaniosi	1.5/2 milioni di nuovi casi/anno
Tripanosomiasi umana africana	70.000 malati in epoca pre-COVID-19
Tripanosomiasi americana (m. di Chagas)	18 milioni di malati
Dracunculiasi o verme di Guinea	11.000 casi/anno a inizio secolo
Echinococcosi	Endemica in Mediterraneo, Australia, Asia cen.
Teniasi/Cisticercosi	100 milioni di persone infestate da T. solium
Ulcera di Buruli	42.000 casi solo in Benin, Ghana, C. d'Avorio
Lebbra	286.000 malati in epoca pre-COVID-19
Blastomicosi	1/2 casi/100.000 abitanti nelle Americhe
Tracoma	Fino a 80 milioni di infetti in epoca pre-COVID-19
Framboesia	49.000 nuovi casi/anno
Dengue	50/100 milioni forme acute/anno
Chikungunya	2016: 175.000 casi confermati nel mondo
Scabbia	~ 10% della popolazione mondiale infestata
Rabbia	26.000 morti (20.000 in India) nel 2010
Ascariasi	1 miliardo e 220 milioni di infetti

**Tab. 2.** Elenco delle NTDs secondo WHO, 2019 e dati statistici relativi<sup>8,11</sup>.



Pathogen or disease
Bovine spongiform encephalopathy
Campylobacteriosis
Chagas disease
Cholera
<i>Cryptococcus</i>
Cryptosporidiosis
Cyclosporiasis
Cysticercosis
Dengue fever
Diphtheria
Drug-resistant infections (antimicrobial resistance)
Ebola hemorrhagic fever
<i>Escherichia coli</i> infection
Group B streptococcus
Hantavirus pulmonary syndrome
Hendra virus
Hepatitis C
Histoplasmosis
HIV/AIDS
Influenza
Lassa fever
Legionnaires' disease
Leptospirosis
Listeriosis
Lyme disease
Malaria
Marburg hemorrhagic fever
Measles
Monkeypox
MRSA
Nipah virus
Norovirus
Pertussis
Plague
Poliomyelitis
Rabies
Rift Valley fever
Rotavirus
Salmonellosis
Severe acute respiratory syndrome
Shigellosis
Sleeping sickness (trypanosomiasis)
Smallpox
Tuberculosis
Tularemia
Valley fever (coccidioidomycosis)
Vancomycin-intermediate or -resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
West Nile virus
Yellow fever

**Tab. 3.** Elenco di patogeni emergenti e riemergenti secondo C.D.C, 2019.

**NTIDs**<sup>8</sup>. Lo scarso interesse della ricerca verso queste affezioni è ben dimostrato da un'indagine<sup>9</sup> che correla il numero di pubblicazioni indicizzate in 52 malattie infettive con l'impatto clinico di queste, espresso da una serie di parametri quali i decessi, i giorni di ricovero, i giorni lavorativi persi, e altri, nel decennio 2010-19; le NTIDs sono agli ultimi posti della graduatoria ottenuta da questa correlazione, soprattutto

le forme da parassiti intestinali e le geelmintiasi (poche centinaia di pubblicazioni), rispetto alle decine di migliaia dedicate a tubercolosi, malaria, HIV, HCV e infezioni sessualmente trasmesse.

Esaminando programmi (partnership pubblico/privato) di sviluppo e cooperazione per la prevenzione, la diagnosi e la cura delle malattie infettive in LMIC's e i fondi stanziati in era pre-COVID-19<sup>10</sup>, osserviamo come le

NTIDs abbiano richiamato investimenti irrisonanti, sia da parte di enti e fondazioni locali che internazionali: a infezioni come la Dengue, per la ricerca di un vaccino, malattia di Chagas, lebbra e leishmaniosi non è stata dedicata alcuna attenzione economica negli ultimi dieci anni.

Anche statistiche precise latitano: abbiamo, da parte dell'O.M.S., dati parziali per la persistente difficoltà a ricevere report dai paesi coinvolti. Solo per alcune infezioni il numero di nuovi casi/l'anno o la stima totale degli infetti sono aggiornati: li riportiamo nella Tab. 2<sup>11</sup>. In Africa si registrano circa 535.000 decessi l'anno, ma il numero è riferito solo a 12/20 patologie, quindi largamente incompleto.

In sintesi, ci troviamo di fronte a malattie neglette, trascurate, che persistono (quasi) solamente nelle popolazioni più povere e dimenticate, dimenticate nella comunità, a livello locale e internazionale, dalla ricerca, dai flussi di finanziamento pubblici e privati, prive o con scarsi farmaci e vaccini, oggetto di pregiudizi e discriminazione sociale (ad es. la lebbra).

La stretta associazione fra NTIDd e "poverty" è sottolineata da una serie di dati: oltre il 70% dei paesi in cui queste affezioni sono preminenti ha un PIL fra i più bassi del mondo; il 100% di questi paesi è afflitto da almeno 5 NTIDs; la trasmissione è facilitata da acqua non potabile, scarsa igiene, promiscuità tra uomini e animali, tutte condizioni associate alla povertà.

Per trattare le NTIDs, non solo sul piano clinico-sanitario, ma anche, compiutamente, da un punto di vista socio-economico, è indispensabile: migliorare l'offerta scolastica e innalzare il tasso di scolarizzazione; migliorare la capacità produttiva e aumentare il tasso di occupazione; ridurre il rischio di comorbidità con HIV, malaria, TBC, epatiti, infezioni sessualmente trasmesse. Una lotta decisa a queste affezioni non può

prescindere da piani concreti e attuati per lo sviluppo socio-economico dei paesi coinvolti: le strategie di riduzione della povertà spezzano il circolo vizioso fra questa e le malattie infettive, a patto che sia implementato l'accesso alle cure specifiche e siano estesi alle popolazioni programmi di educazione sanitaria.

Le strategie di lotta contro le NTIDs non sono né semplici né uniformi, trattandosi di infezioni da patogeni differenti e con segni clinici specifici e multiformi; così, ad esempio, è stata attuata con risultati alterni una chemioterapia preventiva per filariosi linfatica, oncocercosi, schistosomiasi e geelmintiasi. Un approccio clinico integrato e multidisciplinare è sperimentato per Leishmaniosi, Tripanosomiasi, M. di Chagas e Ulcera di Buruli. Priorità comuni da raggiungere sono: farmaci sicuri, di semplice somministrazione, a basso costo; diagnosi individuale o di comunità facili ed economiche; approccio basato su trattamenti preventivi per gruppi di popolazione, a scadenze regolari, ad opera di strutture e personale non necessariamente afferente alla sola sfera sanitaria, ma ad es., anche a scuole; il fine è di espandere la copertura terapeutica. Un approccio clinico individuale, che richiede personale e strumentazione specializzata, in questo campo, può venir dopo la sorveglianza e il monitoraggio di comunità. Ma, prioritarie su tutto, rimangono la lotta contro i vettori, la decontaminazione ambientale, la bonifica delle acque, la chemioterapia e la profilassi con medicinali semplici e a basso costo.

**(r)EID.** Siamo in grado di ricostruire, in parallelo, l'evoluzione umana e la comparsa di patogeni, definiti, in un momento storico specifico e geograficamente delimitati o diffusi, "emergenti". Possiamo anche individuare quegli eventi chiave, dalla rivoluzione neolitica a oggi, posti in relazione con le età presunte dell'esordio, sulla scena dell'uomo, delle malattie infettive<sup>12</sup>. Così, la malaria accompagnò l'uomo quando iniziò a

espandersi nei continenti e a frequentare zone paludose per adattarle all'agricoltura; tubercolosi, lebbra e vaiolo emersero nei primi agglomerati urbani sovraffollati; il colera e la peste seguirono le rotte commerciali, le invasioni e le guerre, le migrazioni di massa; Spagnola e HIV possono essere considerate le prime pandemie di un mondo globalizzato. La frammentazione della linea umana in popolazioni distinte, geneticamente e geograficamente, fu accelerata dalle migrazioni "Out of Africa". In seguito, queste popolazioni iniziarono a mescolarsi ulteriormente, soprattutto lungo rotte commerciali (come la Via della Seta), attraverso la colonizzazione, ieri, ed una frequente consuetudine ai viaggi internazionali, globalizzati, oggi. Tutti questi eventi hanno favorito l'emersione e la dispersione dei patogeni nel mondo.

Vi sono situazioni in cui determinati patogeni non sono mai scomparsi sulla scena umana, ma periodicamente appaiono varianti e sottospecie, che possono comportarsi con caratteristiche totalmente nuove e impattare nei confronti del sistema immunitario dell'uomo fino a provocare epidemie su scala globale; le varianti sono geneticamente generate per riarrangiamenti e ricombinazioni, favorite anche da variazioni climatiche e ambientali di vasta portata. L'esempio più significativo è quello dei virus influenzali: negli ultimi 130 anni varianti del virus A, ognuna con caratteristiche immunologiche diverse e specifiche<sup>13</sup>, hanno provocato una decina di epidemie grandi e piccole, devastanti o contenute. Oggi, e ancor più in futuro, il quadro ecologico si va complicando: nuove specie animali diventano reservoir o ospiti intermedi del virus, facilitando ulteriori riassortimenti genici e la comparsa di nuove varianti, dalle conseguenze imprevedibili<sup>14, 15</sup>.

Di EIDs, a carattere sporadico o epidemico, delimitato o globale, se ne parla da circa 80 anni e i patogeni rilevati e inseriti nelle varie liste di OMS, CDC o altri organismi ed enti, aumentano sempre più; ogni zona del pianeta ne è stata e né interessata, con una maggior concentrazione, e questo è un

dato che può sorprendere, in Europa e nord-America e assenza quasi assoluta di segnalazioni per le aree artiche, ove tuttavia la situazione sta mutando, in particolare a causa del forte incremento termico<sup>16</sup>.

Per quanto riguarda la tipologia dei patogeni, negli ultimi 80 anni si sono registrati diversi cambiamenti microbiologici: decremento, soprattutto nelle ultime 3 decadi, delle infezioni batteriche, scarse variazioni quantitative degli episodi da imputare ad un'eziologia virale, aumento delle elmintiasi in occidente, perlopiù legate alle migrazioni; forte incremento delle zoonosi e delle forme "vector borne", sia a livello locale, che su scala planetaria (basti pensare alle ultime pandemie da virus influenzali e coronavirus); incremento costante ma più evidente dopo il 1990 di ceppi microbici resistenti (spesso poliresistenti) ai farmaci.

L'Italia non è esente da questi eventi, come dimostrano i nuovi virus respiratori o la comparsa di infezioni fino a pochi anni fa "aliene", come la Dengue. Preoccupante il diffondersi di microrganismi farmaco-resistenti: su tutti, MDR/XDR *M. tuberculosis* in Europa orientale, Africa e Asia, *St. aureus* meticillino-resistente in USA ed estremo oriente, *Candida auris* in USA, Plasmodi malarici ovunque la malattia sia endemica. Né vanno dimenticate EIDs in seguito a episodi di bioterrorismo, sospetti o accertati: antrace in USA e Asia, Hendra-virus in Australia<sup>17</sup>.

Per il prossimo futuro tutte le stime<sup>16</sup> concordano su un incremento del trend attuale, anzi, ancor più marcato: pertanto è facile prevedere il rischio di infezioni, a carattere tendenzialmente pandemico, globalizzato, da patogeni emergenti anche totalmente sconosciuti, susseguenti a zoonosi e relativi fenomeni di spillover, trasmessi da animali ai quali viene sovvertito il proprio habitat naturale, anche e, forse, soprattutto, per mano dell'uomo. Così come è facile prevedere un aumento delle antibiotico-resistenze, cui si aggiungeranno ulteriori segnalazioni di resistenze agli

antivirali già impiegati, ma anche di ultima generazione, da parte di virus patogeni. L'Italia sarà interessata da EIDs anche in conseguenza dei cambiamenti climatici e della tropicalizzazione del clima, con alluvioni che sconvolgono ampi territori e ripercussioni sulle popolazioni, la flora e la fauna: pertanto ci dovremo confrontare con zoonosi e infezioni trasmesse da vettori vecchi e nuovi. Il fenomeno dell'antibioticoresistenza sarà legato alla nostra capacità di migliorare, e calmierare, scelte oggi scellerate nella prescrizione degli antibiotici e nello stimolo all'industria farmaceutica nell'utilizzo delle moderne tecnologie per allestire molecole innovative.

### Zoonosi e spillover

Infezioni causate da patogeni trasmessi da animali, a seguito del salto di specie, sono in forte aumento in tutto il mondo da più decenni: cambiamenti climatici, disastri ambientali, profonde modifiche degli habitat naturali, quali le deforestazioni sistematiche,

a spese della fauna, sono tra i fattori favorevoli. Lo spillover è l'evento conclusivo di complesse interrelazioni tra più specie, che possono essere caratterizzate da fasi e situazioni diversificate, durante le quali si verifica l'infezione di animali diversi dal reservoir primario e/o dell'uomo:

1. microbi presenti negli animali e trasmessi ad altre specie ma, in condizioni naturali, non all'uomo;
2. patogeni che dagli animali possono essere trasmessi all'uomo (infezione primaria), mentre è impossibile l'infezione secondaria tra umani;
3. – 4. il patogeno, trasmesso all'uomo, compie pochi o numerosi cicli replicativi e di maturazione nell'uomo stesso, caratterizzando così una fase di latenza e un'infezione secondaria di breve o lunga durata;
5. patogeni adattati all'uomo e trasmessi solo per via intraumana<sup>18</sup>.

Nella Tab. 4 sono riportati alcuni esempi delle 5 fasi qui illustrate.



**Tab. 4.** Esempi di microrganismi che, attraverso fasi differenti di maturazione e replicazione, vengono trasmessi da animali all'uomo, infettandolo (vedi testo).

### ***Cambiamenti climatici, salute e malattie infettive***

I modelli convenzionali considerano solo gli effetti diretti delle variazioni climatiche e i cambiamenti finali della salute, ma vi sono anche conseguenze indirette, attraverso la loro influenza su numerosi fattori socioeconomici, combinandosi con questi, reciprocamente, in un processo a due vie che provoca rischi per la salute, condizionata pertanto a sua volta da situazioni socioeconomiche. Il clima non può essere considerato solo come la parte esterna di questo sistema: i fattori socioeconomici guidano e condizionano i cambiamenti climatici attraverso l'emissione di CO<sub>2</sub> e altri gas e le modifiche della superficie terrestre<sup>19</sup>.

I cambiamenti climatici provocano un ventaglio di reazioni, innanzitutto sull'interazione microrganismi/ospite e sulle produzioni agricole, a seguire sui mezzi di sussistenza, la sicurezza agro-alimentare, i comportamenti, con ulteriori ripercussioni sulla disponibilità di cibo e acqua, la variabilità demografica, gli assetti sociali, economici e sanitari e gli spostamenti di popolazioni, che a loro volta determinano ricadute sui rapporti microrganismi/ospite, chiudendo così un circolo perverso<sup>20</sup>.

Le variazioni climatiche provocano ripercussioni sulla biomassa terrestre e marina, i cui mutamenti quali-quantitativi sono strettamente dipendenti dall'aumento delle temperature, le oscillazioni marcate di piovosità, l'umidità, l'irraggiamento; l'aumento della biomassa e l'emersione di nuove specie, ad esempio per lo scioglimento del permafrost, può cambiare in un dato ambiente il rapporto aerobi/anaerobi, determinare nel suolo e nelle acque nuove catene metaboliche come la metanogenesi, aumentare la decomposizione della flora, mutare la tipologia di nutrienti nel suolo e nelle

raccolte idriche, infine, produrre ulteriori quantità di CO<sub>2</sub> e altri inquinanti.

Numerose attività umane, a cominciare dall'agricoltura, dipendono dalla composizione microbiologica del terreno e dell'ambiente e la condizionano: ricordiamo come i fertilizzanti a base di N e P interferiscono col metabolismo microbico; le vasche di trattamento emettono metano e altri prodotti carboniosi; l'emissione di CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> non è da imputare alle sole attività industriali, ma anche agricole (allevamenti di ovini e bovini) e terziarie; in determinati habitat, le variazioni climatiche selezionano specie microbiche riducendone la biodiversità e la capacità di vivere in una simbiosi benefica con le piante e supportarne la crescita; ma i guasti maggiori, l'eutrofizzazione e il perturbamento dell'ecologia microbica sono, sempre e comunque, da ricondurre ad attività umane.

Le variazioni climatiche amplificano l'impatto dei patogeni: è stretta la connessione tra mutamenti climatici antropogenici e diffusione, mediante ampliamento dei propri areali, dei vettori di patogeni e infezioni correlate; particolarmente pesanti sono le conseguenze sulla biovita marina, stressata a seguito della rottura di delicati equilibri degli ecosistemi e diffusione di nuove malattie infettive; aumentano le malattie delle piante alimentari per l'invasione di parassiti "alieni", con perdita dei raccolti, e attentato alla sicurezza agraria, da cui la necessità di una sorveglianza più assidua; l'aumento della temperatura correla con l'incremento delle antibioticoresistenze, per selezione di ceppi neutralizzanti i nostri farmaci; la fuga da terre deforestate e desertificate di animali vettori favorisce le zoonosi e la diffusione planetaria dei microrganismi; nuove reti e più efficaci mezzi di sorveglianza ambientale, climatologica e microbiologica diventano irrinunciabili.



Per quanto riguarda la trasmissione dei patogeni, numerosi sono i fattori ambientali e le variazioni climatiche che la influenzano. 4 gli scenari possibili:

- 1) Patogeni trasmessi da vettori animali (malaria, dengue, West Nile Virus, m. di Lyme): la trasmissione è influenzata dalle precipitazioni piovose, umidità relativa, temperatura, oscillazioni periodiche del Niño del Sud. Parametri che interferiscono con la trasmissione sono la carica del vettore, la replicazione del patogeno nel vettore stesso, epoca e numero dei morsi (o punture).
- 2) Patogeni trasmessi mediante acque infette (vibrioni, criptosporidium, rotavirus): interferiscono la temperatura ambientale e delle acque, pH e salinità di queste ultime, fattori ambientali quali le precipitazioni e il Niño; importanti sono il trasporto, la sopravvivenza e la replicazione dei patogeni.
- 3) Patogeni trasmessi per via aerea (virus influenzali e parainfluenzali, coronavirus, hantavirus, coccidioides): i parametri climatici e ambientali che interferiscono con la loro diffusione sono temperatura, umidità relativa e andamento dei venti, quelli inerenti le modalità di trasmissione riguardano la sopravvivenza e la dispersione dei microrganismi nell'ambiente.
- 4) Patogeni trasmessi con gli alimenti (salmonelle, campylobacter): a livello ambientale hanno importanza temperatura e precipitazioni, per la trasmissione la replicazione microbica e i comportamenti umani.

Negli ultimi anni imponenti flussi migratori, in e fra tutti i continenti, devono essere imputati ai cambiamenti climatici, cronici o repentini, e disastri ambientali; come abbiamo avuto modo di sottolineare<sup>21</sup> nella conferenza presso l'Accademia Lancisiana nel 2021 (origine di COVID-19), le stesse motivazioni e i

perturbamenti della biologia e degli habitat naturali riguardano anche gli animali: milioni di specie, miliardi di esemplari fuggono e viaggiano anche più velocemente dell'uomo, portando con se un carico di patogeni vecchi o sconosciuti.

Oscillazioni sempre più marcate della piovosità (alternanza di periodi siccitosi e altri a carattere alluvionale) e aumento termico nelle zone endemiche per diverse infezioni "vector borne", soprattutto in Africa, sono oggetto di studio congiunto fra epidemiologi, climatologi e zoologi; malaria e dengue sembrano risentirne maggiormente, il risultato finale è comunque un'estensione dell'areale degli insetti vettori e una diffusione delle patologie a macchia di leopardo, irregolare e imprevedibile, più a nord e più a sud del convenzionale<sup>22</sup>.

Le emissioni di CO<sub>2</sub> e altri inquinanti sono studiate e dibattute negli incontri internazionali sul clima soprattutto nell'ottica degli effetti diretti sulla salute umana, quali i danni respiratori e cardiovascolari; i processi infettivi, visti soprattutto come conseguenze secondarie e sovrapposte, spesso latitano da queste discussioni, mentre meriterebbero un'attenzione ben maggiore e ricerche più accurate riguardo i rapporti specifici dei singoli patogeni con gli inquinanti e le modalità di diffusione.

Negli ultimi 120 anni la temperatura media è aumentata in Africa di 2.5/3.5°, in Europa, Asia del nord e regioni artiche di 5° e oltre: per ogni grado di aumento, le zanzare *Anopheles* e *Aedes* possono estendere il proprio areale di diffusione di due gradi di latitudine, a nord e a sud<sup>23</sup>.

La perdita dei grandi polmoni verdi rappresentati dalle foreste pluviali, in Amazzonia, Africa centrale e sud-est asiatico, sia a seguito dei cambiamenti climatici (aumento della temperatura,

riduzione della piovosità, avanzamento di aree aride), sia per mano dell'uomo (disboscamento irrefrenabile) muta gli habitat naturali di popolazioni umane e animali, costrette a fuggire: nella già citata conferenza del 2021<sup>21</sup>, cui si rimanda, abbiamo estesamente discusso di questi problemi, alla luce dell'origine dei coronavirus patogeni, dello spillover da mammiferi e uccelli all'uomo di nuovi microrganismi, della diffusione planetaria di pandemie da agenti finora sconosciuti<sup>24</sup>.

Inserire le malattie infettive, e in primo luogo NTIDs, tra le conseguenze cosiddette "invisibili"<sup>25</sup> dei cambiamenti climatici e di quei fattori socio-economici di cui parleremo a breve, comporta due ricadute a parer nostro negative: in prima istanza, da un punto di vista mentale e culturale, generando un'attenzione solo marginale a livello governativo e legislativo, oltretutto nei massmedia e nell'opinione pubblica; inoltre da un punto di vista operativo ed economico, stornando fondi pubblici e privati dal problema "salute". E così le infezioni nel sud del mondo e nei LMICs, già neglette e trascurate, perdono ulteriore visibilità rispetto ai danni materiali, certamente ingenti e planetari, che i nuovi climi determinano.

Tra i paesi maggiormente colpiti, negli ultimi decenni, dalle conseguenze delle variazioni climatiche, l'Italia è, come quasi tutto il mondo nord-occidentale, in prima linea: aumento delle temperature e dei giorni con ondate di calore, precipitazioni incrementate non tanto in quantità, ma per una nuova tipologia ad impronta torrentizia e tropicale, estensione dei territori aridi, dissesto idrogeologico, sono sotto gli occhi di tutti e caratterizzeranno clima e ambiente in futuro. Ma si stanno evidenziando due scenari differenti, a causa della concentrazione antropica in grandi città, urbani ed extraurbani, con i primi a manifestare più evidenti ricadute

su tutta la sfera della salute, com'è dimostrato dall'aumento della mortalità negli anziani in estate, i secondi più sul versante infettivologico, per la comparsa di patogeni finora assenti o rari alle nostre latitudini: dengue, chikungunya, West Nile Virus, micobatteri ambientali. Il nuovo coronavirus, tuttavia, si è diffuso ovunque<sup>26</sup>.

Lo scioglimento del permafrost a seguito dell'innalzamento delle temperature nelle aree siberiane e artiche comporta lo sprofondamento dei suoli, l'immissione di una massa di terreno e acqua, finora trattenuti dal gelo, nei mari e nei fiumi, l'emersione di strati sottostanti; il carotaggio con indagini microbiologiche fornisce elementi su quella che, a breve, potrebbe divenire una "nuova" Microbiologia. Siamo in grado di rilevare segni diretti e indiretti della biomassa e del microbioma di terreni e strati non più coperti dal gelo, rimasti esclusi dal contatto con l'atmosfera per migliaia di anni. Acidi nucleici, frazioni proteiche e altro materiale organico sono riconducibili a batteri, perlopiù anaerobi, clamidie, attinomiceti, clostridi, spore e virus appartenenti a centinaia di specie in gran parte ignote: alcune, immesse nel mare, si sono dimostrate né dormienti, né inattive, bensì vitali e patogene per la fauna acquatica<sup>27</sup>. Ci chiediamo, quante per l'uomo? È stato condotto un carotaggio anche di terreni ora riemersi, i cui strati risalgono al Pleistocene: nelle carote con materiale risalente a 19/27/33.000 ya è stato trovato DNA di attinomiceti (micrococcaceae), bacilli (bacillaceae, termoattinomiceti), clostridi, anche in sequenze integre<sup>28</sup>.

Numerose conseguenze dei cambiamenti climatici, dei disastri idrogeologici e dell'inquinamento atmosferico si sono dimostrati, in uno studio recente<sup>29</sup>, concause importanti nella diffusione di virus influenzali e dei

Coronavirus: è cambiato l'habitat di numerosi uccelli selvatici migratori, reservoir dei virus influenzali, mentre per i Coronavirus la deforestazione e l'acquisizione di nuovi areali periurbani dei pipistrelli, loro serbatoio naturale, sono dati acquisiti da tempo. Il cambiamento delle correnti aeree, oggi più accentuato, e le marcate oscillazioni dell'irraggiamento, dell'umidità e delle piogge sono gli altri elementi concorrenti, che, all'unisono, potrebbero aver favorito anche la rapida diffusione di COVID-19, soprattutto nell'emisfero boreale.

Numerose infezioni, catalogabili soprattutto fra NTIDs e EIDs, hanno visto negli ultimi decenni aumentare le proprie zone di diffusione, a latitudini insospettite e là dove finora non si erano mai viste, anche per il concorso decisivo dei fattori climatici e ambientali ora discussi. Riportiamo alcune situazioni.

**Ebola.** Il virus ha provocato epidemie periodiche con migliaia di infetti e 32.000 morti dal 1976 a oggi; si è diffuso lungo il fiume omonimo, nei paesi del golfo di Guinea, sporadicamente altrove. Hanno concorso alla sua diffusione, oltre il mutato habitat dei reservoir e diversi disastri ambientali, molti imputabili all'uomo, numerosi fattori legati a promiscuità uomo-animali e particolari abitudini alimentari, sociali e usanze funebri delle popolazioni del luogo<sup>30, 31</sup>. Ma gli ambientalisti hanno lanciato per i prossimi anni l'allarme: lo sconvolgimento in Africa centrale della natura, in particolare la perdita delle foreste pluviali (sempre!) per mano dell'uomo e l'avanzata di terreni aridi e desertificati, come in Asia e Amazzonia, costringe uomini e animali, soprattutto volatili, a migrare, incontrarsi, vivere maggiormente a contatto fra loro anche presso le grandi città: ecco che l'areale di diffusione di Ebola sta per estendersi dall'Atlantico fin quasi alle coste dell'Oceano Indiano, dall'Africa

subсахariana e molto a sud del Tropico del Capricorno. Se tutto questo è irrefrenabile, deve almeno partire una campagna di educazione sanitaria delle popolazioni al cambiamento di abitudini ataviche, per limitare prossimamente i contagi in occasione di nuove epidemie<sup>5</sup>.

**Zika.** L'infezione fino a vent'anni fa era praticamente confinata in Africa centrale, in seguito si è estesa sia in Oriente che, ancor più, in America centro-meridionale, tanto da scatenare piccole epidemie in Brasile. Casi sporadici, ma d'importazione, sono stati segnalati anche in Europa; in Italia da viaggiatori in Brasile e Polinesia, nessuno finora autoctono. La diffusione dalle foreste africane a tutta la fascia tropico-equatoriale del pianeta, con sporadiche estensioni nelle zone meridionali di Argentina e Brasile, e numerosi paesi allertati, è dovuta a nuove specie di zanzare del genere *Aedes* in grado di veicolare il virus (ad es., zanzara tigre), alla dispersione di vettore e virus mediante i viaggiatori, alle correnti transoceaniche mutate negli ultimi decenni<sup>32, 33</sup>.

**West Nile Virus.** L'infezione è arrivata in Italia, diverse segnalazioni negli ultimi anni di casi, anche gravi, neurologici, soprattutto nelle campagne e fra gli allevatori di cavalli. Le zanzare vettrici (*Aedes*) sono giunte alle nostre latitudini con merci e animali, ma anche sfruttando correnti calde tropicali e giovandosi di temperature elevate. Casi sono stati segnalati persino nelle isole Britanniche e nei paesi baltici, il numero di nazioni a rischio o con infezione presente, aumenta sempre più. Per quanto riguarda la diffusione tropico-equatoriale, valgono le stesse situazioni viste per Zika<sup>34, 35</sup>.

**Dengue.** È una delle infezioni più diffuse al mondo (vedi Tab. 1), fino a 100 milioni di nuovi casi/l'anno e 20.000 decessi; i paesi extra-tropicali colpiti sono sempre più numerosi, Italia inclusa, con casi

di variabile gravità; segnalazioni arrivano dall'Australia alle zone subartiche, tant'è che fra pochi anni potrebbe essere riduttivo definirla "malattia tropicale". Anche in questo caso si nota un aumento di specie del genere *Aedes* responsabili della trasmissione<sup>36</sup>. Negli ultimi 5 anni è stata evidenziata un'inversione di tendenza in America centrale e latina, con riduzione di incidenza e mortalità; il fenomeno non ha trovato finora spiegazioni definitive, probabile il concorso di cause climatiche (Niño?), l'inversione di correnti aeree e oscillazioni di piovosità e temperatura: il trend andrà monitorato per tempi più lunghi.

**Febbre gialla.** Originaria dell'Africa, diffusasi nelle Americhe con la tratta degli schiavi, era fino a qualche decennio fa assente in Asia ed estremo oriente: anche in queste zone, e persino in Europa, iniziano le segnalazioni di casi autoctoni e d'importazione, a causa degli stessi fattori ecologici, climatologici e turistico-commerciale che abbiamo discusso nei paragrafi precedenti riguardo le infezioni trasmesse dalle zanzare del genere *Aedes*. In Oriente la situazione potrebbe divenire complessa nei prossimi anni: aumentano i paesi a rischio e la trasmissione ha due vie di accesso, da ovest (Africa) e da est (America centro-meridionale), il che la differenzia da altre "vector borne" prevalenti solo in Africa<sup>37, 38</sup>.

**Chikungunya.** Originaria dell'Africa, è ormai diffusa in quasi tutta l'America, Cina e Asia del sud-est, ed è arrivata nei primi anni di questo secolo anche in Europa occidentale. In Italia dal 2007 si sono registrati alcuni focolai, anche con casi gravi e decessi, riconducibili non tanto a *Aedes Aegypti*, suo veicolo primario, quanto alla zanzara tigre, giunta alle nostre latitudini con merci provenienti da altri continenti e stanziatasi ormai ben oltre i tropici, sia nel nostro emisfero, come in quello australe<sup>39</sup>.

### **"Poverty"**

Infezioni emergenti, malattie tropicali dimenticate, ma anche le "convenzionali" tubercolosi, malaria, HIV, epatiti, infezioni sessualmente trasmesse trovano una interconnessione perversa, un circolo vizioso di cause ed effetti, con tutti quei fattori politico-economici, sanitari, ambientali, comportamentali e culturali, il cui ruolo e differente grado di compenetrazione nel tessuto sociale segnano la discriminante fra attuazione o mancanza di uno sviluppo sostenibile (SDGs). Soluzioni sanitarie ad impatto immediato, o a lungo termine, ne sono state proposte in gran numero negli ultimi decenni, da ONU, OMS e altri organismi internazionali, programmi perlopiù disattesi o riusciti solo parzialmente, come quello per la diffusione di vaccini e l'accesso a farmaci a basso costo per cure primarie.

Oggi si è compreso che il concetto di "poverty" non può essere inteso solo su una base meramente economica: alla stragrande maggioranza delle popolazioni del mondo tanto altro manca, oltre le risorse monetarie, in campo alimentare, educativo, sanitario, lavorativo e professionale, cura dell'infanzia e dei fragili, e l'elenco è ancora lungo. La chiave di volta è questa: i problemi sanitari non si risolvono, soprattutto, ma non solo, nei paesi LMICs, e la lotta a malattie ataviche come quelle infettive, fino all'eradicazione delle stesse, non può avere successo, se non si affronta uno sviluppo sostenibile globale che investa tutta la società. Così l'OMS ha stilato una serie di obiettivi che rispondono ad una domanda di salute e benessere globale, in un'ottica imprescindibile nella soluzione di tutti i problemi della società, anch'essa globale<sup>40</sup>. I 17 obiettivi prefissati sono elencati nella Tab. 5<sup>41</sup>.

È indubbio tuttavia che gli aspetti economici rimangono preminenti: pertanto, se vogliamo attribuire alla percentuale di

PIL investito in salute, nelle diverse nazioni, il valore di indicatore significativo di efficienza e organizzazione sanitaria, anche se sappiamo che questo parametro da solo non è sufficiente a fornire indicazioni assolute, l'esame di una mappa planetaria evidenzia, e non può essere un caso, un rapporto inversamente proporzionale tra i valori di PIL investiti e la diffusione delle malattie infettive: evidenziamo indici inferiori al 2%, o prossimi allo zero, in tutta l'Africa (ad eccezione del Sud-Africa), l'America centro-meridionale, versante andino, l'Europa dell'est, buona parte dell'Asia, tutte aree geografiche in cui maggiore è la diffusione, in valori assoluti e tipologia, delle patologie infettive. L'Italia come quasi tutta l'Europa occidentale si trova in una posizione intermedia, circa il 5%, giudicata oggi alla luce di quanto accaduto con la pandemia da COVID-19 insufficiente; paesi "virtuosi" sono (>10%) Svizzera e USA, ma sappiamo come proprio in America vi siano altri problemi di assistenza sanitaria e forti sperequazioni fra ricchi e poveri, pubblico e privato, che si riflettono anche nella gestione delle malattie infettive e delle campagne vaccinali.

Va ribadito che tutte quelle cause ed eventi che possono comunque condizionare e amplificare la vulnerabilità e le fragilità degli assetti socio-sanitari, hanno un peso e conseguenze ben maggiori, spesso devastanti, nei LMICs (Tab. 6<sup>42</sup>) ; per riportare un esempio, pensiamo a come la guerra civile abbia in Siria dissolto il sistema sanitario pubblico, esponendo la popolazione a nuove pandemie, alla mancanza di farmaci e vaccini, ad una speranza di vita tornata ai livelli di parecchi decenni fa.

Tutte le stime concordano nel prevedere, nel prossimo decennio, un'accentuazione delle sperequazioni economiche tra benestanti e poveri, a livello individuale, di popolazione, di

regione geografica, soprattutto in Africa: chi oggi non può investire in sanità, senza aiuti internazionali, domani avrà a disposizione risorse ancor più basse, anche per le necessità elementari in prevenzione, assistenza e cura. Corriamo il rischio che le liste di NTIDs e EIDs debbano essere prossimamente aggiornate con l'inserimento di ulteriori infezioni<sup>43</sup>.

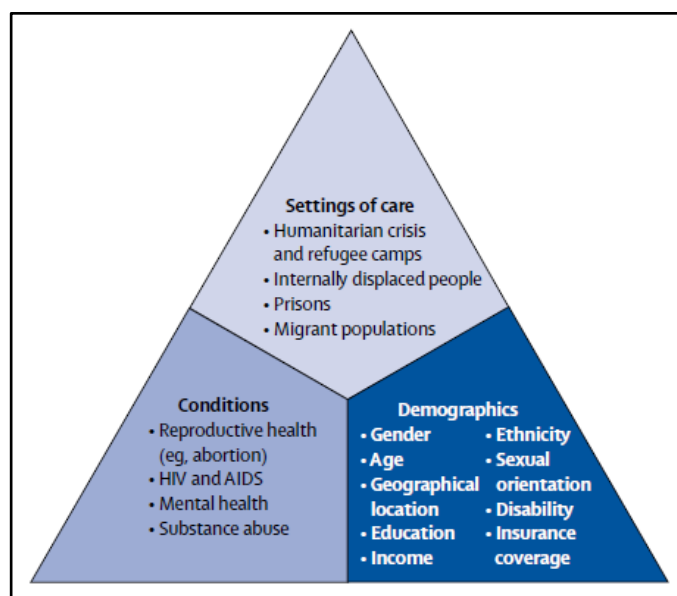
Ma, riguardo gli aiuti internazionali, la ricerca di vaccini in infezioni "orfane" o il miglioramento di altri ormai obsoleti, nonché l'allestimento di preparati a costi contenuti, hanno stimolato diverse istituzioni ad occuparsi dello sviluppo di vaccini contro EIDs e NTDs, da distribuire in Africa e Asia, là dove le popolazioni sono più esposte a malattie infettive altrimenti prevenibili e curabili<sup>44</sup>: fra gli enti meritevoli ricordiamo la senese NVGH, alla cui guida scientifica vi è Rino Rappuoli, che ha provveduto a preparare, con tecniche innovative e distribuire a basso costo vaccini contro shigellosi, febbre enterica, rotavirus e meningiti, e ne ha in progetto numerosi altri<sup>45</sup>.

Concludiamo con un'osservazione significativa che riguarda la nostra Europa: uno studio recente ha correlato la diffusione nelle singole nazioni di infezioni neglette ed emergenti con diversi parametri rientranti nel concetto di "poverty" e il PIL<sup>46</sup>. Mentre nei paesi centro-occidentali prevalgono infezioni batteriche e virali, all'est e nei nuovi stati nati dalla dissoluzione dell'Unione Sovietica, il cui PIL è tra i più bassi sia in termini assoluti, che nella percentuale investita in sanità, sono molto diffuse le elmintiasi alimentari, le geelmintiasi e le infezioni protozoarie, configurandosi un quadro accostabile a quello degli altri LMICs del mondo. Concorrono a questa situazione anche i recenti flussi di profughi innescati dai conflitti in medio-oriente e regione afgana.





**Tab. 5.** Obiettivi di uno sviluppo sostenibile<sup>41</sup>.



**Tab. 6.** LMICs: cause ed eventi che condizionano e amplificano la vulnerabilità e le fragilità degli assetti socio-sanitari<sup>42</sup>.

### **Note epidemiologiche su i Coronavirus e i patogeni più diffusi al mondo**

**Coronavirus.** L'imprevedibilità dell'origine e della diffusione di COVID-19 contrasta con un dato incontrovertibile: conosciamo CoV patogeni per l'uomo da più di 50 anni, ma nella rete di sorveglianza dei vettori ed ecologia ambientale degli stessi, evidentemente, c'è stata qualche falla. Solo per citare le forme maggiori, dal 1966 al 2004 si diffusero in Asia almeno 3  $\alpha$  e  $\beta$ -CoV, trasmessi da pipistrelli e roditori, che provocarono piccole epidemie con infezioni delle alte/medie vie respiratorie; nel 2005 si ebbe un salto di qualità con la diffusione dai roditori di un nuovo  $\beta$ -CoV che provocò polmoniti anche mortali. Dal 2003 a oggi abbiamo avuto le ben note SARS-CoV1, MERS e SARS-CoV2, tutte da  $\beta$ -CoV trasmessi dai pipistrelli (e, forse, altri animali), il cui tasso di mortalità è stato, rispettivamente, del 10, 37 e 3.7%<sup>47</sup>. Oggi conosciamo le caratteristiche e le differenze molecolari dei CoV patogeni, sequenze comuni e specifiche dei genomi, proteine strutturali, non strutturali e accessorie, interazioni recettoriali con le cellule umane: tutto questo ha permesso di comprendere l'eziopatogenesi di ogni singola forma infettiva e la variabilità dell'interazione CoV-ospite e della risposta immune, da cui dipendono i diversi quadri clinici, da sfumati a letali. Ma, soprattutto, le nostre conoscenze genetiche e molecolari dei due protagonisti, aggressore ed ospite, hanno fatto sì che si ottenessero in tempi brevi diversi tipi di vaccini efficaci anti-COVID-19, nella speranza di avere presto un presidio universale contro la maggioranza dei CoV<sup>48</sup>, che altri, nel prossimo futuro, infesteranno sicuramente il mondo.

**Malaria.** Nella Tab. 1 sono riportati i dati statistici complessivi di tutte le forme, invero tuttora drammatici; ma, nello specifico, incidenza e mortalità da *Pl. falciparum* sono in calo, almeno negli adulti, da vent'anni a oggi, grazie all'adozione di filtri quali le zanzariere, la bonifica di aree paludose,

l'impiego di farmaci dotati di una certa efficacia, come l'artemisina. L'incidenza globale nel mondo si è ridotta dal 2000 al 2019 del 9%, la mortalità del 27%; in Africa, incidenza e mortalità si sono ridotte, rispettivamente, del 5% e del 26%<sup>49</sup>. Tutto questo in attesa di un vaccino, che da anni rimane un obiettivo cui si dedicano istituzioni pubbliche e private: numerosi finora sono stati i tentativi e le sperimentazioni fallite, ora, con le tecnologie più moderne, il traguardo sembra prossimo.

Diversa la situazione per le forme da *Pl. vivax*, che è il parassita predominante nel sud-est asiatico e sud-America: gli indici statistici evidenziano una situazione quasi stazionaria negli ultimi decenni, mentre nelle stesse aree endemiche, ma anche in Africa, aumentano le segnalazioni di resistenza del *vivax* alla cloroquina e altri farmaci<sup>50</sup>.

Abbiamo sottolineato come il decremento delle infezioni da *Pl. falciparum*, e mortalità correlata, sia un dato che riguarda gli adulti: tutte le forme di malaria incidono invece con intensità significativa in età infantile, soprattutto < 5 anni, rappresentando, specie in Africa subsahariana, una delle maggiori cause di morte a quell'età, senza sostanziali variazioni negli ultimi tempi di rilevazione: tutto questo impone, in paesi tra i più poveri del mondo, complessi programmi di prevenzione e stringenti monitoraggi dell'unità materno-infantile. Se sovrapponiamo le mappe di endemicità della malaria e quelle relative agli stati con stime assolute di "poverty", le une e le altre praticamente coincidono.

Tra le malattie infettive, la malaria rimane la più emblematica dei paesi gravati da "poverty" e che subiscono passivamente gli effetti dei cambiamenti climatici e dei danni al proprio territorio; si rende perciò indispensabile un modello integrato e complesso per affrontare tutti i fattori di rischio, tenendo conto delle caratteristiche di popolazione e individuali nella risposta ai

patogeni e ai vettori<sup>51</sup>. Un modello siffatto, valido anche per altre infezioni tropicali, potrebbe assemblare e connettere i seguenti parametri riguardanti le comunità:

- 1) Ambientali, modifiche e variabilità del clima: temperatura differenziata dell'aria, delle acque, percepita al suolo; precipitazioni medie annue; El Niño.
- 2) Modifiche dell'utilizzo della terra e dei territori, in tema di agricoltura, variazioni di micro-habitat, zone umide e paludose, programmazione della topografia generale di una regione e delle opere di bonifica.
- 3) Rischi connessi all'eziopatogenesi della malattia: numero e concentrazione dei vettori, modalità di trasmissione mediante morsi, carica dei parassiti.
- 4) Suscettibilità (o resistenza): differenze nella risposta immune fra adulti e bambini, situazione idro-alimentare, percezione del rischio e protezione individuale, risvolti della "poverty" sul benessere fisico e mentale delle popolazioni.
- 5) Capacità difensive acquisite della popolazione: uso delle zanzariere, controlli ambientali, livello di preparazione del capofamiglia, comportamenti per migliorare salute e benessere delle famiglie e delle comunità.
- 6) Capacità difensive istituzionali: qualità dei sistemi nazionali locali, controllo e lotta alle zanzare, qualità dell'informazione e delle procedure d'istruzione.

**Tubercolosi.** I numeri riportati nella Tab. 1 non sono esaustivi della situazione globale dell'infezione, non entrando nel merito delle profonde differenze fra aree geografiche riguardo incidenza, mortalità e diffusione di forme cliniche gravi e farmacoresistenti; la malattia tubercolare continua a colpire pesantemente i paesi "storicamente" coinvolti, nell'Africa sub-sahariana e Asia sud-orientale, ma soprattutto da due/tre decenni si sta diffondendo in Europa dell'est e paesi ex-sovietici<sup>52</sup>. Se complessivamente indici quali incidenza e mortalità complessiva,

fra HIV+ e HIV- hanno avuto un piccolo, ma costante decremento dall'inizio del secolo attuale, siamo comunque lontani non solo dall'eradicazione, ma da una decisa inversione di tendenza nella diffusione della malattia e questo sancisce, in sostanza, il fallimento dei piani a medio-lungo termine dell'OMS che si proponevano di raggiungere cifre ben diverse.

Vi sono anche differenze per quanto riguarda la tubercolosi polmonare ed extrapolmonare: quest'ultima mantiene un'incidenza costante ed è diffusa soprattutto in Africa mediterranea, medio-oriente, Mongolia e Oceania.

In Italia, prima del COVID-19, fino al 2019, erano notificati circa 3300 casi l'anno, di cui il 79.5% nuovi e il 70% forme polmonari; 355 decessi (nel 2019) fra pazienti nuovi e pregressi, ma il dato forse più significativo è l'incremento anche nel nostro paese dei casi MDR-TB, 46, 38 dei quali polmonari e 2 XDR-TB.

L'eradicazione della tubercolosi passa per due grandi sfide nel prossimo futuro: la prima è proprio quella del contenimento delle forme farmaco-resistenti, in aumento in tutto il mondo sia come paesi coinvolti, ormai più di 60, sia come aree geografiche interessate, quelle "storiche" ma soprattutto l'est europeo, sia infine nella tipologia di resistenze, alla rifampicina, ad altri farmaci di prima e seconda scelta, o totalmente resistenti (XDR-TB). Fra i numeri più significativi, segnaliamo la percentuale di MDR-TB tra i nuovi casi e quelli precedentemente trattati, 3.4% e 18%, rispettivamente. È stato osservato che fra i casi resistenti alla rifampicina, solo la metà reagisce positivamente a farmaci di seconda scelta, e quasi il 40% diviene XDR-TB. Pochi dati, questi, emblematici della nuova situazione della malattia e delle forme cliniche che caratterizzeranno i prossimi anni: come illustreremo più avanti, diventa sempre più urgente riprendere la ricerca di nuove molecole che possano affiancare o sostituire

quelle convenzionali, al fine di aumentare l'armamentario farmacoterapeutico a disposizione del clinico.

La seconda sfida è quella di trovare un nuovo vaccino, preventivo e/o curativo: acquisita ormai da anni l'obsolescenza del BCG, si battono nuove vie che coinvolgono tutta l'immunità antitubercolare, il complesso network di cellule e mediatori che a vario titolo entrano nell'interazione micobatterio-ospite<sup>53</sup>; vaccini sperimentati sono stati molti, oggi una quindicina di preparati sono in fase 1-2 o 3, i risultati per ora rimangono sostanzialmente scarsi<sup>54</sup>.

**HIV.** Sono ormai diversi decenni che l'Africa australe è l'area geograficamente più colpita, rispetto al resto del mondo, con i maggiori indici di incidenza e mortalità, riassumendo tutte le condizioni e i comportamenti a rischio che favoriscono i contagi; inoltre, proprio là dove la malattia è maggiormente diffusa, si hanno le peggiori condizioni per curare con farmaci adeguati, favorire l'aderenza ai trattamenti, e aumenta il riscontro di resistenze a nuovi e vecchi antivirali. Purtroppo questo scenario si sta diffondendo anche altrove, persino in Europa, dove, all'aumento dei casi di HIV nei paesi dell'est e baltici, corrisponde negli stessi un impiego e un'aderenza verso HAART limitati<sup>55</sup>.

In Italia il numero di nuovi casi è in lenta, costante diminuzione, attestati a <5 per 100.000 abitanti, nella media dei paesi dell'Europa occidentale; altrove, nel nostro continente, in Romania e Ucraina abbiamo valori fra 5 e 10, in Grecia e paesi baltici >10; soprattutto si è avuto un crollo dell'incidenza fra eterosessuali e tossicodipendenti, mentre la quota di nuovi casi permane invariata tra MSM e bisessuali<sup>56</sup>.

Il problema delle resistenze agli antivirali è divenuto di primaria importanza: la frequenza rilevata verso HAART in popolazioni naive riguarda tutte le aree geografiche in cui l'infezione è diffusa con incidenza più (Africa) o meno (Europa) marcata; un modello predittivo di comparsa

di nuove mutazioni in HIV associate a resistenza agli antivirali, in diverse zone del mondo, ha stimato nei prossimi anni un incremento in Europa e America latina, in particolare di quelle correlate con resistenza verso nevirapina ed efavirenz<sup>57</sup>.

**Epatiti B e C.** Storia naturale e decorso clinico di queste infezioni sono mutate radicalmente negli ultimi decenni: nel caso di HBV, da 30 anni a oggi, con l'introduzione del vaccino, per HCV, più di recente, con l'impiego di antivirali specifici di ultima generazione che possono portare all'abbattimento completo e permanente della viremia, persino alla guarigione<sup>58</sup>. Il problema è che la copertura vaccinale anti-HBV è largamente insufficiente (<50% e oltre), in Africa, India e sud-est asiatico, proprio nelle aree di maggior circolazione del virus, e analoga situazione si ripropone per la diffusione, la disponibilità, l'accesso e l'aderenza alle cure con i nuovi farmaci anti-HCV, peraltro assai costosi, là ove l'epatite C incide maggiormente. Pertanto, se non si interviene nella biodisponibilità di farmaci e vaccini più diffusamente, anche riducendone i costi, si prospetta per il prossimo futuro uno scenario di ulteriore emarginazione per le popolazioni a maggior rischio d'infezione e allargare, anche in questo campo, il divario fra paesi ricchi e paesi in "poverty"<sup>59</sup>. Anche per quanto riguarda vecchi e nuovi antivirali impiegati nelle infezioni da HBV e HCV dobbiamo prendere in considerazione il problema delle resistenze; si stima che, fra le mutazioni note associate a resistenza a Boceprevir e Telaprevir, alcune, nel prossimo futuro, aumenteranno consistentemente: V36A/M + R155K/T del 70%, A156V/T fino al 400%, V36A/M + R156K/T >700%. Inoltre si affacciano mutazioni di nuova individuazione associate a resistenza verso inibitori delle proteasi NS3/NS4, almeno una quindicina, che determinano resistenza a Telaprevir, Boceprevir, Faldaprevir, Danoprevir, Vaniprevir e Sineprevir. Pertanto non deve essere assolutamente abbassata la guardia nella sorveglianza e nel riscontro di vecchie e

nuove mutazioni, ma anche va proseguita la ricerca di ulteriori molecole per incrementare l'armamentario antivirale<sup>60</sup>.

**Morbillo.** La copertura vaccinale anti-morbillo e la riduzione di incidenza e mortalità della malattia sono indicatori, proposti dall'OMS, di wellness delle popolazioni; numerose campagne per incrementare la diffusione di questo vaccino sono state attuate negli ultimi 40 anni, abbassando drasticamente il numero e le conseguenze più gravi di piccole e grandi epidemie, specie in Africa, che causano ancora tanti morti e non solo in età infantile<sup>61</sup>. A metà degli anni '80 del secolo passato si è avuto un netto incremento dei bambini vaccinati, fino ad una media globale, oggi, dell'80%, ma ancora con profonde differenze nelle diverse aree del mondo, mentre il numero di nuove infezioni/l'anno si è attestato a 500.000, rispetto agli oltre 5.000.000 di 40 anni fa. La copertura vaccinale è ancora largamente insufficiente in buona parte dell'Africa, India e Indocina, si è drammaticamente ridotta in paesi belligeranti come Siria (< 40%), Nigeria e Afghanistan, ma anche USA, Italia, Francia e Gran Bretagna hanno visto negli ultimi anni un rallentamento delle vaccinazioni, persino < 80% (finchè non sono state adottate misure obbligatorie connesse con la frequenza scolastica), per diverse cause, come, ad esempio, le conseguenze dannose della diffusione su riviste mediche prestigiose di fake news, veri imbrogli, riguardanti i rapporti tra vaccino e autismo. In USA e Italia la copertura vaccinale non è uniforme: largamente deficitaria nel primo negli stati del sud, ove si sono verificate diverse epidemie, mentre da noi la copertura non supera l'80% nelle regioni del nord-est e vi è una forte sperequazione fra prima dose e ciclo completo<sup>62</sup>. Nei paesi in cui i contagi evidenziano valori ancora elevati, come l'Africa centro-meridionale, il miglioramento indubbio, anche se non pienamente soddisfacente, della copertura vaccinale ha comunque ridotto la mortalità infantile per morbillo negli ultimi 20 anni di oltre il 70%<sup>63</sup>.

### **Farmacoresistenze**

È un problema non nuovo, trascurato e sottovalutato, in costante incremento; se osserviamo la cronologia della scoperta degli antibiotici e dei primi report riguardanti le resistenze, ci rendiamo conto come queste ultime abbiano sempre seguito a breve l'individuazione di un nuovo chemioterapico, ai successi si sono affiancati in tempi stretti i primi riscontri di ceppi resistenti. Così è stato per la Penicillina dal 1943, Tetraciclina dal 1950, Eritromicina dal 1953, Gentamicina dal 1967, e via di seguito; del resto, gli scopritori delle diverse molecole, da Fleming in poi<sup>64</sup>, avevano da subito sottolineato la possibilità di selezione di ceppi resistenti a vecchie e nuove molecole ad azione antibatterica, fenomeno che ha iniziato ad aumentare dal 1960 con una curva in lenta ma costante crescita. Soprattutto negli ultimi decenni assistiamo ad un altro particolare, l'aumento, verso una determinata molecola, del numero e della tipologia di specie o ceppi batterici ad essa resistenti<sup>65</sup>.

Un fenomeno preoccupante, ben dimostrato in Europa e USA (ancora poco studiato altrove) è la correlazione fra aumento delle antibioticoresistenze e incremento della temperatura ambientale<sup>66</sup>: il costante e persistente innalzamento di quest'ultima, come osserviamo oggi, seleziona ceppi più resistenti a diversi fattori fisico-chimici esogeni (temperatura, ma non solo) e alcune mutazioni possono riguardare tanto l'adattamento a situazioni termiche più elevate, quanto la farmacoelusione; in altre parole, batteri che ben si adattano alle mutate condizioni climatiche sono altresì capaci, attraverso caratteri genetici ereditati o neo-acquisiti, di eludere l'armamentario farmacologico. Del resto conosciamo bene il problema dell'antibiotico dispersione nel suolo, nelle acque e nell'ambiente, anche in conseguenza di un eccessivo uso dei farmaci in questione in agricoltura e zootecnia, oltre che nella filiera industriale produttiva, per cui è indubbio che solo i ceppi geneticamente meglio attrezzati



resistono in un mondo sempre più inquinato, caldo e pieno di farmaci<sup>67</sup>.

Nella Tab. 7 sono riportate le motivazioni alla base del fenomeno, tutti fattori fra loro interconnessi, che portano ad un impiego quali-quantitativo irrazionale degli antibiotici: uso eccessivo, smodato, anche senza prescrizione medica, dispersione nell'ambiente, sono le cause principali, ma non uniche, che hanno determinato la situazione attuale e, probabilmente, un trend ulteriormente in crescita per il futuro<sup>68</sup>. Nella Tab. 8 abbiamo illustrato una serie di misure d'intervento per stoppare le resistenze agli antibiotici, e gli steps fondamentali per prevenire origine e disseminazione di batteri resistenti, a diversi livelli d'azione<sup>69</sup>.

Fra le tante situazioni oggi divenute emergenze cliniche, approfondiamo brevemente la farmacoresistenza nella malattia tubercolare. È questo un ulteriore macigno che si aggiunge, in numerosi paesi ove l'infezione incide maggiormente e con quadri clinici ancor oggi destruenti, ad altri, quali la coinfezione TB-HIV, la scarsità di risorse economiche, le capacità e possibilità gestionali limitate o arretrate. Spesso si passa dalla resistenza a farmaci primari come la rifampicina a forme MDR o persino XDR-TB. Nel 2020, poco prima dell'esordio della pandemia COVID-19, l'OMS ha aggiornato una lista di nazioni, in cui 3 eventi si sovrappongono: tubercolosi polmonare ed extrapolmonare ad alta incidenza, coinfezione TB-HIV frequente, incremento di casi MDR/XDR-TB: i paesi sono 30, dislocati perlopiù in Africa australe e sud-est asiatico, ma anche, new entries, ex Unione Sovietica.

Diversi report, dell'OMS, ma non solo, richiamano l'attenzione sui fondi stanziati per la prevenzione, la diagnosi e il trattamento della tubercolosi, in totale, per forme TB/HIV+ e MDR-TB: dal 2006 a oggi sono incrementati, ma risultano ancora insufficienti, mal distribuiti e mal gestiti soprattutto in quei 30 paesi (ecco l'importanza di aggiornare la lista)

summenzionati in cui, al contrario, occorrerebbero più risorse e meglio investite<sup>70</sup>.

Osservando i dati statistici su base geografica, notiamo quanto segue:

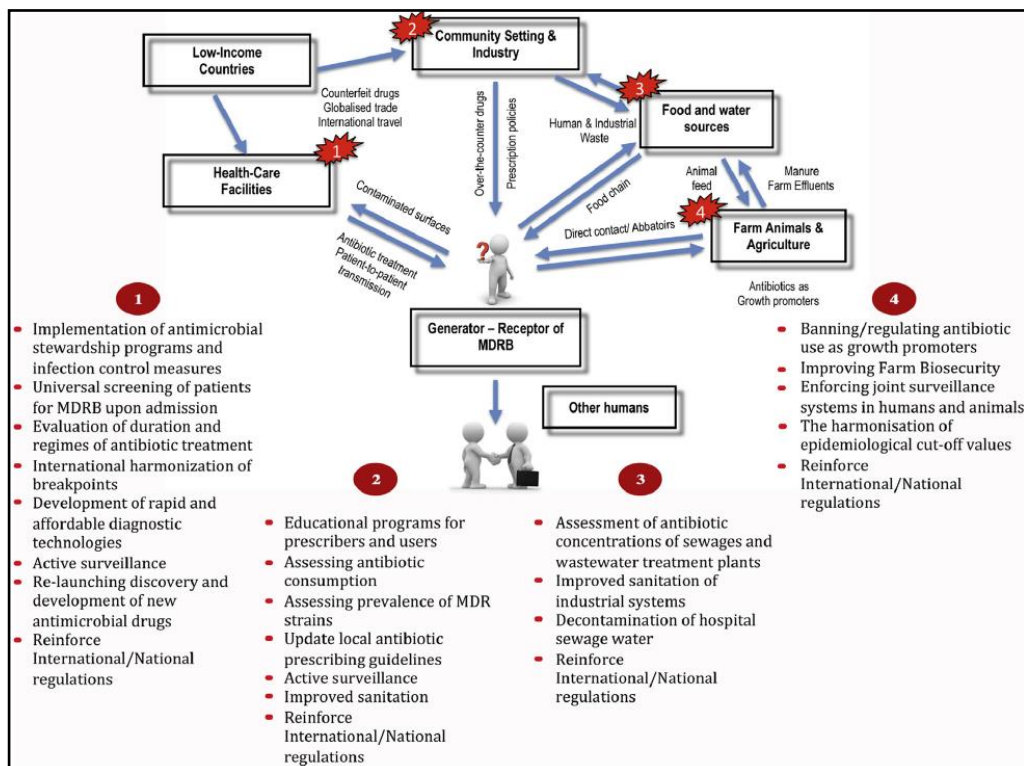
1. la resistenza primaria alla rifampicina tra i nuovi casi di tubercolosi (2019) è sì diffusa fra i 30 paesi di cui sopra, ma anche in America Latina e Messico;
2. MDR-TB, sia tra i nuovi casi, che tra quelli già trattati (2019), sta avanzando pericolosamente nell'Europa dell'est, Russia europea e asiatica, ex stati sovietici;
3. la percentuale di casi MDR-TB in cui viene eseguito il test di suscettibilità per gli antibiotici di seconda linea è largamente insufficiente non solo in Africa, ma anche in America Latina: la motivazione è da ricercare nell'esiguità dei laboratori attrezzati. Il fenomeno è però segnalato anche in Cina.

Le regioni genomiche associate con una riduzione di suscettibilità ai farmaci anti-tubercolari, individuate grazie al sequenziamento del genoma di *M. tuberculosis*, riguardano vecchie e nuove molecole, antibiotici di prima o seconda scelta; negli ultimi anni sono state individuate ulteriori mutazioni geniche, sia assolutamente nuove tra i micobatteri e specifiche di questi, che trasmesse loro orizzontalmente da altri microrganismi, connesse con resistenze farmacologiche<sup>71</sup>: tutto questo dà il polso di una situazione in evoluzione da affrontare con risorse e ricerca a tutto campo.

Un'ultima osservazione riguarda i costi: la gestione economica di un malato MDR/XDR-TB è ben diversa da quella di un paziente suscettibile, con un divario che può arrivare, nei casi più impegnativi, a superare le centinaia, persino migliaia di euro o dollari. È un ulteriore argomento che deve sensibilizzare gli operatori sanitari ad intensificare monitoraggio, gestione e ricerca specifica nel tema delle vecchie e nuove resistenze farmacologiche del *M. tuberculosis*.



**Tab. 7.** Fattori e motivazioni, fra loro interconnessi, che determinano un uso irrazionale degli antibiotici<sup>68</sup>.



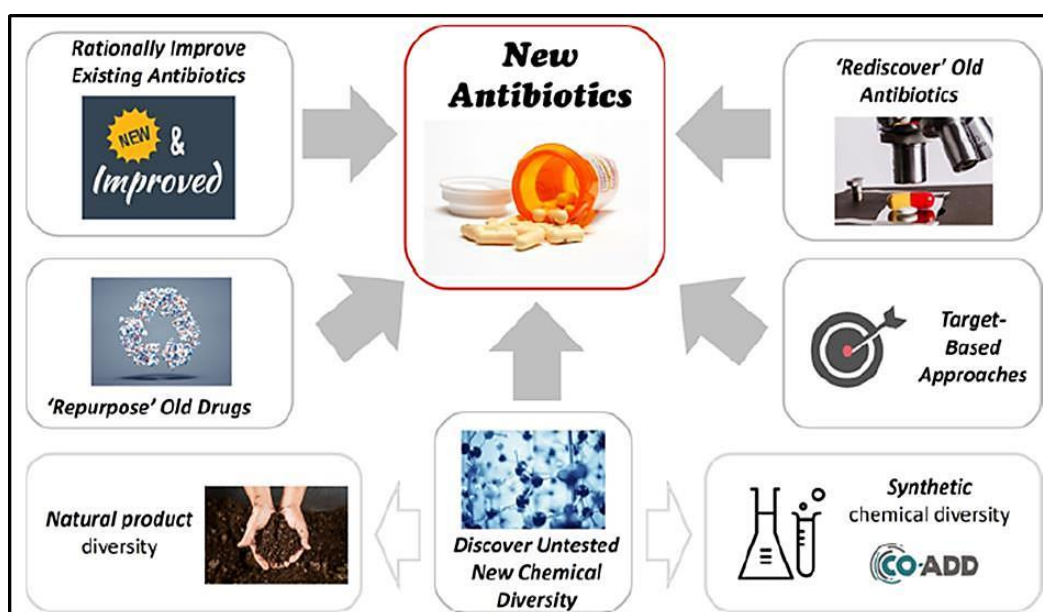
**Tab. 8.** Misure d'intervento per stoppare le resistenze agli antibiotici. Steps fondamentali per prevenire l'insorgere e la disseminazione di batteri resistenti, a diversi livelli d'azione<sup>69</sup>.

## Nuovi farmaci

Nella Tab. 9 sono illustrati approcci innovativi e percorsi differenziati per scoprire nuovi antibiotici<sup>72</sup>; ci piace sottolineare, tra le modalità delineate, il recupero critico, alla luce delle conoscenze attuali, di molecole, antibiotici o altro, in passato frettolosamente accantonate. L'impiego dell'intelligenza artificiale, di software dedicati, soprattutto di programmi di autoapprendimento sono ad un tempo sistemi teorici e mezzi operativi ormai insostituibili.

l'implementazione nella ricerca di nuovi farmaci, auspicandone, dopo accurate selezione e procedura sperimentale, e quindi l'approvazione da parte degli enti preposti, l'impiego e la diffusione, la più ampia possibile, nelle popolazioni.

La ricerca ha ripreso vigore: oggi diverse molecole sono in sperimentazione, 9 in fase I, 12 in fase II, 15 in fase III; trattasi di principi attivi totalmente nuovi, o recuperati dopo precedenti insuccessi, da impiegare singolarmente o in



Tab. 9. Approcci e percorsi differenziati per scoprire nuovi antibiotici<sup>72</sup>.

Inserendo la tubercolosi come paradigma anche di questo capitolo, ricordiamo come l'OMS, nei prossimi piani di controllo e/o eradicazione della malattia, da attuare entro il 2025, ha fissato 10 target raccomandati e validi per tutti i paesi: fra questi, l'implementazione dell'utilizzo, fino al 100%, in tutti i pazienti, dei test di farmacosenibilità (stimolando l'allestimento di test rapidi e facilmente eseguibili, in particolare in LMICs, nel primo riscontro di malattia e delle resistenze); l'impiego, nei test di secondo livello, delle tecniche più aggiornate di sequenziamento per il rilievo di vecchie e nuove mutazioni correlate alle resistenze; infine, ma non ultima,

associazione, comunque un ampio ventaglio di possibilità da cui, si spera, possano uscire farmaci in grado di affiancare quelli convenzionali e aggredire la tubercolosi proprio nelle situazioni che più preoccupano, le forme mono o poliresistenti.

Comunque è tutta l'industria farmaceutica che da qualche tempo sta nuovamente rivolgendo particolare attenzione alla ricerca di nuovi antibiotici in diversi campi: così nelle infezioni respiratorie non-tubercolari assistiamo ad una "new age", quale non si vedeva dagli anni '80/'90 del secolo passato; in USA l'FDA ha approvato, nel biennio 2020/21, dunque in epoca COVID-19, 9 nuovi antibiotici, e altri 10 sono

in fase avanzata di approvazione. Anche in questi casi si tratta di molecole scovate, fra migliaia, dall'A.I., e la sorpresa è stata nel ritrovare principi attivi già scartati e oggi riproposti da soli o in associazione sulla base di nuove conoscenze<sup>73</sup>.

### **Vaccini**

La gran parte dei temi: nuovi preparati e nuove tecnologie, copertura della popolazione, diffusione, disponibilità e accesso ai vaccini, negazionismo e avversione, fake news, antagonismo scienza-antivaccinisti, sono stati ampiamente discussi nella conferenza tenuta presso l'Accademia Lancisiana nel 2017, al cui testo si rimanda<sup>1</sup>; la pandemia COVID-19, soprattutto nel momento in cui sono stati preparati e diffusi vaccini specifici, ha accentuato l'interesse per tutta la materia, e ne è scaturito un dibattito, talora con toni accesi e non sempre lucidi e sereni, un vero e proprio scontro tra chi si affida alla ricerca scientifica e chi la rifiuta con atteggiamenti aprioristicamente irrazionali e immotivati.

A complemento e aggiornamento di quanto esposto in quella conferenza, possiamo aggiungere:

- 1) I tentativi di impiegare mRNA per veicolare antigeni o geni, nell'allestimento di un vaccino, sono iniziati ben 30 anni fa, i primi successi datano 2015, soprattutto in zootecnia e veterinaria, COVID-19 ha dato la spinta definitiva fornendoci un oceano di nuove conoscenze metodologiche che saranno preziose anche per altri vaccini<sup>74</sup>.
- 2) I tempi necessari a trasferire una teoria scientifica in tecnologia per ottenere vaccini sicuri ed efficaci, si sono ridotti progressivamente dall'ordine degli anni a pochi mesi, come dimostrano i successi del 2020/21 nella profilassi anti-COVID-19. È questo un dato essenziale se vogliamo, oggi e ancor più, domani, fermare pandemie su scala globale da patogeni di nuovo riscontro<sup>75</sup>.
- 3) La ricerca vaccinologica oggi è impegnata sia nella immunoprofilassi di malattie infettive verso le quali, finora, non si è ancora riusciti ad ottenere un vaccino sicuro ed efficace (il caso più paradigmatico è quello della malaria), sia nel miglioramento di preparati obsoleti o che han perso parte della propria efficacia per mutate interazioni immunologiche microrganismo-ospite (antrace, micobatteriosi, malattie esantematiche dell'infanzia). Il sequenziamento completo dei genomi di numerosi agenti patogeni e la miglior conoscenza dell'armamentario di aggressione e virulenza dei microrganismi, in particolare le capacità di mutare la struttura antigenica e di eludere l'immunità dell'ospite, impongono un aggiornamento continuo dei vaccini (influenza, COVID-19)<sup>76</sup>.
- 4) L'obiettivo ambizioso che i ricercatori si sono prefissati, nei prossimi anni, è di arrivare ad una "vaccinologia di precisione", se non propriamente personalizzata: utilizzando gli approcci più innovativi, dall'impostazione teorica, ai modelli sperimentali su animali e uomo, all'impiego di transcriptomica, proteomica, metabolomica e genomica e quant'altro siamo riusciti a creare, il vaccino del prossimo futuro si avvicinerà sempre più alle esigenze del singolo o di coorti di pazienti omologhi. L'allestimento di vaccini curativi in oncologia, in cui il target è l'assetto antigenico della cellula neoplastica, può insegnare nuovi percorsi procedurali anche in infettivologia, e saranno a breve protagoniste le tecniche di editing recentemente introdotte come CRISPR-Cas9<sup>77</sup>.
- 5) Il ventaglio di possibili vettori per un vaccino, affinché interagisca con le cellule umane, è assai ampio: frammenti genetici (RNA, DNA), virus, nanoparticelle, nanoemulsioni, liposomi e supporti totalmente sintetici; ognuno

ha i suoi pregi e limiti, ma disporre di così tante possibilità, e altre sono in progetto, accresce la ricerca, caso per caso, vaccino per vaccino, della strada ottimale per portare geni o antigeni a stimolare la nostra immunità.

- 6) Come insegna la pandemia COVID-19, la prevenzione e il trattamento delle infezioni più impegnative passa da un approccio multidisciplinare, vaccini, ma non solo: non dobbiamo dimenticare gli anticorpi monoclonali, i nuovi antibiotici e antivirali, i farmaci biologici ad attività anti-infiammatoria, tutti presidi "costruiti" mediante le nuovissime tecnologie<sup>78</sup>.
- 7) Il confronto fra le mappe, di oggi e di due-tre decenni fa, della copertura vaccinale nel mondo, per quanto riguarda le vaccinazioni-base dell'infanzia, mostra significativi miglioramenti, ma anche diverse criticità: la situazione è peggiorata nei paesi belligeranti, ma anche in nazioni, USA, Francia, nord-Europa, ove ci aspetteremmo un plateau stabilmente elevato. Ben vengano dunque nuovi programmi EPI/OMS per implementare, nelle diverse aree geografiche, le vaccinazioni maggiormente deficitarie e campagne di sensibilizzazione e informazione che spazzino via fake news, propaganda antiscientifica, e accrescano la conoscenza di ciò che viene preparato e diffuso per salvare le vite e per il benessere di tanti bambini<sup>79</sup>.

### **Conclusioni**

COVID-19 ha già lasciato molti insegnamenti, oltre una eredità tecnologica in tema di allestimento di farmaci e vaccini, su larga scala, con nuovissime procedure, dunque un bagaglio culturale e scientifico prezioso per il futuro.

E, si spera, abbiamo acquisito la consapevolezza che in un mondo in cui tutto è globalizzato, salute e malattie comprese, nessuno può difendersi e salvarsi da solo: in

termini geografici, economici, di politica e gestione interdisciplinare socio-sanitaria. La medicina da sola può poco contro le malattie dovute ai cambiamenti climatici e alla «poverty», così come lo sviluppo economico deve tener conto degli aspetti sanitari. La salute è inevitabilmente globale, come le malattie, non conosce confini: i deficit (economici, ma non solo...), le mancanze, l'ignoranza culturale e scientifica di alcuni, coinvolgono negativamente e travolgono il mondo intero.

Vogliamo concludere con le parole di Carlo Urbani, medico che ha sacrificato sé stesso durante l'epidemia SARS-CoV-1, quando nel 1999 ritirò il premio Nobel per la pace assegnato a "Medici senza frontiere": *«...in tutti i consessi internazionali si ripete che in Africa e parte dell'Asia la causa della gran parte delle malattie infettive è una sola: la povertà. Oggi abbiamo consapevolezza che la mano dell'uomo, sull'ambiente e il clima, ne è corresponsabile. Quando arrivai in Africa fresco di studi scoprii che la gente moriva sì di malattie «strane» e dimenticate, ma anche e soprattutto di diarrea e infezioni respiratorie, curabilissime altrove con farmaci da pochi soldi, ma qui spesso introvabili. L'accesso ai farmaci essenziali è una sfida ineludibile, che richiede di dedicare ogni energia a noi, noi che abbiamo il privilegio di fare un lavoro che ci fa guardare le persone negli occhi, ci fa toccare le persone, da quella posizione di prossimità agli individui violati...continueremo a chiamare i politici al loro dovere, gridando ai microfoni la sofferenza dei nostri pazienti, per un'azione alle radici dei mali che osserviamo...siamo convinti che anche se le parole non salvano le vite umane, il silenzio le uccide»<sup>80</sup>.*

### **BIBLIOGRAFIA**

1. Belli F. I vaccini nel XXI secolo, tra evidenze scientifiche e disinformazione. Il punto sull'immunoprofilassi delle infezioni critiche: tubercolosi, malaria, HIV, HCV. Atti Acc Lancisiana 2017; 61: 1-23.

2. Weiss RA, McMichael AJ. Social and environmental risk factors in the emergence of infectious diseases. *Amer J Nat Med* 2004; 10(12 Suppl) :70-6.
3. Nicoletti M. Three scenarios in insect-borne diseases. *Insect-Borne diseases in the 21st century 2020*: 99-251.
4. De Rycker M. Challenges and recent progress in drug discovery for tropical diseases. *Nature* 2018; 559: 498-506.
5. Murray KA, Olivero J, Roche B, Tiedt S, Guégan JF. Pathogeography: leveraging the biogeography of human infectious diseases for global health management. *Ecography* 2018; 41: 1411-27.
6. Bekker LG, Alleyne G, Baral S et al. Advancing global health and strengthening the HIV response in the era of the Sustainable Development Goals: the International AIDS Society-Lancet Commission. *Lancet* 2018; 392: 312-58.
7. MacLennan CA, Saul A. Vaccines against poverty. *Proc Natl Acad Sci* 2014; 111: 12307-12.
8. Hotez PJ, Aksoy S, Brindley PJ, Kamhawi S. World neglected tropical diseases day. *PLoS Negl Trop Dis* 2020; 14: e0007999.
9. Furuse Y. Analysis of research intensity on infectious disease by disease burden reveals which infectious diseases are neglected by researchers. *Proc Natl Acad Sci* 2019; 116: 478-83.
10. Mueller-Langer F. Neglected infectious diseases: are push and pull incentive mechanisms suitable for promoting drug development research? *Health Econ Policy Law* 2013; 8: 185-208.
11. Cultrera R. *le malattie dimenticate*. Ferrara: University Press, 2016.
12. Karlsson EK, Kwiatkowski DP, Sabeti PC. Natural selection and infectious diseases in human populations. *Nat Rev Gen* 2014; 15: 379-93.
13. Francis ME, King ML, Kelvin AA. Back to the future for Influenza preimmunity— Looking back at Influenza virus history to infer the outcome of future infections. *Viruses* 2019; 11: 122. doi: 10.3390/v11020122.
14. Kumar B, Asha K, Khanna M, et al. The emerging influenza virus threat: status and new prospects for its therapy and control. *Arch Virol* 2018; 163: 831-44.
15. Krammer F, Smith GJ, Fouchier RA, et al. Influenza. *Nat Rev Dis Primers* 2018; 4: 3.
16. Jones KE, Patel NG, Storeygard A, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 2008; 451: 990-3.
17. Morens DM, Folkers GK, Fauci AS. Emerging infections: a perpetual challenge. *Lancet Infect Dis* 2008; 8: 710-9.
18. Wolfe ND, Dunavan CP, Diamond J. Origins of major human infectious diseases. *Nature* 2007; 447: 279-83.
19. Nissan H, Ukawuba I, Thomson M. Climate-proofing a malaria eradication strategy. *Malar J* 2021; 20: 190. Correction in: *Malar J* 2021; 20: 215.
20. Heffernan C. Climate change and multiple emerging infectious diseases. *Vet J* 2018; 234: 43-7.
21. Belli F. COVID-19. Identikit di un virus. *Atti Acc Lancisiana* 2021; 65: 163-89.
22. Booth M. Climate change and the neglected tropical diseases. *Adv Parasitol* 2018; 100: 39-126.
23. Molinari M. *Atlante del mondo che cambia*. Milano: Rizzoli, 2020.
24. Hess J, Boodram LG, Paz S, Stewart Ibarra AM, Wasserheit J, Lowe R. Strengthening the global response to climate change and infectious disease threats. *BMJ* 2020; 371: m3081.
25. Parry L, Radel C, Adamo SB, et al. The (in)visible health risks of climate change. *Soc Sci* 2019; 241: 112448.
26. Berry P, Enright PM, Shumake-Guillemot J, Villabados Prats E, Campbell-Lendrum D. Assessing health vulnerabilities and adaptation to climate change: a review of international progress. *Int J Environ Res Public Health* 2018; 15: 2626.
27. Burkert A, Douglas TA, Waldrop MP, Mackelprang R. Changes in the active, dead, and dormant microbial community structure across a Pleistocene permafrost chronosequence. *Appl Environ Microbiol* 2019; 85: e02646-18.
28. Liang R, Lau M, Vishnivetskaya T, et al. Predominance of anaerobic, spore-forming bacteria in metabolically active microbial communities from ancient siberian Permafrost. *Appl Environ Microbiol* 2019; 85: e00560-19.
29. Hofmeister AM, Seckler JM, Criss GM. Possible roles of permafrost melting,

- atmospheric transport, and solar irradiance in the development of major Coronavirus and Influenza pandemics. *Int J Environ Res Public Health* 2021; 18: 3055.
30. Jacob ST, Crozier I, Fischer WA, et al. Ebola virus disease. *Nat Rev Dis Primers* 2020; 6: 13.
  31. Coltart Cordelia CE, Lindsey B, Ghinai I, Johnson AM, Heymann DL. The Ebola outbreak, 2013–2016: old lessons for new epidemics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2017; 372: 20160297.
  32. Chang C, Ortiz K, Ansari A, Gershwin ME. The Zika outbreak of the 21st century. *J Autoimmun* 2019; 68: 1-13.
  33. Noorbakhsh F, Abdolmohammadi K, Fatahi Y, et al. Zika virus infection, basic and clinical aspects: a review article. *Iran J Public Health* 2019; 48: 20-31.
  34. Habarugira G, Suen WW, Hobson-Peters J, Hall RA, Bielefeldt-Ohmann H. West Nile Virus: an update on pathobiology, epidemiology, diagnostics, control and “One Health” implications. *Pathogens* 2020; 9: 589.
  35. Chancey C, Grinev A, Volkova E, Rios M. The global ecology and epidemiology of West Nile Virus. *Biomed Res Int* 2015; 376230.
  36. Viennet E, Ritchie SA, Williams CR, Faddy HM, Harley D. Public health responses to and challenges for the control of Dengue transmission in High-Income Countries: four case studies. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10: e0004943.
  37. Shearer FM, Longbottom J, Browne AJ, et al. Existing and potential infection risk zones of Yellow Fever worldwide: a modelling analysis. *Lancet Glob Health* 2018; 6: 270-8.
  38. Kuno G. The absence of Yellow Fever in Asia: history, hypotheses, vector dispersal, possibility of YF in Asia, and other enigmas. *Viruses* 2020; 12: 1349-87
  39. Moizès RNC, Fernandes TAAM, Guedes PMDM, et al. Chikungunya fever: a threat to global public health. *Pathog Glob Health* 2018; 112: 182-94.
  40. Klohe K, Amuasi J, Moriku Kaducu J, et al. The 2017 Oslo conference report on neglected tropical diseases and emerging/re-emerging infectious diseases – focus on populations underserved. *Infect Dis Poverty* 2019; 8: 40.
  41. Engels D, Zhou XN. Neglected tropical diseases: an effective global response to local poverty-related disease priorities. *Infect Dis Poverty* 2020; 9: 10.
  42. Kruk ME, Gage AD, Arsenault C, et al. High-quality health systems in the Sustainable Development Goals era: time for a revolution. *Lancet Glob Health* 2018; 6: 1196-252.
  43. Soergel B, Kriegler E, Bodirsky BL, Bauer N, Leimbach M, Popp A. Combining ambitious climate policies with efforts to eradicate poverty. *Nat Commun* 2021; 12: 2342.
  44. Bukhman G, Mocumbi AO, Atun R, et al. The Lancet NCDI Poverty Commission: bridging a gap in universal health coverage for the poorest billion. *Lancet NCDI Poverty Commission Study Group. Lancet* 2020; 396: 991-1044.
  45. Barocchi MA, Rappuoli R. Delivering vaccines to the people who need them most. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2015; 370: 20140150.
  46. Hotez PJ, Gurwith J. Europe's neglected infections of poverty. *Int J Infect Dis* 2011; 15: 611-9.
  47. Zhao X, Ding Y, Du J, Fan Y. 2020 update on human Coronaviruses: One Health, One World. *Med Nov Technol Devices* 2020; 8: 100043.
  48. Shang J, Han N, Chen Z, et al. Compositional diversity and evolutionary pattern of Coronavirus accessory proteins. *Brief Bioinform* 2020: bbaa262. doi: 10.1093/bib/bbaa262.
  49. Weiss DJ, Lucas TC, Nguyen M, et al. Mapping the global prevalence, incidence, and mortality of *Plasmodium falciparum*, 2000-17: a spatial and temporal modelling study. *Lancet* 2019; 394: 322-31.
  50. Howes RE, Battle KE, Mendis KN, et al. Global epidemiology of *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg* 2016; 95: 15-34.
  51. Onyango E, Sahin O, Awiti A, Chu C, Mackey B. An integrated risk and vulnerability assessment framework for climate change and malaria transmission in East Africa. *Malar J* 2016; 15: 551.
  52. Murray CJL, Ortblad KF, Guinovart C, et al. Global, regional, and national incidence and mortality for HIV, tuberculosis, and malaria during 1990–2013: a systematic analysis for



- the “Global Burden of Disease Study 2013”. *Lancet* 2014; 384: 1005-70.
53. Hawn T, Day T, Scriba T, et al. Tuberculosis vaccines and prevention of infection. *Self Microbiol Mol Biol Rev* 2014; 78: 650-71.
  54. Sable SB, Posey JE, Scriba TJ. Tuberculosis vaccine development: progress in clinical evaluation. *Clin Microbiol Rev* 2019; 33: e00100-19.
  55. Buchbinder SP, Liu AY. CROI 2016: hot spots in HIV infection and advances in HIV prevention. *MPH Top Antivir Med* 2016; 24: 10-28.
  56. Csete J, Kamarulzaman A, Kazatchkine M, et al. Public health and international drug policy: report of the Johns Hopkins – Lancet Commission on drug policy and health. *Lancet* 2016; 387: 1427-80.
  57. Rhee SY, Blanco JL, Jordan MR, et al. Geographic and temporal trends in the molecular epidemiology and genetic mechanisms of transmitted HIV-1 drug resistance: an individual-patient- and sequence-level meta-analysis. *PLoS Med* 2015; 12: e1001810.
  58. Schillie S, Vellozzi C, Reingold A, et al. Prevention of Hepatitis B Virus infection in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. *MMWR Recomm Rep* 2018; 67: 1-31.
  59. Nelson NP, Easterbrook PJ, McMahon BJ. Epidemiology of Hepatitis B Virus infection and impact of vaccination on disease. *Clin Liver Dis* 2016; 20: 607-28.
  60. Ansaldo F, Orsi A, Sticchi L, Bruzzone B, Icardi G. Hepatitis C Virus in the new era: perspectives in epidemiology, prevention, diagnostics and predictors of response to therapy. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 9633-52.
  61. Moss WJ. Measles control and the prospect of eradication. *Measles* 2009; 330: 173-89.
  62. Coughlin MM, Beck AS, Benkamp B, Rota P. Perspective on global measles epidemiology and control and the role of novel vaccination strategies. *Viruses* 2017; 9: 11.
  63. Adamo G, Baccolini V, Massimi A, et al. Towards elimination of measles and rubella in Italy: progress and challenges. *PLoS One* 2019; 14: e0226513.
  64. Zaman SB, Hussain MA, Nye R, Mehta V, Mamun KT, Hossain N. A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. *Cureus* 2017; 9: e1403.
  65. Olesen SW, Barnett ML, MacFadden DR, et al. The distribution of antibiotic use and its association with antibiotic resistance. *Elife* 2018; 7: e39435.
  66. MacFadden D, McGough S, Fisman D, Santillana M, Brownstein J. Antibiotic resistance increases with local temperature. *Open Forum Infectious Diseases* 2017; 4 (Suppl 1): S179-S179.
  67. McGough SF, MacFadden DR, Hattab MW, Molbak K, Santillana M. Rates of increase of antibiotic resistance and ambient temperature in Europe: a cross-national analysis of 28 countries between 2000 and 2016. *Euro Surveill* 2020; 25: 1900414.
  68. Machowska A, Stalsby-Lundborg C. Drivers of irrational use of antibiotics in Europe. *Int J Environ Res Public Health* 2019; 16: 27.
  69. Roca I, Akova M, Baquero F, et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes New Infect* 2015; 6: 22-9.
  70. Global tuberculosis report 2015 WHO/HTM/TB/2015.22. Geneva: World Health Organization 2015, accessed June 2019: [www.who.int/iris/bitstream/handle\\_eng](http://www.who.int/iris/bitstream/handle_eng)
  71. Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 658-85.
  72. Venter H, Blaskovich MA, Butler MS. Polishing the tarnished silver bullet: the quest for new antibiotics. *Essays Biochem* 2017; 61: 103-14.
  73. Russo A. Spotlight on new antibiotics for the treatment of pneumonia. *Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med* 2020; 14: 1179548420982786.
  74. De Gregorio E, Rappuoli R. From empiricism to rational design: a personal perspective of the evolution of vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 505-14.
  75. Rappuoli R, Pizza M, Del Giudice G, De Gregorio E. Vaccines, new opportunities for a new society. *Proc Natl Acad Sci* 2014; 111: 12288-93.
  76. Walvogel FA. Infectious diseases in the 21st century: old challenges and new opportunities. *Int J Infect Dis* 2004; 8: 5-12.

77. Borriello F, Van Haren SD, Levy O. First International Precision Vaccines Conference: Multidisciplinary approaches to Next-Generation Vaccines. *mSphere* 2018; 3: e00214-18.
78. Bloom D, Black S, Rappuoli R. Emerging infectious diseases: A proactive approach. *Proc Natl Acad Sci* 2017;114: 4055-9.
79. Rey-Jurado E, Tapia F, Muñoz-Durango N, et al. Assessing the importance of domestic vaccine manufacturing centers: an overview of immunization programs, vaccine manufacture, and distribution. *Front Immunol* 2018; 9: 26.

80. Urbani C. *Le malattie dimenticate*. Milano: Feltrinelli, 2002.

Prof. Francesco Belli, Accademico, già Dirigente Medico Microbiologia e Virologia, A.O. San Camillo-Forlanini, Roma; già Docente Immunologia C.d.L. Biotecnologie, "Sapienza" Università di Roma.

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

## Conferenze

---

### Le opere di Avicenna e la loro illustrazione. Il manoscritto 121 della Biblioteca Lancisiana

#### **P. Ricca**

«In debita distanza sorgono due Credenzoni di Noce l'uno in faccia dell'altro. In quello a mano destra conservanti i manoscritti più rari, le opere inedite di scelti Autori, o i loro originali; tali sono specialmente un Volume antichissimo in foglio delle opere d'Avicenna manoscritte in Pergamena avanti l'uso della stampa, e questo certamente è singolare, e forse unico in Roma»<sup>1</sup>.

Il presente elaborato è dedicato all'analisi storico artistica, e in particolare iconografica, del Manoscritto 121, codice membranaceo appartenente al "Fondo Lancisi", conservato presso la Biblioteca Lancisiana di Roma. Giunto in Italia attraverso canali poco noti<sup>2</sup>, il manoscritto tramanda l'opera Al-Qānūn fī'l -ṭibb il *Canone di medicina*, «uno dei prodotti più significativi nella storia della medicina non solo islamica»<sup>3</sup> composta dal medico arabo Abū 'Alī Ibn Sīnā – Avicenna.

Il codice fa parte di un esiguo nucleo di codici miniati<sup>4</sup>, appartenente alla Biblioteca Lancisiana e risulta essere stato menzionato per la prima volta<sup>5</sup> nel XVIII secolo dal «primo bibliotecario eletto dallo stesso Lancisi»<sup>6</sup> Cristoforo Carsughi<sup>7</sup>.

In seguito è stato citato all'interno del "Catalogo Potenziani"<sup>8</sup>, poi all'interno di un Indice ottocentesco<sup>9</sup>, successivamente dal medico Alessandro Canezza<sup>10</sup> e nell'Inventario a schede mobili della biblioteca<sup>11</sup>.

L'Inventario, dei manoscritti esistenti nella Biblioteca Lancisiana Roma redatto da Ada Caputi Moricca<sup>12</sup> indica il Ms 121 Avicenna - Libri in re medica omnes lat. redditi<sup>13</sup>.

Pietro De Angelis<sup>14</sup>, negli anni sessanta, lo indicava nell'Elenco dei manoscritti<sup>15</sup> con il titolo *Avicennae Libri in re Medica omnes, lat. redditi*<sup>16</sup>. Negli anni settanta del secolo scorso, il Ms 121 è stato menzionato da Marie-Therèse D'Alverny nell'ambito dei suoi numerosi studi sulla produzione dei codici latini di Avicenna<sup>17</sup>.

Negli stessi anni Charles Schmitt ha pubblicato un interessante lavoro su alcuni manoscritti della Biblioteca Lancisiana, nel quale cita anche l'Avicenna<sup>18</sup>.

Il manoscritto è stato menzionato anche da Paul Oskar Kristeller nell'*Iter Italicum*<sup>19</sup>.

Il presente elaborato, vista la complessità del manufatto, finora solo menzionato negli studi precedenti, e mai approfondito né descritto in modo analitico, si concentrerà sull'esame del contenuto iconografico delle immagini che introducono i libri del Canone. Non viene invece riconsiderata, in questa sede, la proposta di collocazione del codice nella Francia del sud, formulata da D'Alverny sulla base dell'analisi paleografica del manoscritto. Tale localizzazione, e una datazione all'ultimo

quarto del XIII secolo, sono state recentemente confermate da Francesca Manzari<sup>20</sup>, e da Alison Stones<sup>21</sup>, che hanno preso in esame il codice a seguito dello studio avviato per questo elaborato.

### **L'opera, l'autore, il traduttore: storia della critica**

«Mentre nell'Europa del 1000 si curavano le malattie con gli incantesimi, nel mondo arabo veniva fondata, grazie ad Avicenna, la medicina moderna»<sup>22</sup>.

Il manoscritto Lancisiano 121<sup>23</sup>, oggetto del presente studio, contiene l'intero *Canone* di medicina *al-Qanūn fī'l-ṭibb, Liber Canonis Medicinæ*<sup>24</sup>, di Abū 'Alī Ibn Sīnā – Avicenna, opera tradotta in latino<sup>25</sup> dall'erudito italiano Gerardo da Cremona nel XII secolo a Toledo<sup>26</sup>.

Il *Canone* racchiude in sé «la totalità delle conoscenze della medicina della sua epoca»<sup>27</sup>, dalla tradizione Ippocratica e Galenica ai contributi di origine persiana e indiana, il metodo seguito da Avicenna nello studio della medicina, e i relativi personali risultati. Difatti «si può leggere il *Canone* avicenniano come un imbuto dentro cui tutto passa e tutto esce più chiaro»<sup>28</sup>.

L'opera medica di Avicenna, stampata in lingua originale per la prima volta a Roma nel 1593<sup>29</sup> nella Tipografia Medicea Orientale<sup>30</sup>, contiene la «summa» delle scienze mediche al tempo del suo autore<sup>31</sup> e rappresenta per lo storico della medicina una importante fonte per lo studio del metodo scientifico adottato dal medico arabo<sup>32</sup>. Il *Canone* di Avicenna, «basato su una vasta cultura più che su esperienze pratiche di medico curante»<sup>33</sup>, ebbe notevole fortuna soprattutto nell'Università di Parigi tra il 1230 e il 1258<sup>34</sup> e dal 1309 in quella di Montpellier<sup>35</sup>. Successivamente si diffuse in Italia e per tutto il XVIII secolo ha occupato un posto di prestigio nello studio della medicina<sup>36</sup>.

All'interno del *Canone*, Avicenna ha inserito propri studi teorici circa la

sperimentazione clinica, di cui fu il precursore, con le raccomandazioni di sperimentare i medicinali sugli animali prima di somministrarli agli esseri umani; ha ipotizzato la presenza di microrganismi e classificato le malattie, inclusa la «malinconia», la loro cura e le misure igieniche da adottare<sup>37</sup>.

Sommariamente il *Canone* è organizzato in cinque *libri* suddivisi in sezioni: *fenn* o *fen*<sup>38</sup>, ogni *fen* è ancora diviso in *doctrinae*, *tractati* e *summae*, a loro volta suddivise in *capitoli*<sup>39</sup>.

Il Libro I tratta dei principi generali della medicina teorica e pratica. Il Libro III illustra le malattie disposte in ordine a seconda degli organi colpiti, a partire dalla testa; la parte che riguarda ogni organo è nella maggior parte dei casi preceduta dalla sua descrizione anatomica. Il Libro IV tratta le febbri, le malattie «non specifiche» di determinati organi, la loro diagnosi e terapia, inoltre veleni e creature velenose, obesità e magrezza eccessiva, mentre i Libri II e V descrivono rispettivamente le droghe semplici e quelle composte<sup>40</sup>.

Mi sembra utile ricordare che Avicenna ha riassunto in rima una versione del *Canone*, *l'Urgiūzah o Poemetto in metro ragiaz*, la cui traduzione latina, unita al commento di un altro illustre medico arabo, Averroè, fu fatta dal medico Armengaud di Montpellier<sup>41</sup> tra il 1280 e il 1284 e si diffuse nell'Europa medievale con il nome di *Cantica*<sup>42</sup>.

L'autore del *Canone* ha tramandato la propria autobiografia attraverso il suo discepolo e segretario al-Gūzġānī, il quale, dopo la morte del maestro, ne proseguì l'opera biografica<sup>43</sup>.

Abū 'Alī Ibn Sīnā conosciuto in Occidente con il nome latinizzato Avicenna, vide i natali dopo il 980 d.C. nel villaggio chiamato Afshana in prossimità della città di Buhārā, nell'Impero Persiano, l'odierno Uzbekistan<sup>44</sup>. Medico, filosofo, matematico e fisico,

condusse una vita peregrinante a causa dell'instabilità politica che interessava la sua regione di nascita, nell'intento di trovare protezione da parte di «sovrani illuminati»<sup>45</sup> in grado di garantirgli sicurezza economica in cambio dei suoi preziosi contributi scientifici<sup>46</sup>. Avicenna produsse numerose opere filosofico-scientifiche tra cui il *Trattato sull'Anima per modo di compendio*, composto per il sultano della dinastia samanide Nūh ibn Mansūr; all'interno di quest'opera è descritta la biblioteca di quest'ultimo, evidenziando l'importanza che in essa rivestiva la presenza di antichi testi di filosofi greci, in particolare di Aristotele<sup>47</sup>. Ibn Sīnā, che iniziò a comporre parte del *Canone di medicina* nella città di Gurgān, simultaneamente a un compendio all'opera di astronomia di Tolomeo, l'*Almagesto*<sup>48</sup>, si dedicò successivamente all'insegnamento rivolto a studenti di medicina, nella città di Hamadan, dove terminò l'«opera medica» e compose l'opera filosofica: *Il libro della guarigione*<sup>49</sup>. Avicenna morì nel 1037 durante un viaggio verso Hamadān, ove si stava recando, per ragioni politiche, al seguito dell'emiro nella città di Isfahān<sup>50</sup>.

Prima di introdurre il «traduttore» del *Canone*, ritengo sia opportuno illustrare, seppur sommariamente, il panorama culturale Occidentale del XII secolo; quello che Haskins aveva definito «Rinascimento del XII secolo»<sup>51</sup> evidenziando come sul piano culturale, questo fosse assimilabile al Rinascimento del XVI secolo sia dal punto di vista della rivalutazione dei testi provenienti dall'antichità classica, che dei valori morali ed estetici trasmessi da essi<sup>52</sup>. E «mentre il clangore delle spade risuonava ferocemente sui campi crociati, la cultura europea iniziava ad accogliere il sapere islamico»<sup>53</sup>. L'entrata in Gerusalemme degli eserciti della prima Crociata, la conquista dell'Italia meridionale e della Sicilia da parte dei Normanni nella seconda metà dell'XI secolo e al contempo di Toledo da parte dei cristiani, hanno favorito lo svilupparsi di scambi tra cultura latina e cultura greca o musulmana, determinando

nelle aree geografiche interessate lo sviluppo di importanti centri di vita intellettuale nei quali fiorì un intenso fenomeno di traduzioni in latino<sup>54</sup>. Nel secolo XII l'arabo era considerata la lingua della scienza<sup>55</sup> e attraverso l'opera di traduzione in latino, l'Occidente scoprì i classici del pensiero filosofico-scientifico del mondo islamico, rappresentato inoltre dalle opere di Avicenna le quali, esercitando notevole influenza in Europa, stimolarono la traduzione di ulteriori filosofi<sup>56</sup>. A Toledo ebbe grande fortuna un «collège de traducteurs»<sup>57</sup>, grazie all'attività di Raimondo di Sauvetât, arcivescovo di Toledo, e dell'arcidiacono di Segovia, Domenico Gondisalvi<sup>58</sup>, dove l'opera di traduzione dall'arabo al latino non avveniva direttamente, bensì in due tempi, in cui il primo traduttore volgeva al vernacolare il testo arabo, mentre il secondo traduceva in latino il testo narrato oralmente dal primo<sup>59</sup>.

«Gerardo vi è detto Lombardo, di patria cremonese, e morto nell'anno 1187 in età di ben 73 anni, regnante Federigo II Imperatore dell'imperio suo il trentesimo quarto anno»<sup>60</sup>. Curzio Sprengel menziona Gerardo da Cremona, nella *Storia prammatica della medicina*, con l'intento di sciogliere ogni dubbio circa una «quistione» che si sollevò nel XIX secolo in merito al luogo di nascita del «traduttore», se la città spagnola di Carmona oppure l'italiana Cremona, basandosi su documenti d'archivio<sup>61</sup>. Gerardo nacque a Cremona nel 1114 e dopo aver frequentato la «Scuola Capitolare»<sup>62</sup> nella città natale, dedicandosi a studi filosofici<sup>63</sup>, attratto dall'opera tolemaica *Almagesto*, che lui stesso tradusse<sup>64</sup>, si spostò nella città di Toledo, in Spagna, che nel XII secolo, insieme alla Sicilia, rappresentava il luogo di maggiore sviluppo del «movimento di traduzione» dal greco e dall'arabo<sup>65</sup>. Tuttavia Gerardo, oltre a operare presso la scuola di Toledo, svolse parallelamente un'attività formativa nelle vesti di docente nell'ambito di una istituzione, da lui guidata, presso la cattedrale di Toledo<sup>66</sup> di cui era canonico<sup>67</sup>. Una lista delle opere tradotte dal «maestro»

Gerardo, fu redatta dai suoi discepoli o «socii»<sup>68</sup>, dopo la sua morte, avvenuta a Toledo nel 1187, e pubblicata per la prima volta nel 1851 da Baldassarre Boncompagni Ludovisi nell'opera *Della vita e delle opere di Gherardo Cremonese*<sup>69</sup>.

Attraverso la traduzione dall'arabo al latino di numerose opere a carattere prevalentemente scientifico, il canonico cremonese contribuì notevolmente alla trasmissione del pensiero scientifico greco-arabo nell'Europa medievale.

Ritengo utile mettere in evidenza che dopo l'invenzione dei caratteri mobili, del *Canone* si ebbero, anteriormente al XVI secolo, undici edizioni a stampa complete e due parziali, mentre tra il 1500 e il 1674 ne apparvero almeno altre sessanta, anche in lingua ebraica<sup>70</sup>. Nel 1877 esso venne stampato in arabo, al Cairo, in tre volumi<sup>71</sup>. La Biblioteca Lancisiana infatti conserva interessanti pubblicazioni a stampa dei secoli XVI e XVII inerenti versioni parziali del *Canone* di Avicenna, commentari e disputazioni<sup>72</sup>.

Gli Avicenna di ambito francese mostrano scelte iconografiche simili nell'elaborazione di loro progetti illustrativi, ma il manoscritto 121 spicca per diversi dettagli ripresi dalla pratica reale che lo rendono particolarmente interessante.

Per questo motivo si è deciso di affrontare lo studio del suo progetto illustrativo, per individuare e descrivere le iconografie utilizzate agli incipit dei diversi libri.

Il codice è stato inoltre sommariamente descritto per sottolineare i suoi caratteri peculiari di libro destinato allo studio.

Una caratteristica originale del codice, di cui in questa sede non si è affrontato uno studio approfondito, è la presenza di scudi araldici e *drôleries*, entrambi elementi caratteristici della miniatura francese nella seconda metà del XIII secolo.

Il manoscritto lancisiano in esame, è ricco di decorazioni marginali, che lo rendono certamente molto interessante. Le *drôleries* definite da una studiosa<sup>73</sup> «popolazioni favolose» per la presenza di numerose specie di esseri viventi immaginari, sono apparse per la prima volta nei codici scientifici, tra il XII e XIII secolo, contemporaneamente all'affermarsi della tradizione enciclopedica<sup>74</sup>. Le *drôleries* visibili ai margini del manoscritto 121, confrontate con quelle presenti in alcuni manoscritti, selezionati dal repertorio della *Stones*<sup>75</sup>, hanno mostrato diverse similitudini nella raffigurazione di animali, fregi, antenne e ibridi<sup>76</sup>.

La presenza degli scudi miniati all'interno di manoscritti medievali può aiutare a stabilirne il proprietario, fornendo ulteriori elementi utili alla datazione del codice<sup>77</sup>. Poiché la maggior parte degli scudi presenti nel codice 121 è stato eraso, non è stato possibile identificarli. La presenza di numerosi stemmi diversi, tuttavia, induce a pensare a una committenza di gruppo e studi ulteriori potranno procedere in questo senso, nel tentativo di identificare almeno alcuni degli stemmi visibili.

Il lavoro della tesi, dopo un inquadramento generale degli studi sul *Canone* di Avicenna e sui codici illustrati che trasmettono quest'opera, si è dunque concentrato sul corredo illustrativo e in particolare sui riquadri miniati che introducono ogni libro.

Il progetto illustrativo è stato analizzato minutamente, mettendo in luce il rapporto testo-immagine e individuando con precisione scene, azioni, oggetti e personaggi raffigurati in tali miniature.

Tra le particolarità dell'esemplare lancisiano sono emersi diversi dettagli che rimandano alla pratica concreta, come ad esempio la tavola uroscopica e il secchio di vimini per la matula. Possiamo affermare che le scene illustrate del manoscritto 121 riflettano la medicina scientifica dell'epoca;

le scene di insegnamento e quelle ambientate nei campi possono ritenersi un riferimento alla pratica medica, trasmessa anche attraverso lo studio e l'uso dei testi. Infatti un ruolo decisivo fu svolto dalle Università di Montpellier, Parigi e Bologna nell'organizzazione degli studi, che si è andata affermando nel XIII secolo.

Inoltre, nel manoscritto lancisiano 121, la «cristianizzazione» dell'autore, è accentuata e chiarita dall'inserimento dello Spirito Santo come fonte di ispirazione. Sebbene tale scelta iconografica sia attestata anche in altri esemplari, la soluzione adottata nel codice lancisiano costituisce un unicum, per quanto ad oggi conosciuto, e rende il manoscritto particolarmente interessante nell'ambito della produzione di codici universitari della Francia meridionale, nella seconda metà del XIII secolo.

### **Scheda di descrizione del manoscritto 121**

#### **1. Descrizione del codice.**

Roma, Biblioteca Lancisiana, Ms 121

Avicenna, *Libri quinque canonis medicinae*.

Traduzione di Gerardo da Cremona.

Membranaceo, guardie miste (sono cartacee la prima e la quinta)

Misure mm 400 x 245, cc. II + 353 + III.

Francia meridionale (Tolosa o Montpellier?), ultimo quarto secolo XIII.

Il codice è vergato in scrittura gotica su due colonne di 67 linee<sup>78</sup>. Alle cc 1r, 114r e 350r, si trova, invece, una *mise-en-page* a tre colonne, mentre alle cc. 2r, 113r, 351r, 352r e 353r, il testo è disposto su tre colonne; Al centro della prima carta di guardia è presente una filigrana di un giglio inscritto in un ovale (mm 500 x 450).

Il manoscritto è composto da 32 fascicoli prevalentemente senioni eccetto quattro quinioni (fasc. I, II, XXI, XXIII), due ternioni (fasc. XXXI, XXXII), un binione (fasc. XVII). La

numerazione è recente, a penna e in cifre arabe, apposte nel margine inferiore esterno del recto di ogni carta. La rigatura è a piombo, lo specchio rigato misura mm 280 x 155<sup>79</sup> e la scrittura inizia sotto il primo rigo. I richiami in inchiostro nero non sono sempre presenti, quelli visibili sono apposti nel margine inferiore destro<sup>80</sup> e talvolta sono decorati con piccole linee e puntini rossi<sup>81</sup>.

La foratura non è visibile poiché il codice è stato rifilato, probabilmente in occasione della rilegatura settecentesca.

La coperta del codice con assi in cartone è in pergamena tinta di verde; la decorazione presente sul dorso è dorata a motivi fitoformi.

I materiali e gli strumenti utilizzati sono pennello, inchiostro, e tempera; la gamma cromatica è incentrata su toni del rosso, del blu e del rosa, com'è caratteristico della miniatura francese del XIII secolo; sono utilizzati anche il giallo, il verde acqua, il marrone e talvolta l'arancio.

Il corredo illustrativo è composto da riquadri miniati, da iniziali istoriate e da numerose iniziali decorate.

I riquadri miniati sono posti all'incipit dei libri dal II al V: c. 62v, Libro II: mm 750 x 500; c. 114r Libro III: mm 750 x 450; c. 260r Libro IV: mm 750 x 500; c. 329v Libro V: mm 850 x 350.

Le Iniziali istoriate di dimensioni maggiori sono poste all'incipit del Prologo, del Libro I, e del Libro III<sup>82</sup> rispettivamente: l'iniziale «I(n)» nel recto della carta 1, sull'intera colonna di testo, (mm 150 x 3400) per il Prologo; l'iniziale «D(ico)» a c. 2v, su nove linee di testo, (mm 250 x 400) per il Libro II; l'iniziale «I(n)» a c. 114r, su trenta linee di testo, (mm 300 x 1005) per il Libro III.

Il codice presenta numerose iniziali figurate, istoriate e decorate di dimensioni inferiori variabili, a tre, sette, otto linee di testo<sup>83</sup> poste, ciascuna all'inizio di ogni Fen, Dottrina, Trattato e Summa.



Inoltre sono poste all'inizio di ogni capitolo molteplici iniziali decorate, con il corpo in rosa e blu, contenenti motivi fitoformi, zoo-fitoformi e ibridi, di dimensioni variabili, su tre e sette linee di testo<sup>84</sup>.

La decorazione secondaria è composta da numerose iniziali filigranate oro e blu, rosse e blu, argento e blu, poste nel margine superiore e inferiore del recto e del verso di ogni carta, per indicare l'apertura delle *Fen, Doctrine, Tractati e Summae dei Libri*.

La decorazione secondaria è inoltre composta da riempilinea disegnati con motivi decorativi comprendenti animali e piccoli volti di colore marrone chiaro; in modo analogo, numerose faccine sono disegnate nelle lettere che compongono le linee di scrittura distribuite dopo le iniziali miniate e ai margini del testo.

La decorazione marginale presenta inoltre *drôlerie*, uccelli, cacciatori, cavalieri, cicogne, antenne e scudi araldici; questi ultimi corrispondono alla tipologia scudo gotico e sono presenti sul recto della carta 1, e sul verso della carta 329.

Nel margine superiore della c. 1r sono presenti quattro scudi. Partendo da sinistra, il primo, appeso a un ramo, è d'azzurro allo scaglione rovesciato; il secondo è sorretto da una figura in armatura di cavaliere, è di colore rosso ma non rivela il disegno; il terzo, sorretto da un ulteriore figura di cavaliere, è d'azzurro a *croix pattée*; il quarto scudo, rosso, crociato, è appeso a un ramo.

Sempre a c. 1r, nel margine superiore sinistro, sono presenti tre scudi quasi totalmente erasi. Partendo dall'alto, il primo mostra tracce di colore azzurro e un piccolo giglio bianco, nell'angolo destro del capo; il secondo mostra tracce di colore rosso; il terzo è totalmente eraso nella parte centrale, tranne il bordo che mostra tracce di colore rosso.

Nel *bas-de-page* della carta 329v sono presenti due scudi, appesi al fregio

decorativo, i quali, nella parte centrale, sono totalmente ricoperti da un pigmento di colore scuro, mentre i bordi, ancora visibili, sono di colore rosso.

## 2. Descrizione delle illustrazioni dei cinque Libri del Canone.

**Prologo (c 1r).** L'iniziale istoriata I(n) *primo Deo gratias agemus*, mostra al suo interno l'autore, come un uomo canuto, barbato, con in mano un cartiglio.

Avicenna è abbigliato con lunga tunica di colore grigio, mantello rosso, calze e scarpette rosse; la figura, che con una mano sorregge un rotolo, porta l'altra al petto in segno di stupore, mentre con il volto, di profilo, rivolge lo sguardo in alto verso una colomba nimbata che fa capolino da un'architettura ad arco trilobato.

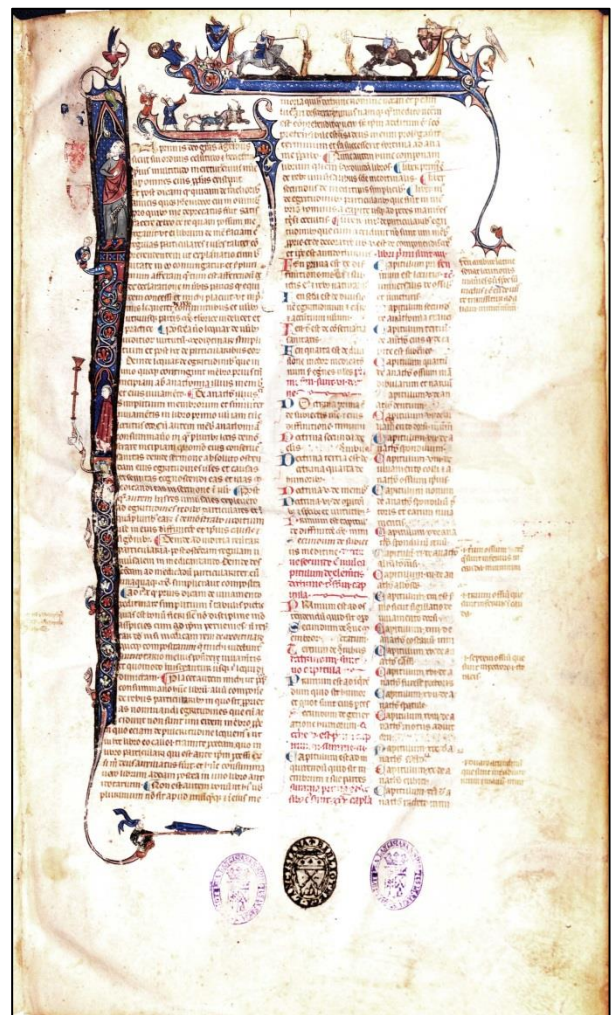


Fig. 1. Roma, Biblioteca Lancisiana, ms 121, c 1r.



**Fig. 2.** Roma, Biblioteca Lancisiana, ms 121, c 1r, particolare.

La scena è ambientata sotto un'architettura stilizzata costituita da un arco acuto. L'iniziale, chiusa in alto, termina superiormente con un ibrido nell'atto di tendere l'arco. In basso, la parte inferiore dell'iniziale si sviluppa con motivi fitoformi, con diversi ibridi, di cui due musicisti nell'atto di suonare uno strumento a percussione, la darbuka, e uno strumento a fiato, la tromba. Sotto una seconda arcata, è raffigurato un piccolo uomo con tunica di colore rosso con copricapo blu, circoscritto da un arco trilobato. L'iniziale prosegue nel verso in basso, con ulteriori figure di ibridi abbigliati con curiosi copricapo e termina nel *bas-de-page* con una figura di ibrido con un copricapo blu nell'atto di sorreggere una lancia.

Nel margine superiore esterno, a sinistra, sono presenti tre scudi, di cui uno blu e due rossi, dei quali è rimasta traccia del colore. Nel margine superiore, un fregio decorativo composto da due cavalieri armati di lancia, rispettivamente vestito con abito di colore blu, armatura di colore grigio e scudo rosso, seduto su un cavallo grigio il primo; il secondo abbigliato di rosso con armatura di colore

grigio e scudo blu, seduto su un cavallo nero, nell'atto di sfidarsi in torneo. Il fregio decorativo si estende a sinistra con motivi vegetali e foglie stilizzate, mostra uno scudo gotico di colore blu, appeso ad un ramo, e termina con un ibrido che sorregge uno scudo rotondo. A destra si estende fino alla metà del margine esterno, con motivi fitomorfi di colore rosso e blu; un volatile è poggiato su un ramo e uno scudo è appeso ad un tralcio vegetale.

Nel margine superiore dell'intercolumnio, un altro fregio di piccole dimensioni delimita il testo. Esso è composto da motivi vegetali stilizzati di colore rosso e blu, con tre cani che inseguono un cervo, un piccolo uomo vestito con una tunica di colore blu, ritratto nell'atto di camminare, e mentre con un braccio sorregge un corno, con l'altra mano tiene un bastone. Il fregio si estende a destra, lungo l'intercolumnio con foglie stilizzate fino a metà; a sinistra termina con un ibrido che suona uno strumento musicale a corda, la lira da braccio.

**Libro I (c 2v).** Iniziale istoriata, su nove linee di testo, *D(ico) que medicina est scientia quavis umani corporis dispo(sitio)nes*, mostra Avicenna abbigliato con tunica di colore blu, mantello e copricapo rosso, mentre insegna. L'autore con una mano sorregge un libro poggiato sopra un leggio, con l'altra leva l'indice nel gesto della parola. All'interno dell'iniziale vi sono altre tre figure che rappresentano giovani studenti abbigliati con tuniche, di cui una di colore rosso, e due blu. Essi sono posti in ascolto innanzi al docente con un libro poggiato su un banco. Nella parte centrale dell'intercolumnio, un fregio decorato è composto da motivi fitoformi, e si sviluppa superiormente con un drago di colore rosso e un piccolo uomo con lunga tunica rossa e calze nere nell'atto di suonare una zampogna.





Fig. 3. Roma, Biblioteca Lancisiana, ms 121, c 2v, particolare.

**Libro II (c 62v).** Seguìto dalla rubrica *Incipit liber canonis avicenne II*, il riquadro miniato è incorniciato da una doppia fascia dorata, decorata con motivi geometrici di colore rosso e bianco; ai quattro angoli sono disposti i disegni di piccoli volti. Il riquadro mostra in primo piano un ruscello d'acqua, un campo coltivato e alcuni alberi. Un uomo abbigliato con lunga tunica, mantello e copricapo di colore rosso e scarpette nere, da identificare con Avicenna, indica verso il basso, un gruppo di figure maschili, dove un uomo, abbigliato con tunica rossa, calze e scarpette grigie, è chino sul campo intento a raccogliere qualcosa mentre ha il volto rivolto verso di esso. In secondo piano tre figure maschili di cui, uno con tunica blu e mantello rosso è chino sul campo, e due, rispettivamente abbigliati con lunghe tuniche e mantelli con cappuccio di colore blu, dialogano tra loro scambiandosi alcune piante; uno dei due uomini indossa un copricapo di colore blu. Sul lato destro della scena, in lontananza, spicca un edificio perimetrato da mura merlate di una città. La scena è posta su un quadrettato di colore blu, ed è ambientata sotto una serie di archi trilobati di colore rosa, disposti in successione. Al margine esterno destro del riquadro miniato sono presenti due ibridi, abbigliati rispettivamente di rosso e blu, entrambi

nell'atto di sorreggere un bastone. A occupare l'intero margine superiore della carta, è presente un fregio di colore rosso e blu composto da motivi fitoformi stilizzati. Al centro del fregio due volatili, e ai loro lati una scimmia e un coniglio che suonano la tromba, mentre un ibrido avanza, a larghi passi, verso un cane che suona la zampogna.



Fig. 4. Roma, Biblioteca Lancisiana, ms 121, c 62v.



Fig. 5. Roma, Biblioteca Lancisiana, ms 121, c 62v, particolare.



L'intercolumnnio è percorso da un'antenna di colore rosso e blu con sottili decorazioni di colore bianco e bottoni dorati. Ad essa è connessa una grande iniziale decorata, N, su nove linee di testo. Il bas-de page è occupato da un fregio decorato che ha origine dalla parte terminale dell'antenna; di colore rosso e blu, esso è composto da elementi vegetali stilizzati e mostra nella parte centrale una figura barbuda di ibrido.

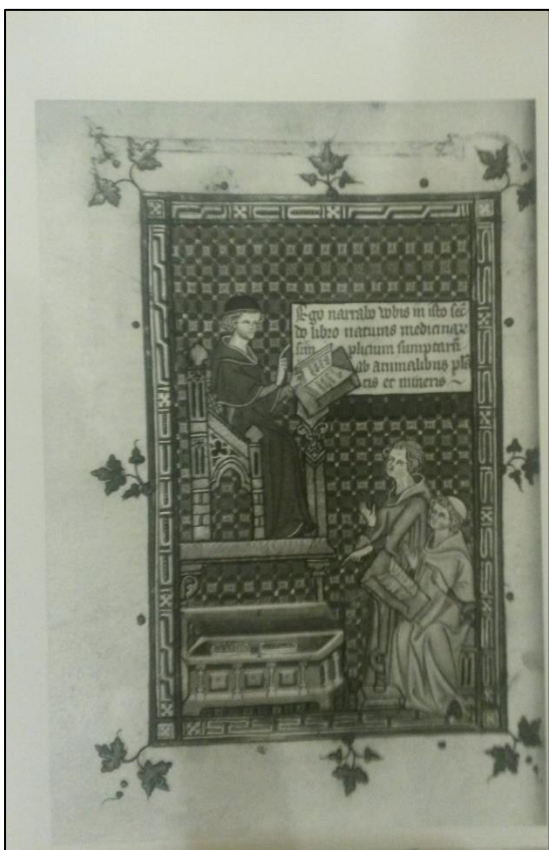


Fig. 6. Paris, BNF lat. 14023, c 123r.

**Libro III (c 114r).** Il riquadro miniato è incorniciato: esternamente da una fascia dorata, internamente da una fascia, per metà di colore blu con decorazioni geometriche di colore bianco, e, per metà, di bianco con decorazione geometrica di colore rosa. Il riquadro è bipartito da una colonna con capitello che divide due scene diverse; nella parte sinistra, un uomo, forse uno speciale abbigliato con lunga tunica e cappuccio di colore blu, è seduto mentre, con un pestello in ogni mano, compie il gesto di mescolare qualcosa in un mortaio. Di fronte a questo, un



Fig. 7. Roma, Biblioteca Lancisiana, ms 121, c 114r.

uomo sta in piedi, abbigliato con una lunga tunica rossa, copricapo di colore grigio e scarpette nere, ritratto nell'atto di sorreggere una bilancia. Sul fondo della scena, una sequenza di archi trilobati di colore rosso bordato di nero, spicca su un fondale piastrellato di colore rosa. Nella parte destra tre uomini abbigliati, uno con lunga tunica e cappuccio di colore grigio scuro e scarpette nere, gli altri due con lunga tunica e mantello con cappuccio di colore rosa chiaro e scarpette nere. L'uomo posizionato al centro, tra i due, è barbuto, ha un copricapo di colore grigio scuro e sorregge con una mano una grossa sciabola, mentre con l'altra gesticola. La scena è inquadrata da archi trilobati di colore rosso, bordati di nero, e spicca su un fondale piastrellato di colore blu.



Fig. 8. Roma, Biblioteca Lancisiana, ms 121, c 114r, particolare.

Subito sotto il margine inferiore del riquadro miniato, è presente una iniziale istoriata, su 26 linee di testo, ad asta, all'incipit di *In quit*, incorniciata con una fascia dorata bipartita in due scene; in quella superiore due figure di uomini, abbigliati con lunghe tuniche con cappuccio di colore rosa, dialogano tra loro. Uno di loro indossa un copricapo bianco e sorregge un contenitore con coperchio di colore grigio. La scena delimitata superiormente da un arco trilobato di colore rosso, bordato di nero, mostra un fondo piastrellato blu. Nella scena inferiore, su un fondo piastrellato rosa, sotto un arco trilobato, sono posizionate due figure di uomini uno di fronte all'altro. Uno è abbigliato con lunga tunica, mantello grigio, e ha il capo fasciato con una benda di colore bianco; l'altro con lunga tunica di colore blu, mantello con cappuccio e copricapo grigio, nell'atto di indicare il capo fasciato. Nel margine superiore della carta è presente un fregio di colore blu, bianco e rosso, composto da motivi fitoformi che termina, a destra, con una piccola testa barbata con copricapo blu, a sinistra, con la figura di uomo in armatura grigia e veste rossa nell'atto di sorreggere, con una mano una lancia e con l'altra uno scudo di colore grigio. Nella parte superiore e centrale dell'intercolumnio sono presenti una figura di volatile e due animaletti, mentre nella parte inferiore si diparte un'antenna di colore rosso, bianco e blu a motivi vegetali con foglie stilizzate e bottoni argentati, che corre verso il

margine inferiore e si riparte in quattro racemi a occupare l'intero *bas-de page*.

**Libro IV (c 260r).** Il riquadro miniato che precede la rubrica *Liber canonis q(u)artus incipit*, è incorniciato esternamente, da una fascia argentata ossidata e internamente da una fascia di colore rosa decorata con motivi geometrici bianchi. La scena mostra una figura femminile abbigliata con veste di colore rosso e copricapo bianco, coricata in un letto sotto una coperta di colore blu. Accanto a lei, una figura maschile, con indosso una tunica con cappuccio di colore marrone, è raffigurata nell'atto di rilevare i battiti del polso; ai piedi del letto due figure, rispettivamente: una donna con i capelli acconciati, abbigliata con una lunga veste di colore marrone chiaro e scarpette nere, con una mano sorregge un piccolo secchio di vimini, mentre con l'altra tiene una matula.



Fig. 9. Roma, Biblioteca Lancisiana, ms 121, c 260r.





Fig 10. Roma, Biblioteca Lancisiana, ms 121, c 260r, particolare.



Fig. 11. Paris, Bibliothèque de l'Arsenal, ms 702, c 143v.

Al fianco della donna, una figura maschile, abbigliata con tunica di colore rosso e scarpette nere, sorregge con entrambe le mani un oggetto di forma circolare, identificabile con una tavola uroscopica. Sul fondo della scena, una quinta architettonica di archi trilobati di colore rosso bordati di nero, spicca su un quadrettato di colore blu. Il margine superiore della carta è percorso da un fregio composto da motivi fitoformi stilizzati di colore rosso e blu e si sviluppa sia a destra che a sinistra, fino a occupare il margine superiore esterno. Sono presenti figure di animali, un levriero grigio, una lepre marrone e un leone in foglia d'argento ossidata. All'interno dell'intercolumnio si sviluppa un'antenna di colore rosso e blu che corre inferiormente fino a ripartirsi in due,

per occupare l'intero *bas-de-page*, mostrando, nella parte centrale, una importante decorazione di foglie stilizzate. Ai lati due racemi con animali, un cervo di colore marrone inseguito da un levriero grigio, e una lepre inseguita da un altro levriero di colore grigio. I racemi terminano, sia a destra che a sinistra, con una voluta inglobante un animale fantastico in foglia d'argento ossidato.



Fig. 12. Paris, BNF lat. 6918, c 356v.

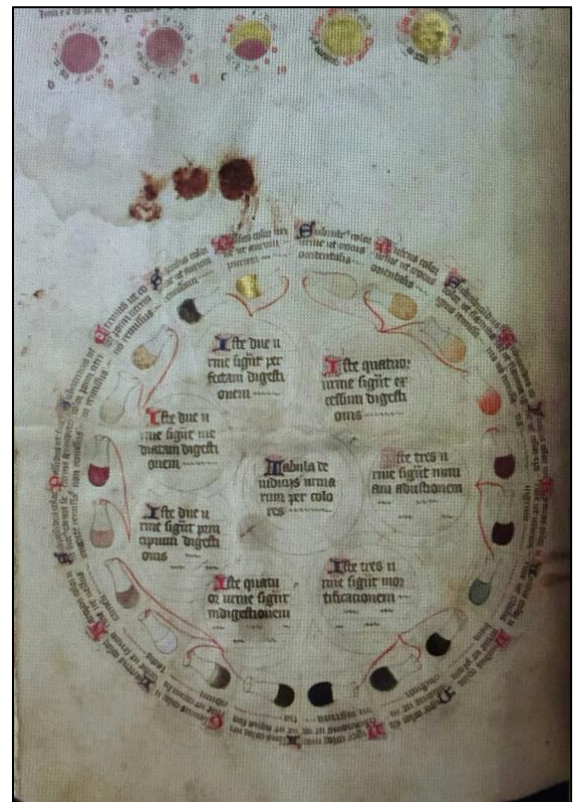


Fig. 13. Oxford, University Bodleian Libraries, MS Ashmole 789, c 364v.



**Libro V (c 329v).** Il riquadro miniato che segue la rubrica *Incipit lib(er) quintus canonis de me(dicina) et est antidot(um)*, è incorniciato da una fascia dorata superiormente e inferiormente, mentre lateralmente è doppia, profilando una fascia decorata con motivi fitomorfi stilizzati di colore blu e rosso. La scena mostra una figura con capelli raccolti in un copricapo di colore oca, abbigliata con lunga tunica di colore rosso e scarpette nere, assisa su una panca nell'atto di mescolare con due pestelli in un mortaio. Di fronte alla figura, due uomini dialogano e sono rispettivamente abbigliati: l'uno con lunga tunica di colore oca, mantello di colore rosso e copricapo nero, l'altro con veste di colore rosso e oca e calzette nere. Lateralmente, una figura maschile, abbigliata con abito di colore rosso e calzette nere, è chinata su un campo nell'intento di raccogliere qualcosa. La scena è inquadrata da una sequenza di archi abbassati di colore rosso, su un fondo piastrellato di colore blu. Il margine superiore della carta è occupato da un fregio a motivi fitoformi stilizzati con volute contenenti foglie stilizzate, un ibrido e animaletti fantastici. All'interno dell'intercolumnio si sviluppa un'antenna di colore rosso e blu, alla quale è connessa una grande lettera decorata su nove linee di testo, all'incipit di *Postq(ua)m*. L'antenna corre lungo l'intero intercolumnio, fino a raggiungere il *bas-de-page*, che occupa interamente con una importante decorazione fitoforme a volute, comprendenti foglie stilizzate, animaletti fantastici e bottoni dorati. Dalla decorazione si diparte un fregio di colore blu, bordato di rosso con volute e animali fantastici. Sotto al fregio sono appesi due scudi (erasi) che presentano tracce di colore rosso. L'intero margine esterno destro è occupato da una ulteriore antenna di colore rosso e blu, alla quale sono connesse diverse iniziali a tre e due linee. L'antenna, in alto, si chiude con racemi a

volute, contenenti foglie stilizzate e animali fantastici. Nel margine inferiore sinistro, è presente una piccola figura maschile con veste color oca, e un'ascia in spalla.



**Fig. 14.** Roma, Biblioteca Lancisiana, ms 121, c 329v.



**Fig. 15.** Roma, Biblioteca Lancisiana, ms 121, c 329v, particolare.



### 3. Storia del Ms 121

La storia del codice è in parte ricostruibile sulla base delle informazioni desunte da cataloghi, inventari e documentazione d'archivio, conservati presso la Biblioteca Lancisiana e su altre notizie ricavabili dal manoscritto stesso.

Il Ms 121 è stato menzionato per la prima volta nel XVIII secolo, dal bibliotecario della Biblioteca Lancisiana di Roma, Cristoforo Carsughi, che descrive il manufatto come «un volume antichissimo in foglio delle opere d'Avicenna, manoscritte in Pergamena avanti l'uso della stampa»<sup>85</sup>. Nel 1731, Giovanni Crescimbeni<sup>86</sup> attribuisce la provenienza del codice al Granduca di Toscana, in seguito a una donazione da questi elargita al fondatore della Biblioteca Lancisiana, Giovanni Maria Lancisi<sup>87</sup>. Il Ms 121 è stato menzionato, poi nel 1770 nell'«Indice Potenziani» con il titolo di *Avicennae opera Latina*<sup>88</sup>.

Nel 1837<sup>89</sup> il medico e bibliotecario Alessandro Canezza<sup>90</sup> fa menzione del codice di Avicenna, nell'Inventario dei manoscritti e in quello a schede mobili<sup>91</sup>. Ada Caputi Moricca<sup>92</sup> indica il Ms 121 con il titolo «Avicenna - Libri in re medica omnes lat. redditi» nell'*Inventario dei manoscritti* da lei redatto. Infine Pietro De Angelis, lo indica nell'*Elenco dei manoscritti*<sup>93</sup> pubblicato nel 1965.

Il Ms 121 conserva al suo interno alcuni importanti informazioni circa la sua storia.

Nel margine inferiore del recto della prima carta, sono visibili tre timbri ovali, dei quali, uno è posto al centro, a inchiostro nero, e reca la legenda «Bibliotheca Lancisiana» con lo stemma di Giovanni Maria Lancisi: due lance di Sant'Andrea accompagnate in capo da tre stelle e in basso dal trimonte. Lo stemma è inoltre qualificato da un cappello di prelato con due ordini di nappe. Gli altri due timbri a inchiostro blu, recano la legenda

«Bibliotheca Lancisiana S. Spiritus in Saxia» con l'identico scudo partito, dove a destra è visibile l'arma di Giovanni Maria Lancisi e, a sinistra, l'insegna dell'Ospedale Santo Spirito con la croce di Lorena e la colomba dello Spirito Santo.

Inoltre, sul dorso del manoscritto sono presenti diverse segnature di epoche differenti. Nella prima casella di testa è visibile un'etichetta cartacea di colore bianco, bordata di blu, recante la segnatura Cod.I.LXXV.I. Nella seconda casella è visibile un tassello di pelle color rosso, con bordo e scritta dorati, recante la dicitura AVICENNAE OPER. LAT. MM. SS.

In corrispondenza del quinto nervo, sul dorso, è visibile un frammento di etichetta cartacea, di colore bianco, bordata di blu, recante la segnatura 121<sup>94</sup>. All'interno dell'ultima casella è presente un'etichetta cartacea di colore bianco, recante la segnatura Biblioteca Lancisiana LXXV.1.5. Nel margine inferiore del piatto esterno, sulla coperta, un'etichetta cartacea dentellata, di colore bianco bordata di blu, reca la segnatura 12333 (depennata con un pastello di colore blu). Sul contropiatto, nel margine inferiore, una mano ha apposto (con pastello di colore blu) la segnatura 75.1.5, mentre nel margine superiore una mano, più antica, ha segnato (con inchiostro nero) LXXV.1. successivamente è stata aggiunta la cifra «5» (con pastello di colore blu).

Nel verso della seconda carta di guardia posteriore, tra le altre annotazioni, è presente la nota «applicuit Montepesolanum in principio Ianuari ano M<sup>o</sup>CCC<sup>o</sup>LXVI unde recessit 8<sup>o</sup> Martii anno M<sup>o</sup>CCC<sup>o</sup>LXVIII»<sup>95</sup>. Nel verso della prima carta di guardia posteriore è altresì presente una nota: «Dominus Marioctus Virginus de Maceratis - Ser Iohannes Iannis de Maceratis»<sup>96</sup>. Infine, il Ms 121 è stato conservato, in deposito, per un periodo di tempo limitato, presso l'Istituto Centrale di Patologia del Libro<sup>97</sup>.

## **Analisi iconografica e corredo illustrativo del Manoscritto 121**

In questa sezione dell'elaborato, prenderò in considerazione unicamente il contenuto iconografico relativo alle miniature che introducono i cinque libri del Canone. L'analisi verterà sul confronto delle miniature esaminate con quelle presenti in un campione di manoscritti, databili all'ultimo quarto del XIII secolo, che rispecchiano la tradizione illustrativa della Francia meridionale<sup>98</sup>.

### **1. Prologo al Libro I**

Il prologo al primo Libro del Canone di Avicenna, tradotto da Gerardo da Cremona, inizia con l'invocazione *In primis Deo gratias agamus sicut sui ordinis celsitudo et beneficij ipsius multitudo meretur, cuius misericordie super omnes prophetas existunt*<sup>99</sup>. La prima carta del Ms 121 (c.1r) ospita una importante iniziale istoriata I(n) che ha la funzione di introdurre il Prologo al Libro I.

L'iniziale, suddivisa in quattro sezioni, mostra in alto, una scena ambientata sotto l'architettura stilizzata di un arco acuto trilobato. All'interno della scena è raffigurato l'autore, di profilo, come un uomo canuto e barbato, con in mano un cartiglio, abbigliato con lunga tunica di colore grigio, mantello, calze e scarpette rosse, mentre rivolge lo sguardo in alto verso una colomba nimbata. Sotto una seconda arcata, un'altra scena mostra un piccolo uomo con tunica di colore rosso, circoscritto da un arco trilobato.

L'iniziale esaminata è stata confrontata con l'iniziale istoriata I(n), del Prologo nel manoscritto Paris Bibliothèque de l'Université ms 129; inoltre è stata comparata con l'iniziale posta all'incipit del Canone di Avicenna del manoscritto Besançon, Bibliothèque municipale, 457, c. 1r (anno 1260) e con l'iniziale istoriata I (usque) posta a carta 133v del codice Santa Barbara, UCSB Bibbia BS 75 1250; infine è stata confrontata con l'iniziale istoriata visibile nel manoscritto Bordeaux, Bibliothèque municipale, Bibbia (c. 213v).

La raffigurazione di Avicenna richiama l'immagine di un profeta dell'Antico Testamento, con in mano un rotolo di scritti profetici, ed evidenzia la volontà, del miniatore, di dare all'autore una interpretazione religiosa, influenzata dal testo dell'incipit. Il confronto dell'iniziale istoriata in esame, con la miniatura presente nell'incipit del codice Paris Bibliothèque de l'Université ms 129, già proposto da Marie Thèrese D'Alverny<sup>100</sup>, mostra alcune similitudini nella rappresentazione di Avicenna: entrambe di profilo, guardano verso il cielo in evidente stato di ispirazione spirituale. Ulteriori elementi che rafforzano l'ipotesi di «cristianizzazione» di Avicenna, sono: una colomba nimbata e un frate, posti all'interno dell'iniziale istoriata visibile all'incipit del Prologo, nel Ms 121. La colomba aureolata, riconducibile allo Spirito Santo, confrontata con quella presente nell'iniziale istoriata visibile nella Bibbia di Bordeaux (c. 213v), mostra similitudini nella raffigurazione. Entrambe di profilo, emergono da una nube mentre «scendono» dalla parte superiore della scena. La sezione centrale dell'iniziale istoriata, è occupata da una scena che mostra sotto un arco trilobato, una figura abbigliata con veste rossa, probabilmente un medico. La raffigurazione del medico, confrontata con quella presente nell'iniziale istoriata, posta all'incipit del Canone del manoscritto Besançon, Bibl. Mun. 457 (c. 1r) mostra similitudini, evidenziando anche in questa occasione, la volontà del miniatore di conferire sacralità al medico, abbigliato da frate. Le restanti sezioni dell'iniziale mostrano elementi a volute che richiamano la stessa tipologia di decorazione riscontrabile nel Besançon 457. L'elemento architettonico, rappresentato dall'arco gotico trilobato, ha la funzione di «sottolineare le cesure e le legature tra gli elementi figurativi, evidenziando il senso della composizione»<sup>101</sup>. Gli archi gotici presenti all'interno dell'iniziale del Ms 121, richiamano la stessa tipologia di arco raffigurato nell'iniziale istoriata del Besançon 457 (c. 1r), e quello posto sopra al

re Assuero, nell'iniziale istoriata della Bibbia BS 75 1250 (c. 133v).

### **Libro I**

Il verso della seconda carta del Ms 121, ospita un'iniziale istoriata, su nove linee di testo, *D(ico) que medicina est scientia quais umani corporis dispo(sitio)nes*. La scena mostra Avicenna abbigliato con tunica di colore blu, mantello e copricapo rosso, mentre insegna. L'autore con una mano, sorregge un libro poggiato sopra un leggio, con l'altra, leva l'indice nel gesto della parola. All'interno dell'iniziale vi sono altre tre figure che rappresentano giovani studenti abbigliati con tuniche, di cui una di colore rosso, e due blu. Essi sono posti in ascolto innanzi al docente con un libro poggiato su un banco.

L'iniziale istoriata esaminata, è stata confrontata con miniature presenti all'interno dei seguenti manoscritti: Paris, BNF, lat. 14023, c. 2r, (1315-1320); Paris, Biblioteque de l'Arsenal, Ms 702 (c. 61v); Cambrai, Médiathèque Municipale, Ms 619, c. 1r (1285) e Paris, BNF lat. 6918, c. 5r (1313-1316).

L'iniziale istoriata in esame è strettamente correlata con il testo in quanto Avicenna, come docente, illustra ai suoi discepoli l'«*universalis scientiae medicae theoremata*»<sup>102</sup> contenuta nel testo del Canone. Confrontata con il riquadro miniato, posto all'apertura del primo libro del Canone, visibile nel manoscritto Paris BNF lat. 14023 (c. 2r), la scena appare simile. Entrambe le raffigurazioni, mostrano Avicenna abbigliato nello stesso modo e mentre nell'immagine del Ms 121 si trova in piedi, in quella del BNF lat. 14023 è assiso su una cattedra importante. Entrambe le immagini mostrano il libro del maestro, appoggiato su un leggio, che risulta essere ben ben visibile sia nel BNF lat. 14023 che nel Ms 121. Anche i discepoli mostrano similitudini, a un confronto tra i due manoscritti sinora menzionati. In entrambe le miniature gli allievi sono tre, intenti ad apprendere; innanzi a loro è posto un libro appoggiato sulle ginocchia, nel

manoscritto BNF lat. 14023, e posto su un banco nel Ms 121. Un ulteriore confronto è stato fatto con l'iniziale posta all'apertura del testo del Libro IV, della *Metaphisica* di Aristotele, (Paris, Bibliothèque de l'Arsenal, Ms 702, c. 61v). L'iniziale dell'Arsenal 702 mostra similitudini con quella in esame, circa la raffigurazione dell'«autore» come docente come pure lo sfondo quadrettato. Un altro interessante confronto circa la raffigurazione di Avicenna come docente, è quello tra l'iniziale esaminata e il riquadro posto all'incipit del primo Libro delle *Decretali* di Gregorio IX, contenuti nel manoscritto Cambrai, Médiathèque Municipale, Ms 619 (c. 1r). Anche nella miniatura del manoscritto di Cambrai, l'autore è raffigurato come docente, assiso su una importante seduta, con libro posto sul leggio, nell'atto della parola, di fronte a tre scolari intenti ad ascoltare la sua lectio.

### **Libro II**

Posto all'apertura del Libro II del Canone, nel verso di carta 62 del Ms 121, un riquadro miniato, mostra in primo piano un ruscello d'acqua e un campo coltivato ed alberi. Avicenna abbigliato con lunga tunica, mantello e copricapo di colore rosso, indica nel gesto della parola, un campo dov'è chinato un uomo, abbigliato con tunica rossa, intento a raccogliere le erbe medicamentose in esso coltivate. In secondo piano tre figure maschili di cui, uno con tunica blu e mantello rosso è chino sul campo, e due, rispettivamente abbigliati con lunghe tuniche e mantelli di colore blu, dialogano tra loro scambiandosi alcune erbe; sul lato destro della scena, in lontananza, spicca una città perimetrata da mura merlate. La scena è posta su un quadrettato di colore blu, ed è ambientata sotto una serie di archi trilobati di colore rosa, disposti in successione.

Il riquadro miniato in esame è stato confrontato con le miniature poste all'interno del manoscritto Paris, BNF, lat. 14023, c. 123v (1315-1320) e con il codice

Tours, Bibliothèque municipale, Ms 558 (c. 93).

La miniatura che segue la rubrica *Incipit liber canonis avicenne II*, mostra Avicenna, come medico e sapiente «simplicium medicamentorum vires explicat»<sup>103</sup>, ai suoi discepoli durante una esercitazione pratica, sul riconoscimento e utilizzo delle erbe medicamentose. Confrontando il riquadro miniato in esame, con quello presente nel codice Paris, BNF lat. 14023 (c. 123), immediatamente ci si accorge di come entrambi i miniatori sono stati influenzati dal testo del Libro. Avicenna infatti ha dedicato il contenuto del Libro II, alla descrizione delle droghe e piante medicinali. Tuttavia, i miniatori hanno restituito una differente interpretazione del testo, ambientando la scena, di identico significato, in contesti diversi. Nel BNF lat. 14023, la scena si svolge in un ambiente chiuso; Avicenna è raffigurato assiso su un'importante seduta sopraelevata, mentre in basso due discepoli posti di fronte a una cassa di piante medicinali, dialogano con lui. Nel Ms 121 la scena si svolge all'aperto, in campagna, lontano dalla città; Avicenna è posto in piedi e si trova in un campo coltivato insieme ai suoi discepoli, in un contesto che non denota solennità. Lo sfondo quadrettato, del riquadro miniato esaminato, confrontato con quello presente nel manoscritto Tours, Bibliothèque municipale 558 (c. 93), mostra evidenti similitudini come pure il disegno dei volti e le acconciature dei personaggi.

### **Libro III**

Il riquadro miniato posto all'apertura del Libro III, mostra una scena ambientata su uno sfondo per metà di colore blu con decorazioni geometriche bianche e rosa e, per metà, bianco con decorazione geometrica rosa. Il riquadro è bipartito da una colonna con capitello che divide due scene diverse; nella parte sinistra, uno speciale è seduto mentre, con un pestello in ogni mano, compie il gesto di mescolare qualcosa in un mortaio. Di fronte a questo,

un uomo sta in piedi, abbigliato con una lunga tunica rossa e copricapo di colore grigio, nell'atto di sorreggere una bilancia. La scena è incorniciata, in alto, da una sequenza di archi trilobati di colore rosso. Lo sfondo è piastrellato di colore rosa. Nella parte destra tre uomini con lunghe tuniche di colore grigio scuro, gli altri due con lunga tunica di colore rosa chiaro. L'uomo posizionato al centro, tra i due, è barbato, ha un copricapo di colore grigio scuro e sorregge con una mano una grossa sciabola. La scena è inquadrata da archi trilobati di colore rosso, su uno sfondo quadrettato blu.

Il riquadro miniato in esame è stato confrontato con il manoscritto Paris, BNF, lat. 14023 (c. 769 v), con il manoscritto Besançon, Bibliothèque municipale 457 (c. 51) e con il codice San Marino, CA, Huntington Library HM 19999, (c. 121v) e con il manoscritto Paris, Bibliothèque Mazarine, 3873 (c. 12v).

La miniatura, restituisce l'argomento del testo contenuto nel Libro III «affectus declarat, qui singulis corporis partibus obueniunt, a summo capite ad imos usque pedes, tam cospliquos, quam abditos»<sup>104</sup>. Nel lato destro della miniatura, tre uomini dialogano su uno sfondo quadrettato blu. Con ogni probabilità l'uomo situato al centro, armato di sciabola, ha procurato una ferita all'uomo vestito di bianco, posto al suo fianco, il quale mostra l'evidente segno rosso della ferita sanguinante. A sinistra della scena, un medico ascolta quanto riportato dai due interlocutori posti innanzi a lui. Sul lato sinistro del riquadro miniato, uno speciale è assiso su una panca, ed è riconoscibile dai pestelli che sorregge e dal mortaio ai suoi piedi; di fronte al droghiere, un uomo tiene una bilancia, quasi certamente, in attesa di un medicamento per la sua malattia. La miniatura, confrontata con quella presente nel manoscritto Paris, Bibliothèque Mazarine, 3873 (c. 12v) mostra evidenti similitudini nell'impostazione del riquadro. Entrambe le miniature, sia quella

del manoscritto San Marino HN 19999 che quella del Ms 121, sono bipartite in due riquadri di colori diversi. Un ulteriore elemento di confronto tra la miniatura in esame e quella presente nel manoscritto San Marino, CA, Huntington Library HN 19999 (c. 121v), è rappresentato dalla colonna, posta al centro tra le due differenti scene.

#### **Libro IV**

Il riquadro miniato posto all'apertura del Libro IV, mostra una scena relativa alla visita ad un malato. I personaggi si muovono su uno sfondo quadrettato blu. Nel lato sinistro una figura femminile è sdraiata in un letto, coperta da un telo blu con i bordi ricamati di banco. Accanto a lei, un medico rileva la frequenza del polso; ai piedi del letto una donna con una mano sorregge un piccolo secchio di vimini mentre con l'altra sorregge una *matula*. Al fianco della donna, un altro medico, forse un assistente, sorregge con entrambe le mani una *tavola uroscopica*.

Il riquadro miniato in esame è stato confrontato con i seguenti manoscritti: Besançon, Bibliothèque municipale, 457, c. 221v, c. 260v, (1260); con il codice Paris, Bibliothèque Arsenal 702, (c. 143v); con il manoscritto Paris, BNF lat. 6918 (c. 356v).

Il riquadro miniato risponde al contenuto del testo conservato nel Libro IV «agit de morbis, quorum non certae sedes assignari possunt: itemque de ornatu, seupolitura». L'iconografia della donna malata coricata nel letto rimanda alla figura femminile sdraiata, anch'ella nel letto, visibile nella miniatura che apre il Libro III del manoscritto Besançon Bibliothèque municipale, 457, c. 221v, c. 260v. I miniatori di entrambi i codici hanno raffigurato la malata sdraiata nel letto, abbigliata con una veste rossa e copricapo bianco. Il medico che rileva la frequenza del polso visibile nel Ms 121 è del tutto simile a quello presente nel codice Paris, Bibliothèque de l'Arsenal 702, (c. 143v). La donna ai piedi del letto con una mano solleva una *matula* mentre con l'altra sorregge un secchiello di

vimini. Il gesto di sollevare l'ampolla contenente urine rimanda ad una iconografia ricorrente in manoscritti raffiguranti personaggi intenti ad osservare le urine dei pazienti. Confrontando la miniatura in esame con quella posta nel codice Paris, BNF lat. 6918 (c. 356v) si riscontrano puntuali similitudini nell'atto del sollevare la *matula* per permettere una migliore osservazione delle urine.

Un ulteriore elemento interessante è rappresentato dall'oggetto circolare, sorretto dal medico nel lato destro della scena che è stato identificato essere una tavola uroscopica dopo averlo confrontato con un disegno presente nel manoscritto Oxford, University Bodleian Libraries, MS Ashmole 789, c. 364v. Un altro elemento di confronto è identificabile nel piede sinistro del medico che sorregge la tavola uroscopica, posizionato in prospettiva, diversamente dal resto della scena. L'elemento del piede in prospettiva rimanda a un esempio simile riscontrato nel Besançon Bibliothèque municipale 457, cc. 221v, 61v.

#### **Libro V**

Il riquadro miniato, posto all'apertura del Libro V, mostra una scena in cui uno speciale con copricapo oca, abbigliato con una lunga tunica rossa è assiso su una panca, nell'atto di tritare con due pestelli in un mortaio, le erbe medicinali raccolte da un suo collaboratore chinato su un campo coltivato. Di fronte alla figura, due uomini abbigliati con tuniche di diverso colore si rivolgono allo speciale per ottenere da lui un rimedio per la cura delle malattie.

Confrontando la miniatura in esame con quella presente nel manoscritto Paris, BNF lat. 14023 (c. 769 v) si riscontrano similitudini nell'iconografia dello speciale, anch'egli assiso su una panca nel gesto di tritare le erbe nel mortaio con due grossi pestelli tra le mani. A un confronto tra la miniatura del Ms 121 e quella presente nel Besançon 457 (c. 51) si riscontra, immediatamente, una

similitudine con lo speziale seduto in primo piano, intento a tritare, con il pestello, le erbe in un mortaio, al fine di ricavarne medicinali utili alla cura delle malattie. Il gesto di mescolare le erbe medicinali è stato riscontrato altresì nel manoscritto Besançon, Bibliothèque municipale 457, c. 51 (anno 1260). Di fronte allo speziale del Besançon 457 (c. 51) è posto un malato nel gesto di bere un infuso medicamentoso appena preparato dal droghiere. Un ulteriore confronto tra la miniatura visibile nel Ms 121 e quella presente nel Besançon 457 (c. 365) mostra similitudini interpretative del testo contenuto nel Libro V da parte dei due miniatori. Entrambi hanno raffigurato uno speziale al lavoro, in compagnia di un collaboratore, e un malato posto di fronte ad essi in cerca di un rimedio medicamentoso. Un altro elemento confrontato con la miniatura del Besançon 457 (c. 365) è rappresentato dalla sequenza di archi. Entrambe le miniature mostrano la stessa tipologia di archi abbassati.

#### INDICE DELLE ILLUSTRAZIONI

1. Roma, Biblioteca Lancisiana, ms 121, c 1r.
2. Roma, Biblioteca Lancisiana, ms 121, c 1r, particolare.
3. Roma, Biblioteca Lancisiana, ms 121, c 2v, particolare.
4. Roma, Biblioteca Lancisiana, ms 121, c 62v.
5. Roma, Biblioteca Lancisiana, ms 121, c 62v, particolare.
6. Paris, BNF lat. 14023, c. 123r.
7. Roma, Biblioteca Lancisiana, ms 121, c 114r
8. Roma, Biblioteca Lancisiana, ms 121, c 114r, particolare.
9. Roma, Biblioteca Lancisiana, ms 121, c 260r.
10. Roma, Biblioteca Lancisiana, ms 121, c 260r, particolare.
11. Paris, Bibliothèque de l'Arsenal, ms 702, c. 143v.
12. Paris, BNF lat. 6918, c. 356v.
13. Oxford, University Bodleian Libraries, MS Ashmole 789, c. 364v.
14. Roma, Biblioteca Lancisiana, ms 121, c 329v.
15. Roma, Biblioteca Lancisiana, ms 121, c 329v, particolare.

#### NOTE NEL TESTO

<sup>1</sup> CARSUGHI 1718, p. 8.

<sup>2</sup> «Distesasi non pur per l'Italia ma anche fuori da essa la fama di questa insigne azione di Monsignor Lancisi, siccome egli era dappertutto cognitissimo, ed aveva Protettori, ed Amici; così non solo n'esigè applauso, e loda universale; ma vari Principi fautori delle lettere vollero dimostrarli il lor godimento, e l'approvazione di si bel genio, regalandogli, in accrescimento della Biblioteca, pregiatissimi libri; e in particolare il Regnante Gran Duca di Toscana gli fece dono di alcuni scelti Codici, cioè di Evangelii, la Gramatica, e le Opere di Avicenna»

<sup>3</sup> CARUSI 2015, p. 1.

<sup>4</sup> I codici miniati conservati presso la Biblioteca Lancisiana sono tre. Oltre al nostro, sono presenti due manoscritti datati: il Ms 329 "Avicenna" del 1471 e il Ms 328 "Liber Fraternitatis Sancti Spiritus et Santa Mariae in Saxia de Urbe", iniziato nel 1446.

<sup>5</sup> Il Ms 121 non è menzionato nel preesistente "Catalogus Librorum Bibliothecae domus Romae S. Spiritus in Saxia, in abaculos XII literis alphabeti signatos, alphabetico ordine digestus. 1652", conservato presso l'Archivio di Stato di Roma (n inv.)

<sup>6</sup> DE ANGELIS 1965, p. 176.

<sup>7</sup> Cristoforo Carsughi fu il primo bibliotecario della biblioteca Lancisiana, egli si occupò dell'ordinamento della stessa.

<sup>8</sup> Si tratta dell'*Indice delle scanzie, ossia inventario de' libri esistenti nella Biblioteca Lancisiana fatto per ordine di Monsignor illustrissimo e reverendissimo Giovanni Potenziani, MDCCCLXX*, conservato presso la Biblioteca Lancisiana di Roma.

<sup>9</sup> *Bibliothecae Lancisiana index ant.ex Marchio. Cioajae praeceptoris etc., tom. I, anno MDCCCXXXVII.*

<sup>10</sup> CANEZZA 1926-1945.

<sup>11</sup> Catalogo a schede mobili: «*Cataloghetto dei manoscritti*», conservato presso la Biblioteca Lancisiana.

<sup>12</sup> Ada Caputi Moricca è stata bibliotecaria presso la Biblioteca Lancisiana tra il 1924 e il 1925.

<sup>13</sup> Una nota aggiunta all'inventario, con ogni probabilità dalla stessa Ada Caputi Moricca, precisa: «v'è annotazione in fine che dice: *Montpellier 1366*».

<sup>14</sup> Pietro De Angelis è stato bibliotecario della Biblioteca Lancisiana di Roma, successe ad Alessandro Canezza nel 1945.

<sup>15</sup> DE ANGELIS 1965, p. 155

<sup>16</sup> Ibidem.

<sup>17</sup> Negli anni 1961-1972 Marie-Therese d'Alverny ha pubblicato nella rivista "Archivi d'Histoire et Doctrinale Litteraire du Moyen Age" 11 fascicoli inerenti lo studio della tradizione codicologica dell'Avicenna latino. Ella descrive più di 150 manoscritti latini del "corpus Avicennan" conservati in biblioteche europee, gettando così le basi per il lavoro poi pubblicato nella collana "Avicenna Latinus", menzionando tra gli altri, un codice di Avicenna appartenente al fondo della Biblioteca Lancisiana (Roma Lancisiana, Ms 329). Un richiamo al nostro manoscritto (Roma Lancisiana, Ms 121) è presente in D'Alverny 1969, p. 130.

<sup>18</sup> C. B. SCHMITT 1970, p. 290.

<sup>19</sup> P. O. KRISTELLER 1992, p. 173.

<sup>20</sup> Francesca Manzari, è stata invitata a tenere una prima presentazione dei tre codici miniati della Biblioteca

Lancisiana in occasione di una giornata di studi dedicata al Polo Museale. La studiosa ha proposto confronti stilistici con manoscritti di produzione tolosana nella sua relazione, dal titolo *Medicina illuminata. Codici miniati nelle collezioni della Biblioteca Lancisiana*, presentata nella giornata di Studi Santo Spirito in Sassia. Verso il polo museale della ASL Roma E, (Roma, Santo Spirito in Sassia, 27.10.2015) F.Manzari, P.Ricca, *Medicina illuminata. La Biblioteca Lancisiana di Roma. Alumina*. pp. 30-31

<sup>21</sup> Desidero ringraziare la studiosa, autrice di un monumentale repertorio sui codici miniati in Francia nella fascia cronologica 1260-1320 (Stones 2013-2014), per aver esaminato il codice con me, in occasione di una visita alla Biblioteca Lancisiana, e per i suoi preziosi consigli.

<sup>22</sup> CALIFANO 2015, p. 26.

<sup>23</sup> Nonostante che il manoscritto (Roma, Biblioteca Lancisiana, Ms 121) oggetto del presente studio, è un codice latino, per ragioni editoriali, in questa sede non sono state inserite le diverse interpretazioni degli studiosi circa la componente iconografica delle miniature delle opere latine di Avicenna.

<sup>24</sup> D'ANGELO 2011, p. 175

<sup>25</sup> Per quanto riguarda la traduzione del Canone è necessario evidenziare che tra la fine del XV e gli inizi del XVI secolo, il medico e arabista italiano Andrea Alpago intervenne con una revisione sul testo medievale tradotto da Gerardo da Cremona: VERCELLIN GIORGIO, *Il Canone di Avicenna fra Europa e Oriente nel primo Cinquecento*, Torino 1991, p.15.

<sup>26</sup> RIZZO, 2013, p.31.

<sup>27</sup> CARUSI 2015.

<sup>28</sup> CRACOLICI 2011, p. 155.

<sup>29</sup> CALIFANO 2015, p. 26.

<sup>30</sup> VERCELLIN 1991, p. 15.

<sup>31</sup> VERCELLIN 1991, p. 15

<sup>32</sup> CARUSI 2015.

<sup>33</sup> CALIFANO 2015, p. 26.

<sup>34</sup> CARUSI 2015.

<sup>35</sup> VERCELLIN 1991, p. 15

<sup>36</sup> D'ALVERNY 1969, p. 122.

<sup>37</sup> D'ANGELO 2015, p. 175.

<sup>38</sup> Deformazione latina della parola araba funūn (plurale di disciplina scientifica).

<sup>39</sup> VERCELLIN 1991, p. 15.

<sup>40</sup> CARUSI 2015.

<sup>41</sup> NALLINO 1930.

<sup>42</sup> LA SALANDRA 2013, p. 16

<sup>43</sup> BERTOLACCI 2005, p. 496

<sup>44</sup> WINOVSKY 2005, p. 94.

<sup>45</sup> BERTOLACCI 2005, p. 516.

<sup>46</sup> BERTOLACCI 2005, p. 495.

<sup>47</sup> BERTOLACCI 2005, p. 499.

<sup>48</sup> BERTOLACCI 2005, p. 503.

<sup>49</sup> BERTOLACCI 2005, p. 503.

<sup>50</sup> BERTOLACCI 2005, p. 496.

<sup>51</sup> VERGER 2008, p. 130

<sup>52</sup> VERGER 2008, p. 130

<sup>53</sup> RIZZO, 2013, p. 8.

<sup>54</sup> VERGER 2008, p. 131

<sup>55</sup> LA SALANDRA 2013, p. 160.

<sup>56</sup> RODINSON 1988, p. 32.

<sup>57</sup> RIZZO, 2013, p. 31.

<sup>58</sup> VERCELLIN 1991, p. 15.

<sup>59</sup> POLLONI 2013, p. 6.

<sup>60</sup> SPRENGEL 1840, p. 342.

<sup>61</sup> SPRENGEL 1840, p. 342.

<sup>62</sup> TRECCANI,2000.

<sup>63</sup> PASSERINI 1825, p. 54.

<sup>64</sup> TRECCANI, 2000.

<sup>65</sup> POLLONI 2013, p. 1.

<sup>66</sup> POLLONI 2013, p. 5; D'ALVERNY 1971, p. 119; D'ALVERNY 1971, p. 118.

<sup>67</sup> RIZZO 2013, p.28.

<sup>68</sup> RIZZO 2013, p. 27.

<sup>69</sup> RIZZO 2013, p. 26.

<sup>70</sup> VERCELLIN 2013, p. 15.

<sup>71</sup> VERCELLIN 2013, p. 15.

<sup>72</sup> Mi sembra utile ricordare alcuni riferimenti bibliografici delle pubblicazioni menzionate, appartenenti al fondo della Biblioteca Lancisiana ANDREA GRATIOLLO, *Principis Avicennae Liber primus. De Universalibus Medicae Scientiae Praeceptis*, Venezia 1580. JACOBI FOROLIVENSIS, *Expositio et quaestiones in primum canonem Avicennae*, Venezia 1547. *Avicennae operum in re medica tomus secundus, idest liber canonis quartus, cum IOANNIS COSTAEI LAUDENSIS & IONNIS PAULI MONGIJ HYDRUNTINI annotationibus*, Venezia 1564.

<sup>73</sup> CARRARA 1998, p.647.

<sup>74</sup> Ibidem.

<sup>75</sup> STONES 2013-2014.

<sup>76</sup> Il confronto è stato effettuato tra il Ms 121 e i seguenti manoscritti: Besançon, Bibliothèque municipale, MS 457;

<sup>77</sup> BASCAPE', DEL PIAZZO 1983, p. 11.

<sup>78</sup> Rilevazione effettuata a c 6r.

<sup>79</sup> Rilevazione effettuata a c 260r.

<sup>80</sup> Rilevazione effettuata a c 274v.

<sup>81</sup> Rilevazione effettuata a c 287v

<sup>82</sup> L'iniziale istoriata «I»nquit posta all'incipit del Libro III affianca il riquadro miniato.

<sup>83</sup> Rilevazione effettuata a c 19r, c 20r.

<sup>84</sup> Rilevazione effettuata a c 158r, c 163r.

<sup>85</sup> CARSUGHI, 1718, p.8

<sup>86</sup> Giovanni Mario Crescimbeni, (Macerata 1663 - Roma 1728) fu il principale fondatore dell'Arcadia (1690), di cui fu custode generale fino alla morte. Fu inoltre il biografo di Giovanni Maria Lancisi, anch'egli membro dell'Arcadia con il nome di Ersilio Macariano. (Amato Bacchini, *La vita e le opere di Giovanni Maria Lancisi (1654-1720)*, Roma, 1920. p. 23).

<sup>87</sup> CRESCIMBENI 1721, p. 104.

<sup>88</sup> INDICE, 1887, p. 1063.

<sup>89</sup> INDICE, 1837.

<sup>90</sup> CANEZZA, 1926-1945.

<sup>91</sup> CANEZZA,1926-1945.

<sup>92</sup> Ada Caputi Moricca è stata bibliotecaria presso la Biblioteca Lancisiana tra il 1924 e il 1925; ella ha redatto altresì il *Catalogo dei libri esistenti nella Biblioteca Lancisiana*. [s.d.]

<sup>93</sup> DE ANGELIS, 1965, p. 155.

<sup>94</sup> Della segnatura 121, sono visibili le ultime due cifre (21) poiché l'etichetta non è integra.

<sup>95</sup> Marie Therèse D'Alverny, attribuisce questa annotazione ad antichi studenti universitari (D'ALVERNY 1969, p. 130)

<sup>96</sup> D'Alverny, ritiene questa annotazione sia un ex libris del XVI secolo, che indica due medici italiani (D'ALVERNY 1969, p. 131.)

<sup>97</sup> Nell'anno 2003 La Biblioteca Lancisiana di Roma ha subito gravi danni strutturali. Pertanto è stato necessario trasferire l'intero patrimonio bibliografico presso un deposito temporaneo, predisposto per la circostanza. In quell'occasione, gli unici tre codici miniati presenti nel fondo



Lancisiano (Ms 328, Ms 329 e Ms 121) per ragioni di tutela, sono stati trasferiti presso l'allora Istituto Centrale per la Patologia del Libro e ivi custoditi per un periodo di due anni, prima di essere collocati nel deposito temporaneo.

<sup>98</sup> La selezione di manoscritti per l'analisi stilistica, è stata scelta da citazioni di Marie Thèrese D'alverny e dal vasto repertorio contenuto nell'opera monumentale di Alison Stones.

<sup>99</sup> FOROLIVENSIS 1547, p. 1.

<sup>100</sup> D'ALVERNY 1969, p. 130.

<sup>101</sup> ALEXANDER 2003, p. 190.

<sup>102</sup> GRATIOLO 1580, p. 1v.

<sup>103</sup> GRATIOLO 1580, p. 1v

<sup>104</sup> GRATIOLO 1580, p. 2v.

## BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

- Bacchini A. La vita e le opere di Giovanni Maria Lancisi. Roma: Stabilimento Sansaini, 1920.
- Bellettini A. St Albans John Whethamstede e il trattato di gnomonica di Robert Stikford. I: Nuove ricerche su codici in scrittura latina all'Ambrosiana. Atti del convegno 6 -7 ottobre 2005, pp 217-228; Milano, 2005.
- Bertolacci A. Biblioteche e centri di cultura nell'Oriente musulmano tra il X e l'XI secolo. In: Storia della filosofia nell'Islam medievale. Vol II: 495-521; Torino: G. Einaudi, 2005.
- Biancastella A. Il Canone di Avicenna della Biblioteca Universitaria di Bologna. Roma: De Luca, 1999.
- Bianchedi L. Aspetti culturali e sanitari dell'Ars medica nell'Italia medioevale. In: Analecta Romana Instituti Danici XXXVIII. Roma, 2013.
- Bibliothecae Lancisiana index ant. ex Marchion. Ciojae praeceptoris etc., I. Roma, 1837.
- Bilotta MA. Images dans les marges des manuscrits toulousains de la première moitié du XIV siècle: un monde imagine entre invention et réalité. In: Mélanges de l'École française de Rome. Moyen Age 121, pp.149-159. Roma, 2009.
- Boncompagni B. Della vita e delle opere di Gherardo cremonese, traduttore del secolo duodecimo, e di Gherardo da Sabbionetta astronomo del secolo decimoterzo. In: Atti della Accademia Pontificia de' Nuovi Lincei, pp. 387-493. Roma 1851.
- Califano S. Storia dell'alchimia: Misticismo ed esoterismo all'origine della chimica moderna. Firenze: University Press, 2015.
- Calo' Mariani MS. L'arte e la corte. In: Catalogo della mostra Federico II. Immagine e potere, pp.29. Venezia 1995.
- Canezza A. Inventario a schede mobili. Roma [s.d.]
- Canezza A. Inventario dei manoscritti..., Roma 1926-1945.
- Carsughi C. La Biblioteca Lancisiana, ovvero Distinto ragionamento della pubblica libreria eretta l'anno 1714 nel sacro pontificio Archiospedale di S. Spirito in Roma dall'illustriss., e reverendiss. mons. Gio: Maria Lancisi (...) Descritto dall'abate Cristoforo Carsughi (...) Con una orazione recitata: De recto usu bibliothecae, e coll'aggiunta d'alcune poesie dello stesso autore, fra gl'arcadi detto Egialo Pastore. Roma, 1718.
- Carusi P. Il Canone di medicina (al-Qanūn fī'l-ṭibb) di Avicenna. Medicina e Chirurgia 2015; 65: 2846-954.
- Castelfranchi V. Il ruolo delle arti minori nel medioevo. In: Arti minori, enciclopedia tematica aperta; pp. 13-36. Milano: Jaka book, 2000.
- Cianci E. La ricezione della medicina nell'Occidente medievale. In: Ricerca didattica tra due sponde. Atti della Convenzione Internazionale tra l'Università G. D'annunzio di Chieti Pescara e l'Università 7 Novembre à Carthage di Tunisi. Lanciano, 2007.
- Cracolici S. L'ultimo umore e le ambiguità della vecchiaia, Senilità Immagini della vecchiaia nella cultura occidentale. Alessandria: Edizioni dell'Orso, 2011.
- Crescimbeni GM. Vita di monsignor Gio. Maria Lancisi camerier segreto, e medico di nostro signore papa Clemente 11. scritta da Gio. Maria Crescimbeni arciprete della basilica di S. Maria in Cosmedin, custode generale d'Arcadia, e collega dell'imperial Società Carolina d'Augusta. Roma, 1721.
- D'agostino A. Manoscritto, materiali per il corso di filologia romanza. AA. 2003- 2004.
- D'alverny MT. Avicennisme en Italie, in Tra Oriente e Occidente nel medioevo: filosofia e scienze. In Atti del Convegno internazionale dei Lincei 9 - 15 aprile 1969; pp.117-144. Roma 1971.
- D'alverny MT. Avicenna Latinus. Codices. Codices descripsit M.-T. d'Alverny. Addenda collegerunt S. Van Riet et P. Jodogne, Leiden, 1994.

- D'angelo S. La medicina nel Medioevo. In: *Medioevo e dintorni*, lezioni della sezione di Trapani dell'Officina di Studi Medievali; pp. 196-183. Palermo: Officina di Studi Medievali, 2011.
- De Angelis P. La Biblioteca Lancisiana. L'accademia Lancisiana nel 250° anno di fondazione. In: *Collana di studi storici sull'Ospedale di Santo Spirito in Saxia e sugli ospedali romani*; pp. 130. Roma, 1965.
- Firpo L. *Medicina medievale*. Torino, 1972.
- Frugoni C. *La voce delle immagini, pillole iconografiche dal medioevo*. Torino: Einaudi, 2010.
- Hasse N. King Avicenna: The consequences of a mistranslation. *Journal of the Warburg and Courtrauld Institutes* 1997; 60: 230-43.
- Indice delle scanzie, ossia inventario de' libri esistenti nella Biblioteca Lancisiana fatto per ordine di Monsignor illustrissimo e reverendissimo Giovanni Potenziani. Roma, 1770.
- Jonathan JG Alexander. I miniatori medievali e i loro metodi di lavoro. Modena: Panini FC Ed., 2003.
- Kristeller PO. *Iter Italicum. Accedunt alia itinera VI*. London-Leiden, 1992.
- La Salandra V. Medioevo italo-arabo, La Scuola Medica Salernitana e gli indubbi influssi della scienza arabo-islamica. In: *Spigolature arabo-islamiche*; pp. 159-184. Roma 2013.
- Laurenti F. *Tradurre: Storie, teorie, pratiche dall'antichità al XIX secolo*. Roma, 2015.
- Morpurgo P. Michele Scoto e la circolazione dei manoscritti scientifici in Italia Meridionale: la dipendenza della Scuola Salernitana dalla Scuola Parigina di Petit Pont. In: *La diffusione delle scienze islamiche nel medioevo europeo*. pp. 167-191. Roma, 1987.
- Nallino CA. Avicenna. In: *Enciclopedia Italiana Treccani*. Torino, 1930.
- Orofino G. *Albucasis, De chirurgia*, Cod. Vindob. S.N. 2641. Una proposta di attribuzione alla Napoli robertiana, in *Miniatura. Lo sguardo e la parola. Studi in onore di Giordana Mariani Canova*; pp. 108-114. Milano, 2012.
- Orofino G. *Chirurgia per il sultano: le illustrazioni del Paris. Suppl. Turc 693 (Amasya, 1465-1466)*. In: *L'officina dello sguardo. Scritti in onore di Maria Andaloro*; pp. 673-678. Roma: Gangemi, 2014.
- Orofino G. *Di padre in figlio. Federico II, Manfredi e l'illustrazione del De arte venandi cum avibus*. In: *Tempi e forme dell'arte*; pp. 137-143. Foggia: C. Grenzi, 2011.
- Orofino G. Il rapporto con l'antico e l'osservazione della natura nell'illustrazione scientifica di età sveva nell'Italia meridionale. In: *Intellectual life at the court of Frederick II Hohenstaufen*; pp. 129-149. Washington, 1994.
- Orofino G. *Incognitae officinae: il problema degli scriptoria di età sveva in Italia meridionale*. In: *Medioevo: le officine. Atti del Convegno Internazionale di Studi*; pp. 468-480. Milano: Electa, 2010.
- Orofino G. La trasmissione dell'iconografia di Germanico nell'Italia meridionale. In: *Manoscritti scientifici miniati fra tradizione classica e modelli arabi*; pp. 25-41. Battipaglia: Laveglia & Carlone, 2013.
- Pächt O. *La miniatura medievale. Una introduzione*. Torino: Bollati Boringhieri, 1987.
- Passerini L. *Biografia universale antica e moderna ossia storia per l'alfabeto della vita pubblica e private di tutte le persone che si distinsero per opera, azioni, talenti, virtù e delitti .... recata in italiano con aggiunte e correzioni. Vol XXIV*; Venezia, 1875.
- Perriccioli Saggese A. A proposito di alcuni libri di medicina miniati a Napoli nel XVI secolo. In: *Manoscritti scientifici miniati fra tradizione classica e modelli arabi*; pp. 63-76. Battipaglia: Laveglia & Carlone, 2013.
- Peter Murray J. *Medieval medicine in Illuminated Manuscript*. British Library; London, 1998.
- Piva G. *Manuale pratico di tecnica pittorica*. Lavis-Trento, 2005.
- Polloni N. Toledo, crocevia di culture nel XII secolo: il caso del movimento di traduzione. In: *Cantieri d'Autunno; Università di Pavia*, 2013.
- Ponzi E. Prime riflessioni su un Avicenna miniato nel fondo urbinato della Biblioteca Apostolica Vaticana. 2. *Illustrare la medicina, in Miniatura. Lo sguardo e la parola. Studi in onore di Giordana Mariani Canova*; pp. 55-60; a cura di Toniolo F, Toscano G. Milano, 2012.
- Rizzo G. Le traduzioni scientifiche dall'arabo al latino in area mediterranea. *Uomini, luoghi e tracciati europei a partire dal secolo XI*. In *Palaver* 2013; 2: 7-36.

Rodinson M. Il fascino dell'Islam. Bari: Dedalo Ed., 1988.

Salvatelli L. Codici scientifici miniati alla corte dei Papi: Analisi storico artistica e culturale della produzione libraria tra XIII e XIV secolo. Berlino, 2014.

Schmitt CB. A Survey of some of the Manuscripts of the Biblioteca Lancisiana in Rome. In "Medical History"; pp. 289-294. 14, London 1970.

Siraisi NG, Ferraripiero Morpurgo G, Biraben JN. Una scienza bizantina e latina: la nascita di una scienza europea. Medicina, chirurgia e farmacologia. In: Enciclopedia Italiana Treccani, 2001.

Sprengel C. Storia prammatica della medicina. Firenze: Tipografia della speranza, 1840.

Stones A. Gothic Manuscripts. 1260-1320. Part One- Part Two, 4 voll., London-Turnhout 2013-2014.

Torno A. Avicenna, il filosofo arabo che scrisse la bibbia dei medici. In: Corriere della Sera; Milano, 2012.

Treccani. Gherardo da Cremona. In: Dizionario Biografico degli Italiani Treccani; vol. 53. Torino, 2000.

Vercellin G. Il Canone di Avicenna fra Europa e Oriente nel primo Cinquecento. Torino: UTET, 1991.

Verger J. Il Rinascimento del XII secolo: storia di un concetto storiografico. In: La fioritura della dialettica, X-XII secolo; pp. 127-186. Milano: Jaca book, 2008.

Winovsky R. Avicenna and the Avicennian tradition. In: The Cambridge Companion to Arabic Philosophy; pp.92-132. Cambridge: Cambridge university press, 2005.

### ***Siti consultati:***

<http://mandragore.bnf.fr/html/enlum/default.htm>

<http://medium.irht.cnrs.fr/>

<http://www.bl.uk/manuscripts/About.aspx>

<http://www.e-codices.unifr.ch/it>

<http://www.mss.vatlib.it/gui/scan/link.jsp>

Dott.ssa Patrizia Ricca, Responsabile conservazione documentale, ASL Roma 1

Per la corrispondenza:  
[patrizia.ricca@aslroma1.it](mailto:patrizia.ricca@aslroma1.it)

# L'intuizione e l'impegno femminile nella salute umana

**R. Russo**

## **Introduzione**

Avendo nella mia professione di ostetrico-ginecologo ascoltato, assistito e curato molte donne, ho avuto il privilegio di apprezzarne l'intelligenza, l'intuito il coraggio e l'impegno per la cura della propria e altrui salute.

Prenderò in considerazione l'intuito femminile, l'impegno sociale per la prevenzione e cura della salute riportando la storia, tra le tante, di tre donne non medico: Lady Montagu, per la vaccinazione antivaaiolosa, Florence Nightingale per il suo impegno nel nursing, anticipatrice della creazione della Croce Rossa Internazionale, e la regina Elena per la terapia dell'encefalite letargica e suoi reliquati. Nell'antica ricchezza della mitologica greca è proprio Igea la loro Dea. Infatti, Igea figlia di Asclepio e Lampeggia era venerata come dea della salute. Veniva rappresentata sotto l'aspetto di una giovane donna nell'atto di dissetare un serpente con la mano sinistra appoggiata ad un'asta. Il culto era associato a quello del padre Asclepio e di Panacea, sua sorellastra. Oltre che dea della salute e del risanamento era la divinità di ogni cosa pulita, rappresentava la prevenzione dalle malattie e mantenimento dello stato di salute.

L'intuito (dal lat. guardare e vedere dentro) è l'atto e la facoltà di intuire, è la conoscenza rapida e chiara, e spesso la capacità di avvertire, comprendere e valutare con immediatezza un fatto e una situazione. Può essere considerato come una percezione immediata di una realtà non manifesta senza l'aiuto di prove o del ragionamento. Secondo Carl Gustav Jung, l'intuizione è un processo di intervento dell'inconscio con cui la mente riesce a percepire i modelli della realtà nascosti dietro ai fatti.

Albert Einstein ritiene che "la mente intuitiva sia un dono sacro e la mente razionale un servo fedele; abbiamo creato una società che onora il servo e che ha dimenticato il dono".

In un convegno della Fondazione Atena "il Cervello della Donna" il neurochirurgo Giulio Maira riferì esserci una differenza tra il cervello maschile e quello femminile. In quest'ultimo è il risultato di una catena di effetti, avvenuti nel corso di millenni, che coinvolgono la genetica, gli ormoni, il cervello, i comportamenti, e che non implicano alcun giudizio di inferiorità o superiorità. Possiamo dire, in linea di massima, che l'uomo possiede un cervello che segue schemi logici più basati sulla razionalità, mentre nella donna il funzionamento cerebrale sarebbe maggiormente di tipo intuitivo, nell'uomo il funzionamento dei circuiti nervosi è più rigido mentre è più plastico nella donna.

Uno studio condotto tra le università di Granada, Barcellona e Londra pubblicato su *Psychoneuroendocrinology* riferisce che, nel cervello femminile, l'intuito, è influenzato sin nel grembo materno, perché, esposto a scarse quantità di testosterone, ormone maschile che invece apporta razionalità e capacità riflessive. Forse l'uomo ha un cervello più razionale in quanto i due emisferi cerebrali destro e sinistro sono meno connessi tra loro rispetto a quelli del cervello femminile. La donna avendo più connessioni tra essi, ha un cervello più olistico e intuitivo.

In questo studio è stato preso in considerazione il "*Digit ratio*" che è il rapporto tra la lunghezza del dito indice (2° dito) e del dito anulare (4° dito) della mano destra, che potrebbe rappresentare con la lunghezza del dito indice più lungo una esposizione del feto a più alti livelli di

estrogeni, mentre un dito anulare più lungo maggiore esposizione del feto agli androgeni testosterone. Le donne con un rapporto più basso tra indice e anulare, quindi più esposte a più alte concentrazioni di testosterone in utero, sono meno intuitive di quelle con un rapporto più elevato; segno che in un certo senso hanno un cervello più maschile.

Nel libro di Shakti Gawain "Il Potere dell'Intuizione" quando nasciamo ciascuno di noi possiede una grande capacità di intuizione, nel corso degli anni vivendo, in una società fondata sul culto della razionalità, perdiamo ogni contatto con essa, sino al punto di farne una perfetta estranea. Il cammino che intraprendiamo verso la verità non conosce punti di arrivo, ma solo stazioni di transito.

Infine "Feminine Intuition" è un racconto fantascientifico scritto nel 1969 da Isaac Asimov in cui con un balzo spaziale si cerca di raggiungere altri sistemi stellari con pianeti abitabili. A questo progetto lavora un robot dotato di personalità, perciò inventiva, per di più tendente al femminile il cui nome è Jane.

### **L'Intuito Femminile**

#### *Lady Montagu*

Per introdurre Lady Montagu, nota anche "Lady Mary", è necessario descrivere una breve storia del vaiolo e parallelamente l'antica storia della sua profilassi. Il vaiolo (vario, chiazato) è una malattia contagiosa di origine virale (orthopoxvirus della famiglia dei Poxviridae); è a contatto con le popolazioni umane da migliaia di anni, il corpo mummificato del faraone Ramses V nel 1157 a.C. ne porta evidenti segni. Queste epidemie hanno sempre generato terrore per l'elevata mortalità specialmente infantile, oltre che, come conseguenza, provocare cecità e cicatrici che potevano sfigurare il volto, che si diceva butterato. Lunga è la storia della profilassi antivaiolosa: i primi furono i cinesi nel 1014, consisteva nell'insufflare nelle narici polvere di croste di

vaiolosi, poi in India i bramini praticavano l'inoculazione sottocute con fili impregnati di materia vaiolosa. Da molto tempo i popoli abitanti vicino al Mar Caspio, come i circassi e i georgiani proteggevano la bellezza delle loro donne dalle deturpazioni provocate dal vaiolo mediante l'inoculazione di questo materiale ed era proprio per questi che i Turchi e Persiani ne traevano delle belle donne schiave per l'harem.

Mary Wortley Montagu (Thoresby Hall 1689-Londra 1762), figlia del conte di Kingston, era una aristocratica colta, aveva studiato il latino e il greco, poliglotta, scrittrice e poetessa, anticonformista e paladina dei diritti delle donne. Nel 1712, contro il volere del padre, rinunciando alla sua eredità, sposò Edward Wortley Montagu, nipote del conte di Sandwich. Nel 1714 lady Mary, donna di affascinante bellezza, una delle donne più ritratte del settecento, contrasse il vaiolo che le deturpò il viso; le cicatrici del suo volto non sono mai apparse nei dipinti stessi; sempre il vaiolo le aveva portato a morte il fratello. Queste tristi vicende la resero protagonista della lotta contro il vaiolo attraverso la sua profilassi.

Per il viso deturpato dalle cicatrici vaiolose è stata usata, come fondo tinta, la biacca, pigmento bianco, costituito da carbonato basico di piombo, adoperato anche in pittura, che poteva provocare avvelenamento da piombo con caduta dei capelli. Ne fece uso, come si può vedere nei suoi quadri, anche Elisabetta I d'Inghilterra che nel 1562 aveva contratto il vaiolo. Il libro di Pierre Darmon descrive il Vaiolo e il mondo nobiliare: "Il vaiolo di Luigi XV e l'inoculazione di Luigi XVI". Nel 1716 seguì, con entusiasmo e forte curiosità, il marito che era stato nominato ambasciatore inglese a Costantinopoli. Lady Mary è ricordata anche per le sue lettere, che per tutta la sua vita, ci hanno documentato parte del '700 sia in Inghilterra che in Europa e in Oriente. Ci ha descritto i suoi lunghi viaggi intrapresi, in particolare quelle scritte dalla Turchia che

rappresentano un reportage dei luoghi incontrati, del mondo delle donne dell'oriente musulmano, sia negli harem che nel bagno turco. In un taccuino di Ingres si trovò una descrizione dei bagni turchi fatta da Lady Montagu.

Lady Mary a Costantinopoli venne a conoscenza parlando con molte donne, di diverso ceto sociale, di lingue diverse, e con vecchie donne greche, secondo una antica sapienza popolare, a scopo profilattico per il vaiolo preferibilmente quando finiva il caldo nel mese di settembre portavano in un guscio di noce del materiale vaioloso prelevato da un malato di vaiolo leggero, pungevano in due o tre punti la cute con un ago intriso di questo pus di un vaioloso. Il soggetto inoculato sviluppava, in ottava giornata dall'inoculazione, una febbre che durava due o tre giorni; nel punto di inoculazione si formava una pustola e successivamente rimaneva una cicatrice.

Questa procedura era una salvaguardia per il soggetto dal terribile vaiolo. Più precisamente questa metodica fu chiamata la variolizzazione o vaiolizzazione, o inoculazione (innesto citato da Giuseppe Parini). Lady Montagu, certa e preoccupata del vaiolo che aveva un esito letale specie nell'infanzia, fece variolizzare dal medico scozzese Charles Maitland, che era al seguito dell'ambasciata inglese, prima il suo figlioletto Edward, successivamente sua figlia senza complicazioni e con ottimo risultato della profilassi antivaiolosa.

Lo stesso dott. Maitland sarà promotore in Inghilterra della vaiolizzazione. Sempre per questa profilassi sono da ricordare due medici, di origine italiana, Emanuele Timoni e Jacopo Pilarino. Emanuele Timoni era un dragomanno. I dragomanni erano figure importanti nei rapporti con l'Oriente, conoscevano molte lingue, usi, costumi e cultura del Paese dove operavano. Erano persone colte, spesso laureati, prevalentemente di origine italiana,

provenienti dalle due maggiori Repubbliche Marinare di Genova e Venezia. Emanuele Timoni di famiglia genovese, era il primo dragomanno dell'ambasciata inglese a Costantinopoli, si era altresì laureato in Medicina a Padova. Era a conoscenza della vaiolizzazione e credeva alla sua efficacia. Per informare, anche la comunità scientifica, aveva inviato nel 1714 una lettera in latino sulla vaiolizzazione alla Royal Society, che fu pubblicata nella *Philosophical Transaction*, descrivendo, minuziosamente, come questo metodo avesse avuto successo nella profilassi del vaiolo.

Della stessa opinione era un altro medico, Jacopo Pilarino, di origine veneta, che si trovava a Smirne e che condivideva l'uso e il vantaggioso successo di questa metodica nella prevenzione del vaiolo, come scrisse nel 1715 in "*Nova e Tuta Variolas Excitandi*" per *Transplantationem Methodus*.

"Lady Mary" tornata in Inghilterra si fece promotrice insieme al dott. Charles Maitland della vaiolizzazione visto che una epidemia di vaiolo nel 1721 aveva colpito il Regno Unito e la sua colonia del Massachusetts. Anche la principessa di Galles Caroline de Ansbach amica ed estimatrice di Lady Montagu fece inoculare i suoi figli. Per sicurezza il medico reale Hans Sloane prima fece inoculare 6 condannati a morte, che non ebbero nessuna conseguenza, salvandosi così non solo dal vaiolo ma dalla stessa condanna. Appena si diffuse la pratica della inoculazione si formarono due gruppi, uno *Wigh* favorevole, l'altro dei *Tory* contrario che denunciarono i rari casi di complicazioni e i decessi, sostenendo inoltre che si trattava di una pratica satanica, di origine orientale e femminile, definendo Lady Mary una sanguinaria viaggiatrice della Turchia.

Il binomio donne-scienza suscitò perplessità e spesso intolleranza anche perché era un metodo praticato da donne in oriente e proposto da una donna in occidente. I detrattori, i no vax esistevano

anche nel 1700, della vaiolizzazione non riportavano l'importanza di isolare, con norme igieniche, gli inoculati in quanto rappresentavano, per breve tempo, un contagio. I detrattori della metodica ne riportavano la pericolosità, alcuni casi di complicazioni e rari decessi.

In questa diatriba parteciparono matematici tra cui Charles Marie de la Condorcet in cui nella memoria dell'inoculazione del vaiolo scrisse "la natura ci decimava ora l'arte ci millesima". Nel 1761 vi sarà un periodo di riaffermazione dell'inoculazione sia da parte degli illuministi, come Voltaire e Giuseppe Parini, che nell'ode "favoloso innesto" inneggia "al *femminero merito*", anche Pietro Verri ne scriverà sul giornale "il Caffè".

Inoltre questa pratica verrà riaffermata sia in Inghilterra che successivamente da ogni parte del mondo medico illuminato. Lady Mary Montagu dal 1716, tornata da Costantinopoli, riiniziò a viaggiare in Europa ma la sua predilezione sarà sempre l'Italia, risiedendo a Venezia e Brescia a Loreto, dove recentemente è stata inaugurato con il suo nome una strada lungo il lago d'Iseo da lei particolarmente amato. Tornata a Londra per carcinoma mammario, Lady Montagu morì nel 1762. Lady Montagu con il suo accanito impegno e costanza nella lotta al vaiolo ci ha lasciato la speranza di un mondo migliore. Per approfondire gli argomenti sovraesposti è da segnalare il libro di Maria Teresa Giaveri "Lady Montagu e il Dragomanno" (ed. Neri Pozza).

Doveroso è citare Edward Jenner (Berkeley 1749-1823), padre dell'immunizzazione con il suo vaccino contro il vaiolo. Come medico osservò che contadini, contagiati dal vaiolo bovino, superata la malattia, non si ammalavano più del vaiolo umano. Nel 1796 iniettò materiale di una donna malata di vaiolo bovino ad un bambino di 8 anni e successivamente gli iniettò quello del vaiolo umano ed il virus non attecchì. Nel 1799 Luigi

Sacco, primario dell'Ospedale Maggiore di Milano, vaccinò sé stesso e cinque bambini, come aveva fatto Jenner, riscontrandone l'immunità per il vaiolo umano. La lotta al vaiolo, iniziata nei secoli scorsi, nel 1700 si riaccese grazie a Lady Montagu e a Medici illuminati, proseguì dal 1796 e che grazie alla vaccinazione di Jenner ottenne l'eradicazione mondiale del vaiolo comunicata dall'OMS nel 1980.

### *Florence Nightingale*

Florence Nightingale (Firenze 12 maggio 1820-Londra 13 agosto 1910). Nasce a Firenze, da cui deriva il proprio nome, appartenente a una famiglia benestante, appartenente alla borghesia britannica; il padre William le impartì lezioni di latino, greco, italiano, francese, tedesco, storia, filosofia e soprattutto matematica e statistica. Florence era profondamente cristiana; dalla sua adolescenza, si sentiva "chiamata da Dio" a servire le persone malate e indigenti e per questo espresse il desiderio, contro il volere della famiglia, di divenire infermiera. In quell'epoca la professione di infermiera era poco riconosciuta e stimata. Nel 1850 Florence si recò, frequentò, e si diplomò, come infermiera, presso l'ospedale per poveri, di Kaiserswerth presso Düsseldorf ammirata per l'elevata qualità dell'assistenza e cure mediche.

Prima di seguire Florence come infermiera in Crimea, è forse necessario parlare di questa guerra. La guerra di Crimea 1853-1856 fu un conflitto nato nella realtà tra la Russia che voleva invadere la Turchia, e come causa fittizia la divergenza fra Russia e Francia sul controllo dei luoghi santi della cristianità nel territorio ottomano. Questo conflitto impegnò la Russia contro la Turchia appoggiata da una coalizione formata da Regno Unito, Francia e Regno di Sardegna. Questa guerra terminata con la sconfitta della Russia costò la vita a 370mila militari che aggiunti ai civili giunse a un milione di morti anche per una epidemia di colera che si era sviluppata in quel periodo bellico.

Florence nel 1854 partì con 38 infermiere volontarie, da lei addestrate, per la Turchia facendo servizio nell'ospedale militare inglese presso Scutari. Qui trovò 10 mila soldati feriti in condizioni disumane di sporcizia, di contagi con malattie infettive e mancanza di attrezzature e peggio disinteresse per i feriti che non servivano a combattere. Riferì che l'alto tasso di mortalità del 42% tra questi soldati era per malattia, correlata all'inadeguatezza dell'assistenza, giungendo così ad affermare che "gli eserciti non erano decimati dalle battaglie ma dalle malattie". Interessante è un grafico di Minard del 1869 in cui la mortalità dell'esercito napoleonico in Russia fu più per congelamento che per scontro armato. In questa lotta Florence ebbe il contributo della stampa, nel Times, venne rappresentata come "la Signora della Lampada", l'angelo che anche di notte veglia e assiste i feriti. Da queste denunce iniziò la riforma della Sanità Militare Inglese. Attraverso l'applicazione di modelli matematici riuscì a dimostrare la fondatezza delle sue teorie che avrebbero portato ad una significativa riduzione dei tassi di mortalità e morbilità anche tra la popolazione civile. Questo suo metodo statistico può essere considerato uno dei primi esempi di applicazione assistenziale basata sull'evidenza scientifica. Questo eccezionale lavoro di statistica medica fu così importante che nel 1858 fu eletta membro della Statistical Society of England.

Florence formò anche le prime infermiere americane attraverso la formazione di Linda Richards. Nel 1872 Henry Dunant, ispirato dal lavoro della instancabile Florence, creò la Croce Rossa Internazionale. Nel 1883 la Regina Vittoria le conferì la Croce Rossa Reale. Morì nel 1910.

Florence ricevette sia in vita che in tutti gli anni seguenti numerose onorificenze per il continuo e appassionato impegno nella formazione infermieristica e nella creazione di una nuova sanità pubblica. Tra i numerosi

monumenti, in ricordo di Florence, sorti nelle varie Nazioni ricordiamo a Londra, Istanbul e Firenze nella Basilica di Santa Croce vi è una sua statua.

Infine, il personaggio di Florence Nightingale è stato portato diverse volte sullo schermo cinematografico e televisivo.

#### *La Regina Elena di Savoia*

A Cettigne, Reggia del Montenegro, l'8 gennaio 1873 nacque Jelena figlia di Nicola I Petrovic Njegos e di Milena Vukotich. A nove anni, Jelena fu iscritta ai corsi di studio per aristocratici presso il severo collegio di Smolnyl di San Pietroburgo. Le materie di studio comprendevano discipline umanistiche e artistiche, la conoscenza delle lingue e rigide regole per essere pronte ad essere mogli di uomini potenti. Lasciato il collegio nel 1890 Jelena tornò a Cettigne, dove, sempre amando la natura, si appassionò a cognizioni ed esperienze mediche, quasi tutte empiriche, tratte da usi popolari montenegrini. In Italia da Umberto I di Savoia e Margherita, cugini di primo grado, nacque a Napoli nel 1869 Vittorio Emanuele futuro re d'Italia. Su consiglio di Francesco Crispi, di etnia albanese, si pensò, come progetto eugenetico-dinastico, di far sposare Jelena di Montenegro con Vittorio Emanuele. Il matrimonio si celebrò a Roma nel 1896. Con il regicidio nel 1900 di Umberto I di Savoia salì al Regno d'Italia il figlio Vittorio Emanuele III, divenendone Regina la sposa Elena che abbandonò il suo precedente nome di Jelena. La regina Elena si dedicò alla cura dei malati e alla loro assistenza, manifestando un particolare interesse per la Medicina e la salute, promovendo opere ospedaliere e soccorso medico anche in situazioni di emergenza, come nel terremoto di Messina del 1908 che uccise tra 50 e 100 mila abitanti tra Sicilia e Calabria. Nella Prima Guerra Mondiale 1915-1918 la regina Elena trasformò il Quirinale in un ospedale da campo che accoglieva soldati mutilati che necessitavano di una riabilitazione. La Prima Guerra Mondiale era costata 16 milioni di



morti per i militari e circa 21 milioni di feriti e mutilati. Inoltre, proprio presso il termine di questa terribile guerra si propagò una pandemia influenzale detta “spagnola” che portò a morte 50 milioni di persone, principalmente giovani.

Infine, si presentò una malattia virale che è rimasta sconosciuta che colpiva il cervello, detta anche per la sua sintomatologia encefalite letargica simile alla malattia del sonno. Un neurologo viennese Constantin von Economo si interessò e studiò questa nuova malattia che costò 5 milioni di morti e con gravissime complicazioni successive; scrisse un articolo scientifico “*Die Encephalitis lethargica*” in cui descrisse questo quadro morboso con sonnolenza quasi da giungere al coma che fu denominata encefalite letargica di von Economo. Questa malattia ignota per la sua capacità di sconvolgere il corpo e mutare la mente dai postumi devastanti come il parkinsonismo post-encefalico è tuttora uno degli enigmi più indecifrabili nella storia della Medicina. La Medicina dell’epoca sembrava impotente a darne una terapia. Tenendo presente quello che diceva il filosofo Rudolf Steiner “per ogni malattia esiste una pianta che ne rappresenta la cura”.

La regina Elena venuta a conoscenza che in Bulgaria, nel 1922, un raccoglitore di erbe e guaritore Ivan Raev aveva ottenuto ottimi risultati sui postumi dell’encefalite letargica con un decotto di radici di atropa belladonna che in bulgaro viene chiamata “*staro bilè*”, vecchia erba o anche “*ludo bilè*”, erba pazza, si adoperò tenacemente con la consulenza di illustri medici di introdurre in Italia questa terapia per l’encefalite letargica e i suoi invalidanti postumi.

L’atropa (Atropo inflessibile era una delle tre moire o parche con la cesoia per interrompere la vita) belladonna o solano sonnifero pianta appartenente alle solanacee con proprietà sia venefiche che inebrianti; anche il nome belladonna deriva forse

dall’abitudine delle donne veneziane di cospargere il volto con un suo infuso, rendendo gli occhi femminili più luminosi e sognanti; nel francese medioevale “*belle femme*” indicava le streghe che ne facevano uso. Inoltre, la midriasi che provoca ha permesso indagini e interventi oculari. Questa terapia fu chiamata “cura bulgara” o “cura della Regina”. La direzione medica, per questa terapia, fu affidata al professore Giuseppe Panegrossi, docente di Neuropatologia presso l’Università di Roma che in una accurata relazione sulla encefalite letargica descrisse la fase infettiva dominata dalla fase infiammatoria e la fase cronica in cui predominavano i fenomeni degenerativi. Visto l’aumentare dei pazienti che richiedevano la terapia e successiva assistenza, su interessamento della regina Elena si aprì una sezione presso il VI padiglione del Policlinico Umberto I con annesso laboratorio dove avveniva la preparazione dell’estratto di radici di belladonna che venivano distribuite dalla ditta Molteni sia per gli ospedali italiani che esteri. Per l’aumentare dei pazienti encefalitici si aprì l’Istituto Provinciale per encefalitici Regina Elena presso la nuova sede di Monteverde in via di Villa Pamphili n. 88. L’impegno continuo e operoso della regina Elena ottenne il suo successo con il Decreto Legge n. 2043 dell’ottobre 1936, in cui il cosiddetto *decotto della regina*, avallato dalle principali autorità cliniche e mediche, fosse reso obbligatorio per l’assistenza e la cura degli affetti da forme di parkinsonismo encefalitico.

La regina Elena proseguì per tutta la sua vita il suo impegno contro le malattie, promosse iniziative per la formazione ed aggiornamento professionale dei medici ed operatori sanitari per la ricerca contro la poliomielite, per il Parkinson e soprattutto contro il cancro.

La regina Elena morì, in esilio, nel 1952 a Montpellier.

Per approfondire i precedenti argomenti è da leggere il libro di Paolo Mazzarello *“L’Erba della Regina. Storia di un decotto miracoloso”* (ed. Bollati Boringhieri). Infine è da ricordare il libro *“Risvegli”* di Oliver Sacks che ci descrive lo stato catatonico dei sopravvissuti all’encefalite letargica che lasciava le vittime in una condizione simile ad una statua senza parole e immobili.

### **Conclusioni**

Ogni donna si è sempre occupata della cura della famiglia e del prossimo per mantenerne la loro piena salute. Si è cercato attraverso la biografia di tre donne, non medico, in tre secoli diversi ‘700, ‘800 e ‘900, di descrivere come il loro intuito e forte impegno, in tutta la loro vita, sia servito alla prevenzione e terapia di diversi e gravi eventi morbosi, anche coadiuvate da medici illuminati. Le tre figure femminili sono in stretta simbiosi tra loro, anche in secoli diversi, volte alla realizzazione dello stesso scopo. Pensiamo a Lady Mary impegnata nella prevenzione del vaiolo, derivata dalla Medicina popolare orientale, che si collega con la *“cura bulgara”* con *atropa belladonna* della regina Elena per l’encefalite letargica e suoi postumi, e come il nursing di Florence Nightingale sia parte integrante del trattamento del parkinsonismo postencefalitico. Proprio a

questi malati, grazie all’acquisizione di queste terapie e trattamenti, è stata risparmiata la soppressione, nelle camere a gas naziste, non essendo soggetti utili alla società.

Termino con la Laurea Honoris Causa del 27 maggio 1940 conferita dalla Facoltà di Medicina dell’Università di Roma “La Sapienza” alla regina Elena: nella motivazione erano ricordate le benemeritenze umanitarie, le sue iniziative sanitarie, la promozione dell’assistenza infermieristica e l’attuazione in Italia di un metodo terapeutico che, con fine intuito, concepì per le desolanti conseguenze di una fra le più gravi malattie, l’encefalite letargica epidemica, la cura del parkinsonismo postencefalitico.

Questa laurea *“Honoris Causa”* è un riconoscimento a tutte le donne che con la loro intuizione e impegno hanno contribuito alla salvaguardia della salute della collettività nei secoli passati, nel presente e nel futuro.

Prof. Roberto Russo, già Professore Associato Cattedra di Clinica Ostetrica Ginecologica, “Sapienza” Università di Roma

Per la corrispondenza: r-russo@libero.it

---

**Premio Giovanni Maria Lancisi - Anno Accademico 2020-2021**

***Tesi di Laurea: “Personalized targeted therapy in diffuse intrinsic pontine glioma” (Sintesi)***

**Autore: A. Ceccarelli**

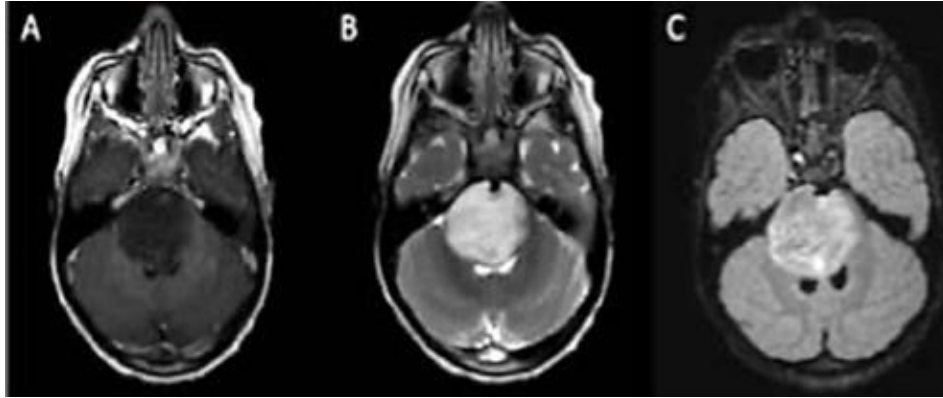
**Relatore: E. Ferretti**

**Correlatore: A. Mastronuzzi**

Diffuse Intrinsic Pontine Glioma (DIPG) is a highly aggressive paediatric brainstem tumour, with a yearly incidence of 2.32 per 1.000.000, no gender predilection and a median age at diagnosis of 6-9 years. Less than 10% of DIPG patients survive for 2 years, with a median overall survival of 9-12 months. Due to the anatomical location and the diffusely infiltrative nature of the tumour, current treatment options are limited and progress towards clinical improvement has been stationary throughout the last four decades. Until recently, a paucity of tissue samples to study led to a lack of understanding of the underlying molecular components of these tumours. Focal radiation therapy is the current standard-of-care for children with newly diagnosed DIPG. Nevertheless, this treatment provides significant but only temporary efficiency delaying tumour progression (Donaldson et al., 2006). Often alongside the radiotherapy, some forms of chemotherapy are provided in the context of a clinical trial to improve outcome, but no chemotherapeutic agent has demonstrated significant efficacy. Patients with DIPG can present with a wide variety and usually with an acute onset of

neurological symptoms and signs reflecting the anatomic localization and the extent of the lesion. Commonly reported symptoms include abnormal or limited eye movements, diplopia, facial asymmetry, clumsiness, disturbance of gait and loss of balance, and weakness. Symptoms are usually of rapid onset with short duration (1-2 months) prior to diagnosis. Cranial nerves VI and VII are the most affected and specific dysfunction of these is characteristic of DIPG.

The diagnosis of DIPG is based on typical clinical presentation and characteristic neuroimaging findings. MRI is the imaging modality of choice for diagnosis. On MRI, DIPGs demonstrate T1-hypointensity and hyperintensity on T2-weighted images, generally without contrast enhancement, and frequently appear relatively homogeneous on fluid attenuated inversion recovery (FLAIR) sequences. Contrast-enhancement is variable, but these lesions frequently do not significantly enhance at diagnosis. On imaging, the tumour core is centred in the pons and diffusely involves most of its axial diameter (Fig. 1).



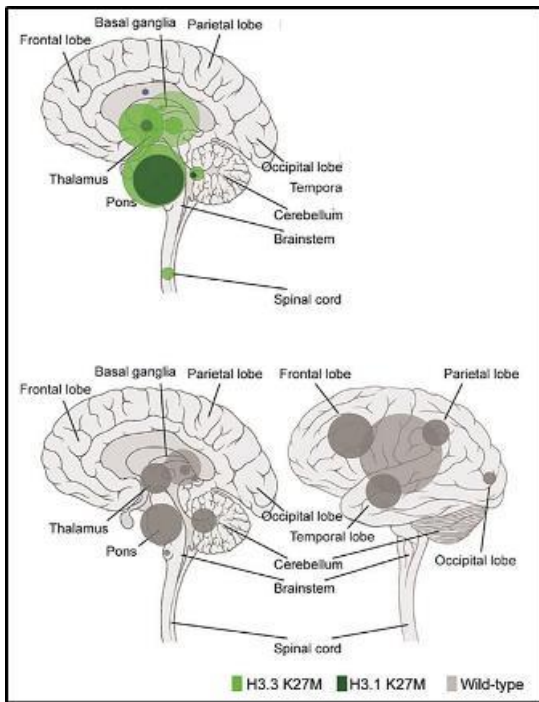
**Fig. 1.** MRI appearance of DIPG. A: T1-weighted post contrast. B: T2-weighted. Brainstem demonstrates a diffuse expansile hyperintense lesion in the pons. C: FLAIR. These tumours are surgically unresectable due to their poorly circumscribed border and eloquent location (Warren, 2012).

For decades, the role of neurosurgery in DIPG has been limited to evaluation and treatment of obstructive hydrocephalus from DIPG and rare biopsies for cases of uncertain diagnosis. However, with the improvements in the biological, molecular and genetic understanding of this disease, tissue acquisition, and therefore surgical biopsy, has developed an increasingly critical role. Developments in identification of potential treatment targets for these lesions, together with the increased safety of stereotactic brain stem biopsies, have helped move the field forward (Hamisch et al., 2017; Williams et al., 2020). Improvements in the safety and feasibility of brain stem biopsy have occurred coincident with improved understanding of DIPG biology. Stereotactic brainstem biopsy in all cases of newly diagnosed DIPG represents a means to better understand the disease and to characterize individual tumours based on molecular pathology in order to direct individualized treatment.

Recent studies have shed light on the molecular makeup of diffuse intrinsic pontine gliomas and identified the H3K27M mutation in nearly 80% of DIPGs, leading to the 2016 WHO classification of diffuse midline glioma H3K27M-mutant, a grade IV brain stem tumour. The histone mutation

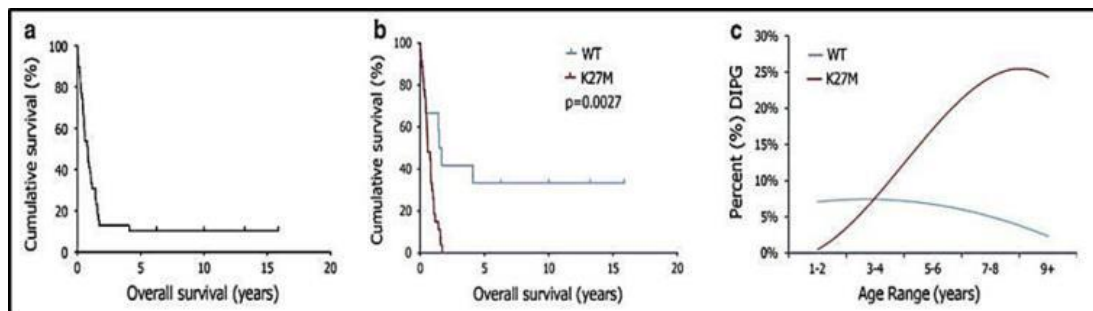
H3K27M results in the substitution of lysine with methionine at position 27 in the isoforms H3.1 and H3.3, encoded by genes HIST1H3B and H3F3A respectively (Wu et al., 2012). This substitution occurs at a critical position within the N-terminal histone tail submitted to regulatory post-translational modification associated with transcriptional repression (K27). This mutation leads to the loss of histone trimethylation, via inhibition of polycomb repressive complex 2 (PRC2), with global hypomethylation of the lysine at position 27 of the H3 protein (H3K27), ultimately producing epigenetic silencing and dysregulation of gene expression (Bender et al., 2013).

There are subtle differences between the histone mutations in H3.1 and H3.3, particularly regarding survival, phenotype, and clinical outcomes (Castel et al., 2015; Khuong-Quang et al., 2012). K27M-H3.1 mutations are specific to the pons with a significantly longer survival (median 15.0 months), whereas K27M-H3.3 are found alongside midline structures *i.e.* pons, thalamus and spinal cord (Mackay et al., 2017) (Fig. 2). Patients who harbor the K27M- H3.3 mutation have worse overall survival in comparison with other H3 wild-type cases (Khuong-Quang et al., 2012) (Fig. 3).

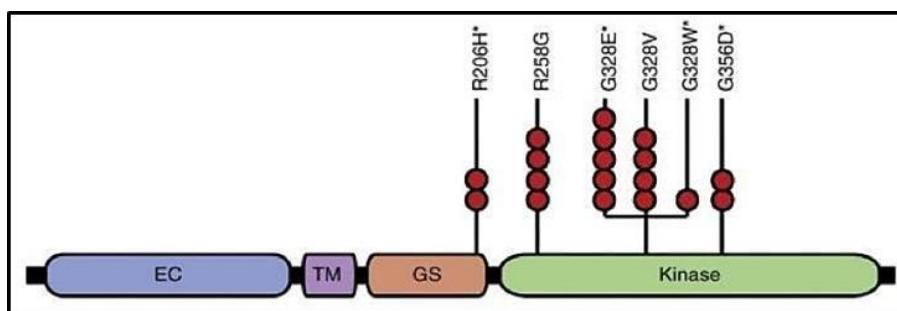


**Fig. 2.** Anatomical location of H3K27M mutations and histone wild type. H3-K27M mutations are found exclusively into the pons, midline structures and spinal cord (Mackay et al., 2017).

In addition, clonal missense ACVR1 mutations were found exclusively in DIPGs (32%) and co-segregate with H3.1 (Wu et al., 2014). ACVR1 gene encodes a bone morphogenetic protein (BMP) type I receptor and ACVR1 mutations in DIPG activate BMP signaling. ACVR1 mutations cause a constitutive ligand-independent activation of the TGF $\beta$ /BMP signaling pathway, resulting in increased levels of SMAD phosphorylation, as well as overexpression of downstream targets ID1 and ID2 (Buczkwicz et al., 2014; Wu et al., 2014). All the ACVR1 residues affected by mutation in DIPGs clustered around either the inhibitory glycine-serine-rich (GS) domain or the ATP-binding pocket of the kinase domain and would be expected to shift the kinase to an active conformation (Wu et al., 2014) (Fig. 4).



**Fig. 3.** K27M-H3.3 is associated with worse overall survival and higher age of diagnosis in DIPG. a) Kaplan–Meier curve of overall survival for all DIPG patients. b) DIPG patients with K27M-H3.3 mutation have worse overall survival compared to patients wild-type for this histone as determined by Kaplan–Meier analysis. c) Age distribution of DIPG patients based on K27M-H3.3 mutational status (Khuong-Quang et al., 2012).



**Fig. 4.** Missense ACVR1 substitutions in DIPG were clustered in the GS or kinase domains. Each red circle indicates a DIPG carrying the specified alteration (Wu et al., 2014).

The standard of care of newly diagnosed DIPG patients is focal radiation therapy (RT), using a 1 cm margin to cover microscopic disease, to a total dose of 54 Gy administered over 6 weeks, usually in daily 1.8-2 Gy fractions. Glucocorticoids are frequently prescribed at the time of diagnosis to reduce and control edema associated with the tumour and radiation treatment. While high-dose steroids offer early relief, their adverse effect profile, including impaired sleep, wound healing, behavior, and endocrine and metabolic functional effects, limits their long-term utility (Curtis et al., 2006). Although large numbers of therapeutic approaches have been tested, no significant progress has been made in treating these high-grade gliomas. Therefore, the identification of new specific targeted therapies is of great importance for innovative and effective treatments.

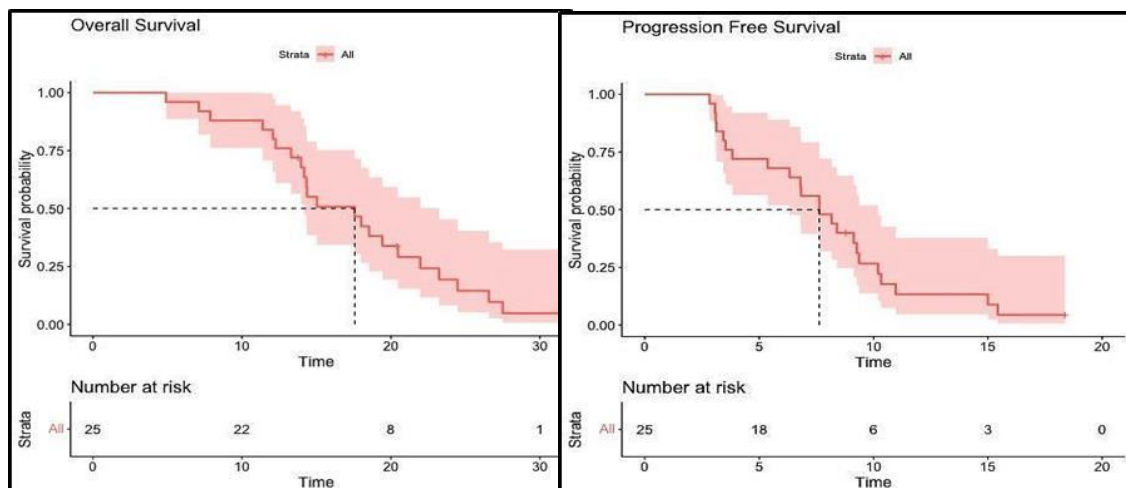
In this context, the aim of my thesis was to evaluate molecular aspects and heterogeneity, in a cohort of DIPGs patients, and to use this information for the choice of a personalized targeted therapy. The goal of this study was to assess the overall survival and progression-free survival of children with DIPGs receiving a personalized approach with molecularly targeted agents based on tumour molecular profiling. The study retrospectively identified a cohort of 25 patients treated at Bambino Gesù Children's Hospital in Rome from 2014 to 2019, with a radiologic diagnosis of DIPG.

Treatment at diagnosis was focal radiotherapy (54 Gy administered in daily 1.8 Gy fractions 5 days a week) associated with systemic chemotherapy as by institutional guidelines based on Massimino et al (2014) indications. Second line treatment included heterogeneous patients-adapted administration regimens.

In order to design personalized treatments, potentially targetable alterations were screened using a combination of immunohistochemistry, Sanger sequencing and Next generation sequencing (NGS). The most frequently targetable mutations were mTOR/pmTOR pathway mutations known to increase sensitivity to mTOR inhibitors such as everolimus and activating ACVR1 mutations. Other potentially actionable alterations included BRAF mutation and a mutation of PDGFRA known to increase sensitivity to kinase inhibitors such as pazopanib.

Guided by comprehensive molecular profiling on tumour tissue, 9/25 patients were subjected to personalized treatment at primary diagnosis (1/9) and at disease progression and received backbone therapy including focal irradiation. Personalized treatments included inhibition of the mTOR pathway, immunotherapy, retinoic receptor agonist, receptor tyrosine kinase inhibition.

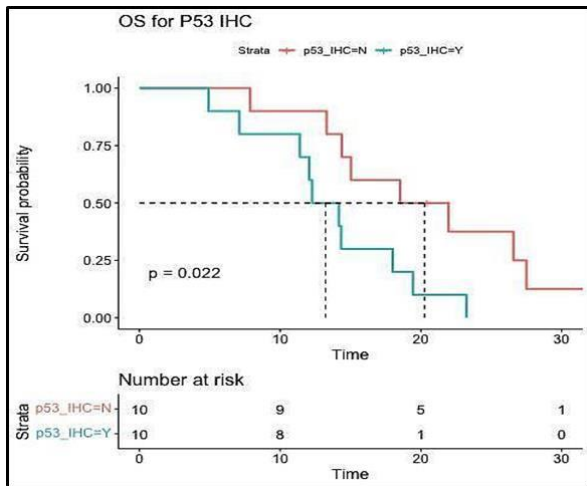
Median overall survival (OS) of the whole cohort was 17.6 months whereas median progression free survival (PFS) was 7.63 months (Fig. 5).



**Fig. 5.** PFS and OS curves for the whole cohort.

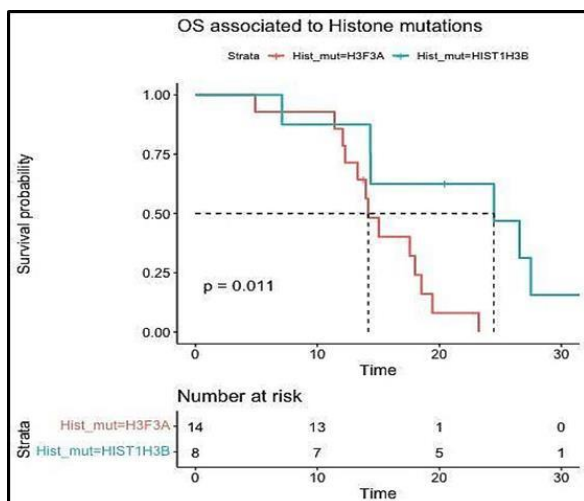


We found a significant association between TP53 staining and OS. Patients with positive TP53 staining (> 50%) showed a significant ( $p= 0.022$ ) shorter overall survival (HR=3.15 CI:1.123-8.834) as shown in Figure 6. Median survival for patients with positive immunostaining of TP53 was 13.2 months versus 20.2 months median survival for patients with  $p53 < 50\%$ .



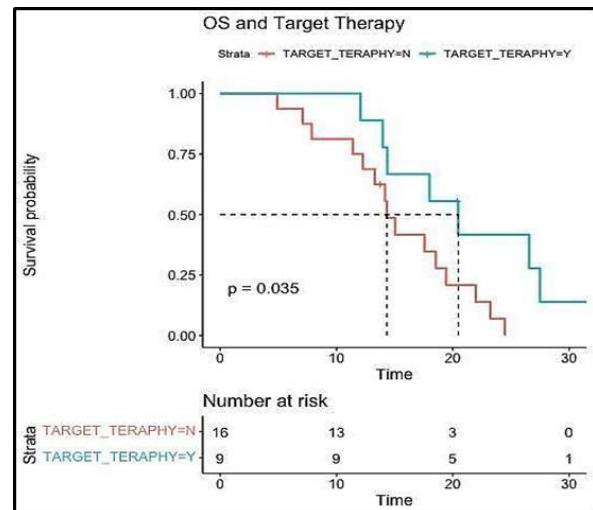
**Fig. 6.** TP53 immunostaining (> 50%) is associated with OS.

Similarly, we confirmed in our cohort that H3F3A mutation confers worst survival. Patients harboring H3F3A mutations had a median OS of 14.2 months versus a median of 24.5 months for patients with mutations in HIST1H3B (HR: 3.41 CI:1.231-9.443,  $p= 0.01$ ) (Fig. 7).



**Fig. 7.** Histone modifications are associated with OS. H3F3A mutation is related to shorter survival compared to HIST1H3B mutation ( $p=0.01$ ).

Then, we evaluated the potential impact of personalized treatment approaches on survival compared to the control group. Kaplan-Meier survival analysis revealed significantly better overall survival for patients treated with targeted therapies versus control group with a median survival of 20.05 vs 14.3 months. The difference in survival was significant ( $p= 0.03$ ) with an HR=0.345 (CI:0.1236-0.9667) (Fig. 8).



**Fig. 8.** Kaplan-Meier curves showing difference in survival of patients receiving personalized treatment and control cohort. OS, overall survival. Patients treated with targeted treatment had better survival (blue curve) than patients treated with standard of care (control group) (red curve) ( $p=0.03$ ).

Major limitations of the study were reduced patient number, non-prospective design of the study and heterogeneity of population in terms of molecular biology and treatments.

Overall, this study details the institutional experience at Bambino Gesù Children's Hospital performing personalized targeted approaches in paediatric neuro-oncology patients. We highlighted the feasibility of genomic profiling in both the primary and recurrent disease setting. Moreover, we presented the significant impact this testing is having on the identification of potential actionable molecular alterations and the improved patient outcome through a personalized approach in H3K27M gliomas.

Based on the results described in our study, we propose to consider biopsy in all patients with DIPG at diagnosis, in order to detect potential molecular drivers alterations that can be targetable and, subsequently, to add personalized agents in first-line treatment in DIPG patients along with the backbone treatment. We envision that this testing will serve as the basis for future clinical trials of personalized targeted therapy, leading to improved outcomes for children with brain tumours.

Nevertheless, large series and future clinical trials are needed to validate these interesting data.

#### REFERENCE BIBLIOGRAPHY

- Bender S, Tang Y, Lindroth AM, et al. Reduced H3K27me3 and DNA hypomethylation are major drivers of gene expression in K27M mutant pediatric high-grade gliomas. *Cancer Cell* 2013; 24: 660-72.
- Buczkwicz P, Hoeman C, Rakopoulos P, et al. Genomic analysis of diffuse intrinsic pontine gliomas identifies three molecular subgroups and recurrent activating ACVR1 mutations. *Nat Genet* 2014; 46: 451.
- Castel D, Philippe C, Calmon R, et al. Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathol* 2015; 130: 815-27.
- Curtis JR, Westfall AO, Allison J, et al. Population-based assessment of adverse events associated with long-term glucocorticoid use. *Arthritis Rheum* 2006; 55: 420-6.
- Donaldson SS, Laningham F, Fisher PG. Advances toward an understanding of brainstem gliomas. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1266-72.
- Hamisch C, Kickingeder P, Fischer M, Simon T, Ruge MI. Update on the diagnostic value and safety of stereotactic biopsy for pediatric brainstem tumors: a systematic review and meta-analysis of 735 cases. *J Neurosurg Pediatr* 2017; 20: 261-8.
- Khuong-Quang DA, Buczkwicz P, Rakopoulos P, et al. (2012). K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol* 2012; 124: 439-47.
- Mackay A, Burford A, Carvalho D, et al. Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell* 2017; 32: 520-37e5.
- Massimino M, Bode U, Biassoni V, Fleischhack G. Nimotuzumab for pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Expert Opin Biol Ther* 2011; 11: 247-56.
- Warren KE. Diffuse intrinsic pontine glioma: poised for progress. *Front Oncol* 2012; 2: 205.
- Warren KE, Killian K, Suuriniemi M, Wang Y, Quezado M, Meltzer PS. Genomic aberrations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Neuro Oncol* 2012; 14: 326-32.
- Williams JR, Young CC, Vitanza NA, et al. Progress in diffuse intrinsic pontine glioma: advocating for stereotactic biopsy in the standard of care. *Neurosurg Focus* 2020; 48: E4.
- Wu G, Broniscer A, McEachron TA, et al. Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat Genet* 2012; 44: 251-3.
- Wu G, Diaz AK, Paugh BS, et al. The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nat Genet* 2014; 46: 444-50.

Sintesi della Tesi di Laurea discussa il 28 giugno 2021

Dott.ssa Anna Ceccarelli, Facoltà di Farmacia e Medicina, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia, "Sapienza" Università di Roma

Prof.ssa Elisabetta Ferretti, Facoltà di Farmacia e Medicina, Dipartimento di Medicina Sperimentale, "Sapienza" Università di Roma

Dott.ssa Angela Mastronuzzi, Responsabile Unità di Neuro-Oncologia Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

Per la corrispondenza:  
annaceccarelli818@gmail.com



# **Tesi di Laurea: “Combined physiological and biochemical approach for the prediction of abdominal aortic aneurysm growth in humans” (Sintesi)**

**Autore: P. Lapolla**

**Relatore: A. Mingoli**

**Correlatore: R. Lee**

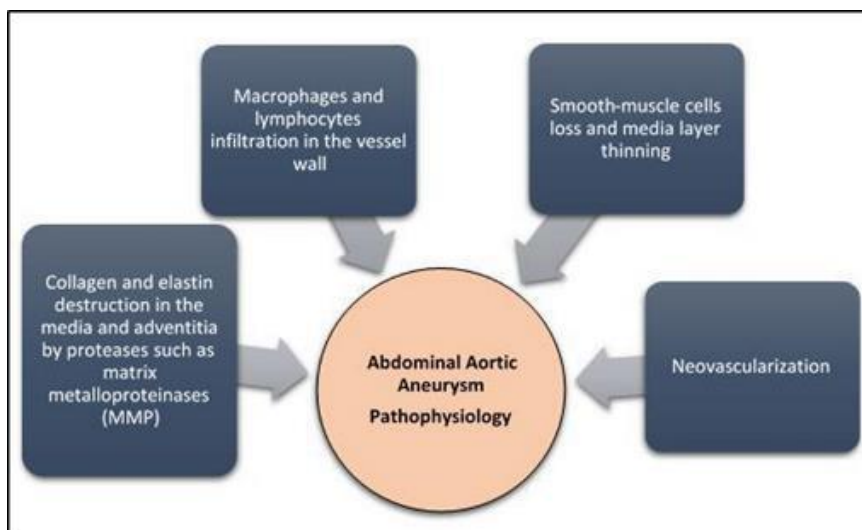
## **Introduzione**

Gli aneurismi dell'aorta addominale (AAA) sono dilatazioni segmentali anormali permanenti dell'aorta addominale che coinvolgono tutti e tre gli strati della parete aortica in modo tale che il diametro del vaso sia >30 mm o più del 50% più grande della dimensione normale (14-30 mm)<sup>1, 2, 3</sup>. AAA è una patologia comune circa tre volte più negli uomini che nelle donne ed è stimato che la prevalenza di pazienti asintomatici di età >60 anni sia del 4-8% negli uomini e dello 0,5-1,5% nelle donne e che il fattore di rischio aumenta con l'età<sup>4</sup>. La mortalità dell'AAA aumenta proporzionalmente all'aumento dell'aspettativa di vita osservato nei paesi sviluppati. Se non si interviene, gli AAA crescono progressivamente con una conseguente rottura degli stessi. Questo è associato ad un'elevata mortalità e ad un'elevata morbilità. La rottura dell'AAA provoca 6.000 decessi ogni anno nel Regno Unito e circa 200.000 casi in tutto il mondo. I fattori di rischio includono il fumo di sigaretta, il sesso maschile e la storia familiare di AAA<sup>5</sup>. In genere, gli AAA sono una condizione altamente letale (mortalità 85-90%), sono asintomatici e precedono la rottura (RAAA). Infatti, dei pazienti che raggiungono l'ospedale, solo il 50-70% sopravvive. Gli AAA si trovano tra il diaframma e la biforcazione aortica. Se gli AAA coinvolgono l'origine delle arterie viscerali, sono classificati come surrenali, se coinvolgono le origini delle arterie renali come iuxtarenali e infrarenali se iniziano al di sotto delle arterie renali. Più cefalico è

l'aneurisma, più complessa è la riparazione. Circa l'85% degli AAA sono infrarenali, e spesso coinvolgono le arterie iliache comuni<sup>1</sup>.

## **Patofisiologia**

La formazione dell'AAA è caratterizzata dall'indebolimento dello strato mediale in una grande arteria di conduttanza ricca di matrice come l'aorta, che coinvolge progressivamente tutti gli strati della parete del vaso. Questo distinto processo degenerativo include lo stato di infiammazione cronica e la degradazione della matrice extracellulare (ECM) da parte del processo mediato dalla proteasi (Fig. 1)<sup>6, 7</sup>. È stato osservato che il processo infiammatorio dell'AAA comporta l'infiltrazione di macrofagi<sup>8-10</sup>, linfociti<sup>11, 12</sup>, neutrofili<sup>13-17</sup>, e mastociti<sup>18</sup> che svolgono un ruolo critico nella formazione e crescita dell'AAA. È stato dimostrato che l'aumento dell'attività delle proteasi come le metalloproteinasi della matrice (MMP) e le catepsine, che sono tipicamente inattive in uno stato fisiologico, è associato all'infiammazione aortica cronica, al rimodellamento del tessuto aortico e alla progressione dell'AAA. Questo processo degenerativo porta a un ridotto turnover della nuova ECM a causa dell'apoptosi delle cellule muscolari lisce vascolari (VSMC), della degenerazione della ECM, della perdita di elastina e della disregolazione nella sintesi del collagene (Fig. 1)<sup>6, 7</sup>. Inoltre, componenti del sangue come piastrine, neutrofili, plasmina e proteasi della trombina contribuiscono allo



**Fig. 1.** Rappresentazione schematica della Fisiopatologia dell'AAA e del relativo processo infiammatorio.

stato infiammatorio nella formazione di AAA. Tuttavia, i meccanismi fisiopatologici a livello molecolare devono essere chiariti per comprendere appieno la patogenesi della formazione di AAA, che è un processo multifattoriale<sup>19-22</sup>. I fattori di rischio non modificabili dell'AAA comprendono il sesso maschile, l'età avanzata e una storia familiare di AAA<sup>23</sup>. L'incidenza dell'AAA aumenta significativamente ogni decennio per gli uomini di età superiore ai 50 anni e per le donne di età compresa tra 60 e 70 anni<sup>24</sup>. Il rapporto di rischio è stimato quattro volte superiore negli uomini rispetto alle donne e quattro volte superiore nei soggetti con storia familiare di AAA rispetto a quelli privi di rischio<sup>23</sup>. Per quanto riguarda i fattori di rischio modificabili, il fumo è il più significativo<sup>23, 25, 26</sup>. Altri fattori di rischio includono preesistente malattia occlusiva aterosclerotica, ipercolesterolemia, obesità e ipertensione<sup>23</sup>. L'etnia caucasica è la più colpita, seguita da neri, asiatici e ispanici<sup>23, 27</sup>. La riduzione del rischio di AAA è associata al diabete mellito di tipo II e allo stile di vita, che consiste in un regolare esercizio fisico e una dieta sana<sup>23, 28</sup>. Lo sviluppo di AAA è associato ad altri fattori di rischio per malattie cardiovascolari, come la malattia coronarica (CAD), la malattia cerebrovascolare e arteriosa periferica (PAD)<sup>29</sup>.

### **Trattamento**

A seconda di diversi fattori, tra cui la dimensione dell'aneurisma, che ha una soglia di 55 mm negli uomini e 50 mm nelle donne, la posizione e le comorbidità, l'intervento di riparazione dell'aneurisma comprende due approcci: la Riparazione chirurgica aperta (Open Surgical Repair, OSR) eseguita dal 1950 o la Riparazione endovascolare (Endovascular aneurysm repair, EVAR), eseguita dal 1987, i quali risultano essere gli interventi attualmente raccomandati (Fig. 2)<sup>30, 31</sup>. Per quanto riguarda il primo approccio di intervento (OSR), la durata media della degenza negli ospedali è di nove giorni e il completo recupero richiede settimane o mesi. La procedura OSR consiste in un'incisione addominale o sul fianco, il monitoraggio dei



**Fig. 2.** Procedura di riparazione chirurgica dell'AAA con approccio aperto (Open Surgical Repair OSR).

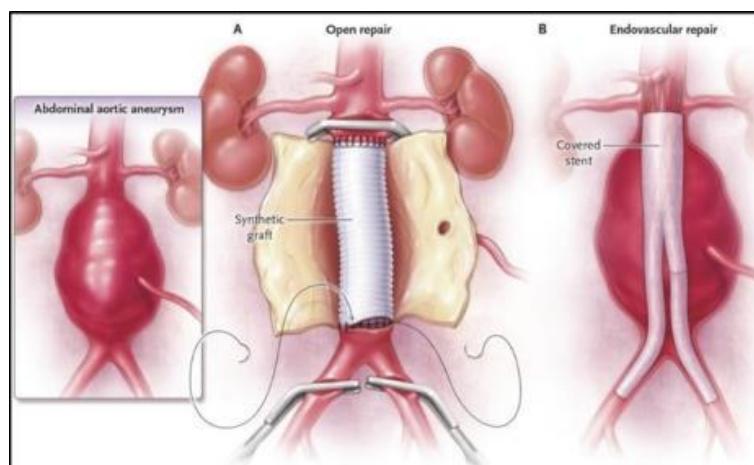
vasi sopra e sotto l'AAA, l'incisione del sacco dell'aneurisma e il posizionamento di un innesto sintetico (Fig. 2)<sup>1</sup>. La mortalità a 30 giorni dell'OSR è stimata tra il 4% e il 5% e riportata fino al 2%.

La riparazione endovascolare (EVAR) può essere eseguita per via percutanea in anestesia locale. In questo caso la durata media della degenza negli ospedali è di tre giorni e la completa guarigione può variare da giorni a settimane. La mortalità a 30 giorni si riduce all'1%. EVAR è una procedura meno invasiva, ossia uno stent coperto viene inserito come un manicotto nello spazio intraluminale attraverso le arterie femorale e iliaca; dunque passa attraverso il sacco dell'aneurisma e si colloca nel vero lume dell'aorta. È ancorato al tessuto

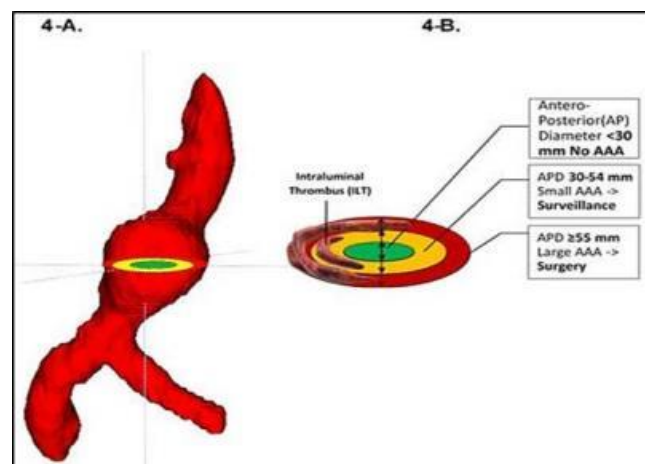
aortico sano sopra l'aneurisma e nelle arterie iliache sotto (Fig. 3, B)<sup>1</sup>.

L'approccio EVAR richiede che il paziente abbia la morfologia anatomica appropriata dei vasi (Fig. 4 A, B). Ciò comprende una dimensione adeguata e sufficiente dei vasi iliaci per consentire l'inserimento dell'innesto e un collo aortico adeguato tale da permettere l'ancoraggio dell'innesto prossimale risparmiando le arterie renali. Pertanto, si evita questo approccio in caso di aneurisma infrarenale dovuto a limitazioni anatomiche<sup>1</sup>.

A causa della natura non invasiva dello stent, il mercato degli innesti stent aortici dovrebbe superare i 3,7 miliardi di dollari entro il 2024<sup>32</sup>.



**Fig. 3.** Interventi per AAA; 3A. Riparazione chirurgica approccio aperto (Open Surgical Repair OSR); 3B. Riparazione Endovascolare (EVAR). Kent KC. Clinical practice. Abdominal aortic aneurysms. N Engl J Med 2014; 371: 22.

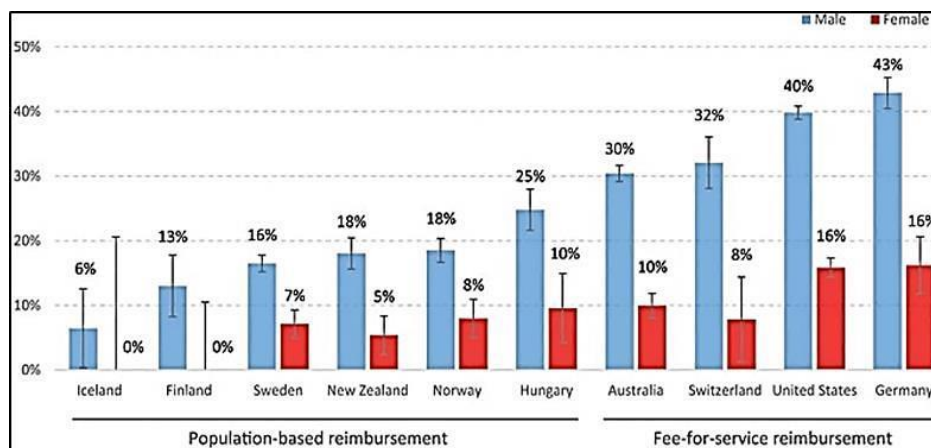


**Fig. 4.** Rappresentazione 3D acquisita da scansione TAC addominale di paziente affetto da AAA (il software ITK-Snap è stato utilizzato per la segmentazione ed elaborazione dell'immagine); 4B Rappresentazione grafica del trombo intraluminale (ILT) e delle soglie di dimensione AAA per l'intervento di riparazione chirurgica dell'aneurisma.

### Screening e follow-up

Sono state osservate variazioni significative nella gestione dell'AAA tra i paesi che possono essere guidate da incentivi finanziari (Fig. 5)<sup>6</sup>. Piccoli AAA (< 55 mm, da 3,0 a 5,4 cm di diametro) devono essere monitorati e richiedono un'ecografia regolare per il follow up sulla crescita. Secondo la legge di Laplace, ad un diametro di AAA maggiore corrisponde una maggiore velocità di espansione. Le linee guida per la frequenza di sorveglianza dell'AAA raccomandano di monitorare ogni 3 anni aneurismi con un diametro da 3,0 a 3,4 cm; ogni anno per aneurismi da 3,5 a 4,4 cm; e ogni sei mesi per aneurismi da 4,5 a 5,4 cm<sup>33</sup>.

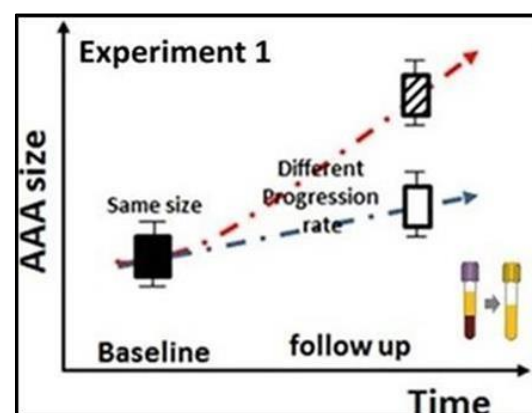
programma di screening dell'aneurisma aortico addominale del NHS (il "NAAASP"), nello specifico un programma di screening introdotto nel Regno Unito nel 2009 che invita gli uomini a sottoporsi a un'ecografia addominale (U/S) durante l'anno in cui compiono 65 anni e includendo gli Stati Uniti regolari una volta diagnosticata l'AAA<sup>35</sup>, non è coerente con le linee guida internazionali in quanto raccomandano scansioni più frequenti per la sorveglianza dell'AAA. Di conseguenza, molte di queste scansioni non sono necessarie e aumentano l'onere dei costi sui sistemi sanitari (~2.500 nuove diagnosi di AAA ogni anno nel SSN)<sup>36,37</sup>.



**Fig. 5.** Nei paesi con un sistema di assistenza sanitaria a pagamento, la percentuale di riparazione di AAA (33%) e gli ottuagenari sottoposti a riparazione AAA (25%) sono più elevati rispetto ai paesi con un modello di assistenza sanitaria gratuita o rimborso (intervento riparazione piccoli AAA 16%; ottuagenari 18%;  $P < 0,01$ ) (Beck AW et al., *Circulation* 2016).

Una meta-analisi che ha valutato il tasso di crescita e rottura eseguita su 15.000 pazienti affetti da AAA suggerisce che potrebbe essere sicuro avere un follow-up più lungo (anni) in un piccolo aneurisma, con un diametro inferiore a 4,0 cm<sup>34</sup>.

Tuttavia, gli AAA con la stessa dimensione iniziale progrediscono a un tasso di crescita diverso tra gli individui e i pazienti con AAA a crescita lenta richiedono una sorveglianza ecografica meno frequente rispetto agli AAA a crescita rapida (Fig. 6) e un approccio personalizzato per la valutazione dei singoli casi. Inoltre, il



**Fig. 6.** Tassi di progressione di AAA differenti al controllo follow-up in pazienti con la stessa dimensione iniziale (baseline). Lee R et al., *Ann Surg* 2020.

### **Intervalli di follow-up**

*SVS, ESVS, AHA, EHJ guidelines:*

- 3.5 - 4.4 cm – yearly scan
- 4.5 - 5.5 cm – biannual scan

*NHS AAA screening program:*

- 3.5 - 4.4 cm – yearly scan
- 4.5 - 5.5 cm – quarterly scan

Le evidenze suggeriscono che la maggior parte dei pazienti (~70%) con piccoli AAA (40-49 mm) svilupperanno una progressione della dimensione del diametro dell'AAA che alla fine richiederà un trattamento chirurgico entro 5 anni. Questo gruppo di pazienti che affrontano un ritardo nell'intervento hanno un rischio aumentato di eventi cardiovascolari e comportano comunque un rischio di rottura dell'1% all'anno, sebbene presentino un piccolo diametro dell'aneurisma<sup>38</sup>.

L'AAA può non presentare rotture nonostante raggiunga un diametro > 70 mm. Ciò suggerisce che la crescita dell'AAA non è lineare e progredisce a ritmi temporali diversi e rapporti diversi. Da una parte l'AAA può espandersi rapidamente o ad intervalli; dall'altra, l'AAA può rimanere stabile, mantenendo la stessa dimensione iniziale per molti anni durante i quali i pazienti possono decedere per diverse cause legate all'età<sup>39</sup>. Le attuali indicazioni possono portare a ritardi inutili in alcuni pazienti e ritardi indesiderati in altri<sup>40</sup>. Pertanto, vi è la necessità di migliorare la comprensione del meccanismo fisiopatologico che governa la formazione di AAA. Ciò aiuterà a trovare gli strumenti per predire la crescita dell'aneurisma che andranno a beneficio dei pazienti e della gestione clinica fornendo una stratificazione accurata, obiettiva e personalizzata dei pazienti per la frequenza di sorveglianza dell'AAA e la tempistica dell'intervento. Di conseguenza, può anche portare alla scoperta di nuovi bersagli terapeutici per la terapia medica definitiva.

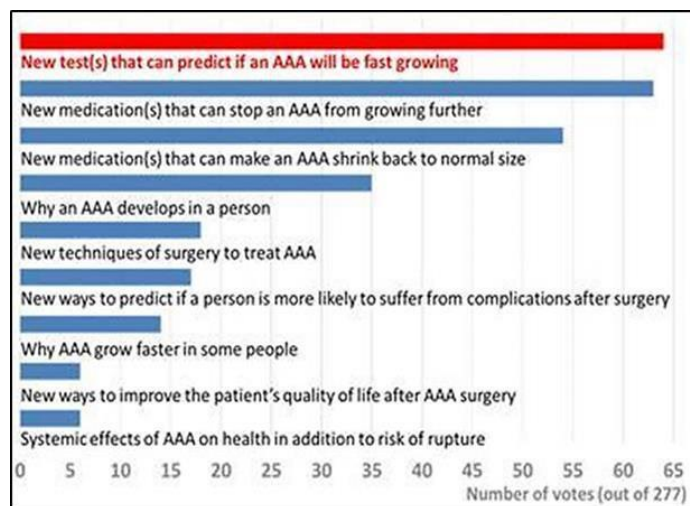
### **Oxford Abdominal Aortic Aneurysm (OxAAA) Study. Introduzione e contesto**

Diversi studi di ricerca sono stati condotti su modelli animali cercando di chiarire i processi che governano la formazione dell'AAA. Tuttavia, rimane la necessità di comprendere i meccanismi fisiopatologici della progressione dell'AAA nell'uomo. L'AAA è una patologia comune che provoca la rottura dell'aneurisma e un'elevata mortalità correlata ed è un'importante causa di morte in tutto il mondo. Secondo le attuali linee guida, la dimensione dell'aneurisma rimane il miglior criterio per valutare l'AAA per l'indicazione chirurgica. Questa è una chiara limitazione poiché il diametro dell'AAA non può predire un livello assoluto di crescita dell'AAA e il relativo rischio di rottura.

Pertanto, vi è la necessità di trovare nuovi metodi per la valutazione del rischio e la stratificazione dei pazienti. Gli esperimenti che ho condotto fanno parte dello studio OxAAA in corso (approvazione normativa; protocollo 4.0, 03.10.2020, Rif. etica 13/SC/0250). Questo progetto mira a chiarire la fisiopatologia alla base della progressione dell'aneurisma identificando nuovi biomarcatori della crescita dell'AAA. Lo studio OxAAA combina le informazioni dal profilo molecolare completo del sangue e dei tessuti AAA e dalla valutazione biomeccanica dell'albero vascolare centrale e periferico mediante imaging funzionale. L'obiettivo è identificare nuovi strumenti per predire la crescita dell'aneurisma e la stratificazione del rischio dei pazienti. Lo studio OxAAA è uno studio osservazionale prospettico di coorte a centro singolo su pazienti con diagnosi confermata di AAA.

Nel 2017 lo studio OxAAA ha condotto un'indagine in cui è stato chiesto alla comunità vascolare di esprimere la loro opinione in merito alla priorità della ricerca per l'aneurisma dell'aorta addominale di piccole dimensioni. "Lo sviluppo di nuovi test per prevedere la crescita dell'aneurisma" è emersa come una delle massime priorità di questa indagine e il gruppo di studio OxAAA è stato istituito specificamente per affrontare questo problema (Fig. 7)<sup>41</sup>.





**Fig. 7.** Indagine dello studio OxAAA nel 2017 sulle priorità della ricerca riguardante l'AAA. Lee R et al. Patients' opinions regarding research and management of abdominal aortic aneurysms. *Int Angiol* 2017; 36: 526-30.

I campioni di tessuto per la valutazione dei biomarcatori tissutali sono ottenuti da pazienti con AAA di grande dimensione sottoposti a intervento chirurgico, consentendo il confronto delle variazioni presenti e in assenza di biomarcatori ematici, rispettivamente, prima e dopo l'intervento chirurgico.

Ciò consente la valutazione multiparametrica di diversi pazienti affetti da AAA in base al tasso di progressione, dimensione e assenza di crescita, oltre al profilo biomolecolare dei campioni di pazienti con AAA. Questi dati sono combinati con informazioni cliniche per scoprire nuovi biomarcatori della progressione dell'AAA. Volontari sani sono anche reclutati per fornire il gruppo di controllo per lo studio.

### **Obiettivi dell'OxAAA Study**

Identificazione di un modello di valutazione multimodale per migliorare la stratificazione del rischio di progressione dell'AAA.

### **Partecipanti allo studio**

I partecipanti allo studio sono divisi in tre categorie di assunzione:

1. Pazienti con diagnosi di AAA confermata sottoposti a controllo follow-up AAA.

2. Pazienti appena inviati all'ospedale con una diagnosi recente di AAA sottoposti ad intervento chirurgico a causa di AAA di grandi dimensioni alla presentazione o che rientrano nel programma di controllo, entrando quindi nella categoria 1.

3. Volontari sani.

### **Criteri di inclusione**

- Maschio o Femmina con diagnosi confermata di AAA
- Pazienti di età  $\geq 16$  anni
- Volontari sani senza AAA che accettano di prendere parte all'indagine.

### **Criteri di esclusione**

- Pazienti con noti problemi clinici relativi allo studio
- Fobia dell'ago per impedire il prelievo di sangue per il campionamento o l'incannulamento venoso periferico.

### **Preparazione del progetto, reclutamento e consenso informato**

Ho fornito un contributo sostanziale alla preparazione del mio progetto, inclusa l'analisi di biomarcatori circolanti selezionati da un flusso di lavoro di identificazione della proteomica per l'algoritmo di predizione, il recupero e l'anonimizzazione di ~1500 set di dati TAC di scansioni in questi timepoint: "molto prima dell'intervento chirurgico" (CT-

"long before surgery" LBS) e "appena prima dell'intervento chirurgico" (CT- "just before surgery" JBS), ecografie e analisi dei dati U/S, coordinamento della fase di reclutamento dei partecipanti, cura del database e raccolta di tutti i moduli di consenso per ~1000 pazienti che erano stati sottoposti a Chirurgia AAA presso gli Ospedali dell'Università di Oxford, inclusa la selezione e l'analisi dei dati ecografici (Fig. 14). Questa è la base fondamentale per consentire l'accesso al set di dati clinici e di imaging completo e necessario per le analisi in corso di questo progetto.

### ***Combinazione di approccio fisiologico e biochimico per la previsione della crescita AAA. Introduzione***

L'AAA è un processo infiammatorio multifattoriale che coinvolge diverse vie interconnesse. Pertanto vi è la necessità di indagare questa malattia utilizzando un approccio multimodale comprendente le analisi biochimiche, genetiche e biomeccaniche<sup>7</sup>. A differenza delle precedenti tecniche di analisi dei marcatori, che erano in grado di valutare solo un basso numero di bersagli come biomarcatori proteici, espressione genica e polimorfismi ecc., la nuova tecnologia consente un'ampia valutazione di un insieme completo di substrati da analizzare senza ipotesi a priori.

Questi includono analisi come metaboloma, proteoma, genoma (ad esempio nel caso di GWAS). I meccanismi biologici possono ora essere studiati utilizzando strumenti moderni (piattaforme KEGG<sup>TM</sup>, Ingenuity Pathway Analysis<sup>TM</sup>, ecc.), che consentono l'analisi di un ampio set di dati e selezionano le informazioni rilevanti coinvolte nel percorso della specifica malattia di interesse.

Tecniche e strumenti ad alto rendimento (piattaforme come la piattaforma ELISA ELLA ProteinSimple<sup>TM</sup>, ecc.) e analisi di biologia dei sistemi consentono la valutazione completa dei cambiamenti nel "profilo

molecolare" del plasma o del campione di tessuto legati al meccanismo biologico specifico della malattia<sup>42</sup>.

Oltre all'infiammazione locale dell'AAA, è stato osservato che i pazienti con AAA non solo mostrano una disfunzione vascolare nel segmento dell'AAA, ma presentano un'infiammazione sistemica e una relativa anomalia nell'albero vascolare e in altri distretti vascolari. Ciò ha indirizzato l'interesse per la ricerca sui biomarcatori circolanti AAA. È stato dimostrato che i livelli di citochine pro-infiammatorie, come IL-6, IL- $\beta$  e CRP sono aumentati nei pazienti con AAA<sup>43</sup>.

È stato scoperto che diversi gruppi di citochine pro-infiammatorie associate alla degradazione della matrice extracellulare (ECM) del trombo intraluminale (ILT, intraluminal thrombus) e AAA sono coinvolti nella fisiopatologia dell'AAA. L'ILT è un componente altamente biologicamente attivo dell'AAA che è coinvolto nella risposta immuno-infiammatoria ed è uno degli elementi chiave per lo studio della fisiopatologia dell'AAA. L'evento di intrappolamento dei neutrofili nell'ILT è legato a uno squilibrio di  $\alpha$ -defensina, mieloperossidasi e altri biomarcatori circolanti implicati nell'attivazione dei neutrofili<sup>44</sup>. Inoltre, è stato osservato che lo sviluppo di AAA è correlato con anomalie nei sottoprodotti della degradazione del collagene, attivazione di enzimi proteolitici come complessi plasma-antiplasma e livelli aumentati di peptidi di elastina sierica<sup>6</sup>. Precedenti indagini sulle implicazioni di questi marcatori in AAA hanno evidenziato che la progressione è stata inconcludente e, in alcuni casi, ha dato luogo a una bassa significatività (bassa specificità o sensibilità). Pertanto vi è la necessità di chiarire l'aspetto della scoperta dei biomarcatori nella progressione dell'AAA.

### ***Scopo del mio progetto nell'OxAAA***

Lo scopo del mio progetto era identificare nuovi biomarcatori individuali per

l'algoritmo di predizione AAA per la stratificazione del rischio. Questi sono biomarcatori del sangue misurabili nel plasma dei pazienti con AAA. Questa indagine fa parte del più ampio studio in corso sull'aneurisma dell'aorta addominale di Oxford (OxAAA). Sono stato finanziato da molteplici prestigiose borse di studio da schemi di finanziamento europei e dall'Università La Sapienza di Roma per lavorare allo studio OxAAA e condurre questi esperimenti per la mia tesi di ricerca.

### ***Ipotesi dello studio***

L'ipotesi è che le caratteristiche di base dell'AAA possano essere utilizzate per predire la futura crescita dell'aneurisma nei singoli pazienti.

### ***Materiali e metodi***

I pazienti sottoposti al programma di sorveglianza AAA da parte del SSN sono stati reclutati in modo prospettico (consenso individuale IRB: SC/0250/13). Il SSN offre screening e un programma di controllo follow-up, durante il quale i pazienti sono stati reclutati nel corso della storia naturale del percorso assistenziale del SSN. Quando i pazienti sono invitati per le misurazioni delle dimensioni dell'aneurisma, possono essere arruolati nello studio e vengono eseguite misurazioni aggiuntive a scopo di ricerca. Queste erano la misurazione della dilatazione flusso-mediata (FMD) riconosciuta come marker di disfunzione endoteliale e contemporaneamente i campioni di sangue raccolti da questi pazienti.

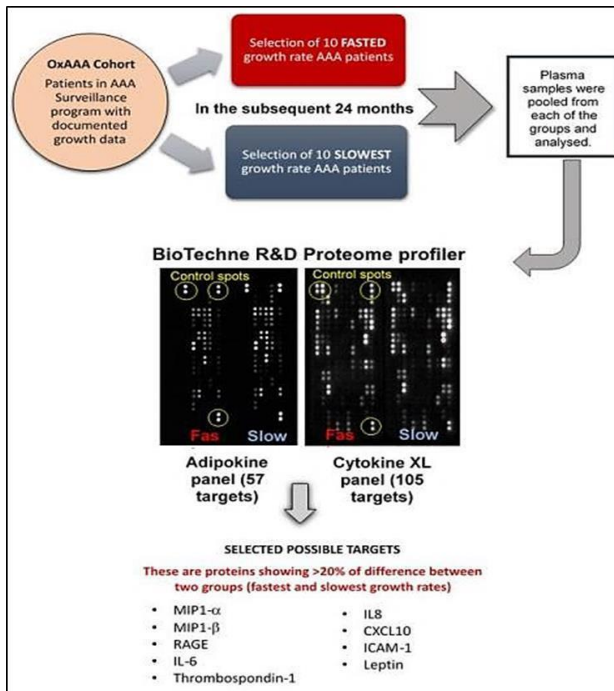
### ***Analisi biochimiche***

L'obiettivo è migliorare l'algoritmo di predizione, costituito dalla dimensione dell'aneurisma, FMD e ora introducendo biomarcatori circolanti mediante analisi biochimiche delle proteine circolanti. Sono state eseguite misurazioni del diametro antero-posteriore dell'AAA e FMD. Inoltre, allo stesso appuntamento di base per il controllo, sono stati prelevati campioni di sangue a digiuno. È stato applicato il

precedente protocollo per ottenere il plasma povero di piastrine (PPP). Si tratta di un metodo di centrifugazione a 2 stadi per preparare campioni di PPP. Sono stati quindi conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$  per la successiva analisi. Sulla base del diametro dell'AAA anteroposteriore misurato nelle successive scansioni ecografiche dell'AAA di sorveglianza, sono stati calcolati i tassi di crescita annuale dell'AAA prospettici. I dati sulla crescita dell'AAA sono stati riportati per 12 mesi in 59 pazienti, con un diametro anteroposteriore medio dell'AA di 47 mm alle misurazioni basali. Quelli invece per 24 mesi sono stati documentati in 51 di questi pazienti, di cui i restanti 8 sono stati poi sottoposti a chirurgia elettiva. Per le analisi biochimiche, ho applicato un metodo proteomico per scoprire nuovi biomarcatori circolanti con l'obiettivo di migliorare l'algoritmo di predizione. Derivato dai tassi di crescita AAA valutati durante i successivi 12 e 24 mesi, è stato selezionato un insieme di pazienti per la parte iniziale dell'analisi proteomica. Dieci pazienti con tasso di crescita AAA più veloce e dieci più lenti sono stati raggruppati e quindi analizzati da array di anticorpi proteici Proteome Profiler Antibody Arrays (sistemi di ricerca e sviluppo, n. ARY022B, n. ARY017) con il pannello Adipokine (57 target) e il pannello Cytokine XXL (105 target).

I dati dell'array sono stati analizzati utilizzando il software HLIImage++ (Western Vision Software, versione PCM 18.0.7). Questo passaggio critico è stato applicato per identificare nove potenziali proteine bersaglio di importanza biologica, che hanno mostrato una differenza di variazione di almeno il 20% tra il gruppo a crescita rapida e quello a crescita lenta. Le nove proteine identificate erano le seguenti: MIP1- $\alpha$  e MIP1- $\beta$  (proteina infiammatoria dei macrofagi 1-alfa e -beta), RAGE, Interleuchina 6 (IL-6), Trombospondina-1, IL-8, C-X-C motivo chemochine ligando 10 (CXCL10), ICAM-1 (molecola di adesione intercellulare 1) e leptina (Fig. 8).





**Fig. 8.** Rappresentazione del flusso di lavoro dell'analisi biochimica.

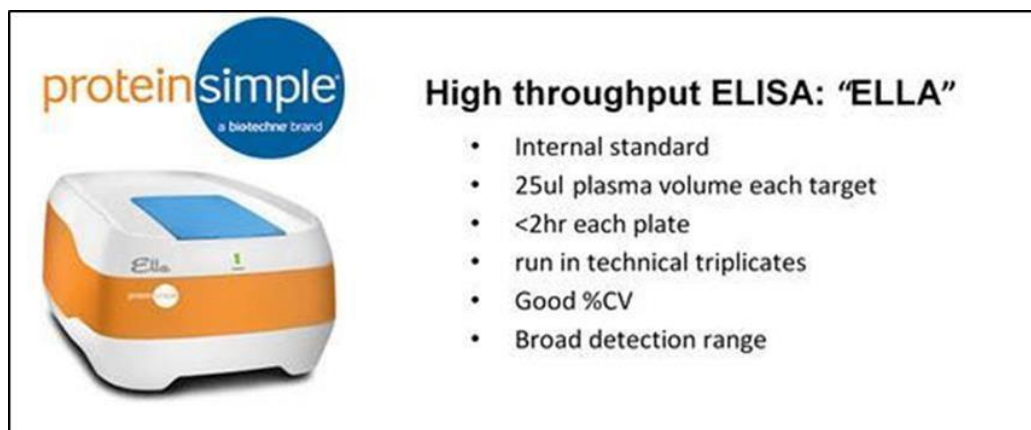
Quindi, ho proceduto con le misurazioni del pannello di proteine nei singoli pazienti utilizzando la piattaforma ELLATM Simple Plex (ELISA) ad alto rendimento. Questa è stata utilizzata per la convalida tecnica dei biomarcatori proteici scoperti con la precedente analisi. Le analisi sono state eseguite utilizzando campioni di plasma privi

di cellule seguendo un protocollo di centrifugazione a due stadi che consente la purificazione rimuovendo i residui piastrinici per ottenere campioni più puliti (Fig. 9).

### **Misurazione delle proteine nell'intera coorte con ELLA Protein Simple™**

La piattaforma Ella Simple Plex tende a eseguire analisi meno soggette a errori rispetto alla tradizionale tecnica Elisa, che necessita di diverse aggiunte di reagenti e lavaggi manuali. Inizialmente, è necessario aggiungere i campioni specifici e il buffer del test, quindi eseguire la scansione della cartuccia per importare le curve standard precaricate (curva standard interna incorporata) e inserirla in "Ella" per eseguire l'analisi.

"Ella" necessita solo di 25 microlitri di campione; non ci sono lavaggi manuali o aggiunte di reagenti perché "Ella" automatizza ogni passaggio dell'Elisa sulla cartuccia. I risultati completamente analizzati da bassi volumi di campione richiedono meno di 2 ore. Questi risultati comprendono queste misurazioni: Unità di fluorescenza relativa (RFU), concentrazione e coefficiente di variazione % (CV), altamente riproducibile al 7% o meno.



**Fig. 9.** Caratteristiche della macchina Ella ProteinSimple per analisi ELISA ad alto rendimento Biotechne. <https://www.proteinsimple.com/>.

$$cv = \frac{\sigma}{\mu}$$

**CV** = population *Coefficient of Variation*; **σ** = population *Standard Deviation*  
**μ** = population *Mean*

$$\% cv = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

**CV for samples:**

**s** = standard deviation for samples;  **$\bar{x}$**  = x-bar average mean in the sample

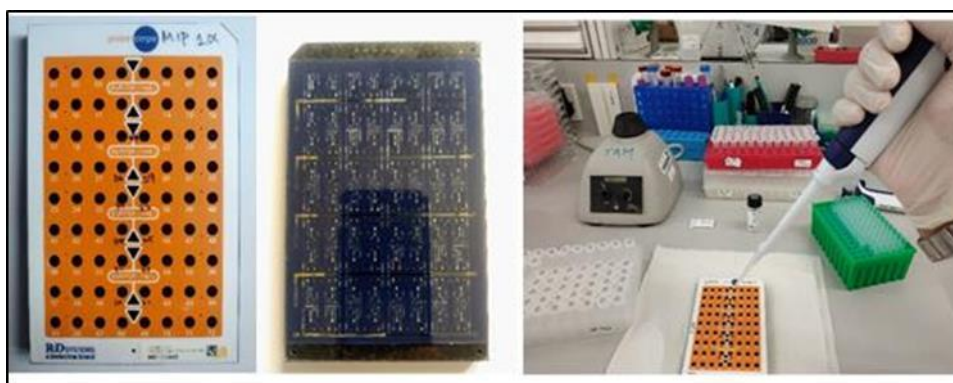
Ella Simple Plex utilizza fluorescenti per il rilevamento fornendo una migliore sensibilità rispetto al colorimetrico e un'ampia gamma dinamica rispetto allo standard Elisa. Le curve standard vengono generate automaticamente. Meccanismi Ella Simple Plex; il test plex semplice si basa sulla cartuccia microfluidica, che automatizza tutte le fasi del test; all'interno della cartuccia, il nanoreattore di vetro o GNR è al centro dell'Elisa.

I GNR sono specifici dell'analita e ottimizzati per un legame elevato con il campione; con 3GNR in ciascun canale, si ottengono automaticamente risultati triplicati incorporati per ogni campione. Ciò si traduce in una riproducibilità più precisa, il che significa che è possibile ottenere una bassa % CV per ogni campione come una singola replica, quindi non è necessario sprecare campioni preziosi eseguendo duplicati o triplicati extra. Ho usato la cartuccia 72 x 1.

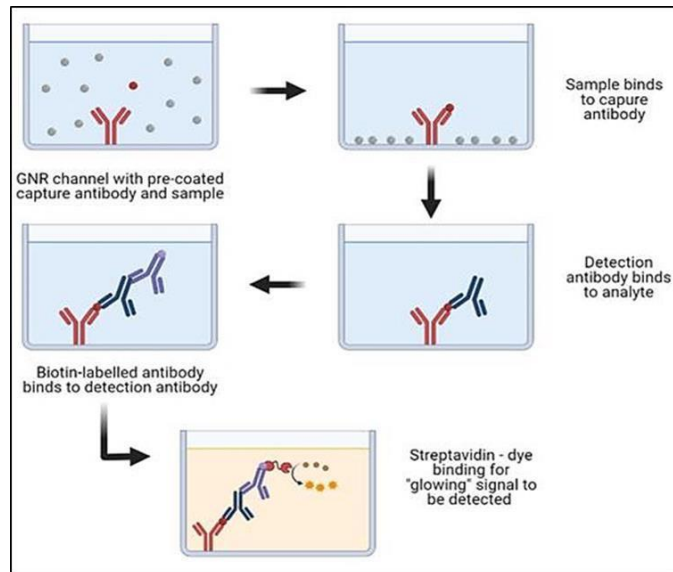
La piastra ha curve standard integrate, che lasciano più spazio per i campioni e non è stato necessario eseguire più di un campione replicato (Figg. 10 e 11).

#### ***Ella ProteinSimple passaggi procedurali per l'analisi ELISA***

- Scansione del codice a barre della cartuccia.
- Aggiunta di campioni e buffer.
- Caricamento della cartuccia in Ella Simple Plex.
- Esegue più analiti su un campione e contemporaneamente su più campioni, divide ciascun campione in canali isolati, ciascuno contenente un nanoreattore di vetro specifico per l'analita (GNR).
- Quindi sposta il campione avanti e indietro all'interno del GNR in modo che il campione si leghi all'anticorpo di cattura.



**Fig. 10.** 72x1 cartuccia Ella simple plex basata sulla tecnologia microfluidica (posteriore e frontale) per l'analisi ELISA. All'interno della cartuccia il nanoreattore di vetro o GNR è il punto centrale per l'analisi dell'ELISA.

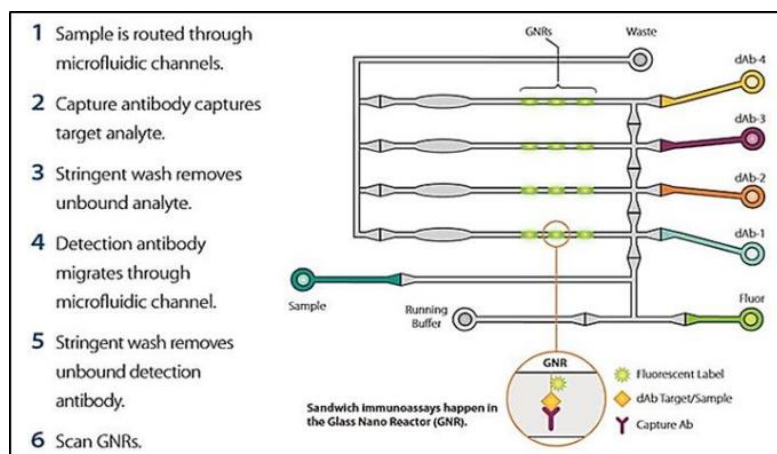


**Fig. 11.** Rappresentazione schematica delle fasi procedurali della tecnica ELISA. (Immagine creata utilizzando il programma BioRender).

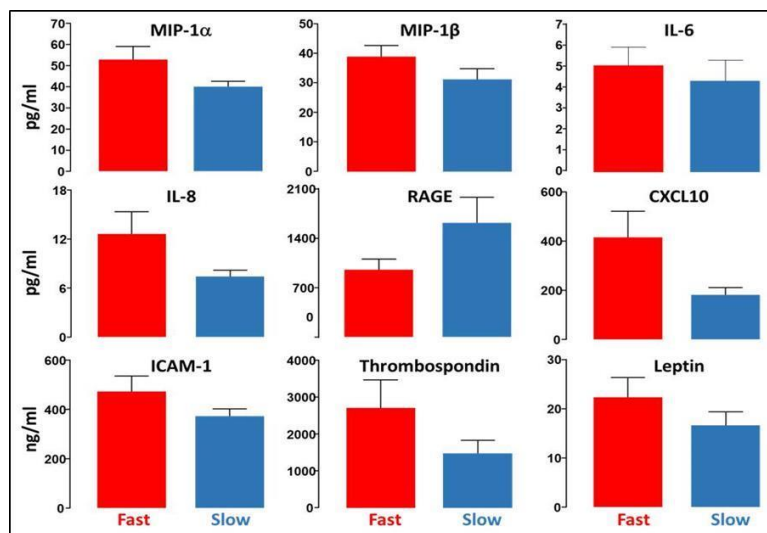
- “Ella” aggiunge un anticorpo di rilevamento che si lega al campione, creando un “sandwich”.
- Viene quindi aggiunto un colorante fluorescente coniugato con streptavidina che fa brillare il complesso quando viene stimolato.
- “Ella” rileva il segnale che viene prodotto, in 60 minuti.
- Fornisce risultati completamente analizzati per tutti gli analiti in ciascuno dei campioni che eseguono test immunologici (Fig. 12).

### Risultati

La validazione tecnica dell'array di anticorpi proteici eseguita con la macchina Elisa per il dosaggio immunologico ad alto rendimento Ella Simple Plex™ ha mostrato che le misurazioni di ciascun campione di pazienti nella coorte di studio hanno confermato i risultati precedentemente osservati dal Proteome Profiler Array per ciascuno dei biomarcatori proteici con almeno una differenza del 20% tra i due gruppi (tasso di crescita più veloce e più lento) (Fig. 13).



**Fig. 12.** Tecnologia Simple Plex; il campione scorre attraverso un canale microfluidico che lega la proteina di interesse. Successivamente, “Ella” lava via l'analita non legato e aggiunge un reagente di rilevamento. I dati vengono quindi generati dalla curva standard calibrata di fabbrica fornita con ogni cartuccia. Poiché ogni canale ha tre Glass Nano Reactor (GNR) rivestiti con un anticorpo di cattura, fornisce risultati triplicati per ciascun campione. <https://www.proteinsimple.com/>.



**Fig. 13.** Tecnica di convalida dell'array del profilo proteomico: ciascuno dei biomarcatori mostra una differenza > 20% tra il gruppo a tasso di crescita veloce e quello lento. Lee R, Charles PD, Lapolla P, et al. *Integrated Physiological and Biochemical Assessments for the Prediction of Growth of Abdominal Aortic Aneurysms in Humans. Annals of Surgery, 2019.*

Abbiamo combinato le misurazioni dei biomarcatori proteici con le misurazioni fisiologiche dell'afta epizootica e il diametro AP della dimensione dell'aneurisma al basale, quindi, testando un modello lineare generalizzato per predire la crescita nella coorte OxAAA di pazienti con dimensioni del diametro AP AAA comprese tra 40 e 55 mm, l'intervallo di pazienti più inclini allo sviluppo di AAA (frequenza di sorveglianza) e sottoposti a riparazione chirurgica. Utilizzando la regressione logistica, abbiamo definito la crescita "Lenta/No" indicando i valori 0%, la crescita "Alcuni" si riferisce a valori di crescita > 0% comunque rimanenti nei due terzi inferiori della crescita e, infine, nel gruppo di crescita "Veloce" corrispondente alla fascia di tasso di crescita del terzile superiore. Questi sono stati calcolati per eventi in due punti temporali; 12 mesi e 24 mesi.

#### **Analisi statistica**

Per l'analisi statistica è stato utilizzato un modello logistico multinomiale con regressione di cresta. L'intervallo di regolazione dei parametri è stato impostato per differire da 0 a 3 con incrementi di 0,1. È stata eseguita una convalida incrociata di 10 volte con 3 ripetizioni al fine di rafforzare la stima dell'accuratezza utilizzando la versione del

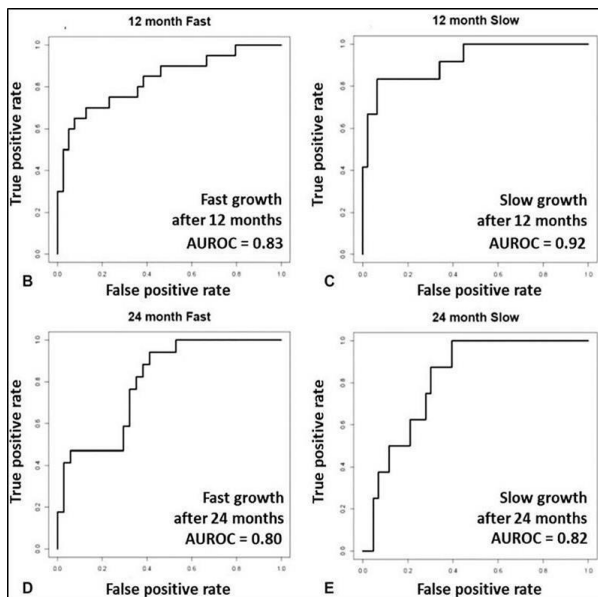
software R 3.5.1, il pacchetto Python-Glmnet e le librerie Caret (Classification And REgression Training).

La classificazione a 3 vie del modello ha mostrato una buona precisione con il 73% per 12 mesi e il 58% per 24 mesi. Il potere predittivo elevato è risultato dopo la combinazione del confronto binario costituito da crescita lenta vs. non lenta e veloce vs. non veloce.

Le caratteristiche operative dell'area sotto ricevitore (AUROC) sono 0,92 e 0,82 per la previsione di crescita "Crescita lenta/assenza" rispettivamente a 12 e 24 mesi e 0,83 e 0,80 per "Crescita rapida" a 12 e 24 mesi, rispettivamente (Fig. 14)<sup>45</sup>.

#### **Discussione**

La previsione della crescita dell'AAA è fondamentale per la valutazione clinica vascolare e attualmente non esistono metodi definiti per prevedere e stratificare in modo obiettivo e accurato i pazienti con AAA per il rischio di progressione o rottura dell'AAA. Ciò crea incongruenze nelle diverse raccomandazioni e linee guida delle società vascolari (ESVS in Europa e SVS negli USA) in merito alla frequenza della sorveglianza dell'AAA mediante scansioni ecografiche seriali



**Fig. 14.** Modello di regressione logistica multinomiale. I modelli hanno mostrato un eccellente potere predittivo se combinati con confronti binari di crescita veloce e non veloce, e crescita lenta rispetto a crescita non lenta. L'area sotto le caratteristiche operative del ricevitore (AUROC) riporta rispettivamente 0,83 (crescita rapida a 12 mesi, B), 0,92 (crescita lenta a 12 mesi, C), 0,80 (crescita rapida a 24 mesi, D) e 0,82 (crescita lenta/nessuna a 24 mesi, E). Lee R, Charles PD, Lapolla P, et al. *Integrated Physiological and Biochemical Assessments for the Prediction of Growth of Abdominal Aortic Aneurysms in Humans. Annals of Surgery, 2019.*

e ai tempi della riparazione chirurgica. Sebbene la fisiopatologia dello sviluppo e della progressione dell'AAA sia un meccanismo multifattoriale complesso, l'indicazione chirurgica per la riparazione dell'AAA si basa esclusivamente sulla dimensione dell'AAA. Con l'obiettivo di migliorare il modello di previsione, sono stati identificati e raggruppati dieci campioni di pazienti con tasso di crescita AAA più veloce e dieci più lento (rispettivamente barre rosse e blu) di pazienti della coorte di studio OxAAA. Questi provengono da pazienti seguiti durante i loro 12 e 24 mesi di sorveglianza AAA reclutati nello studio. Sono stati ottenuti campioni di sangue e campioni di plasma povero di piastrine (PPP) sono stati preparati con un protocollo di elaborazione specifico e conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Si è proceduto con l'analisi di questi 2 set ( $n=10$  più veloci e  $n=10$  più lenti) con array di anticorpi proteici e la successiva identificazione di nove proteine Trombospondina, RAGE, CXCL10, IL6, IL8, leptina e ICAM1, MIP1a e MIP1b, che ha mostrato una differenza di almeno il 20% tra i gruppi a crescita rapida e lenta. Le analisi per la convalida tecnica sono state eseguite utilizzando la piattaforma ELLA SimplePlex<sup>TM</sup> (ELISA) ad alto rendimento che corrispondeva alle precedenti osservazioni dell'array di anticorpi proteici per ciascuna

delle proteine con almeno il 20% di variazione della differenza tra i due gruppi. Successivamente, abbiamo combinato la misurazione dei biomarcatori proteici con le misurazioni fisiologiche dell'alfa epizootica e la dimensione dell'aneurisma al basale, utilizzando la regressione logistica che abbiamo definito come crescita lenta/nessuna o crescita rapida; AUROC = 0,92 e 0,82 per la previsione di crescita "lenta/nessuna" dello 0% rispettivamente a 12 e 24 mesi e 0,83 e 0,80 per "Crescita rapida" rispettivamente a 12 e 24 mesi. Ciò dimostra che il nostro modello è eccellente e fornisce risultati promettenti nel prevedere una crescita lenta e una crescita rapida anche a 24 mesi con grande precisione.

Oltre alle precedenti analisi delle proteine biomarcatori, abbiamo testato il modello di regressione per valutare l'effetto della storia di fumo di un soggetto utilizzando come variabile continua l'anno di fumo. Il fumo di sigaretta è un noto fattore di rischio modificabile per la fisiopatologia della formazione di AAA. Pack-year è una quantificazione clinica del fumo di sigaretta; viene utilizzato per misurare l'esposizione del soggetto al fumo di tabacco e la valutazione del rischio delle patologie correlate.



$$\text{Number of pack – years} = \left( \frac{\text{N of cigarettes smoked per day}}{20} \right) \times \text{number of years smoked}$$

- 1 pack has 20 cigarettes in most of the countries, hence:

$$\begin{aligned} 1 \text{ pack – year} &= \left( \frac{1 \text{ pack}}{\text{day}} \right) \times 1 \text{ year} \\ &= 365.24 \times \left( \frac{20 \text{ cigarettes}}{\text{pack}} \right) \times 1 \text{ year} \\ &= 7\,305 \text{ cigarettes} \end{aligned}$$

Pregresso uso di sigaretta come unità di misura “Pack-year” è stato quindi incorporato come variabile aggiuntiva nel modello di regressione. Ciò ha portato a miglioramenti nel punteggio AUROC; a 12 mesi, la crescita Lenta/Nessuna è risultata a 0,95 e la crescita rapida a 0,88, mentre a 24 mesi, la crescita Lenta/Nessuna è risultata a 0,82 e la crescita Veloce a 0,81.

### **Limitazioni**

Questi risultati possono, tuttavia, essere soggetti a bias a causa del fatto che “Pack-year” è un'unità di quantificazione auto-riferita ed è, quindi, una misurazione soggettiva riferita dal paziente. Di conseguenza, il presente studio è stato diretto su misure sostanziali e oggettive imparziali come quelle studiate in questa ricerca; FMD, diametro AP AAA e proteine biomarcatori del sangue.

### **Conclusioni**

Per la prima volta è stato seguito l'uso del flusso di lavoro di scoperta biochimica applicato ai biomarcatori proteici circolanti in combinazione con misurazioni fisiologiche come l’FMD e la dimensione AP AAA. Abbiamo utilizzato questo approccio integrativo per sviluppare e testare un algoritmo per la previsione dell'AAA in una coorte prospettica di pazienti con AAA, che era in grado di esibirsi con un'eccellente capacità predittiva. La preparazione del campione è stata scrupolosamente eseguita utilizzando un protocollo specifico per elaborare il PPP per evitare residui piastrinici

rimanenti nel campione, che possono agire come un potenziale confondente del segnale rilasciando proteine al momento dello scongelamento e della successiva lisi cellulare.

Le osservazioni sono state validate in modo solido e la scoperta dei biomarcatori è stata massimizzata applicando uno specifico flusso di lavoro di proteomica e utilizzando l'accurata macchina ad alto rendimento per migliorare l'accuratezza.

Gli algoritmi di predizione che abbiamo sviluppato sulla base del modello biologico eseguito con una superba capacità di predizione sono stati descritti nello studio pubblicato su *Annals of Surgery* (Lee R, Charles PD, Lapolla P, et al.)<sup>45</sup>. Questi risultati promettenti possono stimolare l'interesse della comunità vascolare e indurre altri centri ad effettuare una validazione esterna del modello predittivo. Ciò conterebbe su una potenziale coorte reclutata da AAA per la ricerca oltre a richiedere un lavoro sostanziale per la preparazione delle misurazioni PPP e FMD. Oltre alle misurazioni fisiologiche e biochimiche, sarebbe interessante incorporare nell'algoritmo di predizione ulteriori valori derivati dalla caratteristica di stress biomeccanico di AAA utilizzando l'analisi agli elementi finiti (finite element analysis FEA) per la previsione accurata del rischio di rottura<sup>46, 47</sup>. Un multifattoriale approccio di valutazione, considerando le componenti genetiche in termini di polimorfismi genici, sarebbe ideale per identificare potenziali marker di predisposizioni individuali alla rapida crescita di AAA<sup>48</sup>.



È importante che le coorti esterne replichino l'efficacia del nostro pannello di biomarcatori. Questo richiederà sforzi dedicati per misurare l'FMD oltre al fatto di raccogliere campioni di plasma poveri di piastrine in coorti AAA reclutate in modo prospettico, poiché questi non possono essere estratti da studi retrospettivi. Ci auguriamo che questo lavoro serva da primer per generare interessi nella comunità chirurgica vascolare e stimoli gli sforzi futuri per convalidare l'algoritmo di previsione.

I metodi di previsione della crescita dell'AAA consentiranno infine una stratificazione personalizzata della frequenza di sorveglianza dell'AAA e proteggeranno i pazienti da interventi chirurgici non necessari che potrebbero essere parzialmente guidati da incentivi finanziari. Uno strumento per prevedere la crescita degli AAA consente quindi di assicurare i pazienti e di informare meglio sulla frequenza del controllo dell'aneurisma. Questa ricerca fornirà uno strumento importante per la comunità vascolare di tutto il mondo.

## BIBLIOGRAFIA

- Kent KC. Clinical practice. Abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med* 2014; 371: 22.
- Abdul-Hussien H, Hanemaaijer R, Klemann R, et al., The pathophysiology of abdominal aortic aneurysm growth: corresponding and discordant inflammatory and proteolytic processes in abdominal aortic and popliteal artery aneurysms. *J Vasc Surg* 2010; 51: 1479-87.
- Erbel R, Eggebrecht H. Aortic dimensions and the risk of dissection. *Heart* 2006; 92: 137-42.
- Klink A, Hyafil F, Rudd J, et al. Diagnostic and therapeutic strategies for small abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol* 2011; 8: 338-47.
- NIHR. Abdominal aortic aneurysm screening for women is unlikely to be a fair use of NHS resources. 2018. doi: 10.3310/signal-000676.
- Hellenthal FA, Buurman WA, Wodzig WK, Schurink GW. Biomarkers of AAA progression. Part 1: extracellular matrix degeneration. *Nat Rev Cardiol* 2009; 6: 464-74.
- Hellenthal FA, Buurman WA, Wodzig WK, Schurink GW. Biomarkers of abdominal aortic aneurysm progression. Part 2: inflammation. *Nat Rev Cardiol* 2009; 6: 543-52.
- Michel JB. Contrasting outcomes of atheroma evolution: intimal accumulation versus medial destruction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1389-92.
- Wang Y, Aitt-Houfella H, Herbin O, et al. TGF- $\beta$  activity protects against inflammatory aortic aneurysm progression and complications in angiotensin II-infused mice. *J Clin Invest* 2010; 120: 422-32.
- Tieu BC, Lee C, Sun H, et al. An adventitial IL-6/MCP1 amplification loop accelerates macrophage-mediated vascular inflammation leading to aortic dissection in mice. *J Clin Invest* 2009; 119: 3637-51.
- Gräbner R, Lötzer K, Döpping S, et al. Lymphotoxin beta receptor signaling promotes tertiary lymphoid organogenesis in the aorta adventitia of aged ApoE $^{-/-}$  mice. *J Exp Med* 2009; 206: 233-48.
- Thaunat O, Nicoletti A. Lymphoid neogenesis in chronic rejection. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13: 16-9.
- Folkesson M, Kazi M, Zhu C, et al. Presence of NGAL/MMP-9 complexes in human abdominal aortic aneurysms. *Thromb. Haemost* 2007; 98: 427-33.
- Fontaine V, Touat Z, Mtairag EM, et al. Role of leukocyte elastase in preventing cellular re-colonisation of the mural thrombus. *Am J Pathol* 2004; 164: 2077-87.
- Houard X, Ollivier V, Louedec L, Michel JB, Bäck M. Differential inflammatory activity across human abdominal aortic aneurysms reveals neutrophil-derived leukotriene B4 as a major chemotactic factor released from the intraluminal thrombus. *FASEB J* 2009; 23: 1376-83.
- Eliason JL, Hannawa KK, Ailawadi G, et al. Neutrophil depletion inhibits experimental abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation* 2005; 112: 232-40.
- Pagano MB, Bartoli MA, Ennis TL, et al. Critical role of dipeptidyl peptidase I in neutrophil recruitment during the development of experimental abdominal

- aortic aneurysms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 2855-60.
18. Sun J, Sukhova GK, Yang M, et al. Mast cells modulate the pathogenesis of elastase-induced abdominal aortic aneurysms in mice. *J Clin Invest* 2007; 117: 3359-68.
  19. Norman PE, Davis TM, Le MT, Golledge J. Matrix biology of abdominal aortic aneurysms in diabetes: mechanisms underlying the negative association. *Connect Tissue Res* 2007; 48: 125-31.
  20. Fontaine V, Jacob MP, Houard X, et al. Involvement of the mural thrombus as a site of protease release and activation in human aortic aneurysms. *Am J Pathol* 2002; 161: 1701-10.
  21. Lederle FA, Wilson SE, Johnson GR, et al. Immediate repair compared with surveillance of small abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med* 2002; 346: 1437-44.
  22. Houard X, Rouzet F, Touat Z, et al. Topology of the fibrinolytic system within the mural thrombus of human abdominal aortic aneurysms. *J Pathol* 2007; 212: 20-8.
  23. Kent KC, Zwolak RM, Egorova NN, et al. Analysis of risk factors for abdominal aortic aneurysm in a cohort of more than 3 million individuals. *J Vasc Surg* 2010; 52: 539-48.
  24. Bengtsson H, Bergqvist D, Sternby NH. Increasing prevalence of abdominal aortic aneurysms: a necropsy study. *Eur J Surg* 1992; 158: 19-23.
  25. Forsdahl SH, Singh K, Solberg S, Jacobsen BK. Risk factors for abdominal aortic aneurysms: a 7-year prospective study: the Tromsø Study, 1994-2001. *Circulation* 2009; 119: 2202-8.
  26. Brady AR, Thompson SG, Fowkes FGR, Greenhalgh RM, Powell JT. Abdominal aortic aneurysm expansion: risk factors and time intervals for surveillance. *Circulation* 2004; 110: 16-21.
  27. Blanchard JF. Epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Epidemiol Rev* 1999; 21: 207-21.
  28. Reddy HK, Koshy SKG, Wasson S, et al. Adaptive-outward and maladaptive-inward arterial remodeling measured by intravascular ultrasound in hyperhomocysteinemia and diabetes. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2006; 11: 65-76.
  29. Vänni V, Turtiainem G, Hakala T, et al. Vascular comorbidities and demographics of patients with ruptured abdominal aortic aneurysms. *Surgery* 2015; 159: 1191.
  30. Parodi JC, Palmaz JC, Barone HD. Transfemoral intraluminal graft implantation for abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg* 1991; 5: 491-9.
  31. Volodos NL, Karpovich IP, Shekhanin VE, Troian VI, Iakovenko LF. A case of distant transfemoral endoprosthesis of the thoracic artery using a self-fixing synthetic prosthesis in traumatic aneurysm. *Grud Khir* 1988; 6: 84-6.
  32. GlobeNewsWire. Aortic Stent Graft Market Set to Exceed \$3.7 Billion by 2024. 2019.
  33. Chaikof EL, Brewster DC, Dalman RL, et al. SVS practice guidelines for the care of patients with an abdominal aortic aneurysm: executive summary. *J Vasc Surg* 2009; 50: 880-96.
  34. The RESCAN Collaborators. Surveillance intervals for small abdominal aortic aneurysms: a meta-analysis. *JAMA* 2013; 309: 806-13.
  35. Public Health England. NHS Abdominal Aortic Aneurysm Screening Programme. 2016.
  36. Wanhainen A, Verzini F, Van Herzelee I, et al. ESVS Clinical Practice Guidelines on the Management of Abdominal Aorto-iliac Artery Aneurysms. *EJVES* 2019; 57: 8-93.
  37. GOV.UK. Official Statistics Abdominal aortic aneurysm screening: 2018 to 2019 data.
  38. Moxon JV, Parr A, Emeto T, Walker P, Norman PE, Golledge J. Diagnosis and monitoring of abdominal aortic aneurysm: current status and future prospects. *Curr Probl Cardiol* 2010; 35: 512-48.
  39. Kurvers H, Veit FJ, Lipsitz EC, et al. Discontinuous, staccato growth of abdominal aortic aneurysms. *J Am Coll Surg* 2004; 199: 709-15.
  40. Hellenthal FAMVI, Buurman WA, Wodzig WKWh, Shurink GWH. Biomarkers of abdominal aortic aneurysm progression. Part 2: inflammation. *Nat Rev Cardiol* 2009; 6: 543-52.
  41. Lee R, Jones A, Cassimjee I, Handa A. Patients' opinions regarding research and management of abdominal aortic aneurysms. *Int Angiol* 2017; 36: 526-30.
  42. Tunon J, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio ML,

- Lorenzo O, Lopez JA, Egido J. Proteomic strategies in the search of new biomarkers in atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55: 2009-16.
43. Golledge J, Tsao PS, Dalman RL, Norman PE. Circulating markers of abdominal aortic aneurysm presence and progression. *Circulation* 2008; 118: 2382-92.
  44. Houard X, Touat Z, Ollivier V, et al., Mediators of neutrophil recruitment in human abdominal aortic aneurysms. *Cardiovasc Res* 2009; 82: 532-41.
  45. Charles P, Lapolla P, Cassimjee I, et al. Integrated Physiological and Biochemical Assessments for the Prediction of Growth of Abdominal Aortic Aneurysms in Humans. *Ann Surg* 2019; 270: e1-e3.
  46. Fillinger MF, Raghavan ML, Marra SP, et al. In vivo analysis of mechanical wall stress and abdominal aortic aneurysm rupture risk. *J Vasc Surg* 2002; 36: 589-97.
  47. Raghavan ML, Vorp DA. Toward a biomechanical tool to evaluate rupture potential of abdominal aortic aneurysm: identification of a finite strain constitutive model and evaluation of its applicability. *J Biomech* 2000; 33: 475-82.
  48. Duellman T, Warren CL, Matsumura J, et al. Analysis of multiple genetic polymorphisms

in aggressive-growing and slow-growing abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2014; 60: 613-21.e3.

Sintesi della Tesi di Laurea discussa il 28 aprile 2021

Dott. Pierfrancesco Lapolla, Facoltà di Farmacia e Medicina, Dipartimento di Chirurgia "Pietro Valdoni", "Sapienza" Università di Roma; Nuffield Department of Surgical Sciences, University of Oxford, John Radcliffe Hospital, Oxford, UK

Dott. Andrea Mingoli, Dipartimento di Chirurgia "Pietro Valdoni", "Sapienza" Università di Roma

Prof. Lee Regent, Nuffield Department of Surgical Sciences, University of Oxford, John Radcliffe Hospital, Oxford, UK

Per la corrispondenza:  
lapollalosasso.1526391@studenti.uniroma1.it

# **Tesi di Laurea: “Il ruolo del sistema endocannabinoide nella Sclerosi Laterale Amiotrofica: uno studio clinico, elettrofisiologico e molecolare” (Sintesi)**

**Autore: C. Laurini**

**Relatore: M. Inghilleri**

## **Introduzione**

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è una rara patologia degenerativa neuromuscolare, fatale in 3-5 anni. La SLA presenta un'eterogeneità fenotipica in rapporto sia alla sede d'esordio dei sintomi sia all'interessamento prevalente del I o del II neurone di moto. I quadri clinici principali sono:

- esordio spinale con una combinazione di segni del I e II motoneurone degli arti;
- esordio bulbare con interessamento di entrambi i neuroni di moto dei muscoli bulbari;
- sclerosi laterale primaria (SLP) con selettivo coinvolgimento del I motoneurone;
- atrofia muscolare progressiva (PMA) con interessamento esclusivo del II motoneurone.

La Fig. 1 riassume le varie sottoclassificazioni a cui si è accennato (Masrori & Van Damme, 2020).

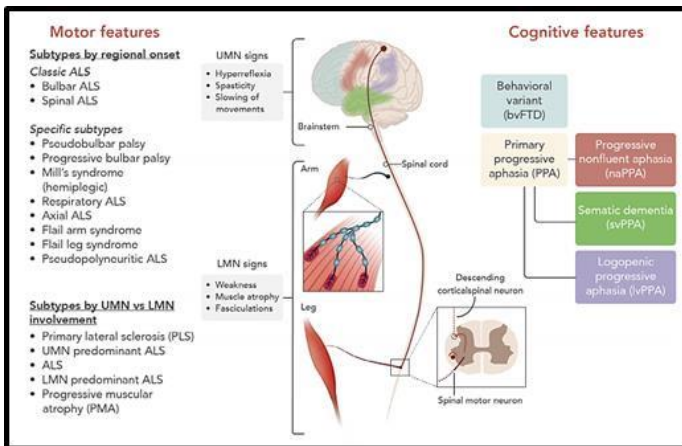
Altre varianti si distinguono in funzione del sito iniziale di insorgenza dei sintomi:

- flail arm syndrome;
- flail leg syndrome;
- variante emiplegica di Mills;
- variante pseudopolinevritica.

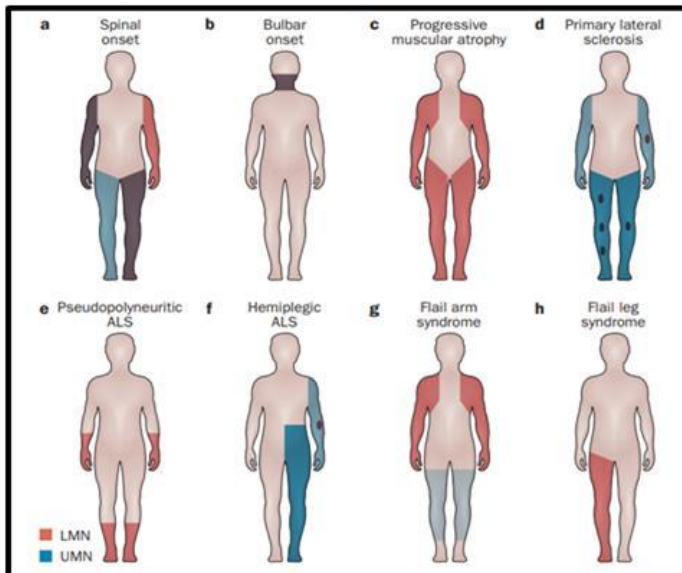
La Fig. 2 (Swinnen & Robberecht, 2014) riassume graficamente queste manifestazioni.

Nel 70% dei casi il fenotipo predominante è quello spinale, seguito da quello bulbare nel 25% e da quello con iniziale coinvolgimento respiratorio nel 5% (Kiernan et al., 2011). La SLA può presentarsi in forma familiare (fSLA), corrispondente al 10% dei casi (Fig. 3), o sporadica (sSLA) nell'85-90% dei casi.

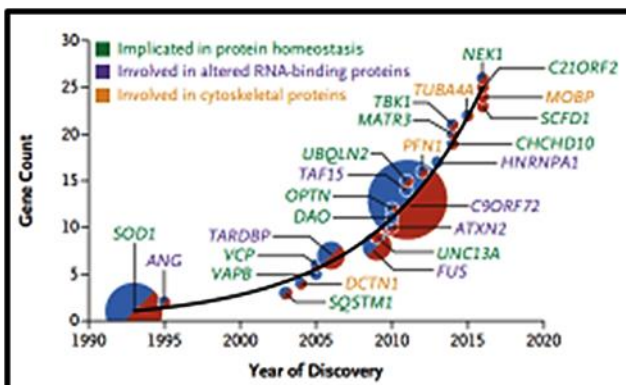
Nella maggioranza delle fSLA ad esordio nell'età adulta, la malattia è ereditata come tratto autosomico dominante, mentre i rari casi di fSLA a esordio giovanile sono più comunemente associati ad eredità autosomica recessiva (Kirby et al., 2016). Fatta eccezione per le forme familiari, l'eziopatogenesi della SLA rimane tuttora poco chiara. Allo stato attuale, la SLA viene considerata una patologia neurodegenerativa con una complessa eziologia multifattoriale, risultato dell'interazione tra numerosi fattori genetici e ambientali. Recenti evidenze suggeriscono, a monte della degenerazione assonale, la presenza di un'alterazione a livello della giunzione neuromuscolare (ipotesi del “*dying-back*”): sebbene si dia per noto che il meccanismo patogenetico della SLA abbia origine dalla degenerazione dei neuroni di moto, recenti evidenze sembrano indicare che la denervazione muscolare preceda la morte neuronale (Palma et al., 2011). Ciò è stato inizialmente dimostrato nel modello murino, dove si è visto che l'espressione di SOD1G93A mutato causa dapprima atrofia muscolare, successivamente alterazione della giunzione neuromuscolare (NMJ), degenerazione assonale



**Fig. 1.** Le presentazioni fenotipiche della SLA. L'interessamento motorio varia in base alla distribuzione regionale ed al coinvolgimento relativo di primo e secondo motoneurone. Fino al 50% dei pazienti può presentare caratteristiche cognitive e comportamentali (Masrori et al., 2020).



**Fig. 2.** Pattern di coinvolgimento motorio nei diversi fenotipi SLA (Swinnen et al., 2014).



**Fig. 3.** Il numero di geni implicati nella SLA è cresciuto esponenzialmente. La grandezza di ogni cerchio riflette la proporzione di fSLA associate a quel gene. I cerchi blu indicano i geni associati soltanto a fSLA, quelli rossi i geni associati soltanto a sSLA, mentre i cerchi metà blu e metà rossi indicano i geni associati sia a fSLA che a sSLA. Il colore con cui è scritto ciascun gene rappresenta il pathway cellulare implicato (Brown et al., 2017).

retrograda e, infine, morte neuronale. Questo pattern di degenerazione retrogrado e progressivo o “*dying-back*” (muscolo-NMJ-nervo) suggerisce che alcune anomalie del muscolo possano precedere la morte neuronale anziché esserne il risultato (Musarò, 2010). Secondo questa prospettiva, inoltre, la morte neuronale sarebbe l’esito di eventi che accadono fuori dal motoneurone, in particolar modo nelle cellule della glia e nel muscolo scheletrico (Dupuis & Loeffler, 2009). Gli endocannabinoidi sono lipidi endogeni in grado di modulare la risposta neuroinfiammatoria e neurodegenerativa. La PEA (*palmitoiletanolamide*) è una molecola endocannabinoid-like con azione sul recettore nicotinico dell’acetilcolina (nAChR) e con interessanti proprietà neuroprotettive e anti-infiammatorie.

### Obiettivo dello studio

Il presente studio ha lo scopo di descrivere il ruolo del sistema endocannabinoide e l’effetto della PEA in pazienti affetti da SLA. Gli obiettivi primari sono:

- la valutazione degli effetti clinici ed elettrofisiologici della PEA;
- studiare l’effetto della PEA sulle citochine infiammatorie muscolari e sistemiche;
- descrivere le modificazioni molecolari e fisiologiche del recettore nAChR in seguito al trattamento con PEA.

### Materiali e metodi

Si tratta di uno studio randomizzato in doppio cieco svolto presso il Centro di Malattie Rare e Neuromuscolari del Policlinico Umberto I di Roma. Ad oggi sono stati reclutati 28 pazienti, 21 dei quali hanno concluso il protocollo, randomizzati in due gruppi: il primo ha assunto PEA + Riluzolo, il secondo placebo + Riluzolo. Il protocollo ha previsto 6 visite, per la durata totale di 16 settimane. Ad ogni visita, ciascun paziente è stato sottoposto a valutazioni cliniche e prelievi ematologici; ai tempi T0 e T5 è stata

inoltre eseguita un’agobiopsia muscolare e una valutazione elettroencefalografica.

### Risultati

Dal punto di vista clinico, nei pazienti trattati con PEA si è riscontrato un rallentamento del declino funzionale (misurato dagli score ALSFRS e MRC) rispetto al gruppo placebo, nonché una stabilizzazione della funzione respiratoria (FVC alla spirometria) (Fig. 4, 5, 6). La valutazione elettrofisiologica non ha mostrato differenze significative tra i due gruppi.

Dal punto di vista molecolare, nel gruppo trattato con PEA è emersa un’upregulation della subunità  $\epsilon$  di nAChR e una riduzione dei livelli locali di citochine pro-infiammatorie (Fig. 7, 8, 9, 10).

Inoltre, lo studio dei recettori nAChR ha mostrato un aumento del tempo di decadimento della corrente IACH nel gruppo placebo, e una sua diminuzione nel gruppo trattato con PEA (Fig. 11).

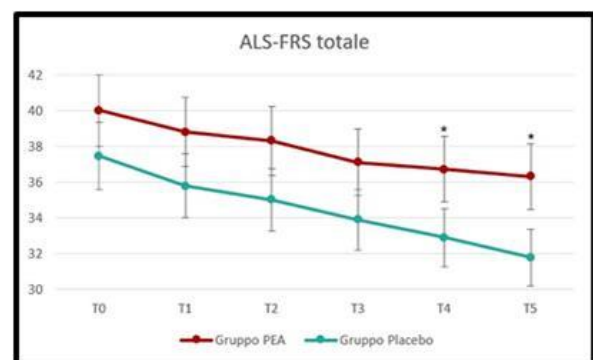


Fig. 4. Andamento longitudinale dello score clinico ALS-FRS totale (\* $p < 0,05$ ).

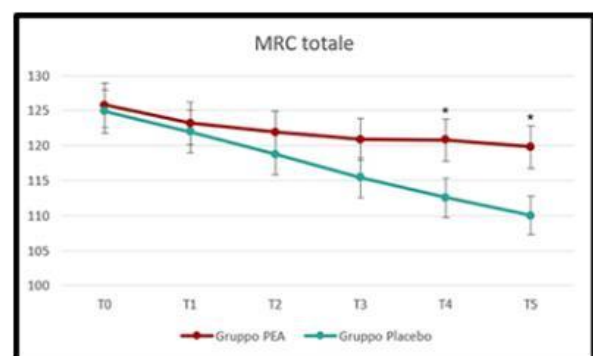
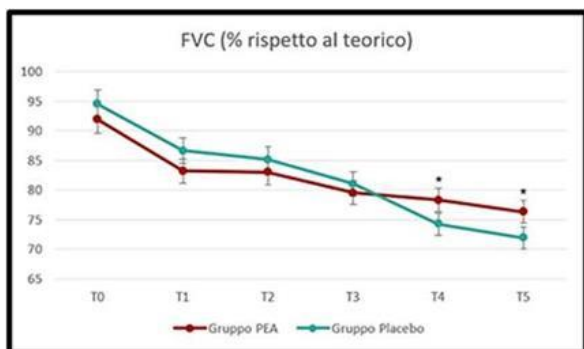
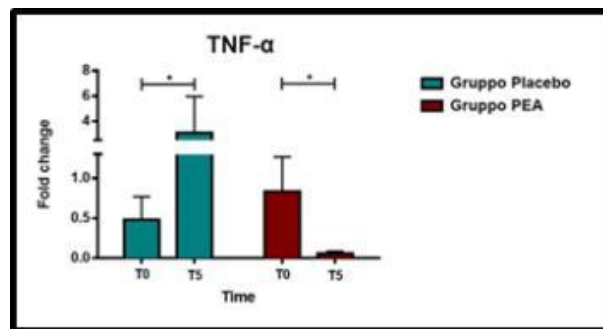


Fig. 5. Andamento longitudinale dello score clinico MRC totale (\* $p < 0,05$ ).

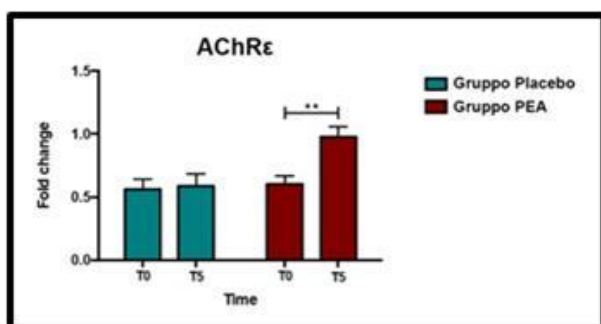




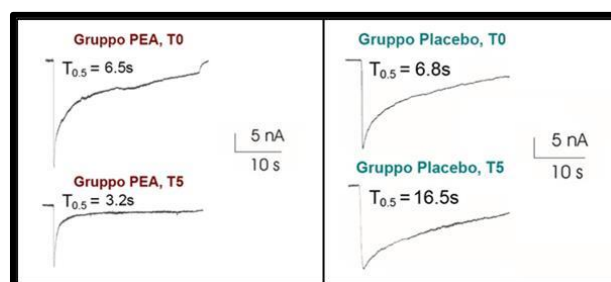
**Fig. 6.** Andamento longitudinale del valore di FVC (\* $p < 0,05$ ).



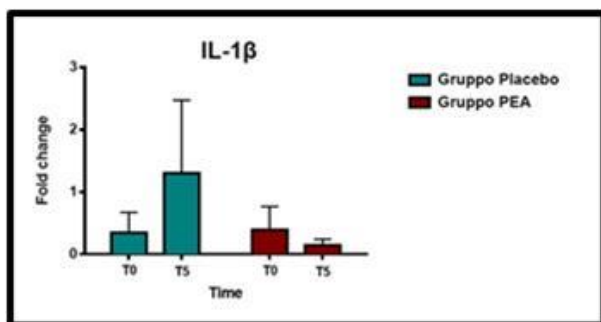
**Fig. 10.** Andamento della trascrizione di TNF- $\alpha$  (\* $p < 0,05$ ).



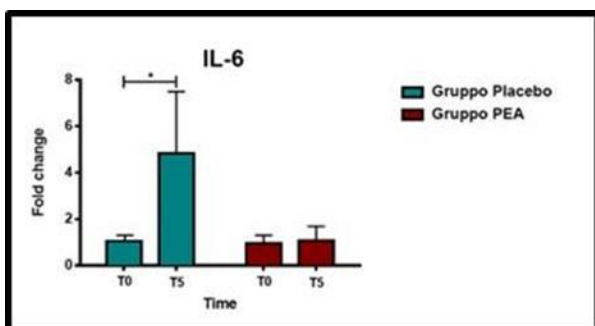
**Fig. 7.** Andamento della trascrizione della subunità  $\epsilon$  di AChR (\*\* $p = 0,0079$ ).



**Fig. 11.** Correnti evocate in oocita di *Xenopus* in seguito a microtrapianto di membrane muscolari da paziente trattato con PEA (Palma, 2016) e da paziente del gruppo placebo, ai tempi T0 (A) e T5 (B). Il tempo di dimezzamento della corrente I<sub>AChR</sub> (T<sub>0,5</sub>) passa da 6,8 secondi a 16,5 secondi nel placebo, dimostrando il passaggio del recettore AChR da una cinetica rapida ad una più lenta. Al contrario, nel paziente trattato con PEA, il tempo di dimezzamento si riduce da 6,5 a 3,2 secondi.



**Fig. 8.** Andamento della trascrizione di IL-1 $\beta$ .



**Fig. 9.** Andamento della trascrizione di IL-6 (\* $p < 0,05$ ).

## Discussione

I risultati fin qui analizzati, sebbene vadano considerati preliminari e parziali, aggiungono nuovi elementi ai dati emersi dal precedente studio (Palma et al., 2016) e rafforzano l'ipotesi che il muscolo eserciti un ruolo rilevante nella patogenesi della SLA e che il recettore AChR possa essere considerato a tutti gli effetti un target farmacologico.

Quanto appena detto trova le sue basi nella convergenza dei risultati clinici e di quelli molecolari. Un dato clinico significativo e inedito riguarda l'andamento dell'ALSFRS totale, che nel gruppo trattato con PEA mostra un declino minore nel corso del protocollo sperimentale. Ciò potrebbe

contribuire a dare un nuovo significato agli effetti della PEA dal punto di vista clinico. Secondo questa ipotesi, dunque, la PEA sarebbe in grado di rendere più stabile il declino funzionale, con un deterioramento della disabilità totale (spinale, bulbare e respiratoria) ridotto sia dal punto di vista temporale (ovvero più lento), sia dal punto di vista dell'intensità (ovvero meno accentuato). Tale riscontro è ancora più importante se si considera l'ALSFERS uno score con potere predittivo in termini di sopravvivenza (Kimura et al., 2006). Il ridotto declino funzionale in termini di disabilità trova la sua spiegazione nella preservazione della forza muscolare segmentale, misurata con il punteggio MRC. Anche questo parametro, infatti, mostra un declino più lento e meno accentuato nel gruppo trattato con PEA. Il presente studio ha inoltre confermato l'effetto stabilizzante della PEA sul declino della funzione respiratoria misurata come Capacità Vitale Forzata, che dimostra un andamento più rapido nel gruppo placebo. Questi tre parametri hanno dimostrato di essere strumenti affidabili nel monitoraggio della progressione di malattia, nonché di poter predire la sopravvivenza dei pazienti con SLA in base al loro declino nel tempo (Magnus et al., 2002). L'ipotesi che la PEA possa aumentare la sopravvivenza in questi pazienti necessita di ulteriori studi con numerosità campionaria e tempi di follow-up maggiori.

La stabilizzazione dei parametri clinici trova giustificazione e fondamento nei risultati molecolari. Lo studio avvalorava una delle acquisizioni più importanti del precedente lavoro (Palma et al., 2016), ovvero la selettività d'azione della PEA sulla subunità  $\epsilon$  dell'AChR. Come precedentemente enunciato, quest'ultima è l'isoforma recettoriale che prevale nell'adulto sano, mentre la  $\gamma$  risulta l'isoforma preponderante nella vita fetale e a seguito della denervazione. Quello che si osserva nei pazienti che hanno assunto la PEA è una *up-regulation* statisticamente significativa della subunità  $\epsilon$ , a scapito di un livello che si mantiene

pressoché invariato nel gruppo dei controlli. Dal momento che tale subunità si concentra perlopiù a livello della giunzione neuromuscolare, la sua *up-regulation* è correlata con la stabilizzazione di questa importante struttura anatomico-funzionale. La subunità  $\gamma$ , invece, può essere interpretata come un indice di denervazione. I livelli di quest'ultima aumentano in entrambi i gruppi senza mostrare differenze significative. L'analisi funzionale del recettore AChR è stata svolta, fino ad ora, soltanto su campioni biotici provenienti da pazienti nel gruppo placebo. Attraverso la tecnica di microtrapianto di membrane muscolari in oociti di *Xenopus*, si è dimostrato che in questo gruppo il recettore AChR aumenta il tempo di decadimento della corrente IACH. Questo effetto potrebbe essere dovuto alla diversa composizione in subunità del recettore stesso, che in seguito ai fenomeni di denervazione e reinnervazione sostituisce la subunità  $\epsilon$  con la subunità  $\gamma$ . È infatti stato dimostrato che la sostituzione della subunità  $\gamma$  fetale con la subunità  $\epsilon$  conferisce al recettore AChR una cinetica di attivazione e inattivazione più rapida, adatta alla contrazione muscolare tipica della vita adulta (Camacho et al., 1993). È lecito quindi ipotizzare che la sostituzione inversa, a seguito dei fenomeni di denervazione e reinnervazione, possa avere l'effetto contrario di rallentare la cinetica del recettore AChR. Questa modificazione interferirebbe con la sommazione temporale dell'impulso nervoso, l'unico compenso disponibile (seppur temporaneo) per poter aumentare la forza di contrazione in seguito alla degenerazione dei motoneuroni e alla perdita di unità motorie, e quindi in seguito alla perdita della funzione di sommazione spaziale. Per sommazione spaziale si intende il reclutamento, all'aumentare della forza da esercitare, di nuove unità motorie secondo la legge di Henneman, secondo la quale vengono reclutate per prime le unità motorie più piccole, specializzate nei movimenti fini, e poi le unità motorie più grandi, meno precise, ma in grado di

generare più forza. Per sommazione temporale si intende, invece, la possibilità di generare più forza muscolare con le unità motorie rimanenti, stimolandole a frequenze più elevate. Una cinetica recettoriale più lenta impedisce quindi all'unità motoria di lavorare in frequenza, per cui il SNC perderebbe un importante funzione di compenso. Conseguentemente, il declino funzionale sarà più rapido in quei pazienti che presentano un recettore AChR con cinetica lenta. In questo senso, l'aumento dell'espressione della subunità  $\epsilon$  nel gruppo dei pazienti trattati assume ancora maggiore importanza. Inoltre, lo studio citato nella sezione precedente (Palma et al., 2016) ha già dimostrato che la PEA è in grado di ridurre il rundown della corrente IACh, rendendo il recettore AChR in grado di rispondere meglio a stimolazioni di frequenza più elevata.

Le analisi elettrofisiologiche hanno mostrato un andamento paragonabile tra i due gruppi, con una progressiva degenerazione del secondo motoneurone. Questo risultato è coerente con l'ipotesi di lavoro, per la quale l'effetto di stabilizzazione clinica della PEA si esplica conservando il meccanismo di compenso della sommazione temporale con un'azione a livello della giunzione neuromuscolare, piuttosto che rallentando effettivamente la degenerazione del secondo motoneurone.

Per quanto riguarda lo studio delle citochine pro-infiammatorie, diversi lavori ne hanno correlato i livelli con la progressione dell'atrofia muscolare in un'ampia varietà di condizioni cliniche (Haddad et al., 2005; Londhe & Guttridge, 2015; Späte & Schulze, 2004; Thoma & Lightfoot, 2018). Nell'ambito della Sclerosi Laterale Amiotrofica, diversi studi recenti hanno dimostrato un aumento dei livelli delle citochine pro-infiammatorie nel sangue venoso periferico rispetto a controlli sani appaiati per età (Hu et al., 2017; Tortelli et al., 2020) e una correlazione tra i livelli di IL-6 e la riduzione dell'ampiezza del cMAP da stimolazione del nervo frenico

(Pronto-Laborinho et al., 2019). Le analisi eseguite finora hanno analizzato l'infiammazione locale attraverso lo studio dei livelli di mRNA delle citochine nei campioni biotici di muscolo. Al momento questo dato, in questa popolazione, risulta inedito nella letteratura scientifica. Le analisi hanno dimostrato una riduzione dell'infiammazione locale nel gruppo trattato con PEA. Il significato e l'importanza di questo dato andranno approfonditi con ulteriori studi. È possibile che l'effetto anti-infiammatorio della PEA abbia un'azione sinergica con l'effetto a livello della giunzione neuromuscolare sulla riduzione del declino funzionale. In alternativa, potrebbe esserne la causa: secondo questa ipotesi la ridotta infiammazione locale andrebbe a preservare i livelli di subunità  $\epsilon$  e quindi la cinetica rapida del recettore AChR. Una terza ipotesi è che l'effetto principale sia a livello della giunzione muscolare, e che la ridotta infiammazione locale derivi dal miglioramento dell'efficacia della contrazione muscolare. Questi dati dovranno essere integrati con quelli relativi ai livelli di citochine pro-infiammatorie nel sangue venoso periferico, indicativi della condizione infiammatoria sistemica.

### **Conclusioni**

Il presente studio consolida l'ipotesi che il sistema endocannabinoide eserciti un ruolo nella SLA e che la PEA possieda potenziali effetti clinici e molecolari sul muscolo affetto dalla malattia. Sebbene i risultati finora analizzati siano promettenti, tuttavia, è necessario consolidare tali dati preliminari con il completamento dello studio tramite l'arruolamento degli altri 6 pazienti previsti. La numerosità campionaria rappresenta, pertanto, uno dei limiti maggiori dei risultati finora presentati. I dati presentati andranno integrati con lo studio dei livelli degli endocannabinoidi a livello del sangue periferico e del muscolo, nonché con l'analisi della funzione fisiologica del recettore AChR nel gruppo trattato e con i livelli di citochine pro-infiammatorie nel sangue venoso periferico.

## BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

- Brown RH, Al-Chalabi A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *New Engl J Med* 2017; 377: 162-72.
- Camacho P, Liu Y, Mandel G, Brehm P. The epsilon subunit confers fast channel gating on multiple classes of acetylcholine receptors. *J Neuroscience* 1993; 13: 605-13.
- Dupuis L, Loeffler JP. Neuromuscular junction destruction during amyotrophic lateral sclerosis: insights from transgenic models. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9: 341-6.
- Haddad F, Zaldivar F, Cooper DM, Adams GR. IL-6-induced skeletal muscle atrophy. *J Applied Physiol* 2005; 98: 911-7.
- Hu Y, Cao C, Qin XY, et al. Increased peripheral blood inflammatory cytokine levels in amyotrophic lateral sclerosis: A meta-analysis study. *Scientific Reports* 2017; 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09097-1>.
- Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 2011; 377: 942-55.
- Kimura F, Fujimura C, Ishida S, et al. Progression rate of ALSFRS-R at time of diagnosis predicts survival time in ALS. *Neurology* 2006; 66: 265-7.
- Kirby J, Al Sultan A, Waller R, Heath P. The genetics of amyotrophic lateral sclerosis: current insights. *Degener Neurol Neuromuscul Dis* 2016; 6: 49-64.
- Londhe P, Guttridge DC. Inflammation induced loss of skeletal muscle. *Bone* 2015; 80: 131-42.
- Magnus T, Beck M, Giess R, Puls I, Naumann M, Toyka KV. Disease progression in amyotrophic lateral sclerosis: Predictors of survival. *Muscle Nerve* 2002; 25: 709-14.
- Masrori P, Van Damme P. Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. *Eur J Neurol* 2020; 27: 1918-29.
- Musarò A. State of the art and the dark side of amyotrophic lateral sclerosis. *World J Biol Chem* 2010; 1: 62.
- Palma E, Inghilleri M, Conti L, et al. Physiological characterization of human muscle acetylcholine receptors from ALS patients. *Proc Nat Acad Scien USA* 2011; 108: 20184-8.
- Palma E, Reyes-Ruiz JM, Lopercolo D, et al. Acetylcholine receptors from human muscle as pharmacological targets for ALS therapy. *Proc Nat Acad Scien USA* 2016; 113: 3060-5.
- Pronto-Laborinho A, Pinto S, Gromicho M, Pereira M, Swash M, de Carvalho M. Interleukin-6 and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sciences* 2019; 398: 50-3.
- Späte U, Schulze PC. Proinflammatory cytokines and skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004; 7: pp. 265- 9.
- Swinnen B, Robberecht W. The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2014; 10: 661-70.
- Thoma A, Lightfoot AP. Nf-kb and inflammatory cytokine signalling: Role in skeletal muscle atrophy. *Adv Exp Med Biol* 2018; 1088: 267-79.
- Tortelli R, Zecca C, Piccininni M, et al. Plasma Inflammatory Cytokines Are Elevated in ALS. *Front Neurol* 2020; 11: 552295.
- Sintesi della Tesi di Laurea discussa il 24 giugno 2021
- Dott. Christian Laurini, Facoltà di Medicina e Odontoiatria, Dipartimento di Neuroscienze Umane, "Sapienza" Università di Roma
- Prof. Maurizio Inghilleri, Dipartimento di Neuroscienze Umane, "Sapienza" Università di Roma
- Per la corrispondenza:  
christian.laurini96@gmail.com

# **Tesi di Laurea: “Ruolo delle varianti nel numero di copie nel *Disturbo dello Spettro Autistico*” (Sintesi)**

**Autore: C. Micolonghi**

**Relatore: A. Pizzuti**

## **Abstract**

**Introduzione.** Il disturbo dello spettro autistico (ASD) rappresenta un gruppo eterogeneo di disordini del neurosviluppo dal punto di vista clinico ed eziologico. Finora sono stati identificati circa 100 geni che convergono su specifici *pathway* molecolari.

**Obiettivo studio.** Le Varianti nel Numero di Copie (CNV) rappresentano la causa genetica dell'autismo in circa il 10-15% dei pazienti. Sebbene vi sia un accordo quasi universale sul fatto che l'ASD sia una condizione complessa, in cui concorrono molteplici fattori genetici e ambientali, è ancora discusso il ruolo delle varianti genetiche comuni e rare nella patogenesi dell'ASD. Questo studio ci ha permesso di identificare diverse CNV, che sono state studiate per andare ad analizzare il loro ruolo nel fenotipo del paziente, soffermandoci sulla possibile correlazione tra CNV ereditate e familiarità, differenziazione delle capacità linguistiche nei due sessi e il ruolo dei geni coinvolti in tali varianti.

**Materiali e Metodi.** Per rilevare la presenza di CNV abbiamo condotto un'analisi di ibridazione genomica comparativa *array* (*array*-CGH) e un'analisi di ibridazione con sonde specifiche per polimorfismi a singolo nucleotide (SNP-*array*) in 120 bambini con fenotipo ASD diagnosticato con l'*Autism Diagnostic Observation Schedule-Second Edition* (ADOS-2) e l'*Autism Diagnostic Interview-Revised* (ADI-R).

**Risultati.** Le analisi hanno documentato la presenza di 58 pazienti con CNV, di cui 14 pazienti con varianti associate a suscettibilità per disturbi del neurosviluppo (2 *de novo* e 12 ereditate) e 44 pazienti con CNV ad incerto significato, mentre 62 casi presentavano un *array* privo di CNV. La ricerca di una correlazione tra la CNV ereditata e la familiarità per patologie

neuropsichiatriche è risultata non statisticamente significativa, ma ciò potrebbe essere spiegato dalla variazione della manifestazione fenotipica di un allele in una data popolazione (OR=0.77, IC 95%=0.38-1.56  $P_{value}=0.58$ ). La categorizzazione e descrizione clinica in base alle capacità linguistiche nei due sessi ci ha permesso di osservare come il rapporto maschi/femmine sia spostato verso una maggiore averbalità nel sesso maschile, ciò a sostegno della teoria del ruolo protettivo femminile nei confronti di varianti patogene (OR=2.4, IC 95%=0.93-6.09  $P_{value}=0.09$ ). L'analisi dei geni coinvolti nella variante ci ha permesso di osservare che i geni che codificano per proteine neuronali e citoscheletriche sono più spesso coinvolti nei casi associati ad alto funzionamento (OR=17.5, IC 95%=2.17-210.2  $P_{value}=0.006$ ; OR=7.0, IC 95%=1.37-39  $P_{value}=0.04$ ). Non risulta chiaro invece se i geni per Non-Coding RNA siano associati a un funzionamento cognitivo più basso rispetto alla popolazione ASD generale (OR=0.88, IC 95%=0.07-6.65  $P_{value}>0.99$ ).

**Conclusioni.** Premesso che la frequenza con cui un allele si manifesta fenotipicamente all'interno di una popolazione varia, poiché la penetranza di queste varianti dipende sia dal genotipo che dall'influenza dell'ambiente, la relazione delle CNV con le diverse informazioni raccolte ci porta a riconoscere il loro ruolo fondamentale ma non del tutto chiaro. Nella varietà dei fenotipi dell'ASD concorrono più fattori: varianti comuni e/o rare, la capacità di buffering del background genetico sulle mutazioni più deleterie, la penetranza delle varianti, il sesso del probando, i geni compresi nelle varianti e i fattori ambientali. Alla luce di tutto ciò l'autismo non va considerato come una singola entità, ma come un continuum della diversità umana.

## **Introduzione**

**Il disturbo dello spettro autistico (ASD)** rappresenta un gruppo eterogeneo di disordini del neurosviluppo dal punto di vista clinico ed eziologico.

Fu inizialmente descritto intorno al 1940 quasi simultaneamente in America dallo psichiatra Kanner e in Austria da Asperger. Da allora sono stati fatti notevoli sforzi da parte della comunità scientifica per comprendere la genetica dell'autismo, che però rappresenta ancora una delle sfide più importanti della ricerca. L'autismo non si adatta esattamente ai modelli di ereditarietà noti e, sebbene questo potrebbe essere solo il risultato dell'eterogeneità eziologica non ancora completamente conosciuta, molti dati indicano che bisognerà incorporare nuove conoscenze dalle Neuroscienze e dalla Genetica per comprendere appieno le basi fisiopatologiche dell'autismo. Finora sono state associate anomalie in centinaia di geni, che includono varianti sia rare che comuni. Questi geni convergono su specifici percorsi molecolari comuni, che guidano lo sviluppo delle caratteristiche principali dell'ASD. Diversi studi genetici sul disturbo dello spettro autistico hanno identificato questi geni come regolatori chiave della plasticità sinaptica. In effetti, molti dei geni *di rischio*, che sono stati collegati a questo disturbo, codificano per proteine di *scaffolding* sinaptico, recettori, molecole di adesione cellulare o proteine coinvolte nel rimodellamento della cromatina, trascrizione, proteine sintesi o degradazione, o dinamiche del citoscheletro. Cambiamenti in una qualsiasi di queste proteine possono aumentare o diminuire l'adesione neuronale, il numero di sinapsi e quindi la connettività neuronale nel cervello, causando una ridotta omeostasi sinaptica, andando ad aumentare il rischio di un individuo di sviluppare l'ASD<sup>1,2</sup>.

I disturbi dello spettro autistico (dall'inglese *Autism Spectrum Disorders*, ASD) sono un insieme eterogeneo di disturbi del

neurosviluppo caratterizzati da deficit persistente nella comunicazione sociale e nell'interazione sociale in molteplici contesti e pattern di comportamenti, e interessi o attività ristretti e ripetitivi.

Con l'introduzione nella pratica clinica del Manuale diagnostico e statistico dei Disturbi Mentali edizione 5 (DSM-V), la dizione "Disturbi Autistici" è stata sostituita da "Disturbi dello Spettro Autistico" a sottolineare che l'autismo rappresenta uno "*spettro*" di patologie differenti tra di loro, non solo dal punto di vista eziologico ma anche dal punto di vista clinico e fenotipico. Andando a sottolineare la scelta di una classificazione di tipo dimensionale, senza una distinzione in sottotipi, con la riorganizzazione della triade sintomatologica in due domini<sup>1,3</sup>.

## **Ereditarietà**

La prevalenza del disturbo dello spettro autistico nel 2018 negli Stati Uniti si attestava su un valore di circa 1 individuo su 59, secondo il *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), con un rapporto 4:1 tra il genere maschile e il femminile. Sebbene le persone con ASD clinico e gli individui con tratti di tipo autistico differiscano l'uno dall'altro per gravità e/o grado di compromissione funzionale, studi sui gemelli hanno dimostrato che potrebbero condividere gli stessi geni di suscettibilità. L'influenza relativa dei fattori genetici, epigenetici e ambientali sul rischio di ASD rimane in discussione, ma tutti gli studi epidemiologici indicano che vi è un forte contributo genetico al rischio di ASD. Tutti gli studi sui gemelli condotti fino ad oggi sull'ASD dimostrano come i gemelli monozigoti (MZ) abbiano tassi di concordanza più elevati per l'ASD (che vanno dal 60% al 90%) rispetto ai gemelli dizigoti (DZ) (dallo 0% al 30%).

In sintesi, gli studi epidemiologici forniscono informazioni cruciali sul contributo genetico all'ASD. Tuttavia, non ci informano sui geni coinvolti o sul numero e



sulla frequenza delle loro varianti. Negli ultimi decenni c'è stata quella che viene definita da molti come una "epidemia di autismo" attribuibile principalmente a una maggiore consapevolezza sia da parte delle famiglie che dei professionisti, che ha portato all'identificazione di un maggior numero di casi<sup>1, 3, 4</sup>.

### **La genetica molecolare dell'ASD**

Una distinzione importante nella genetica dell'autismo è la differenza tra autismo "sindromico" e "non sindromico" (o idiopatico).

Nella maggior parte dei casi si tratta di forme idiopatiche (non sindromico) ossia forme multifattoriali dovute alla compartecipazione di cause genetiche ancora sconosciute e cause ambientali. Inoltre, molti dei geni che sembrano coinvolti nei casi di ASD non sindromico sono coinvolti anche nella disabilità intellettiva e nell'epilessia, a dimostrare che probabilmente appartengono a un continuum di disturbi del neurosviluppo che si manifestano in modi diversi. Le forme sindromiche invece sono condizioni associate alla presenza di una variante genetica responsabile di vere e proprie sindromi genetiche che, tra le varie manifestazioni cliniche, presentano anche il disturbo dello spettro autistico, come la sindrome dell'X fragile (*FMR1*), la sclerosi tuberosa (*TSC1*, *TSC2*) e la sindrome di Rett (*MECP2*).

Usando le tecniche standard di valutazione genetica, è possibile identificare una causa genetica nel 20-25% dei bambini con spettro autistico, per il restante 75-80% le cause rimangono sconosciute.

Le cause genetiche identificate dell'autismo possono essere classificate come anomalie cromosomiche citogeneticamente visibili (5%), varianti nel numero di copie (CNV) (cioè, delezioni submicroscopiche e/o duplicazioni) (10-20%), e disordini di un singolo gene (5%)<sup>1, 5</sup>.

### **L'interazione tra varianti comuni e rare nell'ASD**

Sebbene vi sia un accordo quasi universale sul fatto che il Disturbo dello Spettro Autistico sia una condizione complessa, in cui concorrono molteplici fattori genetici e ambientali, c'è meno accordo sull'importanza delle varianti genetiche comuni e rare nella responsabilità dell'ASD. Nel "*Multiple Hits Model*" l'autismo viene definito come il risultato di combinazioni di tre tipi principali di mutazioni: varianti rare de novo, varianti rare ereditate e varianti comuni:

- le varianti **rare**, ereditate o de novo, possono essere presenti in una persona con autismo ma anche nei parenti non affetti;
- le varianti **comuni** sono quelle presenti in più del 5% della popolazione. Ogni variante comune ha un lieve effetto biologico, che in combinazione, influisce sul rischio di autismo.

La diversità dell'autismo è il principale argomento a favore di questa ipotesi, dove infatti la stessa mutazione può portare a un diverso insieme di tratti in due persone. I dati epidemiologici e molecolari suggeriscono che il contributo genetico all'ASD può essere il risultato di una combinazione di rare varianti causali deleterie e una miriade di alleli a basso rischio (definiti anche come *background genetico*, costituito da *single nucleotide polymorphisms* comuni). L'interazione tra rare varianti causali e comuni alleli a basso rischio influenzerà quindi la **diversità fenotipica** osservata nella popolazione. A seconda della capacità degli alleli comuni a basso rischio di tamponare l'impatto di rare varianti deleterie, può essere prodotto un fenotipo molto diverso.

Ad esempio in un individuo con un *background* genetico con un alto carico di varianti di rischio comuni dell'ASD, anche solo una variante rara causerà ASD. Al contrario, un individuo con un basso

*background* genetico di varianti a rischio comuni, solo un alto carico di mutazioni rare deleterie causerà ASD. Quindi un *background* genetico con una forte capacità di tamponamento o *buffering* genetico, farà fronte all'effetto di rare variazioni genetiche canalizzando l'esito fenotipico. Al contrario, un *background* genetico con una bassa capacità di *buffering* genetico potrebbe rivelare l'effetto di mutazioni taciute nei genitori.

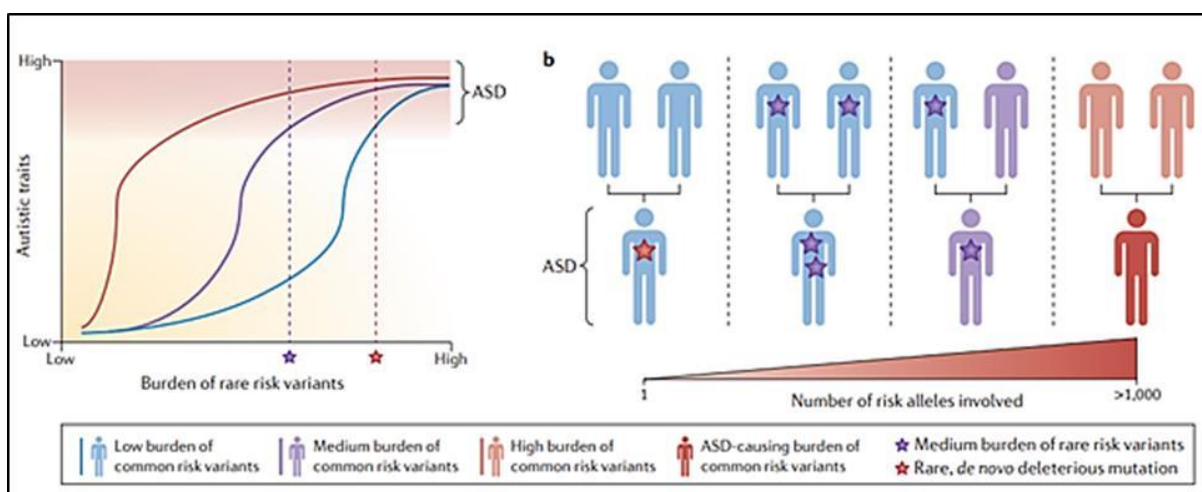
Possiamo illustrare tre situazioni estreme (Fig. 1)<sup>6</sup>.

- Nella prima situazione, un individuo ha un elevato *buffer* genetico e quindi è a basso rischio di ASD, anche se ha un carico relativamente alto di geni a rischio ASD deleteri rari. In questa situazione, solo una mutazione altamente penetrante che appare de novo nel probando potrebbe causare ASD. Questo modello potrebbe rappresentare il 10-25% dei casi di ASD, specialmente quelli con disabilità intellettiva.
- Nella seconda situazione, un individuo ha

un *background* genetico che funge da *buffer* genetico moderato per ASD. Di conseguenza, svilupperanno ASD quando ricevono solo un carico relativamente moderato di mutazioni rare. Questo modello potrebbe spiegare l'osservazione di più varianti rare in alcuni pazienti con ASD.

- Infine, nella terza situazione, l'individuo eredita un *background* genetico con un *buffer* genetico molto basso ed è quindi ad alto rischio di ASD. In questo caso, non è necessario un carico di rare mutazioni deleterie, infatti l'accumulo di un carico elevato di alleli a basso rischio sarà sufficiente a causare ASD. Questo modello potrebbe spiegare le famiglie in cui i genitori hanno tratti autistici subclinici<sup>6</sup>.

In sintesi, mutazioni comuni, rare e de novo possono tutte contribuire al rischio genetico di ASD ma nonostante ciò, resta dogma indiscusso la combinazione dei fattori ambientali e predisposizione genomica a sviluppare un fenotipo clinico ASD<sup>6,7,8</sup>.



**Fig. 1.** Modelli diversi di sviluppo di ASD.

### **Test molecolari e consulenza genetica nel Disturbo dello Spettro Autistico**

Prima della disponibilità della tecnologia di sequenziamento era possibile identificare alterazioni nella quantità e nella struttura dei cromosomi, definite come varianti strutturali microscopiche (dimensioni ~ 3 Mb o più). Più recentemente, nuove strategie e strumenti per l'analisi del genoma umano hanno rivelato variazioni del DNA (con dimensioni comprese tra ~ 1 kb e 3 Mb), coinvolgenti segmenti più piccoli rispetto a quelli identificati al microscopio ottico, ma più grandi di quelli rilevabili mediante sequenziamento. Queste tecnologie sono rappresentate da:

- ibridazione genomica comparativa su Microarray;
- ibridazione con sonde specifiche per polimorfismi a singolo nucleotide su Microarray.

Le varianti strutturali submicroscopiche, definite come CNV, sono segmenti di DNA più grandi di 1000bp (> 1kb), con un numero di copie variabile rispetto a un genoma di riferimento.

Numerose CNV (duplicazioni e delezioni) sono state descritte negli individui con ASD. Queste variano in dimensioni: da riarrangiamenti citogeneticamente visibili, a regioni con variazione del numero di copie (tipicamente > 1 kb) e regioni più piccole di inserzione e delezione (indel, tipicamente < 1 kb), ereditata o insorta de novo. Gli studi di array-CGH concordano in gran parte sull'evidenza di un maggior carico di riarrangiamenti de novo (sia delezioni che duplicazioni) nelle famiglie con ASD rispetto ai controlli sani, con la presenza di CNV da tre a cinque volte più alta. Inoltre, vi è un carico mutazionale maggiore per le CNV di grandi dimensioni tra i casi di ASD rispetto ai controlli non ASD. Queste varianti, inoltre, si sovrappongono a geni noti per disabilità intellettiva o a geni che sono espressi maggiormente a livello cerebrale, più

specificamente quelli che sono strutturalmente e/o funzionalmente correlati ai set di geni di regolazione della densità postsinaptica o del rimodellamento/trascrizione della cromatina. Le varianti più comunemente identificate associate all'ASD sono delezioni o duplicazioni nel locus 16p11.2, duplicazioni nei loci 15q11-13 e delezioni nel locus 22q11. Questi loci vengono regolarmente deleti o duplicati, probabilmente a causa di eventi di ricombinazione che si verificano nelle regioni genomiche introniche fatte di ripetizioni a bassa copia che fiancheggiano i siti di start/end delle CNV<sup>8,9,10</sup>.

### **Interpretazione dei risultati dei test genetici**

Una delle principali sfide dopo l'esecuzione dei test genetici è l'interpretazione dei risultati e, in particolare, la definizione di una probabile patogenicità delle varianti identificate. L'*American College of Medical Genetics and Genomics* e l'*Association for Molecular Pathology* hanno pubblicato linee guida congiunte per la classificazione delle varianti in *benigne*, *patogenetiche* e *incerto significato*<sup>10</sup>. Per classificare le varianti si tiene conto della frequenza delle varianti nella popolazione, della previsione computazionale in silico e dei risultati degli studi funzionali che considerano l'impatto della mutazione sulla struttura e sulla funzione cerebrale in vitro.

Nel complesso, l'interpretazione del significato clinico di una CNV identificata in un paziente autistico può essere impegnativa e insoddisfacente per la famiglia del paziente. Attualmente il ruolo dello specialista in Genetica è quello di discutere al meglio delle sue conoscenze le implicazioni dei risultati del array-CGH e di suggerire studi per ulteriori chiarimenti sui risultati<sup>7,8</sup>.

### **Scopo dello studio**

Il presente studio osservazionale si pone lo scopo di approfondire il ruolo delle CNV nel ASD.

Questo studio si è soffermato su:

- Correlazione tra la CNV ereditata, per segregazione materna o paterna, e la familiarità per patologie neuropsichiatriche raccolta in anamnesi. Studi dimostrano che se la CNV ereditata è potenzialmente patogena, la sua presenza in un genitore non-afetto può indicare una penetranza ridotta e un aumento del rischio per ASD nelle gravidanze future<sup>11</sup>. È quindi molto importante effettuare un'accurata anamnesi familiare, con particolare attenzione alle caratteristiche comportamentali e alle altre condizioni neuropsichiatriche dei genitori del probando.
- Un altro punto in cui il nostro studio si è soffermato è la categorizzazione e descrizione clinica a seconda delle capacità linguistiche nei due sessi (pazienti verbali/averbali). Il linguaggio espressivo, valutato mediante le scale di Griffiths, si è osservato essere compromesso nel 53% dei pazienti, definiti come *non verbali*, mentre il 47% presenta una compromissione del linguaggio espressivo di grado lieve e vengono definiti come *verbali*. Così come in letteratura, anche nel nostro studio si è osservata una maggiore capacità nelle femmine con autismo di attuare dei comportamenti di *mimetizzazione* rispetto ai maschi autistici, nonostante i simili dei loro tratti autistici. La *mimetizzazione*, è definita la strategia utilizzata per apparire “meno autistiche” nelle interazioni sociali, è considerata una caratteristica chiave del fenotipo femminile autistico. Diversi studi qualitativi hanno esplorato le esperienze di donne con diagnosi di autismo e questi hanno portato a resoconti ricchi e dettagliati del loro *camuffamento*, ma anche degli effetti deleteri che questa tecnica va a provocare sul soggetto. Infatti molte adolescenti hanno indicato che l'uso di queste strategie cognitivamente

impegnative ha provocato conseguenze psicologiche avverse<sup>12</sup>.

- Ruolo dei geni coinvolti nelle CNVs e correlazione con il funzionamento cognitivo. Molti dei geni “di rischio”, che sono stati collegati all'ASD, codificano per proteine di *scaffolding* sinaptico, molecole di adesione cellulare o proteine coinvolte nel rimodellamento della cromatina, proteine del citoscheletro<sup>2</sup>. È stato dimostrato che in pazienti con ASD portatori di mutazioni genetiche in **proteine neuronali**, il processo di omeostasi sinaptica potrebbe non essere in grado di contrastare gli effetti delle mutazioni sull'attività sinaptica, determinando un'attività neuronale troppo elevata o troppo bassa. L'anormale *sprouting* (o *pruning*) delle sinapsi a seguito di queste mutazioni potrebbe quindi portare a una anomala coordinazione e competizione tra le reti neuronali. Questo andrebbe a spiegare i problemi nell'integrazione delle informazioni attraverso diverse modalità sensoriali che si osservano negli individui con ASD<sup>6</sup>. Inoltre i neuroni dipendono dalle **proteine del citoscheletro**, come i microtubuli (MT), altamente dinamici per molti processi diversi durante lo sviluppo embrionale iniziale, tra cui la divisione e la migrazione cellulare, il traffico intracellulare e la trasduzione del segnale, nonché la corretta guida degli assoni e la formazione delle sinapsi. Il coordinamento e il supporto dei MT è cruciale affinché i neuroni appena formati migrino in modo appropriato al fine di stabilire connessioni neurali. Una volta stabilite le connessioni, i MT forniscono integrità strutturale e supporto per mantenere la connettività neurale durante lo sviluppo. Le anomalie nella migrazione neurale e nella connettività dovute a mutazioni genetiche delle proteine associate ai microtubuli possono portare a difetti di sviluppo dannosi. Prove crescenti suggeriscono che

queste mutazioni sono associate a molti diversi disturbi dello sviluppo neurologico, tra cui disabilità intellettive e disturbi dello spettro autistico<sup>13</sup>. Inoltre un gran numero di studi ha suggerito che gli **RNA non codificanti** (ncRNA) potrebbero essere nuovi promettenti bersagli per il trattamento dei disturbi dello sviluppo neurologico. Tuttavia i *pathway* regolatori, in cui sono coinvolti gli RNA non codificanti nei disturbi del neurosviluppo, sono molto complessi e i loro meccanismi molecolari sono ancora in gran parte sconosciuti. Molte sfide devono ancora essere intraprese prima che gli RNA non codificanti possano essere utilizzati di routine nelle indagini diagnostiche della pratica clinica<sup>14</sup>.

- Discussione, descrizione e analisi delle CNVs a suscettibilità riscontrate nel gruppo di pazienti selezionati.

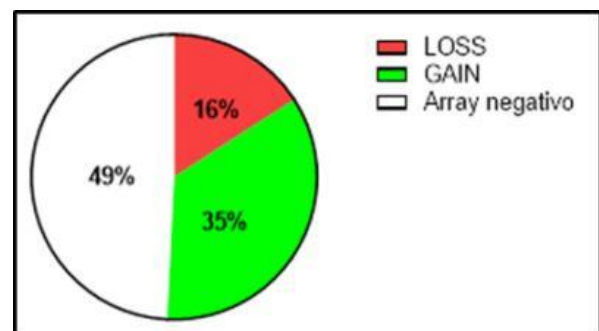
### **Materiali e metodi**

È stata condotta un'analisi di ibridazione genomica comparativa *array* (*array*-CGH) e/o un'analisi di ibridazione con sonde specifiche per polimorfismi a singolo nucleotide (*SNP-array*) in 120 bambini con diagnosi di ASD effettuata tramite l'*Autism Diagnostic Observation Schedule-Second Edition* (ADOS-2) e l'*Autism Diagnostic Interview-Revised* (ADI-R). Il DNA estratto dai campioni ematici dei pazienti è stato analizzato tramite la piattaforma *SNP-array* (*Affymetrix Genome-Wide Human 6.0*; *Affymetrix*, Palo Alto, CA) secondo il protocollo fornito dal produttore. La piattaforma è costituita da circa 1.8 milioni di markers (906.600 SNPs e 946.000 sonde oligonucleotidiche), localizzati nel genoma ad una distanza mediana di 680 bp, con una risoluzione media effettiva di 75 Kb. I dati relativi a 270 controlli sani (*International HapMap Project*), sono stati usati come *reference*. L'analisi dei data è stata effettuata mediante il software *Chromosome Analysis Suite software* versione 4.0 (*Affymetrix*).

Sono state esaminate e interpretate clinicamente le indagini genetiche svolte su 120 pazienti tra i 2 e i 6 anni (età media di 3 anni e 4 mesi), valutando le possibili differenze significative derivate dal confronto tra le loro caratteristiche di età, sesso, funzionamento cognitivo (alto/basso funzionamento, QI/QS), severità dei sintomi, linguaggio (verbale e non-verbale), EEG, ruolo dei geni coinvolti nelle CNV e familiarità per patologie neuropsichiatriche. Ogni paziente è stato valutato presso la Neuropsichiatria Infantile del Policlinico Umberto I per un test per la valutazione del funzionamento cognitivo, mediante la somministrazione di test per quoziente intellettivo o quoziente di sviluppo come le Scale di *Griffiths* e le Scale di *Wechsler*.

### **Risultati e Discussione**

Di questa coorte: 62 pazienti risultavano negativi all'*array*-CGH/*SNP-array*, mentre 58 pazienti presentavano un *array* positivo. Nei bambini con *array* positivo si sono riscontrate 44 duplicazioni e 20 delezioni, per un totale di 64 CNVs, 32 di origine materna, 25 di origine paterna, 4 de novo e 3 non valutabili per mancanza di dati (Fig. 2).



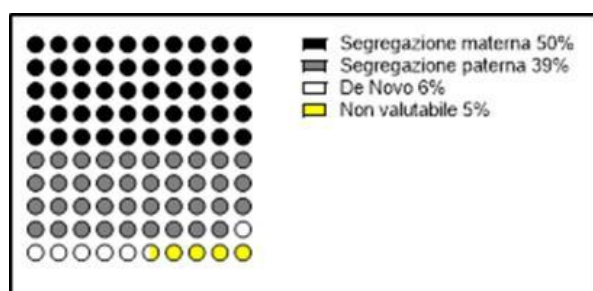
**Fig. 2.** Suddivisione dei pazienti.

Le 64 CNV riscontrate avevano una lunghezza media di circa 575 kb con un valore minimo e massimo compresi tra 36 kb e 16,6 Mb. I cromosomi che possedevano queste varianti erano tutti i cromosomi fatta eccezione per le coppie del 19, 20, 21 e il cromosoma Y. La maggiore frequenza di CNV si è riscontrata nei cromosomi X, 2 e 3. Dei

120 pazienti studiati 14 casi avevano CNVs associate a suscettibilità per disturbi del neurosviluppo e 44 pazienti avevano CNVs associate ad un incerto significato.

### **Correlazione tra la concordanza della CNV ereditata e la familiarità per patologie neuropsichiatriche**

All'interno di questo studio sono state valutate le segregazioni di origine materna o paterna delle varianti riscontrate. In particolare, mediante l'analisi statistica dei dati e le raccolte anamnestiche effettuate sui pazienti, si è ricercata una possibile correlazione tra la/e CNVs ereditate e la familiarità per patologie neuropsichiatriche. La familiarità per suddette patologie è stata presa in considerazione solo nel caso in cui vi fosse una concordanza col tipo di segregazione (linea materna/paterna). Tra i pazienti con varianti del numero di copie, l'analisi di segregazione ha mostrato una segregazione materna nel 50% dei casi (32 casi), paterna nel 39% dei casi (25 casi) e una origine de novo delle CNVs nel 6% dei casi (4 casi), con un 5% non valutabile per la mancanza di dati relativi ai genitori di alcuni pazienti (Fig. 3).



**Fig. 3.** Analisi di segregazione delle varianti.

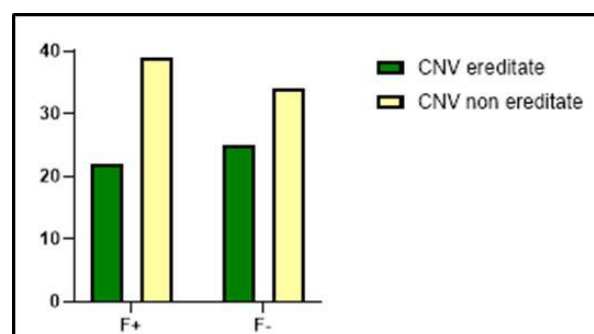
Dei 120 pazienti in studio 61 presentavano familiarità per patologie neuropsichiatriche, contrariamente ai restanti 59. I probandi con familiarità positiva sono stati ulteriormente suddivisi in base al risultato dell'array in pazienti con **CNV ereditate con concordanza** tra la segregazione paterna/materna e la linea di familiarità, e **CNV non ereditate**, perché de

novo o per assenza di concordanza o per assenza di riscontro di varianti all'analisi genetica. I soggetti con positività all'array per varianti segregate ma senza familiarità sono risultati essere 25 mentre i negativi all'analisi e senza familiarità 34 (Tab. 1).

	CNV ereditate	CNV non ereditate
<i>Familiarità +</i>	22	39
<i>Familiarità -</i>	25	34

**Tab. 1.** Suddivisione delle CNV.

In base a questi dati non è stata riscontrata nei nostri pazienti una correlazione significativa tra la segregazione delle CNV e la familiarità. Infatti non si sono riscontrate differenze significative nei due gruppi, visto che all'interno del gruppo con familiarità positiva il 36% possedeva CNV ereditate mentre il 64% no, mentre nel gruppo con familiarità negativa rappresentavano rispettivamente il 42.4% contro il 57.6% (OR=0.77, IC 95%= 0.38-1.56  $P_{value}=0.58$ ) (Fig. 4).



**Fig. 4.** Correlazione tra segregazione delle CNV e familiarità.

### **Categorizzazione e descrizione clinica a seconda delle capacità linguistiche nei due sessi**

In 120 bambini con diagnosi di ASD 99 sono maschi e 21 femmine, con un rapporto maschi/femmine di 5:1, in accordo con i dati di letteratura<sup>1, 2, 15</sup>.



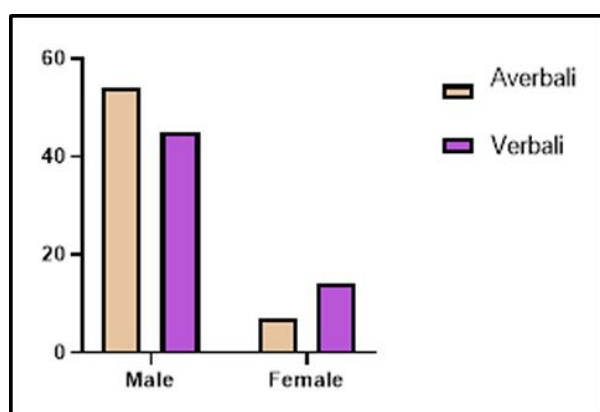
Tra i 99 maschi il 51% (51 casi) presentava un *array* negativo e il 49% (48 casi) un *array* positivo.

Tra le 21 femmine con diagnosi di ASD il 62% dei casi (13 casi) mostrava un *array* negativo, mentre il restante 48% (8 casi) un *array* positivo per CNV. Abbiamo riscontrato una distribuzione omogenea fra verbali e averbali nei pazienti maschi, a differenza delle femmine in cui le verbali risultano essere il doppio delle verbali (Tab. 2).

	Averbali	Verbali
Maschi	54	45
Femmine	7	14

**Tab. 2.** Distribuzione verbali e averbali in pazienti maschi e femmine.

Possiamo notare come il fenotipo averbale sia maggiormente presente nel sesso maschile, rappresentandone il 54,6%, rispetto a quello femminile in cui corrisponde al 33,3% (OR=2.4, IC 95%=0.93-6.09  $P_{value}=0.09$ ) (Fig. 5).



**Fig. 5.** Prevalenza del fenotipo averbale nei maschi.

Questo dato, se paragonato ai risultati presenti in letteratura fa risaltare la presunta capacità del sesso femminile di mitigare l'impatto fenotipico della variante genetica. Nel disturbo da spettro autistico vi è una forte prevalenza di pazienti di sesso maschile, ma nessun meccanismo sa ancora spiegare

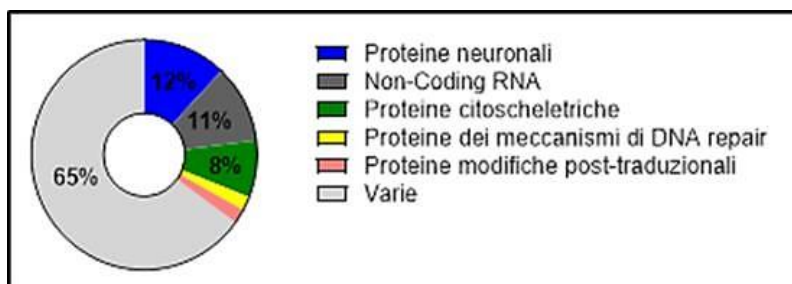
definitivamente questa differenza. Recenti studi portano l'attenzione su ulteriori differenze nella presentazione fenotipica, inclusi un minor numero di comportamenti ripetitivi e problemi comportamentali nelle femmine<sup>12</sup>. Gli studi dimostrano che le femmine sono protette dagli effetti delle varianti ereditate e/o de novo, suggeriscono un ruolo dei geni presenti sui cromosomi sessuali e/o degli ormoni sessuali, in particolare il testosterone. Infatti una possibile spiegazione potrebbe essere il cosiddetto "effetto protettivo femminile" per varianti genomiche patogene. A supporto di ciò un recente studio ha esaminato gli effetti dell'esposizione prenatale all'acido valproico nel cervello dei roditori<sup>16</sup>. Tale esposizione porta a comportamenti di tipo autistico con una maggiore prevalenza di manifestazioni negli animali maschi. Gli autori infatti hanno dimostrato che il tessuto cerebrale femminile ha una maggiore espressione di alcune varianti di splicing del gene BDNF rispetto a quello maschile. Ciò suggerisce che queste varianti di splicing conferiscano una migliore neuroprotezione. Tale reazione dipendente dagli agenti nocivi può quindi essere alla base dell'effetto protettivo femminile osservato nell'uomo.

È stato dimostrato infatti che vi è un eccesso di CNV ereditate dalla madre, dovute all'aumentata tolleranza del genere femminile per le aberrazioni genomiche. Per tale ragione le CNV ereditate da madri non-affette possono avere maggiori probabilità di essere patogene rispetto a quelle ereditate da padri sani<sup>17</sup>.

### **Ruolo dei geni coinvolti nelle CNVs e correlazione con il funzionamento cognitivo**

Mediante l'utilizzo di piattaforme di bioinformatica e l'analisi della letteratura scientifica, di banche dati e di database sono stati studiati i geni coinvolti nelle 56 CNVs dei pazienti in studio (Fig. 6).

In totale le varianti del numero di copie coinvolgono circa 166 geni di cui:



**Fig. 6.** Geni coinvolti nelle CNVs dei pazienti in studio.

- il 12% codificanti per proteine neuronali
- l'11% codificanti per Non-Coding RNA
- il 8% codificanti per proteine citoscheletriche (tubuline, proteine coinvolte al legame con l'actina, etc)
- il 2% codificanti per proteine coinvolte nei meccanismi di riparazione del danno al DNA
- il 2% codificanti per proteine coinvolte nei meccanismi post-traduzionali
- il restante 65% codificante per proteine di varia funzione non categorizzabili (da proteine coinvolte nel Sistema immunitario a fattori di trascrizione, proteine coinvolte nel metabolismo dei glucidi, etc).

Di questi geni i numeri più cospicui si sono osservati nelle categorie di geni per proteine neuronali, per ncRNA e per proteine

citoscheletriche, suggerendo un loro ruolo chiave nella patogenesi dell'ASD.

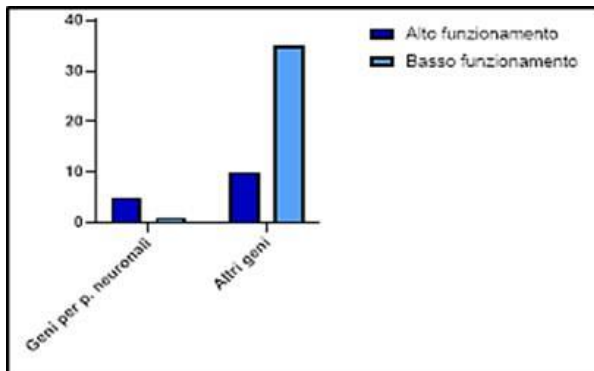
Ogni paziente ha effettuato test per la valutazione del funzionamento cognitivo, mediante Scale di *Griffiths* e *Weschler*. Del totale di 120 pazienti circa 85 mostravano un basso funzionamento, mentre 35 presentavano un alto funzionamento. All'interno di questi due gruppi siamo andati a identificare quale tipo di geni era coinvolto nelle CNV, riscontrando la seguente suddivisione (Tab. 3).

Si è evidenziato come vi fosse una diversa distribuzione tra alto e basso funzionamento tra i vari gruppi di geni. Tale diversità è stata analizzata per ognuno dei tre gruppi in rapporto ai geni non categorizzabili.

	Alto funzionamento	Basso funzionamento
Geni per proteine neuronali	5	1
Geni per Non-Coding RNA	1	4
Geni per proteine citoscheletriche	4	2
Geni per altre proteine (non categorizzabili)	10	35

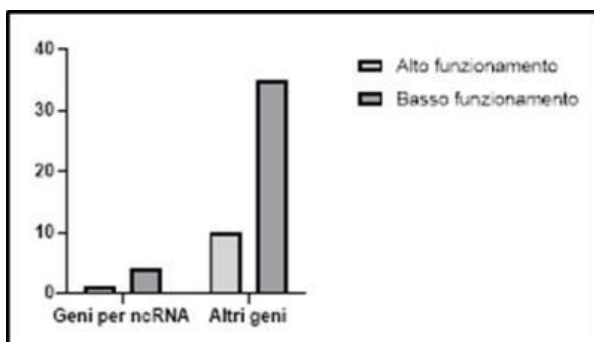
**Tab. 3.** Test di valutazione del funzionamento cognitivo.

Per quanto riguarda i geni per **proteine neuronali** l'83,3% dei casi risultava ad alto funzionamento, mentre il 16,7% a basso funzionamento, diversamente dai geni *non categorizzabili* coinvolti in cui risultavano essere ad essere ad alto funzionamento il 22,2% e a basso il 77,8% (OR=17.5, IC 95%=2.17-210.2  $P_{value}=0.006$ ) (Fig. 7).



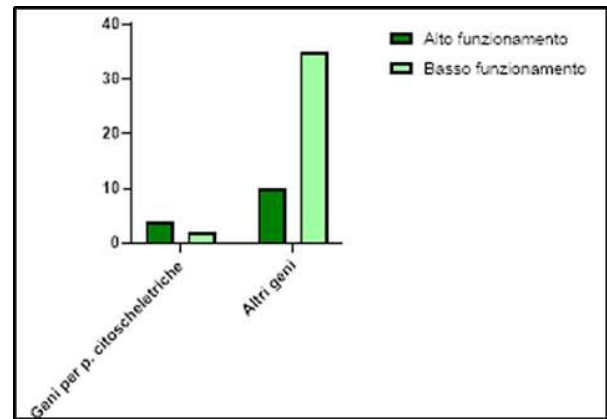
**Fig. 7.** Funzionamento dei geni per proteine neuronali.

Nei geni per **ncRNA** si è riscontrata una distribuzione tra alto e basso funzionamento del 20% contro l'80%, pressoché sovrapponibile ai valori dei geni non categorizzabili, già riportati (OR=0.88, IC 95%=0.07-6.65  $P_{value}>0.99$ ) (Fig. 8).



**Fig. 8.** Funzionamento dei geni per ncRNA.

Nel gruppo dei geni per **proteine citoscheletriche** il 66,7% è risultato essere ad alto funzionamento, mentre il 33,3% a basso, significativamente al 22,2% e 77,8% riportate per le mutazioni non categorizzabili (OR=7.0, IC 95%=1.37-39  $P_{value}=0.04$ ) (Fig. 9).



**Fig. 9.** Funzionamento dei geni per proteine citoscheletriche.

Da questi dati si evince l'importanza del ruolo delle proteine neuronali e citoscheletriche nell'autismo ad alto funzionamento. Per quanto riguarda le varianti nei geni per ncRNA risulta una maggiore presenza di un basso funzionamento, ma non differente da una maggiore prevalenza del basso funzionamento nella popolazione generale ASD.

#### **Geni candidati in CNVs associate a suscettibilità per disturbi del neurosviluppo**

I 14 pazienti con CNVs associate a suscettibilità per disturbi del neurosviluppo comprendevano i geni *NDE1*, *IMMP2L* e *LRRN3*, *GPHN*, *ZMYND11*, *SHOX*, *ASTN2*, *DLGAP1*, *PARK2* e i geni *TUBGCP5*, *CYF1P1*, *NIPA2*, *NIPA1* coinvolti nella medesima variante.

#### **- NDE1**

Al momento della nostra valutazione il paziente aveva 4 anni, presentava un livello di sintomi ADOS severo, classificato come un autismo ad alto funzionamento con un QI di 140 ed un EEG negativo.

L'analisi SNP-array ha identificato una microduplicazione di origine paterna del braccio corto del cromosoma 16 nella regione 16p13.11 di circa 1 Mb (15481920-16516109), comprendente i geni *ABCC6*, *NDE1*, *MYH11*, i quali sono associati a

suscettibilità per patologie neurocognitive a penetranza incompleta. La CNV 16p13.11 è una variante nel numero di copie ricorrente associata a una serie di disturbi del neurosviluppo tra cui autismo, ADHD, disabilità intellettiva e schizofrenia.

Seppur questa CNV sembri essere una variante comune nella popolazione (5/1682, 0.29%), il ruolo delle duplicazioni (de novo o ereditate) nel fenotipo ASD rimane incerto. Infatti la duplicazione 16p13.11 è stata riscontrata in altri pazienti con ritardo mentale e disturbi comportamentali da Hannes et al. e Ullmann et al.<sup>18, 19, 20</sup>. La proteina codificata dal gene *ABCC6* è un membro della superfamiglia dei trasportatori ABC (*ATP-binding cassette*), con funzione di trasporto di varie molecole attraverso le membrane extracellulari e intracellulari. Mutazioni in *ABCC6* sono responsabili dello pseudoxantoma elastico (OMIM 264800). La proteina codificata dal gene *MYH11* è una miosina (isoforma del tessuto muscolare liscio) appartenente alla famiglia delle catene pesanti della miosina. È il più importante gene candidato nella regione 16p13.11 per la predisposizione all'aneurisma e alla dissezione dell'aorta toracica (TAAD); mutazioni eterozigoti nel gene *MYH11* sono state identificate in individui con TAAD familiare e si ritiene siano in grado di interrompere la funzione contrattile della SMC, portando a una precoce e grave diminuzione dell'elasticità della parete aortica<sup>21</sup>.

Il gene *NDE1* codifica la proteina di distribuzione nucleare nudE omologa 1, una proteina centrosomiale che gioca un ruolo cruciale nel processo di encefalizzazione dei mammiferi e crescita della corteccia cerebrale umana, a causa del suo coinvolgimento nella mitosi, migrazione neuronale e organizzazione dei microtubuli durante lo sviluppo cerebrale. Questo gene rappresenta il candidato più forte per i fenotipi dello sviluppo neurologico associati alle CNV nel locus 16p13.11. La perdita di

*NDE1* nei modelli murini causa profondi difetti nella corticogenesi cerebrale e nella proliferazione e migrazione neuronale, e le mutazioni in *NDE1* sono state associate a microlissencefalia negli esseri umani. *NDE1* e il suo omologo *NDEL1* (*Nuclear distribution protein nudE-like 1*) interagiscono fisicamente con LIS1 (lissencefalia 1), il primo gene della lissencefalia identificato, e formano un complesso coinvolto nella proliferazione, differenziazione e migrazione neuronale all'interno del cervello. È importante sottolineare che il complesso *NDE1 / LIS1 / NDEL1* fa parte del percorso che risulta interrotto nella schizofrenia-1 (*DISC1*), uno dei pathway più rilevanti alla base della psicosi, e si lega direttamente al gene *DISC1*; inoltre, la localizzazione subcellulare di *NDE1* e le interazioni proteina-proteina sono modulate attraverso la fosforilazione dalla protein-chinasi A (PKA) attivata da cAMP e *DISC1* è in grado di modulare la fosforilazione da PKA di *NDE1* tramite la regolazione dell'attività di PDE4, un enzima idrolizzante da cAMP che crea un co-complesso con *DISC1* e *NDE1 / LIS1 / NDEL1*<sup>22</sup>.

#### - **GPHN**

Qui vengono descritti e discussi due casi in cui è stata riscontrata una CNV nel locus del gene *GPHN*.

##### *Caso 1*

Al momento della nostra valutazione il paziente aveva 3 anni e presentava un livello di sintomi al test ADOS moderato. È stato classificato come un autismo a basso funzionamento, averbale con un QS inferiore a 85 ed un EEG con anomalie aspecifiche. Inoltre veniva riferita familiarità per ritardo di linguaggio (cugino I in linea materna). L'analisi *array*-CGH ha identificato una microdelezione de novo del braccio lungo del cromosoma 14 nella regione 14q23.3 di circa 348 Kb (67031866-67415874) comprendente il gene OMIM *GPHN* (603930).

##### *Caso 2*

Al momento della nostra valutazione il paziente aveva 3 anni e presentava un livello di sintomi ADOS severo. È stato classificato come un autismo a basso funzionamento, averbale con un QS pari a 50-70 ed un EEG con anomalie aspecifiche. L'analisi *array*-CGH ha identificato due diverse CNV, entrambe ereditate: una microdelezione di origine materna del braccio lungo del cromosoma 14 nella regione 14q23.3 di circa 230 Kb (67111394-67341052) e una microduplicazione di origine paterna del braccio lungo del cromosoma 11 nella regione 11q21 di circa 368 Kb. La microduplicazione 14q23.3 include il gene *GPHN* (603930). La microduplicazione 11q21 include i geni: *CCDC67*, *SLC36A4*, *SMCO4* che, ad oggi, non rivestono un chiaro significato patogenetico.

***GPHN*** è un gene aploinsufficiente che codifica per una proteina (gefirina) coinvolta sia nella sintesi del cofattore di molibdeno sia nel clustering del recettore sinaptico. Lionel et al. hanno descritto 6 soggetti non imparentati, con una gamma di diagnosi neurosviluppo tra cui ASD, schizofrenia o convulsioni, che possiedono rare microdelezioni de novo o ereditate che si sovrappongono agli esoni di *GPHN* sul cromosoma 14q23.3. La gefirina è una proteina di assemblaggio neuronale che ancora i recettori inibitori del neurotrasmettitore al citoscheletro postinaptico e si lega a un dominio di subunità del recettore e a dimeri di tubulina. La gefirina è una delle più importanti proteine dell'impalcatura postsinaptica nelle sinapsi inibitorie a causa della sua interazione con le subunità di GlyR e GABA<sub>A</sub>R, regolandone la diffusione e la clusterizzazione. I canali ionici e le proteine del recettore sono le proteine più frequenti a livello della superficie cellulare neuronale, necessarie per facilitare la comunicazione intercellulare. La gefirina possiede un legame funzionale con diverse proteine sinaptiche come neurologine (*NLGN2*, *NLGN4*), neurexine (*NRXN1*, *NRXN2*, *NRXN3*) e

collibistina (*ARHGEF9*). È noto che queste proteine sono implicate nel rischio genetico per i disturbi del neurosviluppo, compresi i disturbi dello spettro autistico, la schizofrenia e l'epilessia<sup>20</sup>.

#### - ***IMMP2L***

Qui vengono descritti e discussi due casi in cui è stata riscontrata una CNV nel locus del gene *IMMP2L* e *LRRN3*.

##### *Caso 1*

Al momento della nostra valutazione il paziente aveva 4 anni, presentava un livello di sintomi ADOS severo. È stato classificato come un autismo a basso funzionamento, averbale con un QS pari a 50-70 ed un EEG negativo. La famiglia riferiva familiarità per ritardo di linguaggio espressivo nel fratello del paziente. L'analisi *array*-CGH ha identificato due diverse CNV di origine paterna: una microdelezione del braccio lungo del cromosoma 7 nella regione 7q31.1 di circa 150 Kb (111106611-11256664) e una microduplicazione del braccio lungo del cromosoma 16 nella regione 16q22.2 di circa 200 kb (72249593-724491154). La microduplicazione 16q22.2 include parzialmente il gene RefSeq *LINC01572*, un gene che codifica per un long non coding RNA (lncRNA) e, ad oggi, non ha un chiaro significato patogenetico. La microdelezione 7q31.1 include parzialmente il gene OMIM *IMMP2L* (605977) e il gene OMIM *LRRN3* (619748).

##### *Caso 2*

Al momento della nostra valutazione il paziente aveva 4 anni, presentava un livello di sintomi ADOS moderato-severo. È stato classificato come un autismo ad alto funzionamento, verbale con un QI di 117. L'analisi *array*-CGH ha identificato una microdelezione di origine materna del braccio lungo del cromosoma 7 nella regione 7q31.1 di circa 949 Kb (109389060-110338543) che include i geni *EIF3IP1*, *IMMP2L*. *EIF3IP1* è il fattore di iniziazione alla traduzione eucariotica 3 subunità I

pseudogene 1, non associato a patologie. La microdelezione 7q31.1 include il gene *IMMP2L* (605977) e il gene *LRRN3* (619748).

Il gene *IMMP2L* contiene 6 esoni, si estende su 860 kb e codifica una proteina coinvolta nell'elaborazione delle sequenze peptidiche del segnale utilizzate per dirigere le proteine mitocondriali verso i mitocondri<sup>21</sup>. All'interno dei mitocondri questa proteina è essenziale per l'attività catalitica del complesso della peptidasi della membrana interna mitocondriale (IMP). Gimelli et al. hanno presentato nel loro studio la descrizione clinica nella quattro *pazienti* affetti da disturbi dello sviluppo neurologico, con CNV nel locus 7q31.1 che coinvolgono il gene *IMMP2L*, a favore del suo ruolo nella patogenesi dell'ASD, identificati da array-CGH<sup>22, 23</sup>. Kreilau et al hanno sviluppato un modello murino per *IMMP2L* per studiare il comportamento dei topi portatori di una mutazione nel gene *IMMP2L*, confrontando il knockdown *IMMP2L* adulto eterozigote e omozigote di entrambi i sessi con compagni di cucciolata di tipo selvatico in campo aperto, interazione sociale e riconoscimento di nuovi oggetti. Hanno osservato che le conseguenze della carenza di *IMMP2L* non hanno avuto un impatto sulla salute degli animali, ma hanno indotto effetti comportamentali dipendenti dal gene e dal sesso, come l'iperlocomozione descritta nei topi knockdown eterozigoti maschi dell'*IMMP2L* rispetto agli omozigoti, ma non nei topi knockdown femminili. I topi erano molto più sensibili agli effetti stimolanti della desamfetamina. Grazie a questo studio sembra che la neurotrasmissione dopaminergica disfunzionale sembri essere un meccanismo che porta alla sindrome di Gilles de la Tourette e sembra avere un ruolo importante nei Disturbi dello Spettro Autistico<sup>24</sup>. Il gene *LRRN3* codifica per una proteina neuronale, si trova sul cromosoma umano 7q31.1 ed è posizionato all'interno dell'introne 3 del gene *IMMP2L*. È probabile che gli *LRRN* funzionino come molecole di

adesione cellulare o recettori di trasduzione del segnale<sup>25</sup>.

#### - **ZMYND11**

Al momento della nostra valutazione le pazienti (gemelle monozigoti) avevano 4 anni, con un livello di sintomi ADOS moderato. Entrambe le bambine avevano un autismo a basso funzionamento, erano averbali e presentavano un QS inferiore a 50. Inoltre veniva riferita familiarità per disturbo del linguaggio in linea paterna.

L'analisi *array*-CGH ha identificato una microduplicazione di origine materna del braccio lungo del cromosoma 10 nella regione 10p15.3 di circa 177 Kb (100026-277232) che include il gene *ZMYND11*, le cui mutazioni in eterozigosi sono state associate a disabilità intellettiva pertanto, sebbene ad oggi tale microriarrangiamento non assuma un chiaro significato patogenetico, non si può escludere un suo coinvolgimento nella determinazione del quadro clinico delle pazienti. La proteina codificata da questo gene si localizza nel nucleo e funziona come un repressore trascrizionale. Sono state identificate varianti di trascrizione espresse alternativamente che codificano diverse isoforme. Mutazioni in *ZYMND11* sono state associate a disabilità intellettiva e ritardo mentale a trasmissione autosomica dominante. Moskowitz et al. sostengono l'associazione di *ZMYND11* con la sindrome dello spettro autistico e suggeriscono che dovrebbe essere incluso nell'elenco dei geni candidati di suscettibilità ai disturbi del neurosviluppo. Ad oggi però il coinvolgimento di questo gene nel Disturbo dello Spettro autistico è ancora discusso<sup>26</sup>.

#### - **SHOX**

Al momento della nostra valutazione il paziente aveva 2 anni e 4 mesi, presentava un livello di sintomi ADOS moderato-severo, lassità legamentosa. È stato classificato come un autismo a basso funzionamento, non verbale con un QS inferiore a 50. La famiglia



riferiva familiarità per disturbo dello spettro autistico nel fratello del paziente.

L'analisi *array*-CGH ha identificato una microduplicazione del braccio lungo del cromosoma 7 nella regione Xp22.33 di circa 688 Kb (539247-1226834) di origine materna, che include il gene *SHOX*.

***SHOX*** è un gene pseudoautosomico che codifica per un fattore di trascrizione dell'omeodominio coinvolto nel ciclo cellulare e nella regolazione della crescita cellulare. Le delezioni degli *enhancer* di *SHOX* causano bassa statura e anomalie scheletriche con trasmissione dominante legata al cromosoma X. Le microduplicazioni di questa regione sembrano essere considerate fattori di rischio a bassa penetranza per i disturbi del neurosviluppo, con un rischio aumentato in entrambi i sessi. Varie isoforme di *SHOX* specifiche sono espresse esclusivamente nel cervello fetale in via di sviluppo, ciò può spiegare l'effetto di una espressione alterata della proteina *SHOX* nel neurosviluppo<sup>27</sup>.

#### - ***ASTN2***

Al momento della nostra valutazione il paziente aveva 2 anni, presentava un livello di sintomi ADOS moderato. È stato classificato come un autismo a basso funzionamento, verbale con un QS tra 50 e 70. La famiglia riferisce altre due figlie che avevano presentato ritardo del linguaggio.

L'analisi *array*-CGH ha identificato due diverse CNV di origine paterna: una microduplicazione del braccio lungo del cromosoma 9 nella regione 9q33.1 di circa 466 Kb (119005705-119431557) e una microduplicazione del braccio lungo del cromosoma 9 nella regione 9q33.3 di circa 99 Kb (127484621-127583436). La microduplicazione 9q33.3 include i geni *NR6A1*, *OLFML2A* e ad oggi non assume un chiaro significato patogenico. La microduplicazione 9q33.1 include i geni *ASTN2-AS1*, *PAPPA-AS1*, *PAPPA*, *ASTN2*.

Il gene *PAPPA* codifica per una metalloproteinasi secreta che scinde le proteine leganti il fattore di crescita simile all'insulina (IGFBP). Dopo la scissione dell'IGFBP, i fattori di crescita dell'insulina si dissociano dagli IGFBP e si legano ai recettori IGF, determinando l'attivazione della via dell'IGF. La proteina codificata svolge un ruolo nella formazione ossea, infiammazione, guarigione delle ferite e fertilità femminile e, ad oggi, non assume un chiaro significato patogenico.

Il gene ***ASTN2*** è il secondo membro della famiglia delle proteine dell'astrotactina, (astrotactina 2), interagisce con la proteina codificata da *ASTN1* nella membrana neuronale e regola la sua espressione sulla superficie neuronale, mediando così la formazione e il rilascio di aderenze neuronale-gliali durante la migrazione. Le astrotactine specifiche dei vertebrati, *ASTN2* e il suo paralogo *ASTN1*, hanno ruoli chiave nella migrazione neuronale guidata dalla glia durante lo sviluppo del cervello. Infatti l'astrotactina 1 (*ASTN1*) della proteina di membrana integrale, forma aderenze tra i neuroni e l'astroglia come antigene di superficie delle cellule neuronali. Nei modelli murini *ASTN1* è altamente espresso nella migrazione delle cellule dei neuroni dei granuli nel cervelletto e anche in altre regioni del cervello caratterizzate dalla formazione di strutture laminare tramite migrazione neuronale guidata da cellule gliali, tra cui la corteccia cerebrale, l'ippocampo e il bulbo olfattivo<sup>28</sup>. I topi knockout per *ASTN1* mostrano una migrazione alterata dei granuli cerebellari, dimensioni cerebellari minori, ridotto legame dei neuroni gliali, morfologia anormale delle cellule di Purkinje e minore equilibrio e coordinazione nei test comportamentali rispetto al *wild-type*.

Rare CNV che interrompono *ASTN2* o sia *ASTN2* che *TRIM32* sono state riportate nel locus 9q33.1 da studi sull'intero genoma in alcuni individui con disturbi dello sviluppo neurologico (NDD). Per determinare la

prevalenza delle mutazioni dell'astrotactina e delineare il loro spettro fenotipico associato, sono stati esaminati da Lionel et al. sia ASTN2/TRIM32, sia ASTN1 (locus 1q25.2) per CNV esoniche in 89.985 individui. In questo set di dati clinici, sono state identificate 46 delezioni e 12 duplicazioni che interessano ASTN2. Le delezioni di ASTN1 erano molto più rare. Gli individui osservati con tali delezioni includono soggetti con disturbo dello spettro autistico (ASD), disturbo da deficit di attenzione e iperattività (ADHD), ritardo del linguaggio, ansia e disturbo ossessivo compulsivo (DOC). Inoltre è stato osservato e quantificato l'RNA nel tessuto cerebrale che ha rivelato un'espressione ASTN1 costantemente elevata mentre l'espressione di ASTN2 ha raggiunto il picco nella neocorteccia embrionale precoce e nella corteccia cerebellare postnatale. Questi confermano l'importante ruolo svolto dalle astrotactine nello sviluppo neurologico umano e nella neurofisiopatologia dei suoi disturbi<sup>29</sup>.

#### - **DLGAP1**

Al momento della nostra valutazione il paziente aveva 3 anni, presentava un livello di sintomi ADOS severo. È stato classificato come un autismo a basso funzionamento, il paziente presentava ipomimia facciale, averbale con un QS inferiore a 50. La famiglia riferiva familiarità per disturbo depressivo maggiore.

L'analisi *array*-CGH ha identificato una CNV di origine paterna: una microduplicazione del braccio corto del cromosoma 18 nella regione 18p11.31 di circa 129 Kb (4054162-4182981). La microduplicazione 18p11.31 include il gene **DLGAP1** (605445) dal *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM).

La proteina codificata da questo gene è espressa nel tessuto cerebrale, si localizza nella densità postsinaptica e interagisce con un numero di proteine associate all'ASD, tra cui *DLG1*, *DLG4*, *SHANK1*, *SHANK2* e *SHANK3*.

Questo gene è stato originariamente identificato come un gene candidato ASD, infatti il sequenziamento del tessuto cerebrale post mortem di 25 casi di ASD ha portato all'identificazione di varianti significative non sinonime in questo gene confermando il coinvolgimento di questo gene con l'autismo<sup>30</sup>.

#### - **TUBGCP5, CYF1P1, NIPA2, NIPA1, LOC283683, WHAMMP3, GOLGA8IP, HERC2P2**

Riporto qui 3 casi che coinvolgono la regione 15q11.2. Il *Caso 1* e il *Caso 2* presentano una stessa CNV con delezione dei suddetti geni, il *Caso 3* invece una loro duplicazione.

#### *Caso 1*

Al momento della nostra valutazione il paziente aveva 4 anni, presentava un livello di sintomi ADOS moderato. È stato classificato come un autismo a basso funzionamento, verbale con un QS inferiore a 50 ed un EEG con anomalie aspecifiche. La famiglia riferiva familiarità per ritardo del linguaggio in linea paterna. L'analisi *array*-CGH ha identificato una CNV di origine paterna: una microdelezione del braccio lungo del cromosoma 15 nella regione 15q11.2 di circa 512 Kb (22770421-22770421). La microdelezione 15q11.2 include i geni *TUBGCP5*, *CYF1P1*, *NIPA2*, *NIPA1*, *LOC283683*, *WHAMMP3*, *GOLGA8IP*, *HERC2P2*.

#### *Caso 2*

Al momento della nostra valutazione il paziente aveva 3 anni e 3 mesi, presentava un livello di sintomi ADOS severo. È stato classificato come un autismo a basso funzionamento, verbale con un QS inferiore a 50. L'analisi *array*-CGH ha identificato una CNV de novo: una microdelezione del braccio lungo del cromosoma 15 nella regione 15q11.2 di circa 512 Kb (22770421-23282799). La microdelezione 15q11.2 include i geni *TUBGCP5*, *CYF1P1*, *NIPA2*,

*NIPA1, LOC283683, WHAMMP3, GOLGA8IP, HERC2P2.*

### Caso 3

Al momento della nostra valutazione il paziente aveva 2 anni e 3 mesi, presentava un livello di sintomi ADOS lieve. È stato classificato come un autismo ad alto funzionamento, verbale e con un QI di 109. La famiglia riferiva familiarità per ritardo del linguaggio in linea paterna e disturbi ansioso-depressivi in entrambe le linee. L'analisi *array*-CGH ha identificato tre CNV di origine paterna: una microduplicazione del braccio lungo del cromosoma 15 nella regione 15q11.2 di circa 425 Kb, una microduplicazione del braccio corto del cromosoma 2 nella regione 2p25.3 di circa 295 Kb e una microduplicazione del braccio corto del cromosoma 1 nella regione 1p36.11 di circa 86 Kb. La microduplicazione 15q11.2 include i geni *ELM02P1, TUBGCP5, CYF1P1, NIPA2, NIPA1, WHAMMP3*. La microduplicazione 2p25.3 comprende i geni *RNASEH1-AS1, ALLC, AD11, RNASEH1, RPS7, COLEC11, TRAPPC12* e la microduplicazione 1p36.11 include il gene *BC013143* che, ad oggi non assumono un chiaro significato patogenetico relativo al quadro fenotipico del paziente. La regione deleta si estende su circa 300-500 kb nella regione critica della Sindrome di Prader-Willi (PWS; OMIM 176270)/Sindrome di Angelman (AS; OMIM 105830), tra i punti di interruzione 1 (BP1) e 2 (BP2). La regione tra BP1 e BP2 contiene 4 geni che non sono soggetti a imprinting: ***TUBGCP5*** (OMIM 608147), ***NIPA1*** (OMIM 608145), ***NIPA2*** (OMIM 608146) e ***CYFIP1*** (OMIM 606322).

La sindrome da microdelezione 15q11.2 è una rara monosomia autosomica parziale con un'espressione fenotipica variabile e una penetranza ridotta associata a una maggiore suscettibilità ai disturbi neuropsichiatrici o dello sviluppo neurologico (inclusi sviluppo psicomotorio ritardato, ritardo del linguaggio, ASD, ADHD, disturbo ossessivo-compulsivo disturbo, epilessia o convulsioni).

Può anche includere lievi caratteristiche dismorfiche aspecifiche (come orecchie displastiche, fronte ampia, ipertelorismo), palatoschisi, anomalie neurologiche e di neuroimaging (come atassia e ipotonia muscolare)<sup>31</sup>. Questa delezione comprende quindi:

- Il gene *TUBGCP5*, che codifica per la componente 5 della gamma-tubulina, proteina che fa parte del complesso gamma tubulina, necessario per la nucleazione dei microtubuli dal centrosoma;
- Il gene *CYF1P1*, codifica per una proteina cerebrale, componente del complesso CYFIP1-EIF4E-FMR1, il quale lega il cappuccio dell'mRNA del gene *FMR1* e ne media la repressione traduzionale.
- I geni *NIPA1* e *NIPA2* codificano per trasportatori di magnesio nelle cellule neuronali ed epiteliali, svolgendo un ruolo sia nello sviluppo che nel mantenimento del sistema nervoso<sup>20</sup>.

I geni *LOC283683, WHAMMP3, GOLGA8IP, HERC2P2, ELM02P1* ad oggi, non assumono un chiaro significato patogeno relativo al fenotipo dei nostri pazienti.

### - ***PARK2***

Al momento della nostra valutazione il paziente aveva 4 anni, presentava un livello di sintomi ADOS moderato. È stato classificato come un autismo a basso funzionamento, averbale con un QS inferiore a 50. La famiglia riferiva familiarità per disturbo dello spettro autistico nella figlia della sorella gemella del padre del paziente. L'analisi *array*-CGH ha identificato una CNV di origine paterna: una microdelezione del braccio lungo del cromosoma 6 nella regione 6q26 di circa 1.2 Mb (16188913-163121898), che include i geni *LOC105378098, PARK2*.

*LOC105378098* è un gene che codifica per un *long non coding RNA* (lncRNA) e, ad oggi, non ha un chiaro significato patogeno.

Il gene ***PARK2*** codifica per Parkin, un componente di un complesso multiproteina

E3 ubiquitina ligasi che permette il legame dell'ubiquitina al substrato targettandole per la degradazione proteasomiale. Le mutazioni di *PARK2* sono frequentemente associate al morbo di Parkinson, ma sono state descritte anche alterazioni strutturali in pazienti con disturbi del neurosviluppo (NDD), suggerendo un effetto patologico ricorrente in processi cerebrali neurodegenerativi e neurodegenerativi. Inoltre uno studio di Yin et al su 335 pazienti con ASD ha dimostrato la presenza di 6 casi con delezione/duplicazione del locus 6q26. Questi risultati hanno dimostrato che delezioni e duplicazioni esoniche possono andare ad alterare la funzione del gene<sup>32, 33</sup>.

### **Conclusioni**

Questo studio ci ha permesso di identificare diverse CNV e analizzare il loro ruolo nell'ASD. La relazione di queste ultime con le diverse informazioni raccolte ci porta a riconoscere il loro ruolo fondamentale ma non del tutto chiaro, come anche è riportato in letteratura. La ricerca di una correlazione tra la CNV ereditata e la familiarità per patologie neuropsichiatriche è risultata non essere statisticamente significativa, ma ciò potrebbe essere dato dalla variazione di manifestazione fenotipica di un dato allele all'interno di una popolazione. Premesso che la frequenza con cui un allele si manifesta fenotipicamente all'interno di una popolazione varia, poiché la penetranza di queste varianti dipende sia dal genotipo che dall'influenza dell'ambiente, l'identificazione di una CNV ereditata richiede un accurato studio dell'albero genealogico e la ricerca di possibili caratteristiche comportamentali del fenotipo ASD nel genitore portatore della variante. L'identificazione di CNV associate a suscettibilità per disturbi del neurosviluppo, nei soggetti affetti da ASD, può facilitare la consulenza post-test poiché la variante può essere considerata responsabile della condizione clinica del paziente. Tuttavia, l'identificazione di CNV non ricorrente richiede un accurato studio dell'analisi di

segregazione di tale variante nella famiglia, e sul ruolo dei geni coinvolti al fine di identificare una possibile associazione con il quadro clinico del paziente. La categorizzazione e descrizione clinica a seconda delle capacità linguistiche nei due sessi ci ha permesso di osservare come il rapporto maschi/femmine sia spostato verso una maggiore averbalità nel sesso maschile, a sostegno della teoria del ruolo protettivo del sesso femminile. Questa teoria può contribuire a spiegare perché le CNV ereditate da madri non-affette hanno maggiori probabilità di essere patogene rispetto a quelle ereditate da padri sani.

Altro aspetto fondamentale è l'analisi dei geni coinvolti nella variante. Il nostro studio mette in evidenza una possibile associazione tra ASD ad alto funzionamento e i geni per proteine neuronali e citoscheletriche, mentre rimane ancora incerto se i geni per *Non-Coding* RNA siano associati a un funzionamento cognitivo più basso rispetto alla popolazione ASD generale. Questo ci testimonia come questi geni, coinvolti nello sviluppo del sistema nervoso fetale, nella regolazione dell'espressione genica, nelle funzioni del citoscheletro e nelle interazioni intersinaptiche, svolgano un ruolo chiave nella manifestazione fenotipica dell'ASD e nella sua patogenesi<sup>18</sup>. I presenti risultati concordano con la letteratura scientifica riguardo il dibattuto ruolo delle CNV nella patogenesi del ASD.

La varietà dei fenotipi dell'ASD può essere collegata a diverse varianti comuni e/o rare, ai fattori ambientali e alla capacità di buffering del background genetico sulle mutazioni più deleterie. L'identificazione di questa eterogeneità attraverso l'uso di informazioni provenienti da diversi campi di ricerca, dovrebbe consentire una migliore diagnosi, cura e integrazione nella società di individui con autismo.

Alla luce di ciò l'autismo non va considerato una singola entità ma come un continuum della diversità umana.

### BIBLIOGRAFIA

1. Miles JH. Autism spectrum disorders--a genetics review. *Genetics in Medicine* 2011; 13: 278-94.
2. Oron O, Elliott E. Delineating the Common Biological Pathways Perturbed by ASD's Genetic Etiology: Lessons from Network-Based Studies. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 828.
3. Biblioteca Alessandro Liberati del Servizio Sanitario Regionale del Lazio. <https://bal.lazio.it/speciale-autismo/tabella-criteri-diagnostici/>.
4. Geschwind DH, Paulson HL, Klein C. Neurogenetics, Part I. In: Aminoff MJ, Boller F, Swaab DF. *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 147 (3rd series), Elsevier 2018.
5. Ivanov HY, Stoyanova VK, Popov NT, Vachev TI. Autism Spectrum Disorder - A Complex Genetic Disorder. *Folia Medica* 2015; 57: 19-28.
6. Bourgeron T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci* 2015; 16: 551-63.
7. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST, Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. American college of medical genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med* 2011; 13: 680-5.
8. Velinov M. Genomic Copy Number Variations in the Autism Clinic-Work in Progress. *Frontiers Cell Neurosci* 2019; 13: 57.
9. Klei L, Sanders SJ, Murtha MT, et al. Common genetic variants, acting additively, are a major source of risk for autism. *Mol Autism* 2012; 3: 9.
10. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine* 2015; 17: 405-24.
11. Chung BH, Tao VQ, Tso WW. Copy number variation and autism: new insights and clinical implications. *J Formosan Med Ass = Taiwan yi zhi* 2014; 113: 400-8.
12. Wood-Downie H, Wong B, Kovshoff H, et al. Sex/Gender Differences in Camouflaging in Children and Adolescents with Autism. *J Autism Dev Disord* 2021; 51: 1353-64.
13. Lasser M, Tiber J, Lowery LA. The Role of the Microtubule Cytoskeleton in Neurodevelopmental Disorders. *Front Cell Neurosci* 2018; 12: 165.
14. Zhang S-F, Gao J, Liu C-M. The Role of Non-Coding RNAs in Neurodevelopmental Disorders. *Front Genet* 2019; 10: 1033.
15. Pinto D, Delaby E, Merico D, et al. Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet* 2014; 94: 677-94.
16. Konopko MA, Densmore AL, Krueger BK. Sexually dimorphic epigenetic regulation of brain-derived neurotrophic factor in fetal brain in the valproic acid model of autism spectrum. *Dev Neurosci* 2017; 39: 507-18.
17. Werling DM, Geschwind DH. Sex differences in autism spectrum disorders. *Curr Opin Neurol* 2013; 26: 146-53.
18. Pinto D, Delaby E, Merico D, et al. Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet* 2014; 94: 677-94.
19. Hannes FD, Sharp AJ, Mefford HC, et al. Recurrent reciprocal deletions and duplications of 16p13.11: the deletion is a risk factor for MR/MCA while the duplication may be a rare benign variant. *J Med Genet* 2009; 46: 223-32.
20. Lionel AC, Vaags AK, Sato D, et al. Rare exonic deletions implicate the synaptic organizer Gephyrin (GPHN) in risk for autism, schizophrenia and seizures. *Hum Mol Genet* 2013; 22: 2055-66.
21. Tropeano M, Ahn JW, Dobson RJ, et al. Male-Biased Autosomal Effect of 16p13.11 Copy Number Variation in Neurodevelopmental Disorders. *PLoS One* 2013; 8: e61365.
22. Gimelli S, Capra V, Di Rocco M, et al. Interstitial 7q31.1 copy number variations disrupting *IMMP2L* gene are associated with a wide spectrum of neurodevelopmental disorders. *Mol Cytogenet* 2014; 7: 54.
23. RefSeq. NCBI Reference Sequence Database. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>.
24. Kreilhaus F, Chesworth R, Eapen V, Clarke R, Karl T. First behavioural assessment of a

- novel Immp2l knockdown mouse model with relevance for Gilles de la Tourette syndrome and Autism spectrum disorder. *Behav Brain Res* 2019; 374:112057.
25. Sousa I, Clark TG, Holt R, et al. Polymorphisms in leucine-rich repeat genes are associated with autism spectrum disorder susceptibility in populations of European ancestry. *Mol Aut* 2010; 1: 7.
  26. Moskowitz AM, Belnap N, Siniard AL, et al. A de novo missense mutation in ZMYND11 is associated with global developmental delay, seizures, and hypotonia. *Cold Spring Harbor Mol Case Studies* 2016; 2: a000851.
  27. Tropeano M, Howley D, Gazzellone MJ, et al. Microduplications at the pseudoautosomal SHOX locus in autism spectrum disorders and related neurodevelopmental conditions. *J Med Genet* 2016; 53: 536-47.
  28. Chung BH, Tao VQ, Tso WW. Copy number variation and autism: new insights and clinical implications. *J Formosan Med Ass = Taiwan yi zhi* 2014; 113: 400-8.
  29. Lionel AC, Tammimies K, Vaags AK, al. Disruption of the ASTN2/TRIM32 locus at 9q33.1 is a risk factor in males for autism spectrum disorders, ADHD and other neurodevelopmental phenotypes. *Hum Mol Genet* 2014; 23: 2752-68.
  30. Li J, Shi M, Ma Z, et al. Integrated systems analysis reveals a molecular network underlying autism spectrum disorders. *Mol Syst Biol* 2014; 10: 774.
  31. Orphanet. [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?Ing=EN&Expert=261183](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Ing=EN&Expert=261183).
  32. Yin CL, Chen HI, Li LH, et al. Genome-wide analysis of copy number variations identifies PARK2 as a candidate gene for autism spectrum disorder. *Mol Autism* 2016; 7: 23.
  33. Conceição IC, Rama MM, Oliveira B, et al. Definition of a putative pathological region in PARK2 associated with autism spectrum disorder through in silico analysis of its functional structure. *Psyc Genet* 2017; 27: 54-61.

Sintesi della Tesi di Laurea discussa il 24 giugno 2021

Dott.ssa Caterina Micolonghi, Facoltà di Medicina e Odontoiatria, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Dipartimento di Neuroscienze Umane, "Sapienza" Università di Roma

Prof. Antonio Pizzuti, Dipartimento di Medicina Sperimentale, "Sapienza" Università di Roma

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



# **Tesi di Laurea: “Analisi genica del Wnt signaling e dell’infiammazione nel tessuto osseo, adiposo e muscolare di pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2 candidati ad artroprotesi d’anca” (Sintesi)**

**Autore: M. Pileri**

**Relatore: R. Papalia**

**Correlatori: N. Napoli, G. Leanza**

## **Introduzione**

Il diabete mellito di tipo 2 (T2DM) è un disturbo metabolico caratterizzato da iperglicemia, dovuta a inefficienza biologica dell’ormone insulina e del suo recettore di legame (insulino-resistenza) che comporta nel tempo e con la progressione della malattia, una graduale disfunzione delle  $\beta$ -cellule pancreatiche<sup>1-3</sup>. È di gran lunga la forma più frequente di diabete, rappresentando il 90% circa di tutti i casi<sup>4</sup>. La sua prevalenza mondiale è aumentata drammaticamente negli ultimi decenni, passando da 30 milioni di casi nel 1985 a 425 milioni nel 2018<sup>5</sup>.

Tra le complicanze del diabete, specie nei soggetti anziani, spicca la fragilità ossea e le conseguenti fratture, tipicamente a livello dell’anca<sup>6</sup>, ma possibili anche del polso, del piede o vertebrali<sup>7, 8</sup>. Alcuni studi recenti hanno anche evidenziato la presenza nei soggetti diabetici di uno stato di infiammazione cronica del tessuto adiposo e muscolare<sup>9</sup>.

I meccanismi fisiopatologici coinvolti sono spiegati solo in parte dalla lipotossicità e dalla glucotossicità, determinate rispettivamente dall’aumento degli acidi grassi liberi circolanti e dall’iperglicemia. La presenza di uno stato infiammatorio sistemico persistente, di un aumento dello stress ossidativo, di un accumulo di *Advanced Glycation end Products* (AGEs), oltre che di un danno

ipossico, si ipotizza alterino le proprietà del collagene e le proprietà dei tessuti osseo, adiposo e muscolare<sup>10</sup>.

Uno dei principali meccanismi molecolari coinvolti nel metabolismo osseo, adiposo e muscolare, oltre che nella regolazione del differenziamento delle cellule staminali mesenchimali, è il Wnt signaling<sup>11</sup>.

In modelli murini con T2DM l’espressione di sclerostina (codificata dal gene SOST) e del gene DKK-1, due dei principali inibitori del Wnt signaling, sono aumentati. Anche in vivo, i pazienti con T2DM presentano un aumento dei livelli sierici di sclerostina. Uno studio condotto dal laboratorio di Endocrinologia e Diabetologia dell’Università Campus Bio-Medico (Piccoli et al. 2020) ha evidenziato livelli elevati di AGEs nell’osso e un’espressione genica di SOST aumentata nei pazienti affetti da T2DM, oltre che una ridotta espressione di RUNX-2 (fattore di trascrizione essenziale per la differenziazione delle cellule osteoformatrici)<sup>12</sup>. La letteratura recente (Nie et al. 2021) sottolinea come numerosi ligandi del Wnt signaling (Wnt5a, Wnt10b) giochino un ruolo cruciale nello sviluppo del T2DM e delle sue complicanze, spesso volte agendo in sinergia con adipochine, miocchine e citochine infiammatorie (IL-6, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ )<sup>13</sup>.

### **Lo studio: ipotesi ed obiettivi**

L'ipotesi alla base dello studio, basata sulle evidenze suddette, è che l'inibizione del Wnt signaling sia coinvolta nell'aumento della fragilità ossea, della sarcopenia e dello stato infiammatorio cronico tipico del paziente con T2DM.

Gli obiettivi specifici dello studio sono:

- indagare la BMD (Bone Mineral Density) e la microstruttura ossea in pazienti diabetici rispetto a una popolazione di controllo (pazienti non diabetici);
- indagare le alterazioni del collagene di tipo 1 AGEs indotte attraverso l'espressione di Col1A1;
- indagare il Wnt signaling e l'infiammazione nei pazienti diabetici rispetto ai controlli tramite l'analisi genica tessuto-specifica rispettivamente di:
  - Tessuto osseo: Wnt5a, Wnt10b, ADIPOQ, SOST, Lef-1, Dkk-1, Col1A1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ ;
  - Tessuto adiposo: Wnt5a, Wnt10b, ADIPOQ, IL-6, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ ;
  - Tessuto muscolare: Wnt5a, Wnt10b, ADIPOQ, IL-6, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ .

### **Lo studio: materiali e metodi**

Abbiamo condotto questo studio clinico traslazionale multicentrico presso il Policlinico Universitario Campus Bio-Medico di Roma e presso il laboratorio di Diabetologia ed Endocrinologia del Polo di Ricerca Avanzata in Biomedicina e Bioingegneria (PRABB) dell'Università Campus Bio-Medico, in collaborazione con il dipartimento di *Bone and Mineral Diseases* della *Washington University in St. Louis*, MO, USA.

Sono state arruolate, in base ai Sono state arruolate, in base ai criteri di

inclusione ed esclusione, un totale di 92 donne (19 soggetti con T2DM e 73 controlli non diabetici) in condizioni di post-menopausa e destinate ad un intervento di chirurgia sostitutiva protesica d'anca.

Dai referti clinici sono stati analizzati i parametri antropometrici (peso, altezza, BMI), i parametri relativi al controllo glicemico (HbA1c, glicemia a digiuno), i parametri cardio-metabolici (calcio, creatinina, azotemia), gli anni e la durata di malattia espressa in anni. Lo stato ponderale è stato ricavato calcolando il *Body Mass Index* (BMI). I partecipanti sono stati sottoposti i giorni precedenti all'intervento a un esame DXA, mentre il mattino prima a un prelievo ematico. L'intervento chirurgico protesico d'anca è stato effettuato presso le sale chirurgiche del Policlinico Universitario Campus Bio-Medico, utilizzando protesi totali d'anca, mediante un accesso postero-laterale. Completata l'operazione chirurgica i campioni di tessuto osseo, tessuto adiposo e tessuto muscolare, assieme a quelli ematici precedentemente prelevati, sono stati raccolti a fresco e conservati senza alcun tipo di fissante a 4 °C fino alla lavorazione da parte del team di studio. Per effettuare l'analisi dell'espressione genica i campioni sono stati lavorati in maniera differente dipendentemente dal tipo di tessuto, per poi essere sottoposti a protocolli di estrazione dell'RNA (tramite metodologia TRIzol®), quantificazione dell'RNA tramite TECAN®, retrotrascrizione e Real Time PCR con metodologia TaqMan®. Una seconda biopsia ossea eseguita sui nuclei di osso trabecolare ottenuti dalla testa femorale (8 mm di diametro e 8-10 mm di lunghezza) ha consentito di effettuare la tomografia micro-computerizzata (micro-CT 40; SCANCO Medical®) per valutare: densità minerale tissutale (TMD), densità minerale ossea volumetrica (BMD) e parametri standard dell'architettura trabecolare.

## Risultati

Per quanto concerne le caratteristiche demografiche e cliniche dello studio (Tab. 1), come prevedibile, i soggetti affetti da T2DM hanno mostrato valori di glicemia a digiuno (*fasting plasma glucose*) più elevati rispetto ai controlli (diabetici  $100.7 \pm 11.21$  mg/dL, p-value=0.002). I valori di calcemia (non diabetici  $9.2 \pm 0.4$  mg/dL vs diabetici  $9.3 \pm 0.5$  mg/dL), creatinemia (non diabetici  $0.76 \pm 0.16$  mg/dL vs diabetici  $0.83 \pm 0.25$  mg/dL) e azotemia (non diabetici  $41.5 \pm 11.5$  mg/dL vs diabetici  $48 \pm 15.6$  mg/dL) hanno mostrato in entrambi i gruppi valori simili tra loro e nel range di normalità. Di seguito le altre caratteristiche demografiche e cliniche dei soggetti arruolati: età anagrafica della popolazione (non diabetici  $73.2 \pm 5.8$  anni vs diabetici  $75.2 \pm 8.5$  anni); durata della malattia (diabetici  $14.6 \pm 9.8$  anni); BMI (non diabetici  $27.7 \pm 5.6$  kg/m<sup>2</sup> vs diabetici  $29.9 \pm 5.4$  g/m<sup>2</sup>); HbA1c (diabetici  $6.5 \pm 1.7$  %).

I risultati della DXA (Tab. 2, sinistra) non hanno mostrato differenze strutturali statisticamente significative nell'osso di pazienti diabetici rispetto ai controlli: BMD Lumbar L1+L4 (non diabetici  $0.92 \pm 0.17$

g/cm<sup>2</sup> vs diabetici  $0.95$  g/cm<sup>2</sup>  $\pm 0.12$ , p-value=0.43); Lumbar T-score (non diabetici  $-1.15 \pm 1.43$  SD vs diabetici  $-0.83 \pm 1.14$  SD, p-value=0.44); BMD Femoral total (non diabetici  $0.79 \pm 0.11$  g/cm<sup>2</sup> vs diabetici  $0.82 \pm 0.09$  g/cm<sup>2</sup>, p-value=0.39); BMD Femoral neck (non diabetici  $0.68 \pm 0.12$  g/cm<sup>2</sup> vs diabetici  $0.66 \pm 0.11$  g/cm<sup>2</sup>, p-value=0.62); Femoral T-score (non diabetici  $-1.36 \pm 0.87$  SD vs diabetici  $-0.89 \pm 0.75$  SD, p-value=0.27). I valori di T-score vertebrale e femorale hanno mostrato osteopenia nel 50% dei soggetti diabetici contro il 32.1% dei non diabetici.

I risultati della micro-CT (Tab. 2, destra) non hanno mostrato alcuna differenza significativa tra pazienti diabetici e controlli: BV/TV (non diabetici  $0.26 \pm 0.10$  vs diabetici  $0.24 \pm 0.14$ , p-value=0.54); Trabecular number (non diabetici  $1.59 \pm 0.37$  1/mm vs diabetici  $1.48 \pm 0.5$  1/mm, p-value=0.49); Trabecular thickness (non diabetici  $0.2 \pm 0.08$  mm vs diabetici  $0.2 \pm 0.005$  mm, p-value=0.98); Trabecular separation (non diabetici  $0.61 \pm 0.15$  mm vs diabetici  $0.71 \pm 0.2$  mm, p-value=0.14); Volumetric BMD (non diabetici  $243.0 \pm 74.0$  mgHA/cm<sup>3</sup> vs diabetici  $220.4 \pm 100.2$  mgHA/cm<sup>3</sup>, p-value=0.48).

	Non-diabetic Subjects (n=73)	T2DM subjects (n=14)	P value
AGE (years)	73.2 (5.8)	75.2 (8.5)	NS
Menopausal age (years)	49.3 (5.2)	48.9 (5.9)	NS
Disease duration (years)	-	14.6 (9.8)	-
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.7 (5.6)	29.9 (5.4)	NS
Fasting plasma glucose (mg/dL)	100.7 (11.21)	120.1 (21.5)	0.002
HbA1c (%)	-	6.5 (1.7)	-
Serum calcium (mg/dL)	9.2 (0.4)	9.3 (0.5)	NS
Creatinine (mg/dL)	0.76 (0.16)	0.83 (0.23)	NS
Serum blood urea nitrogen (mg/dL)	41.5 (11.5)	48 (15.6)	NS

**Tab. 1.** Caratteristiche demografiche e cliniche dei soggetti dello studio. I dati sono riportati con: media (DS).

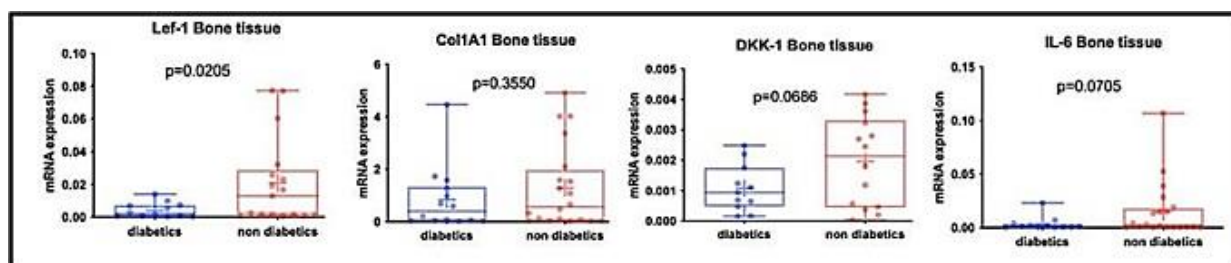
	Non-diabetic subjects (n=73)	T2DM subjects (n=14)	P Value
<b>Dual-energy X-ray absorptiometry (DXA)</b>			
<b>BMD Lumbar L1 + L4 (g/cm<sup>2</sup>)</b>	0.92 (0.17)	0.95 (0.12)	0.43
<b>BMD Femoral total (g/cm<sup>2</sup>)</b>	0.79 (0.11)	0.82 (0.09)	0.39
<b>BMD Femoral neck (g/cm<sup>2</sup>)</b>	0.68 (0.12)	0.66 (0.11)	0.62
<b>Lumbar T-score</b>	-1.15 (1.43)	-0.83 (1.14)	0.44
<b>Femoral T-score</b>	-1.36 (0.87)	-0.98 (0.75)	0.27
<b>Microcomputed Tomography (micro-CT)</b>			
<b>BV/TV</b>	0.26 (0.10)	0.24	0.54
<b>Connectivity (1/mm<sup>3</sup>)</b>	6.75 (2.41)	6.99 (4.25)	0.89
<b>Trabecular number (1/mm)</b>	1.59 (0.37)	1.48 (0.5)	0.49
<b>Trabecular thickness (mm)</b>	0.2 (0.08)	-0.2 (0.05)	0.98
<b>Trabecular separation (mm)</b>	0.61 (0.15)	0.71 (0.2)	0.14
<b>Volumetric BMD (mgHA/cm<sup>3</sup>)</b>	243.0 (74.8)	220.4 (100.2)	0.48
<b>Tissue mineral density (mgHA/cm<sup>3</sup>)</b>	685.5 (29.51)	689.36 (32.8)	0.65

**Tab. 2.** Dati della DXA, BMD e T-score (sinistra) e dati della micro-CT (destra). I dati sono riportati con: media (DS).

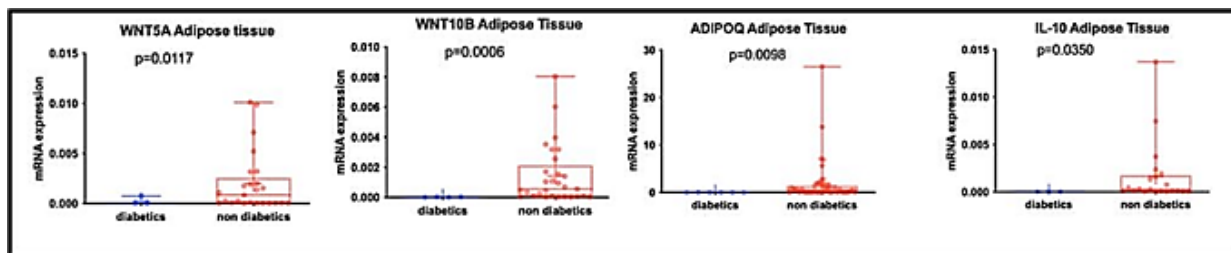
L'analisi dell'espressione genica ossea (Fig. 1) suggerisce una significativa ridotta espressione di Lef-1 nei diabetici rispetto ai non diabetici, in linea con l'ipotesi di un'inibizione del *pathway* canonico di Wnt alla base della fragilità ossea correlata al T2DM (non diabetici  $0.02086 \pm 0.02648$  vs diabetici  $0.004148 \pm 0.004566$ , p-value=0.02).

Non risultano esserci differenze di espressione genica ossea statisticamente significative per: Col1A1 (non diabetici  $1.285 \pm 1.584$  vs diabetici  $0.8350 \pm 1.210$ , p-value=0.35), IL-8 (non diabetici  $0.01149 \pm 0.01474$  vs diabetici  $0.008160 \pm 0.01183$ , p-value=0.47), IL-10 (non diabetici  $0.007337 \pm$

$0.009614$  vs diabetici  $0.004057 \pm 0.007206$ , p-value= 0.35), TNF $\alpha$  (non diabetici  $0.02195 \pm 0.05021$  vs diabetici  $0.001803 \pm 0.004233$ , p-value= 0.14), ADIPOQ (non diabetici  $0.07836 \pm 0.1631$  vs diabetici  $0.06400 \pm 0.1620$ , p-value= 0.79), Wnt5a (non diabetici  $0.003094 \pm 0.002348$  vs diabetici  $0.007292 \pm 0.007772$ , p-value= 0.09), Wnt10b (non diabetici  $0.001238 \pm 0.001294$  vs diabetici  $0.0006096 \pm 0.0005368$ , p-value= 0.12). È emerso un trend di aumento di Dkk-1 nei non diabetici rispetto ai diabetici (non diabetici  $0.001959 \pm 0.001478$  vs diabetici  $0.001074 \pm 0.0007831$ , p-value=0.06) e di IL-6 (non diabetici  $0.01499 \pm 0.02618$  vs diabetici  $0.003316 \pm 0.006572$ , p-value=0.07) seppur non statisticamente significativo.



**Fig. 1.** Analisi dell'espressione genica nel tessuto osseo: Lef-1, Col1A1, DKK-1, IL-6.



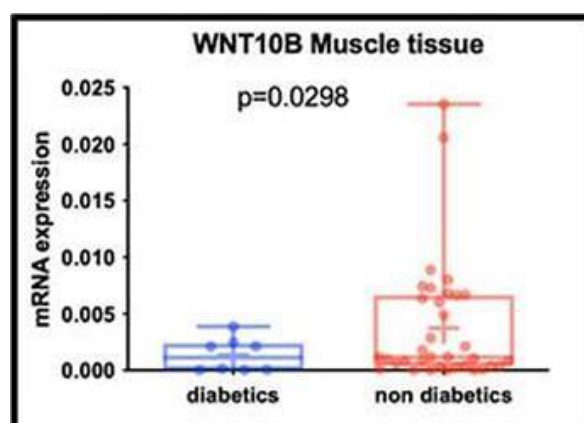
**Fig. 2.** Analisi dell'espressione genica nel tessuto adiposo: WNT5A, WNT10B, ADIPOQ, IL-10.

Nel tessuto adiposo (Fig. 2) risultano significativamente differenti: Wnt5a (non diabetici  $0.002004 \pm 0.002988$  vs diabetici  $0.0002502 \pm 0.0004146$ , p-value= 0.01), Wnt10b (non diabetici  $0.001428 \pm 0.001972$  vs diabetici  $1.666e-005 \pm 1.249e-005$ , p-value= 0.0006), ADIPOQ (non diabetici  $2.018 \pm 4.75$  vs diabetici  $0.01578 \pm 0.03073$ , p-value=0.0098) e IL-10 (non diabetici  $0.001638 \pm 0.003284$  vs diabetici  $1.663e-005 \pm 0.000$  p-value=0.03). I livelli di espressione genica di Wnt5a, Wnt10b e adiponectina nel tessuto adiposo sono inferiori nel soggetto diabetico. La citochina infiammatoria IL-10 risulta significativamente più elevata nei soggetti non diabetici.

Sempre nel tessuto adiposo non vi sono differenze di espressione genica statisticamente significative per: IL-6 (non diabetici  $0.02670 \pm 0.04734$  vs diabetici  $0.009238 \pm 0.01562$ , p-value=0.22), IL-8 (non diabetici  $0.01955 \pm 0.03227$  vs diabetici  $0.01450 \pm 0.03486$  p-value=0.75), TNF $\alpha$  (non diabetici  $0.001352 \pm 0.002005$  vs diabetici  $0.002252 \pm 0.003180$  p-value=0.75).

Infine si riportano i dati del tessuto muscolare (Fig. 3), dove sono significativamente inferiori nei soggetti diabetici i livelli di espressione genica di Wnt10b (non diabetici  $0.003722 \pm 0.005434$  vs diabetici  $0.0001335 \pm 0.001485$ , p-value= 0.02). Non risultano invece significativamente differenti: Wnt5a (non diabetici  $0.08456 \pm 0.01919$  vs diabetici  $0.1625 \pm 0.3038$ , p-value= 0.53), ADIPOQ (non diabetici  $0.2382 \pm 0.6997$  vs diabetici  $0.1840 \pm 0.3035$ , p-value=

0.70), IL-6 (non diabetici  $0.03830 \pm 0.07583$  vs diabetici  $0.02415 \pm 0.03301$ , p-value= 0.40), IL-8 (non diabetici  $0.04327 \pm 0.06914$  vs diabetici  $0.02906 \pm 0.03754$ , p-value= 0.44), IL-10 (non diabetici  $0.0009544 \pm 0.001512$  vs diabetici  $0.0004478 \pm 0.0004878$ , p-value= 0.13), TNF $\alpha$  (non diabetici  $0.0008652 \pm 0.0008804$  vs diabetici  $0.002270 \pm 0.002188$  p-value=0.09).



**Fig. 3.** Analisi dell'espressione genica nel tessuto muscolare: WNT10B.

### Conclusioni

I dati sull'imaging osseo, conformemente a quanto riportato in letteratura su studi minori, non hanno evidenziato differenze strutturali significative tra diabetici e controlli, indicando pertanto l'assenza di alterazioni quantitative dell'osso nei pazienti con T2DM.

L'analisi dell'espressione genica ossea ha invece oggettivato una ridotta espressione di Lef-1 nei diabetici rispetto ai non diabetici, in linea con l'ipotesi di un'inibizione del

*pathway* canonico di Wnt alla base della fragilità ossea correlata al T2DM. Nessuna citochina infiammatoria ha mostrato una differenza significativa di espressione genica nell'osso tra soggetti diabetici e non diabetici.

A livello del tessuto adiposo, sia Wnt5a che Wnt10b sembrano avere un ruolo chiave nella regolazione del pathway di Wnt. Entrambe le molecole sono espresse meno nei soggetti diabetici. La riduzione di questi determinerebbe una minore insulino-sensibilità da parte del tessuto adiposo. I livelli di ADIPOQ risultano essere significativamente più elevati nei non diabetici, a riprova del fatto che l'adiponectina a livello del tessuto adiposo sia fisiologicamente fondamentale per garantire tolleranza glucidica e insulino-sensibilità. Anche IL-10 è significativamente più elevato nei non diabetici, confermando così la funzione antiinfiammatoria di questa citochina.

Infine, nel tessuto muscolare si evincono differenze significative di espressione di Wnt10b e TNF $\alpha$ , potendo far supporre così un possibile ruolo chiave del pathway Wnt e dell'infiammazione anche nella genesi delle complicanze muscolari indotte dal diabete.

Nonostante la ridotta dimensione campionaria, i risultati di questo studio forniscono dati preliminari molto importanti per studi futuri sul possibile targeting terapeutico del Wnt signaling per la prevenzione delle fratture da fragilità, per le complicanze muscolari e le caratteristiche adipogeniche dei soggetti affetti da diabete mellito di tipo 2. In ambito chirurgico, le evidenze dello studio sottolineano la necessità di un approccio mirato nei pazienti diabetici durante l'intervento chirurgico e nella riabilitazione post-intervento.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Rugarli C. Medicina interna sistematica. Milano: EDRA Masson, 2015.

2. Pozzilli P, Briganti SI, Cannata F. L'endocrinologia del Campus Bio-Medico. Torino: Minerva Medica, 2020.
3. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 2014; 37 (Suppl 1): S81-S90.
4. Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. Lancet 2017; 389: 2239-51.
5. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 10th edn. Brussels, Belgium, 2021. <https://www.diabetesatlas.org>.
6. Janghorbani M, Van Dam RM, Willett WC, Hu FB. Systematic Review of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus and Risk of Fracture. Am J Epidemiol 2007; 166: 495-505.
7. Ahmed LA, Joakimsen RM, Berntsen GK, Fønnebø V, Schirmer H. Diabetes mellitus and the risk of non-vertebral fractures: the Tromsø study. Osteoporos 2006; 17: 495-500.
8. Yamamoto M, Yamaguchi T, Yamauchi M, Kaji H, Sugimoto T. Diabetic Patients Have an Increased Risk of Vertebral Fractures Independent of BMD or Diabetic Complications. J Bone Miner Res 2009; 24: 702-9.
9. Neutzsky-Wulff AV, Andreassen KV, Hjuler ST, et al. Future detection and monitoring of diabetes may entail analysis of both  $\beta$ -cell function and volume: How markers of  $\beta$ -cell loss may assist. J Transl Med 2012; 10: 214.
10. Napoli N, Chandran M, Pierroz DD, et al. Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility. Nat Rev Endocrinol 2017; 13: 208-19.
11. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. Nat Med 2013; 19: 179-92.
12. Piccoli A, Cannata F, Strollo R, et al. Sclerostin Regulation, Microarchitecture, and Advanced Glycation End-Products in the Bone of Elderly Women With Type 2 Diabetes. J Bone Miner Res 2020; 35: 2415-22.
13. Nie X, Wei X, Ma H, Fan L, Chen WD. The complex role of Wnt ligands in type 2 diabetes mellitus and related complications. J Cell Mol Med 2021; 25: 6479-95.

Sintesi della Tesi di Laurea discussa il 9 luglio 2021

Dott. Matteo Pileri, Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università Campus Bio-Medico di Roma

Prof. Rocco Papalia, Professore Ordinario di Malattie apparato locomotore, Università Campus Bio-Medico di Roma

Prof. Nicola Napoli, Professore Ordinario di Endocrinologia, Università Campus Bio-Medico di Roma

Dott.ssa Giulia Leanza, PHD Fellow in Endocrinology, Università Campus Bio-Medico di Roma

Per la corrispondenza:  
[matteo.pileri95@gmail.com](mailto:matteo.pileri95@gmail.com)



## **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** (Word) 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 dovranno impegnarsi a garantire la consegna dei testi da parte dei singoli Relatori inderogabilmente entro il termine sopra indicato**, nonché il rispetto delle presenti norme redazionali.

La redazione si riserva il diritto di apportare al testo eventuali necessarie modifiche nel rispetto delle norme redazionali.

I testi dovranno essere accompagnati dalla firma da parte dei singoli Autori della "Dichiarazione di responsabilità/Autorizzazione a pubblicare" allegata alle presenti norme, da consegnare tassativamente prima della Seduta.

Tale "liberatoria" esime la Rivista da eventuale correzione di bozze da parte dell'Autore.

**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 senza parentesi*. 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 da *New England Journal Medicine* alla pagina <https://www.nejm.org/author-center/new-manuscripts>

