



I Congresso Nazionale

La Ricerca nel Parkinson

Palermo 4-5 dicembre 2007

Fondazione Parkinson Italia

Via XX Settembre 11

90141 Palermo

www.fondazioneparkinsonitalia.it

Indice

1	INTRODUZIONE.....	5
1.1	FONDAZIONE PARKINSON ITALIA, <i>MARINA RIZZO, PRESIDENTE ..</i>	6
1.1.1	<i>La Fondazione: Pazienti e Medici insieme contro il Parkinson</i>	6
1.1.2	<i>Organico della Fondazione Parkinson Italia</i>	8
1.1.3	<i>Contatti</i>	9
1.2	PARKINSON ITALIA ONLUS: CONFEDERAZIONE ASSOCIAZIONI PARKINSON, <i>LUCILLA BOSSI - PRESIDENTE</i>	10
1.2.1	<i>La Confederazione.....</i>	10
1.2.2	<i>Le Associazioni</i>	11
1.2.3	<i>La missione di PARKINSON ITALIA.....</i>	14
1.2.4	<i>I progetti</i>	15
1.2.5	<i>Il Team operativo.....</i>	16
1.2.6	<i>Una rete esistenziale: tra progettualità e utopia</i>	16
2	ULTIMI SVILUPPI NELLA RICERCA DEL PARKINSON....	20
2.1	I PARKINSONISMI GENETICI, <i>ENZA MARIA VALENTE^{1,2}, ALESSANDRO FERRARIS^{1,3}, BRUNO DALLAPICCOLA^{1,3}</i>	21
2.1.1	<i>Introduzione.....</i>	21
2.1.2	<i>MP e parkinsonismi a trasmissione autosomica dominante</i>	22
2.1.3	<i>Parkinsonismi a trasmissione autosomica recessiva</i>	25
2.1.4	<i>Problemi diagnostici e consulenza genetica nella MP</i>	29
2.2	RUOLO DEGLI ESTROGENI NELLA MALATTIA DI PARKINSON, <i>GIOVANNI SAVETTIERI, MARIA ANTONIETTA MAZZOLA, MARCO D'AMELIO</i>	33

2.2.1	<i>Studi di epidemiologia analitica: estrogeni come fattore protettivo per MP</i>	36
2.2.2	<i>Studi condotti su animali</i>	41
2.3	POSSIBILITÀ DI INTERVENIRE CON PROTESI BIOLOGICHE NELLA TERAPIA DELLA MALATTIA DI PARKINSON, <i>ALBERTO ALBANESE</i>	52
2.3.1	<i>Anatomia funzionale e fisiopatologia dei sintomi nella malattia di Parkinson</i>	52
2.3.2	<i>Terapie cellulari nei pazienti con malattia di Parkinson</i>	54
2.3.3	<i>Neurostimolazione nei pazienti con malattia di Parkinson</i> .	56
2.3.4	<i>Come sviluppare una terapia con protesi biologiche nella malattia di Parkinson</i>	58
2.3.5	<i>Tabelle</i>	60
2.3.6	<i>Figure</i>	61
2.4	LE CELLULE STAMINALI: QUALE FUTURO NELL TERAPIA DELLA MALATTIA DI PARKINSON?, <i>MECO G, RUBINO A, PURCARO C.</i>	67
2.4.1	<i>LE CELLULE STAMINALI</i>	67
2.4.2	<i>POSSIBILI APPLICAZIONI ALLE MALATTIE NEUROLOGICHE</i>	72
2.4.3	<i>INDUZIONE DI NEUROGENESI</i>	72
2.4.4	<i>TRAPIANTO CELLULARE</i>	73
2.4.5	<i>LE CELLULE STAMINALI NELLA MALATTIA DI PARKINSON</i>	74
2.5	NUOVE TERAPIE NELLA MALATTIA DI PARKINSON, <i>MARIO ZAPPIA</i>	89
2.5.1	<i>Terapia Protettiva</i>	89
2.5.2	<i>Trattamento sintomatico</i>	92

2.5.3	<i>Terapia ristorativa</i>	95
2.6	DEVELOPMENT, RESULTS AND FUTURE APPLICATIONS OF THE FIRST GEGE THERAPY APPROACH FOR HUMAN PARKINSON'S DISEASE, <i>MICHAEL G. KAPLITT, MD PHD</i>	97
2.7	ANALYSIS OF SPECIFIC ABSORPTION RATE (SAR) FOR DEEP BRAIN STIMULATION LEADS IN MRI, <i>LEONARDO ANGELONE AND GIORGIO BONMASSAR</i>	114
2.7.1	<i>INTRODUCTION</i>	114
2.7.2	<i>METHODS</i>	117
2.7.3	<i>RESULTS</i>	118
2.7.4	<i>DISCUSSION AND CONCLUSIONS</i>	119
2.8	"STIMOLAZIONE ELETTRICA E MAGNETICA DEL SISTEMA NERVOSA: L'ESEMPIO DEL DEEP BRAIN STIMULATION ", <i>MICAELA LIBERTI, FERNANDO MAGGIO, ALESSANDRA PAFFI FRANCESCA APOLLONIO,, GUGLIELMO D'INZEO</i>	123
2.8.1	<i>Introduzione</i>	123
2.8.2	<i>La Deep Brain Stimulation</i>	124
2.8.3	<i>Il modello elettromagnetico e il problema dosimetrico</i>	126
2.8.4	<i>Modelli biofisici della struttura neuronale stimolata.</i>	129
2.9	L'IMAGING MOLECOLARE NEL PARKINSON: IL RUOLO CLINICO DEL DATSCAN, <i>GASPARE ARNONE</i>	135
2.9.1	<i>Stima quantitativa</i>	139
2.10	I DISTURBI DEL SONNO NELLA MALATTIA DI PARKINSON, <i>ROSA MARIA GAGLIO, GIACOMO GURGONE</i>	151
2.11	EFFETTI DELLA MODULAZIONE CEREBELLARE SULLA CORTECCIA MOTORIA DI PAZIENTI CON DISTONIE FOCALI, <i>ROMANO M*, BRIGHINA F, GIGLIA G, COSENTINO G, PANETTA ML, PUMA A, SAIA V, FIERRO B</i>	159

2.11.1	<i>Introduzione</i>	159
2.11.2	<i>Materiale e metodi</i>	163
2.11.3	<i>Risultati</i>	168
2.11.4	<i>Discussione</i>	169
3	LA RICERCA CLINICA TRA SCIENZA ED ETICA	174
3.1	LA RICERCA CLINICA TRA SCIENZA ED ETICA, <i>INA SIVIGLIA</i>	175
3.2	LA RICERCA CLINICA TRA SCIENZA ED ETICA NELLA MALATTIA DI PARKINSON, <i>ANTONINA ARGO - STEFANIA ZERBO</i>	178
3.3	LA SPERIMENTAZIONE CLINICA TRA SCIENZA, ETICA E POLITICHE SANITARIE, <i>VITTORIO CRESPI</i>	201

INTRODUZIONE

1.1 FONDAZIONE PARKINSON ITALIA, Marina Rizzo, Presidente

1.1.1 La Fondazione: Pazienti e Medici insieme contro il Parkinson

La “Fondazione Parkinson Italia” nasce a Palermo nel maggio del 2006, in stretti rapporti con la Confederazione “Parkinson Italia”. Le Associazioni già confederate a Parkinson Italia alla data della costituzione della Fondazione assumono la qualifica di soci fondatori, a differenza delle Associazione che aderiscono successivamente che entrano nella Fondazione come soci ordinari. Inoltre il Consiglio di Amministrazione della Fondazione viene eletto in seno al Consiglio Direttivo della Confederazione. Le due organizzazioni lavorano quindi in stretta collaborazione, pur mantenendo ognuna completa autonomia giuridica.

La Fondazione si avvale della consulenza di un prestigioso Comitato Scientifico e di una Commissione Etica. Quest’ultima non vuole sostituirsi ai comitati etici delle strutture universitarie od ospedaliere, ma costituisce un primo presidio di controllo e garanzia nella valutazione dei progetti di ricerca che la fondazione vuole portare avanti, verificandone gli assetti e il rispetto delle Norme di Buona Pratica Clinica

Scopi della Fondazione sono :

- la promozione della ricerca sulla malattia di Parkinson e Disturbi del Movimento;
- la promozione di progetti multidisciplinari per la cura della persona con Parkinson;
- la divulgazione e diffusione degli studi sulla malattia.

La Fondazione in virtù della stretta collaborazione tra medici ed ammalati nella lotta contro il Parkinson mira a favorire la ricerca finalizzata al benessere della persona. In primo luogo puntualizzando il diritto di autodeterminazione del paziente in merito alla sua partecipazione alla ricerca, con conseguente rivalutazione del suo ruolo: da oggetto passivo diventa soggetto della sperimentazione clinica. Il secondo aspetto riguarda le nuove tecnologie. Le protesi biologiche e le terapie geniche potrebbero contribuire in modo straordinario a migliorare la qualità della salute, tuttavia la loro utilizzazione solleva crescenti problemi etici. Promuovendo un confronto aperto sugli aspetti etici e sulla valutazione delle potenzialità e dei rischi si vogliono ottenere indicazioni per un buon impiego delle biotecnologie con attenzione agli aspetti di sicurezza del paziente

1.1.2 Organico della Fondazione Parkinson Italia

1.1.2.1 Consiglio di Amministrazione

Presidente Marina Rizzo (Palermo)

Vice Presidente Nadia Barbieri (Grosseto)

Segretario Giuseppe Gorgonie (Palermo)

Tesoriere Roberto Satta (Genova)

Consiglieri Valeria de la Vida (Roma)

Pasquale Bizzarro (Benevento)

Francesco Perna (Palermo)

1.1.2.2 Comitato Scientifico

Prof. Giovanni Abbruzzese (*Genova*)

Prof. Alberto Albanese (*Milano*)

Prof. Giuseppe Meco (*Roma*)

Prof. Stefano Ruggieri (*Roma*)

Prof. Mario Zappia (*Catania*)

1.1.2.3 Commissione Etica

Dott. Vittorio Crespi (*Milano*)

Dott. Salvino Leone (*Palermo*)

Dott. Carlo Pasetti (*Pavia*)

1.1.3 Contatti

Sito web: www.fondazioneparkinsonitalia.it

Informazioni: segreteria@fondazioneparkinsonitalia.it

1.2 PARKINSON ITALIA ONLUS: CONFEDERAZIONE **ASSOCIAZIONI PARKINSON, *Lucilla Bossi - Presidente***

1.2.1 La Confederazione

PARKINSON ITALIA (onlus) è una Confederazione di Associazioni in favore dei malati di Parkinson e dei loro familiari che interessa circa 10.000 persone. E' un organismo NAZIONALE con sede a Milano.

Le associazioni che aderiscono a Parkinson Italia si stendono su tutta la penisola. Attualmente, da Nord a Sud: Bolzano, Trento, Vicenza, Verona, Brescia, Arona, Milano, Pavia con le sedi di Vigevano e Voghera, Genova, Parma, Reggio Emilia, Carpi, Viareggio, Grosseto, Ancona, Roma, Frosinone, Benevento, Palermo con la sede di Messina.

Si avvale della consulenza di un prestigioso Comitato Scientifico che conta i maggiori esperti italiani della patologia.

PARKINSON ITALIA rappresenta qualche cosa di radicalmente nuovo nel panorama associazionistico italiano: un NETWORK di associazioni che mantenendo la propria indipendenza e la propria presa sul territorio - ovvero stretti rapporti con la regione di appartenenza - si sono date al tempo stesso un'organizzazione

moderatamente centralizzata per avere maggiore visibilità a livello nazionale. Non dunque una struttura verticale e gerarchica ma una struttura a RETE, “piatta”, intrinsecamente democratica.

1.2.2 Le Associazioni

La missione delle Associazioni confederate è aiutare i pazienti parkinsoniani e i loro familiari ad avere la miglior qualità di vita possibile .

Il loro programma minimo si può riassumere in tre punti:

informazioni

contatti e compagnia

sostegno psicologico

1° punto: INFORMAZIONI

L’Associazione può informare sui centri nella zona dove il Parkinson è curato in modo specialistico e dove è possibile fare cicli di riabilitazione specifica per questa malattia.

L’Associazione può organizzare incontri tra un medico o un terapeuta specializzati nel Parkinson e gli associati offrendo loro l’occasione di porre a un vero esperto tutte le domande che vorranno.

Non può dare informazioni di carattere terapeutico, a meno che non sia un medico a rispondere ma può dare informazioni di carattere pratico utili alla gestione quotidiana dei sintomi.

L'Associazione può distribuire materiale informativo come la guida alla malattia di Parkinson in sei opuscoli, il notiziario di Parkinson Italia News, il Manuale per la autoriabilitazione a domicilio, gli Atti dei Convegni e altro ancora.

E per chi legge l'inglese è disponibile il notiziario dell' EPDA, l'Associazione Europea alla quale Parkinson Italia aderisce.

2° punto: CONTATTI e COMPAGNIA

E' noto che la malattia di Parkinson spinge all'isolamento, in parte per caratteristiche intrinseche alla patologia stessa, in parte per l'imbarazzo che molti pazienti provano per i loro sintomi e che li spinge a chiudersi in casa.

L'Associazione può creare gruppi d'incontro per pazienti e familiari, condotti o meno da uno psicologo, pazienti e familiari che in questo modo hanno una buona occasione per lasciare le loro mura protettive e scambiare quattro chiacchiere senza imbarazzi. Possono nascere così delle vere amicizie dove il piacere di ritrovarsi in occasione degli incontri periodici è grande e genuino.

L'Associazione è poi il luogo dove pazienti e familiari possono rivolgersi quando sono un po' giù, sicuri di trovare l'ascolto comprensivo di chi conosce il problema da vicino. Di persona o al telefono è un punto di riferimento costante e sicuro per sentirsi meno soli con le proprie difficoltà.

3° punto: SOSTEGNO PSICOLOGICO

Da tutto quello che è stato detto fin qui è chiaro che l'associarsi, per il semplice fatto che permette nuovi contatti, che dà un aiuto con informazioni preziose, che offre l'occasione di alleggerire un po' il proprio fardello di pazienti o di caregiver dando sfogo al proprio malessere o, all'estremo opposto, dimenticandolo per un paio d'ore, ha come risultato – anche in assenza di riunioni specifiche – di sostenere anche moralmente.

Tuttavia la qualità della nostra vita può migliorare notevolmente, non solo con una giusta terapia e un buon programma riabilitativo ma anche *per come noi stessi rispondiamo a questo accidente che ci è capitato*. Possiamo sentirci vittime, autocommiserarci, pesare su chi ci è vicino, oppure attingere alla nostra forza interiore e continuare, nonostante tutto, a tenere saldamente in pugno il timone della nostra vita.

Infine, in una prospettiva meno angusta rispetto a quella in cui siamo soliti muoverci e ragionare , potremmo includere tra i compiti che un'associazione può darsi, anche quello di ricordare ai suoi iscritti che un uomo o una donna non sono semplicemente un organismo che ingurgita levodopa o dopaminoagonisti ma PERSONE dotate di spirito, di carattere e di una mente, e che la loro qualità di vita dipenderà in ultima analisi da quello che loro stessi sapranno fare di questo colpo della sorte.

Nelle parole di Aldous Huxley: “l’esperienza non è quello che ci capita ma quello che facciamo con quello che ci capita”

1.2.3 La missione di PARKINSON ITALIA

aiutare le associazioni confederate ad adempiere alla *loro* MISSION - che è aiutare i pazienti parkinsoniani e i loro familiari a convivere al meglio con la malattia,

costituire una rete lungo la quale corrono risorse e informazioni

A questo scopo Parkinson Italia:

organizza riunioni periodiche tra le Associazioni confederate per scambi di informazioni e di esperienze

partecipa ai principali Congressi italiani sul Parkinson

- organizza un Convegno scientifico annuale
- distribuisce un notiziario di alta qualità scientifica e materiale informativo altrettanto qualificato
- mette un sito Internet a disposizione degli aderenti
 - aderisce all'E.P.D.A. (European Parkinson's Disease Association).

1.2.4 I progetti

“ Tutti in ballo contro il Parkinson” (con Novartis), esperienza ludica di musica, danza e altro... Tuttora in corso.

“... Via col Parkinson” la cui realizzazione si è conclusa da qualche tempo ma che è tuttavia meritevole di menzione per lo straordinario successo raccolto

Questo progetto, grazie ai contributi di alcune case farmaceutiche, ci ha permesso di aiutare le Associazioni che aderiscono a Parkinson Italia a portare a Stresa, al congresso EPDA un'ottantina di loro iscritti. Il progetto era mirato a offrire alle Associazioni Confederate la possibilità di coinvolgere i loro aderenti a partecipare a un convegno scientifico di grande interesse vivere due giorni in un ambiente estraneo e anche in mezzo a persone delle più diverse

nazionalità (che, peraltro, hanno molto da insegnarci al riguardo della disinvoltura con cui “portano” anche sintomi che per noi Italiani – sempre così attenti agli sguardi altrui – sono fonte di imbarazzo se non di vergogna).

“Parkinson Italia diventa più’ grande” progetto sempre *in progress* che si propone:

- di rendere la presenza delle Associazioni più diffusa su tutto il territorio nazionale
- di assistere le Associazioni che vorrebbero formarsi e quelle appena nate o comunque in difficoltà
 - aiutare le nuove Associazioni a crescere nella realtà locale

1.2.5 Il Team operativo

per migliorare la struttura di Parkinson Italia rendendola più efficiente e funzionale ai suoi scopi è stato creato un team operativo che agisce – con ampia discrezionalità e considerevole efficienza – nei limiti di quanto stabilito dal Consiglio Direttivo

1.2.6 Una rete esistenziale: tra progettualità e utopia

Il Parkinson non è solamente una malattia neurologica, è una CONDIZIONE ESISTENZIALE che investe tutto il contesto della

vita del paziente (e di chi gli vive accanto) accompagnandolo, se si ammala giovane, anche 20 o 30 anni, forse di più.

Le persone con Parkinson (e i loro familiari - *caregiver*) hanno bisogno di essere aiutati non solo sul piano della malattia ma anche su quello esistenziale dell'incontro con l'aspetto oscuro e doloroso della vita per imparare ad attingere alle loro risorse interiori

Con il moltiplicarsi delle Associazioni di pazienti a partire dalla fine degli anni '80 nasce il "paziente informato". Il malato vuol sapere tutto della propria malattia partendo dall'assunto che questa conoscenza l'aiuterà a curarsi meglio. Tuttavia l'informazione medico-scientifica benché importantissima per una gestione ottimale dei sintomi, quando è troppa presenta alcuni effetti collaterali:

Ansie anticipatorie, già comunque presenti in una malattia degenerativa

Accanimento conoscitivo con l'illusione di poter controllare l'evoluzione della malattia

Fuga dalla realtà che porta il paziente lontano da se stesso inducendolo a guardare sempre fuori di sé, alla ricerca della cura miracolosa e mai dentro alla ricerca della propria forza morale

Tutto quello che possiamo imparare sul Parkinson non ci avvicinerà di un passo a quella pace interiore e a quel distacco che sono la cosa di cui chi è malato ha più bisogno.

La domanda

A che cosa serve sapere tutto su levodopa e dopaminoagonisti se non si riesce a operare il passaggio da una rassegnazione amara a un'accettazione serena della malattia?

La fine del mondo e il nuovo inizio

Una malattia cronica e grave come il Parkinson è sempre, per chi ne è colpito, una “fine del mondo”- del proprio mondo - ma la rete esistenziale delle Associazioni ci può aiutare a imparare che il nostro mondo può essere ricostruito su nuove basi, su un sistema di valori completamente nuovo e che, anche se la malattia è cronica, è possibile una rinascita, un nuovo inizio, non già del corpo ma dell'anima.

Ampliare la missione

Le Associazioni che hanno trovato la loro prima ragion d'essere nel creare pazienti informati dovrebbero ora fare un salto di qualità e **AMPLIARE LA LORO MISSIONE** integrando un'informazione scientifica adeguata alle reali necessità del paziente, con la saggezza,

la sensibilità, l'umanità e l'esperienza necessarie ad aiutare pazienti e familiari che non riescono ad accettare le condizioni della propria esistenza.

L'approdo

Ogni Associazione potrà allora diventare per molti pazienti un approdo, un luogo dove – magari dopo anni di solitudine e di smarrimento e talvolta anche d'isolamento autoimposto – trovare gli stimoli adatti a riprendere in mano la propria vita.

Ultimi sviluppi nella Ricerca del Parkinson

2.1 I PARKINSONISMI GENETICI, *Enza Maria Valente*^{1,2}, *Alessandro Ferraris*^{1,3}, *Bruno Dallapiccola*^{1,3}

1 Unità Neurogenetica, Istituto CSS-Mendel, Roma;

2 Dip. Scienze Pediatriche Mediche e Chirurgiche, Università di Messina, Messina;

3 Dip. Medicina Sperimentale e Patologia, Università La Sapienza, Roma.

2.1.1 Introduzione

Nell'ultimo decennio, l'identificazione di numerosi geni causativi di parkinsonismi a trasmissione autosomica dominante o recessiva ha portato un notevole contributo alla comprensione del processo neurodegenerativo. Sebbene i geni causativi di parkinsonismo siano responsabili di una percentuale relativamente bassa di casi (prevalentemente con storia familiare positiva), è verosimile che i meccanismi patogenetici identificati nelle forme monogeniche possano giocare un ruolo rilevante anche nella patogenesi della più comune forma sporadica di Malattia di Parkinson (MP) ad eziologia multifattoriale. Questa presentazione tratterà di 5 geni inequivocabilmente causativi di parkinsonismo, due a trasmissione autosomica dominante (PARK1/SNCA codificante per la proteina alfa-sinucleina, e PARK8/LRRK2 codificante per la proteina LRRK2/Dardarina) e tre con modalità di trasmissione autosomica recessiva (PARK2/Parkin, PARK6/PINK1 e PARK7/DJ-1).

2.1.2 *MP e parkinsonismi a trasmissione autosomica dominante*

2.1.2.1 PARK1/4 – SNCA – alfa-sinucleina

Il locus PARK1 / PARK4 sul braccio corto del cromosoma 4 si identifica con il gene SNCA, codificante per la proteina alfa-sinucleina. L'importanza storica di questo gene deriva dal fatto che SNCA è stato il primo gene ad essere identificato come causativo di MP ereditaria a trasmissione autosomica dominante in un'ampia famiglia della Campania con ramificazioni negli Stati Uniti (la famiglia di Contursi), aprendo la strada ad una vera e propria rivoluzione negli studi sulla genetica e sui meccanismi patogenetici della MP. Inoltre, pur essendo raramente mutata nei pazienti parkinsoniani, l'alfa-sinucleina è una proteina estremamente importante nella MP in quanto rappresenta la componente principale dei corpi di Lewy, le caratteristiche inclusioni citoplasmatiche formate da aggregati proteici presenti nei neuroni aminergici sopravvissuti alla degenerazione in pazienti con MP idiopatica. Le mutazioni di SNCA rappresentano una causa molto rara di MP familiare, con sole 3 mutazioni missenso (A30P, E46K, A53T) sinora identificate in una decina di famiglie. Tuttavia, recenti studi hanno dimostrato che anche la duplicazione o triplicazione del gene SNCA (in assenza di mutazioni puntiformi) possono causare MP a

trasmissione dominante. I portatori di mutazioni nel gene alfa-sinucleina presentano un quadro clinico tendenzialmente più grave della MP classica, caratterizzato da parkinsonismo solitamente associato a demenza e allucinazioni visive di severità variabile. Gli studi autoptici hanno dimostrato atrofia della sostanza nera e numerosi corpi di Lewy positivi per alfa-sinucleina e ubiquitina all'interno dei neuroni aminergici residui, non soltanto nella sostanza nera ma anche nel troncoencefalo e in regioni corticali, un quadro neuropatologico sovrapponibile con quello osservato nella demenza con corpi di Lewy. Lo studio di famiglie con duplicazione o triplicazione del gene SNCA ha dimostrato una correlazione precisa tra numero di copie, livelli di espressione del gene e gravità del quadro clinico. I portatori di triplicazione presentano un fenotipo molto più grave con esordio precoce, disautonomia, deterioramento cognitivo ed evoluzione rapida della malattia. Viceversa, i portatori di duplicazione del gene presentano un fenotipo simile alla MP idiopatica.

2.1.2.2 PARK8 - LRRK2 – dardarina

Il gene LRRK2 è stato recentemente identificato all'interno del locus PARK8 (cromosoma 12) e codifica per una proteina di 2517 aminoacidi denominata LRRK2 o dardarina (dal termine basco

“dardara” che significa “tremore”). E’ stato recentemente dimostrato che una specifica mutazione che sostituisce una glicina con una serina in posizione 2019 della proteina (G2019S) rappresenta in assoluto la causa nota più frequente di parkinsonismo ereditario. A seguito di un effetto fondatore, tale mutazione è responsabile di circa il 5-8% dei casi con MP a trasmissione autosomica dominante e del 2% circa dei casi sporadici di MP nella popolazione caucasica. In alcune popolazioni come quella araba nord-africana e quella ebrea aschenazita, la frequenza di tale mutazione può raggiungere il 40% dei casi di MP. Altre mutazioni del gene LRRK2 sono molto più rare. La penetranza delle mutazioni di LRRK2 aumenta con l’età ma non diventa mai completa. Infatti sono stati descritti alcuni individui ottuagenari portatori sani della mutazione G2019S.

Il quadro clinico associato alla mutazione G2019S e ad altre mutazioni di LRRK2 è caratterizzato da MP senza caratteristiche atipiche, con età di esordio variabile dalla terza all’ottava decade (l’età media di esordio è attorno alla quinta-sesta decade). È da notare che, data la penetranza ridotta e correlata all’età, la mutazione G2019S si riscontra anche in pazienti con storia familiare negativa ed esordio tardivo della malattia, pertanto del tutto indistinguibili dalle comuni forme idiopatiche di MP sinora considerate “non genetiche”.

2.1.3 *Parkinsonismi a trasmissione autosomica recessiva*

Sinora sono stati identificati tre geni causativi di parkinsonismo a trasmissione autosomica recessiva (Parkin, PINK1 e DJ-1). Il quadro clinico delle forme recessive è solitamente caratterizzato da età di esordio giovanile (< 40-45 anni di età), lenta progressione della malattia e ottima risposta alla terapia con levodopa, con occasionale associazione di caratteristiche atipiche quali distonia all'esordio e fluttuazioni diurne della sintomatologia. Tuttavia mutazioni in tali geni possano essere talora responsabili di quadri clinici ad esordio più tardivo e presentazione indistinguibile dalla MP idiopatica.

Un aspetto ancora non ben definito nell'ambito dei parkinsonismi recessivi è il frequente riscontro di singole mutazioni in eterozigosi sia in pazienti parkinsoniani che in soggetti sani. Il ruolo di tali mutazioni è ancora ampiamente controverso e numerose ipotesi sono in atto. L'ipotesi al momento più interessante è che le mutazioni eterozigoti possano rappresentare un fattore di rischio per lo sviluppo di MP idiopatica e che la presenza di tali mutazioni, non sufficiente da sola allo sviluppo della malattia, possa concorrere con altri fattori genetici ed ambientali al raggiungimento di una "soglia di malattia", superata la quale vi sarebbe lo sviluppo del fenotipo conclamato. Tale ipotesi, almeno per quanto riguarda i geni Parkin e PINK1, è

supportata da studi di neuroimmagini funzionali, che hanno dimostrato la presenza di alterazioni significative, seppure a livello subclinico, in soggetti sani portatori di singole mutazioni in eterozigosi, come ad esempio la perdita di terminali dopaminergici afferenti allo striato o la riorganizzazione di alcuni circuiti neuronali. Il confronto della frequenza di singole mutazioni in popolazioni comparabili di pazienti e controlli ha prodotto risultati contraddittori.

2.1.3.1 PARK2 – parkin

Mutazioni nel gene PARK2, codificante per la proteina con attività ubiquitin-ligasica parkina, rappresentano la causa più frequente di parkinsonismo ad esordio giovanile, con una prevalenza inversamente proporzionale all'età di esordio dei pazienti.

La frequenza delle mutazioni nel gene PARK2 in pazienti con parkinsonismo ad esordio giovanile (<45 anni) raggiunge quasi il 50% dei casi familiari a trasmissione autosomica recessiva (individui affetti nella stessa generazione con genitori sani; frequente consanguineità tra i genitori) e il 10-15% dei casi sporadici. In questi ultimi, le mutazioni si riscontrano soprattutto in casi ad esordio molto precoce (< 20 anni) mentre sono rare nei pazienti con età di esordio più elevata. Tuttavia, è da notare che l'età di esordio può variare nei membri di una stessa famiglia, raggiungendo persino la

settima decade di vita. Il quadro neuropatologico è solitamente caratterizzato da una perdita di neuroni dopaminergici della sostanza nera e del locus coeruleus, più selettiva rispetto alla MP idiopatica e solitamente associata ad assenza di corpi di Lewy. Tuttavia, sono stati descritti rari casi con riscontro neuropatologico di corpi di Lewy o aggregati neurofibrillari simili a quelli osservati nelle tauopatie. Le cause di tale variabilità non sono ancora chiare, ma potrebbero essere legate a specifiche mutazioni che riducono invece di abolire completamente la funzione della proteina. Nei pazienti con MP idiopatica, la proteina parkin si riscontra all'interno dei corpi di Lewy.

2.1.3.2 PARK6 – PINK1

Mutazioni del gene PINK1, localizzato nel braccio corto del cromosoma 1 e codificante per una protein-chinasi a localizzazione mitocondriale, rappresentano la seconda causa più comune di parkinsonismo a trasmissione recessiva dopo le mutazioni di Parkin. La prevalenza di mutazioni del gene PINK1 è nettamente inferiore rispetto a quella di Parkin, aggirandosi attorno al 2% dei pazienti con parkinsonismo ad esordio giovanile. L'età di esordio media sembra essere tendenzialmente più alta rispetto a quella dei pazienti con mutazioni del gene Parkin (fine quarta-inizio quinta decade), tuttavia

sono stati descritti casi con esordio molto precoce (seconda-terza decade). Il quadro clinico dei pazienti portatori di due mutazioni nel gene PINK1 è caratterizzato da un parkinsonismo tipico, con una minore frequenza di caratteristiche atipiche rispetto ai pazienti Parkin-positivi. Non sono disponibili reperti autoptici di pazienti con mutazioni omozigoti o eterozigoti composte del gene PINK1; pertanto non si hanno dati riguardo la presenza di corpi di Lewy. L'analisi di alcuni cervelli di pazienti portatori di singole mutazioni in eterozigosi ha riscontrato un quadro neuropatologico sovrapponibile alla MP idiopatica con presenza di corpi di Lewy. Inoltre, uno studio di espressione su cervelli di pazienti con MP idiopatica non portatori di mutazioni nel gene PINK1 ha dimostrato la presenza della proteina PINK1 in circa il 10% dei corpi di Lewy.

2.1.3.3 PARK7 - DJ-1

Mutazioni nel gene DJ-1 rappresentano la causa più rara di MP a trasmissione recessiva, con una frequenza inferiore all'1% nei pazienti con esordio precoce della malattia. Il quadro clinico è sovrapponibile a quello delle altre forme a trasmissione recessiva, con frequente riscontro di segni atipici come la distonia all'esordio, che può interessare anche il distretto craniale e cervicale. Sono frequenti inoltre i disturbi psichiatrici, talora gravi. Le rare mutazioni

sinora descritte sono sia di tipo missenso che delezioni multiesoniche, e sono state descritte sia in omozigosi che in eterozigosi, queste ultime con significato patogenetico non definito. Infatti a differenza dei dati riportati per parkin e PINK1, gli studi di neuroimmagini funzionali in soggetti sani portatori di singole mutazioni eterozigoti di DJ-1 non sembrano mostrare alterazioni di tipo subclinico. Studi neuropatologici in pazienti con mutazioni in DJ-1 non sono ad oggi disponibili.

2.1.4 Problemi diagnostici e consulenza genetica nella MP

Se da una parte l'identificazione di numerosi geni causativi di MP ha rivoluzionato l'approccio del neurologo clinico a questa malattia, bisogna ricordare che al momento soltanto il 20% circa dei casi di MP ad esordio giovanile e non oltre il 3% dei casi di MP ad esordio tardivo sono dovuti a mutazioni in geni specifici.

La nuova era della genetica della MP ha permesso di sviluppare test genetici diagnostici, ma allo stesso tempo ha portato alla ribalta nuove ed importanti problematiche. 1) Mentre in alcuni pazienti la familiarità positiva indica chiaramente una forma genetica (dominante o recessiva) di MP, in molti casi il quadro clinico tipico e l'assenza di storia familiare possono rendere una forma genetica indistinguibile dalla più comune forma idiopatica della malattia.

Pertanto, non sempre è semplice selezionare i pazienti che possono essere portatori di una possibile forma genetica di MP, e che quindi andrebbero indirizzati ad un'adeguata consulenza genetica e ad un eventuale test genetico. 2) Nel sospetto di una forma genetica, la scala di priorità dei geni da analizzare non è sempre intuitiva, a seguito delle scarse correlazioni genotipo-fenotipo con sovrapposizione dei fenotipi associati a forme genetiche differenti, e per la possibile presenza di fenocopie e di fattori genetici quali la penetranza incompleta, che possono rendere difficile l'interpretazione della modalità di trasmissione della malattia all'interno di una famiglia. 3) Una volta selezionato il gene da analizzare, i risultati dell'indagine genetica possono essere di non semplice interpretazione. La maggior parte dei geni sono grandi e, con l'esclusione di G2019S nel gene LRRK2, non vi sono "hot spots" mutazionali. La grande varietà di mutazioni possibili, tra cui le mutazioni puntiformi ed i riarrangiamenti esonici, richiede l'utilizzo combinato di tecnologie complementari, spesso complesse e costose e non sempre comunemente disponibili in laboratorio. Le tecniche utilizzate spesso non presentano una sensibilità diagnostica del 100%, e conseguentemente non tutte le mutazioni possono essere correttamente identificate. 4) Una volta effettuato un test genetico questo andrebbe sempre accompagnato con un'appropriata

consulenza genetica, con ulteriori importanti problematiche. Infatti, a seguito della ridotta sensibilità delle tecnologie utilizzate e della notevole eterogeneità genetica della MP, un risultato negativo non esclude la base genetica della malattia. In caso di referto positivo risulta difficile effettuare correlazioni tra il tipo di mutazione identificata e la possibile evoluzione del quadro clinico e fornire elementi prognostici utili alla gestione della malattia o alla scelta delle terapie più appropriate. Infine, il riscontro di una singola mutazione in eterozigosi nell'ambito dei geni recessivi rappresenta un risultato al momento non interpretabile, soprattutto in termini di rischio di ricorrenza nella famiglia.

Al momento i test genetici per le forme mendeliane di MP sono disponibili in Italia soltanto in pochi laboratori selezionati, e dovrebbero essere consigliati dal neurologo specialista con cautela e soltanto dopo attenta valutazione del quadro clinico e della storia familiare del paziente. In particolare, l'analisi molecolare dei geni causativi di parkinsonismo recessivo andrebbe effettuata nei pazienti con MP ad esordio giovanile e chiara modalità di trasmissione autosomica recessiva (ad esempio più fratelli affetti con genitori sani, consanguineità dei genitori), soprattutto se con progressione lenta della malattia e risposta alla terapia con levodopa eccellente e prolungata nel tempo.

Bibliografia selezionata

Douglas MR, Lewthwaite AJ, Nicholl DJ (2007) Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism. *Expert Rev Neurother* 7:657-666

Shih MC, Felicio AC, de Oliveira Godeiro-Junior C, et al (2007) Molecular imaging in hereditary forms of parkinsonism. *Eur J Neurol* 14:359-368

Valente EM, Ferraris A (2007) Heterozygous mutations in genes causing parkinsonism: monogenic disorders go complex. *Lancet Neurol* 6:576-578

Klein C, Lohmann-Hedrich K, Rogaeva E, Schlossmacher MG, Lang AE (2007) Deciphering the role of heterozygous mutations in genes associated with parkinsonism. *Lancet Neurol* 6:652-662

Hardy J, Cai H, Cookson MR, et al (2006) Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism. *Ann Neurol* 60:389-398

Farrer MJ (2006) Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nat Rev Genet* 7:306-318

Neurons intracellularly labeled with HRP: light-microscopic analysis. *J Neurosci* 1987;

2.2 RUOLO DEGLI ESTROGENI NELLA MALATTIA DI PARKINSON, *Giovanni Savettieri, Maria Antonietta Mazzola, Marco D'Amelio*

Dipartimento Universitario di Neuroscienze Cliniche, Università degli Studi di Palermo

La MP si caratterizza per un esordio ed una progressione graduale ed insidiosa dei sintomi, che riflette la perdita progressiva dei neuroni dopaminergici della sostanza nera (pars compacta) dei nuclei encefalici della base. Il progressivo depauperamento neuronale comporta la comparsa di sintomi caratteristici della malattia: tremore a riposo, bradicinesia, rigidità ed instabilità posturale. Pur essendo ad oggi dal punto di vista clinico una delle malattie meglio caratterizzate, le cause della Malattia di Parkinson (MP) rimangono sconosciute. Sono stati ipotizzati diversi meccanismi lesionali quali stress ossidativo, *misfolding* delle proteine, riduzione dei fattori trofici, ridotta tolleranza a sostanze tossiche e meccanismi infiammatori, ma il meccanismo che porta alla degenerazione dei neuroni dopaminergici è ancora dibattuto.

La MP è un disordine “complesso” in cui fattori genetici ed ambientali interagendo tra di loro divengono probabilmente responsabili del danno neuronale.

Studi epidemiologici rivelano come la malattia esordisce insidiosamente tra i 50 ed i 60 anni di età e che il sesso più frequentemente colpito è quello maschile. Questa differenza nei sessi evidente per la MP idiopatica non lo è per gli altri parkinsonismi, come quello iatrogeno o quello vascolare.¹

Tale aspetto suggerito da studi di epidemiologia descrittiva di prevalenza ed incidenza della MP, è supportato da studi su modelli animali, è alla base di studi di epidemiologia analitica. In breve l'epidemiologia descrittiva si basa sull'utilizzo di dati già esistenti ed ha lo scopo di quantificare la frequenza di una malattia o di qualsiasi altro evento di interesse, mentre l'epidemiologia analitica cerca di saggiare in termini probabilistici se una relazione causa effetto, suggerita da inchieste descrittive o osservazioni cliniche, è vera o falsa².

In questa relazione verranno esaminati alcuni studi di epidemiologia descrittiva ed analitica e saranno riassunti alcuni dei risultati di studi condotti su animali che hanno posto la loro attenzione sul ruolo degli estrogeni nel determinismo della MP. **Studi di epidemiologia descrittiva: differenze nel rischio di MP tra uomini e donne.**

L'epidemiologia descrittiva si avvale di misure di prevalenza (rapporto tra numero di pazienti sull'intera popolazione a rischio in

un dato intervallo di tempo/periodo), l'incidenza (rapporto tra numero di nuovi pazienti sull'intera popolazione a rischio in un dato intervallo di tempo/periodo) e dei tassi di mortalità. Gli studi di prevalenza e di incidenza mostrano una frequenza maggiore (prevalenza) ed un rischio di sviluppare MP (incidenza) più elevato nel sesso maschile rispetto a quello femminile.

Alcuni studi hanno riportato prevalenze di MP più elevate nel sesso maschile rispetto a quello femminile,^{3,4,5,6,7} mentre altri non hanno osservato differenze significative tra i sessi.^{8,9,10,11}

Le misure di prevalenza, sebbene utili ai fini della pianificazione sanitaria, non sono al contrario delle misure di incidenza un indice del rischio di malattia.

Gli studi di incidenza mostrano questa riduzione del rischio di MP nelle donne, dato che è evidente per tutte le fasce d'età.^{12,13,14}

Questo dato è stato confermato da una recente metanalisi che ha analizzato studi compiuti in diverse aree geografiche (Polonia, Cina, Italia, Finlandia USA). Il risultato della metanalisi ha confermato un rischio di sviluppare MP più elevato negli uomini rispetto alle donne. Pur non essendo immediata la spiegazione di tale evidenza, gli autori hanno ipotizzato che lo stile di vita degli uomini (ad esempio maggiore predisposizione ai traumi), ovvero un ruolo protettivo degli

ormoni sessuali femminili potrebbero essere responsabili di tale differenza.¹⁵

Come gli studi di prevalenza ed incidenza, sebbene tale dato non sia sempre confermato,¹⁶ anche alcuni studi di mortalità hanno osservato un rischio più elevato nel sesso maschile rispetto a quello femminile.¹⁷

I dati provenienti dagli studi di epidemiologia descrittiva hanno consentito di ipotizzare un ruolo neuroprotettivo degli ormoni sessuali femminili, in particolare degli estrogeni.

2.2.1 Studi di epidemiologia analitica: estrogeni come fattore protettivo per MP.

La maggior parte della letteratura sugli estrogeni fino a pochi anni fa aveva focalizzato l'attenzione sul ruolo degli estrogeni esogeni.^{18,19,20,21}

Uno dei primi studi che ha indagato l'associazione tra MP ed estrogeni endogeni è stato quello di Benedetti et al.²² Gli autori hanno confrontato alcune variabili come: tipo di menopausa, età alla menopausa e terapia sostitutiva estrogenica in 72 donne con nuova diagnosi di MP (casi) con quelle di 72 donne non affette da MP (controlli) individuate nell'ambito della popolazione generale. I

risultati ottenuti hanno evidenziato una associazione tra isterectomia e MP, ipotizzando quindi un aumentato rischio di MP nelle donne sottoposte a condizioni che causano una precoce riduzione degli estrogeni endogeni.

Dati simili sono stati osservati da un altro gruppo di lavoro italiano,²³ che confrontando il numero di gravidanze, l'età al menarca, l'età e il tipo di menopausa e l'uso di terapia estrogenica pre e postmenopausale in 131 donne affette da MP con quelle di 131 donne di controllo ha osservato una associazione tra MP e 1) durata della vita fertile inferiore a 36 anni (intesa come intervallo tra età al menarca ed età alla menopausa), 2) menopausa precoce, 3) numero di gravidanze superiore a tre. Questi dati suggeriscono una relazione tra declino dei livelli estrogenici durante il periodo perimenopausale, che inizia 2 o 3 anni prima della menopausa, ed il processo degenerativo che porta alla MP. Il ruolo delle gravidanze è interpretato dagli autori come effetto dei più bassi livelli di estrogeni nelle donne che hanno avuto più gravidanze rispetto alle nullipare.^{24,25,26} Inoltre, i livelli ormonali possono anche essere normali ma la biodisponibilità è ridotta a causa dell'elevato numero di SHBG (proteine di trasporto degli ormoni sessuali).^{27,28} Lo stesso studio ha osservato un'associazione inversa tra menopausa chirurgica e MP, dato questo di più difficile interpretazione. L'effetto della menopausa

chirurgica sull'esposizione agli estrogeni è tuttavia il risultato di una catena di eventi diversi e quindi la menopausa chirurgica, epifenomeno di questo processo, sarebbe un indicatore indiretto e non specifico. Riguardo il ruolo della terapia estrogenica sostitutiva, gli autori non hanno trovato dei risultati statisticamente significativi.

Alcuni studi hanno riportato un effetto positivo degli estrogeni esogeni sulle funzioni motorie dei pazienti affetti da MP, ³²⁻²⁹ mentre altri hanno riportato un effetto negativo. ³⁰ Altri ancora hanno rilevato che la terapia ormonale sostitutiva potrebbe ridurre il rischio di demenza nel paziente con MP, senza però mostrare efficacia nella prevenzione della malattia. ³¹

A tal proposito la frequenza dell'uso di terapia estrogenica in un gruppo di donne affette da MP (25%) era la metà di un gruppo di donne di controllo (50%) (Currie et al³²) facendo ipotizzare che la terapia estrogenica post menopausale potrebbe essere associata nelle donne ad una riduzione del rischio di MP.

Un recente studio di Rocca ³³ ha valutato l'associazione tra ooforectomia prima della menopausa e rischio di MP. Gli autori hanno incluso nello studio tutte le donne sottoposte ad ooforectomia unilaterale e bilaterale nel periodo compreso tra il 1950 ed il 1987. Ogni donna è stata appaiata ad un'altra donna di riferimento, cioè

non sottoposta ad intervento di ooforectomia. I risultati dello studio hanno mostrato un aumentato rischio di MP nelle donne sottoposte ad intervento chirurgico. Inoltre il rischio era più elevato nelle donne sottoposte ad ooforectomia in età più giovane.

Tuttavia i dati presenti in letteratura sul ruolo degli estrogeni nel determinismo della MP non sono concordi.

Uno studio di associazione³⁴ tra caratteristiche della vita fertile della donna (età al menarca, numero di gravidanze, età alla menopausa, tipo di menopausa) ed uso di terapia ormonale postmenopausale con il rischio di MP, ha mostrato un aumento del rischio di MP tra le donne che avevano assunto terapia ormonale e che erano state sottoposte a menopausa chirurgica. Il rischio in questo caso aumentava progressivamente con l'aumentare della durata della terapia. Lo stesso studio mostrava al contrario, nelle donne che erano andate incontro ad una menopausa naturale un effetto protettivo della terapia ormonale se questa era stata praticata per un periodo di almeno 10 anni.

Una possibile spiegazione di questo differente effetto della terapia ormonale potrebbe dipendere dal fatto che le donne con isterectomia sarebbero sottoposte a più visite mediche e quindi la probabilità che la MP venga diagnosticata sarebbe maggiore. Un'ipotesi alternativa

sarebbe il diverso effetto della terapia prescritta alle donne con menopausa chirurgica (terapia estrogenica) verso quello della terapia prescritta nelle donne con menopausa naturale (terapia estroprogestinica).

Lo stesso studio ha mostrato una riduzione del rischio di MP tra tutte le donne che avevano avuto una menopausa precoce (prima dei 44 anni), suggerendo in questo caso che bassi livelli di estrogeni potevano essere protettivi. Questo risultato secondo gli autori sarebbe in accordo con l'aumento del rischio associato ad una terapia ormonale sostitutiva.

Altri studi si sono spinti ad indagare la possibile associazione tra l'utilizzo di estrogeni e l'assunzione di caffeina,³⁵ sostanza per la quale è stato dimostrato un effetto protettivo nei confronti della MP. I risultati dello studio hanno mostrato che la terapia estrogenica associata ad una modica assunzione di caffè (1-3 tazzine/die) comporta una riduzione del rischio. Al contrario un'elevata assunzione di caffè (>6 tazzine/die) in associazione all'uso di terapia estrogenica, risulta associata ad un aumento del rischio di sviluppare MP.

2.2.2 *Studi condotti su animali*

Un primo accenno al possibile effetto neuroprotettivo degli estrogeni è stato pubblicato circa dieci anni fa. In questo studio l'incidenza e la severità del danno cerebrale successivo ad occlusione dell'arteria carotide erano di minore frequenza ed intensità nelle femmine di ratto rispetto ai maschi.^{36,37,38} Altri studi hanno mostrato che la somministrazione esogena di 17β -E2 riduceva drammaticamente il volume dell'area infartuata in seguito ad occlusione dell'arteria cerebrale media, nei ratti femmina che avevano subito una ovariectomia^{39,40,41}, nei ratti maschi⁴², e nei ratti femmina che avevano un'età avanzata,⁴³ che rappresenta un modello di menopausa.

Nei modelli murini è stata valutata anche l'azione degli estrogeni sul sistema dopaminergico. Essi migliorerebbero la funzione dopaminergica incrementando la sintesi di dopamina,^{44,45} regolando verso il basso gli enzimi che sono coinvolti nel metabolismo della dopamina⁴⁶ o incrementando la densità dei recettori dopaminergici.^{47,48} È stato anche suggerito che gli estrogeni potrebbero esercitare la loro attività neuroprotettiva inibendo la funzione di trasporto della dopamina,⁴⁹ incrementando l'attività mitocondriale o agendo come antiossidante.⁵⁰

I dati sul ruolo degli estrogeni tuttavia non sono sempre in favore di un loro ruolo protettivo. Ad esempio, gli estrogeni potrebbero agire sopprimendo la funzione dopaminergica riducendo lo stato di affinità dei recettori D2 della dopamina⁵¹ o tramite il rilascio di prolattina che esercita un effetto inibitorio sul sistema dopaminergico⁵².

Pochi studi hanno esplorato gli effetti di entrambi estrogeni e progesterone sul sistema dopaminergico, ed i dati in nostro possesso indicano un'interazione antagonista o nessuna interazione tra questi ormoni.^{53,54}

Recentemente è stato postulato che gli ormoni possono agire sulla risposta gliale all'inflammatione e sullo stress ossidativo indotto dal MPTP.⁵⁵ Secondo questa ipotesi, i glucocorticoidi endogeni e l'estradiolo potrebbero inibire la cascata neuroinfiammatoria e proteggere gli astrociti e la microglia dalla morte cellulare programmata.

Questi risultati sono in linea con quegli studi che indicano un incremento della resistenza delle colture di neuroni dopaminergici alla neurodegenerazione indotta dall'MPTP e nei modelli murini di parkinsonismi.^{56,57}

Conclusioni

In conclusione la relazione tra ormoni sessuali e MP è complessa. Gli effetti degli estrogeni differiscono per il tipo di estrogeno stimolante (estradiolo, estriolo o estrone), per la durata dell'esposizione (fluttuazioni mensili e gravidanza), ed in generale gli effetti degli estrogeni variano anche in relazione ad altri fattori come la concentrazione delle proteine leganti gli ormoni. Per questa ragione è estremamente difficile estrapolare un singolo effetto degli estrogeni nella patologia della MP.

Nonostante ciò, i dati ad oggi disponibili suggeriscono l'evidenza di un effetto neuroprotettivo da parte degli estrogeni accertato anche da dati biologici. Altri studi potrebbero essere indirizzati verso la valutazione della efficacia clinica degli estrogeni nel trattamento delle malattie neurodegenerative, valutando il possibile effetto antiossidante, la dose necessaria e il migliore iter di somministrazione per ottenere un massimo beneficio dal trattamento.

Bibliografia

¹ Wenning GK, Kiechl S, Seppi K, Müller J, Högl B, Saletu M, Rungger G, Gasperi A, Willeit J, Poewe W. Prevalence of movement disorders in men and women aged 50-89 years (Bruneck Study cohort): a population-based study. *Lancet Neurol.* 2005;4:815-20.

² Carlo Signorelli. *Elementi di metodologia.* Società editrice Universo, 1995:101-102.

³ Benito-León J, Bermejo-Pareja F, Rodríguez J, Molina JA, Gabriel R, Morales JM; Neurological Disorders in Central Spain (NEDICES) Study Group. Prevalence of PD and other types of parkinsonism in three elderly populations of central Spain. *Mov Disord.* 2003;18:267-74.

⁴ Clavería LE, Duarte J, Sevillano MD, Pérez-Sempere A, Cabezas C, Rodríguez F, de Pedro-Cuesta J. Prevalence of Parkinson's disease in Cantalejo, Spain: a door-to-door survey. *Mov Disord.* 2002;17:242-9.

⁵ Mayer R, Marder K, Cote LJ, et al The frequency of idiopathic Parkinson's disease by age, ethnic group, and sex in northern Manhattan, 1988-1993. *Am J Epidemiol* 1995;142:820-27.

⁶ Li SC, Schoenberg BS, Wang CC, Cheng XM, Zhou SS, Bolis CL. Epidemiology of epilepsy in urban areas of the People's Republic of China. *Epilepsia.* 1985;26:391-4.

⁷ Fall PA, Axelson O, Fredriksson M, Hansson G, Lindvall B, Olsson JE, Granérus AK. Age-standardized incidence and prevalence of Parkinson's disease in a Swedish community. *J Clin Epidemiol.* 1996;49:637-41.

⁸ de Rijk MC, Breteler MM, Graveland GA, Ott A, Grobbee DE, van der Meché FG, Hofman A. Prevalence of Parkinson's disease in the elderly: the Rotterdam Study. *Neurology*. 1995;45:2143-6.

⁹ Tison F, Dartigues JF, Dubes L, Zuber M, Alperovitch A, Henry P. Prevalence of Parkinson's disease in the elderly: a population study in Gironde, France. *Acta Neurol Scand*. 1994;90:111-5.

¹⁰ de Rijk MC, Tzourio C, Breteler MM, Dartigues JF, Amaducci L, Lopez-Pousa S, Manubens-Bertran JM, Alperovitch A, Rocca WA. Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1997;62:10-5.

¹¹ Morgante L, Rocca WA, Di Rosa AE, De Domenico P, Grigoletto F, Meneghini F, Reggio A, Savettieri G, Castiglione MG, Patti F, et al. Prevalence of Parkinson's disease and other types of parkinsonism: a door-to-door survey in three Sicilian municipalities. The Sicilian Neuro-Epidemiologic Study (SNES) Group. *Neurology*. 1992;42:1901-7.

¹² Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpeter A, Bloch DA, Nelson LM. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol*. 2003;157:1015-22.

¹³ Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Rocca WA. Influence of strict, intermediate, and broad diagnostic criteria on the age- and sex-specific incidence of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2000;15:819-25.

- ¹⁴ Baldereschi M, Di Carlo A, Rocca WA, Vanni P, Maggi S, Perissinotto E, Grigoletto F, Amaducci L, Inzitari D. Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men. ILSA Working Group. Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurology*. 2000;55:1358-63.
- ¹⁵ Wooten GF, Currie LJ, Bovbjerg VE, Lee JK, Patrie J. Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004;75:637-9.
- ¹⁶ D'Amelio M, Ragonese P, Morgante L, Reggio A, Callari G, Salemi G, Savettieri G. Long-term survival of Parkinson's disease: a population-based study. *J Neurol*. 2006;253:33-7. Epub 2005 Jul 18.
- ¹⁷ Fernandez HH, Lapane KL. Predictors of mortality among nursing home residents with a diagnosis of Parkinson's disease. *Med Sci Monit*. 2002;8:CR241-6.
- ¹⁸ Saunders-Pullman R, Gordon-Elliott J, Parides M, Fahn S, Saunders HR, Bressman S. The effect of estrogen replacement on early Parkinson's disease. *Neurology*. 1999 Apr 22;52(7):1417-21.
- ¹⁹ Thulin PC, Filoteo JV, Roberts LW, O'Brien SA. Effects of hormone replacement therapy on cognitive and motor function in women with Parkinson's disease [abstract]. *Neurology* 1998;50:A280.
- ²⁰ Marder K, Tang MX, Alfaró B, et al. Postmenopausal estrogen use and Parkinson's disease with and without dementia. *Neurology* 1998;50:1141-1143.

²¹ Shulman LM, weiner WJ, Senneff MR. The effect of endogenous and exogenous estrogen exposure in patients with Parkinson's disease [abstract]. *Mov Disord* 1998;13:A64.

²² Benedetti MD, Maraganore DM, Bower JH, McDonnell SK, Peterson BJ, Ahlskog JE, Schaid DJ, Rocca WA. Hysterectomy, menopause, and estrogen use preceding Parkinson's disease: an exploratory case-control study. *Mov Disord*. 2001;16:830-7.

²³ Ragonese P, D'Amelio M, Salemi G, Aridon P, Gammino M, Epifanio A, Morgante L, Savettieri G. Risk of Parkinson disease in women: effect of reproductive characteristics. *Neurology*. 2004;62:2010-4.

²⁴ Cole, MacMahon P & B. Oestrogen fraction during early reproductive life in the etiology of breast cancer. *Lancet* 1969;1:604-609.

²⁵ Melamed M, Castano E, Notides AC, Sasson S. Molecular and kinetic basis for the mixed agonist/antagonist activity of estriol. *Mol Endocrinol*. 1997;11:1868-1878.

²⁶ Ragonese P, D'Amelio M, Callari G, et al. Age at menopause proticts age at onset of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2006;21:2211-4.

²⁷ Wildt L, Sir-Petermann T. Oestrogen and age estimations of perimenopausal women. *Lancet*. 1999 ;354:224.

²⁸ Westberg L, Håkansson A, Melke J, Shahabi HN, Nilsson S, Buervenich S, Carmine A, Ahlberg J, Grundell MB, Schulhof B, Klingborg K,

Holmberg B, Sydow O, Olson L, Johnels EB, Eriksson E, Nissbrandt H. Association between the estrogen receptor beta gene and age of onset of Parkinson's disease. *Psychoneuroendocrinology*. 2004;29:993-8.

²⁹ Tsang KL, Ho SL, Lo SK. Estrogen improves motor disability in parkinsonian postmenopausal women with motor fluctuations. *Neurology*. 2000;54:2292-8.

³⁰ Bedard P, Langelier P, Villeneuve A. Oestrogens and extrapyramidal system. *Lancet*. 1977;2:1367-8.

³¹ Marder K, Tang MX, Alfaró B, Mejia H, Cote L, Jacobs D, Stern Y, Sano M, Mayeux R.

Postmenopausal estrogen use and Parkinson's disease with and without dementia. *Neurology*. 1998;50:1141-3.

³² Currie LJ, Harrison MB, Trugman JM, Bennett JP, Wooten GF. Postmenopausal estrogen use affects risk for Parkinson disease. *Arch Neurol*. 2004;61:886-8.

³³ Rocca WA, Bower JH, Maraganore DM, Ahlskog JE, Grossardt BR, de Andrade M, Melton LJ 3rd. Increased risk of cognitive impairment or dementia in women who underwent oophorectomy before menopause. *Neurology*. 2007;69:1074-83. Epub 2007 Aug 29

³⁴ Popat RA, Van Den Eeden SK, Tanner CM, McGuire V, Bernstein AL, Bloch DA, Leimpeter A, Nelson LM. Effect of reproductive factors and postmenopausal hormone use on the risk of Parkinson disease. *Neurology*. 2005;65:383-90.

³⁵ Ascherio A, Chen H, Schwarzschild MA, Zhang SM, Colditz GA, Speizer FE. Caffeine, postmenopausal estrogen, and risk of Parkinson's disease. *Neurology*. 2003;60:790-5.

³⁶ Alkayed NJ, Harakuni I, Kimes AS, et al. Gender-linked brain injury in experimental stroke. *Stroke* 1998;29:159-166

³⁷ Hall ED, Pazara KE, Linseman KL. Sex differences in postischemic neuronal necrosis in gerbils.

J Cereb Blood Flow Metab. 1991;11:292-8.

³⁸ Dhandapani KM, Brann DW. Protective effects of estrogen and selective estrogen receptor modulators in the brain. *Biol Reprod*. 2002;67:1379-85. Review.

³⁹ Simpkins JW, Rajakumar G, Zhang YQ, Simpkins CE, Greenwald D, Yu CJ, Bodor N, Day AL. Estrogens may reduce mortality and ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the female rat. *J Neurosurg*. 1997;87:724-30.

⁴⁰ Dubal DB, Kashon ML, Pettigrew LC, Ren JM, Finklestein SP, Rau SW, Wise PM. Estradiol protects against ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1998;18:1253-8.

⁴¹ Rusa R, Alkayed NJ, Crain BJ, Traystman RJ, Kimes AS, London ED, Klaus JA, Hurn PD. 17beta-estradiol reduces stroke injury in estrogen-deficient female animals. *Stroke*. 1999;30:1665-70.

⁴² Toung TJ, Traystman RJ, Hurn PD. Estrogen-mediated neuroprotection after experimental stroke in male rats. *Stroke*. 1998;29:1666-70.

- ⁴³ Alkayed HJ, Crain BJ, Traystman RJ. Estrogen-mediated neuroprotectio in reproductively senescent rats. *Stroke* 1999;30:274.
- ⁴⁴ Pasqualini C, Olivier V, Guibert B, Frain O, Leviel V. Acute stimulatory effect of estradiol on striatal dopamine synthesis. *J Neurochem.* 1995;65:1651-7.
- ⁴⁵ Di Paolo T, Rouillard C, Bédard P. 17 beta-Estradiol at a physiological dose acutely increases dopamine turnover in rat brain. *Eur J Pharmacol.* 1985;117:197-203.
- ⁴⁶ Xie T, Ho SL, Ramsden D. Characterization and implications of estrogenic down-regulation of human catechol-O-methyltransferase gene transcription. *Mol Pharmacol.* 1999;56:31-8.
- ⁴⁷ Hruska RE, Silbergeld EK. Increased dopamine receptor sensitivity after estrogen treatment using the rat rotation model. *Science.* 1980;208:1466-8.
- ⁴⁸ Roy EJ, Buyer DR, Licari VA. Estradiol in the striatum: effects on behavior and dopamine receptors but no evidence for membrane steroid receptors. *Brain Res Bull.* 1990;25:221-7
- ⁴⁹ Disshon KA, Boja JW, Dluzen DE. Inhibition of striatal dopamine transporter activity by 17beta-estradiol. *Eur J Pharmacol.* 1998;345:207-11.
- ⁵⁰ Disshon KA, Dluzen DE. Estrogen as a neuromodulator of MPTP-induced neurotoxicity: effects upon striatal dopamine release. *Brain Res.* 1997;764:9-16.

- ⁵¹ Lévesque D, Di Paolo T. Rapid conversion of high into low striatal D2-dopamine receptor agonist binding states after an acute physiological dose of 17 beta-estradiol. *Neurosci Lett.* 1988;88:113-8.
- ⁵² Dupont A, Di Paolo T, Gagné B, Barden N. Effects of chronic estrogen treatment on dopamine concentrations and turnover in discrete brain nuclei of ovariectomized rats. *Neurosci Lett.* 1981;22:69-74.
- ⁵³ Fernández-Ruiz JJ, de Miguel R, Hernández ML, Ramos JA. Time-course of the effects of ovarian steroids on the activity of limbic and striatal dopaminergic neurons in female rat brain. *Pharmacol Biochem Behav.* 1990;36:603-6.
- ⁵⁴ Kalia V, Fenske C, Hole DR, Wilson CA. Effect of gonadal steroids and gamma-aminobutyric acid on LH release and dopamine expression and activity in the zona incerta in rats. *J Reprod Fertil.* 1999;117:189-97.
- ⁵⁵ Marchetti B, Serra PA, L'Episcopo F, Tirolo C, Caniglia S, Testa N, Cioni S, Gennuso F, Rocchitta G, Desole MS, Mazzarino MC, Miele E, Morale MC. Hormones are key actors in gene x environment interactions programming the vulnerability to Parkinson's disease: glia as a common final pathway. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Dec;1057:296-318. Review.
- ⁵⁶ Callier S, Morissette M, Grandbois M, Di Paolo T. Stereospecific prevention by 17beta-estradiol of MPTP-induced dopamine depletion in mice. *Synapse.* 2000;37:245-51.
- ⁵⁷ Xu K, Xu Y, Brown-Jermyn D. et al. Estrogen prevents neuroprotection by caffeine in the mouse 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2006;26:535-541.

2.3 POSSIBILITÀ DI INTERVENIRE CON PROTESI BIOLOGICHE NELLA TERAPIA DELLA MALATTIA DI PARKINSON, *Alberto Albanese*

Istituto Nazionale Neurologico Carlo Besta, Milano

2.3.1 Anatomia funzionale e fisiopatologia dei sintomi nella malattia di Parkinson

Nel corso degli ultimi decenni, le conoscenze sulla neuroanatomia chimica si sono arricchite di numerosi dettagli sul funzionamento dei gangli della base e sulle loro connessioni anatomiche intrinseche ed estrinseche. Le diverse strutture che compongono i gangli della base sono altamente interconnesse con diversi circuiti a retroazione che elaborano un importante flusso di informazioni prima di reindirizzarle all'esterno dei gangli stessi. I principali nuclei dei gangli della base, che svolgono un ruolo di rilievo nel controllo motorio, sono: il nucleo caudato, il putamen, il globo pallido (parte interna e parte esterna), il nucleo subtalamico e la sostanza nera (parte compatta e parte reticolata). Nel corso degli anni recenti è stata svolta una dettagliata mappatura delle connessioni che connettono queste diverse strutture e delle proiezioni che esse hanno all'esterno

dei gangli della base. Ciononostante, esistono ancora molte domande irrisolte sull'organizzazione anatomofunzionale dei gangli della base. È oggi chiaro, che le diverse componenti dei gangli della base funzionano in modo integrato e che le alterazioni anche di una sola di esse provocano alterazioni del trasferimento dei dati all'interno dei gangli e, conseguentemente, anche all'esterno. La principale alterazione patologica della malattia di Parkinson (MP) è la degenerazione dei neuroni dopaminergici nigrostriatali. Tali neuroni costituiscono l'ossatura intorno alla quale il corpo striato si assembla nel corso dello sviluppo embrionario. La perdita dei neuroni dopaminergici costituisce un fenomeno lento e progressivo, che causa variazioni sia a livello del corpo striato (ove le terminazioni dopaminergiche degenerate non stimolano più i recettori dopaminergici su cui agire), che a livello delle proiezioni afferenti alla sostanza nera (che non trovano più il sito post-sinaptico su cui normalmente agiscono) (Figura 1). Gli assoni dei neuroni nigrostriatali sono molto lunghi; costituiscono il fascio nigrostraitale che si dirige rostralmente per diversi centimetri fino a raggiungere il corpo striato. Lì i terminali dopaminergici si sfioccano con un'arborizzazione molto ricca, tanto che i terminali di un singolo neurone occupano fino ad un terzo del volume del nucleo caudato o del putamen. Senza considerare la presenza dei fenomeni

degenerativi all'esterno dei gangli della base (che anche caratterizzano la MP), la terapia ideale della MP consisterebbe nel ripristino dei neuroni nigrostriatali degenerati e delle loro connessioni afferenti ed efferenti.

2.3.2 *Terapie cellulari nei pazienti con malattia di Parkinson*

Uno dei veri miracoli della medicina moderna è consistito nell'introduzione della levodopa, il precursore della dopamina, nella terapia della MP. Tuttavia, fin dai primi studi clinici sulla levodopa sono state osservate complicazioni inattese, quali movimenti coreoatetosici (discinesie) e fluttuazioni da una condizione di buona mobilità (il periodo *on*), spesso accompagnato da discinesie, a uno stato di grave parkinsonismo (il periodo *off*), che compare spesso più volte nella stessa giornata. Queste complicanze sono divenute sempre più comuni e invalidanti man mano che la durata di malattia si è accresciuta e la durata dell'esposizione alla levodopa è aumentata.

Gli esperimenti basati sull'impianto di cellule dopaminergiche si sono a lungo incentrati sulla possibilità di reinnervare direttamente il corpo striato, che è un obiettivo chirurgico facile e ha un volume ampio. Gli studi in pazienti con MP che hanno ricevuto trapianti intra-striatali di tessuto fetale mesencefalico umano, ricco di neuroni

dopaminergici post-mitotici, hanno fornito la prova del principio che, dal punto di vista tecnico, la reintegrazione di neuroni può funzionare nel cervello dell'uomo. I neuroni trapiantati sopravvivono e reinnervano lo striato per almeno 10 anni nonostante non sia interrotto il processo morboso in corso, che distrugge i neuroni dopaminergici propri del paziente (1;2). I trapianti sono in grado di normalizzare la liberazione striatale di dopamina (2) e di annullare la riduzione di attivazione corticale, che è il correlato funzionale dell'acinesia (3). In sostanza, i neuroni dopaminergici trapiantati possono integrarsi funzionalmente nei circuiti nervosi del cervello (3). Diversi studi in aperto hanno riferito del beneficio clinico (4;5). In alcuni casi i pazienti hanno potuto interrompere per diversi anni la terapia con levodopa e riprendere una vita indipendente (2).

Due recenti studi controllati con impianto chirurgico vero o finto hanno invece mostrato solo miglioramenti modesti (6;7), indicando così che le metodiche di impianto cellulare attualmente impiegate sono lungi dall'essere ottimali. È possibile spiegare la pochezza dei risultati di uno di questi due studi con l'esiguità del numero di neuroni trapiantati e sopravvissuti (6) a paragone di quanto osservato negli studi in aperto (1;8;9). Nell'altro dei due studi, invece, al momento dell'arruolamento i pazienti erano in condizioni di disabilità alquanto grave e quindi presentavano presumibilmente un

quadro degenerativo più esteso. Infine, l'immunosoppressione attuata nei pazienti dei due studi controllati è stata di breve durata o assente, il che costituisce una variabile non secondaria.

Un aspetto importante è dato dalla scoperta, effettuata per la prima volta mediante gli studi controllati, che dopo il trapianto possono svilupparsi discinesie (7;10), che sono invalidanti nel 7-15% dei pazienti trapiantati (6;7;10). Si ritiene che questo effetto collaterale non sia causato da un'eccessiva crescita di terminali dopaminergici (7;10;11), ma piuttosto da una irregolarità di reinnervazione (11), che causa livelli bassi o intermedi di dopamina in alcuni punti dello striato, o dalla presenza di una risposta immunitaria e infiammatoria cronica intorno al trapianto (7). Un'interpretazione alternativa è che le discinesie indotte dal trapianto possano essere spiegate con una composizione sfavorevole del tessuto impiantato in rapporto al contenuto cellulare prevalente: neuroni dopaminergici provenienti dalla sostanza nera, neuroni dopaminergici provenienti dall'area segmentale ventrale, neuroni non dopaminergici (12).

2.3.3 Neurostimolazione nei pazienti con malattia di Parkinson

Nel 1995, un gruppo di ricercatori di Grenoble, in Francia, hanno per la prima volta osservato che la "sindrome da levodopa" rispondeva

alla stimolazione ad alta frequenza del nucleo subtalamico (13) (Figura 2). Da allora, numerosi altri gruppi hanno confermato questa osservazione. È rimasta, però, a lungo un'incertezza rispetto alla durata di efficacia di questo approccio, finché non è stato osservato che i risultati osservati a breve termine permangono anche 5 anni dopo l'impianto (14). In questi pazienti si osserva un marcato miglioramento delle condizioni motorie che rispondono alla levodopa, senza gli effetti collaterali della terapia con levodopa. Le discinesie indotte da levodopa sono migliorate considerevolmente e sono spesso scomparse, soprattutto poiché le dosi di farmaci dopaminergici sono state ridotte.

I risultati a lungo termine hanno però anche mostrato che non tutti i sintomi parkinsoniani migliorano con l'impianto di neurostimolatori profondi. I pazienti hanno sviluppato nel corso degli anni alcuni sintomi refrattari alla neurostimolazione, quali instabilità posturale, il *freezing* della marcia, difficoltà della parola, e acinesia. Inoltre, la metodica espone al rischio di complicanze psichiatriche, quali ipomania, apatia e depressione (15).

2.3.4 Come sviluppare una terapia con protesi biologiche nella malattia di Parkinson

Una terapia cellulare che possa essere utilmente impiegata in clinica deve fornire vantaggi tangibili rispetto le terapie correnti per la MP. Le terapie cellulari devono produrre miglioramenti rilevanti e di lunga durata delle condizioni motorie e devono curare le discinesie. In alternativa, le nuove terapie cellulari devono essere in grado di migliorare i sintomi non controllati con altri trattamenti, ad esempio l'impegno posturale. I miglioramenti clinici osservati dopo il trapianto di cellule fetali (4;6;7) non hanno superato (né almeno eguagliato) gli effetti prodotti dall'impianto di neurostimolatori profondi (14), e non vi è evidenza che possano migliorare i sintomi resistenti alla terapia farmacologia (4). È possibile che i risultati solo parzialmente soddisfacenti ottenuti finora con gli impianti cellulari siano conseguenti al fatto che lo striato è reinnervato soltanto parzialmente (4;9). D'altra parte, però, anche negli esperimenti con animali, in cui si ottiene una reinnervazione adeguata dello striato, i miglioramenti osservati sono soltanto parziali (16); ciò induce a supporre che sia proprio la scelta di effettuare l'impianto in una sede ectopica (quale lo striato) la causa del parziale insuccesso. In effetti, è stato osservato in animali da esperimento che è possibile ottenere miglioramenti clinici mediante trapianti posizionati nella sostanza

nera (16;17); questa procedura, che è stata tentata anche in clinica (18), non è in grado di ricostruire la via nigrostriatale (16).

In linea di principio, l'uso di cellule staminali può agevolmente rimpiazzare gli impianti di tessuto mesencefalico (Figura 3); si ritiene, però, che tale tipo di impianti ponga problemi e abbia limiti del tutto analoghi a quelli evidenziati dagli studi clinici basati sull'uso di tessuto embrionario. L'esperienza accumulata nel campo degli impianti cellulari per la malattia di Parkinson può essere riassunta finora in pochi dati essenziali. La linea di ricerca preclinica è stata avviata oltre trenta anni fa ed ha dato risultati molto interessanti sul piano scientifico, ma del tutto inadeguati sul piano clinico. Le sperimentazioni cliniche sono state condotte inizialmente fuori delle tradizionali metodologie degli studi controllati e randomizzati. I risultati di quest'ultimo tipo di studi non hanno confermato le osservazioni degli studi in aperto ed hanno anzi permesso di osservare la comparsa di un importante effetto collaterale, costituito dalle discinesie.

All'opposto, la scoperta della neurostimolazione profonda si è sviluppata direttamente sull'uomo, senza una fase di ricerca animale preliminare, e ha portato risultati clinici eccellenti e in breve tempo. Il confronto tra i due approcci non regge e fa sorgere il dubbio che

l'approccio cellulare nella MP sia limitato da ragioni precipuamente anatomiche. Per questa ragione, non sorprende che oggi si dedichi molto impegno all'uso di fattori trofici in grado di arrestare (o perfino prevenire) a degenerazione dei neuroni dopaminergici. I primi esperimenti con liatermina (GDNF) in condizioni di sperimentazione aperta hanno fornito risultati incoraggianti (19), ma un successivo studio controllato di fase II non ha confermato le aspettative (20). Sembra replicarsi la discrepanza osservata a proposito degli impianti cellulari tra studi in aperto e studi controllati. Questi dati nel loro insieme indicano, pertanto, che è indispensabile attuare una corretta metodologia clinica per poter dimostrare l'efficacia delle protesi biologiche nella malattia di Parkinson e in altre malattie neurodegenerative.

2.3.5 *Tabelle*

Tabella 1. Possibili meccanismi funzionali responsabili del miglioramento clinico osservato dopo trapianto cellulare.

Meccanismo	Modo d'azione
Danno tissutale	Stimolazione delle risposte plastiche dell'ospite indotta dall'infiammazione Interferenza con l'attività neurale dell'ospite
Correzione del deficit biochimico	Liberazione di neurotrasmettitori mancanti (effetto "minipompa")
Secrezione di fattori di	Stimolazione delle risposte plastiche e

crescita	miglioramento della sopravvivenza e del funzionamenti dei neuroni dell'ospite
Reinnervazione locale	Restaurazione della capacità di liberare trasmettitori sinaptici
Ricostruzione dei circuiti nervosi	Ristabilimento di connessioni afferenti ed efferenti funzionali

2.3.6 *Figure*

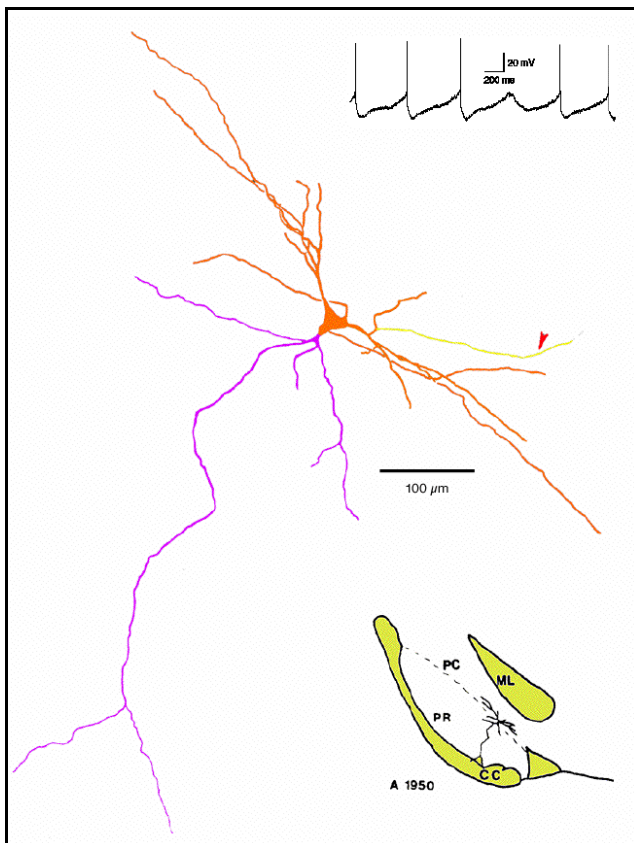


Figura 1.
Ricostruzione di un neurone dopaminergico nigrostriatale identificato con metodiche elettrofisiologiche. Il corpo cellulare e i dendriti che proiettano lateralmente sono colorati in arancio; i dendriti ventrali che proiettano nella parte reticolata sono colorati in viola; la porzione iniziale dell'assone, che è troncato e normalmente si estende fino al corpo striato, è colorata in giallo (freccia). La posizione del neurone nella regione mesencefalica è indicata in basso a destra; si nota come il

dendrite color viola si estende per un'ampia porzione del mesencefalo, oltre la parte reticolata, fino al fascio corticospinale. Da (21)

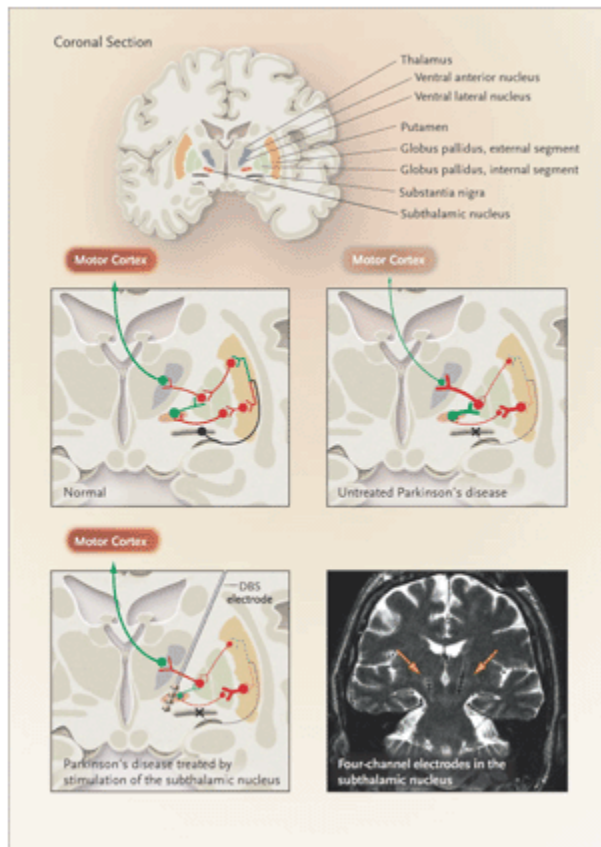


Figura 2. Malattia di Parkinson e stimolazione del nucleo subtalamico. La sezione coronale mostra la localizzazione dei nuclei dei gangli della base che sono implicati nella malattia di Parkinson. Gli schemi anatomici illustrano in modo molto semplificato le connessioni dei gangli della base. Le linee rosse mostrano le connessioni inibitorie, le linee verdi quelle eccitatorie. Lo spessore delle linee indica il livello di attività in rapporto alla condizione normale. La stimolazione del nucleo subtalamico può

risultare nella normalizzazione delle proiezioni efferenti inibitorie dalla parte interna del globo pallido al talamo e quindi così causare il miglioramento dei sintomi parkinsoniani. La figura illustra una delle possibili spiegazioni di questo effetto: l'inibizione di un nucleo subtalamico reso iperattivo dalla malattia. Le sezioni coronali di risonanza magnetica mostrano la localizzazione degli elettrodi con quattro contatti (freccie) impiantati bilateralmente nel nucleo subtalamico. Abbreviazioni: DBS, stimolazione cerebrale profonda. Da (22)

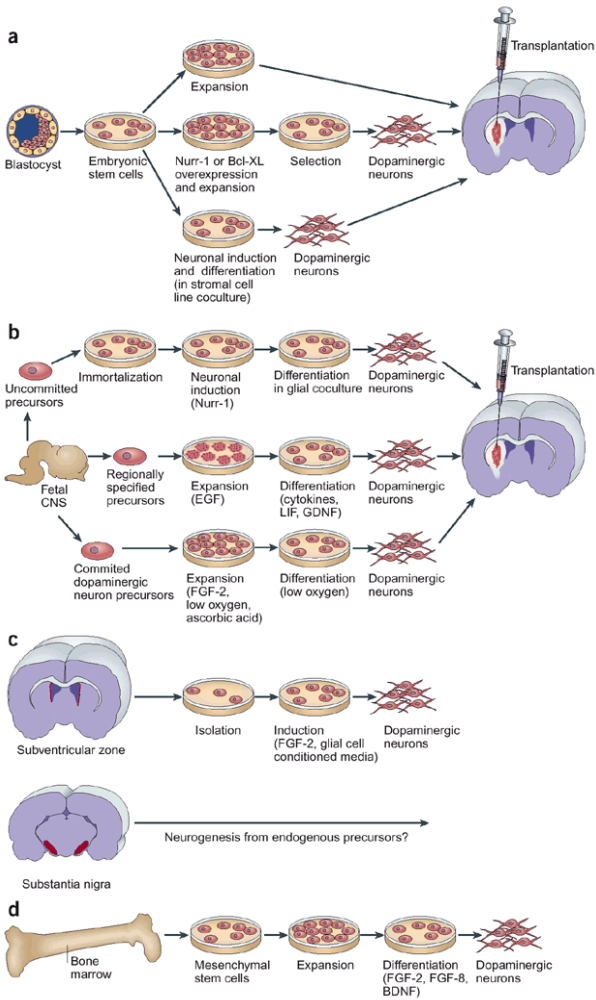


Figura 3. Generazione di neuroni dopaminergici per la malattia di Parkinson. È illustrato il cervello di un ratto, nel cui neostriato vengono impiantate cellule staminali embrionali (a), cellule staminali da tessuto fetale (b), cellule staminali provenienti da cervello adulto (c) o da altri tessuti. Da (23).

Bibliografia

- (1) Kordower JH, Freeman TB, Snow BJ, Vingerhoets FJ, Mufson EJ, Sanberg PR et al. Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease. *N Engl J Med* 1995; 332:1118-1124.
- (2) Piccini P, Brooks DJ, Bjorklund A, Gunn RN, Grasby PM, Rimoldi O et al. Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci* 1999; 2:1137-1140.
- (3) Piccini P, Lindvall O, Bjorklund A, Brundin P, Hagell P, Ceravolo R et al. Delayed recovery of movement-related cortical function in Parkinson's disease after striatal dopaminergic grafts. *Ann Neurol* 2000; 48:689-695.
- (4) Lindvall O, Hagell P. Clinical observations after neural transplantation in Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 2000; 127:299-320.
- (5) Polgar S, Morris ME, Reilly S, Bilney B, Sanberg PR. Reconstructive neurosurgery for Parkinson's disease: a systematic review and preliminary meta-analysis. *Brain Res Bull* 2003; 60:1-24.
- (6) Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2001; 344:710-719.
- (7) Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF et al. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 54:403-414.
- (8) Kordower JH, Freeman TB, Chen EY, Mufson EJ, Sanberg PR, Hauser RA et al. Fetal nigral grafts survive and mediate clinical benefit in a patient with Parkinson's disease. *Mov Disord* 1998; 13:383-393.
- (9) Kordower JH, Rosenstein JM, Collier TJ, Burke MA, Chen EY, Li JM et al. Functional fetal nigral grafts in a patient with

Parkinson's disease: chemoanatomic, ultrastructural, and metabolic studies. *J Comp Neurol* 1996; 370:203-230.

(10) Hagell P, Piccini P, Bjorklund A, Brundin P, Rehncrona S, Widner H et al. Dyskinesias following neural transplantation in Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2002; 5:627-628.

(11) Ma Y, Feigin A, Dhawan V, Fukuda M, Shi Q, Greene P et al. Dyskinesia after fetal cell transplantation for parkinsonism: a PET study. *Ann Neurol* 2002; 52:628-634.

(12) Isacson O, Bjorklund LM, Schumacher JM. Toward full restoration of synaptic and terminal function of the dopaminergic system in Parkinson's disease by stem cells. *Ann Neurol* 2003; 53(Suppl. 3):S135-S146.

(13) Limousin P, Pollak P, Benazzouz A, Hoffmann D, Le Bas JF, Broussolle E et al. Effect of parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Lancet* 1995; 345:91-95.

(14) Krack P, Batir A, Van Blercom N, Chabardes S, Fraix V, Ardouin C et al. Five-year follow-up of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2003; 349:1925-1934.

(15) Romito LM, Raja M, Daniele A, Contarino MF, Bentivoglio AR, Barbier A et al. Transient mania with hypersexuality after surgery for high frequency stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2002; 17:1371-1374.

(16) Winkler C, Kirik D, Bjorklund A, Dunnett SB. Transplantation in the rat model of Parkinson's disease: ectopic versus homotopic graft placement. *Prog Brain Res* 2000; 127:233-265.

(17) Mukhida K, Baker KA, Sadi D, Mendez I. Enhancement of sensorimotor behavioral recovery in hemiparkinsonian rats with intrastriatal, intranigral, and intrasubthalamic nucleus dopaminergic transplants. *J Neurosci* 2001; 21:3521-3530.

(18) Mendez I, Dagher A, Hong M, Gaudet P, Weerasinghe S, McAlister V et al. Simultaneous intrastriatal and intranigral fetal dopaminergic grafts in patients with Parkinson disease: a pilot study. Report of three cases. *J Neurosurg* 2002; 96:589-596.

(19) Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M et al. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med* 2003; 9:589-595.

(20) GDNF Withdrawn by Manufacturer; A vs B in CD (ANA 2004). <http://www.mdvu.org/emove/article.asp?ID=762> . 2004.

(21) Tepper JM, Sawyer SF, Groves PM. Electrophysiologically identified nigral dopaminergic neurons intracellularly labeled with HRP: light-microscopic analysis. *J Neurosci* 1987; 7:2794-2806.

(22) Lang AE. Subthalamic stimulation for Parkinson's disease--living better electrically? *N Engl J Med* 2003; 349:1888-1891.

(23) Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med* 2004; 10(Suppl.):S42-S50.

2.4 LE CELLULE STAMINALI: QUALE FUTURO NELL TERAPIA DELLA MALATTIA DI PARKINSON?, *Meco G, Rubino A, Purcaro C.*

Centro Parkinson
DAI di Neurologia e Psichiatria Policlinico Universitario 'Umberto I'
Università di Roma 'La Sapienza'

Come già noto dagli studi di Cajal del 1928 la capacità rigenerativa del SNC è estremamente limitata per cui danni a questo complesso sistema, indotti da svariate condizioni come la malattia di Parkinson, la malattia di Alzheimer, l'ictus cerebri, i traumi spinali e molte altre malattie, esitano in deficit funzionali permanenti.

I rapidi e recenti progressi nel campo della biologia dello sviluppo e delle cellule staminali hanno determinato un interesse crescente verso strategie di trattamento di queste condizioni basate sulla rigenerazione di tessuto nervoso danneggiato^[1].

2.4.1 LE CELLULE STAMINALI

Le cellule staminali sono cellule che si differenziano dalle altre per tre caratteristiche peculiari:

- non sono differenziate terminalmente
- possono dividersi senza limite
- quando si dividono ciascuna cellula figlia può o diventare anche essa cellula staminale o imboccare la via del differenziamento terminale.

Si distinguono due tipi di cellule staminali a seconda del loro stato di sviluppo: le cellule staminali embrionali e le cellule staminali adulte. Le cellule staminali adulte sono responsabili del rinnovo e della riparazione della maggior parte dei tessuti adulti. Le cellule staminali embrionali invece normalmente esistono solo negli stadi dell'embrione che precedono l'impianto e sono effettivamente totipotenti avendo la possibilità di differenziarsi in qualunque tipo cellulare^[2] (fig.1).

Recentemente si sono accumulate varie evidenze^[5-7] che indicano tuttavia che alcuni tipi di cellule staminali adulte avrebbero un potenziale di plasticità (ovvero di totipotenza) simile a quello delle cellule staminali embrionali. Secondo alcune teorie infatti le cellule staminali adulte potrebbero andare incontro ad un processo di transdifferenziazione, diventando cellule differenziate di un'altra linea cellulare

rispetto a quella verso cui erano originariamente indirizzate, o di de-differenziazione e successiva trasformazione in cellule di un'altra linea cellulare.

Inoltre di recente anche il dogma delle cellule staminali embrionali (ovvero il fatto che siano presenti solo nei tessuti embrionali) è stato messo in discussione. Infatti è stata notata la presenza in alcuni organi di cellule staminali embrionali 'dormienti'^[8-10].

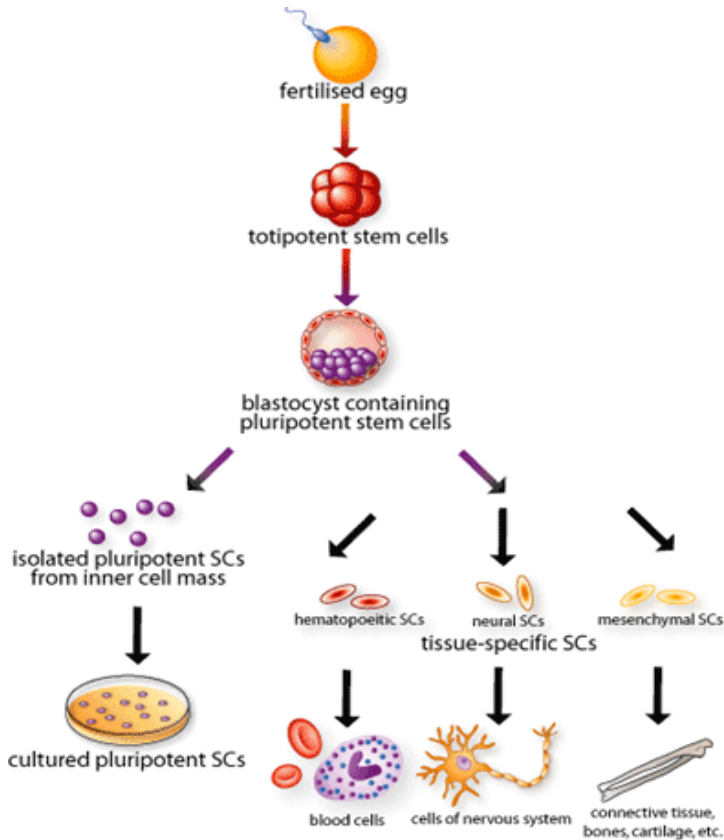


Fig.1 differenziazione di una cellula staminale embrionale

L'utilizzo terapeutico delle cellule staminali non è più a tutt'oggi un'utopia ma esistono al momento diverse centinaia di trials clinici che stanno tentando di utilizzare questa preziosa risorsa in svariati tipi di patologia umana. Si tratta nella

maggioranza dei casi di terapie condotte con cellule provenienti dal midollo osseo degli stessi pazienti ma in alcuni casi ci sarebbe l'intenzione di cominciare trial con cellule embrionali staminali[2].

L'utilizzo delle cellule staminali embrionali sarebbe la scelta ideale data la loro completa totipotenza. Varie sono però le limitazioni a questo uso. Innanzitutto gli interrogativi e problemi etici assai considerevoli che sorgono. Inoltre far differenziare una cellula staminale embrionale in vitro è un processo assai complesso. Infine rischi da non sottovalutare e che finora sono stati confermati da studi su animali sono il rigetto immunologico e l'induzione della formazione di tumori[11-13]. Quest'ultimo rischio aumenta proporzionalmente al numero di cellule trapiantate e dipende dal sito di impianto, essendo stato osservato in modelli murini un rischio più elevato a livello epatico e minore a livello cutaneo[14].

Per quel che riguarda invece le cellule staminali adulte si utilizzano oggi nella maggior parte dei casi le cellule staminali ematopoietiche provenienti dal midollo osseo, le quali sono le

più facilmente accessibili[15-17]. Tuttavia è anche possibile a tutt'oggi isolare cellule staminali mesenchimali. Il principale vantaggio dell'uso delle cellule staminali adulte è la possibilità di autotrapianto che scongiura ogni possibilità di rigetto.

2.4.2 POSSIBILI APPLICAZIONI ALLE MALATTIE NEUROLOGICHE

Uno dei campi più promettenti per l'utilizzo di cellule staminali sono le malattie neurologiche. Ciò perché a tutt'oggi per molte di queste patologie la terapia è ancora solo sintomatica e scarsamente soddisfacente. L'utilizzo delle cellule staminali in queste malattie potrebbe prevedere il rimpiazzo delle cellule nervose perse. I possibili scenari sono in tal senso due: l'attivazione di cellule staminali nervose endogene (induzione di neurogenesi) e il trapianto di cellule esogene (trapianto cellulare).

2.4.3 INDUZIONE DI NEUROGENESI

La neurogenesi è un processo di rigenerazione di cellule nervose perse a seguito di un insulto (ischemico, degenerativo...). Tale fenomeno tuttavia è assai limitato e

porta a rigenerazione di appena lo 0,2% dei neuroni persi^[18]. Nel sistema nervoso centrale dell'adulto sono state ritrovate cellule staminali nervose endogene solo nelle zone periventricolari.

Vi sono due ipotesi riguardo i meccanismi della neurogenesi. In primo luogo a seguito dell'insulto le cellule staminali potrebbero, forse su stimolo dell'EGF^[19], trasformarsi in neuroblasti e migrare nelle zone danneggiate. Altra ipotesi è che la neurogenesi avvenga localmente nella zona del danno grazie a cellule staminali latenti^[20].

In un prossimo futuro è ipotizzabile un tentativo di stimolazione del processo di neurogenesi in seguito a perdita di cellule nervose in corso di patologie neurodegenerative o ischemiche. Tale strategia, sebbene teoricamente ottima perché poco invasiva, è tuttavia ancora molto avveniristica.

2.4.4 TRAPIANTO CELLULARE

La maggior parte degli studi si concentra oggi sulla possibilità di trapianto di nuove cellule nervose ottenute tramite neurogenesi in vitro a partire da cellule staminali esterne di

varia origine. Tali cellule possono essere sia cellule staminali embrionali che cellule staminali adulte ottenute dai pazienti stessi^[1].

2.4.5 LE CELLULE STAMINALI NELLA MALATTIA DI PARKINSON

Le due strategie di utilizzo delle cellule staminali appena descritte sono teoricamente applicabili anche alla malattia di Parkinson. In questa condizione, come noto, si ha una degenerazione dei neuroni della via dopaminergica nigrostriatale nell'ambito dei nuclei della base. Le terapie attualmente disponibili sono solamente sintomatiche e non permettono di arrestare la degenerazione neuronale progressiva dovuta ad accumulo di polimeri della proteina alfa-sinucleina nei neuroni della via nigrostriatale. L'utilizzo delle cellule staminali potrà invece rivelarsi rivoluzionario, permettendo di rimpiazzare le cellule nervose perse.

Analizzeremo qui di seguito tutte le conoscenze e le esperienze finora accumulate riguardo l'utilizzo delle staminali nel Parkinson.

I primi tentativi di terapia ‘cellulare’ nella malattia di Parkinson risalgono alla fine degli anni 80 quando una serie di studi in aperto^[21-24] provarono ad utilizzare cellule nigrostriatali fetali. Il trapianto di tali cellule è stato associato ad un modesto beneficio clinico con miglioramento rilevabile anche alla PET con fluorodopa. Due ulteriori studi in doppio cieco invece ridimensionarono l’entità del beneficio clinico ottenuto con questa terapia che si rivelò solo nei pz più giovani^[25] o in quelli con malattia meno grave^[26]. Inoltre in questi studi si evidenziò che il miglioramento sintomatologico tendeva a cessare con la riduzione della terapia immunosoppressiva mostrando un probabile rigetto a lungo termine delle cellule trapiantate. Infine una quota considerevole di questi pazienti ha mostrato la comparsa di peculiari discinesie di fase off.

Nello stesso periodo emerse una nuova possibilità di trattamento ‘cellulare’ ovvero il trapianto di tessuto della midollare del surrene: tale tentativo si basava sul fatto che le cellule cromaffini di tale tessuto producono e rilasciano quantità importanti di catecolamine tra cui dopamina. Circa 40

tentativi sono stati fatti tramite autotrapianto di midollare del surrene su un totale di circa 400 pazienti in alcuni casi con qualche beneficio. Invece altri 13 studi hanno tentato su un totale di 55 pazienti il trapianto di midollare surrenalica fetale. Entrambe le metodiche comunque hanno portato a risultati e benefici assai dubbi^[4].

A tutt'oggi quindi l'idea del trapianto di cellule nigrostriatali fetali o di cellule della midollare surrenalica sembra essere stata abbandonata e la maggior parte delle speranze si concentrano sulle **cellule staminali**.

Varie sono le possibili fonti di cellule staminali utilizzabili nella malattia di Parkinson:

- cellule staminali embrionali
- cellule staminali neurali adulte o fetali
- cellule staminali autologhe (derivanti dal midollo osseo o da altri tessuti dei pazienti stessi)
- cellule staminali derivanti dal cordone ombelicale

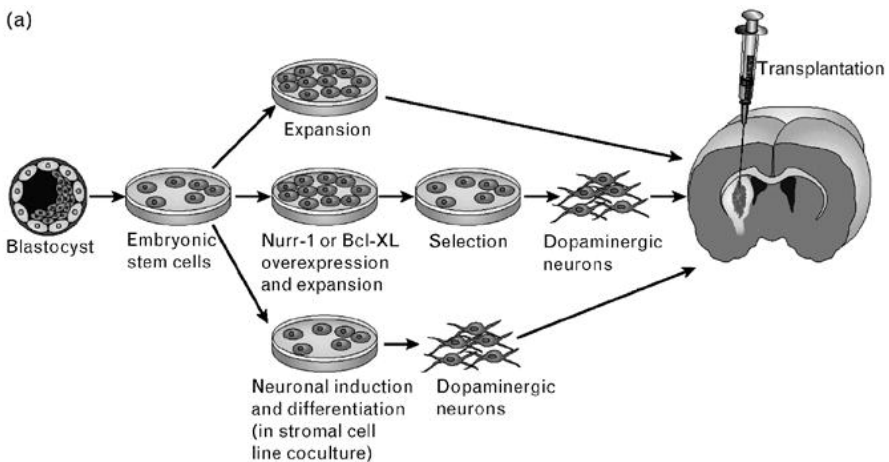
2.4.5.1 CELLULE STAMINALI EMBRIONALI

Le cellule staminali embrionali sono attualmente considerate la più promettente risorsa di neuroni dopaminergici da impiantare nella malattia di Parkinson (a). Queste cellule derivano dalla massa cellulare interna della blastocisti, hanno la capacità di differenziarsi verso ogni tipo cellulare e possono essere mantenute in coltura per un tempo pressoché indefinito.

I primi studi nella malattia di Parkinson sono stati condotti in vitro su cellule staminali embrionali murine e hanno permesso la sintesi di neuroni dopaminergici a partire da queste. Recentemente in vitro[27] si è riusciti a far avvenire lo stesso processo differenziativo a partire da cellule staminali embrionali umane. Il trapianto di cellule staminali embrionali in vivo è invece stato tentato su modelli murini con risultati modesti[28]. Tali risultati sono stati migliori se il differenziamento delle cellule staminali trapiantate viene facilitato usando fattori di trascrizione come Nurr-1 e fattori di crescita come FGF-8 (fibroblast-growth factor 8)[29]. Risultati promettenti sono stati ottenuti anche su modelli di primati parkinsonizzati [30]. Un'ulteriore strategia per migliorare i

risultati di un trapianto di cellule staminali embrionali potrebbe essere quella di trasferire solo le cellule staminali esprimenti la tirosina-idrossilasi, che sono quelle che più probabilmente si differenzieranno a cellule dopaminergiche. Ancora molta tuttavia è la strada da fare in questo ambito prima di poter ipotizzare trials sulla specie umana, dati i risultati abbastanza modesti negli studi sugli animali e dato il rischio non trascurabile di tumorigenesi con formazione di teratomi evidenziato negli stessi studi[3].

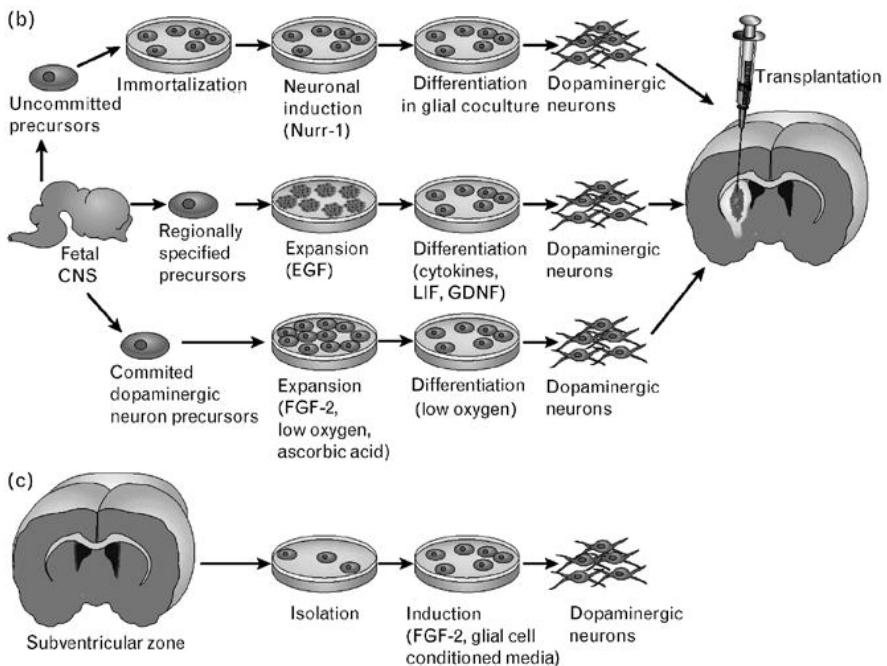
(a)



2.4.5.2 CELLULE STAMINALI NEURALI ADULTE O FETALI

Anche questo tipo di cellule rappresenta una possibile fonte di neuroni dopaminergici per il trapianto cellulare nella malattia di Parkinson (b-c).

Tuttavia il grosso limite nell'utilizzo di tali cellule è che la spontanea trasformazione in neuroni dopaminergici è rara e la maggior parte di queste cellule si differenziano in cellule gliali[3].

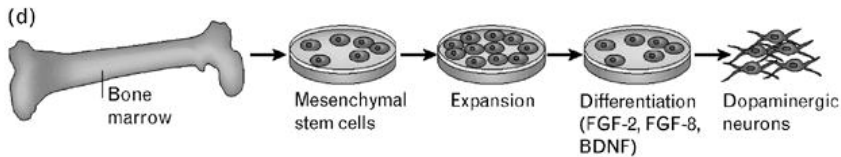


2.4.5.3 CELLULE STAMINALI AUTOLOGHE

Cellule staminali derivate dai tessuti del paziente stesso attraggono l'attenzione dei ricercatori a causa di due vantaggi fondamentali: si eviterebbero infatti sia le preoccupazioni etiche sia le difficoltà immunologiche correlate all'utilizzo di cellule staminali derivate da embrioni umani.

Le cellule staminali autologhe si ottengono soprattutto dal midollo osseo (d). Studi compiuti con trapianto di cellule staminali autologhe in modelli murini di malattia di Parkinson hanno mostrato[31] che cellule derivanti dal midollo osseo tendono a differenziarsi più facilmente verso la linea gliale. Tuttavia il numero di cellule che si differenziano in neuroni dopaminergici è maggiore se avviene contemporaneamente trattamento con GDNF (glial-derived neurotrophic factor).

I risultati ottenuti rimangono comunque modesti, ma è da dire come le staminali autologhe dagli esperimenti animali non hanno mai indotto tumorigenesi, differentemente dalle cellule staminali eterologhe (ad esempio embrionali), o altri effetti collaterali e questo potrebbe essere un punto a favore del loro utilizzo nella specie umana.



2.4.5.4 CELLULE STAMINALI DERIVANTI DAL CORDONE OMBELICALE

La matrice del cordone ombelicale contiene anche cellule staminali primitive. Esperimenti con cellule del cordone ombelicale di suino sono stati effettuati in modelli murini di malattia di Parkinson[32]. La percentuale di trasformazione in cellule dopaminergiche dopo trapianto non è troppo incoraggiante (6%), tuttavia non è stato notato alcun fenomeno di rigetto, probabilmente in quanto tali cellule hanno una bassa immunogenicità, e ciò potrebbe costituire un punto a favore rispetto all'utilizzo di cellule staminali fetali o embrionali.

Indipendentemente dalla fonte di cellule staminali, vi sono alcuni problemi comuni a tutti questi tipi di cellule da affrontare e che limitano ancora di molto il possibile utilizzo della terapia 'cellulare' nel Parkinson.

In primo luogo vi è la questione dell'attecchimento delle cellule staminali dopo il trapianto. Il numero di cellule che sopravvive al trapianto e si differenzia in neuroni dopaminergici è ancora molto limitato negli studi animali nonostante l'utilizzo di volta in volta di antiossidanti, fattori trofici ed antiapoptotici. La sopravvivenza delle cellule staminali trapiantate, secondo alcuni, sarebbe ulteriormente messa a rischio dalla terapia con L-dopa. Questo farmaco infatti resta il cardine della terapia farmacologica sintomatica del Parkinson, tuttavia potrebbe ulteriormente aumentare lo stress ossidativo e quindi velocizzare la morte dei neuroni della via nigrostriatale, come ipotizzato anche se non dimostrato dallo studio Elldopa[33]. Tale effetto potrebbe esserci anche sulle neo-trapiantate cellule staminali nel loro percorso differenziativo verso i neuroni dopaminergici.

Inoltre un altro limite al trapianto di un qualunque tipo di staminale embrionale sono i possibili effetti collaterali prevedibili e imprevedibili. Tra i prevedibili e gravi va annoverata la tumorigenesi che finora è stata confermata solo per le cellule embrionali. Inoltre vanno tenuti da conto gli

effetti della terapia immunosoppressiva in caso di trapianto con cellule eterologhe. Ulteriori studi andrebbero effettuati per scongiurare l'insorgenza di discinesie di fase off, le quali hanno complicato l'utilizzo delle cellule nigrostriatali fetali. Comunque l'assenza di altri effetti collaterali evidenziati negli studi animali non costituisce garanzia del fatto che essi non possano comparire nell'uomo.

In ultima analisi va detto che sebbene la maggior parte dei sintomi della malattia di Parkinson siano correlati alla degenerazione della via dopaminergica nigrostriatale, anche altre zone vanno incontro a degenerazione ed altre popolazioni neuronali non dopaminergiche potrebbero essere coinvolte nella genesi di un disturbo neurodegenerativo così complesso, la cui patogenesi ancora non è completamente delucidata. Per tale motivo il rimpiazzo delle sole cellule dopaminergiche potrebbe non coprire tutto l'ampio spettro sintomatologico del paziente parkinsoniano, analogamente a quanto succede per la terapia dopaminergica farmacologica[3].

In conclusione il trapianto di cellule staminali è una prospettiva intrigante per la terapia della malattia di Parkinson ma molti

problemi, scientifici ed etici, devono essere affrontati prima di poter iniziare a testare tale terapia nella specie umana.

Bibliografia

- [1] Okano H, Sakaguchi M, Koichi O, Suzuki N, Sawamoto K. Regeneration of the central nervous system using endogenous repair mechanisms. *J Neurochem*, 2007, 102, 1459-1465.
- [2] Zech NH, Shkumatov A, Koestenbauer S. The magic behind stem cells. *J Assist Reprod Genet* (2007) 24: 208-214.
- [3] Snyder BJ, Warren Olanow C. Stem cell treatment for Parkinson's disease: an update for 2005. *Curr Opin Neurol* 18; 376-385.
- [4] Drucker-Colin R, Verdugo-Diaz L. Cell transplantation for Parkinson's disease: present status. *Cell and Molec Neurobiol* Vol. 24, No.3, June 2004.
- [5] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418 (6893): 41-9.
- [6] Geiger H, Sick S, Bonifer C, Muller AM. Globin cell expression is reprogrammed in chimeras generated by injecting adult hematopoietic stem cells into mouse blastocysts. *Cell* 1998; 93 (6) 1055-65.
- [7] Pochampally RR, Neville BT, Schwarz EJ, Li MM, Prockop DJ. Rat adult stem cells (marrow stem cell) engraft and differentiate in chick embryos without evidence of cell fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 101 (25) 9282-5.
- [8] Kucia M, Reza R, Campbell FR, Zuba-Surma E, Majka M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)/SSEA-1(+)/Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 2006 May; 20(5): 857-69.

[9] Yu H, Fang D, Kumar SM, Li L, Nguyen TK, Acs G, Herlyn M, Xu X. Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. *Am J Pathol.* 2006 Jun;168(6):1879-88.

[10] Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, Nolte J, Wolf F, Li M, Engel W, Hasenfuss G. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature.* 2006 Apr 27;440(7088):199-203.

[11] Fujikawa T, Oh SH, Pi L, Hatch HM, Shupe T, Petersen BE. Teratoma formation leads to failure of treatment for type I diabetes using embryonic stem cell-derived insulin-producing cells.

Am J Pathol. 2005 Jun;166(6):1781-91.

[12] Wakitani S, Takaoka K, Hattori T, Miyazawa N, Iwanaga T, Takeda S, Watanabe TK, Tanigami A. Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint. *Rheumatology (Oxford).* 2003 Jan;42(1):162-5.

[13] Asano T, Sasaki K, Kitano Y, Terao K, Hanazono Y. In vivo tumor formation from primate embryonic stem cells. *Methods Mol Biol.* 2006;329:459-67.

[14] Cooke MJ, Stojkovic M, Przyborski SA. Growth of teratomas derived from human pluripotent stem cells is influenced by the graft site. *Stem Cells Dev.* 2006 Apr;15(2):254-9.

[15] Shyu WC, Lin SZ, Yang HI, Tzeng YS, Pang CY, Yen PS, Li H. Functional recovery of stroke rats induced by granulocyte colony-stimulating factor-stimulated stem cells. *Circulation.* 2004 Sep 28;110(13):1847-54.

[16] Buzańska L, Machaj EK, Zabłocka B, Pojda Z, Domańska-Janik K. Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro. *J Cell Sci.* 2002 May 15;115(Pt 10):2131-8.

[17] Newsome PN, Johannessen I, Boyle S, Dalakas E, McAulay KA, Samuel K, Rae F, Forrester L, Turner ML, Hayes PC, Harrison DJ, Bickmore WA, Plevris JN. Human cord blood-derived cells can

differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion. *Gastroenterology*. 2003 Jun;124(7):1891-900.

[18] Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med*. 2002 Sep;8(9):963-70.

[19] Ninomiya M, Yamashita T, Araki N, Okano H, Sawamoto K. Enhanced neurogenesis in the ischemic striatum following EGF-induced expansion of transit-amplifying cells in the subventricular zone. *Neurosci Lett*. 2006 Jul 31;403(1-2):63-7.

[20] Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature*. 2000 Jun 22;405(6789):951-5.

[21] Freed CR, Breeze RE, Rosenberg NL, Schneck SA, Kriek E, Qi JX, Lone T, Zhang YB, Snyder JA, Wells TH, et al. Survival of implanted fetal dopamine cells and neurologic improvement 12 to 46 months after transplantation for Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 1992 Nov 26;327(22):1549-55.

[22] Lindvall O, Brundin P, Widner H, Rehncrona S, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders KL, Sawle G, Rothwell JC, Marsden CD, et al. Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science*. 1990 Feb 2;247(4942):574-7.

[23] Sawle GV, Bloomfield PM, Björklund A, Brooks DJ, Brundin P, Leenders KL, Lindvall O, Marsden CD, Rehncrona S, Widner H, et al. Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: PET [18F]6-L-fluorodopa studies in two patients with putaminal implants. *Ann Neurol*. 1992 Feb;31(2):166-73.

[24] Freeman TB, Olanow CW, Hauser RA, Nauert GM, Smith DA, Borlongan CV, Sanberg PR, Holt DA, Kordower JH, Vingerhoets FJ, et al. Bilateral fetal nigral transplantation into the postcommissural putamen in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 1995 Sep;38(3):379-88.

[25] Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D, Fahn S.

Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 2001 Mar 8;344(10):710-9.

[26] Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF, Shannon KM, Nauert GM, Perl DP, Godbold J, Freeman TB. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2003 Sep;54(3):403-14.

[27] Perrier AL, Tabar V, Barberi T, Rubio ME, Bruses J, Topf N, Harrison NL, Studer L. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Aug 24;101(34):12543-8.

[28] Bjorklund LM, Sánchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IY, McNaught KS, Brownell AL, Jenkins BG, Wahlestedt C, Kim KS, Isacson O. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Feb 19;99(4):2344-9.

[29] Kim TE, Lee HS, Lee YB, Hong SH, Lee YS, Ichinose H, Kim SU, Lee MA. Sonic hedgehog and FGF8 collaborate to induce dopaminergic phenotypes in the Nurr1-overexpressing neural stem cell. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Jun 13;305(4):1040-8.

[30] Takagi Y, Takahashi J, Saiki H, Morizane A, Hayashi T, Kishi Y, Fukuda H et al. Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J Clin Invest.* 2005 Jan;115(1):102-9.

[31] Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, Itokazu Y, Tajima N et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest.* 2004 Jun;113(12):1701-10.

[32] Medicetty S, Bledsoe AR, Fahrenholtz CB, Troyer D, Weiss ML. Transplantation of pig stem cells into rat brain: proliferation during the first 8 weeks. *Exp Neurol.* 2004 Nov;190(1):32-41.

[33] Fahn S; and the Parkinson Study Group. Does levodopa slow or hasten the rate of progression of Parkinson's disease? J Neurol. 2005 Oct;252 Suppl 4:IV37-IV42.

2.5 NUOVE TERAPIE NELLA MALATTIA DI PARKINSON, *Mario Zappia*

Dipartimento di Neuroscienze - Università degli Studi di Catania

Il progredire delle conoscenze nella Malattia di Parkinson (MP) ha permesso l'elaborazione di nuovi approcci terapeutici.

Ad oggi è possibile suddividere i trattamenti per la malattia di Parkinson in tre categorie principali:

- 1) protettivi;
- 2) sintomatici;
- 3) ristorativi.

2.5.1 Terapia Protettiva

Per neuroprotezione intendiamo un meccanismo di protezione dei neuroni dalla morte cellulare. Obiettivo, quindi, del trattamento è quello di arrestare o, comunque, rallentare il processo neurodegenerativo. Il meccanismo patogenetico che sottende alla patologia, infatti, coinvolge una cascata di eventi che includono: stress ossidativo (cioè squilibrio tra formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e capacità del sistema di difesa antiossidante di

neutralizzarle), anomalie della funzione mitocondriale (riduzione dell'attività del complesso I della catena respiratoria mitocondriale e dei livelli di glutazione ridotto), eccitotossicità, eventi infiammatori e meccanismi degradativi correlati al sistema ubiquitina-proteasoma (stress proteolitico). Tali eventi conducono ad una morte programmata dei neuroni (apoptosi) in aree particolarmente suscettibili.

Comunque, come meglio chiarito ultimamente, sembra sempre più probabile, se non certo, che, nonostante tutto, vi sia una proporzione di neuroni danneggiati e mal funzionanti che non vanno incontro ad apoptosi. Sulla base di tali dati, è stato possibile identificare il ruolo e l'attività di alcune molecole come agenti neuroprotettivi al fine di risanare la funzione di questa popolazione neuronale compromessa. Per tale motivo, possiamo parlare di neuroprotezione in termini sia di rallentamento ed arresto del processo neurodegenerativo che di reversione alla normale funzione dei neuroni danneggiati.

Un intervento neuroprotettivo sarà tanto più efficace quanto prima si interverrà rispetto all'inizio del processo patologico. Da questo punto di vista, il trattamento dovrebbe essere instaurato ancor prima che la malattia si manifesti. Purtroppo, ancora non disponiamo di markers pre-clinici di malattia e,

quindi, non siamo ancora in grado di intervenire in una fase precoce dall'inizio del processo patogenico.

Fra i possibili agenti neuroprotettivi possiamo considerare diversi farmaci: dopaminoagonisti e inibitori delle MAO, attivi sullo stress ossidativo; bioenergetici, efficaci sulla disfunzione mitocondriale; antagonisti glutamatergici, contrastanti l'eccitotossicità; antibiotici batteriostatici come la minociclina ad azione antiinfiammatoria.

Il "National Institute for Health" statunitense ha varato un programma, denominato "NET-PD" (Neuroprotective Therapy for Parkinson's Disease), volto alla sperimentazione clinica delle sostanze identificate come potenzialmente neuroprotettive. Almeno 12 sostanze sono state repute meritevoli di sperimentazione e, per almeno quattro di queste, vi sono motivi per ritenerle particolarmente promettenti.

1) La Minociclina: tetraciclina che inattiva la microglia attivata ha funzione antiinfiammatoria; inoltre, presenta una funzione antiapoptotica inattivando le caspasi 1-3.

2) La Creatina viene convertita in fosfocreatina per fornire fosfati per la sintesi mitocondriale di ATP.

3) Il GPI-1485 fa parte delle neuroimmunofilline, sostanze derivate da un immunosoppressore (tacrolimus) con effetti neurotrofici, che però, a differenza di BDNF e GDNF, attraversano la barriera emato-encefalica.

4) Il Co-enzima Q10, sostanza bioenergetica, ha già evidenziato un'efficacia sintomatica al dosaggio di 1200 mg/die.

La creatina e la minociclina sembrano essere più efficaci nel rallentare la progressione di malattia rispetto alle altre sostanze prese in esame.

2.5.2 Trattamento sintomatico

Il trattamento sintomatico può suddividersi in due tipi di strategie: dopaminergiche e non dopaminergiche.

Strategie non dopaminergiche. Nella MP è presente iperattività della via glutammatergica. Farmaci antiglutammatergici, quali la amantadina, hanno dimostrato efficacia nel migliorare le discinesie e nel potenziare l'effetto della L-Dopa. Altri farmaci in fase sperimentale sono: antagonisti dei recettori glutammatergici AMPA (Talampanel), NMDA e metabotropici; antagonisti dei recettori per i cannabinoidi; antagonisti dei recettori adrenergici alfa-2 (Idazoxan e Fipamezolo); antagonisti dei recettori dell'adenosina A2a.

A questa ultima categoria appartiene la caffeina, che alcuni studi epidemiologici hanno considerato avere un ruolo protettivo nello sviluppo della MP. Partendo da questi presupposti, è stato proposto come agente antiparkinsoniano un altro antagonista dei recettori dell'adenosina A_{2a}, l'Istradefillina, che ha dimostrato di poter ridurre il periodo "off" di circa 1.2 ore senza un aumento delle discinesie (studio US-005).

I recettori serotoninergici (5HT_{1A}, 5HT_{1B}, 5HT_{2C}) sono normalmente espressi nello striato. Dati preclinici hanno dimostrato che gli agonisti 5HT_{1A} e gli antagonisti 5HT_{2C} (tandospirone e sarizotan) determinano un miglioramento dei sintomi motori oltre che delle complicanze farmacologiche (in particolare: discinesie, studio SPLENDID).

Strategie dopaminergiche. Sebbene la patofisiologia delle complicanze motorie non sia ben chiara, è stato suggerito che una stimolazione non fisiologica, pulsatile, piuttosto che continua dei recettori dopaminergici striatali risultante dai trattamenti attualmente disponibili, determini dei rimodellamenti plastici dei gangli della base che influenzano lo sviluppo di complicanze motorie. Pertanto, negli ultimi anni si è cercato di rendere possibile una stimolazione continua dopaminergica attraverso l'impiego di nuovi farmaci o

impiegando farmaci noti ma utilizzando nuove vie di somministrazione.

Rotigotina: agonista della dopamina non ergolinico D3/D2/D1. Un cerotto transdermico rilascia costantemente la Rotigotina, che viene assorbita dalla cute. Dal momento che il farmaco viene somministrato per via transdermica, non ci sono problemi di assorbimento dovuti al cibo o a disturbi gastrointestinali. Le concentrazioni di equilibrio plasmatico vengono raggiunte dopo uno o due giorni dall'applicazione del cerotto e si mantengono ad un livello stabile con una sola applicazione giornaliera del cerotto per 24 ore. La Rotigotina viene in gran parte metabolizzata tramite N-dealchilazione e coniugazione diretta e secondaria non sottoponendosi all'effetto di primo passaggio epatico. Le reazioni avverse più probabili sono quelle legate al profilo farmacodinamico di un agonista della dopamina e comprendono: nausea, vomito, ipotensione, movimenti involontari, allucinazioni, confusione, convulsioni e altri segni di stimolazione dopaminergica centrale.

Apomorfina. L'Apo-MTD consiste in una molecola di R-apomorfina idrocloridrato incorporato in una microemulsione stabile di acqua-olio. 21 pazienti con MP avanzata sono stati trattati con tale formulazione dimostrando un significativo aumento nella durata

totale dei periodi “off”. L’effetto collaterale rilevante era rappresentato da irritazioni cutanee in quattro pazienti.

Duodopa. Sospensione concentrata di levodopa/carbidopa (2g / 0.5g per 100 ml). Lo studio DIREQT (Duodopa Infusion: Randomized Efficacy and Quality of Life Trial) ha studiato gli effetti di tale trattamento su fluttuazioni motorie e qualità di vita in pazienti con MP avanzata. I risultati hanno dimostrato una significativa riduzione della fase «off» senza incremento delle discinesie, con evidente miglioramento della qualità di vita.

2.5.3 *Terapia ristorativa*

Prevede il ripristino dei neuroni nigrali dopaminergici perduti in seguito alla degenerazione mediante cellule capaci di produrre dopamina tramite:

- impianti di neuroni dopaminergici provenienti da cellule staminali;
- fattori neurotrofici;
- terapia genica.

Quest’ultima, in particolare, ha come obiettivo il trasferimento ed espressione di materiale genetico in cellule *target* mediante vettori

virali (adenovirus). Una sperimentazione clinica ha valutato il gene della glutammico-decarbossilasi che, decarbossilando il glutammato, migliora la trasmissione GABAergica nel nucleo subtalamico. Il trial clinico eseguito su 12 pazienti ha dimostrato un miglioramento dell'UPDRS in fase off (da 38.6 ± 8.4 a 30.9 ± 13.8 a sei mesi e 30 ± 12.3 a 12 mesi). Tali evidenze fanno ritenere che, in un futuro non troppo lontano, la terapia genica potrà avere un ruolo importante per la cura della MP.

2.6 DEVELOPMENT, RESULTS AND FUTURE APPLICATIONS OF THE FIRST GEGE THERAPY APPROACH FOR HUMAN PARKINSON'S DISEASE, *Michael G. Kaplitt, MD PhD*

Victor and Tara Menezes Clinical Scholar and Vice-Chairman for Research
Department of Neurological Surgery
Weill Medical College of Cornell University

Although gene therapy has long held promise as a novel biologically-based methodology for improving disease, translation into successful human therapies has been slow. After difficulties encountered in some clinical trials of gene therapy for peripheral diseases, there has been a resurgence led by gene therapy of the central nervous system. In recent years, phase I safety studies have been completed or remain ongoing for numerous diseases, including three studies for Parkinson's disease, two neurogenetic disorders studies (Canavan and Batten diseases) and one Alzheimer's disease study, with epilepsy, pain and a fourth Parkinson's disease study about to be initiated. Based upon excellent safety profiles and encouraging clinical and imaging outcome data, two Parkinson's studies have moved to randomized, phase II trials, with additional later phase studies planned for some of the other applications. With the explosion of pre-clinical applications of gene transfer technology

to many new disease models, continued progress in current clinical trials will help broaden the range of opportunities for genetic intervention into neurological disease. Here we will review our data which led to the development of the first human trial of gene therapy for any adult neurological disease, as well as the clinical and imaging results of our phase I study in Parkinson's disease. Finally, we will review the issues which are critical to successful transition toward a clinically useful product and which are being addressed in later phase human trials.

The major advance which facilitated translation of gene transfer from a research tool to a potentially viable human therapeutic was the development of the adeno-associated virus vector. Previously we and others had used a variety of viral vectors for gene transfer, including vehicles based upon herpes simplex virus (HSV) and adenovirus[1-4]. These original vectors used recombinant viruses, in which a gene was inserted into the whole virus backbone while one or more important genes were removed to reduce virulence and/or productive infections. However, these early generation recombinant vectors had limited longevity of gene expression and some of the remaining viral genes resulted in ongoing toxicity and immunoreactivity[5]. Defective viral vectors were then developed which would package a therapeutic gene into a viral coat, to allow

efficient gene transfer mediated by viral surface proteins while eliminating all viral genes from within the vector. Defective HSV vectors, also called amplicons, were the earliest defective viral vectors used in the brain, but these were difficult to grow to high titers and complete elimination of contaminating and somewhat toxic helper viruses was difficult[3, 4]. Adeno-associated virus (AAV) is naturally defective, however, as it cannot complete a full life-cycle without the presence of certain adenovirus or HSV gene products in the same cell[6, 7]. Since AAV is quite small (the genome is roughly 5 kilobases in length) and is very different in size from the helper viruses, complete purification in early systems was fairly simple. Subsequently, plasmid-based systems were developed such that the gene flanked by AAV replication and packaging signals could be packaged into an AAV coat by a second plasmid expressing a limited number of AAV and adenovirus genes. This resulted in a completely pure AAV vector without the use of any contaminating helper viruses. Based upon these advantages, we first demonstrated that AAV could be a safe and efficient vehicle for long-term gene delivery in the brain[8]. Hundreds of subsequent papers over the past 15 years, confirmed that AAV vectors could yield safe, long-term gene expression without toxicity or inflammation.

Parkinson's disease (PD) has long been viewed as a potential target for gene therapy. While the cause of pathology in PD remains unknown, the consequences of nigral dopamine neuronal loss are fairly well understood. The earliest approach to gene therapy for PD was to insert the gene for tyrosine hydroxylase (TH), which is the rate-limiting step in the synthesis of dopamine, into the striatum to permit local restoration of dopamine neurotransmission. This was first accomplished with *ex vivo* gene therapy, in which cells were transplanted into the brain which were genetically modified to express TH. This was soon followed by *in vivo* gene therapy, in which viral vectors were used to insert the TH gene directly into endogenous striatal neurons in animal models of PD. In fact, in our study which first demonstrated that AAV vectors could be safe and efficient gene transfer vehicles for the brain, we also demonstrated that these vectors could improve abnormal rotational behavior in animals with nigral lesions following striatal transfer of the TH gene[8]. However, adverse effects and limited efficacy in human PD patients treated with intra-striatal fetal cell transplantation raised concerns regarding unregulated synthesis of dopamine within the striatum as a treatment for PD[9]. Another approach to gene therapy for PD was introduction of growth factor genes, in particular the gene for glial derived neurotrophic factor (GDNF). This also

showed significant promise in both rodent and primate models of PD, since GDNF is highly trophic for nigral dopamine neurons. Again, however, the human experience with GDNF infusion raised concerns regarding the future of gene therapy. An early trial of infusion of recombinant GDNF protein into the ventricular system was stopped due to significant adverse effects[10]. Subsequently, a phase I study of recombinant GDNF infusion directly into the striatum of human PD patients showed much greater promise[11]. This result was not replicated in a randomized, placebo-controlled, blinded study, in which both the treatment and control groups showed little change over time[12]. While there remains debate regarding the reasons for this discrepancy, animal models of PD receiving GDNF infusion showed dramatic responses, similar to other approaches such as gene therapy and earlier cell transplantation experiments. Therefore, this raised some questions as to the relevance of animal models as predictors of success in human clinical trials.

Based upon these findings and issues, we developed a novel approach to gene therapy for PD which was based upon treatments which have been successful in human patients. The goal was to learn from those therapies that have been effective in advanced human PD, and develop a gene therapy that could improve upon these treatments

while simultaneously having a greater chance of demonstrating a success for gene therapy in a neurological disease. The most accepted therapy currently for patients with advanced PD, particularly those with motor fluctuations, increasing “off” times and/or severe dyskinesias on medication, is subthalamic nucleus (STN) deep brain stimulation. Animal models and human studies have all suggested that dysregulation of the basal ganglia circuitry following loss of striatal dopamine leads to a reduction in inhibitory GABAergic inputs and resulting disinhibition of the STN[13]. Although the mechanism of action of DBS continues to be debated, it remains clear that reduction in STN activity can improve PD symptoms, since STN lesioning is also an effective therapy. Furthermore, infusion of the GABA agonist muscimol into the STN of human patients during DBS surgery resulted in transient symptomatic improvements.

Gene transfer of the glutamic acid decarboxylase (GAD) gene into the STN via AAV-mediated gene transfer was designed to take advantage of these findings in human patients. Introduction of GAD into the STN was designed to accomplish several functions. First, local production of GABA by GAD would replace the lost GABAergic inputs to the STN in PD and thereby normalize STN hyperactivity. In addition, GABA might be released via projections

into the STN targets, the globus pallidus interna (GPi) and substantia nigra pars reticulata (SNr), thereby normalizing their abnormal hyperactivity as well. Since GAD utilizes glutamate as a substrate to produce GABA, introduction of GAD into STN neurons should also reduce the amount of glutamate within these neurons, thereby further reducing the abnormally high glutamatergic output of the STN. Finally, there is evidence that excitotoxicity from the STN can accelerate nigral dopamine neuronal degeneration, so this could potentially slow progression of disease in addition to possible symptomatic benefits. Using standard rodent models of PD, we validated many of these hypotheses[14]. There were significant improvements in spontaneous and drug-induced abnormal behaviors in animals with nigral lesions. In addition, there was an improvement in the abnormal electrophysiological activities of STN neurons, and an increase in GABA release as measured by microdialysis in the SNr with increased STN activity following AAV-GAD gene transfer in the STN. A subsequent study performed in Korea confirmed these findings, and also suggested that increased expression of GAD using different promoters could lead to even greater symptomatic improvement in rodent PD models[15]. These data, combined with a primate safety and efficacy study showing improvements in both behavior and functional imaging, led to

development of a protocol for a phase I study of AAV-GAD gene therapy for human PD[16].

The phase I study of AAV-GAD gene therapy for human PD was the first trial approved using *in vivo* gene therapy for any adult neurodegenerative disorder. Given the obvious potential for unknown complications despite a strong safety profile in animal studies, U.S. regulatory agencies required that treatment only be performed unilaterally. This was understandable, since the potential for devastating complications are far greater if damage occurs to the same structure on both sides of the brain. Therefore, while unilateral therapy was not initially proposed, the instance on this by government regulators resulted in a study in which one side of the brain would be treated while the other side would remain untreated. Since all patients to be enrolled in the study would be standard candidates for STN DBS, and they would need to be at least early stage III on the Hoehn and Yahr scale, these would all be patients with some bilateral symptoms[17]. Therefore, although phase I studies are primarily designed for safety and are therefore not blinded, the ability to compare the treated side of the brain to the untreated side in the same patients would provide a unique control to better understand any potential efficacy which would support further development of this therapy. Twelve patients were treated, with four

patients each treated in three different dose groups. Doses ranged from 3.5×10^9 in the lowest dose group to 3.5×10^{10} in the highest dose group. Patients were followed before surgery and at 1,3,6, and 12 months after surgery with clinical and neuropsychological testing, as well as with blood tests for immune responses. Fluorodeoxyglucose (FDG) PET scans were also performed before surgery and at 6 and 12 months after surgery to analyze brain metabolic activity, in order to determine if there were any improvements in abnormal activity of relevant brain regions which might support any clinical findings.

The results of this study were encouraging in several ways and have now been reported [18, 19]. The primary outcome measure of the phase I study was safety, and there were no adverse events at any point which were related to the gene therapy. Blood tests also failed to demonstrate any evidence of induction of an immune reaction to either the GAD gene or to the AAV2 virus, which was the strain used as a gene transfer vector in this study. Two patients had pre-existing immunity to AAV2, but the level of neutralizing antibodies against AAV2 did not change even in these patients throughout the study. There were also no abnormalities on brain MRIs at any point, and neuropsychological testing revealed no new deficits over time, and improvement in some specific measures.

While the safety profile was comforting, the clinical outcomes were more promising[18]. Using the standard motor subsection of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS part III), there was a significant improvement in the practically-defined "off" medication scores beginning at 3 months following surgery, improving slightly at 6 months and continuing at the 12 months timepoint. More surprisingly, there was also a significant improvement in the "on" medication scores over the same time period. Improvements in "on" scores are less frequently seen with DBS, and therefore this was somewhat unexpected. Analysis of these scores based upon body side indicated that the improvements were largely restricted to the side of the body opposite the treated brain hemisphere, suggesting that these improvements were due to the intervention. This does not absolutely prove that these outcomes were not caused by a placebo effect, but comparison between the two sides of the body does provide greater confidence in the result compared with a totally uncontrolled study. Also, there have been questions raised regarding the possibility that outcomes were due to a microlesioning effect following STN surgery. In all cases, only a single microelectrode recording tract was used, and the infusion catheter was roughly 140 microns in diameter. Since the 1.2mm DBS electrode does not routinely cause a sustained lesioning effect

(otherwise there would be no need for the pulse generator), it is unlikely that a catheter nearly 100 fold smaller in diameter would lead to such an outcome. Furthermore, AAV normally requires several weeks to maximize gene expression, while lesioning usually results in fairly immediate improvements. Thus, the delayed improvement is consistent with the known biology of AAV and less consistent with the known time course of lesioning effects.

In addition to clinical outcomes, functional imaging provided more supportive evidence of the efficacy of AAV-GAD in our patients. Comparison of regional metabolic changes indicated significant improvements in the metabolism of the thalamus restricted to the treated hemisphere, with no changes in the untreated hemisphere[18]. These were similar to the changes previously documented following standard therapies such as l-dopa or DBS[20, 21]. There was also a significant improvement in premotor cortex hypometabolism, and a highly significant correlation between increased supplementary motor cortex metabolism and improvements in clinical ratings. To further address the question of microlesioning, we also compared our results with data obtained from Taiwanese patients who had undergone STN lesioning as a therapy for PD[22]. While the change in thalamic metabolism was similar between groups, the effect on the globus pallidus was

completely opposite in the two groups in a manner that is consistent with the different mechanisms of action of lesioning the STN compared with changing STN function[19]. This further suggests that our clinical results were not the result of a lesioning effect.

These results are consistent with the pre-clinical studies and prior human studies which formed the basis for our phase I trial, and support the further development of this therapy in later phase studies. A phase II study is currently being initiated, which would involve bilateral infusion of AAV-GAD into the STN of PD patients with sham surgery performed on an equal number of patients in a blinded fashion. This will directly address any questions regarding possible placebo effects, and if successful will support final stage evolution of this experimental therapy into an approved product. We have also worked with industry to develop a system for infusion into the brain, since there is no commercially-available product currently for direct infusion into the human brain. This new system is also being tested in this phase II study. In addition to our approach, two additional approaches to gene therapy for PD have moved into clinical trial after we had initiated our study. As an alternative to GDNF (which the company owning the patent rights refuses to further develop), a phase I study of gene therapy for a similar growth factor, neurturin, has been completed, also using AAV[23,

24]. While results have not been published, presentations at scientific meetings have indicated a good safety profile and promising clinical efficacy data. This moved aggressively into a blinded phase II study, and this study has now completed enrollment and patient evaluations are ongoing. A third approach is using AAV-mediated transfer of the aromatic acid decarboxylase (AADC) gene into the striatum[25, 26]. AADC converts L-dopa to dopamine, so the goal is to increase striatal dopamine but in a manner which can be controlled, since reduction in L-dopa intake should limit adverse effects of overproduction of striatal dopamine. This phase I study is ongoing, but there also appears to be a good safety profile and encouraging imaging results demonstrating increased conversion of radiolabelled L-dopa on PET into dopamine in the striatum. Along with other human trials of AAV gene therapy in the brain which are ongoing, such as nerve growth factor gene therapy for Alzheimer's disease and two pediatric neurogenetic diseases, all of these studies provide hope that human gene therapy for neurological diseases will develop further into approved therapies for general use[27-29]. These results seem to be confirming our original confidence in AAV as a gene therapy vehicle for the brain, as demonstrated in our first animal application and then our first adult human application of this

vector, and suggest that AAV-mediated gene transfer in the brain will continue to flourish in both pre-clinical and clinical studies.

References

1. Le Gal La Salle, G., et al., *An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain*. Science, 1993. **259**(5097): p. 988-90.
2. Chiocca, E.A., et al., *Transfer and expression of the lacZ gene in rat brain neurons mediated by herpes simplex virus mutants*. New Biol, 1990. **2**(8): p. 739-46.
3. Federoff, H.J., et al., *Expression of nerve growth factor in vivo from a defective herpes simplex virus 1 vector prevents effects of axotomy on sympathetic ganglia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(5): p. 1636-40.
4. Kaplitt, M.G., et al., *Expression of a functional foreign gene in adult mammalian brain following in vivo gene transfer via a herpes simplex virus type 1 defective viral vector*. Mol Cell Neurosci, 1991. **2**: p. 320-30.
5. Byrnes, A.P., et al., *Adenovirus gene transfer causes inflammation in the brain*. Neuroscience, 1995. **66**(4): p. 1015-24.
6. Flotte, T.R., et al., *Stable in vivo expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(22): p. 10613-7.
7. Samulski, R.J., L.S. Chang, and T. Shenk, *A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised in vitro and its use to study viral replication*. J Virol, 1987. **61**(10): p. 3096-101.

8. Kaplitt, M.G., et al., *Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain*. Nat Genet, 1994. **8**(2): p. 148-54.
9. Freed, C.R., et al., *Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease*. N Engl J Med, 2001. **344**(10): p. 710-9.
10. Nutt, J.G., et al., *Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD*. Neurology, 2003. **60**(1): p. 69-73.
11. Gill, S.S., et al., *Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease*. Nat Med, 2003. **9**(5): p. 589-95.
12. Lang, A.E., et al., *Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease*. Ann Neurol, 2006. **59**(3): p. 459-66.
13. Hamani, C., et al., *The subthalamic nucleus in the context of movement disorders*. Brain, 2004. **127**(Pt 1): p. 4-20.
14. Luo, J., et al., *Subthalamic GAD gene therapy in a Parkinson's disease rat model*. Science, 2002. **298**(5592): p. 425-9.
15. Lee, B., et al., *Enhanced expression of glutamate decarboxylase 65 improves symptoms of rat parkinsonian models*. Gene Ther, 2005. **12**(15): p. 1215-22.
16. Emborg, M.E., et al., *Subthalamic glutamic acid decarboxylase gene therapy: changes in motor function and cortical metabolism*. J Cereb Blood Flow Metab, 2007. **27**(3): p. 501-9.
17. Hoehn, M.M. and M.D. Yahr, *Parkinsonism: onset, progression and mortality*. Neurology, 1967. **17**(5): p. 427-42.
18. Kaplitt, M.G., et al., *Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial*. Lancet, 2007. **369**(9579): p. 2097-105.

19. Feigin, A., et al., *Modulation of metabolic brain networks after subthalamic gene therapy for Parkinson's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(49): p. 19559-64.
20. Carbon, M. and D. Eidelberg, *Modulation of regional brain function by deep brain stimulation: studies with positron emission tomography*. Curr Opin Neurol, 2002. **15**(4): p. 451-5.
21. Feigin, A., et al., *Metabolic correlates of levodopa response in Parkinson's disease*. Neurology, 2001. **57**(11): p. 2083-8.
22. Su, P.C., et al., *Metabolic changes following subthalamotomy for advanced Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2001. **50**(4): p. 514-20.
23. Gasmi, M., et al., *AAV2-mediated delivery of human neurturin to the rat nigrostriatal system: long-term efficacy and tolerability of CERE-120 for Parkinson's disease*. Neurobiol Dis, 2007. **27**(1): p. 67-76.
24. Kordower, J.H., et al., *Delivery of neurturin by AAV2 (CERE-120)-mediated gene transfer provides structural and functional neuroprotection and neurorestoration in MPTP-treated monkeys*. Ann Neurol, 2006. **60**(6): p. 706-15.
25. Bankiewicz, K.S., et al., *Long-term clinical improvement in MPTP-lesioned primates after gene therapy with AAV-hAADC*. Mol Ther, 2006. **14**(4): p. 564-70.
26. Forsayeth, J.R., et al., *A dose-ranging study of AAV-hAADC therapy in Parkinsonian monkeys*. Mol Ther, 2006. **14**(4): p. 571-7.
27. Tuszynski, M.H., et al., *A phase I clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease*. Nat Med, 2005. **11**(5): p. 551-5.
28. McPhee, S.W., et al., *Immune responses to AAV in a phase I study for Canavan disease*. J Gene Med, 2006. **8**(5): p. 577-88.
29. Crystal, R.G., et al., *Clinical protocol. Administration of a replication-deficient adeno-associated virus gene transfer vector expressing the human CLN2 cDNA to the brain of children with*

late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. Hum Gene Ther,
2004. **15**(11): p. 1131-54.

2.7 ANALYSIS OF SPECIFIC ABSORPTION RATE (SAR) FOR DEEP BRAIN STIMULATION LEADS IN MRI, *Leonardo Angelone and Giorgio Bonmassar*

Biomedical Engineering Department, Tufts University
Athinoula A. Martinos Center for Biomedical Imaging, Massachusetts General Hospital,
Harvard Medical School, Boston, MA, USA

2.7.1 INTRODUCTION

Tens of millions of MRI, functional MRI or multimodal investigations such as electroencephalography (EEG)/fMRI are performed every year in an increasing number of human subjects and patients. MRI, fMRI or multimodal recording may also provide invaluable diagnostic benefits for a growing number of patients, such as epilepsy or Parkinson's, currently treated with implanted neurostimulators.

Deep brain stimulation (DBS) is a surgical procedure currently used on over 30,000 patients in US to treat symptoms linked to Parkinson's disease. MRI is often the diagnostic tool of choice for monitoring many pathological changes in many Parkinson's patients with an implanted DBS system. These patients may also undergo investigational functional MRI (fMRI) (Arantes, Cardoso et al.

2006). However, the radio frequency (RF) field may produce excess heating in presence of DBS leads (Rezai, Baker et al. 2005). Unfortunately, a case of serious neurological injury from RF heating occurred recently during a clinical MRI investigation on a patient with an implanted DBS system (Henderson, Tkach et al. 2005).

The balance between clinical benefits and potential risks for the health of the human subjects opens important scientific challenges, where technologically advanced engineering tools need to be properly synthesized with the knowledge of biophysical mechanisms regulating the human body. MRI is considered a non significant risk device when used within specific operational conditions; one of such conditions is to maintain the levels of RF energy absorbed by the human body during recordings below levels that may lead to adverse thermal effects. Over the past years, the clinical need for improved signal quality, spatial resolution and speed has pushed the scientific community toward the use of ultra high-field MRI (UHF-MRI), namely 3T and even 7T. At the RF frequencies required for UHF-MRI novel tools are required to properly model and systematically evaluate the biophysical parameters affecting RF - dosimetry in the human body.

Given the known relationship between SAR and heating

(Collins, Liu et al. 2004), the effects of DBS lead resistivity were evaluated in terms of specific absorption rate (SAR). The goal of this study was to perform a systematic SAR analysis and propose novel technological solutions for MRI recording performed in patients with DBS leads. For this purpose, original models of human head with intracranial leads were designed and implemented in numerical electromagnetic simulations. In the case of DBS leads in the human head used during MRI, the interactions between leads and the RF-field are expected to produce local peaks of electric field, hence SAR, near the lead (NCRP 1981). Such local peaks depend on different variables, including dimensions, orientation, shape, and composition of the implant/electrode as well as the heterogeneous electrical properties of the human head (Gabriel, Gabriel et al. 1996), as confirmed by numerical and experimental studies (Chou, McDougall et al. 1997; Ho 2001; Armenean, Perrin et al. 2004).

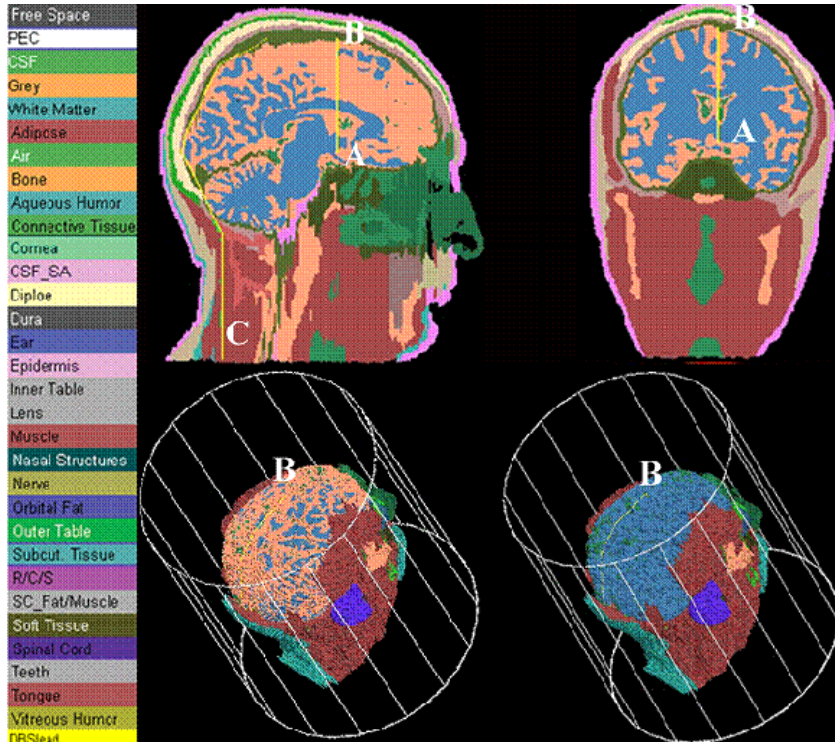


Figure 1. 2D and 3D view of head model with a co-registered DBS implant (yellow). (Bottom) 3D views of the head model and DBS implant, with illustrative view of internal tissues (Angelone and Bonmassar 2007)

2.7.2 METHODS

Numerical simulations based on the FDTD algorithm (Kunz and Luebbers 1993) were performed on an anatomically fine-grained head model (Angelone, Tulloch et al. 2005) with

electrical properties selected as in literature (Gabriel, Gabriel et al. 1996). Simulations were conducted using a birdcage RF coil (Fig. 1) (Angelone, Potthast et al. 2004) at a frequency of 128 MHz - 3 T. Following the standard setup for DBS implant (Henderson, Tkach et al. 2005), a DBS implant was modeled as a thin wire connected to the left sub-thalamic nucleus (Fig. 1A). The implant was oriented vertically through the brain, tunneled around the skull (Fig. 1B), and placed between the dura and bone, exiting at the base of the neck (Fig. 1C). The total length of the lead was 613 mm. Four different values of lead resistivity were evaluated: $\rho_{\text{lead}} = 1.67 \cdot 10^{-8}$ (ρ_{copper}), 10^{-5} , 10^{-3} and $1 \Omega \text{ m}$. Whole-head, peak 1g and 10 g averaged SAR (IEC 2002) were computed using the XFDTD software (REMCOM Co., USA) and values were normalized to 1 W of input power (Makris, Angelone et al.).

2.7.3 RESULTS

Overall, simulation results confirmed that the resistivity of the DBS leads influenced both whole-head and peak SAR values. The DBS lead induced high values of SAR for low lead resistivity (ρ_{lead} equal to ρ_{copper}); SAR decreased as lead resistivity increased from ρ_{copper} to

$\rho_{\text{lead}} = 1 \Omega \text{ m}$. There was a reduction in 1g averaged SAR of more than twofold when lead resistivity varied from $\rho_{\text{lead}} = \rho_{\text{copper}}$ to $\rho_{\text{lead}} = \rho_{\text{ref}}$ (see **Fig.3**).

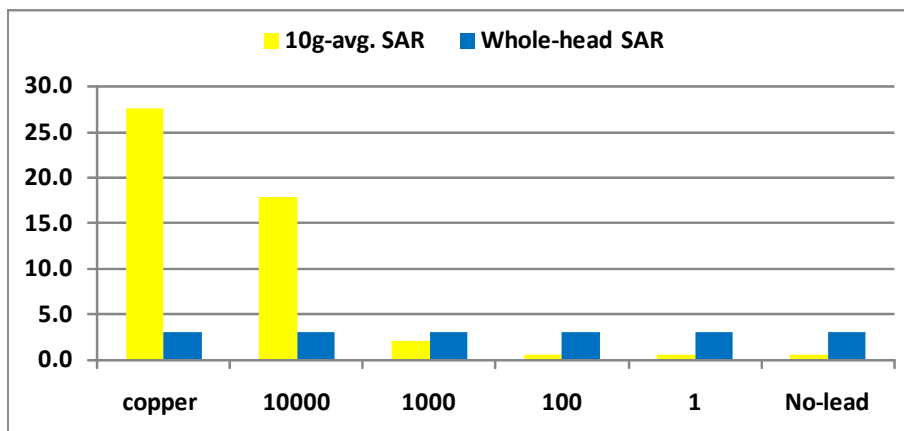


Figure 2 10g-averaged and whole-head averaged SAR estimated with the head model and DBS leads. The increase of lead resistivity allowed to reduce SAR peaks at the tip of the DBS lead

2.7.4 DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The use of a head model with high spatial resolution and high anatomical accuracy allowed for evaluation of SAR in thin head tissues. Staircasing errors of approximately 20% (Gajsek, Walters et al. 2002) may be present due to the geometry of the model. Hence, this study was performed by varying only the lead resistivity and keeping unchanged the overall geometry of head, coil, and lead.

The simulations presented in this study suggest that the SAR of the human head at 3 Tesla varies with the resistivity of the DBS lead. The SAR changes are highest for low resistivity (copper) and are minimal for high resistivity values (i.e., $\rho_{\text{lead}} > \rho_{\text{max}} \approx 0.001 \Omega \text{ m}$). New and potentially safer leads with higher resistivity can be built for instance by employing conductive ink technology (Vasios, Angelone et al. 2006). A new type of lead, the resistive tapered stripline, with low resistivity at low frequency and high resistivity at the RF frequencies has been investigated (Bonmassar 2004).

The main issue with highly resistive leads is the power deposition during normal operation. Considering that DBS systems are designed to include light and portable batteries, the power dissipated by the stimulating current must be minimized in order to extend battery life. For example, commercially available nylon-based fibers with copper coating with resistivity $\rho \approx 0.1 \Omega \text{ m}$ may produce a good protection against risk, but power dissipation in the wire of several mW (**Fig. 3**). The SAR variability with lead resistivity can therefore be interpreted as a risk/cost function: the optimal value of resistivity ($\rho_{\text{lead}} = \rho_{\text{max}}$ in **Fig. 3**) will minimize both SAR dissipation at RF and power dissipation for the DBS system.

ACKNOWLEDGEMENTS. Thank to Nikos Makris and the Center for Morphometric Analysis for the head model segmentation. We thank Emad Eskandar with suggestion on the DBS implant. Work supported by NIH R01 EB002459, P41 RR014075, and the MIND institute.

References

Angelone, L. and G. Bonmassar (2007). Effect of Deep Brain Stimulation lead resistivity on specific absorption rate at 3 T MRI. Joint Annual Meeting ISMRM-ESMRMB, Berlin.

Angelone, L., A. Potthast, et al. (2004). "Metallic Electrodes and leads in simultaneous EEG-MRI: Specific absorption rate (SAR) simulation studies." bioelectromagnetics **25**(4): 285-295.

Angelone, L. M., S. Tulloch, et al. (2005). New high resolution head model for accurate electromagnetic field computation. Thirteenth Scientific Meeting of the International Society of Magn. Reson. Med., Miami, FL, USA, Proc. Intl. Soc. Magn. Reson. Med.

Arantes, P. R., E. F. Cardoso, et al. (2006). "Performing functional magnetic resonance imaging in patients with Parkinson's disease treated with deep brain stimulation." Mov Disord **21**(8): 1154-62.

Armenean, C., E. Perrin, et al. (2004). "RF-induced temperature elevation along metallic wires in clinical magnetic resonance imaging: influence of diameter and length." Magn Reson Med **52**(5): 1200-6.

Bonmassar, G. (2004). "Resistive Tapered Stripline (RTS) in Electroencephalogram Recordings During MRI." IEEE Trans on Microw Theory and Tech **52**(8): 1992-1998.

Chou, C. K., J. A. McDougall, et al. (1997). "RF heating of implanted spinal fusion stimulator during magnetic resonance imaging." IEEE Trans Biomed Eng **44**(5): 367-73.

Collins, C. M., W. Liu, et al. (2004). "Temperature and SAR calculations for a human head within volume and surface coils at 64 and 300 MHz." J Magn Reson Imaging **19**(5): 650-6.

Gabriel, C., S. Gabriel, et al. (1996). "The dielectric properties of biological tissues: I. Literature survey." Phys. Med. Biol. **41**: 2231–2249.

Gajsek, P., T. J. Walters, et al. (2002). "Empirical validation of SAR values predicted by FDTD modeling." Bioelectromagnetics **23**(1): 37-48.

Henderson, J. M., J. Tkach, et al. (2005). "Permanent neurological deficit related to magnetic resonance imaging in a patient with implanted deep brain stimulation electrodes for Parkinson's disease: case report." Neurosurgery **57**(5): E1063; discussion E1063.

Ho, H. S. (2001). "Safety of metallic implants in magnetic resonance imaging." J Magn Reson Imaging **14**(4): 472-7.

IEC (2002). International Standard, medical equipment - part 2-33: Particular requirements for the safety of the magnetic resonance equipment for medical diagnosis, 2nd revision. Geneva, International Electrotechnical Commission 601-2-33: 29-31.

Kunz, K. S. and R. J. Luebbers (1993). The finite difference time domain method for electromagnetics. Boca Raton, CRC Press.

Makris, N., L. Angelone, et al. "MRI-based Comprehensive Anatomic Model of the Human Head." To be submitted.

NCRP (1981). Radiofrequency electromagnetic fields: properties, quantities and units, biophysical interaction, and measurement. Bethesda, MD, National Council Radiation Protection and Measurements.

Rezai, A. R., K. B. Baker, et al. (2005). "Is magnetic resonance imaging safe for patients with neurostimulation systems used for deep brain stimulation?" Neurosurgery **57**(5): 1056-62; discussion 1056-62.

Vasios, C. E., L. M. Angelone, et al. (2006). "EEG/(f)MRI measurements at 7 Tesla using a new EEG cap ("InkCap")." Neuroimage **33**(4): 1082-92.

2.8 "STIMOLAZIONE ELETTRICA E MAGNETICA DEL SISTEMA NERVOSO: L'ESEMPIO DEL DEEP BRAIN STIMULATION", Micaela Liberti, Fernando Maggio, Alessandra Paffi, Francesca Apollonio,, Guglielmo D'Inzeo

Dipartimento di Ingegneria Elettronica,
Università di Roma 'La Sapienza'

2.8.1 Introduzione

Un passo fondamentale verso l'ottimizzazione dei dispositivi biomedicali basati sulla stimolazione elettrica del Sistema Nervoso Centrale (SNC) consiste nella comprensione dei meccanismi di interazione tra campo elettrico e cellule neuronali. Pertanto, la metodologia seguita è la stessa già utilizzata negli studi di interazione bioelettromagnetica e si basa su un approccio che integra diversi livelli di complessità biologica, da quello atomico a quello macroscopico [1], [2]. Attraverso studi dosimetrici viene valutata la distribuzione di campo elettromagnetico (EM) all'interno del soggetto biologico esposto, campo che, a sua volta, rappresenta un ingresso dei modelli biofisici con i quali si analizzano gli effetti dell'interazione ad ogni livello di complessità biologica. Nel caso

specifico, l'indagine si pone ai livelli più alti della scala biologica e in particolare a livello di singolo neurone e di rete neuronale.

Per la comprensione dei meccanismi d'azione delle tecniche di stimolazione cerebrale di uso clinico, la ricerca viene articolata in due fasi.

La prima fase consiste nella messa a punto di un modello elettromagnetico a bassa frequenza delle strutture anatomiche coinvolte dalla stimolazione e nel calcolo del potenziale elettrico indotto. Successivamente, si passa ad affrontare il problema relativo alla modellizzazione biofisica delle strutture neuronali interessate, al fine di valutare gli effetti della suddetta stimolazione.

2.8.2 La Deep Brain Stimulation

La deep brain stimulation (DBS) è una tecnica di stimolazione del cervello per il trattamento e la cura del morbo di Parkinson, il cui utilizzo in ambito clinico registra una crescita costante di anno in anno (attualmente 10.000 pazienti/anno) [3].

La malattia di Parkinson si manifesta in una iperattività di strutture anatomiche poste in prossimità del talamo e sotto la zona corticale, che prendono il nome di nuclei ganglio-basali. La causa di tale iperattività risiede nella degenerazione cronica e progressiva del

livello di dopamina, neurotrasmettitore responsabile del controllo dei movimenti corporei, dando così luogo, macroscopicamente, a sintomi quali tremore, rigidità, instabilità posturale [3], [4].

La tecnica della DBS consiste nell'inserimento permanente di elettrodi nella zona dei nuclei basali in modo tale che il campo elettrico, generato da una stimolazione con segnali alle centinaia di Hertz, interferisca con i percorsi elettrici tra le diverse zone cerebrali (talamo-corticali) attenuando i sintomi parkinsoniani e permettendo, inoltre, un ottimo controllo degli effetti collaterali (distonia, discinesia, difficoltà del parlato, freezing della marcia) [5], [6].

Senza dubbi, uno dei principali vantaggi della tecnica è l'ampia percentuale di successi registrati (circa il 70% dei pazienti denuncia la 'scomparsa' della malattia [7], [8]), a fronte però di una applicazione clinica empirica dovuta proprio alla scarsa conoscenza dei meccanismi alla base del fenomeno di stimolazione. Pertanto, risulta necessario colmare tale gap, a partire dall'analisi degli aspetti più critici da un punto di vista funzionale:

- scelta del target di stimolazione;
- posizionamento e proprietà dell'elettrodo;
- parametri di stimolazione del segnale;
- proprietà elettriche dei tessuti.

2.8.3 *Il modello elettromagnetico e il problema dosimetrico*

Il punto di partenza consiste nella messa a punto di un modello elettromagnetico rappresentativo della zona cerebrale stimolata di forma quadrata e/o rettangolare (box model). Con l'ausilio di immagini provenienti da un atlante stereotassico 2-D [9], è stato messo a punto un modello NeuroAnatomico (NAT) del target di stimolazione che la pratica clinica individua nel nucleo sub-talamico (STN) [10], [11]. Tale regione è risultata la più adatta alla stimolazione sia per quanto riguarda gli effetti benefici che il controllo di quelli indesiderati [12], [13]. L'STN è un piccolo nucleo circondato da tessuto modellizzato come materia bianca che, recenti studi identificano come mezzo anisotropo [14], [15]. L'STN e il resto delle strutture anatomiche sono modellizzati come materia grigia con proprietà isotrope [14].

Il modello di elettrodo è basato su quello costruito e commercializzato dalla MedTronic [16], in quanto è l'unico che, attualmente, ha l'approvazione della Food and Drug Administration (FDA) per l'applicazione in ambito clinico, e presenta quattro contatti che possono essere attivati anche contemporaneamente. L'esperienza clinica individua la stimolazione unipolare quale la più

efficace, pertanto avremo un solo contatto attivo ad un potenziale pari a -1 V [17], [18].

La soluzione del problema elettromagnetico è ottenuta utilizzando il software commerciale Comsol Multiphysics v.3.2 (Comsol Inc), basato su tecniche numeriche agli elementi finiti [19], e risolvendo l'equazione di Laplace nel caso quasi-statico, viste le frequenze tipiche del segnale DBS (120 – 180 Hz) [20]. Tuttavia, la dipendenza del problema dalla frequenza è tenuta in conto attraverso una conducibilità complessa e l'analisi è svolta per una frequenza pari a 120 Hz [21].

Gli osservabili elettrici sono rappresentati dal potenziale elettrico, il cui valore è poi usato come un ingresso dei modelli biofisici neuronali, e dalla funzione di attivazione (AF), definita come la derivata seconda spaziale del potenziale stesso [22] e usata in letteratura per predire le regioni di depolarizzazione e iperpolarizzazione neuronale. Essa fornisce, quindi, una indicazione quantitativa della forza dello stimolo nell'eccitare o meno una fibra nervosa [23], [24].

Un'analisi è stata condotta per valutare gli effetti delle dimensioni del box e del posizionamento del ground sulla distribuzione degli osservabili precedentemente definiti. In particolare, il ground è stato

posto, sia su tutto il contorno del dominio di analisi (whole boundary) che su un solo lato (base side) [25].

Gli effetti sul potenziale sono stati valutati basandosi su mappe isopotenziali ricavate al variare delle dimensioni del box e della posizione del ground. Gli effetti sulla AF sono stati esaminati valutando e la distribuzione spaziale attorno al contatto attivo e la distribuzione lungo linee verticali rappresentative di una orientazione della fibra nervosa, in tal caso parallela all'elettrodo.

L'analisi dei risultati mostra che la dimensione del box influenza la distribuzione sia del potenziale elettrico sia della funzione di attivazione all'interno del NAT, e che gli effetti più evidenti si osservano in condizioni di 'whole boundary'. Pertanto, è possibile affermare che un box di dimensioni almeno 50 x 50 cm 'base side' permette di ridurre al minimo la variabilità nella stima delle quantità elettriche indotte nella regione stimolata [21].

La necessità di rappresentare meglio l'eterogeneità dei tessuti coinvolti dalla stimolazione ha portato alla realizzazione di un modello 3-D del target anatomico (in collaborazione con l'ISIB-CNR di Milano), con il quale è possibile valutare realisticamente l'effetto dell'anisotropia e non omogeneità dei tessuti [26], dell'impedenza

[27] e capacità dell'elettrodo [28], della frequenza e durata dello stimolo sulla distribuzione del potenziale elettrico indotto [29].

2.8.4 *Modelli biofisici della struttura neuronale stimolata.*

Risolto il problema dosimetrico, si può affrontare la modellizzazione biofisica delle strutture neuronali coinvolte, dove il campo EM precedentemente calcolato rappresenta uno degli ingressi del sistema. Dalla messa a punto di reti neuronali adatte per i target biofisici individuati, diventa possibile ricostruire gli effetti che portano all'efficacia terapeutica della tecnica, analizzando i parametri di interesse e individuando le caratteristiche principali per una corretta stimolazione cerebrale.

In particolare, da precedenti attività del gruppo di ricerca, si è osservato come il fenomeno della risonanza stocastica (SR) ottimizzi la codifica neuronale di un segnale elettromagnetico [30]. A partire dalla singola cellula nervosa, descritta con un modello circuitale alla Hodgkin-Huxley (H-H), il potenziale stimato dagli studi dosimetrici è stato simulato come un generatore di tensione sovrapposto alla tensione di membrana. Nelle equazioni descrittive del modello si è introdotto un termine di rumore, rappresentativo dell'attività dei canali ionici e delle sinapsi, come un generatore di corrente gaussiana bianca in parallelo alla capacità di membrana. La

rilevabilità del campo EM è stata valutata in termini di rapporto segnale-rumore (SNR) dell' uscita in funzione dell'intensità di rumore D (varianza D nell'intervallo $[0 \div 20] \mu\text{A}^2/\text{cm}^4$), per diversi valori di frequenza e ampiezza del segnale EM. Le curve così ricavate mostrano un andamento a campana tipico del fenomeno della SR, cioè la presenza di una particolare intensità di rumore che massimizza la codifica del segnale EM nell'output neuronale [30].

Dunque, l'idea è quella di sfruttare tale fenomeno in prospettiva biomedicale: un rumore esogeno sovrapposto al segnale può ottimizzare la stimolazione elettrica attraverso il meccanismo della SR [31].

L'utilizzo di modelli multi-compartmentali, in grado di tener conto delle diverse morfologie neuronali (piramidale, stellato, ecc.) e di riprodurre diversi pattern spazio-temporali dell'attività neuronale (firing, bursting), può portare ad approfondire gli aspetti legati alla determinazione della soglia di attivazione dei processi neuronali indotti dalla stimolazione, gli effetti sulla soglia bursting–firing e, più in generale, il meccanismo di stimolazione cerebrale.

Bibliografia

- [1] Apollonio F., Liberti M., D'Inzeo G., Tarricone L., *Integrated models for the analysis of biological effects of EM fields used for mobile communications*, IEEE Trans. on Microwave Theory and Techniques, Nov 2000.
- [2] Hunter P. J., Borg T. K., *Nature Reviews, Molec. Cell Biology*, 2003, vol. 4, pp. 237-243.
- [3] Pahwa R., *Understanding Parkinson's disease: an update on current diagnostic and treatment strategies*, J Am Med Dir Assoc, 2006, 7:4-10.
- [4] Smeding H.M., Esselink A.J., Schmand B., Koning-Haanstra M., Nijhuis I., Wijnalda E.M., Speelman J.D., *Unilateral pallidotomy versus bilateral subthalamic nucleus stimulation in PD: A comparison of neuropsychological effects*, J.Neurology, 2005, 252:176-182.
- [5] Benazzouz A., *Mechanism of action of deep brain stimulation*. Neurology, 2000. 55:13-16.
- [6] Yokochi F., *Effect of deep brain stimulation on FOG*, Parkinsonism and Related Disorders, 2006, 12:67-69.
- [7] Ostergaard K., Sunde N.A., *Evolution of Parkinson's Disease During 4 Years of Bilateral Deep Brain Stimulation of the Subthalamic Nucleus*. Movement Disorder, 2006, 21(5):624-631.
- [8] Parsons T.D., Rogers S.A., Braaten A.J., Woods S.P., Trösteret A.I., *Cognitive sequelae of subthalamic nucleus deep brain stimulation in Parkinson's disease: a meta-analysis*. Lancet Neurol., 2006. 5: 578-88.
- [9] Schaltenbrand G., Wahren W., *Atlas for Stereotaxy of the Human Brain*, 2nd ed., Stuttgart: Thieme, 1977.
- [10] Miocinovic S., Parent M., Butson C.R., Hahn P.J., Russo G.R., Vitek J.L., McIntyre C.C., *Computational analysis of subthalamic nucleus and lenticular fasciculus activation during therapeutic deep brain stimulation*, J Neurophysiol., 2006, 96(3):1569-1580.
- [11] Zonenshayn M., Sterio D., Kelly P.J., Rezai A.R., Beric A., *Location of the Active Contact Within the Subthalamic Nucleus (STN) in the*

- Treatment of Idiopathic Parkinson's Disease*, Surg.Neurol., 2004, 62:216-226.
- [12] Lozano A.M., Mahant N., *Deep brain stimulation surgery for parkinson's disease: mechanisms and consequences*, Parkinsonism and Related Disorders, 2004, 10:49-57.
- [13] Kuncel A.M., Grill W.M., *Selection of stimulus parameters for deep brain stimulation*, Clin. Neurophysiol., 2004, 115(11):2431-2441.
- [14] Gabriel C., Gabriel S., Corthout E., *The dielectric properties of biological tissues: I. Literature survey*, Phys. Med. Biol., 1996, 41:2231-2249.
- [15] Güllmar D., Haueisen J., Eiselt M., Gießler F., Flemming L., Anwänder A., Knösche T. R., Wolters C. H., Dümpelmann M., Tuch D. S., Reichenbach J. R., *Influence of Anisotropic Conductivity on EEG Source Reconstruction: Investigations in a Rabbit Model*, IEEE Trans. on Biom. Eng., 2006, 53(9).
- [16] Medtronic DBSTM *Implant Manual 2006: lead kit for deep brain stimulation*.
- [17] McIntyre C.C., Mori S., Sherman D.L., Thakor N.V., Vitek J.L., *Electric field and stimulating influence generated by deep brain stimulation of the subthalamic nucleus*, Clinical Neurophys., 2004, 115:589-595.
- [18] Kuncel A.M., Cooper S., Montgomery E.B., Baker K.B., Rezai A.R., Grill W.M., *Clinical response to varying the stimulus parameters in deep brain stimulation for essential tremor*. Mov. Dis., 2006, 21(11):1920-28.
- [19] McIntyre C.C., Grill W.M., *Finite element analysis of the current-density and electric field generated by metal microelectrodes*, Ann. Biomed. Engin., 2001, 29(3):227-235.
- [20] Volkmann J., Herzog J., Kopper F., Deuschl G., *Introduction to the Programming of Deep Brain Stimulators*, Movement Disorder Society, 2002, 17(3):181-187.

- [21] Liberti M., Apollonio F., Paffi A., Parazzini M., Maggio F., Novellino T., Ravazzani P., D'Inzeo G., *Fundamental Electrical Quantities in Deep Brain Stimulation: Influence of Domain Dimensions and Boundary Conditions*, proceedings of the 29th Annual Int. Conf. IEEE Eng. In Med. and Biol. Soc. (EMBS), Lyon, France, Aug. 2007.
- [22] Rattay F., *Analysis of models for external stimulation of axons*, IEEE Trans. Biomed. Eng., 1986, 33:974-977.
- [23] McIntyre C.C., Savastab M., Kerkerian-Le Goffc L., Viteket J. L., *Uncovering the mechanism(s) of action of deep brain stimulation: activation, inhibition, or both*, Clinical Neurophysiology, 2004, 115:1239-1248
- [24] Butson C.R., McIntyre C.C., *Role of electrode design on the volume of tissue activated during deep brain stimulation*, J. Neural Engin., 2006, 3(1):1-8.
- [25] Liberti M., Apollonio F., Paffi A., Parazzini M., Maggio F., Ravazzani P., D'Inzeo G., *Influence of Conducting Domain and Ground Positioning in the Numerical Modeling of Deep Brain Stimulation*, submitted to IEEE Transactions on Biomedical Engineering.
- [26] Grill W.M., *Modelling the effects of electric fields on nerve fibers: influence of tissue electrical properties*. IEEE Trans.Biom.Eng., 1999, 46(8):918-928.
- [27] Butson C.R., Maks C.B., MacIntyre C.C., *Sources and effects of electrode impedance during deep brain stimulation*, Clinical Neurophys., 2006, 117(2):447-454.
- [28] Butson C.R., McIntyre C.C., *Tissue and electrode capacitance reduce neural activation volumes during deep brain stimulation*, Clinical Neurophysiol., 2005, 116(10):2490-2500.
- [29] McIntyre C.C., Grill W.M., *Extracellular stimulation of central neuorns: influence of stimulus waveform and frequency on neuronal output*, J.Neurop., 2002, 88:1592-1604.

- [30] Gianni M., Liberti M., Apollonio F., D'inzeo G., *Modeling Electromagnetic Fields Detectability in a HH-like Neuronal System: Stochastic Resonance and Window Behavior*, *Biological Cybernetics*, February 2006.
- [31] Paffi A., Liberti M., Apollonio F., Gianni M., D'Inzeo G., *Effects of Exogenous Noise in a Silent Neuron Model: Firing Induction and EM Signal Detection*, proceedings of the 28th Annual Int. Conf. IEEE Eng. In Med. and Biol. Soc. (EMBS), New York City, USA, Sept. 2006.

2.9 L'IMAGING MOLECOLARE NEL PARKINSON: IL RUOLO CLINICO DEL DATSCAN, *Gaspare Arnone*

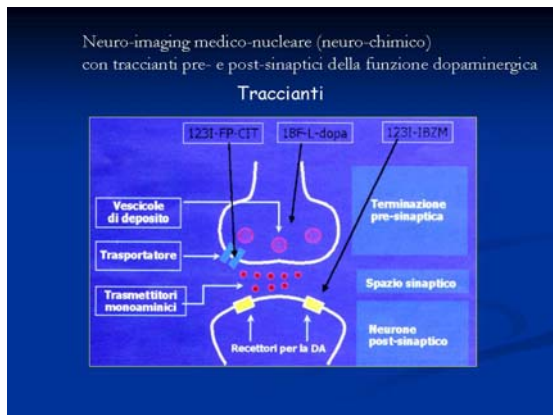
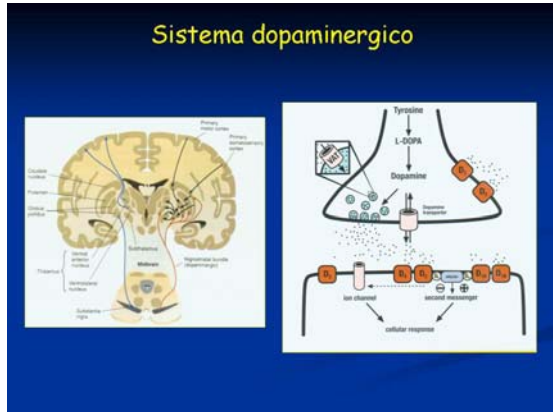
Medicina Nucleare
Azienda di Rilevo Nazionale e di Alta Specializzazione (A.R.N.A.S.) - Palermo

La Medicina Nucleare è la “Disciplina che vede l’invisibile” alla Radiologia, perché, a differenza di quest’ultima, è capace di evidenziare alterazione funzionali anche in assenza di alterazioni dell’anatomia e della struttura.

L’imaging medico-nucleare è così definito molecolare o funzionale, su base biochimica o recettoriale o immunologica o metabolica.

La somministrazione endovenosa di sostanze debolmente radioattive, chiamate radiofarmaci, con particolare tropismo verso un organo o una struttura, permette di studiare le alterazioni di una funzione (*magic o smart bullets*).

Nel caso dei disturbi del movimento, la funzione dopaminergica può essere studiata con tecniche medico-nucleari a livello sia pre-sinaptico che post-sinaptico nelle terminazioni nigro-striatali, che sono le strutture interessate.



IMAGING PRE-SINAPTICO

1) Imaging del trasportatore della dopamina (DaT)

- 123I-FP-CIT (ioflupane)

- 123I-beta-CIT
- 18F-FP-CIT
- 99mTc-TRODAT
- 123I-altropane

2) Imaging del trasportatore vescicolare

- 11C-VMAT2

3) Imaging del turnover della DA

- 18F-L-dopa

I radiofarmaci pre-sinaptici, sia con tecnica SPET che PET, consentono la diagnosi differenziale tra la malattia di Parkinson primaria o idiopatica e i parkinsonismi atipici (quali, ad esempio, la paralisi sopranucleare progressiva e l'atrofia multisistemica) *versus* i parkinsonismi secondari (psicogeno, tossico, traumatico, vascolare, da idrocefalo, etc.) e il tremore senile o essenziale.

I radiofarmaci post-sinaptici (^{123}I -IBZM) consentono, poi, di differenziare la m. di Parkinson dai parkinsonismi atipici.

Questa capacità di fornire una diagnosi accurata e precoce ha un ruolo in caso di diagnosi incerta su base clinica; infatti, in fase precoce, esiste un margine di errore di circa il 10% nel porre

diagnosi di malattia di Parkinson. Inoltre, è possibile valutare la gravità della malattia e monitorare la velocità di progressione, oltre a stimare l'efficacia della terapia neuroprotettiva.

Scelta del radiofarmaco a seconda dell'obiettivo clinico

- 1) DIAGNOSI: imaging con molti radiofarmaci (requisiti: buon rapporto tumore/fondo per *stima qualitativa*)
- 2) FOLLOW-UP e 3) STIMA della RISPOSTA alla TERAPIA: necessità di *quantificazione* accurata e riproducibile, specie nel secondo caso (requisiti: radiofarmaci a cinetica lenta: non indicati radiofarmaci positrone-emittenti o altropane); infatti:
 - a) la progressione è molto lenta e spesso con variabilità interindividuale (il rate medio di perdita del segnale è circa il 5-11% *per annum*, con modeste variazioni a seconda del "target" biologico pre-sinaptico misurato);
 - b) l'eventuale azione neuroprotettiva comporta una riduzione (presumibilmente il 35-40%) di tale velocità di progressione.Dunque, sono davvero modeste le variazioni quantitative che documentano la progressione di malattia e, a maggior ragione, l'eventuale effetto protettivo.

2.9.1 *Stima quantitativa*

Necessità di trials ben disegnati :

- a) corretta selezione (età, etc.) e numero dei pazienti;
- b) timing tra lo studio di base (ex-ante) e quello successivo o post-intervento (ex-post);
- c) standardizzazione delle condizioni generali del paziente: ad esempio, una diversa idratazione può influenzare uptake e wash-out striatale, già variabili individualmente;
- d) standardizzazione della tecnica di esecuzione dell'esame: difficoltà di misura se si procede con singola acquisizione, a tempo prefissato.

Il tutto per evitare che alterazioni del segnale possano dipendere da “altro” rispetto al target biologico da misurare, cioè la densità dei siti del DaT.

PROPRIETA' FARMACOCINETICHE di alcuni radiofarmaci per l'imaging del DaT

Per una accurata stima quantitativa necessitano più misure, rese possibili da radiofarmaci a maggiore T1/2 Effettivo, con sia il T1/2

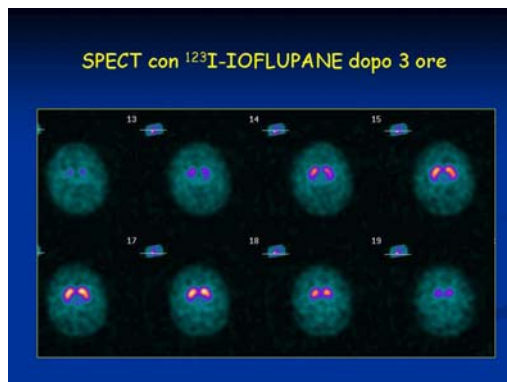
Fisico sia il T1/2 Biologico più lunghi (radiofarmaci a cinetica più lenta, nei quali, cioè, la fase di wash-out sia prolungata).

**PROPRIETA' FARMACOCINETICHE di alcuni RF per
L'IMAGING del DaT**

	¹²³ I-beta-CIT	¹²³ I-PP-CIT	^{99m} Tc-TRODAT	¹²³ I-altropan
Time peak uptake	Protratto	Rapido 2-3 h	Rapido 2-3 h	Rapido 0.5-1 h
Fase di wash-out	Prolungata	Prolungata	Intermedia	rapida
Affinità di legame al Dat	1.4 nM K _i	3.5 nM K _i	9.7 nM K _i	6.62 nM IC ₅₀
Selettività DAT/SERT	1.7 : 1	2.8 : 1	26 : 1	28 : 1
Rapporto tissutale T/B	Alto	Alto	Basso	Basso

La SPET recettoriale che studia la funzione pre-sinaptica utilizzando lo ioflupano (tracciante gamma-emittente) prende il nome di DaTSCAN.

- Legame specifico a livello della membrana pre-sinaptica
- Legame aspecifico ai trasportatori della serotonina (SERT) e della norepinefrina



Necessità di:

- corretta selezione dei pazienti
- accurata standardizzazione

Interferenze farmacologiche

* Non interferiscono con la captazione di ioflupane:

levodopa, amantidina, selegina, budipina, metoprololo, propranololo, piramidone, benrexol

dopamino-agonisti e dopamino-antagonisti (azione sui recettori D₂ post-sinaptici)

E' necessario, comunque, valutare in modo conclusivo gli effetti di terapie di breve durata e ad alte dosi con dopamino-agonisti e l-dopa/carbidopa.

* Interferiscono con la captazione del radiofarmaco i farmaci che si legano al trasportatore della dopamina (anfetamine, cocaina, benzotropine, bupronione, metilphenidati)

Ruolo clinico dello ¹²³I-Ioflupane:

§ 1) **DIAGNOSI** più accurata e precoce: valore aggiunto vs
“gold standard” clinical diagnosis in fase precoce

(errore:10%)

- Conferma o esclusione di S. Parkinsoniana clinicamente

sospetta (*d.d. M. di Parkinson idiopatica/parkinsonismi*

atipici vs parkinsonismi secondari e tremore

senile/essenziale);

- Diagnosi precoce di S. Parkinsoniana (ad es. forme ad esordio
tremorigeno isolato)

- Diagnosi anche in stadio preclinico (screening di II livello in
popolazione ad alto rischio): una finestra aperta sul futuro?

*Infatti, in pazienti. emiparkinsoniani si rileva una riduzione
bilaterale dell'uptake (circa*

*40-50% controlateralmente e circa 20-30% ipsilateralmente vs
volontari sani di*

età compatibile).

§ **2) FOLLOW UP:** valutazione della gravità della malattia (disease status) e monitoraggio della velocità di progressione.

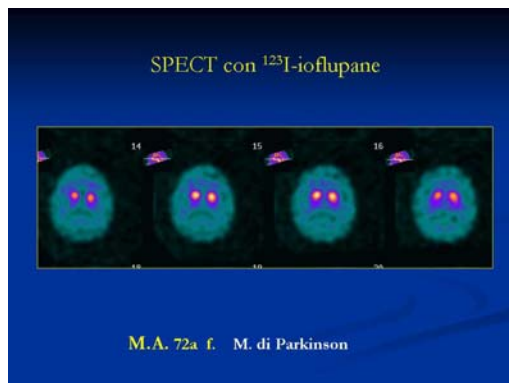
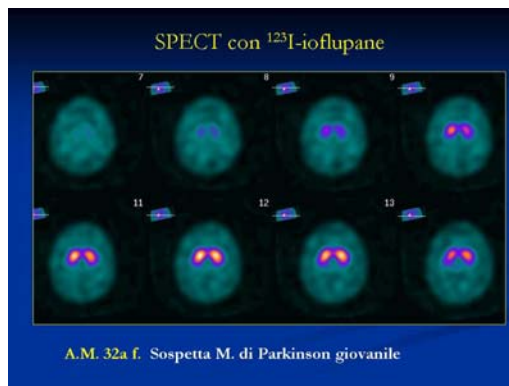
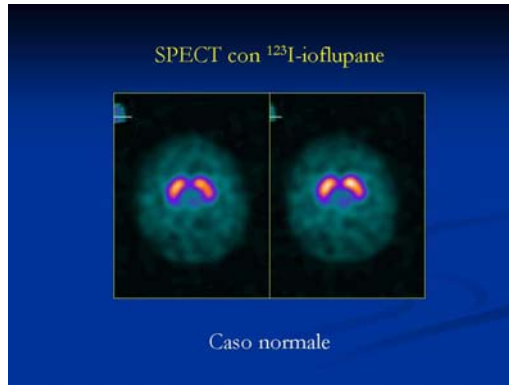
§ **3) VALUTAZIONE dell'EFFICACIA della TERAPIA** (“neuroprotezione”)

- “spazio”: stima clinica inficiata dall'impossibilità di un completo wash-out farmacologico

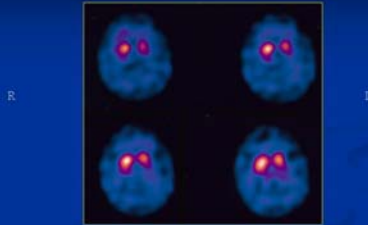
TRIALS CLINICI completati:

- 1) studio CALM-PD
(123I-beta-CIT; dopamino-agonista: pramipexolo)
- 2) studio REAL-PET
(18F-DOPA; dopamino-agonista: rapirinolo)

caveat: valutazione è possibile nel singolo paziente? quale il timing ottimale?

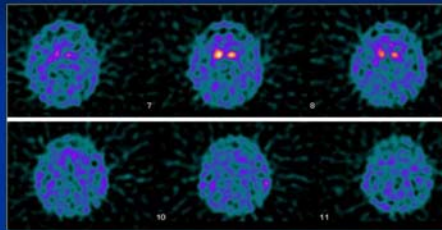


SPECT con ^{123}I -ioflupane



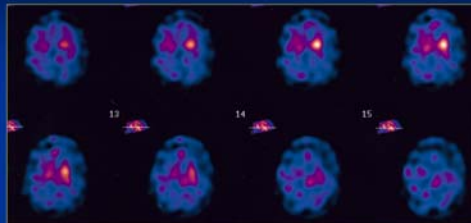
V.G. 68 aa. m.: Sindrome Parkinsoniana
monolaterale (uptake alterato controlateralmente;
a volte anche ipsilateralmente)

SPECT con ^{123}I -ioflupane

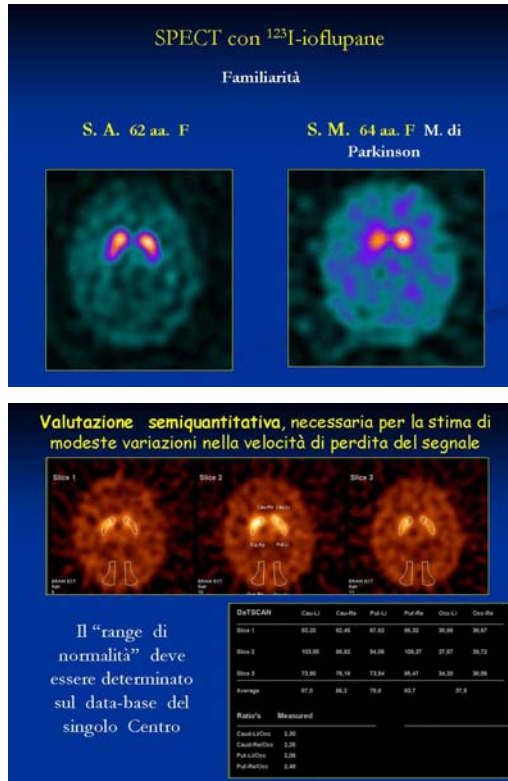


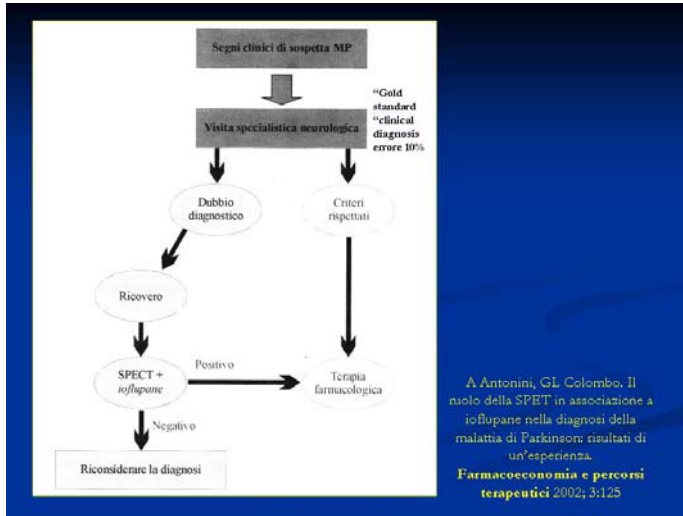
S.P. 64 aa. F. M. di Parkinson in fase avanzata

SPECT con ^{123}I -ioflupane



C. A. 82aa m. Sindrome Parkinsoniana bilaterale
cl clinicamente più marcata a sinistra





Infine, è opportuna una considerazione di economia sanitaria. Bisogna considerare come i cambiamenti nella gestione clinica dei pazienti con parkinsonismo clinicamente incerto comportino consistenti risparmi, conseguenti all’abbattimento dei tempi di degenza.

E’, dunque, un esame che risponde alle “tre E” di un test, cioè a criteri di efficacia, di efficienza e di economicità.

	Diagnosi tradizionale	Diagnosi SPECT + iofupane	Differenziale
Ricoveri 2000 ¹	10.340	-----	-----
Ricoveri a scopo diagnostico	3.102 ²	3.102	0
Degenza media ³	10,32	3,0	- 7,32
Giornate complessive di degenza per ricoveri a scopo diagnostico	32.013	9.306	- 22.707
Costi diretti di degenza (in euro) per ricoveri a scopo diagnostico ⁴	6.978.756	2.028.708	- 4.950.048

*1. dati Ministero della Salute pubblicati sito www.sanita.it
2. stimati al 30% in fase di prima diagnosi
3. dati Regione Lombardia pubblicati al sito www.sanita.regione.lombardia.it
4. stimato per costo medio giornaliero di 218 euro (costo medio dei soli costi diretti, personale, farmaci, altri beni sanitari e non, prestazioni intermedie richieste ad altri servizi, in un campione di Neurologie di ospedali lombardi, anno 2001).*

Antonini, GL Colombo. Il ruolo della SPET in associazione a iofupane nella diagnosi della malattia di Parkinson: risultati di un'esperienza 2002 ; 3:125

Studio internazionale in corso

- “A multicentre, randomised, open label, comparative Phase 4 trial to assess changes in clinical management after DaTSCAN imaging of subjects with clinically uncertain parkinsonism in a general neurologist setting” (Studio clinico multicentrico di fase IV, randomizzato, in aperto, comparativo, per valutare i cambiamenti dopo esame con DaTSCAN nella gestione clinica dei soggetti con parkinsonismo clinicamente incerto in un dipartimento di neurologia)

CONCLUSIONI

- Continuo aggiornamento, sia dei Clinici che degli Specialisti dell'imaging;

- L'evoluzione delle conoscenze fisiopatologiche e la disponibilità di nuove metodiche e nuovi radiofarmaci rendono indispensabile una maggiore integrazione di competenze e linguaggio;
- Ricadute nella pratica clinica (nuove applicazioni);
- Iter diagnostico-clinici validati (protocolli, Linee guida) in un'ottica cost-effectiveness; indicazioni ad un uso corretto (appropriatezza) delle indagini: quando e come richiedere, come refertare;
- Ruolo delle Società scientifiche, Fondazioni, etc.

2.10 I DISTURBI DEL SONNO NELLA MALATTIA DI PARKINSON, *Rosa maria Gaglio, Giacomo Gurgone*

U.O. di Neurologia, Az. Ospedaliera S. Giovanni di Dio - Agrigento

La presenza di concomitante patologia del sonno, come parte integrante del complesso sintomatico della malattia di Parkinson (MP), non è una acquisizione recente. James Parkinson già nella prima descrizione della malattia pose una discreta enfasi sulla presenza di disturbi del sonno, e in particolare sulla presenza di sonnolenza diurna. Nonostante ciò, tali aspetti estremamente invalidanti e peggiorativi della qualità di vita dei pazienti hanno ricevuto un'attenzione relativamente scarsa fino a tempi recenti. Attualmente sono catalogati, insieme ai disturbi psichici e disautonomici tra le complicanze non motorie della MP (1).

La genesi dei disturbi del sonno nella MP è riferita allo stesso processo degenerativo che invade le strutture profonde dell'encefalo, in particolare del tronco encefalico: allorché si ha l'interessamento delle aree rilevanti per la regolazione del sonno possono presentarsi i primi segni di disturbo o disgregazione del sonno, a volte precocemente rispetto alla comparsa della sintomatologia motoria (2). Nella MP stabilizza i disturbi del sonno

sono da riferire ad alterazioni dell'architettura del sonno(3,4), alla riemergenza dei disturbi motori durante le ore notturne, al concomitante instaurarsi di disturbi respiratori, ai segni iniziali riferibili all'instaurarsi di complicanze psichiche (depressione in particolare o demenza) (7). I disturbi di tipo respiratorio che interferiscono sulla qualità e continuità del riposo notturno, sono dati in particolare da anomalie del tono dei muscoli delle vie aeree superiori (discinesie della glottide e delle strutture sopraglottiche con chiusura intermittente) non corrette dalla L-DOPA, da apnee centrali, o da apnee ostruttive, da ipoventilazione episodica. Inoltre occorre tenere in considerazione l'importanza che rivestono come fattori disturbanti extraneurologici l'eventuale presenza di problemi di natura ortopedica, internistica, cardiologia, urologia, o legate all'uso stesso dei farmaci generali e parkinsoniani (8).

In generale si distinguono disturbi tipici della fase iniziale, e disturbi caratteristici della fase di stato della MP. Tra i primi si distinguono: difficoltà ad addormentarsi, risveglio precoce al mattino, sonnolenza diurna, riduzione della durata del sonno. Tra i secondi: acinesia notturna, frammentazione del sonno, veglia intra-sonno, crampi notturni dolorosi e distonia, nicturia. Gli studi polisonnografici hanno evidenziato nella MP le seguenti alterazioni dell'architettura del sonno (6):

- Drastiche riduzioni degli stadi 3 e 4 del sonno lento, e del sonno REM
- Riduzioni degli spindles e delle onde lente del sonno NREM

Infine è da tenere in considerazione che i disturbi motori della MP sono attenuati, ma non completamente aboliti durante il sonno (8). Il tremore in particolare può ricomparire a tratti negli stadi di sonno leggero 1 e 2, o in concomitanza con risvegli, micro-risvegli, movimenti corporei e anche durante le scariche di movimenti oculari rapidi (sonno REM).

I disturbi del sonno “specifici” connessi alla condizione parkinsoniana o parkinsonismo, sono rappresentati da:

- I movimenti periodici degli arti
- Il disturbo del comportamento durante sonno REM
- La sindrome delle gambe senza riposo

Nel periodo osservazionale di circa due anni presso il nostro ambulatorio dedicato ai disturbi motori sono stati seguiti 64 pazienti con MP o parkinsonismi, di età compresa tra 54 e 82 anni, che hanno presentato una concomitanza di disturbi del sonno.

METODI

I pazienti che riferivano disturbi del sonno presentavano le seguenti caratteristiche: a. appartenevano per la maggior parte alla fascia di età più avanzata; b. presentavano spesso concomitanza di patologie specifiche di tipo internistico, o disturbi della sfera psichica (depressione, demenza); c. la MP era spesso in uno stadio avanzato.

La valutazione complessiva e specifica dei disturbi del sonno ha utilizzato i seguenti metodi diagnostici:

- Cartella clinica ambulatoriale dedicata
- Diario giornaliero
- Questionari
- Test neuropsicologici

La valutazione della EDS si è avvalsa dell'utilizzo del questionario di auto-somministrazione.

RISULTATI

La distribuzione nel campione e la tipologia dei disturbi ipnici è schematizzata nella tabella 1, mentre la distribuzione per sesso, età e patologia è visualizzabile nel grafico 1.

TAB. 1 - Distribuzione nel campione dei disturbi del sonno	
ASSENZA DI DISTURBI DEL SONNO	21

DISTURBI DEL SONNO REM	2
SINDROME DELLE GAMBE SENZA RIPOSO	3
ECESSIVA SONNOLENZA DIURNA	4
INSONNIA	34

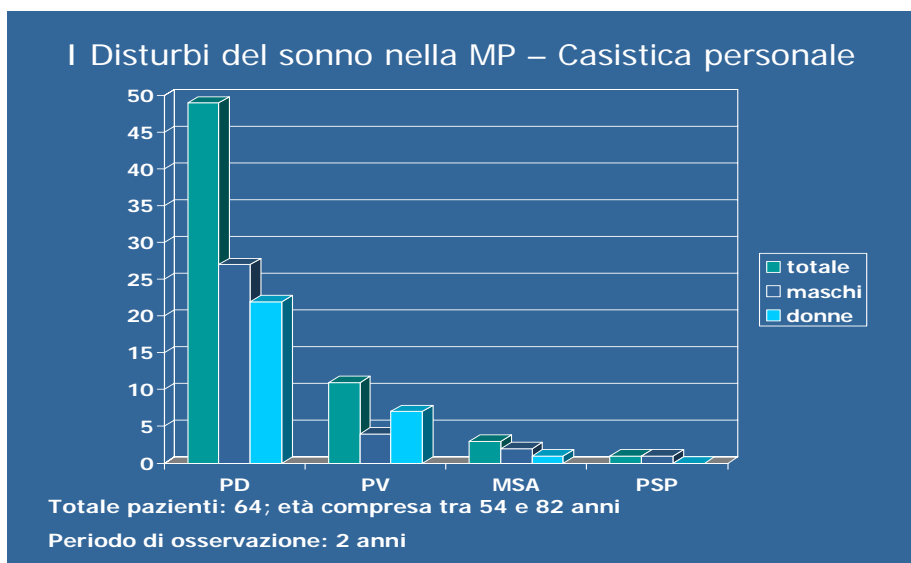


Grafico n. 1.

I farmaci dopaminergici si sono rivelati utili nell'andamento della sindrome delle gambe senza riposo, specie se associati al clonazepam. Nei disturbi del sonno REM (RBD) i migliori risultati si sono ottenuti con il clonazepam.

L'insonnia in fase iniziale è stata trattata con i consueti precetti di igiene del sonno, e valutando la comorbilità psichiatrica (eventuale depressione, presenza di turbe allucinatorie...).

L'eccessiva sonnolenza diurna è stata trattata modificando il dosaggio e il "timing" delle somministrazioni.

In caso di discinesie notturne, da sovradosaggio di dopamina, che disturbavano il sonno è stato utile ridurre il dosaggio di L-DOPA serale.

Nella PD avanzata, trattata con alti dosaggi di L-DOPA, è stato necessario trattare farmacologicamente l'insonnia.

I farmaci utilizzati sono schematizzati nella tabella 2.

Categoria farmacologica	Molecola	Osservazioni
Benzodazepine	<i>Triazolam</i> <i>Clonazepam</i> <i>Zolpidem</i>	farmaci da usare con cautela nelle persone anziane
Antidepressivi triciclici	<i>Amitriptilina a basso dosaggio</i>	Da usare con cautela, considerati gli effetti collaterali cardiaci e anticolinergici
Antidepressivi atipici	<i>Mirtazapina</i>	A basso dosaggio (15 mg) e considerata

		tollerata ed efficace
Antipsicotici atipici	<i>Clozapina</i> <i>Quiapina</i>	Utili nel caso di allucinazioni, anche provocate da L-DOPA; la clozapina va titolata lentamente e monitorata. Non utilizzare mai alti dosaggi

Tab. 2

CONCLUSIONI

La terapia con farmaci antiparkinsoniani ha poca influenza sui disturbi del sonno associati alla M. di Parkinson e ai Parkinsonismi.

I farmaci antiparkinsoniani e in particolare la L-DOPA influiscono certamente sull'andamento del ritmo sonno veglia, che risulta comunque influenzato da svariati fattori, tra cui quelli legati allo stadio di malattia, i disturbi non motori concomitanti, le comorbidità internistiche, la demenza.

BIBLIOGRAFIA

1. Askenasy JJM: Sleep in Parkinson's disease. Acta Neurol. Scand, 87: 167, 1993.
2. German D.C., Manaye KF, White CL et al.: Disease-specific patterns of locus coeruleus cell loss. Ann. Neurol. 32: 667, 1992.

3. Vanderheyden JE: Restless legs syndrome and nocturnal myoclonus in Parkinson's disease. *Mov. Disord.*, 11:101, 1996.
4. Wetter TC, Seidel VC, Scheidmann K, Trenkwalder C: A comparative polysomnographic study of patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Sleep Res.*, 26: 604, 1997.
5. van Hilten B., Hoff JI, Middelkoop HA et al.: Sleep disruption in Parkinson's disease. Assessment by continuous activity monitoring. *Arch. Neurol.* 51:922, 1994.
6. Hening W, Rolleri M, Chokroverty S: Parkinson's disease patients have impaired sleep quality and frequent sleep complaints. *Sleep Res.* 25:418, 1996
7. Menza MA, Rosen RC: Sleep in Parkinson's disease. The role of depression and anxiety. *Psychosomatics* 36:262, 1995.
8. Currie LJ, Bennett JP, Harrison MB et al.: Clinical correlates of sleep benefit in Parkinson's disease. *Neurology* 48:1115, 1997.

2.11 EFFETTI DELLA MODULAZIONE CEREBELLARE SULLA CORTECCIA MOTORIA DI PAZIENTI CON DISTONIE FOCALI, Romano M*, Brighina F, Giglia G, Cosentino G, Panetta ML, Puma A, Saia V, Fierro B

Dipartimento Universitario di Neuroscienze Cliniche, Università degli Studi di Palermo
*A.O. Villa Sofia CTO, Palermo

2.11.1 Introduzione

Nei pazienti affetti da distonia sono state descritte alterazioni dell'eccitabilità della corteccia motoria. In particolare, è stata riscontrata una ridotta efficienza dei circuiti inibitori intracorticali ed un difetto di integrazione sensori-motoria (De Fazio et al. 2007; Quartarone).

Recentemente inoltre, sulla base delle seguenti evidenze, è stato ipotizzato che oltre i gangli della base anche il cervelletto possa svolgere un ruolo nella patogenesi della distonia (Jinnah ed Hesse, 2006; Le Ber et al 2006),

1. prominente atrofia cerebellare in assenza di alterazioni dei gangli della base in una famiglia di pazienti distonici Le Ber et al (2006)
2. evidenze autoptiche e di neuro-immagine di alterazioni del cervelletto o delle sue afferenze (ponte, bulbo, midollo spinale, oliva inferiore) nella maggior parte di casi di distonia secondaria; è stato

evidenziato un deficit della neurotrasmissione eccitatoria delle fibre rampicanti, che originano nell'oliva inferiore, sulle cellule di Purkinje; a) La disfunzione olivocerebellare può alterare la fisiologia e la topografia metabolica dei circuiti strio talamo corticali B) la comparsa di distonia cervicale, sebbene legata ad una anomalia primaria olivocerebellare, può richiedere interazione tra i circuiti olivocerebellari e strio-talamocorticali. (Le Doux et al 2002)

3. presenza di distonia come manifestazione clinica rilevante nelle atassie spinocerebellari, incluse le forme in cui le alterazioni anatomo-patologiche sono confinate al cervelletto (Manto 2006).

4. evidenza di alterazione funzionale cerebellare insieme a quelle dei gangli della base nelle distonie primarie (Eidelberg et al 1998).

5. evidenze a favore di un ruolo causale delle alterazioni cerebellari nelle distonie in modelli sperimentali:

a. in un modello genetico di distonia parossistica nel topo, la selettiva ablazione delle cellule di Purkinje anomale interrompeva la distonia determinando atassia (Campbell et al. 1999)

b. l'applicazione di farmaci eccitotossici (acido cainico) nella corteccia cerebellare del topo normale è in grado di determinare

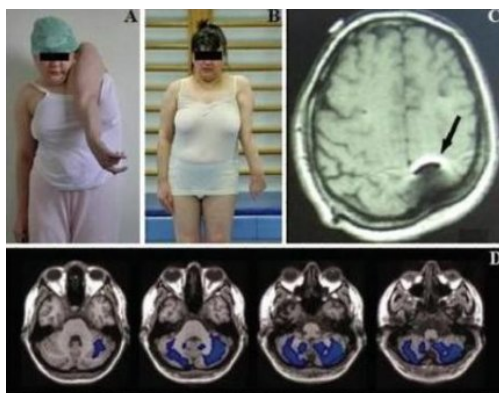
distonia : l'attivazione neuronale rivelava infatti espressione mRNA c-fos nel cervelletto, nel locus ceruleus e nel nucleo rosso (Pizoli et al 2002).

6.sono state dimostrate, attraverso immagini morfometriche RMN, anomalità nelle strutture cerebrali interconnesse alle rete sensorimotoria incluso il cervelletto e la rappresentazione corticale dell'area affetta. Come il cervelletto sia implicato nella patofisiologia della distonia non è chiaro. Recentemente nella scimmia è stata rivelata una via di connessione tra il cervelletto e i gangli della base. Ciò suggerisce un 'interazione delle due strutture nel controllo del movimento. A tale meccanismo patofisiologico può aggiungersi anche una plasticità maladattativa in risposta ad una sostenuta ripetitiva attivazione sensorimotoria della mano distonica.(Delmaire et al 2007)

7.Studi PET durante interventi di stimolazione del globo pallido interno in pazienti con Distonia fissa (rara condizione in cui posture distoniche fisse non ritornano alla posizione neutrale a riposo)hanno evidenziato un significativo ridotto metabolismo nel cervelletto e nessun incremento nel metabolismo corticale . La stimolazione motoria corticale a bassa frequenza si pensa attivi i neuroni corticali

modulando le vie corticopontocerebellari e corticopallidotalamocorticali.

La significativa riduzione bilaterale del metabolismo di glucosio cerebellare durante la stimolazione corticale, suggerisce un effetto modulante sulla funzione cerebellare.



La eliminazione selettiva dell'output cerebellare migliora la distonia in animali da esperimento. Alternativamente un modificato flusso cerebellare alla corteccia motoria può determinare una riorganizzazione plastica della rappresentazione corticale del movimento si da produrre una migliore funzione motoria

Sia i gangli della base che il cervelletto , strutture chiavi nel controllo motorio, possono essere quindi coinvolte nelle varie manifestazioni di Distonia .

Sono ben note nell'uomo le connessioni tra cervelletto ed area motoria ed è stato anche dimostrato che la stimolazione magnetica transcranica (SMT) del cervelletto è in grado di esercitare effetti modulatori sulla corteccia motoria controlaterale (Daskalakis et al 2004; Fierro et al 2006; Ugawa et al. 1995)

Scopo del nostro studio è stato indagare, tramite l'impiego della SMT, le influenze modulatorie del cervelletto sui circuiti intracorticali motori in pazienti con distonia focale dell'arto superiore valutando anche eventuali differenze tra lato affetto e lato sano.

2.11.2 Materiale e metodi

Abbiamo studiato 5 pazienti affetti da distonia focale (3M/2F; età media: 35 ± 6.2 anni) e 6 soggetti di controllo sani di pari età e sesso. Le caratteristiche cliniche dei pazienti sono riportate nella tabella 1.

Tabella 1

D.S.	Età	Sesso	Tipo di distonia	Lato affetto	Durata malattia
CG	30	F	distonia del musicista (pianista)	DX	4 anni
D.S.	30	M	distonia del musicista (chitarrista)	SN	5 anni
MA	27	M	distonia del musicista (chitarrista)	DX	4 anni
L R	44	M	crampo dello scrivano	DX	2 anni
ML	43	F	crampo dello scrivano	DX	6 anni

Stimolazione magnetica transcranica (SMT)

Tutti i soggetti in condizione di riposo sono stati sottoposti ad un paradigma SMT di condizionamento cerebellare (Ugawa et al 1995) in cui uno stimolo erogato sull'emisfero cerebellare era seguito a distanza di 7 msec da uno stimolo test sull'area motoria controlaterale. In tale paradigma, il condizionamento cerebellare determina una significativa soppressione della risposta motoria. Nel nostro studio abbiamo anche valutato gli effetti del condizionamento cerebellare sull'eccitabilità dei circuiti motori intracorticali esaminando l'inibizione intracorticale a breve latenza (SICI) e la facilitazione intracorticale (ICF).

Procedura per il condizionamento cerebellare:

Stimolo cerebellare:

Sede: 2 cm inferiormente e lateralmente all'inion (Brighina et al 2006)

Intensità: 5% inferiore alla soglia motoria per stimolazione del tratto piramidale

Coil: focale, raffreddato ad acqua alimentato da stimolatore Cadwell

Stimolo area motoria:

(7 ms dopo lo stimolo condizionante cerebellare):

Sede: area motoria controlaterale in corrispondenza dell'“hot spot” per il muscolo abduuttore breve del pollice.

Coil: focale Magstim alimentato da due stimolatori a singolo impulso
Magstim connessi tramite modulo Bistim

Due condizioni di stimolo:

a: Singolo impulso

Intensità: tale da elicitare un MEP d'ampiezza 700-1000 microV

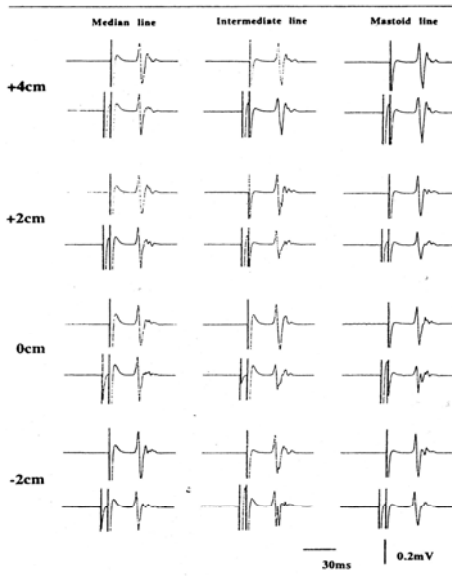
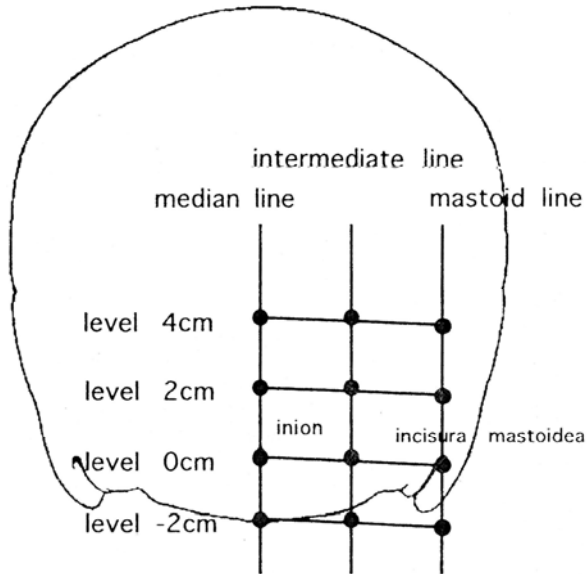
b: Doppio stimolo:

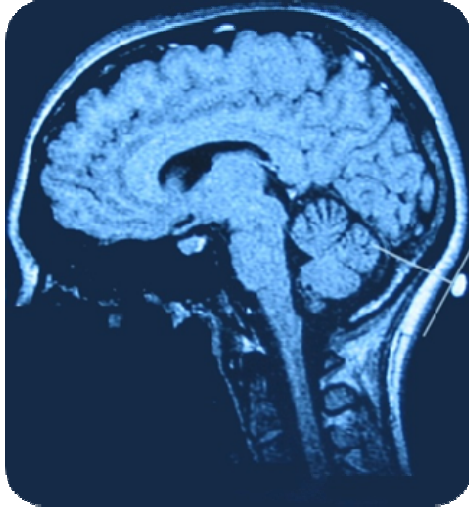
Intensità: I° stimolo (condizionante): 80%SM;

II° stimolo (test): intensità idonea ad indurre MEP di 700-1000 μ V

2 intervalli interstimolo: 2 msec: SICI; 10 msec: ICF

I valori di SICI ed ICF vengono espressi come % d'ampiezza del corrispondente MEP test





Nei pazienti e nei controlli sani, sono stati esaminati il MEP test e SICI ed ICF dell'area motoria dx e sin prima e dopo condizionamento dell'emisfero cerebellare controlaterale.

Per ogni condizione di stimolazione (MEP test, SICI, ed ICF, prima e dopo condizionamento) sono state effettuate 8 ripetizioni per ogni lato di stimolazione in sequenza random. Anche l'ordine del lato di stimolazione (corteccia dx e sin) è stato randomizzato

SICI ed ICF e MEP test prima e dopo condizionamento nei pazienti e nei controlli sono stati comparati tramite ANOVA per misure ripetute.

2.11.3 Risultati

MEP test:

In condizione di base:

non si evidenzia alcuna significativa differenza del MEP test tra controlli e pazienti e nel gruppo dei pazienti tra lato affetto e lato sano

Dopo condizionamento cerebellare:

nei controlli si evidenzia un effetto inibitorio sul MEP test;

nei pazienti distonici invece non si osserva alcuna significativa riduzione d'ampiezza del MEP test sia sul lato affetto che su quello sano (fig. 1a e 1b).

2.11.3.1 SICI ed ICF

Considerata la sovrapponibilità dei dati nei controlli i valori medi dei due lati sono stati confrontati separatamente con ciascun lato dei pazienti

In condizioni di base:

non si evidenziano significative differenze tra i due gruppi, per quanto una riduzione (seppure non significativa) del SICI è apprezzabile nei pazienti distonici.

Dopo condizionamento cerebellare:

nei controlli si apprezza una riduzione del SICI che si approssima alla significatività statistica, ed un significativo incremento dell'ICF(inibizione della inibizione intracorticale da parte del cervelletto quindi facilitazione)

nei pazienti non si evidenzia invece alcun significativo effetto di modulazione sui parametri di eccitabilità intracorticale motoria (vedi fig. 2a e 2 b)

2.11.4 *Discussione*

In analogia con i dati della letteratura in condizioni di base è stata osservata una ridotta inibizione intracorticale nei pazienti rispetto ai

controlli (l'assenza di significatività potrebbe essere dovuta all'esiguo numero di osservazioni).

Nei controlli il condizionamento cerebellare determina effetti di modulazione della corteccia motoria consistenti in soppressione del MEP test ed incremento dell'eccitabilità intracorticale (Daskalakis 2004).

Nei distonici invece il condizionamento cerebellare non induce alcun effetto di modulazione né sul MEP test né sui parametri di eccitabilità corticale

Nessuna differenza prima e dopo il condizionamento cerebellare si osserva tra lato affetto e lato sano dei pazienti.

Tali dati sembrano supportare il ruolo del cervelletto nella patogenesi delle distonie focali.

Bibliografia

Brighina F, Daniele O, Piazza A, Giglia G, Fierro B. Hemispheric cerebellar rTMS to treat drug-resistant epilepsy: case reports. *Neurosci Lett.* 2006. 397:229-233.

Campbell DB, North JB, Hess EJ Tottering mouse motor dysfunction is abolished on the Purkinje cell degeneration (PCD) mutant background. *Exp Neurol* 1999 160: 268-278

Daskalakis ZJ, Paradiso JO, Christensen BK, Fitzgerald PB, Gunraj C, Chen R. Exploring the connectivity between the cerebellum and motor cortex in humans, *J Physiol*. 2004; 557: 689-700.

Delmaire C, Vidaihet M., Elbaz A. et al , Structural abnormalities in the cerebellum and sensorimotor circuit in writer's cramp , *Neurology* 69 July 2007 : 376-380

De Fazio G, Berardelli A, Hallett M. Do primary adult-onset focal dystonias share aetiological factors. *Brain* 2007, 130: 1183-1193

Eidelberger D, Moeller JR, Antonini A. Functional brain networks in DYT1 dystonia. *Ann Neurol* 1998; 44: 303-312

Le Ber I, Clot F, Vecueil L et al. Predominant dystonia with marked cerebellar atrophy: a rare phenotype in familial dystonia. *Neurology* 2006; 67:1769-1773

Le Doux MS, Brady KA. Secondary cervical dystonia associated with structural lesions of the central nervous system. *Mov Disord* 2002; 18: 60-69

Manto MU. The wide spectrum of spinocerebellar ataxias (SCAs). *Cerebellum* 2005; 4: 2-6

Pizoli CE, Jinnah HA, Billingsley MI, Hess EJ Abnormal cerebellar signaling induces dystonia in mice. *J Neurosci* 2002; 22: 7825-7833.

Ugawa Y, Uesaka Y, Terao Y, Hanajima R, Kanazawa I (1995) Magnetic stimulation over the cerebellum in humans. *Ann Neurol* 37:703-713.

Romito L.M., Franzini A., Perani D, Carella F, Marras C., Capus L., Garibotto V., Brogli G., Albanese A. – Fixed dystonia unresponsive to pallidal stimulation improved by motor cortex stimulation *Neurology* 68 875-876

Fig. 1 a

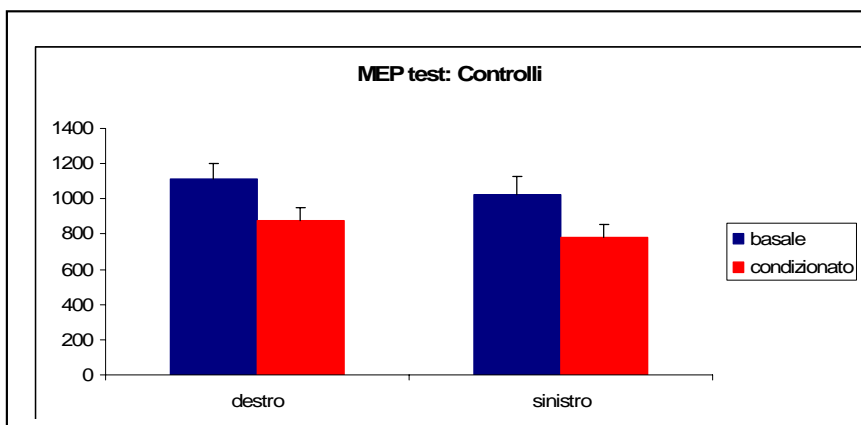


Fig. 1 b

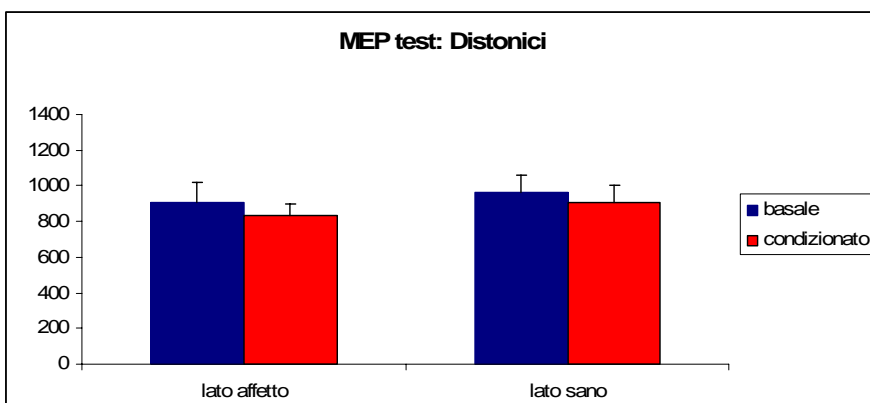


Fig 2 a

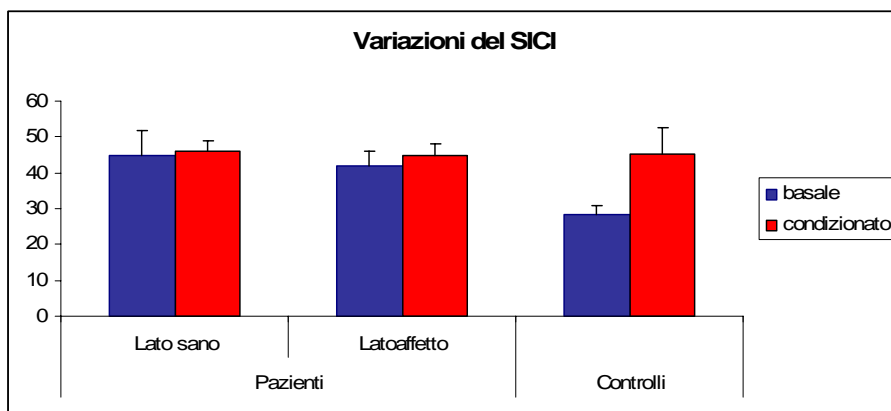
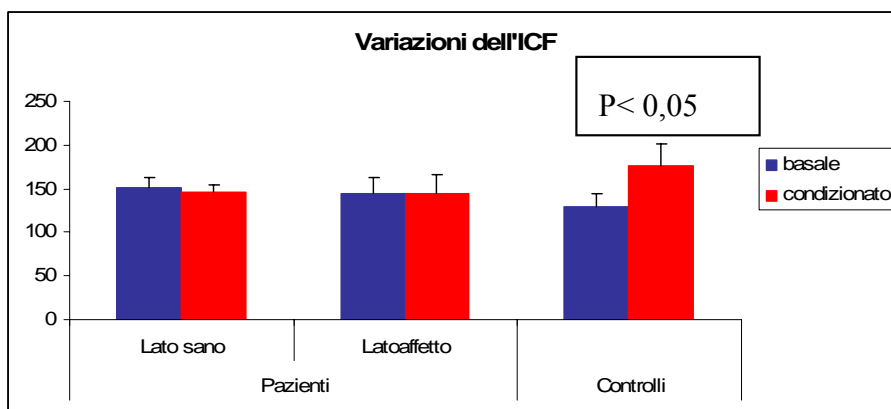


Fig 2b



La ricerca clinica tra scienza ed etica

3.1 LA RICERCA CLINICA TRA SCIENZA ED ETICA, *Ina Siviglia*

Antropologia Teologica Facoltà Teologica di Sicilia

Il tema della ricerca scientifica, medica in particolare, costituisce uno degli argomenti più attuali e delicati del nostro tempo in quanto è in gioco la salute, l'integrità e la dignità della persona umana.

Il "tra", posto nello spazio che intercorre tra la scienza e l'etica, dice la necessità di una espressa riflessione a monte sul senso e sul valore della ricerca, in modo tale che la scienza non annulli o non assorba in sé il profilo etico che ha una grande rilevanza e fonda alcune esigenze irrinunziabili.

Avendo come oggetto l'uomo, la ricerca non può non porsi l'obiettivo alto di osare in tutta quella vasta area di sperimentazione che può condurre ad un graduale progresso, qualche volta a qualche salto di qualità, con una costante attenzione, anzi preoccupazione a non oltrepassare alcuni limiti che ci si impone di volta in volta, perchè la ricerca potrebbe ledere la dignità e il valore della persona. Da qui lo sviluppo, che andrebbe ancora incoraggiato, a tutti i livelli della bioetica come ambito di ricerca comune tra scienziati e studiosi di morale.

In realtà l'uomo è costituito nell'universo come il valore più alto di tutto ciò che esiste e questo può essere universalmente riconosciuto da tutti, indipendentemente dal fatto di essere credenti o non credenti. Alla luce di questo, che può essere considerato un presupposto condiviso, si può operare su quella piattaforma comune, nella quale si riconosce la diversità e profondità del mistero umano, rispetto agli altri esseri viventi, e si può lavorare di comune accordo per ridefinire di volta in volta quei confini che permettono di ricercare con serenità di coscienza.

Le affermazioni fin qui formulate acquistano ancora più spessore e forza per quanti, essendo credenti nel Dio di Gesù Cristo, rinvengono nell'uomo, con gli occhi della fede, un essere "creato ad immagine e somiglianza di Dio", portatore dunque di una dignità sacra ed inviolabile.

Per chi crede, tale impronta divina esiste nell'uomo sin dal suo concepimento e perdura fino all'ultimo istante della sua vita, anche quando tale immagine dovesse apparire opaca o perfino irriconoscibile, a causa di handicap fisico o mentale, o per la perdita della coscienza o in stadi terminale di malattie gravissime.

Apprezzo moltissimo l'obiettivo di questa fondazione nata per i malati di Parkinson, la sua opera e la sua progettualità.

Essa si propone lo scopo di studiare, prevenire e curare una malattia che, per il fatto che perdura nel tempo, richiede una sensibilità umana e una attenzione del tutto particolare, rivolte alla cura della qualità della vita e alla gestione sanitaria e sociale del problema.

La nostra comunità civile risulta, per tanti versi, ancora piuttosto inadeguata e miope rispetto ad un problema che tocca ormai, in virtù del prolungamento della vita, numerosissimi cittadini.

La fondazione si è assunta il compito non facile di sensibilizzare le istituzioni e gli organi competenti per far sì che essi contribuiscano ad un migliore inserimento familiare e sociale di tali individui. Ciò esige un investimento economico e politico di maggiori risorse per migliorare la qualità di vita dei tanti uomini e donne che soffrono di questo disturbo così diffuso.

3.2 LA RICERCA CLINICA TRA SCIENZA ED ETICA NELLA MALATTIA DI PARKINSON, Antonina Argo - Stefania Zerbo

Medicina Legale Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Medicina Legale, Università degli Studi di Palermo.

I recenti interventi normativi relativi ai “grandi temi” della biomedicina, lambendo l’area dell’etica di inizio e fine vita, rendono sempre attuale la riflessione sui rapporti tra ricerca scientifica ed i valori ad essa connessi, in coerenza ad una riflessione deontologica ovvero riferiti al sistema delle “norme” legali. In quanto tale, l’interesse per l’etica riguarda ogni uomo (ben al di là ed indipendentemente delle stesse appartenenze culturali o religiose), e mira complessivamente ad una utilizzazione delle conoscenze e delle capacità tecniche **conforme alla dignità umana, parametro di riferimento fondamentale autorevolmente riaffermato dalla Convenzione Europea sui diritti dell’uomo e la biomedicina.**

La fondamentale riflessione che crediamo di poter sviluppare nel presente contribuito attiene l’obbligo –ineludibile- del medico, del ricercatore, dello scienziato, di interrogarsi dinanzi ai *gradi temi*;

secondariamente, di riaffermare la “responsabilità della scienza”; da ultimo, ma non per importanza, di guardare con vigore all’etica della responsabilità dichiarata del ricercatore come momento fondamentale delle strategie decisionali nell’ambito della ricerca scientifica. Nell’ambito dell’etica clinica, il tema del rapporto con la ricerca scientifica clinica è stato fra i primi ad essere sistematicamente trattato sotto il profilo dei limiti di liceità morale ed a trovare, dopo la seconda guerra mondiale, una autorevole regolamentazione etica di principio, attraverso le dichiarazioni di Norimberga e di Helsinki.

Cionostante, è sempre più diffusa l’evidenza che considerare i profili etici nell’ambito della sperimentazione e della ricerca possa essere avvertito, in molti casi, e secondo certi luoghi comuni, come un mero limite, tollerato con difficoltà, all’espandersi della scienza. In realtà un simile modo di pensare è del tutto fuorviante: l’accento, infatti, deve essere posto sull’esigenza di **orientare l’attività scientifica in favore dell’uomo, globalmente considerato nella sua veste di persona.** Anzi, oggi sussiste la consapevolezza, secondo una nota affermazione, che se si realizzasse tutto ciò che tecnicamente è possibile fare, l’uomo finirebbe per autodistruggersi. Perciò l’etica, lungi dall’essere un onere per la scienza, è una vera e propria condizione per il suo sviluppo e per il futuro stesso dell’uomo, il “caso serio” della vita.

Ponendosi al crocevia fra diverse esigenze etiche, la sperimentazione assume un valore paradigmatico: è necessaria al progresso della scienza medica, nell'interesse dei malati di oggi e di domani, restando nel contempo sottoposta alla regola minima di qualsiasi attività sanitaria: *primum non nocere*.

Nella valutazione della ricerca è essenziale distinguere fra sperimentazione su persone malate e su volontari sani, nonché - soprattutto - fra sperimentazione a scopo terapeutico, intesa a curare il soggetto che ad essa si sottopone, e sperimentazione puramente clinica, intesa alla conoscenza in sé dei dinamismi e degli effetti di nuovi farmaci o tecniche terapeutiche. Presupposto etico basilare dell'attività sperimentale è la **intangibilità della vita** ed in genere **dell'integrità psico-fisica del soggetto interessato**. Se infatti il principio di solidarietà può rendere accettabili taluni sacrifici personali, mai il sacrificio potrebbe deliberatamente costituire un danno permanente per un certo individuo. Se esiste un **principio di totalità** nella sfera terapeutica individuale, secondo cui un organo o una funzione può essere sacrificato per la sopravvivenza dell'intero organismo, ciò non vale certamente nel rapporto fra individuo e società: non può operarsi alcun bilanciamento fra il valore di ciascun individuo e vantaggi effettivi o presunti per la collettività. Essendo in gioco, comunque, un sacrificio personale o, in ogni caso, il ricorso ad

uno strumento terapeutico non ancora confermato nella sua affidabilità, sarà sempre necessario, da parte di ciascun soggetto coinvolto nella sperimentazione, uno specifico consenso liberamente espresso (di regola per iscritto) e debitamente informato: salvo, in sede terapeutica, il ricorso ad un farmaco innocuo e comunque già utilizzabile sull'uomo, in presenza del consenso complessivo alla terapia, e salvo il caso dello stato di necessità. Va infatti sempre considerato eticamente ammissibile, con riguardo a quest'ultima ipotesi, il ricorso ad una terapia che possa costituire una ragionevole chance estrema di salvezza per il paziente, altrimenti perduto.

Più in generale, in sede terapeutica il rischio connesso alla utilizzazione di una terapia sperimentale andrà pur sempre valutato in rapporto ai possibili benefici per la salute del paziente, mentre nel caso di mera sperimentazione clinica dovrà sussistere, rispetto ad un rischio quanto più possibile contenuto, nonché, comunque, lieve, un vantaggio prevedibilmente significativo per la scienza medica.

Ne deriva quale ulteriore ed ovvio prerequisito etico di qualsiasi prassi sperimentale in ambito medico la **serietà scientifica della sperimentazione e la competenza** dei soggetti cui la gestione della medesima venga affidata.

La sintesi di tale principi fondamentali dell'etica della ricerca clinica può così sintetizzarsi:

- principio di totalità nella sfera terapeutica individuale
- non può operarsi alcun bilanciamento fra il valore di ciascun individuo e vantaggi effettivi o presunti per la collettività.
- sarà sempre necessario, da parte di ciascun soggetto coinvolto nella sperimentazione, uno specifico consenso liberamente espresso (di regola per iscritto) e debitamente informato
- in sede terapeutica il rischio connesso alla utilizzazione di una terapia sperimentale andrà pur sempre valutato in rapporto ai possibili benefici per la salute del paziente
- nel caso di mera sperimentazione clinica dovrà sussistere, rispetto ad un rischio quanto più possibile contenuto, nonché, comunque, lieve, un vantaggio prevedibilmente significativo per la scienza medica

Peculiari problematiche pongono l'attività sperimentativa su soggetti minori o incapaci di consenso: da un lato non potrà escludersi il rilievo della capacità naturale, nei limiti in cui essa sussista (con il delicato interrogativo circa i casi in cui risulti necessaria una sua integrazione).

Va considerata con particolarissima cautela la **possibilità di ammettere rispetto ai soggetti indicati sperimentazioni o ricerche non immediatamente terapeutiche**, entro i limiti esclusivi in cui esse siano altrimenti impraticabili.

L'alternativa, pur autorevolmente formulata, di una totale esclusione potrebbe precludere le conoscenze necessarie per il progresso degli strumenti terapeutici riferibili ad intere categorie di pazienti incapaci, senza potersi escludere a priori, fra l'altro, effetti vantaggiosi futuri per gli stessi soggetti sui quali è effettuata la sperimentazione.

Ulteriori, rilevanti questioni sono poste allorché la sfera della libertà personale o morale del soggetto che presti il consenso non sia piena (ovvero una qualsiasi prestazione del consenso si ricolleggi a retribuzioni o vantaggi). Altresì rilevante la sperimentazione randomizzata, in doppio cieco. Una simile metodica, salvo sempre il consenso da riferirsi anche alla randomizzazione (va escluso qualsiasi inganno), non dovrà mai implicare il venir meno della copertura terapeutica non sperimentale che sia necessaria ai soggetti inseriti nel progetto. Ove, in particolare, si tratti di sperimentazione terapeutica, la sospensione delle terapie ordinarie non dovrà risultare dannosa e, dunque, il farmaco sperimentale dovrà fondatamente garantire un'efficacia non inferiore a quella della terapia già in uso. L'attuazione

di qualsiasi progetto andrebbe interrotta allorché emergessero danni riferibili all'uso del farmaco sperimentale, ma andrebbe reimpostata anche ove si rendessero anticipatamente palesi eventuali vantaggi, onde conseguire la *massima estensione dei benefici*.

Questi precetti fondamentali sono stati così illustrati (Ashley & O'Rourke, 1997):

- il rationale della ricerca deve essere importante e non deve essere ottenibile attraverso altri mezzi, la ricerca deve essere condotta da persone qualificate.
- una appopriata sperimentazione sugli animali e sui cadverì deve precedere la sperimentazione umana.
- il rischio di sofferenza o di lesione deve essere proporzionato al bene da conseguibili.
- i soggetti della ricerca devono essere selezionati così che i rischi e i benefici non siano differenti in un gruppo di società.
- Per proteggere l'integrità delle persone umane, deve essere ottenuto il consenso personale ed informato.
- In ogni momento della ricerca, il soggetto (o il testimone delle sue volontà che ha fornito il "proxy consent") deve essere libero.

TABELLA 1. Elementi del consenso informato

I. Threshold elements

(preconditions)

1. Competente

2. Voluntariness

II. Information elements

3. Disclosure (of material information)

4. Recommendation (or plan)

5. Understanding (of terms 3. and 4.)

III. Consent elements

6. Decision (in favour of a plan)

7. Authorisation (of the chosen plan)

Le necessarie informazioni richieste sono così definite:

1. indicazione dello scopo della ricerca e descrizione delle sue procedure;
2. descrizione dei prevedibili rischi e svantaggi;
3. descrizione dei benefici;
4. chiarimento delle appropriate alternative, se ve ne sono;

5. determinazione dell'estensione della confidenzialità;
6. spiegazione della disponibilità di trattamento medico per i Danni e compensazione delle disabilità prodotta;
7. indicazione dei soggetti da contattare per ricevere le risposte alle domande;
8. determinazione che la partecipazione è volontaria.

Elementi di informazione addizionale (da fornirsi se appropriati):

- rischi addizionali al soggetto o al feto se il soggetto diviene gravido;
- circostanze nelle quali la partecipazione di un soggetto può essere interrotta senza il suo/o di lei consenso;
- costi addizionali del soggetto che possono risultare dalla partecipazione;
- le conseguenze delle decisioni di un soggetto in ordine alla prosecuzione della partecipazione;
- presenza di un comitato per divulgare il significato dei nuovi sviluppi durante la ricerca;
- il numero approssimato dei soggetti che partecipano allo studio.

Una situazione assai delicata si realizza, infine, in presenza di sperimentazioni randomizzate, nell'ambito delle quali i soggetti reclutati sono suddivisi in due gruppi, di cui ignorano la distribuzione, ed il farmaco sperimentale è effettivamente utilizzato rispetto ad uno solo di essi, onde comparare i risultati. Nel caso in cui, per minimizzare le interazioni soggettive, la distribuzione sia ignorata anche dallo sperimentatore, fino al momento conclusivo dell'iter (o sia nota solo a chi abbia il controllo generale del progetto), la sperimentazione è detta a doppio cieco. Una simile metodica, salvo sempre il consenso da riferirsi anche alla randomizzazione (va escluso qualsiasi inganno), non dovrà mai implicare il venir meno della copertura terapeutica non sperimentale che sia necessaria ai soggetti inseriti nel progetto. Ove, in particolare, si tratti di **sperimentazione terapeutica, la sospensione delle terapie ordinarie non dovrà risultare dannosa** e, dunque, **il farmaco sperimentale dovrà fondatamente garantire un'efficacia non inferiore a quella della terapia già in uso.**

Ovviamente, l'attuazione di qualsiasi progetto andrebbe interrotta allorché emergessero danni riferibili all'uso del farmaco sperimentale, ma andrebbe reimpostata anche ove si rendessero anticipatamente palesi eventuali vantaggi, onde conseguire la massima estensione dei benefici.

I principi sin qui illustrati sono ampiamente presenti nella Dichiarazione di Helsinki dell'Associazione medica mondiale sulla ricerca biomedica che coinvolga individui umani (1964), dichiarazione la quale ha avuto successivi aggiornamenti nelle assemblee mediche mondiali di Tokio (1975), Venezia (1983, Helsinki II), ed Hong Kong (1989, (Helsinki IV) fino alla più recente V revisione di Edinburgo 2000 (Helsinki V). Il lungo cammino della declaratorie che attengono i principi etici in tema di sperimentazione deve senz'altro considerare il Belmont Report, edito ad opera della Commissione Presidenziale USA nel 1979.

TABELLA 2. Declaratorie internazionali

Ulteriori declaratorie inerenti la sperimentazione clinica e l'etica clinica possono dedursi da documenti sovranazionali come di seguito riportato.

Council for International Organisations of Medical Sciences (CIOMS)	<ul style="list-style-type: none"> • International Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Human Subjects (1982, 1993, 2002)
World Health	<ul style="list-style-type: none"> • Various guidelines and expert reports

Organisation (WHO)	<ul style="list-style-type: none">• Guidelines for Good Clinical Practice for Trials on Pharmaceutical Products, 1995J• Operational Guidelines for Ethics Committees that Review Biomedical Research (TDR/WHO, 2000)• Surveying and Evaluating Ethical Review Practices. A Complementary Guideline to the Operational Guidelines. (TDR/WHO, 2002)
--------------------	---

Al di là di queste regole generali, peraltro, si è posto il problema di definire l'iter necessario per giungere alla sperimentazione di farmaci sull'uomo e, successivamente, alla immissione dei medesimi nel mercato.

Già il testo di Helsinki esige previ esami di laboratorio e sperimentazioni su animali. Ma è soprattutto la Direttiva CEE n. 507 del 1991 (comprendente in allegato il testo delle **Norme europee di buona pratica clinica**) che configura un quadro sistematico di regole attinenti alla salvaguardia dei soggetti coinvolti nelle sperimentazioni, alla configurazione delle responsabilità, alla gestione dei dati, agli aspetti statistici ed al controllo della qualità

(vengono fra l'altro descritte le quattro fasi in cui sono comunemente classificate le sperimentazioni di prodotti medicinali: studi preliminari su nuovo principio attivo; studi terapeutici pilota; studi su gruppi di pazienti più numerosi; studi successivi alla commercializzazione).

TABELLA 3.

Normativa inerenti la Good Clinical Practice

International Conference on Harmonisation rules on Good Clinical Practice (in drug trials) (ICH GCP)	<ul style="list-style-type: none"> • Note for Guidance on Good Clinical Practice (1997) and several related Guidelines
United Nations Educational, Scientific and Cultural Organisation (UNESCO)	<ul style="list-style-type: none"> • Universal Declaration on Human Genome (1997) • Universal Declaration on Human Genetic Data (2004)
Council of Europe ,CoE) (especially the	<ul style="list-style-type: none"> • European Convention on Human Rights and Biomedicine (Oviedo, 1997) and the

<p>work of the Steering Committee on Bioethics (CDBI)</p>	<p>Additional Protocols to the Convention, especially the Additional Protocol on Biomedical Research (2004)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Other relevant protocols, recommendations, commissioned papers, surveys and publications
<p>European Commission (EC)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Good Clinical Practice for Trials on Medicinal Products in the European Community, Note for Guidance, iii/3976/88-en. • Directives 2001/20/EC and 2005/28/EC (on Good Clinical Practice) • Other relevant regulations, directives, notes for <i>guidance and</i> other instruments
<p>European Group of Ethics (EGE)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Several relevant Opinions
<p>European Forum for Good Clinical Practice (EF GCP)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Guidelines and Recommendations for European Ethics Committees (1997) • European Guidelines for Auditing Independent <i>Ethics</i> Committees (2001)

- | | |
|--|---|
| | <ul style="list-style-type: none">• Publications from conferences and workshops |
|--|---|

La già citata originaria GCP for Trials on Medicinal Products in the European Community è ora recepita in Italia dal decreto Min. San. 27.4.1992, il quale -integrando le disposizioni del decreto legislativo 29.5.1971, n. 178 (recepimento delle precedenti Direttive CEE nn. 65/1965, 319/1975, 570/1983 e 21/1987 in materia di farmaci) circa le documentazioni tecniche da presentare a corredo delle domande di autorizzazione all'immissione in commercio delle specialità medicinali per uso umano, come previsto dall'art. 811 - esige la conformità delle documentazioni suddette all'Allegato della Direttiva n. 507/1991, a sua volta riportando in allegato il testo delle citate *Norme europee*.

Il tema della sperimentazione propone oggi, peraltro, anche una serie di problemi bioetici non tradizionali, attinenti a nuove possibilità di intervento sulla vita umana, soprattutto nella fase prenatale. Vanno innanzitutto considerate le possibili utilizzazioni dell'embrione umano, per fini di ricerca, sperimentazione, produzione farmacologica o altro, ed in tal senso il nodo cruciale è dato dal riconoscimento del momento di inizio della vita umana e

dunque dallo statuto dell'embrione, posto che da quando sussiste un'esistenza umana non può ammettersi alcun intervento lesivo nei suoi confronti.

Ulteriore, e nuovo, elemento di tutela rispetto ad attività sperimentali è l'identità genetica umana, di cui si occupa, fra l'altro, una specifica Risoluzione approvata già nel 1989 dal Parlamento Europeo ed ulteriormente citata nella Convenzione Europea sui diritti dell'uomo e la biomedicina. In linea di principio, si ammette la gene-terapia sostitutiva di geni malati su cellule somatiche, per la cura di malattie ereditarie, mentre si preclude qualsiasi intervento di alterazione genetica o, comunque, condotto su cellule germinali. Infine, sono da considerarsi precluse sperimentazioni, anche in fase estremamente precoce, consistenti in ibridazioni uomo-animale, in predeterminazioni per fini non terapeutici di caratteristiche genetiche, in clonazioni o nella induzione di gemellanze monovulari.

I temi considerati rendono evidente la complessità dei problemi etici che insorgono in ambito sanitario: problemi che non attengono solo alle regolamentazioni di principio, bensì anche alla complessa valutazione delle esigenze rilevanti nel caso concreto.

Riguardo al campo della ricerca nel morbo di Parkinson, una recente rivisitazione delle problematiche etiche nel settore delle

neuroscienze enfatizza innanzitutto proprio la “prospettiva” del paziente, ovvero la doverosa riconsiderazione dei valori pertinenti la persona che già si sa destinata alla lunga convivenza con siffatta infermità (Ethical Issues in Clinical Neuroscience Research: A Patient’s Perspective, 2007); i concetti guida possono essere così sintetizzati: la prospettiva etica nella ricerca clinica deve riconciliare i conflitti possibili tra i differenti valori espressi dai “primary stakeholders in the process”.

E’ fondamentale caratterizzare i valori di riferimento e la motivazione di ciascuno “portatore di interesse”: gruppi di ricerca scientifica, fornitori di assistenza clinica (sovente anche i familiari), gli sponsor dell’industria ed i pazienti.

La protezione della integrità dei pazienti deve essere assicurata da un processo di regolamentazione sia nella fase preclinica che in quella clinica della ricerca, attraverso un graduale incremento della loro (dei pazienti) esposizione ai rischi della “*nuova medicina*”, ed attraverso una rigorosa valutazione degli esiti ad ogni stadio della ricerca. Si tratta, in definitiva, di una quanto più possibile rigorosa applicazione del principio di precauzione/prudenza.

Questi lavori enfatizzano, inoltre, il ruolo di piena condivisione e democratica partecipazione dei pazienti al progresso della ricerca inerente le patologie da cui sono affetti, soprattutto nel ricorso al “placebo”, che ancora presenta notevoli implicazioni etiche, così evidenziando –finalmente- il ruolo realmente propositivo della alleanza terapeutica (modello della beneficence in trust) fondata sulla informazione piena e veritiera.

Indagini mirate a migliaia di pazienti volontari arruolati nelle ricerche, evidenziano che le motivazioni preponderanti percepite sono il vantaggio della scienza e della medicina (51%), ed il conseguimento di un miglior trattamento (46%).

Le ragioni più frequentemente fornita a sostegno della partecipazioni a futuri trials sono: “se avessi una malattia terminale” (71%), “se ritenessi che il farmaco potesse servirmi da cura” (67%), e “se non vi fossero altre opzioni mediche disponibili per me” (66%).

Altrettanto importanti i risultati dello studio condotto nel 2004 dal National Institutes of Health Workshop, “Inviting Public Participation in Clinical Research: Building Trust through Partnerships”, nell’ambito del **Parkinson Pipeline Project**, di seguito illustrati.

TABELLA 4. Preferenze dei pazienti espresse nell'ambito del Parkinson Pipeline Project.

WHAT PATIENTS WANT

- Know the benefits/risks and relevance.
- Know their health and privacy are valued and safeguarded.
- Be treated as human beings.
- Be fully informed of researchers' conflicts of interest.
- Be advised of study results and post-study options
- for medical care.
- Receive interim information about study progress.
- Inclusion of patients' perspectives in planning and conducting clinical evaluations of new therapies and diagnostics.
- Development of policies and practices that accelerate treatment approvals.
- Access to experimental treatments for seriously all patients.
- Full disclosure of and access to research details and results.

- Full disclosure of conflicts of interest among the research team.
- Opportunities to educate trial participants, investigative staff, and treatment sponsors.

Nello stesso progetto si sottolinea che questi esempi forniti sono gli elementi di effettiva umanizzazione in trials clinici: la necessità di “voci autentiche” dei pazienti nelle nuove prospettive terapeutiche. I pazienti ben educati, motivati ampiamente sperano che la loro voce sia rispettata come parte integrale di ogni tappa del processo di approvazione dei farmaci. La partecipazione dei pazienti allo sviluppo ed all’approvazione delle nuove strategie terapeutiche potrebbe condurre ad un più ampio apprezzamento degli scienziati, delle autorità amministrative e degli sponsor, della urgente necessità di terapie efficaci proprio nel contesto della malattia di Parkinson.

La presente riflessione, nel contesto della ricerca nazionale deve tenere in considerazione anche la recente codificazione deontologica. Il Codice deontologico italiano, ben lontano dalla medicina difensiva, punta alla “autonomia responsabile”. Numerosi passaggi attengono il tema della ricerca e della sperimentazione clinica.

Immodificato rispetto al previgente (sugli accertamenti diagnostici e trattamenti terapeutici) è il fondamentale art.12 che tratta in generale i temi dell'autonomia prescrittiva dei farmaci (anche *off label*) da modulare sempre con la libertà (anche di rifiuto) del paziente attraverso i passaggi della competenza professionale, dell'*informazione più attenta*, dell'acquisizione del consenso.

L'art. 15 (ex 13), affrontando *i trattamenti "non convenzionali"*, rivendica la esclusiva pertinenza e responsabilità medica di ogni pratica alternativa che, comunque, non può né deve prescindere dal rispetto del decoro e della dignità professionale, né sottrarre il cittadino da trattamenti specifici e scientificamente consolidati, né esonerare il medico da "circostanziata informazione e acquisizione del consenso" e tanto meno favorire l'esercizio abusivo della professione.

L'art. 18 attiene il tema contiguo della terapia del dolore, legittimata dal fine di alleviare le sofferenze pur se incidenti sulla integrità psicofisica e sulla resistenza del malato (anche - non ci sembra illegittimo aggiungere - di fronte alla morte), nel pieno rispetto del **principio di terapeuticità dell'atto sanitario**.

Le nostre possibili riflessioni conclusive pongono enfasi al tema dell'Etica della responsabilità ("metagiuridica") dei professionisti

come impegno ed attitudine fondamentale a realizzare il maggior bene possibile per il paziente, nel rispetto delle sue volontà. Sotto prospettiva dell'Etica della virtù, si richiede impegno all'umiltà nei confronti della scienza (imperfetta ma grande; è in sé etico ricercare) e del paziente; il principio di beneficenza, si tradurrà in terapeuticità dell'atto, nella piena salvaguardia tanto dell'autonomia, quanto di quella del medico. Il modello ancora e sempre prospettabile è quello della alleanza terapeutica ("beneficence in trust").

Bibliografia

Perry D. Cohen, Linda Herman, Sheryl Jedlinski, Peggy Willocks, and Paula Wittekind, Ethical Issues in Clinical Neuroscience Research: A Patient's Perspective. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2007

Freed CR, Greene P, Breeze R, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2001;344:710–719.

McRae C, Cherin E, Yamazaki TG, et al. Effects of perceived treatment on quality of life and medical outcomes in a double-blind placebo surgery trial. *Arch Gen Psychiatry* 2004;61:412–420.

Kim SY, Frank S, Holloway R, Zimmerman C, Wilson R, Kiebertz K. Science and ethics of sham surgery: a survey of Parkinson disease clinical researchers. *Arch Neurol* 2005;62:1357–1360.

Fahn S, Elliott RA. PDF statement on Amgen's decision to block reinstatement of experimental Parkinson's treatment for trial participants. Released February 11, 2005. Available at http://www.pdf.org/Publications/Amgens_Denial_Access.pdf. Accessed March 27, 2007.

Parkinson's Disease Foundation. Parkinson's Disease Foundation expresses concern at statement on Kentucky court decision supporting Amgen's denial of patient access to GDNF. Released July 12, 2005. Available at http://www.pdf.org/Publications/Amgens_Denial_Access.pdf. Accessed March 27, 2007.

Colloca L, Lopiano L, Lanotte M, Benedetti F. Overt versus covert treatment for pain, anxiety, and Parkinson's disease. *Lancet Neur*, 2004, nov, vol 3: 679-684.

Cattorini P, Sala R, Una verità in dialogo. Storia, metodologia e pareri di un comitato di etica. Europa Scienze umane editrice, Milano, 1994.

Ghetti V, Etica nella ricerca biomedica. Franco Angeli, Milano, 1991.

Fornero G, Bioetica cattolica e bioetica laica. Bruno Mondadori, Milano, 2005.

Santuososso A, Libertà di cura e libertà di terapia. Il pensiero scientifico editore, Roma, 1998.

Santuososso A, Il consenso informato tra giustificazione per il medico e diritto del paziente. Raffaello Cortina editore, Milano, 1996.

3.3 LA SPERIMENTAZIONE CLINICA TRA SCIENZA, ETICA E POLITICHE SANITARIE, *Vittorio Crespi*

U.O. di Neurologia Ospedale Civile, Vimercate, Milano
Comitato Etico Ospedale San Gerardo, Monza

I percorsi della sperimentazione clinica sono complessi; è opportuno, in questa sede, delineare gli scenari individuando gli importanti crocevia esistenti fra scienza ed etica e accennando ad alcuni problemi emergenti.

La consapevolezza di una stretta interrelazione fra etica e scienza è maturata nell'ultimo cinquantennio in rapporto ad una serie di eventi e circostanze che possono essere così riassunti:

- Lo sviluppo del metodo sperimentale, con la definizione delle fasi della sperimentazione clinica ed il raggiungimento di un consolidato assetto statistico-procedurale
- La maturazione della bioetica come disciplina e l'affermazione dei diritti dell'uomo, in particolare il riconoscimento che l'individuo ha il diritto di autodeterminarsi in merito alla sua partecipazione a qualsivoglia tipo di pratica sperimentale. E' opportuno ricordare a questo proposito almeno due pronunciamenti

internazionali fondamentali quali la “Dichiarazione di Helsinki” adottata nel 1961 dall’Associazione Medica Mondiale ed aggiornata fino al 2004 e la cosiddetta “Convenzione Europea di Biomedicina” del 1996 in cui l’autonomia decisionale del soggetto viene solennemente riconosciuta

- L’esigenza di garanzie per il soggetto/oggetto della sperimentazione già sottolineata nel cosiddetto “Codice di Norimberga” presa di posizione ufficiale conseguita ai processi di condanna ai crimini nazisti nel 1946 e più volte riaffermata.

Un tappa importante è rappresentata nel 1979 dal cosiddetto “Belmont Report” elaborato da una apposita Commissione Presidenziale U.S.A. che definisce principi e linee guida per la ricerca biomedica: di particolare rilievo appare il richiamo ai principi eticamente rilevanti di autonomia, beneficenza, non maleficenza, giustizia oltre che la definizione di norme procedurali valide a tutt’oggi.

Il principio di autonomia rende ragione all’autodeterminazione del paziente con quanto ne consegue in termini di informazione e

consenso informato. I principi di beneficenza e non maleficenza comportano altre esigenze, nell'ordine:

- Massimizzare i benefici attesi e minimizzare i rischi della ricerca
- Porre attenzione ai prerequisiti di sicurezza derivati dalla sperimentazione animale e dalla sperimentazione umana di fase I
- Non esporre a rischi definibili come più che minimi soggetti particolarmente vulnerabili
- Prevedere ove possibile analisi ad interim dei risultati per una loro immediata applicazione in caso di successo o per un arresto della sperimentazione in caso di palese insuccesso.

Da ultimo il principio di giustizia impone la massima attenzione a non discriminare l'accesso alla sperimentazione in senso positivo o negativo, a distribuire equamente rischi e benefici, ad estendere poi ancora equamente i benefici indotti dalla sperimentazione stessa.

Se questi sono i principi generali, esistono altri riferimenti più specifici: il principio di incertezza, le norme relative all'uso del placebo, il prerequisito del significato scientifico.

Il principio di incertezza (uncertainty principle) costituisce la giustificazione etica alle procedure di randomizzazione necessarie per i trial controllati: essa appare accettabile solo se non esiste nella comunità scientifica la ragionevole convinzione che un trattamento (quello da testare) sia più efficace di un altro (quello utilizzato come controllo). Anche l'uso del placebo, frequente negli studi controllati di fase 3, è soggetto a norme che discendono in ultima analisi dai già citati principi di non maleficenza e di giustizia: in linea di principio tale uso è consentito solo se non risulta alcun trattamento consolidato da attribuire al braccio di controllo.

Possono esistere parziali eccezioni se il trattamento di controllo non appare così certo, nel qual caso ogni decisione dipende da un serie di variabili come il rischio e la durata della sperimentazione, la durata e la gravità della malattia, da valutare accuratamente caso per caso.

Particolarmente importante è il principio secondo il quale una sperimentazione non è sostenibile se essa non è dotata di valore e validità scientifica “bad science = bad ethics”. Il criterio del valore si riferisce alla rilevanza dei risultati attesi, da cui il corollario che il carico dei disagi e dei rischi indotti, va sempre ad essi commisurato. Il criterio della validità si riferisce invece alla correttezza delle procedure con cui i risultati vogliono essere raggiunti: ogni onere

indotto ai pazienti dalla sperimentazione non è giustificato se esiste un'inefficacia metodologica che pregiudichi l'ottenimento di risultati credibili.

Le revisioni scientifica ed etica della sperimentazioni non possono quindi essere nettamente separate: di conseguenza i Comitati Etici o gli organi di revisione comunque definiti considerano entrambi gli aspetti dei protocolli di ricerca.

Abbiamo finora omesso di parlare di consenso informato: si tratta in realtà dell'altro fondamentale momento etico della sperimentazione, accanto a quello della scientificità. E' interessante notare che la norma del consenso, oggi estesa a qualunque pratica medica, è stata inizialmente sanzionata proprio in pronunciamenti relativi alle sperimentazioni.

Il consenso informato è indispensabile per legittimare qualunque ricerca biomedica ed è oggi perfino scontato che chi accetta di sottoporsi ad una sperimentazione debba essere in grado di prendere una decisione libera dopo un'esauriente informazione. Superata quindi la fase di accettazione della regola generale, restano oggi problemi di tipo pratico-applicativo, oppure connessi ad alcune situazioni particolari.

In sintesi estrema, il consenso informato deve rispettare quattro condizioni fondamentali:

- La qualità della comunicazione
- La comprensione dell'informazione
- La libertà decisionale del paziente
- La capacità decisionale del paziente

Diventa perciò indispensabile utilizzare per l'informazione una terminologia chiara, semplice e comprensibile, evitando il gergo medico e spiegando i termini tecnico scientifici ritenuti indispensabili, specificando l'eventuale uso di placebo ed eventuali rischi connessi allo studio.

Tocca evidentemente allo sperimentatore esercitare un'attenta funzione di controllo perché queste regole vengano rispettate, sia in sede di preparazione che del protocollo, sia "in itinere", all'atto del reclutamento dei singoli pazienti. Una ulteriore verifica, preliminare ed in corso d'opera, è compito dei Comitati Etici. Ciò ad evitare che nella quotidianità delle sperimentazioni si vanifichino gli assunti iniziali ed il consenso venga di fatto ad essere svuotato di ogni reale significato.

Occorre infine accennare alle circostanze in cui diventa difficile ottenere un consenso pienamente valido: si tratta delle cosiddette “situazioni particolari” come il caso del paziente demente, il caso del paziente con turbe di coscienza, il caso dell’emergenza-urgenza ove falliscono le abituali modalità di raccolta del consenso.

Informare un paziente con patologia acuta in modo soddisfacente perché questi possa aderire ad una sperimentazione è già arduo a causa dello stress, della situazione emotiva, del contesto diagnostico-terapeutico indotto dall’urgenza: è del tutto impossibile se questi presenta turbe di coscienza o qualunque altro problema di comunicazione verbale. Secondo le norme di Good Clinical Practice fatte proprie dal legislatore italiano occorrerebbe in tali casi ricorrere ad un “rappresentante legalmente riconosciuto”, figura peraltro non definita nel nostro Codice se non per i minori o per gli individui interdetti legalmente. Certamente in tali casi lo studio deve poter fornire ulteriori garanzie ed è previsto un particolare impegno dei Comitati Etici nel tutelare i diritti, la sicurezza ed il benessere del soggetto.

Da ultimo va considerata la situazione dei pazienti “not competent” cioè non in grado di comprendere l’informazione preliminare al consenso, né di elaborarla in modo sufficiente per poter fornire un

consenso motivato. L'argomento è stato discusso in molte sedi: l'orientamento è che tutte le residue capacità cognitive del soggetto debbano venire utilizzate, con il supporto eventuale di una persona di fiducia del paziente, e che una sperimentazione sia comunque praticabile quando l'impegno e i rischi siano molto limitati e commisurati all'importanza dei risultati che si vogliono ottenere.

Se queste sono le situazioni, più o meno problematiche, con cui ci si deve confrontare ogniqualvolta si entri nel mondo delle sperimentazioni, non vanno dimenticati altri aspetti che si pongono ormai all'attenzione quotidiana: per esempio l'indipendenza degli sperimentatori ed i loro eventuali conflitti di interesse, la trasparenza dei dati e l'impegno alla pubblicazione senza condizionamenti, indipendentemente dai risultati ottenuti. Sono del tutto giustificate le sempre più numerose le prese di posizione, dentro e fuori la comunità scientifica, perché queste esigenze vengano rispettate appieno: anche la normativa nazionale ed internazionale si è adeguata ed è ormai fra i compiti dei Comitati Etici quello di operare le opportune verifiche.