



RAPPORTI ISTISAN 17|25

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Corso di alta formazione

Aspetti molecolari di prevenzione e salute

**Roma, Istituto Superiore di Sanità
gennaio-novembre 2016**

RELAZIONI

A cura di S. Gessani, A. Geraci, C. Ferreri



EPIDEMIOLOGIA
E SANITÀ PUBBLICA

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Corso di alta formazione
Aspetti molecolari di prevenzione e salute

Roma, Istituto Superiore di Sanità
gennaio-novembre 2016

RELAZIONI

A cura di
Sandra Gessani (a), Andrea Geraci (b), Carla Ferreri (c)

(a) Centro di Riferimento Medicina di Genere, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Centro Nazionale Salute Globale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

*(c) Istituto per la Sintesi Organica e la Fotoreattività,
Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bologna*

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Rapporti ISTISAN
17/25

Istituto Superiore di Sanità

Corso di alta formazione. Aspetti molecolari di prevenzione e salute. Roma, Istituto Superiore di Sanità. Gennaio-novembre 2016. Relazioni.

A cura di Sandra Gessani, Andrea Geraci, Carla Ferreri
2017, iii, 120 p. Rapporti ISTISAN 17/25

Questo documento riporta le principali relazioni presentate nel corso di alta formazione in aspetti molecolari di prevenzione e salute tenutosi presso l'Istituto Superiore di Sanità nel 2016. Il corso ha avuto come obiettivo primario la realizzazione di un percorso formativo finalizzato all'accrescimento delle conoscenze nel campo della medicina molecolare e allo studio dei meccanismi patogenetici alla base delle malattie di maggiore prevalenza. Sono stati affrontati aspetti riguardanti l'utilizzo delle tecnologie "omiche" nella diagnostica clinica e nella medicina personalizzata, i meccanismi cellulari e molecolari alla base dei processi patologici, e l'importanza di stile di vita, alimentazione e gestione dello stress nella prevenzione e cura della malattia. Il corso ha fornito le basi teorico-pratiche necessarie per l'utilizzo e l'integrazione di nuovi strumenti diagnostici, prognostici e terapeutici, al passo con le nuove tendenze della medicina, in un'ottica di integrazione e personalizzazione.

Parole chiave: Tecniche diagnostiche molecolari; Medicina molecolare; Medicina integrata; Stile di vita; Processi patologici

Istituto Superiore di Sanità

Advanced training course. Molecular aspects of prevention and health. Rome, Istituto Superiore di Sanità. January-November 2016. Contributions.

Edited by Sandra Gessani, Andrea Geraci, Carla Ferreri
2017, iii, 120 p. Rapporti ISTISAN 17/25 (in Italian)

This document reports the main contributions presented in the advanced training course on molecular aspects of prevention and health held at the Istituto Superiore di Sanità (National Institute of Health) in 2016. This course had as primary objective the creation of a training program aimed to the growth of knowledge in the field of molecular medicine and the study of pathogenetic mechanisms underlying the most prevalent diseases. Aspects regarding the use of "omics" technologies in clinical diagnostics and personalized medicine, cellular and molecular mechanisms underlying the pathological processes, and the importance of lifestyle, diet and stress management in the prevention and treatment of the disease were treated. The course provided the theoretical-practical bases required for the use and integration of new diagnostic, prognostic and therapeutic tools, in line with the latest trends in medicine, in a perspective of integration and customization.

Key words: Molecular diagnostic techniques; Molecular medicine; Integrative medicine; Life-style; Pathologic processes

Si ringraziano Marta Ponzi per il prezioso supporto scientifico, Rossella Di Nallo, Rosario Internullo e Veronica Michetti per il supporto tecnico.

Per informazioni su questo documento scrivere a: sandra.gessani@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Gessani S, Geraci A, Ferreri C (Ed.). *Corso di alta formazione. Aspetti molecolari di prevenzione e salute. Roma, Istituto Superiore di Sanità. Gennaio-novembre 2016. Relazioni.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2017. (Rapporti ISTISAN 17/25).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Gualtiero Ricciardi*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Paola De Castro e Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.

INDICE

Prefazione.....	iii
-----------------	-----

PARTE PRIMA

Tecnologie “omiche” nella diagnostica clinica e nella medicina personalizzata

Contributo delle tecnologie “omiche” alla medicina personalizzata <i>Raffaella Cascella, Claudia Strafella, Giuseppe Novelli, Emiliano Giardina</i>	3
Proteomica e biomarcatori nella diagnostica clinica e nel follow-up di malattia <i>Marco Crescenzi, Serena Camerini</i>	8
Lipidomica: membrana cellulare e profilo metabolico-nutrizionale <i>Carla Ferreri</i>	13
Metabolomica nella ricerca biomedica <i>Egidio Iorio, Rossella Canese</i>	17
Metodi e applicazioni della metabolomica <i>Rossella Canese, Egidio Iorio</i>	24
Stress ossidativo, ossidazione degli acidi nucleici e patologie umane <i>Annalisa Masi</i>	30
Dalle “omiche” alla <i>Systems Medicine</i> <i>Chiara Romualdi, Enrica Calura</i>	35
Medicina di genere: rischio di malattia e risposta alla terapia <i>Walter Malorni, Federica Delunardo</i>	39

PARTE SECONDA

Aspetti cellulari e molecolari dei processi patologici

Tessuto adiposo come regolatore dell’omeostasi immunologica: ruolo delle adipocitochine <i>Manuela Del Cornò, Gloria Donninelli, Lucia Conti, Sandra Gessani</i>	45
Dieta mediterranea e infiammazione cronica: impatto sui biomarcatori classici ed emergenti <i>Gloria Donninelli, Manuela Del Cornò, Sandra Gessani, Lucia Conti</i>	51
Metainfiammazione e obesità <i>Rossella Menghini, Viviana Casagrande, Massimo Federici</i>	57
Struttura e funzione del microbiota <i>Silvia Turroni, Marco Candela</i>	61

Impatto della dieta sul microbiota intestinale	
<i>Chiara Devirgiliis</i>	66
Asse intestino-cervello, microbiota intestinale e sindrome dell'intestino irritabile	
<i>Giovanni Bruno, Carola Severi</i>	70
Medicina integrata e patologie cronico-degenerative	
<i>Rosaria Ferreri</i>	77

PARTE TERZA

Stile di vita, alimentazione e gestione dello stress nella prevenzione e cura delle malattie

Alimenti funzionali e nutrigenomica	
<i>Beatrice Scazzocchio, Rosaria Vari, Sara Del Papa, Roberta Masella</i>	85
Esigenze nutrizionali in fasce di età sensibili	
<i>Marco Silano</i>	93
Metabolismo e attività fisica	
<i>Silvia Migliaccio, Emanuela Greco</i>	96
Medicina integrata e stili di vita	
<i>Andrea Geraci</i>	100
Stili di vita e malattie del sistema nervoso centrale: dieta ed esercizio fisico	
<i>Maria Antonietta Ajmone Cat, Luisa Minghetti</i>	107
Stress come fattore di rischio di malattia: interazione tra sistema nervoso, endocrino e immunitario	
<i>Alessandra Berry, Francesca Cirulli</i>	112
Stress psicosociale e <i>life skills</i>	
<i>Anna De Santi</i>	117

PREFAZIONE

La definizione dello stato molecolare dell'individuo e la conoscenza degli aspetti psico-sociali e ambientali nei quali tale individuo si colloca sono oggi ritenuti di grande importanza nella valutazione degli stati patologici e della risposta individuale alla malattia, rappresentando pertanto un potenziale strumento efficace per la promozione della salute e la prevenzione di numerose malattie. I fattori legati allo stile di vita, allo stress e alla nutrizione sono in grado di modificare lo stato molecolare di un individuo rendendo prioritaria l'acquisizione di conoscenze sui meccanismi attraverso i quali tali fattori influenzano il sottile equilibrio tra lo stato di salute e quello di malattia, elemento indispensabile per la prevenzione e correzione di stati patologici. Negli ultimi anni abbiamo assistito al cambiamento di alcuni paradigmi della medicina: siamo passati da un approccio reattivo verso la malattia ad uno proattivo, che ha reso possibile la nascita di nuovi approcci "sistemici" che possono definire e orientare le strategie atte soprattutto al mantenimento dello stato di salute. Queste nuove tendenze sottolineano l'importanza della "medicina personalizzata", ovvero di una medicina che consideri le caratteristiche molecolari/genetiche individuali al fine di favorire non soltanto la scelta terapeutica più appropriata, ma anche la definizione di strategie preventive più mirate ed efficaci. L'approccio più avanzato in tale ambito è stato definito "medicina delle 4P", ovvero Predittiva, Personalizzata, Preventiva e Partecipativa. Nonostante l'indubbia validità di questo approccio, c'è oggi un consenso sul fatto che l'indagine delle variabili psico-cognitive, implicate nelle scelte individuali rispetto alla propria salute e ai percorsi di trattamento e cura, rappresenti un aspetto molto rilevante, ma spesso trascurato, nella cura del paziente. Tali considerazioni hanno evidenziato la necessità di sviluppare nuovi approcci, definiti dalla "medicina delle 5P", finalizzati alla considerazione dell'individuo nella sua totalità, con una forte attenzione alle caratteristiche individuali, agli aspetti psico-sociali (la quinta P!) e all'ambiente nel quale l'individuo è inserito. Si ritiene oggi che al mantenimento dello stato di salute contribuiscano numerose variabili, di natura diversa ma fortemente interconnesse. L'alterazione di tali elementi determina uno sbilanciamento che, se persiste nel tempo o si somma ad altri elementi negativi, può sfociare in uno stato patologico come sostenuto da diverse evidenze scientifiche. Conoscere quindi lo stato molecolare di un individuo, ovvero il suo profilo in termini di geni e loro espressione, proteine, lipidi, metaboliti, ecc., la composizione della microflora intestinale, ovvero il microbiota, lo stato infiammatorio e del sistema immunitario, nonché di altri fattori ambientali quali lo stile di vita, lo stress e il contesto psico-sociale, rappresenta un requisito essenziale per indirizzare le strategie mediche verso nuovi approcci clinici volti all'integrazione e alla personalizzazione. Al fine di fornire le basi teorico-pratiche per l'applicazione delle nuove conoscenze in medicina, in linea con le recenti raccomandazioni comunitarie e internazionali, il presente rapporto sintetizza le tematiche principali trattate nel corso residenziale del 2016 "Aspetti molecolari di prevenzione e salute". Tale corso è il frutto di una collaborazione tra alcuni ricercatori dell'Istituto Superiore di Sanità e le Dott.sse Carla Ferreri e Annalisa Masi dell'Istituto per la Sintesi Organica e la Fotoreattività (ISOF) del Consiglio Nazionale delle Ricerche di Bologna.

Questo rapporto è suddiviso in 3 parti:

1. Tecnologie "omiche" nella diagnostica clinica e nella medicina personalizzata;
2. Aspetti cellulari e molecolari dei processi patologici;
3. Stile di vita, alimentazione e gestione dello stress nella prevenzione e cura delle malattie.

I curatori del rapporto

PARTE PRIMA
**Tecnologie “omiche” nella diagnostica clinica
e nella medicina personalizzata**

CONTRIBUTO DELLE TECNOLOGIE “OMICHE” ALLA MEDICINA PERSONALIZZATA

Raffaella Cascella (a, b), Claudia Strafella (a, c), Giuseppe Novelli (a), Emiliano Giardina (a, d)
(a) *Dipartimento di Biomedicina e Prevenzione, Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Roma*
(b) *Dipartimento di Tecnologie Chimiche Farmaceutiche e Biomolecolari, Università Cattolica Nostra Signora del Buonconsiglio, Tirana, Albania*
(c) *Laboratorio Emotest, Pozzuoli, Napoli*
(d) *Laboratorio di Genetica Molecolare UILDM, Fondazione Santa Lucia, Roma*

Introduzione

Negli ultimi decenni abbiamo assistito ad un rapido sviluppo di tecnologie innovative che hanno rivoluzionato gli approcci molecolari nei diversi settori scientifici. Questo tipo di evoluzione ha aperto la strada a studi che hanno come obiettivo la conoscenza globale del DNA, dei suoi trascritti e dei suoi prodotti (1).

Nel campo della genetica sono stati necessari circa 20 anni per trasformare radicalmente gli approcci e i tempi per lo studio del DNA. Infatti, se nella seconda metà degli anni novanta era necessario circa un giorno per conoscere il genotipo di un polimorfismo del singolo nucleotide (*Single Nucleotide Polymorphism, SNP*), ad oggi sono sufficienti circa quattro giorni per ottenere la sequenza dell'intero genoma umano. Questi risultati sono stati raggiunti grazie al progresso tecnico-scientifico che ha condotto allo sviluppo di sequenziatori di nuova generazione che sono in grado di svolgere un sequenziamento massivo ad alta velocità con costi e tempi ridotti. Questi sistemi innovativi consentono e consentiranno un'analisi approfondita e massiva nei diversi settori biomolecolari, fornendo informazioni complessive sulle molecole in esame e generando un'enorme quantità di dati. L'impiego di questi approcci molecolari ha determinato l'introduzione del suffisso “omico” nel settore scientifico, favorendo la nascita delle cosiddette discipline o scienze “omiche” come la genomica che analizza l'organizzazione e la struttura dei geni nel contesto dell'interno genoma, la trascrittomica che analizza tutti i trascritti di un dato organismo o tipo cellulare, l'epigenomica che studia i cambiamenti del DNA che non coinvolgono modifiche nella sequenza, la metabolomica che esamina l'insieme dei profili metabolici di diversi processi cellulari, la proteomica che analizza le proteine espresse da una cellula o da un organismo su larga scala, la lipidomica che studia i profili lipidici, solo per citare alcuni esempi. Le scienze “omiche” hanno il compito di analizzare e studiare specifici aspetti che devono essere considerati nella loro complessità (2).

La conoscenza di tali profili ha portato allo sviluppo di nuove discipline come la Medicina Genomica e la Farmacogenomica. Questa evoluzione ha provocato anche un cambiamento in ambito medico-biologico, determinando il passaggio da un approccio reattivo ad uno proattivo, come evidenziato dalla Medicina delle 4P: Personalizzata, Predittiva, Preventiva e Partecipativa, che si avvale delle informazioni “omiche” per evidenziare il concetto di benessere piuttosto che quello di malattia (3). Queste discipline hanno bisogno di elementi “omici” specifici, comunemente definiti biomarcatori, che siano misurabili e che siano indicatori dei processi biologici normali o patologici e della risposta terapeutica. I biomarcatori genomici ad esempio, sono in grado di fornire informazioni sull'espressione, sulla regolazione e sulla funzione genica, nonché fornire elementi predittivi della risposta terapeutica, utilizzabili quindi come elementi diagnostici, prognostici, predittivi e farmacogenetici.

Genomica

Fra le diverse scienze “omiche” la prima ad essere conosciuta fu la genomica, intesa come disciplina che studia il DNA nella sua totalità (struttura, sequenza, funzione ed evoluzione). Gli studi di genomica strutturale hanno rilevato che il nostro DNA è costituito da: ~6 miliardi di singole lettere, ~22.000 geni, ~98,5% di sequenze non codificanti, ~10 milioni di SNP la cui frequenza varia molto fra i diversi individui (4). Inoltre, è emerso che gli esseri umani condividono circa il 99,5% del loro genoma, diversificandosi per una percentuale di circa 0,5%. Questa percentuale è costituita da elementi altamente variabili che possono essere distinti in: polimorfismi di sequenza (SNP) e piccole inserzioni o delezioni (INDEL), polimorfismi di lunghezza (*Short Tandem Repeats*, STR) e polimorfismi del numero di copie di ampie regioni del DNA (*Copy Number Variations*, CNV). Lo 0,5% del nostro genoma è dunque responsabile delle caratteristiche che rendono unico un soggetto, consentendo di fatto di delineare dei “profili genomici individuali” (5).

Le nuove discipline “omiche” hanno cambiato il nostro approccio allo studio delle malattie genetiche così come di quelle complesse o multifattoriali, per stabilirne il profilo di rischio di un singolo individuo.

Esempi di malattie complesse sono la Degenerazione Maculare Legata all'Età (DMLE) e la steatosi epatica non alcolica (*Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*, NAFLD). In particolare, la DMLE è la causa più frequente di perdita graduale dell'acuità visiva centrale nella popolazione di età superiore ai 55 anni. Questa malattia retinica colpisce circa 30 milioni di persone nel mondo e si stima che entro il 2020 circa 196 milioni ne sarà affetto. In Italia, colpisce circa un milione di persone in età avanzata (6). La DMLE è descritta come una malattia invalidante e multifattoriale che necessita di adeguati approcci preventivi. La NAFLD invece, è la forma più comune di steatosi epatica nei Paesi occidentali, causa principale di circa il 10% dei trapianti di fegato negli USA (7).

Ad oggi, sono noti diversi geni di suscettibilità e diversi fattori ambientali, che concorrono allo sviluppo di queste malattie (8, 9), e per i quali sono stati messi a punto test genetici basati sui diversi biomarcatori di rischio identificati. Inoltre, per la DMLE sono stati introdotti test predittivi che combinano le informazioni genetiche con quelle ambientali, che meglio definiscono il reale rischio individuale di malattia. È importante ricordare che i test genetici devono essere sempre gestiti in ambito di una consulenza genetica pre e post test.

Il concetto di profilo “omico” individuale è stato anche applicato con successo alla malattia multifattoriale per eccellenza, il tumore. Infatti, sia il profilo “omico” del singolo individuo sia quello del tumore sono importanti per l'identificazione di fattori di rischio individuali, mutazioni tumorali nonché per la definizione della terapia ottimale. Al riguardo, l'introduzione della biopsia liquida nella pratica clinica consentirà di analizzare il DNA tumorale e prevedere la comparsa di recidive da un semplice prelievo di sangue. Inoltre, stabilire la presenza di specifiche varianti genetiche potrà guidarci verso un adeguato trattamento terapeutico.

Il progresso tecnico-scientifico ha inoltre favorito la *targeted therapy* (terapie bersaglio), approccio mirato ad un'azione diretta contro le cellule tumorali con l'obiettivo di limitare gli effetti collaterali e migliorare la qualità della vita dei singoli pazienti trattati. Esempi di terapie-bersaglio in uso nella pratica clinica per il trattamento di tumori solidi (colon e polmone), sono i farmaci anti-*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR), in grado di bloccare l'attività del recettore del fattore di crescita epidermico (10).

Farmacogenomica

La farmacogenomica ha come oggetto di studio le varianti genomiche che possono giocare un ruolo sull'efficacia e sulla tollerabilità di una terapia in un determinato individuo, permette di prescrivere ad ogni singolo individuo la terapia più appropriata alle sue caratteristiche genetiche, al fine di ottenere la massima efficacia contro la minor tossicità (11). Gli approcci farmacogenomici sono anche utilizzati per contrastare gli “effetti nocivi” provocati da un medicinale, le cosiddette reazioni avverse ai farmaci (*Adverse Drug Reactions*, ADR) (11). Si stima che negli USA circa il 3-7% delle ospedalizzazioni siano dovute ad ADR e che vi siano più di 100.000 morti l'anno (12). In Svezia, le ADR corrispondono a circa il 3% di tutti i decessi, rappresentando la settima causa di morte (13). Gli esempi di farmacogenomica e ADR sono molteplici, fra tutti è importante ricordare il binomio Abacavir-HLA-B*57:01. L'abacavir (ABC) è un farmaco antiretrovirale impiegato nel trattamento di soggetti positivi all'infezione da virus dell'immunodeficienza acquisita (HIV). Nonostante la sua efficacia sia ampiamente dimostrata, ABC non è molto diffuso nella pratica clinica a causa dell'alto rischio di ADR. Diversi studi hanno dimostrato che circa il 5% di soggetti trattati, manifesta reazioni avverse durante le prime 6 settimane di trattamento. La ADR è una sindrome multi-organo caratterizzata da problemi gastrointestinali e respiratori, febbre, rash cutanei e addirittura morte se somministrato nuovamente (14). Diversi studi hanno documentato la forte associazione fra ADR/ABC e un particolare allele (HLA-B*57:01) del locus HLA-B. Studi retrospettivi e prospettici hanno confermato che l'assenza dell'allele HLA-B*57:01 è un requisito fondamentale per la prescrizione di ABC (9), caratterizzando l'allele HLA-B*57:01 come un biomarcatore farmacogenomico. È importante sottolineare che dal 2008 la *European Medicines Agency* (EMA) ha reso obbligatorio lo screening per l'allele HLA-B*57:01 prima della somministrazione di ABC (9). Un altro esempio dell'utilizzo della farmacogenomica per la prescrizione di un farmaco è rappresentato dalla terapia peginterferone- α e ribavirina in pazienti positivi all'infezione da virus dell'epatite C (HCV), con l'obiettivo di conoscere il genotipo di due SNP (rs12979860 e rs8099917) localizzati nel gene IL28B (19q13.2), di notevole importanza nella risposta alla terapia. L'analisi genetica consente di stabilire le diverse classi genotipiche che verranno poi utilizzate per delineare il miglior approccio farmacologico in termini di durata della terapia, dosaggio e risposta al trattamento (15). I dati descritti rivelano come specifici biomarcatori genomici e farmacogenomici stiano entrando nella pratica clinica mirata ad una medicina sempre più personalizzata.

Epigenomica

Un altro aspetto utile per definire il profilo di rischio individuale è l'impiego delle tecnologie di nuova generazione allo studio dell'epigenoma. Questa nuova branca delle scienze “omiche” studia le modifiche ereditarie nella regolazione genica del DNA che si verificano in assenza di cambiamenti nella sua sequenza. L'epigenomica svolge un ruolo chiave nell'espressione e nella regolazione genica, determinando differenti profili individuali ed è coinvolta in numerosi processi cellulari quali la differenziazione/crescita e la tumorigenesi (16). Nonostante le modifiche epigenetiche avvengano per consentire all'organismo di adattarsi ai cambiamenti ambientali, non sempre rappresentano un vantaggio per l'individuo e sono state frequentemente associate a diverse malattie umane quali il cancro. Inoltre, lo status epigenomico di un individuo è in continua evoluzione e cambia durante il corso della vita (crescita e invecchiamento) in relazione all'esposizione ambientale e può differire anche fra i gemelli omozigoti che mostrano un identico

profilo epigenomico solo alla nascita (17). Nel corso degli ultimi anni il campo dell'epigenetica è stato rivoluzionato da diverse tecnologie innovative atte a determinare tali modificazioni (epimutazioni) attraverso l'analisi della metilazione del DNA, espressione di RNA non codificanti, modificazioni degli istoni e del nucleosoma (16). Questi dati sottolineano come lo studio del genoma e ancor di più dell'epigenoma contribuiscano a tracciare un profilo individuale specifico che evidenzia una variabilità intra-individuale. A tal proposito, l'epigenetica sta acquisendo un ruolo importante anche nel determinare la suscettibilità a diverse malattie.

Conclusioni

La medicina personalizzata ha il compito di combinare le informazioni fornite da diverse discipline "omiche" per stabilire un profilo di rischio individuale. L'interazione fra le diverse discipline "omiche" favorirà la diagnosi e una appropriata valutazione della risposta individuale al trattamento farmacologico contribuendo quindi ad una prognosi più favorevole. In particolare, sarebbe interessante creare una rete "omica" che sfrutti i biomarcatori "omici" per definire il profilo globale di ogni singolo individuo.

Nonostante la conoscenza dei profili "omici" individuale abbia contribuito allo sviluppo della Medicina Personalizzata e di Precisione e al miglioramento dello stato di salute dell'individuo, è necessario che questo campo è in continua evoluzione e probabilmente porterà nel prossimo futuro all'introduzione di tecnologie e approcci sempre più sofisticati. Al riguardo, recenti scoperte hanno portato alla luce un sistema di endonucleasi di origine batterica, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-associated protein-9 nuclease* (CRISPR-Cas9), in grado di tagliare i filamenti di DNA in punti precisi modificando quindi la sequenza di specifici geni e la funzione delle proteine codificate (18-20). Questo sistema di precisione sta aprendo le porte ad una nuova era bio-molecolare che potrebbe rivoluzionare gli approcci di terapia genica nelle diverse patologie (malattie monogeniche, tumori, malattie virali).

Bibliografia

1. Ciani E. Le tecnologie a supporto delle scienze "omiche". In: *Atti del 21° Congresso nazionale SIPAOC*. Supplemento 1 al n. 4 - agosto 2014, anno 20. Foggia, settembre 2014. p. 223-6.
2. Coughlin SS. Toward a road map for global-omics: a primer on-omic technologies. *Am J Epidemiol* 2014;180(12):1188-95.
3. Sagner M, McNeil A, Puska P, Auffray C, Price ND, Hood L, Lavie CJ, Han ZG, Chen Z, Brahmachari SK, McEwen BS, Soares MB, Balling R, Epel E, Arena R. The P4 health spectrum-a predictive, preventive, personalized and participatory continuum for promoting healthspan. *Prog Cardiovasc Dis* 2016;0620(16)30078-0.
4. Goldman AD, Landweber LF. What is a genome? *PLoS Genet* 2016;12(7).
5. Dalla Piccola B, Novelli G. *Genetica medica essenziale*. Roma: CIC Edizioni Internazionali; 2012.
6. Wong WL, Su X, Li X, Cheung CM, Klein R, Cheng CY, Wong TY. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* 2014;2:106-16.
7. Oh H, Jun DW, Saeed WK, Nguyen MH. Non-alcoholic fatty liver diseases: update on the challenge of diagnosis and treatment. *Clin Mol Hepatol* 2016;22(3):327-35.

8. Cascella R, Ragazzo M, Strafella C, Missiroli F, Borgiani P, Angelucci F, Marsella LT, Cusumano A, Novelli G, Ricci F, Giardina E. Age-related macular degeneration: insights into inflammatory genes. *J Ophthalmol* 2014;2014:582842.
9. Black JR, Clark SJ. Age-related macular degeneration: genome-wide association studies to translation. *Genet Med* 2016;18(4):283-9.
10. Marmé D. Advances in Cancer Therapy: Targeted Therapies. *Oncol Res Treat* 2016;39(12):758-759.
11. Stocchi L, Cascella R, Zampatti S, Pirazzoli A, Novelli G, Giardina E. The pharmacogenomic HLA biomarker associated to adverse abacavir reactions: comparative analysis of different genotyping methods. *Curr Genomics* 2012;13(4):314-20.
12. Wester K, Jönsson AK, Spigset O, Druid H, Hägg S. Incidence of fatal adverse drug reactions: a population based study. *Br J Clin Pharmacol* 2008;65(4):573-9.
13. Pirmohamed M, James S, Meakin S, Green C, Scott AK, Walley TJ, Farrar K, Park BK, Breckenridge AM. Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients. *BMJ* 2004;329(7456):15-9.
14. Cascella R, Strafella C, Ragazzo M, Zampatti S, Borgiani P, Gambardella S, Pirazzoli A, Novelli G, Giardina E. Direct PCR: a new pharmacogenetic approach for the inexpensive testing of HLA-B*57:01. *Pharmacogenomics J* 2015;15(2):196-200.
15. Jensen DM, Pol S. IL28B genetic polymorphism testing in the era of direct acting antivirals therapy for chronic hepatitis C: ten years too late? *Liver Int* 2012;32 Suppl 1:74-8.
16. Mensaert K, Denil S, Trooskens G, Van Criekinge W, Thas O, De Meyer T. Next-generation technologies and data analytical approaches for epigenomics. *Environ Mol Mutagen* 2014;55(3):155-70.
17. Wong CC, Parsons MJ, Lester KJ, Burrage J, Eley TC, Mill J, Dempster EL, Gregory AM. Epigenome-wide DNA methylation analysis of monozygotic twins discordant for diurnal preference. *Twin Res Hum Genet* 2015;18(6):662-16.
18. Marmé D. Advances in cancer therapy: targeted therapies. *Oncol Res Treat* 2016;39(12):758-759.
19. Eid A, Mahfouz MM. Genome editing: the road of CRISPR/Cas9 from bench to clinic. *Exp Mol Med* 2016;48(10):e265.
20. Vidigal JA, Ventura A. Rapid and efficient one-step generation of paired gRNA CRISPR-Cas9 libraries. *Nat Commun* 2015;6:8083.

PROTEOMICA E BIOMARCATORI NELLA DIAGNOSTICA CLINICA E NEL FOLLOW-UP DI MALATTIA

Marco Crescenzi, Serena Camerini

Servizio Grandi Strumentazioni e Core Facilities, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Il concetto di biomarcatore è sorprendentemente ampio. Il *Biomarkers Definitions Working Group* dei *National Institutes of Health* statunitensi lo definisce una caratteristica misurabile oggettivamente e utilizzabile come indicatore di processi biologici normali, di stati patologici o di risposta a interventi terapeutici (1). Nel concetto sono quindi comprese molecole quali anticorpi, metaboliti, proteine, glicidi, misurati nelle comuni analisi cliniche, ma anche dati strumentali, come le risultanze di un elettrocardiogramma o di una radiografia, o segni fisici di malattia, per esempio un fegato aumentato di volume o un soffio cardiaco. E la stessa definizione appena enunciata potrebbe essere ulteriormente allargata. In questo articolo, tuttavia, ci limitiamo a considerare i biomarcatori biochimici, con particolare riguardo a quelli proteici.

I biomarcatori possono avere diverse finalità. Quelli diagnostici sono di grande utilità nell'identificazione di una patologia; i marcatori prognostici aiutano a prevedere il decorso o l'esito di un'affezione, mentre i predittori di risposta alla terapia intervengono nell'identificazione dei pazienti che possono giovare di una determinata azione terapeutica.

L'utilità di un biomarcatore viene misurata mediante vari indici, stabiliti attraverso la valutazione statistica di ripetute misurazioni in appropriate popolazioni. I parametri più utili e più comunemente utilizzati sono i seguenti:

- Accuratezza: grado di corrispondenza fra il valore misurato, che contiene inevitabilmente errori, e quello "vero";
- Precisione: la distanza fra diverse misurazioni di una stessa quantità nota (dispersione);
- Riproducibilità: la dispersione ottenuta compiendo le stesse misurazioni, per esempio, con strumenti e operatori differenti, in laboratori diversi, e/o in un intervallo temporale relativamente lungo;
- Robustezza: capacità di un metodo di misura di fornire risultati simili, resistendo a modifiche delle condizioni in cui la misura viene effettuata;
- Sensibilità: probabilità di un test, per esempio di un biomarcatore diagnostico, di indicare un risultato positivo nei pazienti colpiti dalla malattia. Si calcola dividendo il numero di pazienti positivi al test per quello di tutti gli individui affetti dalla patologia in esame;
- Specificità: reciprocamente alla sensibilità, è la probabilità di un test di indicare un risultato negativo nei soggetti indenni dalla patologia. Si calcola dividendo il numero di persone non affette negative al test per quello di tutti i soggetti non affetti.

I due ultimi indici, sensibilità e specificità, sono sempre relativi alla popolazione considerata e in particolare alla prevalenza della malattia (cioè la percentuale di individui affetti in un dato momento). Sensibilità e specificità possono essere combinati tra loro per calcolare la predittività positiva e negativa di un determinato biomarcatore.

Immaginiamo di misurare un biomarcatore diagnostico per una patologia della tarda età in una popolazione di individui compresi fra i 50 e gli 80 anni di età e di trovare che il risultato del test è anomalo (troppo alto o troppo basso) nel 97% dei pazienti affetti dalla malattia; supponiamo

inoltre che nel 95% dei soggetti non colpiti dalla patologia in esame il test risulti negativo (entro i valori normali). Questo significa che, “all’interno della popolazione considerata”, il biomarcatore ha una sensibilità del 97% e una precisione del 95%. Questi dati, da soli, non possono dirci quale sia la probabilità che un soggetto positivo al test sia realmente affetto dalla malattia (predittività positiva) o, al contrario, che una persona negativa ne sia davvero esente (predittività negativa). Per calcolare questi indici è necessario conoscere le caratteristiche della popolazione di riferimento.

Supponiamo quindi che, nel nostro caso, la popolazione comprenda un milione di individui e che fra questi la prevalenza della malattia sia dell’1%. Possiamo allora compilare una piccola tabella in cui saranno comprese quattro categorie: malati positivi al test, malati negativi, non affetti positivi e non affetti negativi. Le prime due categorie assommano a 10.000 persone (1% di 1.000.000), di cui il 97% (9.700) positive al test e il 3% (300) negative. Le persone non affette, invece, saranno 990.000 (1.000.000-10.000), 95% delle quali negative al test (940.500) e 5% positive (49.500) (Tabella 1).

Tabella 1. Calcolo delle predittività positiva e negativa di un biomarcatore diagnostico

Biomarcatore	Malati	Non affetti
positivo	9.700	49.500
negativo	300	940.500

Il valore di predittività positiva è dato da:

$$\frac{\text{n. di malati positivi per il biomarcatore}}{\text{n. di tutti i positivi per il biomarcatore}} = \frac{9.700}{9.700 + 49.500} = 16,4\%$$

Quindi un soggetto positivo per il biomarcatore ha solo il 16,4% di probabilità di essere malato.

Analogamente, il valore di predittività negativa è dato da:

$$\frac{\text{n. di non affetti negativi per il biomarcatore}}{\text{n. di tutti i negativi per il biomarcatore}} = \frac{940.500}{300 + 940.500} = 99,97\%$$

Perciò la negatività per il biomarcatore esclude quasi totalmente la patologia.

Poiché dipendono da sensibilità e specificità, anche gli indici di predittività positiva e negativa variano con la prevalenza della malattia nella popolazione di riferimento. Se avessimo considerato l’intera popolazione di una certa area geografica, invece della sola fascia in età avanzata, la prevalenza della patologia (che avevamo supposto essere tipica della tarda età) sarebbe stata inferiore e gli indici sarebbero variati di conseguenza.

Biomarcatori proteici

Come già accennato, la natura biochimica del biomarcatore può essere molto varia. Può trattarsi di un carboidrato, di un lipide, di un acido nucleico, di una piccola molecola o di altre specie ancora. Le proteine sono molto rappresentate fra i biomarcatori e di queste ci occuperemo in modo particolare.

Una prima domanda è in quale materiale biologico vada valutato il biomarcatore. In alcuni casi la misurazione viene effettuata su cellule o tessuti, per esempio nel caso di marcatori tumorali ricercati in materiale biotico. Ovunque possibile, però, si preferisce analizzare un fluido biologico, particolarmente il sangue, che può essere raccolto in modo semplice, economico e poco invasivo. Le proteine presenti nel siero (la parte liquida, non cellulare del sangue) possono avere diverse provenienze. In certi casi può trattarsi di proteine direttamente secrete nel sangue (ad esempio un fattore della coagulazione); in altri le proteine sono secrete solo localmente (ad esempio citochine in un tessuto infiammato), e solo secondariamente vengono trasportate nella corrente ematica, dove possono essere rilevate. Ancora in altri casi la proteina biomarcatore viene rilasciata da cellule danneggiate o morte, indicando quindi un danno o una patologia, e poi trascinata nel sangue. Si può osservare che il sangue potrebbe contenere i marcatori in concentrazione minore, in confronto ai tessuti/organi interessati dalla patologia. Ma è altrettanto vero che, in assenza di indicazioni riguardo la sede affetta dalla patologia (è questo il caso dello screening precoce per tumori) il sangue, come altri fluidi biologici accessibili (urina, saliva), diventa prezioso per la ricerca di marcatori.

Quando si ricerca un nuovo biomarcatore proteico, ci si può trovare in due diverse condizioni: in alcuni casi la sorgente del biomarcatore è nota, almeno in via presuntiva, come quando si vuole utilizzare una proteina per evidenziare un danno tissutale. In queste circostanze le migliori candidate sono proteine che siano abbondanti nel tessuto di interesse e possibilmente solo in esso.

Un'eventualità frequente è invece quella in cui si ricerchi per esempio un marcatore diagnostico per una patologia, ma non si abbiano indizi sulla sua identità. In questi casi si effettuano spesso ricerche "a tappeto", senza conoscere in anticipo le caratteristiche del potenziale biomarcatore, ma cercando una proteina la cui concentrazione vari in funzione della presenza o dell'assenza della patologia di interesse. È necessario ricorrere allora ad un metodo capace di identificare e misurare il maggior numero possibile di proteine nel materiale biologico di scelta. Negli ultimi venti anni la tecnologia maggiormente utilizzata per questo scopo è stata la spettrometria di massa (*Mass Spectrometry*, MS) delle proteine. Questa straordinaria tecnologia, tuttora in fase di veloce evoluzione, permette di misurare con estrema accuratezza il peso molecolare di minutissime quantità di proteine e dei loro frammenti. Sulla base di questi dati è possibile identificare la proteina allo studio e determinarne la concentrazione nel campione di origine. In pratica, nella maggior parte dei casi, le proteine vengono sottoposte ad una digestione enzimatica, che le riduce ad un insieme di peptidi; sono questi ultimi ad essere analizzati in MS.

Gli spettrometri di massa, anche se molto diversi fra loro, sono accomunati dalla stessa struttura generale, che comprende tre sezioni (Figura 1) (2). La prima, la sorgente, ionizza le molecole allo studio, i peptidi nel nostro caso, trasformandoli in ioni molecolari carichi positivamente in fase gassosa. Nella seconda sezione dello strumento, l'analizzatore, i peptidi vengono separati da potenti campi elettromagnetici sulla base del loro peso molecolare. In questa sede i peptidi possono essere fatti collidere con un gas, producendo un insieme di frammenti che vengono a loro volta separati in base al peso. La terza componente dello strumento è il rivelatore, che produce un segnale elettronico in funzione della quantità di ioni da cui viene raggiunto.

Gli spettrometri di massa identificano una proteina determinando il peso molecolare dei peptidi e dei loro frammenti prodotti nell'analizzatore. Questi dati sono utilizzati da appositi *software*, che li confrontano con banche dati di proteine e determinano quale sia l'unica proteina compatibile con i diversi peptidi e i loro frammenti. E non è tutto qui: i moderni strumenti sono in grado di effettuare queste operazioni non su una molecola alla volta, ma su miscele molto complesse. In questo modo un'analisi di poche ore può dare informazioni su centinaia o migliaia di proteine diverse. In questi casi si parla di strategie "proteomiche".

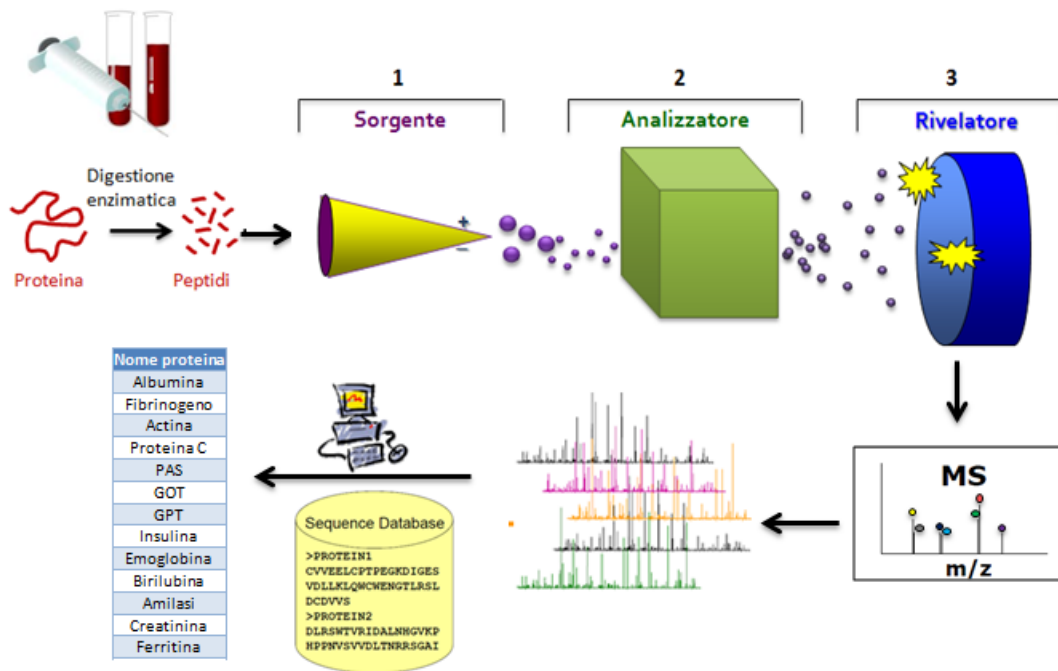


Figura 1. Processo per l'analisi di proteine mediante spettrometria di massa

Date determinate condizioni, gli spettrometri di massa sono anche in grado di misurare in quale quantità ciascuna proteina sia presente nel campione analizzato. In questo modo è possibile cercare correlazioni fra uno stato patologico e variazioni di concentrazione di una o più proteine nel siero. È da notare che per estrarre questa informazione diagnostica non è essenziale conoscere la funzione delle proteine coinvolte e neppure il motivo che ne fa variare le concentrazioni ematiche nel corso della patologia presa in esame. Può quindi accadere che un biomarcatore identificato nel modo descritto entri nell'uso clinico prima che si conoscano i suoi rapporti con la patologia per la quale serve da indicatore.

Nonostante la potenza dei moderni spettrometri di massa, la ricerca di biomarcatori proteici incontra formidabili ostacoli. Uno dei più importanti è l'enorme variabilità nella concentrazione delle proteine del siero. Il sangue è un collettore di informazioni da ogni distretto dell'organismo, perché le proteine secrete o rilasciate da qualunque cellula o tessuto finiscono prima o poi nel torrente circolatorio. Ne discende l'importanza di cercare potenziali biomarcatori proprio nel sangue. Ma se alterazioni macroscopiche si riflettono in grandi variazioni della composizione del siero (si pensi all'insufficienza epatica, che determina una cospicua riduzione della proteina sierica più abbondante, l'albumina), patologie che interessano un ristretto numero di cellule (ad esempio un tumore in uno stadio molto precoce) possono produrre cambiamenti infinitesimali. La difficoltà risiede proprio nel dover ricercare cambiamenti, che possono essere grandi o piccolissimi, della concentrazione di proteine ignote a priori. Fra le proteine più e meno abbondanti del siero intercorrono dieci ordini di grandezza. Chiedere a uno spettrometro di massa di analizzare le une e le altre equivale a pretendere che una bilancia pesi con uguale precisione oggetti di un milligrammo e di dieci tonnellate.

A queste difficoltà è possibile in parte ovviare preparando i campioni con metodiche volte ad arricchire le proteine poco abbondanti, prima di procedere con l'analisi mediante MS. La MS

prevede lunghe procedure di laboratorio e l'uso di costosi strumenti, che non ne facilitano l'utilizzo diretto nella diagnostica clinica. Tuttavia la MS si rivela estremamente utile nella fase di identificazione (*discovery*) dei biomarcatori proteici. Ad oggi, già numerosi biomarcatori sono stati individuati con strategie proteomiche e il loro successivo utilizzo in specifici test diagnostici, di più semplice e rapida esecuzione, è entrato nella pratica clinica (3-5). Tabelle che elencano quelli già in uso e altri in corso di approvazione sono state pubblicate (4).

Conclusioni

Il progresso tecnologico sta portando allo sviluppo di spettrometri di massa sempre più veloci, sensibili e accurati, strumenti preziosi per l'analisi sia qualitativa che quantitativa delle proteine anche in campioni complessi quali i fluidi biologici. L'utilizzo della spettrometria di massa sta dunque diventando sempre più frequente e anche più efficiente nella ricerca di nuovi biomarcatori (2).

Bibliografia

1. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2001;69(3):89-95.
2. Crutchfield CA, Thomas SN, Sokoll LJ, Chan DW. Advances in mass spectrometry-based clinical biomarker discovery. *Clinical Proteomics* 2016;13:1-12.
3. Füzéry AK, Levin J, Chan MM, Chan DW. Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: issues and challenges. *Clin Proteomics* 2013;10(1):13.
4. Parker C E, Borchers CH. Mass spectrometry based biomarker discovery, verification, and validation - Quality assurance and control of protein biomarker assays. *Mol Oncol* 2014 Jun;8(4):840-58.
5. Verrills NM. Clinical proteomics: present and future prospects. *Clin Biochem Rev* 2006;27(2):99-116.

LIPIDOMICA: MEMBRANA CELLULARE E PROFILO METABOLICO-NUTRIZIONALE

Carla Ferreri

Istituto per la Sintesi Organica e la Fotoreattività, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bologna

Introduzione

La membrana cellulare è la risultante di fattori diversi di natura fisico-chimica e nutrizionale-metabolica. L'assetto dei fosfolipidi di membrana risponde *in primis* a principi di equilibrio biofisico che sono riflessi nella sua composizione molecolare. Difatti la realizzazione del compartimento funzionale di membrana avviene spontaneamente, per avvicinamento delle molecole di fosfolipidi, influenzato a sua volta dal tipo di acidi grassi presenti, a struttura satura, oppure insatura, che creano zone più rigide e più fluide rispettivamente, mediante interazioni molecolari stabilizzate da forze di Van der Waals (1). L'aggregazione spontanea di queste molecole anfifiliche forma il doppio strato della membrana che delimita l'ambiente cellulare, tant'è che la cellula non può esistere senza la membrana. La composizione in acidi grassi saturi e insaturi dei fosfolipidi di membrana è un fattore chiave che determina le proprietà di fluidità e permeabilità della membrana stessa, insieme all'altro fattore di regolazione lipidica che è il colesterolo. Le molecole proteiche associate conferiscono altre funzioni alla membrana, come permeabilità a specifiche molecole idrofile (glucosio) oppure ioni (sodio, potassio, calcio, ecc.), ricezione e invio di segnali (proteine recettoriali, ecc.). Tali argomenti sono stati trattati in lavori scientifici e di rassegna (2-4).

Membrana cellulare e turnover degli acidi grassi

Le membrane cellulari sono in grado di rispondere in modo efficiente alle variazioni metaboliche e ambientali, ripristinando l'omeostasi dopo ogni stimolo o cambiamento. È ben noto che, in situazioni non limitanti per l'apporto di acidi grassi, i fosfolipidi di membrana mantengono stabilmente la composizione caratteristica di ciascun tessuto (5).

La membrana dell'eritrocita umano è stata in diversi studi presa come riferimento per il monitoraggio dei livelli di acidi grassi (6, 7). Come vedremo nella sezione successiva, l'analisi della membrana del globulo rosso maturo può fornire importanti informazioni sui livelli di incorporazione di acidi grassi, fra cui quelli essenziali omega-6 e omega-3.

Il ruolo della nutrizione nell'assunzione di acidi grassi necessari è stato trattato in numerose pubblicazioni che ne hanno esaminato aspetti fisiologici ed evolutivi. I lavori citati potranno essere utilizzati dal lettore per approfondire la tematica (8-10). Diversi studi hanno evidenziato che nelle diete dei Paesi industrializzati esiste uno sbilanciamento nell'assunzione di grassi saturi rispetto agli insaturi e di omega-6 rispetto a omega-3 (11, 12). Le maggiori organizzazioni nazionali e internazionali per la promozione della salute e della corretta alimentazione attribuiscono un ruolo fondamentale all'assunzione adeguata di acidi grassi essenziali quale condizione indispensabile per il benessere e il mantenimento dello stato di salute. Le quantità di grassi totali, la suddivisione nelle varie tipologie e l'indicazione di sostituire gli acidi grassi saturi

con quelli monoinsaturi sono contenute nelle linee guida emanate dalla *European Food Safety Agency* (EFSA) e citate in diverse pubblicazioni (13-16).

Gli acidi grassi sono elementi chiave nel turnover della membrana cellulare, in risposta a stimoli infiammatori o di altra natura che possono portare alla attivazione delle fosfolipasi come ad esempio la fosfolipasi A2. Questi enzimi agiscono sui fosfolipidi di membrana idrolizzando uno dei due legami esterei con gli acidi grassi. Dalla reazione enzimatica viene liberato un acido grasso e prodotta una molecola di lisofosfolipide (ovvero la molecola di fosfolipide da cui si è distaccato il residuo di acido grasso). Gli acidi grassi liberi entreranno poi nelle diverse vie di biosintesi dei mediatori lipidici.

Il rimodellamento della membrana cellulare, noto come il ciclo di Land (17), è di importanza fondamentale per il ricambio dei fosfolipidi e il mantenimento dell'omeostasi di membrana. Diversi studi hanno dimostrato che le abitudini alimentari e il metabolismo influenzano il ricambio dei fosfolipidi e di conseguenza la composizione delle membrane. Pertanto, l'apporto bilanciato di elementi pro- e anti-infiammatori, mediante una dieta corretta, è fondamentale per l'ottimale composizione del corredo lipidico (18-20).

Lipidomica di membrana

La lipidomica è una disciplina nata da qualche decade come branca della metabolomica che analizza il profilo lipidico (lipidoma) di cellule e tessuti. La lipidomica valuta l'assetto del lipidoma non solo analizzando quantità e qualità delle molecole ma anche correlando questi dati al metabolismo (metabolomica) fornendo così un quadro completo delle trasformazioni (21).

La lipidomica di membrana condotta con metodiche analitiche (gas cromatografia e spettrometria di massa) si occupa principalmente dei fosfolipidi, costituenti fondamentali delle membrane cellulari con funzioni strutturali e regolative che possono essere modulati a livello individuale attraverso l'apporto nutrizionale, come ad esempio nell'infiammazione (22, 23). L'analisi lipidomica può quindi fornire una visione personalizzata dell'assetto strutturale e funzionale della membrana legato allo stile di vita, alle abitudini alimentari e al metabolismo individuale. La ricerca nel settore sta anche prendendo in esame aspetti molecolari associati a condizioni patologiche.

Nell'applicazione della lipidomica di membrana al monitoraggio della salute umana l'eritrocita maturo circolante è utilizzato come cellula rappresentativa anche di altri tessuti con i quali è in continuo contatto per funzioni di scambio. Il prelievo ematico non è particolarmente invasivo e si esegue con una modalità semplice. Il globulo rosso ha una vita media di 120 giorni e, per ottenere un campionamento preciso e ripetibile, vengono isolati mediante robotica specializzata i globuli rossi maturi (> 3 mesi di vita), sfruttando la loro maggiore densità (24) e la diversa distribuzione di antigeni di superficie, come la glicoforina (CD235a) (25).

L'isolamento dei globuli rossi è preferibile rispetto all'uso del plasma (ottenibile per centrifugazione) oppure del sangue intero (senza separare il plasma dalla parte cellulare), poiché il contenuto in acidi grassi di questi ultimi non è riferito ai soli fosfolipidi di membrana ma risente fortemente della presenza dei trigliceridi, il cui livello è influenzato dall'assunzione di grassi nel periodo immediatamente precedente l'analisi.

L'analisi lipidomica della membrana degli eritrociti è stata utilizzata per valutare un gruppo di 10 acidi grassi cis e 2 acidi grassi trans (acido oleico trans e acido arachidonico trans) (26), sempre presenti nel globulo rosso, che forniscono un profilo lipidomica umano basale (2, 9, 10). I valori medi di riferimento della popolazione sana sono stati riportati nel 2008 in una meta-analisi condotta su varie popolazioni (9), inclusa quella italiana (10, 27).

Tramite il confronto con gli intervalli di riferimento, l'analisi lipidomica di membrana può evidenziare un allontanamento dal bilanciamento ottimale degli acidi grassi, e fornire indicazioni per un intervento nutrizionale compensativo. Come già sottolineato, la relazione tra acidi grassi e patologie può fornire una spiegazione riguardo all'influenza della nutrizione e dello stile di vita sul rischio di insorgenza di alcune patologie umane. Il concetto di membrana cellulare come "pacemaker metabolico" sviluppato da Hulbert negli anni novanta (28) include oggi anche il ruolo della nutrizione e del metabolismo per l'equilibrio strutturale e funzionale della membrana stessa. Attualmente, la *Lipid Replacement Therapy* (LRT) è un trattamento di riequilibrio a livello molecolare, suggerito per pazienti affetti da diversi tipi di patologie, e supportato dalle ricerche di Nicolson, il primo a proporre il "modello a mosaico fluido" della membrana cellulare (29).

Conclusioni

Da quanto esposto appare chiaro che metabolismo e nutrizione possono modulare la composizione lipidica di membrana di un individuo, ovvero la qualità e la quantità degli acidi grassi nel *pool* lipidico. L'analisi lipidica della membrana integra informazioni sulla nutrizione e sul metabolismo dell'individuo, che possono essere utilizzate nella pratica clinica per impostare un corretto supporto nutrizionale alla terapia farmacologica. La conoscenza del "lipidoma" della membrana permette anche di impostare un piano personalizzato di prevenzione attiva per il mantenimento dello stato di salute, tramite l'equilibrio delle componenti alimentari. Infine, la raccolta di dati sulla popolazione e la loro valutazione statistica, integrata da dati provenienti dalle tecnologie "omiche", contribuirà alla definizione di profili molecolari utilizzabili per la fase diagnostico-terapeutica e per le indicazioni nutrizionali ai pazienti.

Bibliografia

1. Nagle JF, Tristram-Nagle S. Structure of lipid bilayers. *Biochim. Biophys Acta* 2000;1469:159-95.
2. Mouritsen OG. *Life-as matter of fats: the emerging science of lipidomics*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2005.
3. Lingwood D, Binnington B, Róg T, Vattualinen I, Grzybek M, Coskun U, Lingwood CA, Simons K. Cholesterol modulates glycolipid conformation and receptor activity. *Nat Chem Biol* 2011;7(5):260-2.
4. Cevc G. How membrane chain-melting phase-transition temperature is affected by the lipid chain asymmetry and degree of saturation- an effective chain-length model. *Biochemistry* 1991;30:7186-93.
5. Lauritzen L, Hansen HS, Jorgensen MH, Michaelsen KF. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relationship to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res* 2001; 40: 1-49.
6. Hodson L, Skeaff CM, Fielding BA. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Prog. Lipid Res* 2008; 47:348-380.
7. Ferreri C, Chatgililoglu, C. Role of fatty acid-based functional lipidomics in the development of molecular diagnostic tools. *Expert Rev Mol Diagn.* 2012 Sep;12(7):767-80.
8. Simopoulos AP. Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain. *Mol Neurobiol* 2011;44:203-15.
9. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acid and athletics. *Curr Sports Med Rep* 2007;6:230-6.
10. AI MD, von Houwelingen AC, Honstra G. Long-chain polyunsaturated fatty acids, pregnancy, and pregnancy outcome. *Am J Clin Nutr* 2000;71(1 Suppl):285S-91S.
11. Patterson E, Wall R, Fitzgerald GF, Ross RP, Stanton C. Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Metab* 2012;2012:539426.

12. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids* 2001;36:1007-24.
13. European Food Safety Authority. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific opinion on Dietary Reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA Journal* 2010;8:1461.
14. European Food Safety Authority. EFSA panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific opinion on the tolerable upper intake level of eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA). *EFSA Journal* 2012; 10:2815.
15. Joint WHO/FAO Expert Consultation. *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases*. Geneva: World Health Organization; 2003. (WHO technical report series 916).
16. European Food Safety Authority. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to the replacement of mixtures of saturated fatty acids (SFAs) as present in foods or diets with mixtures of monounsaturated fatty acids (MUFAs) and/or mixtures of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 621,1190,1203,2906, 2910, 3065) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 2011; 9:2069.
17. Lands WE. Metabolism of glycerolipides; a comparison of lecithin and triglyceride synthesis. *J Biol Chem* 1958;231:883-8.
18. Raphael W, Sordillo LM. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammation: the role of phospholipid biosynthesis. *Int J Mol Sci* 2013;14(10):21167-88.
19. Wu H, Bogdanov M, Zhang Y, Sun K, Zhao S, Song A, Luo R, Parchim NF, Liu H, Huang A, Adebisi MG, Jin J, Alexander DC, Milburn MV, Idowu M, Juneja HS, Kellems RE1, Dowhan W, Xia Y. Hypoxia-mediated impaired erythrocyte Land's cycle is pathogenic for sickle cell disease. *Sci Rep* 2016;6:29637.
20. Pol A, Gross SP, Parton RG. Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins, and sites. *J Cell Biol* 2014;204:635-46.
21. German JB, Gillies LA, Smilovitz JT, Zivkovic AM, Watkins SM. Lipidomics and lipid profiling in metabolomics. *Curr Opin Lipidol* 2007;18:66-71.
22. Ferreri C, Chatgililoglu C. *Membrane lipidomics for personalized health*. New York: Wiley and Sons; 2015.
23. Serhan C. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Rev Immunol* 2008;8:349-61.
24. Bartosz G. Erythrocyte membrane changes during aging *in vivo*. In: Harris JB (Ed). *Blood cell biochemistry. Erythroid cells*. New York: Springer Science & Business media; 1990. vol. 3 p. 45-79.
25. Telen MJ. Expression of human erythrocyte membrane protein antigens during erythroid differentiation. In: Harris JB (Ed). *Blood cell biochemistry. Erythroid cells*. New York: Springer Science & Business media; 1990. vol 2. p. 27-44.
26. Chatgililoglu C, Ferreri C, Melchiorre M, Sansone, A, Torreggiani A. Lipid geometrical isomerism: From chemistry to biology and diagnostics. *Chem Rev* 2014;114:255-84.
27. Ferreri C, Masi A, Sansone A, Giacometti G, Larocca, A, Menounou G, Scanferlato R, Tortorella S, Rota D, Conti M, Deplano S, Louka M, Maranini AR, Salati A, Sunda V, Chatgililoglu C. Fatty acids in membrane sas homeostatic, metabolic and nutritional biomarkers: recent advancements in analytics and diagnostics. *Diagnostics (Basel)* 2016;7(1). pii: E1.
28. Else PL, Hulbert AJ. Membranes as metabolic pacemakers. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003;30:559-64.
29. Nicholson G, Ash ME. Lipid replacement therapy: A natural medicine approach to replacing damaged lipids in cellular membranes and organelles and restoring function. *Biochim Biophys Acta* 2014;1838:1657-79.

METABOLOMICA NELLA RICERCA BIOMEDICA

Egidio Iorio, Rossella Canese

Servizio Grandi Strumentazioni e Core Facilities, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Nell'era della post-genomica è ormai evidente che, oltre all'analisi dell'espressione genica e proteica, sia necessario caratterizzare il metaboloma, cioè l'insieme di molecole a basso peso molecolare di un determinato sistema biologico (dalla singola cellula all'intero organismo). Tra tutte le tecnologie "omiche" la metabolomica è tra le più recenti ed è considerata quella che maggiormente definisce il fenotipo, inteso come risultato dell'interazione tra geni e ambiente. Infatti al centro dello studio del metaboloma vi è il concetto che lo stato metabolico può rappresentare al meglio, tra tutte le scienze "omiche", lo stato globale di un individuo (1-3). In questa visione l'espressione genica potrebbe rappresentare lo specchio della natura interna di un sistema biologico, mentre i metaboliti posti alla fine dei processi metabolici potrebbero rappresentare l'interazione di altri fattori quali l'alimentazione, l'ambiente e lo stile di vita, i microrganismi commensali, gli agenti infettivi, l'esposizione a farmaci e/o sostanze tossiche. Possiamo quindi concludere che la genomica e la proteomica rappresentano le potenzialità di un sistema biologico, mentre lo studio del metaboloma il suo dinamismo reale (Figura 1).

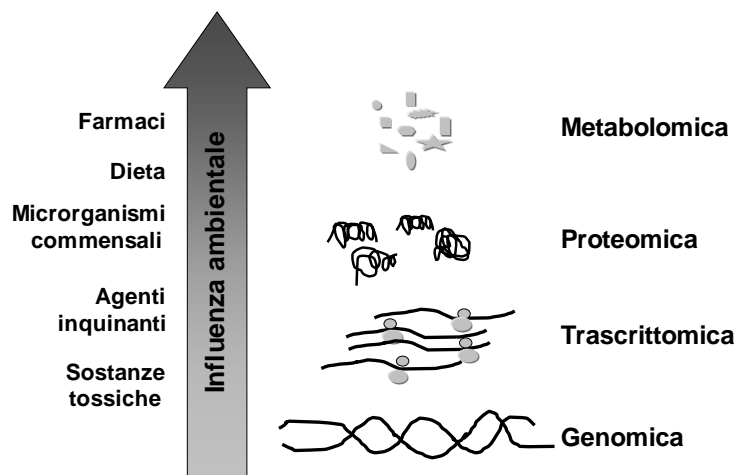


Figura 1. Rappresentazione schematica dell'influenza ambientale a livello genomico (DNA e mRNA), a livello proteomico e metabolomico

Un metabolita viene definito come qualsiasi molecola organica rilevabile nei tessuti e fluidi biologici con un peso molecolare inferiore a 1.500 Dalton. Sono considerati metaboliti ad esempio aminoacidi, lipidi, peptidi, oligonucleotidi, zuccheri, nucleosidi, chetoni, aldeidi, farmaci, tossine, contaminanti intracellulari o secreti. I metaboliti sono parte integrante e unità principali dei sistemi biologici. La metabolomica è connessa alle altre "omiche" in quanto i metaboliti, quali i nucleotidi monofosfati (AMP, CMP, GMP, TMP), sono componenti principali del genoma e

trascrittoma, mentre gli aminoacidi sono componenti principali del proteoma. I metaboliti svolgono molteplici funzioni come componenti principali delle membrane biologiche, assicurando quindi la struttura e l'integrità cellulare (lipidi). Inoltre, i metaboliti servono come substrati per la formazione di energia (zuccheri, aminoacidi, lipidi, ATP), cofattori o come mediatori della trasduzione di segnali cellulari per tutti i processi studiati da proteomica e genomica (4).

Metabonomica e metabolomica: la “firma metabolica”

La medicina sin dal passato ha direttamente o indirettamente valutato lo stato metabolico di un individuo osservando colore, sapore e odori dei fluidi biologici e nell'ultimo secolo, tramite lo sviluppo di strumenti analitici, misurando i livelli di specifici metaboliti quali ad esempio glucosio, colesterolo, creatinina.

Dallo sviluppo di tecnologie “omiche” la ricerca potrebbe in futuro avvalersi di analisi più complesse in grado di rilevare una “firma metabolica” (definita come l'identificazione di pattern metabolici o di singoli metaboliti) dello stato di un individuo.

Recentemente in letteratura sono stati conati due diversi termini per questo tipo di analisi complesse sul metaboloma: metabonomica e metabolomica. La metabonomica è definita come la misura quantitativa dei metaboliti presenti in un sistema biologico, o delle alterazioni delle concentrazioni dei metaboliti in risposta a stimoli fisiopatologici e/o a modificazioni genetiche e ambientali (5, 6). La metabolomica è invece definita come l'analisi di tutto il profilo metabolomico nel suo insieme in un dato set di condizioni (7). A tutt'oggi c'è ancora un ampio grado di sovrapposizione nell'utilizzo dei termini e spesso sono usati come sinonimi. Entrambe la metabonomica e la metabolomica sono complementari e integranti alla genomica e alla proteomica e altre scienze “omiche” offrendo così una visione integrata del sistema biologico in esame. In questo scenario la metabolomica, identificando specifiche “firme metaboliche”, può risultare uno strumento utile per comprendere l'eziologia di una patologia, descrivere con opportuni parametri la sua evoluzione e consentire quindi di formulare nuove ipotesi patogenetiche. In particolare, la metabolomica può:

- fornire marcatori predittivi di prognosi e/o di diagnosi di malattia (8);
- indagare sui meccanismi molecolari specifici delle malattie (9);
- identificare biomarcatori della risposta ai farmaci, fornendo un mezzo efficace per prevedere la risposta di un soggetto ad uno specifico trattamento (farmacometabolomica) (10);
- monitorare la risposta alla terapia e le recidive di malattia, come nel caso dei tumori;
- sviluppare nuovi farmaci basati su bersagli molecolari responsabili di alterazioni metaboliche specifiche (11);
- rappresentare la base per lo sviluppo di nuovi metodi di “imaging” metabolici come la risonanza magnetica nucleare (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR), la tomografia a emissione di positroni (*Positron Emission Tomography*, PET) e altre tecniche di *imaging* molecolare (12).

Grazie a queste potenzialità della metabolomica oggi sono state acquisite nuove conoscenze sui meccanismi che sono alla base di diverse malattie, tra cui patologie neuropsichiatriche, malattie cardiovascolari, tumori e diabete.

Laboratorio della metabolomica

La metabolomica si basa sullo studio sistematico di una serie completa di metaboliti in un campione biologico di qualsiasi natura (urine, sangue, tessuti, cellule, pus, liquido amniotico, feci ecc.). Come per ogni determinazione analitica le procedure devono essere standardizzate e riproducibili (13-15). Un aspetto cruciale nelle analisi metabolomiche è rappresentato dalle fasi preanalitiche e analitiche, fasi in cui il campione biologico deve essere opportunamente conservato e processato al fine di evitare processi degradativi endogeni in quanto l'attività enzimatica può perdurare oltre il momento della raccolta del campione. Il metabolismo di ciascun campione deve essere ridotto o spento tramite utilizzo di solventi organici o congelamento. Inoltre la contaminazione di macromolecole (DNA e proteine) può essere evitata tramite tecniche di frazionamento. La scelta del campione dipende dal quesito biologico. Negli studi di coorte su larga scala sono maggiormente utilizzati i biofluidi (ad esempio, il siero, plasma, urine, saliva, feci) a causa della loro relativa facilità di raccolta, preparazione e stoccaggio. La saliva rappresenta la scelta di elezione per lo studio delle malattie del cavo orale, le feci per il microbioma, e l'urina per le malattie renali e studi tossicologici, mentre generalmente siero o plasma sono utilizzati per lo studio di malattie cardiovascolari e per studi di farmacocinetica.

Le analisi metabolomiche si possono suddividere in due fasi sequenziali principali:

- 1) una fase sperimentale, basata su analisi effettuate con i metodi spettroscopici;
- 2) l'analisi dei dati e la loro interpretazione (inclusa la consultazione di apposite banche dati).

I principali metodi spettroscopici sono: la spettroscopia NMR e la spettrometria di massa (*Mass Spectrometry*, MS) (16, 17).

La spettroscopia NMR è una tecnica non invasiva (applicabile anche al paziente), non distruttiva, poco sensibile (sensibile fino a concentrazioni micromolari, μM), non selettiva (si osservano tutte le molecole possedenti il nucleo di osservazione) e multinucleare. È una tecnica analitica quantitativa, secondo la quale l'intensità del segnale è proporzionale alla concentrazione del metabolita (18).

La spettrometria MS è la tecnica maggiormente utilizzata per le analisi metabolomiche. È una tecnica molto più sensibile rispetto alla spettroscopia NMR (capace di misurare concentrazioni femtomolari, fM). Gli analiti possono ionizzarsi diventando carichi di segno positivo o negativo e gli ioni sono separati secondo il rapporto massa/carica (m/z). Spesso questa tecnica è associata a metodi di separazione cromatografica come la gascromatografia associata alla spettrometria di massa (GC-MS) e la cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa (LC-MS) (19).

Analogamente a quanto avviene per altre scienze omiche anche nella metabolomica si genera un'enorme quantità di dati, per cui l'analisi bioinformatica e statistica sono parti cruciali per elaborare le informazioni. In questo modo si creano dei modelli multidimensionali in grado di interpretare le interazioni all'interno del sistema e tra i vari sistemi in studio (20). Inoltre l'analisi metabolomica può focalizzarsi sull'analisi qualitativa e quantitativa di un singolo analita (*targeted analysis*), e/o un gruppo di metaboliti appartenenti ad una specifica via metabolica (*metabolite profiling*). Oltre a queste analisi generalmente ipotesi-guidate, la metabolomica valuta il maggior numero possibile di metaboliti per l'identificazione di una "firma metabolica" associata ad una determinata condizione fisiopatologica. Una volta identificato il pattern specifico, si procede con l'identificazione strutturale dei metaboliti rilevanti (cioè caratteristici di quella particolare condizione fisiopatologica) e quindi l'individuazione di un possibile marcatore biologico. Tra i più grandi vantaggi di questo tipo di approccio a priori non guidato da ipotesi vi è la possibilità di identificare marcatori biologici inattesi se non addirittura sconosciuti, che potrebbero rappresentare la base per lo sviluppo di nuovi bersagli molecolari per nuove terapie. Le tecniche di analisi statistica multivariata maggiormente utilizzate per la metabolomica si dividono in metodi che utilizzano dei modelli non noti a priori (*unsupervised*) che forniscono una

visione oggettiva dell'informazione e metodi che utilizzano dei modelli noti a priori (*supervised*) che guidano l'analisi.

La metabolomica è una tecnologia complessa e richiede non solo tecnologie analitiche avanzate, ma la stretta collaborazione di esperti nel campo analitico, bioinformatico e statistico. Nonostante l'individuazione e pubblicazione di 7900 molecole su *Human Metabolome DataBase* (HMDB, l'unico database ufficiale del metaboloma umano), l'intero metaboloma non è stato ancora mappato completamente e non si conosce ancora il numero esatto dei suoi componenti (21).

Metabolomica nella ricerca oncologica

Le applicazioni della metabolomica nella medicina sono numerose, a partire dagli studi di *screening* neonatali per l'individuazione di disordini metabolici sino a patologie legate all'invecchiamento. Un campo molto promettente di applicazione della metabolomica è la ricerca oncologica. La metabolomica si sta rivelando molto utile sia nella diagnosi che nella identificazione di nuovi bersagli molecolari per le terapie biologiche.

Il cancro è una delle malattie più devastanti e con una elevata mortalità. Numerosi studi hanno evidenziato che i tessuti e in particolare le cellule tumorali presentano un metabolismo alterato rispetto alla corrispondente parte non tumorale. In particolare in molti tumori è stata osservata una riprogrammazione metabolica, tale da permettere alle cellule tumorali un utilizzo flessibile di vie metaboliche alternative a seconda delle loro esigenze (22-24). La dipendenza delle cellule tumorali dal glucosio è nota già dagli inizi del 20° secolo dagli studi di Warburg, in cui era stato osservato che le cellule tumorali utilizzano maggiormente il metabolismo anaerobico come fonte energetica (glicolisi) anche in presenza di livelli fisiologici di ossigeno (22). Oltre al glucosio, la glutammina e gli amminoacidi non essenziali, come serina, prolina e arginina svolgono un ruolo importante nella crescita tumorale. Inoltre, vi sono tumori portatori di mutazioni in geni che codificano enzimi metabolici, i cui prodotti, denominati "oncometaboliti", possono raggiungere livelli elevati come il 2-idrossiglutarato nel glioma, e sulla base di questi, determinare una differente prognosi (25-27).

La metabolomica in campo oncologico è molto utile nella identificazione di nuovi biomarcatori, di traccianti metabolici e di bersagli molecolari. Ad esempio, la sarcosina, derivato N-metilico della glicina, è stata proposta come un possibile biomarcatore precoce per i tumori più aggressivi della prostata (28). Inoltre, sono stati sviluppati traccianti di nuova generazione per PET quali 18-fluoro-(F)-timidina, 11-Carbonio-(C)-acetato, 11C-metionina e 18F-colina, oltre al più utilizzato 18F-deossiglucosio (29). Alcuni farmaci antitumorali sono noti come farmaci antimetaboliti (anti-purine, anti-pirimidine e antagonisti dell'acido folico), che bloccano il metabolismo degli acidi nucleici (DNA e RNA), e sono utilizzati da anni nelle terapie oncologiche.

Nuove strategie antitumorali possono sfruttare bersagli molecolari che interferiscono con la disponibilità di specifici metaboliti per esempio con l'uso della lonidamina (un farmaco in grado di ridurre la glicolisi) o con il riposizionamento di farmaci non tumorali in nuovi protocolli anti tumorali per esempio le statine e la metformina (utilizzati, rispettivamente, contro il metabolismo dei lipidi e del glucosio in patologie non tumorali).

Nell'ambito dei biomarcatori, alterazioni specifiche dei profili metabolici di derivati acquosi del ciclo della fosfatidilcolina (PtdCho), rivelate con tecniche di *imaging* molecolare *in vitro* e *in vivo*, potrebbero rappresentare nuovi marcatori di diagnosi, prognosi e predizione della risposta a trattamenti antitumorali (30, 31). A tale proposito, il nostro gruppo presso l'Istituto Superiore di Sanità ha partecipato attivamente a questo percorso di ricerca traslazionale dalla cellula al

paziente, con studi di imaging molecolare e cellulare principalmente focalizzati al ciclo della PtdCho e al ruolo funzionale di enzimi in esso coinvolti in modelli di carcinoma dell'ovaio. I risultati ottenuti hanno evidenziato un alterato metabolismo della PtdCho durante la progressione tumorale del carcinoma ovarico, in linee cellulari cresciute sia *in vitro* che in ascite di topo *in vivo* (32-35). In particolare è stato osservato un accumulo di metaboliti acquosi contenenti colina (tCho, dovuti principalmente ad un aumento di fosfocolina, PCho) in linee umane di carcinoma ovarico a confronto con cellule epiteliali non tumorali della superficie dell'ovaio. Le cause molecolari dell'accumulo di PCho nelle cellule di carcinoma ovarico sono dovute principalmente ad un'attivazione delle vie cataboliche del ciclo della PtdCho (fosfolipasi C), insieme alla via di sintesi mediata dalla colina chinasi. L'inibizione della colina chinasi e di fosfolipasi C specifica per PtdCho hanno determinato una riduzione della crescita tumorale *in vitro* e *in vivo* in modelli sperimentali (32-36). Inoltre l'uso di approcci multidisciplinari che comprendono metodi di *imaging* e spettroscopia mediante NMR (*imaging*, MRI e *magnetic resonance spectroscopy*, MRS) *in vivo* su modelli preclinici idonei hanno contribuito alla comprensione dei meccanismi molecolari di progressione tumorale e di risposta alla terapia (34, 35). Questi risultati hanno fornito le basi per uno studio pilota presso il Policlinico San Donato di Milano in cui il segnale dei metaboliti contenenti colina ha permesso di discriminare con altissima sensibilità e specificità le pazienti affette da carcinoma dell'ovaio rispetto a donne non affette (37, 38). Queste evidenze potrebbero fornire le basi sia per lo sviluppo di metodi clinici non invasivi per la diagnosi e il *follow-up* della risposta a trattamenti farmacologici che per la possibile progettazione futura di terapie antitumorali basate su nuovi target metabolici per questa neoplasia.

Conclusioni

La metabolomica, anche se relativamente giovane, risulta di interesse emergente nella ricerca preclinica e clinica. Ci sono ancora limiti a diversi livelli. Non vi è ancora un approccio tecnologico in grado di misurare simultaneamente l'intero metaboloma. Vi sono ancora limiti nella standardizzazione dei protocolli quantitativi (dalla raccolta e conservazione del campione al suo frazionamento e analisi) rendendo complessi la comparazione di studi indipendenti. Nonostante si sia avviato un progetto sull'identificazione dell'intero metaboloma umano chiamato *human metabolome* sono necessari ancora molti studi per l'integrazione di una banca dati dei metaboliti. Inoltre, l'analisi bioinformatica, l'interpretazione dei dati e la traduzione dei risultati in un significato biologicamente utile richiede approcci di validazione funzionale e studi clinici a lungo termine.

Nonostante questi limiti la metabolomica, però, ha permesso di identificare alcuni possibili biomarcatori, di comprendere meccanismi molecolari, individuare nuovi bersagli molecolari, e sviluppare traccianti metabolici per studi di *imaging* funzionale. Così, nonostante i numerosi ostacoli, il crescente utilizzo della metabolomica nella ricerca clinica potrebbe presto trasformare questa tecnologia innovativa in uno dei più potenti strumenti per l'identificazione, il monitoraggio e il trattamento di numerose patologie.

Bibliografia

1. Kell DB, Oliver SG. The metabolome 18 years on: a concept comes of age. *Metabolomics* 2016;12(9):148.
2. Beger RD, Dunn W, Schmidt MA, Gross SS, Kirwan JA, Cascante M, Brennan L, Wishart DS, Oresic M, Hankemeier T, Broadhurst DI, Lane AN, Suhre K, Kastenmüller G, Sumner SJ, Thiele I, Fiehn O,

- Kaddurah-Daouk R; for “Precision Medicine and Pharmacometabolomics Task Group”-Metabolomics Society Initiative. Metabolomics enables precision medicine: “A White Paper, Community Perspective”. *Metabolomics* 2016;12(10):149.
3. Karahalil B. Overview of systems biology and omics technologies. *Curr Med Chem* 2016;23(37):4221-30.
 4. Mamas M, Dunn WB, Neyses L, Goodacre R. The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease. *Arch Toxicol* 2011;85(1):5-17.
 5. Nicholson JK, Lindon JC, Systems biology - Metabonomics. *Nature* 2008;455:1054-6.
 6. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics’: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999;29(11):1181-9.
 7. Fiehn O. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 2002;48(1-2):155-71.
 8. van der Greef J, Stroobant P, van der Heijden R. The role of analytical sciences in medical systems biology. *Curr Opin Chem Biol* 2004;8(5):559-65.
 9. Fan TW, Lane AN. Applications of NMR spectroscopy to systems biochemistry. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 2016;92-93:18-53.
 10. Everett JR. From metabonomics to pharmacometabonomics: the role of metabolic profiling in personalized medicine. *Front Pharmacol* 2016;7:297.
 11. Olivares O, Däbritz JH, King A, Gottlieb E, Halsey C. Research into cancer metabolomics: Towards a clinical metamorphosis. *Semin Cell Dev Biol* 2015;43:52-64.
 12. Lin G, Chung YL. Current opportunities and challenges of magnetic resonance spectroscopy, positron emission tomography, and mass spectrometry imaging for mapping cancer metabolism *in vivo*. *Biomed Res Int* 2014;2014:625095.
 13. Bernini P, Bertini I, Luchinat C, Nincheri P, Staderini S, Turano P. Standard operating procedures for pre-analytical handling of blood and urine for metabolomic studies and biobanks. *J Biomol NMR* 2011;49(3-4):231-43.
 14. Yin P, Peter A, Franken H, Zhao X, Neukamm SS, Rosenbaum L, Lucio M, Zell A, Häring HU, Xu G, Lehmann R. Preanalytical aspects and sample quality assessment in metabolomics studies of human blood. *Clin Chem* 2013;59(5):833-45.
 15. Veneroni S, Dugo M, Daidone MG, Iorio E, Valeri B, Pincioli P, De Bortoli M, Marchesi E, Miodini P, Taverna E, Ricci A, Canevari S, Pelosi G, Bongarzone I. Applicability of under vacuum fresh tissue sealing and cooling to omics analysis of tumor tissues. *Biopreserv Biobank* 2016;14(6):480-90.
 16. Naz S, Moreira dos Santos DC, García A, Barbas C. Analytical protocols based on LC-MS, GC-MS and CE-MS for nontargeted metabolomics of biological tissues. *Bioanalysis* 2014;6(12):1657-77.
 17. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc* 2007;2(11):2692-703.
 18. Markley JL, Brüschweiler R, Edison AS, Eghbalian HR, Powers R, Raftery D, Wishart DS. The future of NMR-based metabolomics. *Curr Opin Biotechnol* 2016;43:34-40.
 19. Emwas AH. The strengths and weaknesses of NMR spectroscopy and mass spectrometry with particular focus on metabolomics research. *Methods Mol Biol* 2015;1277:161-93.
 20. Yi L, Dong N, Yun Y, Deng B, Ren D, Liu S, Liang Y. Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. *Anal Chim Acta* 2016;914:17-34.
 21. Wishart DS, Mandal R, Stanislaus A, Ramirez-Gaona M. Cancer metabolomics and the human metabolome database. *Metabolites* 2016;6(1).

22. Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J. Gen. Physiol* 1927;8:519-30.
23. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009;324(5930):1029-33
24. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646-74.
25. Yoshida GJ. Metabolic reprogramming: the emerging concept and associated therapeutic strategies. *J Exp Clin Cancer Res* 2015;34:111.
26. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011;11(2):85-95.
27. Sciacovelli M, Frezza C. Oncometabolites: Unconventional triggers of oncogenic signalling cascades. *Free Radic Biol Med.* 2016;100:175-181.
28. Lima AR, Bastos Mde L, Carvalho M), Guedes de Pinho P. Biomarker discovery in human prostate cancer: an update in metabolomics studies. *Transl Oncol* 2016;4:357-70.
29. Challapalli A, Aboagye EO. Positron emission tomography imaging of tumor cell metabolism and application to therapy response monitoring. *Front Oncol* 2016;6:44.
30. Glunde K, Bhujwala ZM, Ronen SM. Choline metabolism in malignant transformation. *Nat Rev Cancer* 2011;11:835-48.
31. Podo F, Canevari S, Canese R, Pisanu ME, Ricci A, Iorio E. MR evaluation of response to targeted treatment in cancer cells. *NMR Biomed* 2011;24:648-72.
32. Iorio E, Mezzanzanica D, Alberti P, Spadaro F, Ramoni C, D'Ascenzo S, Millimaggi D, Pavan A, Dolo V, Canevari S, Podo F. Alterations of choline phospholipid metabolism in ovarian tumor progression. *Cancer Res.* 2005;65:9369-76.
33. Iorio E, Ricci A, Bagnoli M, Pisanu ME, Castellano G, Di Vito M, Venturini E, Glunde K, Bhujwala ZM, Mezzanzanica D, Canevari S, Podo F. Activation of phosphatidylcholine cycle enzymes in human epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2010;70:2126-35.
34. Canese R, Pisanu ME, Mezzanzanica D, Ricci A, Paris L, Bagnoli M, Valeri B, Spada M, Venditti M, Cesolini A, Rodomonte A, Giannini M, Canevari S, Podo F, Iorio E. Characterization of *in vivo* ovarian cancer models by quantitative ¹H magnetic resonance spectroscopy and diffusion-weighted imaging. *NMR Biomed* 2012;25:632-642.
35. Pisanu ME, Ricci A, Paris L, Surrentino E, Liliac L, Bagnoli M, Canevari S, Mezzanzanica D, Podo F, Iorio E, Canese R. Monitoring response to cytostatic cisplatin in a HER2(+) ovary cancer model by MRI and *in vitro* and *in vivo* MR spectroscopy. *Br J Cancer* 2014;110:625-35.
36. Granata A, Nicoletti R, Perego P, Iorio E, Krishnamachary B, Benigni F, Ricci A, Podo F, Bhujwala ZM, Canevari S, Bagnoli M, Mezzanzanica D. Global metabolic profile identifies choline kinase alpha as a key regulator of glutathione-dependent antioxidant cell defense in ovarian carcinoma. *Oncotarget* 2015;6(13):11216-30.
37. Podo F, Sardanelli F, Iorio E, Canese R, Carpinelli G, Fausto A, Canevari S. Abnormal choline phospholipid metabolism in breast and ovary cancer: Molecular bases for noninvasive imaging approaches. *Curr Med Imaging Rev* 2007;3:123-37.
38. Esseridou A, Di Leo G, Sconfienza LM, Caldiera V, Raspagliesi F, Grijuela B, Grijuela B, Hanozet F, Podo F, Sardanelli F. *In vivo* detection of choline in ovarian tumors using 3D magnetic resonance spectroscopy. *Invest Radiol* 2011;46:377-82.

METODI E APPLICAZIONI DELLA METABOLOMICA

Rossella Canese, Egidio Iorio

Servizio Grandi Strumentazioni e Core Facilities, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

In medicina, con il termine risonanza magnetica nucleare (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) si intende un insieme di tecniche capaci di studiare alterazioni morfologiche oppure seguire processi metabolici o entrambi in organismi viventi.

Tali tecniche possono essere suddivise in tecniche di immagini (*imaging*) e di spettroscopia. Infatti, allo studio anatomico in condizioni normali e patologiche con *imaging* (*Magnetic Resonance Imaging*, MRI) si può affiancare la spettroscopia di risonanza magnetica (*Magnetic Resonance Spectroscopy*, MRS) per quantificare *in vivo* i metaboliti presenti all'interno di organi o lesioni, e seguire i livelli di questi metaboliti durante l'evoluzione di una patologia o in risposta a trattamenti terapeutici.

Un sistema per risonanza magnetica è composto da un magnete che produce un alto campo magnetico statico e omogeneo al suo interno. I più diffusi sono di ampiezza pari a 1,5 tesla (T), ma oggi stanno aumentando le installazioni cliniche a 3,0 T. Per avere un'idea della grandezza di questo campo basta considerare che 1 tesla è uguale a 10.000 gauss e che il campo magnetico terrestre è circa 0,5 gauss. All'interno di questo campo è situata una bobina in grado di trasmettere un segnale a radiofrequenza che produce un campo magnetico variabile (di intensità molto minore di quello statico) e di ricevere il segnale in risposta.

L'applicazione dei due campi magnetici simultanei dà luogo al fenomeno della risonanza magnetica. La struttura cilindrica dei magneti facilita l'inserimento dei pazienti all'interno. Il campo magnetico variabile viene applicato sotto forma di impulsi in combinazione con gradienti di campo magnetico statico.

La combinazione mediante specifiche sequenze di questi due campi consente di selezionare dei piccoli volumi all'interno di un organismo vivente in modo non invasivo e di studiare il suo metabolismo *in vivo*.

La principale limitazione di questa tecnica spettroscopica è la bassa sensibilità che si traduce in un tempo aggiuntivo alla MRI diagnostica (6-15 minuti) non sempre tollerato dai pazienti e dai manager dei centri diagnostici.

A 36 anni dalla sua prima applicazione (1), la mancanza di standardizzazione nell'acquisizione e nell'analisi degli spettri ha fatto sì che ancora oggi la MRS sia considerata una "tecnica di sperimentazione" da parte di molti medici e organizzazioni sanitarie.

D'altra parte, la capacità di fare una prima diagnosi non invasiva o di aumentare la fiducia in una ipotesi diagnostica è molto apprezzata dai pazienti e medici. Di conseguenza, un numero crescente di centri diagnostici stanno incorporando la MRS nei loro protocolli clinici per gli esami in pazienti selezionati.

Le applicazioni più diffuse della MRS comprendono gli studi sul metabolismo cerebrale (sia durante il normale sviluppo che in patologie psichiatriche e neurodegenerative), il metabolismo tumorale per tutti i tumori (fatta eccezione di quelli del sangue) e le malattie metaboliche tra le quali l'obesità.

Applicazioni cliniche della MRS

Sistema nervoso centrale

Tra gli organi più studiati c'è il sistema nervoso centrale (2). Già dalle ricerche dei primi anni 90' si sono potute osservare alterazioni nei livelli di alcuni metaboliti cerebrali in diverse patologie, per esempio nei tumori cerebrali (3), nelle malattie neurodegenerative e nei disturbi comportamentali (4). In Figura 1A è mostrato un esempio di uno spettro ottenuto da una regione del lobo occipitale della corteccia di un cervello umano delimitata dai rettangoli bianchi nelle immagini pesate in T1 (o tempo di rilassamento longitudinale, è una misura del tempo richiesto ai protoni per tornare alle condizioni di equilibrio iniziale) sono mostrate a destra.

Si possono osservare diversi segnali che corrispondono a diversi gruppi chimici tramite i quali è possibile risalire all'identificazione e, con opportuni protocolli, alla quantificazione di diversi metaboliti. Molti segnali sono sovrapposti e questo rende più difficile l'analisi del singolo metabolita. In Figura 1B è mostrato uno spettro ottenuto dalla corteccia del cervello di un topo. Dal punto di vista metabolico non ci sono differenze evidenti.

a) MRS *in vivo* nella materia bianca di un volontario

b) MRS *in vivo* nell'ippocampo di un topo

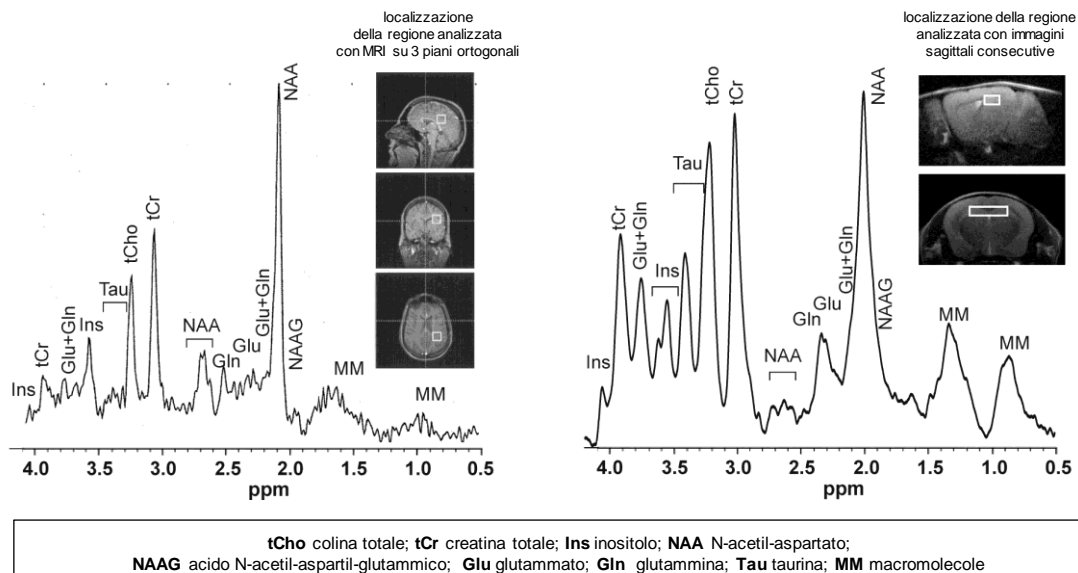


Figura 1. MRS *in vivo*: a) spettro ^1H NMR (1.5 T) localizzato nella regione occipitale di un volontario sano; b) spettro ^1H NMR (4.7 T) localizzato nell'ippocampo di un topo sano

In entrambi gli spettri possiamo osservare segnali di:

- N-acetil-aspartato (NAA, un marcatore neuronale);
- creatina totale (tCr, segnale composto dalla somma della creatina e fosfocreatina, che sono considerati buffer di energia);
- colina totale (tCho, che racchiude tutti i composti contenenti colina che sono importanti intermedi del metabolismo dei lipidi il cui aumento è associato ad una crescita cellulare anomala; questo segnale è considerato il più importante biomarcatore metabolico di malignità nei tumori);

- glutammina (Gln, è il donatore di azoto in importanti vie metaboliche quali le sintesi puriniche e pirimidiniche);
- glutammato (Glu, è un precursore dell'acido γ -amminobutirrico che sono entrambi coinvolti nella regolazione delle trasmissioni nervose);
- taurina (Tau, è uno dei principali osmoliti intracellulari e fornisce quindi un contributo importante alla regolazione del volume cellulare);
- inositolo (Ins, ha un ruolo importante nella cellula come secondo messaggero per molti segnali ormonali) e macromolecole (MM).

In stati patologici si possono osservare anche segnali dell'acido lattico (Lac, è il prodotto di degradazione della glicolisi anaerobica), dei lipidi (Lip, originati da un pool di lipidi relativamente mobili, acidi grassi e trigliceridi), di sostanze esogene che attraversano la barriera emato-encefalica (es. glicole propilenico dopo la somministrazione di alcune preparazioni), o di etanolo dopo consumo moderato di alcol.

La più importante applicazione della MRS è nell'aiuto alla diagnosi di malignità (“*grading*”) dei tumori cerebrali. Uno studio multicentrico denominato “eTumour” ha descritto un protocollo comune di acquisizione ed elaborazione degli spettri ed ha consentito di identificare un profilo spettrale per ciascun grado di malignità dei tumori cerebrali (5-7). Caratteristiche dei tumori cerebrali sono il segnale tCho molto elevato e l'assenza del segnale dell'NAA negli spettri di astrocitoma rispetto allo spettro di un cervello sano. Il segnale dell'acido lattico è presente nei tumori a basso grado e può essere il risultato di ipossia oppure di un cambiamento metabolico verso la glicolisi, che è molto frequente nei tumori (una caratteristica metabolica importante nelle cellule tumorali è l'interruttore che sposta la glicolisi a produrre lattato, anche in presenza di sufficiente ossigeno). Nei tumori ad alto grado, si osserva un segnale prominente dei lipidi e delle macromolecole (cioè dei segnali che risuonano a 2,0, 1,3, e 0,9 ppm) associati a necrosi.

Disturbi congeniti possono coinvolgere sia la biosintesi che il trasporto di creatina determinando carenza di produzione di creatina nel cervello, rivelabile con MRS. Negli ultimi anni è stata identificata la sindrome da deficit primario di creatina nella popolazione pediatrica la cui diagnosi può essere confermata solo con la MRS (8). I bambini affetti da questa sindrome presentano un ritardo mentale o psicomotorio associato ad assenza di linguaggio. Questi sintomi possono essere migliorati con l'integrazione di creatina nella dieta.

Prostata

Un'estensione della MRS da un singolo *voxel* (la più piccola unità di spazio tridimensionale in un'immagine computerizzata) a tutto un organo o distretto corporeo, è la spettroscopia tridimensionale o *imaging* spettroscopico (*Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging*, MRSI). L'MRSI effettua la mappatura metabolica di tutta la ghiandola della prostata, nella quale possono essere identificati segnali corrispondenti a citrato, creatina, colina totale, e poliammine. Le variazioni nelle concentrazioni di questi metaboliti possono essere utilizzate per identificare il carcinoma della prostata con elevata specificità. Gli spettri tratti da regioni di questo tumore mostrano una riduzione significativa dei segnali del citrato e delle poliammine accompagnata da un aumento di tCho. Questi cambiamenti nella quantità di citrato sono attribuiti al passaggio dalla produzione di citrato al metabolismo citrato-ossidante. L'aumento del segnale della tCho è da attribuire a diversi meccanismi tra i quali la sovra-espressione e attivazione degli enzimi del ciclo della fosfatidilcolina (9). L'uso del rapporto tCho/Cr per distinguere tumori aggressivi ricorrenti da tumori indolenti sembra essere molto promettente per la selezione del piano terapeutico più appropriato per il paziente (10).

Mammella e ovaio

L'innalzamento del segnale della tCho è osservato in quasi tutti i tumori solidi, tra i quali il carcinoma della mammella e dell'ovaio. Nel quadro della diagnostica, la MRS può fornire l'alta specificità necessaria per distinguere lesioni benigne da quelle maligne, complementare alla elevata sensibilità fornita dalla MRI. La MRS può anche essere applicata al carcinoma mammario come indicatore di risposta precoce in pazienti sottoposti a chemioterapia neoadiuvante: i pazienti responsivi tendono a mostrare una diminuzione dei livelli di tCho all'inizio della terapia (11-13).

Nel carcinoma ovarico studi preclinici su modelli sperimentali hanno mostrato come la spettroscopia sia in grado di rivelare alterazioni nel metabolismo durante lo sviluppo della neoplasia (14), o in seguito a terapie convenzionali (15, 16) che prevedono un arresto della crescita invece di una riduzione del volume e che sono quindi difficilmente osservabili con la MRI.

Tessuto adiposo bruno

Il tessuto adiposo nell'uomo può essere di tipo bianco o bruno. Il tessuto adiposo bianco (*White Adipose Tissue*, WAT) è un deposito di energia mentre il bruno (*Brown Adipose Tissue*, BAT) è responsabile della produzione di calore con consumo di energia. Il BAT è in grado di regolare il dispendio energetico sia basale (in base all'esposizione al freddo) che inducibile (legato alla sovralimentazione), influenzando il metabolismo di tutto l'organismo e modificando la suscettibilità all'aumento del peso corporeo. Il BAT, presente dalla nascita fino all'adolescenza, diminuisce nella vita adulta. Negli adulti normopeso i depositi di grasso bruno si trovano nelle regioni del collo, del petto e dell'addome. Differenze tra il grasso bruno e il grasso bianco sono rilevabili con MRS *in vivo* (17). Queste informazioni, unite alla MRI addominale per la quantificazione del grasso addominale, stanno assumendo sempre maggiore importanza perché iniziano ad essere considerati fattori di rischio per diverse malattie legate all'obesità, come diabete e sindrome metabolica, nonché di diverse malattie neoplastiche. Un recente studio clinico ha messo in evidenza una correlazione tra il contenuto in trigliceridi dei depositi di BAT sopraclavicolari di individui adulti (misurati con ^1H MRS *in vivo*) e il rischio di sviluppare insulino-resistenza nella sindrome metabolica, indipendentemente dalla circonferenza della vita, l'età o il rischio di diabete (18).

Uno studio preclinico recente ha studiato il ruolo del recettore mineralcorticoide degli adipociti nello sviluppo dell'obesità mediante la misura del WAT e del BAT con tecniche ^1H MRS *in vivo* in topi alimentati con una dieta ricca di grassi (17). Da questo studio è emerso che l'uso di antagonisti del recettore mineralcorticoide ha provocato un imbrunimento del grasso bianco associato ad una migliore distribuzione del grasso corporeo e tolleranza al glucosio. Questo recettore sembra quindi essere un bersaglio promettente per lo sviluppo di nuove terapie per la prevenzione e il trattamento di disfunzioni del tessuto adiposo.

Calcagno

Il profilo lipidico del midollo osseo ottenuto con MRS *in vivo* da siti scheletrici periferici, quali il calcagno, può essere uno strumento promettente per lo screening di popolazioni di grandi dimensioni volto ad identificare gli individui che hanno un alto rischio di sviluppare l'osteoporosi (19) fornendo inoltre informazioni sui cambiamenti metabolici che si verificano nel midollo osseo durante lo sviluppo dell'osteoporosi.

Conclusioni

Prima che la metabolomica basata sulla MRS possa diventare uno strumento clinico efficace e ampiamente utilizzato bisogna superare ancora alcune sfide. Queste includono la commercializzazione di strumenti di facile utilizzo e una maggior consapevolezza dei medici e dei tecnici nell'acquisizione, nell'analisi e nell'interpretazione dei dati di metabolomica.

Bibliografia

1. Ackerman JJ, Grove TH, Wong GG, Gadian DG, Radda GK. Mapping of metabolites in whole animals by ³¹P NMR using surface coils. *Nature* 1980;283:167-70.
2. McKay J, Tkac I. Quantitative *in vivo* neurochemical profiling in humans: where are we now? *Int J Epidemiol* 2016;45:1339-50.
3. Martin Noguero T, Sanchez-Gonzalez J, Martinez Barbero JP, Garcia-Figueiras R, Baleato-Gonzalez S, Luna A. Clinical Imaging of Tumor Metabolism with (1)H Magnetic Resonance Spectroscopy. *Magn Reson Imaging Clin N Am* 2016;24:57-86.
4. Xu H, Zhang H, Zhang J, Huang Q, Shen Z, Wu R. Evaluation of neuron-glia integrity by *in vivo* proton magnetic resonance spectroscopy: Implications for psychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 2016;71:563-77.
5. Opstad KS, Ladroue C, Bell BA, Griffiths JR, Howe FA. Linear discriminant analysis of brain tumour (1)H MR spectra: a comparison of classification using whole spectra versus metabolite quantification. *NMR Biomed* 2007;20:763-70.
6. Julia-Sape M, Griffiths JR, Tate RA, Howe FA, Acosta D, Postma G, Underwood J, Majós C, Arús C. Classification of brain tumours from MR spectra: the INTERPRET collaboration and its outcomes. *NMR Biomed* 2016;29:371.
7. Garcia-Gomez JM, Luts J, Julia-Sape M, Krooshof P, Tortajada S, Robledo JV, Melssen W, Fuster-García E, Olier I, Postma G, Monleón D, Moreno-Torres A, Pujol J, Candiota AP, Martínez-Bisbal MC, Suykens J, Buydens L, Celda B, Van Huffel S, Arús C, Robles M. Multiproject-multicenter evaluation of automatic brain tumor classification by magnetic resonance spectroscopy. *MAGMA* 2009;22:5-18.
8. Oz G, Alger JR, Barker PB, Bartha R, Bizzi A, Boesch C, Bolan PJ, Brindle KM, Cudalbu C, Dinger A, Dydak U, Emir UE, Frahm J, González RG, Gruber S, Gruetter R, Gupta RK, Heerschap A, Henning A, Hetherington HP, Howe FA, Hüppi PS, Hurd RE, Kantarci K, Klomp DW, Kreis R, Kruiskamp MJ, Leach MO, Lin AP, Luijten PR, Marjańska M, Maudsley AA, Meyerhoff DJ, Mountford CE, Nelson SJ, Pamir MN, Pan JW, Peet AC, Poptani H, Posse S, Pouwels PJ, Ratai EM, Ross BD, Scheenen TW, Schuster C, Smith IC, Soher BJ, Tkáč I, Vigneron DB, Kauppinen RA; MRS Consensus Group. Clinical proton MR spectroscopy in central nervous system disorders. *Radiology* 2014;270:658-79.
9. Podo F, Canevari S, Canese R, Pisanu ME, Ricci A, Iorio E. MR evaluation of response to targeted treatment in cancer cells. *NMR Biomed* 2011; 24:648-72.
10. Zhang VY, Westphalen A, Delos Santos L, Tabatabai ZL, Shinohara K, Vigneron DB, Kurhanewicz J. The role of metabolic imaging in radiation therapy of prostate cancer. *NMR Biomed* 2014;27:100-11.
11. Sharma U, Baek HM, Su MY, Jagannathan NR. *In vivo* 1H MRS in the assessment of the therapeutic response of breast cancer patients. *NMR Biomed* 2011;24:700-11.
12. Meisamy S, Bolan PJ, Baker EH, Bliss RL, Gulbahce E, Everson LI, Nelson MT, Emory TH, Tuttle TM, Yee D, Garwood M. Neoadjuvant chemotherapy of locally advanced breast cancer: predicting response with *in vivo* (1)H MR spectroscopy--a pilot study at 4 T. *Radiology* 2004; 233:424-31.

13. Haddadin IS, McIntosh A, Meisamy S, Corum C, Styczynski Snyder AL, Powell NJ, Nelson MT, Yee D, Garwood M, Bolan PJ. Metabolite quantification and high-field MRS in breast cancer. *NMR Biomed* 2009;22(1):65-76.
14. Canese R, Pisanu ME, Mezzanzanica D, Ricci A, Paris L, Bagnoli M, Valeri B, Spada M, Venditti M, Cesolini A, Rodomonte A, Giannini M, Canevari S, Podo F, Iorio E. Characterisation of *in vivo* ovarian cancer models by quantitative ¹H magnetic resonance spectroscopy and diffusion-weighted imaging. *NMR Biomed* 2012;25:632-42.
15. Nardo G, Favaro E, Curtarello M, Moserle L, Zulato E, Persano L, Rossi E, Esposito G, Crescenzi M, Casanovas O, Sattler U, Mueller-Klieser W, Biesalski B, Thews O, Canese R, Iorio E, Zanovello P, Amadori A, Indraccolo S. Glycolytic phenotype and AMP kinase modify the pathologic response of tumor xenografts to VEGF neutralization. *Cancer Res* 2011;71:4214-25.
16. Pisanu ME, Ricci A, Paris L, Surrentino E, Liliac L, Bagnoli M, Canevari S, Mezzanzanica D, Podo F, Iorio E, Canese R. Monitoring response to cytostatic cisplatin in a HER2(+) ovary cancer model by MRI and *in vitro* and *in vivo* MR spectroscopy. *Br J Cancer* 2014;110:625-35.
17. Armani A, Cinti F, Marzolla V, Morgan J3, Cranston GA, Antelmi A, Carpinelli G, Canese R, Pagotto U, Quarta C, Malorni W, Matarrese P, Marconi M, Fabbri A, Rosano G, Cinti S, Young MJ, Caprio M. Mineralocorticoid receptor antagonism induces browning of white adipose tissue through impairment of autophagy and prevents adipocyte dysfunction in high-fat-diet-fed mice. *FASEB J* 2014;28:3745-57.
18. Raiko J, Holstila M, Virtanen KA, Orava J, Saunavaara V, Niemi T, Laine J, Taittonen M, Borra RJ, Nuutila P, Parkkola R. Brown adipose tissue triglyceride content is associated with decreased insulin sensitivity, independently of age and obesity. *Diabetes Obes Metab* 2015;17:516-9.
19. Di Pietro G, Capuani S, Manenti G, Vinicola V, Fusco A, Baldi J, Scimeca M, Hagberg G, Bozzali M, Simonetti G, Tarantino U. Bone marrow lipid profiles from peripheral skeleton as potential biomarkers for osteoporosis: A ¹H-MR spectroscopy study. *Acad Radiol* 2016;23:273-83.

STRESS OSSIDATIVO, OSSIDAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI E PATOLOGIE UMANE

Annalisa Masi

Istituto per la Sintesi Organica e la Fotoreattività, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bologna

Introduzione

Le sostanze ossidanti vengono prodotte dalla cellula attraverso vari processi fisiologici quali: difesa immunitaria, reazioni enzimatiche, fosforilazione ossidativa. Esiste una complessa interazione tra la produzione di queste specie ossidanti e di quelle antiossidanti finalizzata al mantenimento di un corretto bilanciamento tra le due sostanze, definito equilibrio ossido-riduttivo o equilibrio *redox*. Quando però, nel tessuto o nella cellula, la capacità di regolazione non funziona più correttamente, a causa dell'aumento delle sostanze ossidanti o della diminuzione di quelle antiossidanti, o della combinazione dei due meccanismi, si può instaurare una situazione di squilibrio definito *stress ossidativo*.

Specie ossidanti

Le specie ossidanti possono essere classificate a seconda dell'atomo responsabile della loro reattività in: specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS), dell'azoto (*Reactive Nitrogen Species*, RNS) e del carbonio (*Reactive Carbon Species*, RCS) (1). Queste a loro volta possono essere distinte in specie radicaliche e non radicaliche a seconda che abbiano o meno un elettrone spaiato nell'orbitale esterno (Tabella 1).

Tabella 1. Specie ossidanti e relative formule

Nome	Formula
Specie non radicaliche	
Perossido di idrogeno	H ₂ O ₂
Ozono	O ₃
Ossigeno singoletto	¹ O ₂
Anione perossinitrito	ONOO ⁻
Acido ipocloroso	HClO
Specie radicaliche	
Anione superossido	O ₂ ^{-•}
Idrossile	HO [•]
Alcossile	RO [•]
Perossile	ROO [•]
Ossido nitrico	•NO
Diossido d'azoto	•NO ₂

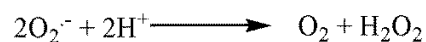
I radicali liberi sono specie estremamente reattive e instabili e la loro natura li porta a cercare la stabilità estraendo, cedendo o mettendo in compartecipazione l'elettrone mancante con le molecole con le quali vengono in contatto, che diventano a loro volta specie radicaliche. Esse pertanto innescano un meccanismo di reazione di propagazione che se non fermato può causare gravi danni alla cellula e quindi all'intero organismo.

La produzione di sostanze ossidanti formate tramite il normale metabolismo cellulare (*fonte endogena*) può subire un incremento per effetto di stimolazioni esterne (*fonte esogena*) quali: esposizione a radiazioni ionizzanti e a raggi ultravioletti (UV), ad agenti chimici quali il fumo di sigaretta, l'assunzione di farmaci.

Nell'immaginario collettivo ai radicali liberi è associato solitamente un ruolo negativo che si manifesta con l'accelerazione dell'invecchiamento dei tessuti o con l'instaurarsi di gravi patologie quali malattie cardiovascolari e neurodegenerative, diabete e cancro. In realtà la situazione è molto più complessa e i radicali nei tessuti svolgono funzioni importantissime e necessarie al corretto funzionamento delle cellule, agendo ad esempio come molecole segnale e promuovendo l'espressione dei geni che sintetizzano molecole ad azione antiossidante. L'ossido nitrico (NO), il radicale superossido (O_2^-) e il radicale ossidrilico rappresentano esempi di specie molto abbondanti in natura, la cui presenza può regolare processi a vantaggio o svantaggio della cellula.

Tra le specie radicaliche dell'azoto l'NO rappresenta uno dei più importanti mediatori biochimici. La sua sintesi avviene all'interno dell'organismo ed è regolata dall'enzima ossido nitrico sintasi, del quale sono note tre isoforme: endoteliale, neuronale e inducibile. A basse concentrazioni e, a seconda di dove viene sintetizzata, la molecola svolgerà diverse funzioni fisiologiche. A livello delle cellule neuronali svolge funzioni di neurotrasmettitore; nelle cellule endoteliali regola importanti meccanismi di vasocostrizione e vasodilatazione; mentre in caso di infiammazione è in grado di generare citotossicità nei confronti dei batteri, virus e altri microorganismi. La sua attività benefica, svolta a basse concentrazioni, viene ampiamente sfruttata dalla farmacologia per la preparazione di farmaci antiinfiammatori, antiipertensivi e con attività sul sistema cardiovascolare. Quando però la regolazione omeostatica della cellula viene a mancare si può avere una super produzione di NO non bilanciata dalla produzione di altrettante specie antiossidanti, in questo caso ci troveremo di fronte ad una condizione di stress nitrosativo che potrebbe portare a reazioni di nitrosilazione a danno delle proteine. Inoltre l'ossido nitrico può reagire con l'anione O_2^- portando alla formazione dell'anione perossinitrito che è un potente agente ossidante e che causa frammentazione del DNA e ossidazione lipidica (1, 2). L' O_2^- viene prodotto dal nostro organismo come difesa dalle infezioni batteriche. Tale reazione è catalizzata dalla nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADPH) ossidasi che interviene in risposta ad uno stimolo delle cellule infiammatorie, come i neutrofili, gli eosinofili e i macrofagi, le quali incrementano l'assunzione dell'ossigeno. La NADPH ossidasi catalizza il trasferimento di elettroni permettendo così la formazione di anioni O_2^- . Un'altra fonte metabolica è rappresentata dai mitocondri, per mezzo della catena respiratoria mitocondriale, tramite il processo di fosforilazione ossidativa. La catena respiratoria rappresenta un meccanismo molto efficiente, ma in condizioni fisiologiche una certa quota di elettroni (1-2%) sfugge al sistema di trasporto dei vari coenzimi con la formazione di anione O_2^- o perossido di idrogeno.

Nelle nostre cellule il radicale O_2^- viene poi rapidamente dismutato in perossido di idrogeno (acqua ossigenata, H_2O_2) e ossigeno (Schema 1).



Schema 1

L' H_2O_2 così prodotto rappresenta un potenziale pericolo per la cellula perché attraversa facilmente le membrane cellulari e in presenza di cationi metallici (Fe^{+2}) prende parte a reazioni

ossido riduttive, come la reazione di Fenton (Schema 2), con generazione del radicale ossidrilico (1-3).



Schema 2

Il radicale ossidrilico è considerato il radicale più reattivo nei sistemi biologici, si combina in meno di un millisecondo con le molecole nelle immediate vicinanze attraverso tre tipi di reazioni: idrogeno estrazione, addizione e trasferimento elettronico. Tale radicale è molto abbondante, reattivo ed estremamente ossidante, e questo lo rende tra le specie ossidanti più pericolose essendo in grado di attaccare qualsiasi biomolecola.

Inoltre, anche se scarsamente diffusibile, il radicale ossidrilico reagisce nel sito stesso in cui viene generato con qualunque componente cellulare (membrana plasmatica, proteine e acidi nucleici) producendo dei radicali secondari di reattività variabile che possono diffondere dal sito di origine determinando un danno a distanza (1-3).

Antiossidanti e danni ossidativi al DNA

L'organismo, al fine di contrastare l'effetto dei radicali liberi, ha sviluppato numerosi meccanismi, tra i quali la produzione di specie riducenti o antiossidanti (4). Gli antiossidanti costituiscono un sofisticato sistema di difesa, nel quale possiamo annoverare: superossido dismutasi, catalasi, glutatione perossidasi, vitamina C, vitamina E, glutatione, ubiquinone (CoQ10), acido α -lipoico ecc. Sono distribuiti sia a livello extracellulare che intracellulare e possono essere classificati secondo diversi criteri: origine (*endogeni* ed *esogeni*), natura chimica (*enzimatici* e *non enzimatici*), solubilità (*liposolubili* e *idrosolubili*), al meccanismo d'azione (*preventivi*, *scavenger*, *agenti di riparo* e *agenti di adattamento*). Negli ultimi vent'anni abbiamo assistito ad un graduale incremento nell'assunzione degli integratori antiossidanti; è però determinante comprendere che l'assunzione di concentrazioni elevate di quest'ultimi può portare ad un altro tipo di squilibrio definito *stress riduttivo*. Il cibo è sicuramente la fonte migliore di antiossidanti e una corretta alimentazione sta alla base della salvaguardia del nostro organismo. L'integrazione nutrizionale deve essere seguita solo dopo aver diagnosticato una reale situazione di stress ossidativo e sempre sotto la guida di specialisti.

Nel momento in cui la produzione di specie ossidanti non viene controbilanciata dalla produzione di specie antiossidanti, l'eccesso di radicali presenti all'interno della cellula può attaccare qualunque substrato cellulare come i lipidi, le proteine e gli acidi nucleici.

Il DNA contenuto in ogni cellula è sottoposto a stress ossidativo che può determinare dalle 10 mila ad 1 milione di lesioni al giorno per cellula, ovvero modificazioni delle basi, rottura del singolo e doppio filamento, formazione di siti abasici, *crosslink* tra DNA e proteine. Il nostro organismo ha sviluppato un complesso meccanismo di riparazione enzimatico che lavora in continuazione al fine di contenere il danno cellulare e di proteggere il genoma da danni e mutazioni nocive. Sono noti diversi sistemi che in base al meccanismo di riparazione sono riconosciuti come: *Base Excision Repair* (BER) ripara il danno rimuovendo le basi danneggiate; *Nucleotide Excision Repair* (NER) ripara le lesioni indotte dalle radiazioni UV e da composti cancerogeni, come il fumo della sigaretta; *Mismatch Repair*, ripara gli errori di accoppiamento delle basi che possono verificarsi durante la replicazione; *Non-Homologous end Joining* e *Homologous Recombination* riparano le rotture a doppio filamento del DNA.

Quando la cellula invecchia o come conseguenza di alcune patologie, si può avere la diminuzione o addirittura la perdita di attività del sistema di riparazione con conseguente

accumulo delle lesioni. A questo punto la cellula può andare incontro a senescenza, apoptosi o all'insorgenza di una serie di fenomeni degenerativi e patologici.

Stress ossidativo e patologie

È ben nota l'associazione dello stress ossidativo con malattie infiammatorie come diabete, cancro, invecchiamento precoce, malattie cardiovascolari, malattie neurodegenerative (Parkinson, Alzheimer, ecc.) (4-6). La lista delle patologie umane in cui si può dimostrare un coinvolgimento di reazioni di stress ossidativo è lunga e in continuo aggiornamento.

Ad oggi in molti casi non è ancora possibile stabilire se l'alterazione dello stato ossidativo abbia un ruolo patogenetico, oppure se l'aumento delle specie ossidanti sia un segnale della presenza della malattia.

Individuare un valido biomarcatore delle condizioni patologiche potrebbe aiutare a capire in quali malattie le ROS/RNS hanno un ruolo causale e quindi sviluppare strategie preventive per ritardare lo sviluppo della malattia (7).

Un marcatore ideale dello stress ossidativo deve avere i seguenti requisiti:

- essere un prodotto stabile nel tempo;
- avere un ruolo nella patogenesi della malattia ed essere predittivo per lo sviluppo futuro della stessa;
- essere presente nel tessuto d'indagine o in altro tessuto che comunque rifletta le modificazioni ossidative del primo;
- essere quantificabile tramite una tecnica specifica, sensibile e riproducibile;
- non essere influenzato da fattori dietetici;
- avere una bassa variabilità biologica ed essere facilmente misurabile nella popolazione.

Tra i prodotti di ossidazione degli acidi nucleici la 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-OHdG) rappresenta il biomarcatore più utilizzato per valutare il danno ossidativo al DNA (8).

La 8-OHdG presenta un documentato potenziale mutageno che si esplica in vari modi in particolare transversioni GC----AT, errori o perdita di specificità di accoppiamento fra le basi, errori di lettura su basi adiacenti (9). Inoltre questo addotto è quantitativamente il più presente in matrici biologiche extracellulari facilmente accessibili, come sangue e urine. Durante il processo di riparazione *in vivo*, la 8-OHdG viene liberata e secreta nelle urine sia come base singola sia inclusa in tratti di sequenza di DNA; data la sua stabilità e la specificità, la concentrazione di 8-OHdG nelle urine è uno dei marcatori più affidabili e accessibili per valutare il grado di stress ossidativo sistemico.

In molte patologie, quali il cancro al polmone e al seno, si è riscontrato un innalzamento dei livelli di 8-OHdG che può essere associato ad una riduzione degli antiossidanti nel sito tumorale, o ad una forte riduzione della capacità di riparazione del DNA.

La quantificazione dei livelli di 8-OHdG rimane comunque un problema oggettivo, le tecniche utilizzate attualmente si avvalgono della cromatografia liquida ad alta prestazione (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), della gas cromatografia (*Gas Chromatography*, GC), della spettrometria di massa (*Mass Spectrometry*). Sistemi più complessi, ma anche più affidabili, prevedono l'associazione della cromatografia liquida con la massa (HPLC/MS o HPLC-MS/MS). Quest'ultima risulta essere la tecnica di misura più accurata, sensibile e selettiva, ma di non facile disponibilità e utilizzo. In questi ultimi anni sono stati messi a punto anche alcuni saggi immunoenzimatici (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) e elettroforetici (*Comet Assay*) (9-12).

La frequente incongruenza dei dati ottenuti con le diverse tecniche risiede maggiormente nei protocolli usati per l'isolamento della lesione e spesso il danno ossidativo viene sovrastimato perché indotto durante la preparazione del campione stesso.

Conclusioni

Appare evidente come lo stress ossidativo sia profondamente coinvolto nella fisiopatologia degli organismi viventi. Un approccio molecolare, per l'individuazione dei biomarcatori ossidativi, rappresenta un potente strumento di diagnosi predittiva dello stato di squilibrio, necessario nella scelta di trattamenti terapeutici mirati alla prevenzione e promozione dello stato di salute dell'individuo.

Bibliografia

1. Winterbourn CC. Biological chemistry and of reactive oxygen species. In: Chatgililoglu C, Studer A (Ed.). *Encyclopedia of radicals in chemistry, biology and materials*. Chichester, UK: Wiley and Sons; 2012. Chap. 43. p. 1259-81.
2. Leiper J, Nandi M. The therapeutic potential of targeting endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10(4):277-91.
3. Geacintov NE, Shafirovich V. Reactions of small reactive species with DNA. In: Chatgililoglu C, Studer A (Ed.). *Encyclopedia of radicals in chemistry, biology and materials*. Chichester, UK: Wiley and Sons; 2012. Chap. 44. p. 1283-317.
4. Valko M., Leibfritz D, Moncol J, Cronin M TD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(1):44-84.
5. Ferguson LR. Review Chronic inflammation and mutagenesis. *Mutat Res* 2010;690(1-2):3-11.
6. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol* 2009;7(1):65-74.
7. Griffiths HR, Møller L, Bartosz G, Bast A, Bertoni-Freddari C, Collins A, Cooke M, Coolen S, Haenen G, Hoberg AM, Loft S, Lunec J, Olinski R, Parry J, Pompella A, Poulsen H, Verhagen H, Astley SB. Biomarkers. *Mol Aspects Med* 2002;23(1-3):101-208.
8. Neeley WL, Essigmann JM. Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine. *Chem Res Toxicol* 2006;19(4):491-505.
9. Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G-T and A-C substitutions. *J Biol Chem* 1992;267(1):166-72.
10. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 2002;32(11):1102-15.
11. Cadet J, Douki T, Ravanat JL. Oxidatively Generated Damage to the Guanine Moiety of DNA: Mechanistic Aspects and Formation in Cells. *Acc Chem Res*. 2008 Aug;41(8):1075-83.
12. Gallo V, Khan A, Gonzales C, Phillips DH, Schoket B, Györfy E, Anna L, Kovács K, Møller P, Loft S, Kyrtopoulos S, Matullo G, Vineis P. Validation of biomarkers for the study of environmental carcinogens: a review. *Biomarkers* 2008;13(5):505-34.

DALLE “OMICHE” ALLA SYSTEMS MEDICINE

Chiara Romualdi, Enrica Calura

Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Padova, Padova

Introduzione

L'avvento delle nuove tecnologie omiche, in tutti i campi della biologia e della medicina, ha permesso di studiare in modo globale moltissimi aspetti della vita degli organismi viventi. Negli ultimi dieci anni si è assistito ad un incremento sempre maggiore degli studi scientifici basati su dati omici, e di conseguenza ad un incremento esponenziale dei dati biologici disponibili. Considerando per esempio il solo dato di espressione, il database GEO, che risiede al *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, contiene quasi due milioni di campioni biologici depositati.

È evidente come, in un'era in cui il dato è relativamente facile da ottenere, il collo di bottiglia è rappresentato non solo dalla gestione ma anche dall'analisi e interpretazione del dato stesso. L'analisi del singolo esperimento di trascrittomico, di *Chromatin immunoprecipitation followed by sequencing (ChIP-Seq)* è abbastanza semplice mentre l'analisi diventa complicata quando si vuole integrare in un unico modello matematico tutte le informazioni relative ai diversi livelli di regolazione della cellula. Questi tipi di approcci di integrazione, che quindi dovrebbero fornire una visione completa e generale di quello che avviene nel sistema biologico, vanno sotto il nome di approcci di biologia dei sistemi (*systems biology*).

La biologia dei sistemi è quella disciplina che cerca di comprendere il funzionamento dei sistemi biologici integrando informazioni di diversa natura e studiando la rete di connessioni dinamiche esistenti tra geni, proteine, metaboliti e altre molecole. È quindi un approccio olistico, che ha rivoluzionato il modo di studiare gli organismi viventi negli ultimi dieci anni, e che è complementare agli approcci riduzionistici che invece studiano le singole molecole tralasciando gran parte del contesto in cui operano. Gli studi di *systems biology* necessitano di un approccio interdisciplinare che integra tecniche e conoscenze biologiche, informatiche e statistiche, che siano in grado di produrre e analizzare dati, interpretandoli sia in senso matematico-statistico che biologico.

I metodi di integrazione possono dividersi in due grandi categorie: i metodi di integrazione a posteriori (quelli usati fino ad oggi) e i metodi di integrazione *ab initio*. I primi analizzano separatamente i diversi livelli di regolazione per poi integrarli successivamente. Questo approccio è facile da trattare da un punto di vista computazionale, e il processo di integrazione si basa sul concetto di confronto tra liste di oggetti. Gli approcci di integrazione *ab initio* invece si basano sulla definizione di un unico modello matematico che contiene al suo interno tutte le variabili misurate di tutti i livelli di regolazione. Modelli di questo tipo sono molto complessi e ancora di difficile trattazione, ma avrebbero il vantaggio di non filtrare i dati a nessun livello, mantenendo tutta l'informazione disponibile.

In mancanza di ipotesi sul meccanismo che si sta studiando, diventa critica la comprensione del risultato, ovvero la ricerca dei circuiti regolativi più interessanti da validare con tecniche sperimentali indipendenti e specifiche. Quello che generalmente avviene è che, a fronte di una grande quantità di risultati potenzialmente molto interessanti, solo una piccola parte viene selezionata per uno studio approfondito. Questo sbilanciamento è dettato in parte dalla mancanza

di tecniche sperimentali per lo studio massivo delle interazioni tra gli elementi della cellula, e in parte dai costi e dai tempi che i classici saggi sperimentali richiedono.

Proprio per questi aspetti i risultati biologici ottenuti da dati omici vengono ancora considerati puramente esplorativi, cioè il punto di partenza per uno studio più mirato. In alcuni contesti però le potenzialità delle tecnologie di *Next Generation Sequencing* (NGS) sono state ampiamente riconosciute e la loro applicazione è sempre più promossa.

Medicina di precisione o personalizzata

Il termine medicina di precisione è un concetto che negli ultimi anni si è affermato come la nuova frontiera della pratica medica. Si definisce medicina di precisione la capacità di disegnare trattamenti farmacologici mirati alle esigenze dei singoli pazienti sulla base di informazioni genetiche, molecolari, cliniche che contraddistinguono il paziente e lo accomunano ad altri con manifestazioni cliniche simili. L'obiettivo è quello di migliorare l'esito della terapia riducendo al minimo gli effetti collaterali ed evitando trattamenti inutilmente invasivi.

In questo contesto, l'utilizzo e la convergenza delle discipline omiche nella pratica medica hanno ampliato lo scopo della medicina di precisione migliorando la classificazione delle malattie, la prognosi dei pazienti e permettendo nuovi approcci terapeutici. Tra tutte le nuove tecnologie, sicuramente il sequenziamento di DNA è quello che ha influito maggiormente in questa rivoluzione. L'utilizzo di test per specifiche mutazioni ha modificato la classificazione di alcuni tipi di tumore ed è diventata una pratica di routine per la scelta della migliore terapia oncologica. Per quanto riguarda invece il sequenziamento dell'RNA, ci sono sempre più studi che hanno identificato marcatori molecolari la cui espressione è specifica di determinate condizioni patologiche o di prognosi più o meno sfavorevole. La loro capacità predittiva è spesso forte, perché ad esempio strettamente legati all'attività della cellula tumorale, e anche se il loro utilizzo nella pratica clinica è ancora lontano, questo approccio fornisce bersagli molecolari per lo sviluppo di nuove strategie di intervento.

Integrazione dei dati generati dalle tecnologie “omiche”

Tra gli approcci solitamente utilizzati per l'analisi dei dati omici, quelli di integrazione possono sicuramente giocare un ruolo importante per la stratificazione e la classificazione dei pazienti. Tra questi le analisi dei *pathway* ricoprono sicuramente un ruolo chiave. I *pathway* sono mappe delle relazioni che intercorrono tra molecole presenti nella cellula: proteine, composti chimici, microRNA (miRNA), strutture cellulari di vario tipo. Possono essere suddivisi in *pathway* di segnale e *pathway* metabolici. Nei *pathway* di segnale l'evento tipico è la trasduzione di un segnale, ossia il passaggio di un'informazione tra una serie di molecole. Invece, quando si parla di *pathway* metabolici ci si riferisce all'insieme delle reazioni che avvengono nella cellula, nelle quali i reagenti, i prodotti intermedi e i prodotti finali di una reazione enzimatica sono composti chimici detti metaboliti. Le trasformazioni dei metaboliti, rappresentate dalle connessioni tra un metabolita e l'altro, sono operate da enzimi (proteine).

In genere queste mappe sono disegnate e curate manualmente e racchiudono tutte le conoscenze che si hanno nell'ambito del processo biologico che descrivono. Queste informazioni sono disponibili in database pubblici, i principali sono KEGG (realizzata dall'Università di Kyoto) e Reactome (curata dallo *European Bioinformatic Institute*), che mettono a disposizione queste mappe sia in formato grafico che in formato macchina.

La cura manuale delle mappe porta da un lato ad avere delle mappe basate su informazioni solide e validate sperimentalmente, dall'altro rende inevitabilmente lento e complesso il processo di annotazione, con la conseguenza che molte mappe purtroppo non sono aggiornate. Ad esempio i microRNA e anche i nuovi *long non coding RNA* sono scarsamente rappresentati.

I miRNA sono corti RNA non codificanti, della lunghezza media di una ventina di nucleotidi, che svolgono un ruolo importante nella regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica. Il loro meccanismo d'azione prevede l'interazione con il complesso proteico *RNA-Induced Silencing Complex* (RISC), che media la degradazione del trascritto *target* o l'inibizione della sua traduzione. Un'alterata regolazione dei miRNA può alterare i processi della cellula in cui il miRNA è coinvolto e di cui è regolatore.

Nell'ultimo decennio i miRNA sono stati utilizzati come marcatori molecolari per patologie tumorali. Questo ruolo si deve sicuramente alla loro stabilità molecolare e alla semplicità di quantificazione ottenibile con esperimenti di trascrittomica. Per far fronte alla mancanza dei miRNA nei *pathway*, recentemente è stato proposto un metodo di integrazione chiamato "Micrographite" (1) in grado di compiere analisi di *pathway* integrate con dati di espressione di geni e miRNA misurati simultaneamente negli stessi campioni biologici, con lo scopo di trovare *pathway* o loro porzioni che meglio caratterizzano i campioni biologici oggetto dello studio.

In breve, la procedura utilizza i *pathway* di KEGG e Reactome a cui sono stati aggiunti i miRNA, eseguendo dei test multivariati sulla media di espressione e sulle correlazioni tra i geni appartenenti ad un *pathway*, tenendo conto delle relazioni biologiche descritte nel *pathway* stesso. I geni non vengono quindi analizzati singolarmente ma a gruppi sulla base delle loro relazioni funzionali. Il risultato ottenibile con Micrographite è una rete contenente elementi molecolari (geni e miRNA) che sono alterati in un gruppo di pazienti rispetto ad un altro sia come espressione sia come forza di interazione. L'efficacia di questo approccio è stata ampiamente valutata non solo su dati simulati, che hanno verificato i buoni livelli di sensibilità e specificità, ma anche su dati di espressione reali di tumore ovarico.

Il tumore epiteliale ovarico di stadio precoce: un caso studio

Il tumore epiteliale ovarico è la quarta causa di morte correlata a cancro tra le donne occidentali. Se diagnosticato in stadio avanzato, la percentuale di sopravvivenza nei cinque anni successivi alla diagnosi è del 30%; questa aumenta fino a più del 90% se la diagnosi avviene quando il tumore si trova ancora allo stadio I. Tuttavia, una diagnosi precoce è sfortunatamente poco frequente, a causa della scarsa sintomatologia di tale tumore finché esso è confinato nell'organo di origine. L'eziopatogenesi del tumore epiteliale ovarico è ignota ed esistono diverse teorie a riguardo. Studi recenti hanno ipotizzato il coinvolgimento di nicchie di cellule staminali presenti sulla superficie dell'ovaio.

Nonostante l'eterogeneità clinica e molecolare della malattia, negli ultimi 30 anni l'unico trattamento somministrato è stata la chemioterapia con cisplatino, contro la quale molti pazienti manifestano resistenza, rendendo vana la possibilità di essere curate. Si ritiene che, per migliorare le nostre capacità di cura di questo tumore, lo stadio I abbia un ruolo chiave, specialmente nella caratterizzazione dei suoi isotipi, per capirne l'eziopatogenesi, migliorare le strategie di diagnosi e disegnare terapie farmacologiche più specifiche ed efficaci.

In uno studio retrospettivo, basato su una larga coorte di pazienti di stadio I si sono misurati i profili di espressione sia di miRNA che di RNA messaggero (mRNA). Usando approcci di analisi di *pathway* come Micrographite è stato possibile identificare un circuito isotipo-specifico,

caratterizzante l'istotipo mucinoso (1). Il circuito contiene i geni caratteristici del controllo del ciclo cellulare (ciclina e chinasi ciclina-dipendenti), numerosi geni codificanti per integrine, proteine di membrana coinvolte nel riconoscimento e adesività cellulare e due miRNA che sono stati identificati come marcatori dell'istotipo mucinoso, il miRNA-194 e il miRNA-192 (2).

Conclusioni

La capacità di analizzare e interpretare i diversi segnali molecolari che vengono trasmessi all'interno delle cellule tra componenti diversi è sicuramente una delle sfide più importanti che la biologia molecolare deve affrontare. Grazie alle nuove biotecnologie riusciamo a misurare migliaia di macromolecole contenute nelle nostre cellule che danno luogo a centinaia di funzioni biologiche diverse riconducibili sia a funzioni fisiologiche sia a condizioni patologiche della cellula.

Sempre più studi ci suggeriscono che la rete di connessioni tra le macromolecole cellulari è enorme, complessa e spesso ridondante e questo ci obbliga a rivolgere i nostri sforzi allo sviluppo di strumenti capaci di guidarci nell'interpretazione di questi segnali.

La medicina di precisione ci spinge sempre di più a sviluppare queste tecniche per l'esigenza di avere sempre migliori strumenti diagnostici e prognostici a disposizione. Una visione più ampia e una aumentata capacità interpretativa delle variazioni patologiche dei dati omici ci ha permesso e ci permetterà di comprendere meglio i meccanismi di azione della cellula e ci darà strumenti di intervento innovativi e più precisi.

Bibliografia

1. Calura E, Martini P, Sales G, Beltrame L, Chiorino G, D'Incalci M, Marchini S, Romualdi C. Wiring miRNAs to pathways: a topological approach to integrate miRNA and mRNA expression profiles. *Nucleic Acids Res* 2014;42(11):e96.
2. Calura E, Fruscio R, Paracchini L, Bignotti E, Ravaggi A, Martini P, Sales G, Beltrame L, Clivio L, Ceppi L, Di Marino M, Fuso Nerini I, Zanotti L, Cavalieri D, Cattoretti G, Perego P, Milani R, Katsaros D, Tognon G, Sartori E, Pecorelli S, Mangioni C, D'Incalci M, Romualdi C, Marchini S. MiRNA landscape in stage I epithelial ovarian cancer defines the histotype specificities. *Clin Cancer Res* 2013;19(15):4114-23.

MEDICINA DI GENERE: RISCHIO DI MALATTIA E RISPOSTA ALLA TERAPIA

Walter Malorni, Federica Delunardo

Centro di riferimento Medicina di Genere, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

La Medicina di Genere si occupa delle differenze biologiche tra i due sessi e della loro influenza sullo stato di salute e di malattia rappresentando un punto d'interesse fondamentale per il Servizio Sanitario Nazionale (SSN). Le differenze tra i sessi in termini di salute non sono tuttavia legate esclusivamente alle peculiarità biologiche dell'individuo e alla sua funzione riproduttiva; con il termine "genere" si intende infatti un'accezione più ampia che include fattori ambientali, sociali e culturali. Differenze tra uomini e donne si osservano sia nella frequenza che nella sintomatologia di numerose malattie nonché nella risposta alle terapie. Un approccio di genere alla medicina, garantendo a tutti, uomini o donne, il migliore trattamento auspicabile in funzione delle specificità di genere, consente di promuovere l'appropriatezza e la personalizzazione delle cure generando risparmi per l'SSN. Per raggiungere questo obiettivo, la Medicina di Genere non deve essere una specialità a sé stante, ma un'integrazione trasversale di specialità e competenze mediche affinché si formi una cultura e una presa in carico della persona che tenga conto delle differenze di genere non solo sotto l'aspetto anatomo-fisiologico, ma anche delle differenze biologico-funzionali, psicologiche, sociali e culturali, oltre che ovviamente di risposta alle cure.

Recentemente, Agenzie e istituzioni internazionali quali *Food and Drug Administration* (FDA), *World Health Organization* (WHO) e *United Nations* (UN) hanno preso in considerazione questa nuova disciplina ed hanno "consigliato" di favorire lo sviluppo di nuove strategie preventive, diagnostiche, prognostiche e terapeutiche che tengano conto delle differenze tra uomini e donne in termini biologici, sanitari e sociopsicologici. In linea con queste Istituzioni, le differenze di genere sono oggi divenute un argomento di grande interesse anche per la comunità scientifica. Infatti, articoli sull'argomento sono apparsi su riviste internazionali importanti, incluse le più note come *Science* e *Nature*. Si va da semplici raccomandazioni e dichiarazioni d'attenzione, al proponimento di linee guida, a veri e propri lavori di medicina e biomedicina, che affrontano la questione in modo specifico. In particolare, negli ultimi cinque anni sono stati pubblicati circa 5000 lavori clinici e di biologia sperimentale su riviste scientifiche. Sono nate alcune riviste scientifiche specialistiche (es. *The Italian Journal of Gender Specific Medicine*, *Biology of Sex Differences*, ecc.) e interi Istituti specificamente dedicati alle differenze di genere (*Berlin Institute of Gender in Medicine* in Germania; *Center for Gender Based Biology* della Università della California, ecc.). Questo ha consentito alla stampa e ai mass-media in generale di recepire il tema come innovativo e di interesse pubblico.

Medicina di genere in Italia

In Italia l'interesse per la medicina di genere sta crescendo sempre di più nella comunità scientifica e ne sono testimonianza le numerose iniziative intraprese negli ultimi anni. Per

esempio il Decreto Legislativo 81/08 introduce una concezione nuova di “salute e sicurezza sul lavoro” improntata in modo sistematico sulle “differenze di genere” in relazione alla valutazione dei rischi in ambito lavorativo (1). Inoltre, sono state promosse iniziative sul piano istituzionale, come il recente *statement* (Gruppo di lavoro su Farmaci e Genere) dell’Agenzia Italiana del Farmaco del gennaio 2011, che prevede l’inclusione delle donne negli studi clinici (la cui partecipazione è attualmente solo attorno al 30% negli studi clinici di fase 3, mentre sono assenti negli studi di fase 1). Le differenze biologiche tra i due sessi, almeno in alcuni settori, sono così numerose e complesse che è evidente la necessità di arrivare, nel lungo periodo, a farmaci specificamente disegnati per le donne e per gli uomini. Oltre a ciò, le reazioni avverse ai farmaci sono 1,7 volte più frequenti nelle donne rispetto agli uomini e per questo è necessario aumentare la sicurezza dei trattamenti farmacologici. Il problema, al di là del costo individuale e sociale, porta ad un notevole aggravio in termini economici e lo sviluppo del settore potrebbe consentire un risparmio di risorse da parte dell’SSN.

Il destino cellulare in una prospettiva di genere

In generale, numerosissime patologie umane sono dovute a meccanismi patogenetici che chiamano in causa dei disturbi della morte cellulare. Un eccesso o un difetto di apoptosi, una forma di morte cellulare programmata, e di autofagia, un meccanismo cellulare di rimozione selettiva di componenti citoplasmatici danneggiati, sono esempi di fattori alla base di malattie importanti come quelle neurodegenerative, che presentano un eccesso di apoptosi, o i tumori, che presentano invece una carenza di apoptosi. Per questo motivo la modulazione del destino cellulare è divenuta un target terapeutico innovativo e molto promettente. È quindi importante sviluppare una citopatologia di genere che possa fornire i meccanismi alla base di patologie influenzate dal genere e far sviluppare una farmacologia più appropriata che tenga conto della peculiarità dell’uomo e della donna: cioè una farmacologia di genere.

Per quanto riguarda per esempio le cellule endoteliali vascolari, un nostro studio ha evidenziato importanti differenze di genere: le cellule provenienti dai maschi (XY) hanno uno stato redox “basale” diverso da quelle provenienti dalle femmine (XX). Rispetto alle cellule XX, le XY:

- producono più radicali liberi (in particolare anione superossido e perossido d’idrogeno);
- hanno livelli di glutazione più bassi;
- hanno una ridotta attività degli enzimi antiossidanti superossido dismutasi e catalasi;
- se sottoposte a stress ossidativo vanno incontro ad apoptosi, mentre quelle femminili vanno incontro a senescenza prematura e autofagia (2).

Queste differenze di genere delle cellule vasali sono basilari nel determinare le differenze uomo/donna nelle malattie cardiovascolari e rappresentano un esempio paradigmatico del possibile ruolo della citopatologia di genere nello sviluppo di metodologie di indagine e di intervento terapeutico più appropriato (3).

Quindi si può concludere che:

- anche le cellule hanno un “sesso” e questo potrebbe risultare rilevante nelle loro risposte agli agenti stressanti;
- bisogna riconsiderare alcuni aspetti dell’uso delle linee cellulari stabilizzate come modello per gli studi preclinici (ad esempio risposta ai farmaci, tossicità);
- è necessario sviluppare una citologia di genere per studi di farmacologia e tossicologia e per studi sulla patogenesi delle malattie.

Importanti differenze di genere sono state infatti descritte per alcune malattie per quanto riguarda l'incidenza, il decorso e la risposta al trattamento; due esempi importanti sono le malattie cardiovascolari e i tumori.

Malattie cardiovascolari

Le malattie cardiovascolari sono state studiate negli ultimi decenni principalmente negli uomini, ma sono la prima causa di mortalità e disabilità nelle donne (4, 5).

Per molti anni, infatti, lo studio della malattia coronarica e dei suoi fattori di rischio ha interessato prevalentemente gli uomini, data la maggiore frequenza della malattia in età media, la comparsa in età più giovane rispetto alla donna e l'elevata letalità. Nelle donne, fino alla menopausa, la frequenza della malattia risulta più bassa rispetto agli uomini; con l'avanzare dell'età le differenze si riducono e diventano simili o addirittura tale frequenza diviene più elevata nelle donne.

Studi anatomico-patologici dimostrano come, nell'uomo, le placche sulle pareti arteriose iniziano a comparire intorno all'età di 30 anni, aumentano in maniera proporzionale al livello sierico di colesterolo, alla pressione arteriosa, all'obesità e al numero di sigarette fumate, e raggiungano la "criticità" in un periodo che può andare dai 40 ai 70 anni. Nelle donne, invece, il periodo fertile (ricco in estrogeni) posticipa la data di comparsa delle placche, ma la criticità viene raggiunta all'età di 65-80 anni (15-20 anni dopo rispetto all'uomo).

I fattori di rischio per le malattie cardiovascolari hanno impatti diversi a seconda del genere; le manifestazioni cliniche delle malattie cardiovascolari e l'efficacia dei farmaci presentano importanti differenze di genere. È stata dimostrata una differenza sia nell'efficacia sia nella presenza di effetti collaterali dei vari farmaci nei due sessi e questo dato dovrebbe essere considerato per lo sviluppo di nuovi farmaci e nella decisione del tipo di terapia da intraprendere.

Tumori

Il cancro rappresenta una delle principali cause di morte, la cui incidenza è in costante aumento in tutto il mondo (6, 7). È stata osservata per una varietà di tumori disparità di genere nell'incidenza, nell'aggressività e nella prognosi. Questi dati, solo parzialmente conosciuti, vengono tuttavia sottovalutati nella pratica clinica per il trattamento dei principali tipi di cancro. Per valutare gli effetti del genere sul cancro devono essere considerate oltre le disparità anatomiche e ormonali, anche le differenze genetiche. Inoltre l'esistenza di differenze di sesso nelle risposte immunitarie, rappresentano potenziali fattori che contribuiscono al diverso esito della malattia e della risposta alle terapie nei maschi e nelle femmine. La diversa risposta immunitaria tra maschi e femmine è dovuta a:

- gli effetti diretti dei geni legati al cromosoma X o Y;
- gli effetti indiretti degli ormoni sessuali;
- i fattori di rischio ambientali che agiscono in modo sesso-specifico.

Nel corso degli ultimi decenni, gli studi clinici e di ricerca in modelli animali non hanno tenuto conto della differenza di genere. Considerate però le differenze tra maschi e femmine osservate nella localizzazione del tumore, nell'incidenza, nell'aggressività, nella risposta immunitaria e nella risposta alle terapie, appare di estrema importanza introdurre un approccio di genere nella ricerca sul cancro.

Conclusione

Una migliore comprensione delle differenze biologiche legate al sesso tra uomini e donne può portare ad un miglioramento della diagnosi e della cura di molte malattie. Nella stessa ottica, la comprensione delle specificità socio-culturali associate al genere fornirebbe risultati migliori nella prevenzione e nello sviluppo di strategie terapeutiche.

Bibliografia

1. Italia. Decreto legislativo 9 aprile 2008, n. 81. Attuazione dell'articolo 1 della legge 3 agosto 2007, n. 123, in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n.101, 30 aprile 2008 - Supplemento Ordinario n. 108.
2. Straface E, Vona R, Gambardella L, Ascione B, Marino M, Bulzomi P, Canu S, Coinu R, Rosano G, Malorni W, Franconi F. Cell sex determines anoikis resistance in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 2009;583(21):3448-54.
3. Pierdominici M, Ortona E, Franconi F, Caprio M, Straface E, Malorni W. Gender specific aspects of cell death in the cardiovascular system. *Curr Pharm Des* 2011;17(11):1046-55.
4. Appelman Y, van Rijn BB, Ten Haaf ME, Boersma E, Peters SA. Sex differences in cardiovascular risk factors and disease prevention. *Atherosclerosis* 2015;241(1):211-8.
5. Intapad S, Ojeda NB, Dasinger JH, Alexander BT. Sex differences in the developmental origins of cardiovascular disease. *Physiology (Bethesda)* 2014;29(2):122-32.
6. Dorak MT, Karpuzoglu E. Gender differences in cancer susceptibility: an inadequately addressed issue. *Front Genet* 2012;28(3):268.
7. Micheli A, Ciampichini R, Oberaigner W, Ciccolallo L, de Vries E, Izarzugaza I, Zambon P, Gatta G, De Angelis R, EURO CARE Working Group. The advantage of women in cancer survival: an analysis of EURO CARE-4 data. *Eur J Cancer* 2009;45(6):1017-27.

PARTE SECONDA
Aspetti cellulari e molecolari
dei processi patologici

TESSUTO ADIPOSO COME REGOLATORE DELL'OMEOSTASI IMMUNOLOGICA: RUOLO DELLE ADIPOCITOCHINE

Manuela Del Cornò, Gloria Donninelli, Lucia Conti, Sandra Gessani
 Centro di Riferimento Medicina di Genere, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Il Tessuto Adiposo (TA) bianco, per molto tempo considerato un tessuto inerte con l'unica funzione di deposito dei grassi, è oggi riconosciuto come un organo dinamico e complesso coinvolto in un'ampia gamma di processi biologici e metabolici, come la sensibilità all'insulina, l'appetito, le funzioni endocrine, l'infiammazione, l'immunità e il metabolismo osseo (1). Ciò fa del TA l'organo immuno-endocrino più esteso del corpo. Questa diversa prospettiva è stata imposta dall'osservazione che all'interno del TA sono rappresentate tutte le popolazioni cellulari appartenenti al sistema immunitario: cellule T *helper* (Th) residenti (cellule T CD4), cellule T citotossiche (cellule T CD8), cellule T e B regolatorie, macrofagi e cellule dendritiche (2, 3). Inoltre il TA secreta una serie di ormoni, fattori e segnali proteici, collettivamente chiamati adipocitochine, prodotti principalmente, ma non esclusivamente, dagli adipociti che esercitano la loro funzione biologica per via autocrina, paracrina e sistemica (4). Queste sostanze sono state così denominate perché collegano il TA e il sistema immunitario e svolgono un ruolo importante nell'omeostasi energetica e immunitaria e nel metabolismo.

Omeostasi immunologica del tessuto adiposo

L'omeostasi è una proprietà fondamentale dei sistemi biologici, che ne preserva la stabilità utilizzando "sensori" specializzati capaci di monitorare alcune variabili regolate chiave e di mantenerne i valori all'interno di intervalli accettabili (Figura 1) (5). Opera a livello sistemico (es. concentrazione glucosio, pressione arteriosa, temperatura), tissutale (es. numero cellulare, composizione cellulare, architettura tissutale) e cellulare (es. volume, concentrazione di ioni intracellulari, potenziale di membrana). In questo contesto, l'infiammazione può essere vista come una risposta adattativa finale a situazioni di stress causate ad esempio da infezione o da danno tissutale, volta a mantenere l'omeostasi. Se non risolta, l'infiammazione può sfociare in stati patologici. Inoltre, uno stato di infiammazione cronica di basso grado (o para-infiammazione) può accompagnare diverse patologie, anche in assenza di danno o infezione scatenante.

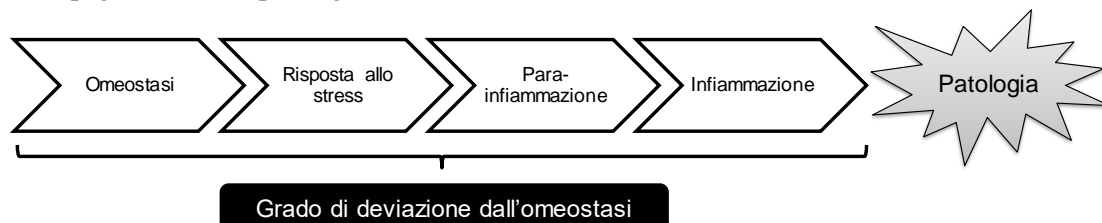


Figura 1. Omeostasi e risposta infiammatoria

Un esempio di para-infiammazione è quello relativo agli stress metabolici, come avviene nelle condizioni di obesità (1). In particolare, a livello del TA, lo stato metabolico e nutrizionale regola fortemente l'omeostasi immunologica, che può essere definita come una condizione di equilibrio tra attivazione e tolleranza del sistema immunitario. Numerosi studi condotti sia in modelli animali che nell'uomo hanno evidenziato come l'eccessivo accumulo di grasso determini cambiamenti molto profondi nella tipologia di cellule immuni presenti nel TA viscerale. Nella condizione di normopeso nel TA sono abbondanti le popolazioni con attività anti-infiammatoria (macrofagi M2, linfociti Th2, eosinofili, cellule T regolatorie), che attraverso la produzione di fattori inibitori tengono sotto controllo le cellule effettrici dell'infiammazione, mentre sono poco rappresentati i tipi cellulari con proprietà pro-infiammatorie (macrofagi M1, linfociti Th1) responsabili del rilascio di citochine/chemochine che promuovono l'infiammazione. Al contrario, l'obesità determina un cambiamento nel fenotipo e nel numero delle cellule immunitarie verso una risposta infiammatoria tipica M1/Th1 (6-8). L'alterato bilancio tra queste diverse popolazioni, caratteristico dell'obesità, è un regolatore chiave dell'infiammazione e dell'omeostasi del TA e contribuisce all'insorgenza delle maggiori complicanze obesità-associate.

Adipocitochine

Il tessuto adiposo bianco secerne oltre 100 tipi di molecole biologicamente attive, complessivamente denominate adipocitochine o adipochine (4). Le adipocitochine sono una classe di proteine, estremamente eterogenee per struttura e funzione, coinvolte in vari processi fisiologici e patologici, secrete non soltanto dagli adipociti, ma anche dalle cellule stromovascolari e del sistema immunitario che compongono il tessuto.

Sulla base delle loro caratteristiche funzionali, esse possono essere distinte in alcune maggiori categorie che includono (Figura 2):

- Fattori che influenzano direttamente il metabolismo glucidico e la sensibilità all'insulina;
- Fattori pro-infiammatori e reattanti di fase acuta dell'infiammazione;
- Fattori pro-mitogeni e angiogenici;
- Fattori connessi con il metabolismo/trasporto dei lipidi;
- Fattori di crescita.

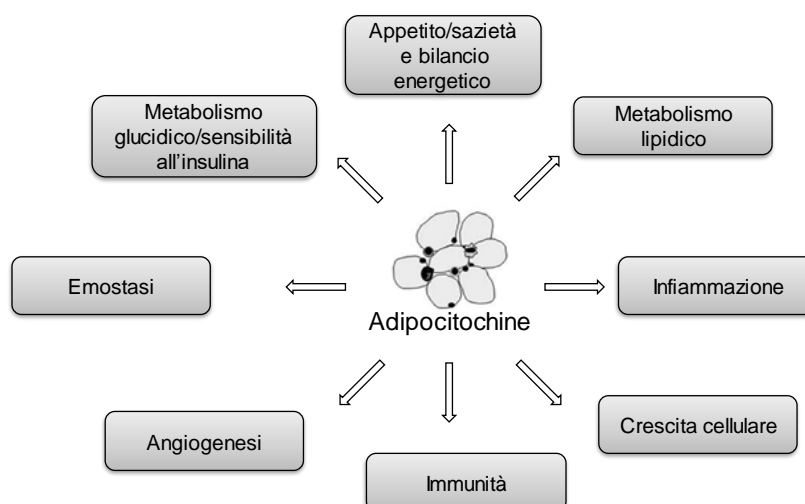


Figura 2. Caratteristiche funzionali delle adipocitochine

Inoltre, in base alla loro capacità di influenzare il comportamento e le funzioni delle cellule del sistema immunitario, le adipocitochine possono essere grossolanamente suddivise in adipocitochine anti-infiammatorie (es. adiponectina, adiposina, vaspina) e pro-infiammatorie (es. leptina, *angiopoietin-like protein 2*, resistina, visfatina, apelina, chemerina, fetuina-A, gremlina-1, lipocalina 2, nesfatina-1, progranulina). Alcune di esse, quali l'adiponectina e la leptina, sono prodotte principalmente dagli adipociti. Altre sono espresse negli adipociti, come pure nei macrofagi attivati e/o in altre cellule immunitarie. I loro effetti sono prevalentemente dovuti all'azione combinata, piuttosto che agli effetti di un singolo fattore. L'importanza del ruolo svolto dalle adipocitochine è elevato, in quanto il TA è uno dei tessuti più rappresentati e la quantità totale di molecole secrete può interessare l'intero organismo. Inoltre, per la stretta connessione degli adipociti con la rete vascolare, le adipocitochine penetrano facilmente nel circolo dopo il rilascio, costituendo così un *network* di regolazione dell'infiammazione e del metabolismo a livello locale e sistemico (9).

Obesità come condizione di rottura dell'omeostasi immunologica: il ruolo della leptina e dell'adiponectina

In accordo con la definizione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, l'obesità è una condizione caratterizzata da un eccesso di peso corporeo dovuto all'accumulo di TA viscerale e legata ad uno squilibrio tra alimentazione e consumo energetico, che altera i meccanismi di regolazione del peso, l'omeostasi metabolica e innesca un processo infiammatorio tissutale e sistemico caratterizzato dall'aumento di adipocitochine pro-infiammatorie. Data la funzione di organo endocrino e la capacità di influenzare i processi infiammatori del TA, non è sorprendente che i cambiamenti locali delle adipocitochine associati all'obesità possano avere un impatto sistemico sul sistema immunitario (4). Tra le modulazioni meglio caratterizzate delle funzioni immuni da parte di adipocitochine sono quelle esercitate dalla leptina e dall'adiponectina, molecole chiave nell'interazione tra obesità e sistema immunitario.

I livelli di leptina, regolati dinamicamente dallo stato nutritivo e aumentati proporzionalmente alla massa adiposa, agiscono come segnale di riserva energetica regolando a livello ipotalamico, sia l'assunzione del cibo, con la diminuzione del senso della fame, che il dispendio energetico, con l'aumento della termogenesi. Disfunzioni nutrizionali alterano drammaticamente la concentrazione di leptina da una condizione di iperleptinemia a una di ipoleptinemia, osservate in obesità e malnutrizione, rispettivamente. Inoltre nell'obesità, l'iperleptinemia coesiste con una diminuita risposta alla somministrazione di leptina stessa (leptino-resistenza) (10). Deficit della leptina o del suo recettore causano non soltanto obesità severa ma anche anomalie del metabolismo del glucosio e dei lipidi ed effetti su ematopoiesi, riproduzione, angiogenesi, rimodellamento vascolare, pressione arteriosa, metabolismo osseo e attività tiroidea. Il ripristino della sensibilità alla leptina è considerato come una strategia utile per combattere l'obesità e malattie ad essa associate ed è ad oggi una delle maggiori sfide per la ricerca nel campo dell'obesità. L'adiponectina è espressa abbondantemente ed esclusivamente dall'adipocita e al contrario della leptina, i suoi livelli plasmatici diminuiscono nell'obesità. L'adiponectina possiede importanti proprietà antiaterogene, antidiabetiche e antinfiammatorie (11). È inoltre coinvolta nei segnali che promuovono la fame a livello del sistema nervoso contrale, facendo quindi parte, insieme alla leptina, dei meccanismi molecolari che regolano l'appetito e il senso di sazietà.

Dal punto di vista immunologico, la leptina è una adipocitochina potentemente pro-infiammatoria, capace di controllare le funzioni e il differenziamento delle cellule immuni, indirizzandole verso *subset* pro-infiammatori. Il recettore della leptina è ubiquitariamente

espresso sulla superficie delle cellule immuni e la leptina può pertanto esercitare effetti sulla risposta innata e adattativa. Può stimolare le funzioni immunitarie, come la produzione di citochine infiammatorie nei macrofagi e aumentare la proliferazione delle cellule Th17, oppure può avere effetti inibitori come diminuire il differenziamento delle cellule T CD4⁺ in cellule T regolatorie, la maturazione delle cellule dendritiche, o il potenziale citolitico delle cellule natural killer (NK) (12). L'adiponectina, al contrario, possiede importanti attività anti-infiammatorie essendo capace di inibire l'azione del fattore di necrosi tumorale α (TNF- α) e stimolare quella di interleuchina 10 (IL-10), ridurre l'attivazione macrofagica promuovendo un fenotipo M2, e l'espressione di molecole di adesione monocitaria (13). Inoltre, l'adiponectina è stata descritta come regolatore negativo della funzionalità delle cellule NK (14) e delle cellule T (15), sebbene in altri studi determini l'attivazione di cellule dendritiche e di una risposta pro-infiammatoria Th1 e Th17 (16). Leptina e adiponectina sembrano pertanto essere molecole chiave, legate allo stato nutrizionale, nella rottura dell'omeostasi immunologica e metabolica osservata nell'obesità (17).

In generale, le adipocitochine secrete nel TA rappresentano la base biochimica nell'interazione funzionale tra sistema immunitario e metabolismo. La loro alterazione, osservata in obesità, contribuisce a generare uno stato flogistico e aumenta il rischio di disordini metabolici (Figura 3) (4).

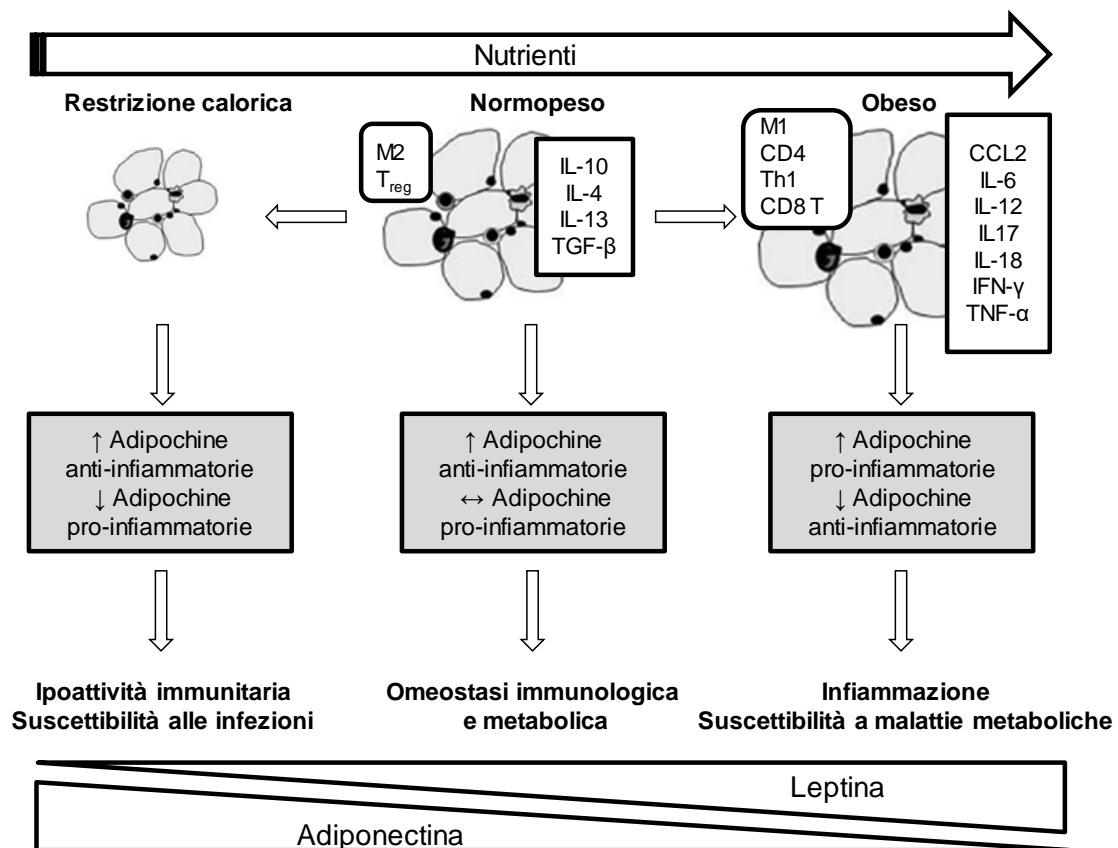


Figura 3. Effetti della restrizione calorica e dell'obesità sulle popolazioni leucocitarie, la secrezione di adipocitochine e l'infiammazione a livello del tessuto adiposo

Conclusioni

Le maggiori conoscenze raggiunte negli ultimi anni sulla biologia del TA ne hanno evidenziato un ruolo centrale nell'omeostasi energetica, la sensibilità all'insulina, il metabolismo lipidico e il sistema immunitario, nonché nella genesi di malattie ad essi collegate. La caratterizzazione di numerosi prodotti del TA, in particolare delle adipocitochine, ha fatto inoltre chiarezza sulle basi molecolari dei rapporti esistenti fra obesità, infiammazione sistemica e le maggiori complicanze che accompagnano l'obesità (patologie cardiovascolari, diabete di tipo 2, sindrome metabolica, tumori). Una delle principali sfide per la ricerca nel campo dell'obesità resta quella di individuare quali fattori, tra la moltitudine di adipocitochine prodotte e i loro effetti, siano fisiologicamente e patologicamente più importanti. Tali fattori, se modulati farmacologicamente, possono rappresentare potenziali e promettenti bersagli di interventi terapeutici.

Bibliografia

1. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(6):2548-56.
2. Exley MA, Hand L, O'Shea D, Lynch L. Interplay between the immune system and adipose tissue in obesity. *J Endocrinol* 2014;223(2):R41-8.
3. Mathis D. Immunological goings-on in visceral adipose tissue. *Cell Metab* 2013;17(6):851-9.
4. Mancuso P. The role of adipokines in chronic inflammation. *Immunotargets Ther* 2016;23(5):47-56.
5. Chovatiya R, Medzhitov R. Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Mol Cell* 2014;54(2):281-8.
6. Apostolopoulos V, de Courten MP, Stojanovska L, Blatch GL, Tangalakis K, de Courten B. The complex immunological and inflammatory network of adipose tissue in obesity. *Mol Nutr Food Res* 2016 Jan;60(1):43-57.
7. Grant RW, Dixit VD. Adipose tissue as an immunological organ. *Obesity (Silver Spring)* 2015;23(3):512-8.
8. Schipper HS, Prakken B, Kalkhoven E, Boes M. Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. Trends in endocrinology and metabolism: *Trends Endocrinol Metab* 2012;23(8):407-15.
9. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2006;6(10):772-83.
10. Aragonés G, Ardid-Ruiz A, Ibars M, Suarez M, Blade C. Modulation of leptin resistance by food compounds. *Mol Nutr Food Res* 2016;60(8):1789-803.
11. Sun Y, Li DG, Li Q, Huang L, He Z, Zhang F, Wang CB. Relationship between adiponectin gene polymorphism and lipid levels and diabetes. *J Biol Regul Homeost Agents* 2015;29(1):221-7.
12. Procaccini C, Jirillo E, Matarese G. Leptin as an immunomodulator. *Mol Aspects Med* 2012 Feb;33(1):35-45.
13. Okamoto Y, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Libby P. Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond)* 2006;110(3):267-78.
14. Kim KY, Kim JK, Han SH, Lim JS, Kim KI, Cho DH, et al. Adiponectin is a negative regulator of NK cell cytotoxicity. *J Immunol* 2006;176(10):5958-64.
15. Wilk S, Scheibenbogen C, Bauer S, Jenke A, Rother M, Guerreiro M, et al. Adiponectin is a negative regulator of antigen-activated T cells. *Eur J Immunol* 2011;41(8):2323-32.

16. Jung MY, Kim HS, Hong HJ, Youn BS, Kim TS. Adiponectin induces dendritic cell activation via PLCgamma/JNK/NF-kappaB pathways, leading to Th1 and Th17 polarization. *J Immunol* 2012;188(6):2592-601.
17. Wensveen FM, Jelencic V, Valentic S, Sestan M, Wensveen TT, Theurich S, et al. NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. *Nat Immunol* 2015;16(4):376-85.

DIETA MEDITERRANEA E INFIAMMAZIONE CRONICA: IMPATTO SUI BIOMARCATORI CLASSICI ED EMERGENTI

Gloria Donninelli, Manuela Del Cornò, Sandra Gessani, Lucia Conti
Centro di Riferimento Medicina di Genere, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

L'inflammation è una componente centrale dell'immunità innata. Rappresenta una risposta locale al danno cellulare ed è caratterizzata da un punto di vista biologico da dilatazione capillare, infiltrazione leucocitaria e produzione localizzata di numerosi mediatori chimici, volti all'eliminazione dell'agente scatenante, alla riparazione del tessuto danneggiato e all'induzione di una risposta immune specifica. Pur trattandosi di un processo essenziale per l'immunosorveglianza e la difesa primaria dell'ospite, la risposta infiammatoria può essere tuttavia considerata un "amico-nemico", in quanto uno stato infiammatorio cronico di basso grado, come quello osservato in obesità, è associato ad un aumentato rischio di resistenza all'insulina e di diabete di tipo 2 (DT2), e rappresenta una condizione predisponente per diverse patologie croniche, quali le Malattie CardioVascolari (MCV), cerebrovascolari e neurodegenerative, nonché diversi tipi di tumore (1). Lo stato metabolico/nutrizionale contribuisce all'omeostasi immunologica e la dieta, così come i singoli nutrienti, possono influenzare il rischio di sviluppare queste patologie agendo direttamente sull'inflammation (1). Nei paragrafi seguenti saranno descritti i biomarcatori clinici utilizzati per rivelare e quantificare l'inflammation di basso grado, o para-inflammation, e come questi siano modulabili dai diversi regimi alimentari o da singoli componenti bioattivi della dieta.

Biomarcatori clinici dell'inflammation

I biomarcatori più comunemente utilizzati per diagnosticare i processi infiammatori e monitorare la risposta al trattamento terapeutico sono stati validati in anni di esperienza clinica e si distinguono in marcatori plasmatici e cellulari, con sensibilità e specificità diverse a seconda della causa scatenante il processo infiammatorio. I primi includono la Velocità di EritroSedimentazione (VES), la Viscosità del Plasma (VP), la Proteina C-Reattiva (PCR), il fibrinogeno, il complemento, l'omocisteina, le immunoglobuline e le citochine sieriche. Tra i marcatori cellulari, invece, sono da segnalare la conta dei globuli bianchi (*White Blood Cells*, WBC) e delle piastrine (*Platelets*, PLT), la formula leucocitaria completa, più i singoli rapporti linfociti/monociti (LMR) e neutrofili/linfociti (NLR), proposti più di recente per l'utilizzo in particolari condizioni. A questi, che vengono utilizzati per rivelare l'inflammation sistemica generalizzata, si aggiungono i biomarcatori locali, ricercati nei vari liquidi biologici (urine, feci, liquido cerebrospinale, ecc.), il cui andamento dà un'indicazione più precisa di ciò che avviene a livello di singolo organo o sistema, e sono quindi diversi a seconda del sito dell'organismo interessato dal processo infiammatorio. Nuove biomolecole, tra cui gli RNA non codificanti

(circolanti e locali), attualmente in corso di studio, sembrano promettenti come futuri marcatori di infiammazione.

Marcatori di infiammazione di basso grado e rischio di malattie cronico-degenerative

L'infiammazione cronica di basso grado è un disordine sub-clinico, caratterizzato da un'umentata concentrazione di alcuni marcatori dell'infiammazione in assenza di fattori scatenanti e di sintomi evidenti, ed è ora riconosciuta come un fattore di rischio per varie malattie cronico-degenerative. Diversi biomarcatori, sia plasmatici (PCR, fibrinogeno, omocisteina) che cellulari (WBC e PLT) sono stati proposti negli ultimi anni e vengono attualmente utilizzati per misurare l'infiammazione di basso grado, tuttavia il marcatore o la combinazione di marcatori più appropriati per monitorare questa condizione sono ancora in corso di definizione.

A partire dalla seconda metà degli anni novanta, numerosi studi epidemiologici e clinici hanno documentato l'esistenza di un'associazione statisticamente significativa tra PCR, WBC e fibrinogeno circolanti e probabilità di sviluppare eventi cardiovascolari, indicandoli quindi come marcatori affidabili. Nello specifico, la PCR (valori normali < 6 mg/L) è una proteina della fase acuta prodotta in risposta a citochine proinfiammatorie, e la sua concentrazione aumenta tanto e rapidamente nel corso di infiammazione acuta (Tabella 1). Tuttavia, concentrazioni basse, comprese tra 3 e 10 mg/L, ma anche inferiori a 3 mg/L (determinate mediante un saggio ultrasensibile) sono indicative di para-infiammazione e dell'esistenza di un processo infiammatorio all'interno della parete vascolare (2). La mortalità per MCV risulta infatti aumentata di 2 volte con valori di PCR > 3 mg/L, e dunque questo fattore rappresenta un marcatore predittivo di MCV più forte e indipendente di altri (con 3 classi di rischio riconosciute, Tabella 1), oltre che rivelare un aumentato rischio di sviluppare DT2 (insieme ad alte concentrazioni di IL-6) e alcuni tumori. Il fibrinogeno plasmatico è prodotto dal fegato e dall'endotelio ed è fondamentale nel processo della coagulazione. In associazione con la PCR, anche i valori di fibrinogeno (valori normali 200-400 mg/dL) sono indicatori molto sensibili di infiammazione vascolare (3). Al contrario, l'omocisteina, un aminoacido solforato il cui accumulo nel sangue è legato a una dieta ricca in carne e latticini e povera di vegetali, rappresenta un fattore di rischio indipendente per MCV, con 3 classi di rischio riconosciute (Tabella 1), nonché per le malattie neurodegenerative (4).

Tabella 1. Biomarcatori plasmatici dell'infiammazione e livelli di rischio per MCV

Biomarcatore	Concentrazione sierica	Livello di rischio
PCR	< 1 mg/L	basso
	1,0-3,0 mg/L	medio
	> 3,0 mg/L	alto
	> 10 mg/L	infiammazione acuta
Omocisteina	10-12 µmoli/L	basso-nullo
	13-30 µmoli/L	moderato
	30-100 µmoli/L	alto
	> 100 µmoli/L	severo

Più recentemente è stato messo in evidenza il ruolo importante delle piastrine come cellule attivamente coinvolte nell'infiammazione e nella risposta immunitaria, e valori di PLT e WBC più elevati, nell'intervallo dei valori normali, vengono ora considerati come biomarcatori cellulari emergenti di infiammazione di basso grado e di rischio MCV (5). In uno studio recente è stato proposto e validato un indicatore composito di infiammazione di basso grado (*index INFLA score*), basato sull'utilizzo combinato di 4 biomarcatori plasmatici e cellulari (PCR, WBC, PLT, NLR), relativamente facile da misurare anche a livello epidemiologico, che risulta avere un maggiore valore predittivo (6). Inoltre, citochine pro-infiammatorie quali l'IL-6 e molecole indicatrici di alterata funzionalità endoteliale (ICAM-1) sono state misurate in vari studi e considerate come ulteriori marcatori di para-infiammazione e di rischio MCV (7).

Impatto della dieta mediterranea sull'infiammazione di basso grado

L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha riconosciuto che la dieta gioca un ruolo importante nella prevenzione delle malattie croniche non trasmissibili, e che dieta e stili di vita scorretti costituiscono fattori di rischio per DT2, MCV, tumori e altre malattie su base infiammatoria attraverso l'attivazione cronica del sistema immunitario innato e la cosiddetta infiammazione di basso grado. La para-infiammazione farebbe quindi da collegamento tra stili di vita scorretti/obesità e rischio di malattia. Studi epidemiologici degli anni '60 avevano dimostrato un'associazione tra regimi alimentari "sani" (caratterizzati dal consumo preferenziale di frutta, verdure, legumi e pesce) e minore incidenza di queste malattie, evidenziando un'associazione molto forte con l'aderenza alla dieta mediterranea.

Negli ultimi 15 anni è stata messa in evidenza una forte correlazione inversa tra l'aderenza a regimi alimentari "sani", in particolare la dieta mediterranea, e i biomarcatori sistemici dell'infiammazione. Al contrario, regimi di tipo occidentale, o comunque caratterizzati dall'assunzione più o meno elevata di carne, hanno mostrato un'associazione positiva (7-9). La dieta mediterranea tradizionale è caratterizzata dal consumo di olio d'oliva come fonte di grassi, frutta fresca e secca, verdure, legumi, cereali integrali e pesce, un basso utilizzo di carne rossa e un moderato consumo di derivati del latte, carne bianca e alcol.

Importanti studi randomizzati (*ATTICA Study* sulla popolazione dell'area metropolitana di Atene; il *Nurses' Health Study* sugli infermieri statunitensi; il *PREDIMED-PREvención con Dieta MEDiterránea* popolazione spagnola) hanno mostrato e confermato la relazione inversa tra aderenza alla dieta mediterranea e marcatori di infiammazione.

Una recente revisione sistematica e meta-analisi ha riportato un'associazione inversa tra diete "sane" e valori di PCR nel 75% degli studi analizzati, e un'associazione inversa statisticamente significativa tra PCR e aderenza alla dieta mediterranea in tutti gli studi di intervento considerati (8), sottolineando l'elevato effetto protettivo/preventivo di tale dieta sull'infiammazione di basso grado. Inoltre, mediante un approccio diverso, è stata stabilita un'associazione inversa tra livelli di PCR e un alto consumo di frutta, verdure, cereali e pesce, e un'associazione diretta di PCR e IL-6 con profili alimentari caratterizzati da alto consumo di carne rossa e processata e basso consumo di frutta, verdure e cereali integrali (8).

Uno studio condotto su un'ampia coorte italiana di soggetti sani arruolati nella regione Molise (Studio MOLI-SANI) ha per la prima volta messo in relazione la dieta mediterranea tradizionale con i marcatori cellulari dell'infiammazione, dimostrando chiaramente un'associazione inversa tra aderenza alla dieta mediterranea e numero di WBC e PLT, indipendentemente da altri marcatori infiammatori quali la PCR, in accordo con i risultati di uno studio di intervento (5).

Altre revisioni sistematiche e meta-analisi hanno recentemente evidenziato che la dieta mediterranea non solo abbassa i marcatori dell'infiammazione ma migliora anche le funzioni endoteliali (7, 10). In particolare, in pazienti ad alto rischio di MCV l'aderenza alla dieta mediterranea ha mostrato un'associazione inversa con le concentrazioni plasmatiche di IL-6, del recettore del TNF e del marcatore endoteliale ICAM-1, e una relazione diretta con i livelli di adiponectina, che esercita un'attività anti-infiammatoria a livello vascolare (10).

Sebbene l'aderenza alla dieta mediterranea spesso si associa a un calo di peso, uno studio di intervento su uomini con sindrome metabolica ha rivelato che la riduzione dei parametri infiammatori indotta dalla dieta mediterranea si ottiene anche in assenza di calo di peso, sebbene l'impatto sia maggiore in associazione con una riduzione della circonferenza della vita (11).

Oltre che sul ruolo della dieta mediterranea *in toto*, la ricerca si è anche focalizzata sull'impatto che possono avere i singoli componenti bioattivi del cibo sulla para-infiammazione e sui livelli di espressione dei biomarcatori. Ci sono forti evidenze epidemiologiche che il consumo prolungato di diete ricche in polifenoli abbia un effetto preventivo sullo sviluppo delle principali malattie croniche e neurodegenerative (12). Il consumo di frutta, verdure, cioccolato fondente, tè, caffè e vino rosso, cibi ricchi in polifenoli, è in grado di modulare l'infiammazione di basso grado, e diversi studi di intervento di breve durata hanno riportato effetti positivi di tali cibi sui singoli marcatori dell'infiammazione (12). Inoltre, quando viene considerato lo stato infiammatorio generale, attraverso la costruzione dell'indicatore composito, l'associazione negativa con il contenuto di polifenoli nella dieta è anche più significativa (6). Uno studio di intervento nella coorte MOLI-SANI ha mostrato che il consumo di succo d'arancia, ricco in polifenoli, può prevenire la reazione infiammatoria (incremento di WBC e PLT) indotta da un pasto grasso, modulando funzioni cellulari a livello vascolare (13). Nella stessa coorte è stato dimostrato l'effetto benefico del consumo regolare (20 grammi/3 giorni) di cioccolato fondente, ricco di flavonoidi, sui livelli di infiammazione definiti in base ai valori di PCR plasmatica (14), in accordo con altre evidenze sull'associazione inversa tra apporto di flavonoidi e marcatori di infiammazione (12). Inoltre, il consumo di noci, particolarmente ricche in acidi grassi polinsaturi $\omega 3$, è stato inversamente correlato con i marcatori infiammatori e con il tasso di mortalità per cancro, indipendentemente dall'aderenza alla dieta mediterranea (15). In generale ci sono evidenze che il consumo di cibo con proprietà antiossidanti si associa a bassi livelli di biomarcatori infiammatori e basso rischio di MCV e disordini cronico-degenerativi (16). A tale riguardo, i componenti bioattivi dell'olio extravergine di oliva, principale fonte di grassi della dieta mediterranea, hanno dimostrato effetti misurabili sui marcatori di infiammazione e proprietà anti-ossidanti ed endotelio-protettive (17).

Conclusioni

Diversi studi hanno riportato che profili alimentari "sani" esercitano un'azione preventiva nei confronti dell'infiammazione di basso grado e che possono agire modulando vari biomarcatori, dai più noti (PCR, IL-6 e WBC) a quelli emergenti, come la conta delle piastrine e gli indicatori di funzione endoteliale, nonché i biomarcatori combinati o compositi.

Sebbene siano necessari studi prospettici osservazionali che stabiliscano definitivamente un'associazione significativa tra aderenza alla Dieta Mediterranea e riduzione del rischio di MCV e di altre malattie croniche, c'è comunque ampio consenso sugli effetti positivi di tale dieta, ricca in antiossidanti, fibre, acidi grassi polinsaturi, sulla relazione tra riduzione dei biomarcatori dell'infiammazione e diminuzione del rischio di sviluppare malattie croniche associate all'infiammazione di basso grado (Figura 1).

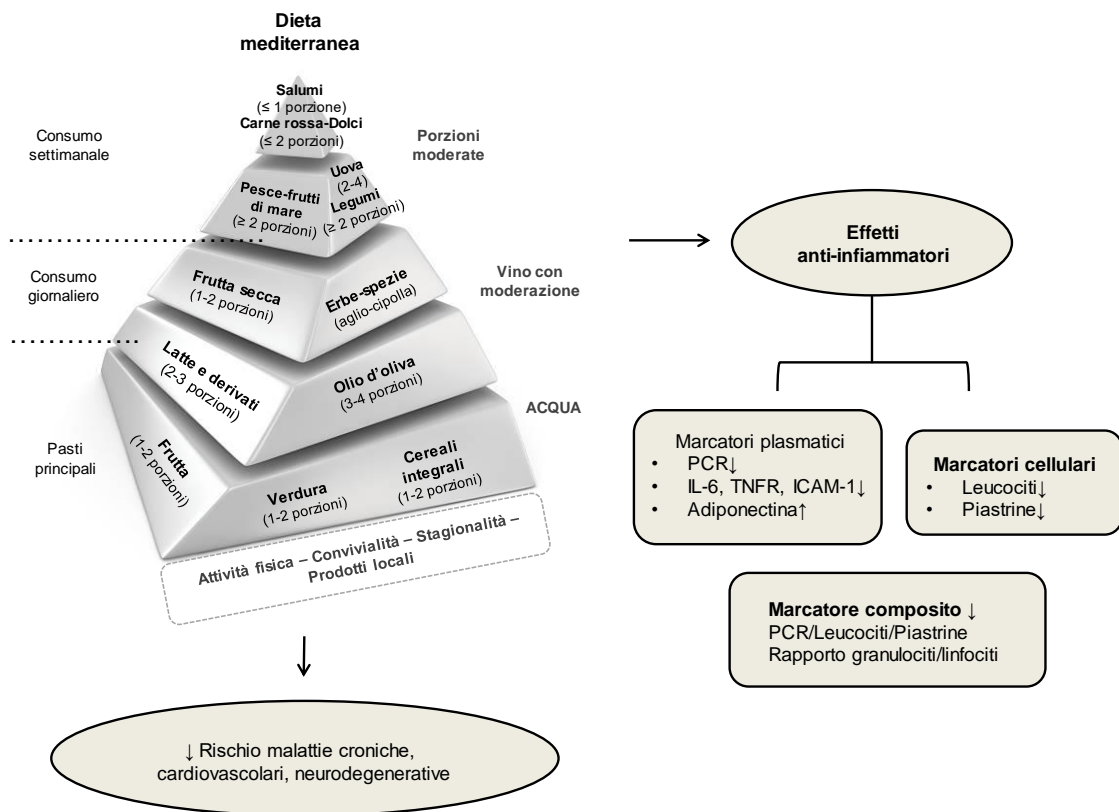


Figura 1. Rappresentazione schematica dell'impatto dell'aderenza alla dieta mediterranea sui biomarcatori dell'infiammazione di basso grado

Al contrario, diete di tipo occidentale, basate sull'elevato consumo di carne, sono associate ad un aumento di tale rischio per l'alto contenuto di nutrienti ad azione pro-infiammatoria. In virtù del fatto che sono in grado di agire su proteine della fase acuta, citochine, piastrine, cellule dell'immunità innata e fattori endoteliali, la dieta mediterranea e i suoi principali componenti possono teoricamente influenzare lo stato infiammatorio, e di conseguenza la risposta immunitaria, a tutti i livelli. Le recenti acquisizioni sulle potenzialità preventive di specifici comportamenti alimentari nei confronti di alcune patologie, così come sulla loro capacità di modulare in maniera misurabile lo stato infiammatorio, aprono nuove prospettive per lo sviluppo di strategie nutrizionali volte a ridurre il rischio di malattie cronic-degenerative e a mantenere lo stato di salute.

Bibliografia

1. Minihane AM, Vinoy S, Russell WR, Baka A, Roche HM, Tuohy KM, Teeling JL, Blaak EE, Fenech M, Vauzour D, McArdle HJ, Kremer BHA, Sterkman L, Vafeiadou K, Massi Benedetti M, Williams CM, Calde PC. Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. *Br J Nutr* 2015;114(7):999-1012.
2. Bassuk SS, Rifai N, Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein: clinical importance. *Curr Probl Cardiol* 2004; 29(8):439-93.

3. Sarwar N, Thompson AJ, Di Angelantonio E. Markers of inflammation and risk of coronary heart disease. *Dis Markers* 2009;26(5-6):217-25.
4. Sharma M, Tiwari M, Tiwari RK. Hyperhomocysteinemia: Impact on Neurodegenerative Diseases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2015;117(5):287-96.
5. Bonaccio M, Di Castelnuovo A, De Curtis A, Costanzo S, Persichillo M, Donati MB, Cerletti C, Iacoviello L, and De Gaetano G. Adherence to the Mediterranean diet is associated with lower platelet and leukocyte counts: results from the Moli-sani study. *Blood* 2014;123(19):3037-44.
6. Pounis G, Bonaccio M, Di Castelnuovo A, Costanzo S, de Curtis A, Persichillo M, Sieri S, Donati MB, Cerletti C, de Gaetano G, Iacoviello L. Polyphenol intake is associated with low-grade inflammation, using a novel data analysis from the Moli-sani study. *Thromb Haemost* 2016;115(2):344-52.
7. Schwingshackl L, Hoffmann G. Mediterranean dietary pattern, inflammation and endothelial function: a systematic review and meta-analysis of intervention trials. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2014;24(9):929-39.
8. Barbaresko J, Koch M, Schulze MB, Nöthlings U. Dietary pattern analysis and biomarkers of low-grade inflammation: a systematic literature review. *Nutr Rev* 2013;71(8):511-27.
9. Ahluwalia N, Andreeva VA, Kesse-Guyot E, Hercberg S. Dietary patterns, inflammation and the metabolic syndrome. *Diabetes Metab* 2013;39(2):99-110.
10. Casas R, Sacanella E, Urpì-Sardà M, Chiva-Blanch G, Ros E, Martinez-Gonzalez M-A, Covas M-I, Lamuela-Raventos RM, Salas-Salvadò J, Fiol M, Aros F, Estruch R. The effects of the Mediterranean diet on biomarkers of vascular wall inflammation and plaque vulnerability in subjects with high risk for cardiovascular disease. A randomized trial. *PLoS One* 2014; 9(6):e100084.
11. Richard C, Couture P, Desroches S, Lamarche B. Effect of the Mediterranean diet with and without weight loss on markers of inflammation in men with metabolic syndrome. *Obesity* 2013;21(1):51-7.
12. Rosa FT, Zulet MÁ, Marchini JS, Martínez JA. Bioactive compounds with effects on inflammation markers in humans. *Int J Food Sci Nutr* 2012;63(6):749-65.
13. Cerletti C, Gianfagna F, Tamburrelli C, De Curtis A, D'Imperio M, Coletta W, Giordano L, Lorenzet R, Rapisarda P, Reforgiato Recupero G, Rotilio D, Iacoviello L, de Gaetano G, Donati MB. Orange juice intake during a fatty meal consumption reduces the postprandial low-grade inflammatory response in healthy subjects. *Thromb Res* 2015;135(2):255-9.
14. Di Giuseppe R, Di Castelnuovo A, Centritto F, Zito F, De Curtis A, Costanzo S, Vohnout B, Sieri S, Krogh V, Donati MB, De Gaetano G, Iacoviello L. Regular Consumption of Dark Chocolate Is Associated with Low Serum Concentrations of C-Reactive Protein in a Healthy Italian Population. *J Nutr* 2008; 138: 1939-45.
15. Bonaccio M, Di Castelnuovo A, De Curtis A, Costanzo S, Bracone F, Persichillo M, Donati MB, de Gaetano G, Iacoviello L. Nut consumption is inversely associated with both cancer and total mortality in a Mediterranean population: prospective results from the Moli-sani study. *Br J Nutr* 2015;114(5):804-11.
16. Casas R, Sacanella E, Estruch R. The immune protective effect of the Mediterranean diet against chronic low-grade inflammatory diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2014;14(4):245-54.
17. Schwingshackl L, Christoph M, Hoffmann G. Effects of olive oil on markers of inflammation and endothelial function-a systematic review and meta-analysis. *Nutrients* 2015;7(9):7651-75.

METAINFIAMMAZIONE E OBESITÀ

Rossella Menghini, Viviana Casagrande, Massimo Federici
Dipartimento di Medicina dei Sistemi. Università degli Studi di Roma "Tor Vergata", Roma

Introduzione

Nelle ultime decadi si è assistito, nei Paesi industrializzati, ad un preoccupante aumento dell'incidenza e prevalenza dell'obesità e del sovrappeso. L'obesità rappresenta quindi un importante problema sanitario, che si accompagna ad aumento di morbilità e mortalità per numerose patologie croniche, fra cui insulino resistenza, diabete di tipo 2, steatosi epatica e patologie cardiovascolari. Pertanto si è concentrata molta attenzione sulla comprensione dei legami molecolari tra obesità e malattie metaboliche croniche ed è in questo contesto che è emerso il ruolo chiave da un punto di vista fisiopatologico dell'infiammazione cronica di basso grado nello sviluppo e nella progressione delle complicanze legate all'obesità. La visione del tessuto adiposo è progressivamente mutata e quello che per molto tempo è stato considerato un organo di deposito e rilascio di energia è ad oggi riconosciuto come un complesso organo endocrino in grado di secernere numerose molecole, con molteplici azioni a livello locale e sistemico (1).

La prima evidenza di un legame fondamentale fra obesità, infiammazione e insulino resistenza risale al 1993, con la dimostrazione che il tessuto adiposo di animali obesi era in grado di esprimere molecole proinfiammatorie e che esse potevano avere un effetto diretto sul metabolismo cellulare (2). Tuttavia, soltanto dieci anni dopo è stata descritta, come parte integrante del processo di infiammazione associato alle patologie metaboliche, l'infiltrazione tissutale da parte di cellule immunitarie come neutrofili, eosinofili e macrofagi. I modelli animali e umani di obesità sono caratterizzati infatti da un aumento del numero di cellule immunitarie, in particolare macrofagi, nel tessuto adiposo, direttamente proporzionale alla dimensione degli adipociti e allo stato di infiammazione sistemica (3).

Da un punto di vista fisiopatologico diversi meccanismi possono essere coinvolti in tale processo. È ormai chiaro che, in parte, l'iniziale espansione degli adipociti e pre-adipociti produce segnali chemiotattici in grado di richiamare macrofagi. Inoltre, un attento esame temporale della morfologia del tessuto adiposo durante l'obesità ha mostrato come la morte adipocitaria, determinata da necrosi semplice o da fenomeni apoptotici, costituisca di per sé uno stimolo all'attività fagocitica mediata dai macrofagi che, anziché disperdersi uniformemente nel tessuto, si distribuiscono in strutture a corona intorno alle cellule in necrosi, probabilmente allo scopo di rimodellamento del tessuto stesso (4).

Immunometabolismo

In anni più recenti si è dimostrato che oltre all'aumentato numero di macrofagi, l'obesità induce anche un cambiamento fenotipico della loro polarizzazione nel tessuto adiposo. Infatti, i macrofagi che migrano nel tessuto adiposo dei modelli animali sottoposti a dieta con alto contenuto di grassi sono differenti da quelli in normali condizioni dietetiche. L'obesità indotta dalla dieta conduce a un cambiamento nello stato di attivazione dei macrofagi del tessuto adiposo da uno stato polarizzato M2 (che negli animali magri protegge gli adipociti dall'infiammazione)

a uno stato proinfiammatorio M1 (5). La diversa polarizzazione è accompagnata da cambiamenti sia a livello trascrizionale che metabolico e si parla di immunometabolismo basato sulla premessa secondo cui l'aumento e la variazione fenotipica dei macrofagi rappresenta uno degli aspetti fondamentali delle patologie metaboliche. Mentre alterazioni metaboliche nel microambiente del tessuto adiposo possono modificare la funzione delle cellule immunitarie in modo che si inneschi il programma infiammatorio, allo stesso modo cambiamenti metabolici sistemici dovuti a obesità e diabete (es. variazioni nella disponibilità di nutrienti, metaboliti e segnali ormonali) possono alterare il metabolismo delle cellule del sistema immunitario, determinando così una risposta immunologica che si ripercuote sulle cellule adipocitarie.

Infiammazione e polarizzazione macrofagica

La dicotomia M1/M2 dello stato di polarizzazione non è chiaramente sufficiente per la comprensione dei diversi fenotipi e funzioni dei macrofagi né è semplice classificarli strettamente in questi due gruppi.

In generale i macrofagi M1 rispondono ad attivazioni di tipo T *helper* 1, intervengono nella prima fase dell'infiammazione con produzione di intermedi reattivi dell'ossigeno e dell'azoto e di citochine infiammatorie (IL-1beta, TNFalfa, IL-6), mentre i macrofagi M2 sono associati alla presenza di citochine del tipo T *helper* 2 (come IL-4 e IL-13) e possono essere identificati usando specifici marcatori quali i recettori per il mannosio e l'arginasi, per la presenza di alti livelli di IL-10 e bassi livelli di MHC-II e IL-12. I macrofagi M2 bloccano l'azione degli M1, eliminano i detriti rimasti e producono importanti fattori capaci di riparare e ricostruire il tessuto danneggiato in modo da favorire una corretta rivascolarizzazione (6). Una parziale classificazione può essere basata sul metabolismo dell'arginina che negli M1 avviene ad opera dell'enzima ossido nitrico sintasi inducibile con produzione di ossido nitrico con effetti anti-proliferativi e di protezione contro gli agenti patogeni e cellule aberranti, mentre negli M2 dipende dall'azione dell'arginasi associata a reazioni di riparazione dei tessuti via produzione dell'ornitina. Inoltre, sempre in anni recenti, si è fatta luce sull'esistenza di un legame fra metabolismo e funzione cellulare. Infatti, mentre nei macrofagi M1 si predilige l'attivazione della glicolisi con aumento del consumo di glucosio, conversione del piruvato in lattato e attenuazione dell'attività della catena respiratoria, tutti eventi metabolici in grado di fornire rapidamente energia necessaria per l'attività antimicrobica, i macrofagi M2 ottengono gran parte della loro energia dall'ossidazione degli acidi grassi e dal metabolismo mitocondriale, più lenti ma più adeguati a sostenere meccanismi riparativi (7).

Il differente metabolismo non rappresenta solo una caratteristica dei sottoinsiemi di macrofagi polarizzati, ma è anche un prerequisito per una corretta polarizzazione e regolazione della risposta infiammatoria. È importante sottolineare che l'inibizione della glicolisi piuttosto che dell'ossidazione degli acidi grassi si accompagna ad una mancata attivazione rispettivamente di M1 o M2. La rilevazione dei cambiamenti metabolici nei macrofagi potrebbe quindi essere utilizzata come strumento per valutare il loro stato di polarizzazione e il potenziale infiammatorio.

Metabolismo lipidico e fenotipo macrofagico

Un altro elemento importante nella determinazione del fenotipo macrofagico è rappresentato dal metabolismo lipidico; in generale i lipidi e i segnali da essi attivati svolgono un ruolo cruciale sia nell'integrazione delle vie metaboliche con le risposte infiammatorie che nella patogenesi

delle malattie metaboliche. Gli acidi grassi liberi, i cui livelli aumentano durante l'obesità, attivando segnali pro-infiammatori inducono una polarizzazione M1 dei macrofagi, con alterazione dell'assorbimento in tali cellule dei lipidi rilasciati dagli adipociti del tessuto adiposo in condizioni di obesità (8). Il recettore nucleare *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma* (PPARgamma) rappresenta uno dei regolatori chiave del metabolismo lipidico nei macrofagi e la sua espressione sembra essere attivata oltre che da segnali Th2, dalla presenza di acidi grassi monoinsaturi ed è stata associata ad un fenotipo di tipo M2. In modelli murini, la delezione specifica del gene in cellule mieloidi comporta infatti una riduzione drastica del numero di macrofagi M2 presenti nel tessuto adiposo e promuove condizioni di obesità e insulino resistenza. Inoltre, coculture di adipociti con macrofagi privi del gene PPARgamma mostrano una netta riduzione di assorbimento di glucosio indotto da insulina, e disfunzione mitocondriale, confermando l'ipotesi che il fenotipo dei macrofagi del tessuto adiposo svolga un ruolo essenziale nel mantenimento della funzione degli adipociti (9).

A conferma della complessità dell'attivazione della risposta dei macrofagi in diverse condizioni metaboliche, studi di proteomica hanno recentemente mostrato come il trattamento *in vitro* con una combinazione di glucosio, insulina e palmitato, condizioni di coltura che mimano cioè la sindrome metabolica, inducano nei macrofagi un fenotipo metabolico unico, distinto dall'attivazione infiammatoria classica e in parte guidato da PPARgamma, capace comunque di promuovere l'infiammazione del tessuto adiposo. La stessa attivazione metabolica è stata riscontrata anche *in vivo* sia in modelli murini di obesità che in soggetti obesi (10). È stato inoltre identificato un nuovo meccanismo attraverso il quale trigliceridi e acidi grassi non esterificati rilasciati dagli adipociti in espansione vengono tamponati dai macrofagi residenti nel tessuto adiposo mediante l'attivazione di un fenotipo differente da M1 e caratterizzato dall'espressione di geni coinvolti in uptake dei lipidi e ossidazione lisosomiale, con parziale protezione degli altri tessuti da lipotossicità indotta da obesità, suggerendo quindi che i macrofagi residenti nel tessuto adiposo contribuiscono quantitativamente allo sviluppo dell'infiammazione indotta da obesità, ma allo stesso tempo svolgono un ruolo importante nel controllo del metabolismo lipidico, indipendentemente dal loro fenotipo infiammatorio (11). Infine, studi in modelli murini hanno mostrato che una ridotta capacità di percepire e rispondere agli stimoli infiammatori a livello degli adipociti diminuisce la capacità di espansione e rimodellamento del tessuto adiposo e che in condizioni di obesità questo si associa ad un complessivo peggioramento del profilo metabolico e della steatosi epatica (12).

Conclusioni

Il metabolismo è un determinante cruciale del fenotipo funzionale acquisito dalle cellule immunitarie sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Le cellule immunitarie, a loro volta sono in grado di controllare, attraverso l'espressione di mediatori specifici, diversi aspetti del metabolismo e influenzare lo sviluppo di malattie metaboliche, quali obesità, diabete, steatosi epatica e aterosclerosi. L'interazione tra il metabolismo e le cellule immunitarie suggerisce quindi che le malattie metaboliche possano essere trattate con terapie immunologiche e viceversa che le funzioni immunologiche possano essere modulate attraverso il controllo dei processi metabolici. In ambito clinico si stanno sviluppando terapie specifiche dirette sul macrofago, come l'utilizzo di statine o di modulatori di PPARgamma, che sebbene progettate per altri scopi sono in grado di modulare anche l'attivazione di queste cellule e la loro polarizzazione. Benché in molti casi l'efficacia clinica delle terapie mirate al macrofago non sia ancora stata definita, l'identificazione di meccanismi e molecole associate alla plasticità e attivazione dei macrofagi potrebbe fornire una base importante per la nascita di nuove strategie diagnostiche e terapeutiche (13, 14).

Bibliografia

1. Rajala MW, Scherer PE. Minireview. The adipocyte: at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 2003;144:3765-73.
2. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993;259(5091):87-91.
3. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112(12):1796-808.
4. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 2005;46(11):2347-55.
5. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007;117(1):175-84.
6. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas. *J Clin Invest* 2012;122(3):787-95.
7. Galván-Peña S, O'Neill LA. Metabolic reprogramming in macrophage polarization. *Front Immunol* 2014;5:420.
8. Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med* 2012 ;18(3):363-74.
9. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, Red Eagle A, Vats D, Brombacher F, Ferrante AW, Chawla A. Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 2007 ;447(7148):1116-20.
10. Kratz M, Coats BR, Hisert KB, Hagman D, Mutskov V, Peris E, Schoenfelt KQ, Kuzma JN, Larson I, Billing PS, Landerholm RW, Crouthamel M, Gozal D, Hwang S, Singh PK, Becker L. Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages. *Cell Metab* 2014;20(4):614-25.
11. Xu X, Grijalva A, Skowronski A, van Eijk M, Serlie MJ, Ferrante AW Jr. Obesity activates a program of lysosomal-dependent lipid metabolism in adipose tissue macrophages independently of classic activation. *Cell Metab* 2013;18(6):816-30.
12. Wernstedt Asterholm I, Tao C, Morley TS, Wang QA, Delgado-Lopez F, Wang ZV, Scherer PE. Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling. *Cell Metab* 2014;20(1):103-18.
13. Menghini R, Casagrande V, Menini S, Marino A, Marzano V, Hribal ML, Gentileschi P, Lauro D, Schillaci O, Pugliese G, Sbraccia P, Urbani A, Lauro R, Federici M. TIMP3 overexpression in macrophages protects from insulin resistance, adipose inflammation, and nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Diabetes* 2012;61(2):454-62.
14. Marino A, Menghini R, Fabrizi M, Casagrande V, Mavilio M, Stoehr R, Candi E, Mauriello A, Moreno-Navarrete JM, Gómez-Serrano M, Peral B, Melino G, Lauro R, Fernandez Real JM, Federici M. ITCH deficiency protects from diet-induced obesity. *Diabetes* 2014;63(2):550-61.

STRUTTURA E FUNZIONE DEL MICROBIOTA

Silvia Turrone, Marco Candela

Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie, Università degli Studi di Bologna, Bologna

Introduzione

Oltre mille miliardi di microrganismi sono ospitati nel corpo umano e la maggior parte di essi risiede nel nostro intestino, in un *continuum* di comunità microbiche, estremamente dinamiche, alle quali ci si riferisce con il termine di microbiota intestinale umano. In termini di densità microbica, si stima che vi siano circa 10^{12} microrganismi per grammo di contenuto a livello di colon e feci. Tali microrganismi appartengono a tutti e 3 i domini della vita: Bacteria, che predominano, Archaea ed Eukarya.

Il microbiota intestinale è caratterizzato da un'immensa diversità filogenetica, con oltre 1000 specie batteriche rilevate nell'intera popolazione umana, di cui circa 150 presenti nel singolo individuo. Ad alti livelli filogenetici, questa biodiversità microbica si riduce drasticamente. La maggior parte dei batteri endogeni in individui sani, appartiene, infatti, a 2 soli phyla, Firmicutes e Bacteroidetes, che insieme costituiscono oltre il 90% delle categorie filogenetiche note del microbiota intestinale. Membri di Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, Verrucomicrobia, Lentisphaerae e Spirochaetes sono regolarmente presenti ma con abbondanze relative spesso <1%. Sin dalle prime applicazioni dei metodi cultura-indipendenti, è apparsa evidente anche un'immensa variabilità inter-individuale nella composizione del microbiota intestinale, con un unico *fingerprint* di taxa microbici per individuo (1).

Il microbioma, vale a dire il genoma collettivo del microbiota intestinale, contiene almeno 3.3 milioni di geni microbici, pari ad almeno 150 volte il genoma umano. Allo stato attuale, la frazione nota del microbioma è di circa il 60%, e include geni coinvolti nel metabolismo dei carboidrati, degli amminoacidi, di cofattori e vitamine, e nella biosintesi di metaboliti secondari.

Grazie a questo immenso patrimonio di geni, i microrganismi intestinali esercitano una profonda influenza sulla nostra fisiologia e sul nostro metabolismo. I batteri intestinali sono, ad esempio, in grado di complementare diverse fasi delle nostre vie metaboliche, producono vitamine essenziali e, soprattutto, rendono possibile l'estrazione di energia dai polisaccaridi complessi, altrimenti indigeribili, che caratterizzano la nostra dieta (2). Un'altra funzione ascrivibile al microbiota è il classico effetto barriera, ovvero la resistenza alla colonizzazione da parte di enteropatogeni. I meccanismi coinvolti sono principalmente la competizione per le risorse nutritive, l'inibizione della crescita mediante produzione di acetato o batteriocine, e la stimolazione del sistema immunitario. Il microbiota intestinale è riconosciuto come un vero e proprio componente integrale del sistema immunitario dell'ospite, capace di calibrare finemente le risposte immuni, innate e adattative, nelle diverse fasi della nostra vita. L'intima relazione che si viene ad instaurare tra i batteri intestinali e le cellule immuni mucosali è, infatti, cruciale per il mantenimento dell'omeostasi immunologica e, soprattutto, per l'educazione del sistema immunitario durante la nostra infanzia (3, 4). Inoltre, è ormai universalmente accettata l'esistenza di un *gut-microbiota-brain axis*, con un possibile ruolo del microbiota nella regolazione dell'ansia, del dolore, del comportamento, e un possibile contributo alla fisiopatologia di disordini del sistema nervoso centrale (5). Il microbiota intestinale è altresì in grado di interagire e modulare il sistema endocrino, influenzando fortemente i livelli degli ormoni legati allo stress, il nostro metabolismo e la sensazione di appetito, i livelli e la sensibilità all'insulina (6).

Plasticità del microbiota intestinale

Fino a qualche anno fa, si riteneva che la composizione del microbiota intestinale fosse stabile nel corso della vita adulta. Con l'introduzione di studi di tipo longitudinale, è apparsa evidente, invece, la sua plasticità e la sua dinamicità temporale. Il microbiota intestinale è, infatti, in grado di modificare sia la sua struttura che la sua funzionalità, in risposta a cambiamenti dei fattori ambientali ed endogeni, quali la genetica dell'ospite, la fisiologia, l'età, la dieta e lo stile di vita, mantenendo comunque un rapporto di simbiosi mutualistica con l'ospite. Tuttavia, in certe circostanze, questi stessi stressori ambientali ed endogeni, possono forzare il microbiota a passare da una configurazione mutualistica, che supportava l'omeostasi, ad un profilo disbiotico, associato alla malattia, caratterizzato da un minor livello di diversità filogenetica e funzionale, compromettendo il mutualismo e favorendo la malattia stessa. L'interruzione del mutualismo si verifica, ad esempio, in caso di infezione, infiammazione, de-regolazione del sistema immunitario, assunzione di antibiotici o un apporto dietetico anormale, con possibili ripercussioni in termini di obesità, diabete e patologie metaboliche (7).

Per quanto riguarda la genetica dell'ospite, sono state stabilite diverse correlazioni tra alcune componenti microbiche e determinati geni, come quella tra *Bifidobacterium* e il gene della lattasi, anche se si ritiene comunque che la genetica contribuisca solo in minima parte alla struttura del microbiota intestinale (8). Diversamente, il microbiota descrive una vera e propria traiettoria nel corso della nostra vita, si evolve assieme a noi, e modifica il suo profilo filogenetico e funzionale dalla nostra infanzia sino alla vecchiaia. Durante il periodo neonatale, ad esempio, siamo immersi in un complesso e dinamico scambio coi microrganismi ambientali, processo che allo svezzamento, con l'introduzione di cibi solidi, lo sviluppo della mucosa intestinale e la maturazione del sistema immune, termina con l'acquisizione di quello che viene definito *adult-type microbiota*, caratterizzato da una maggiore stabilità e da una complessità via via crescente, sia a livello filogenetico che funzionale. Il microbiota intestinale adulto mantiene, comunque, un rilevante grado di plasticità che consente di modulare le attività metaboliche del super-organismo per un'ottimizzazione dinamica dell'estrazione di energia dalla dieta, e in relazione a diversi stati fisiologici. Un caso peculiare è rappresentato dalla gravidanza, periodo in cui il microbiota della donna si presenta in uno stato di disbiosi, con l'espansione di Enterobacteriaceae, Streptococcaceae e Actinobacteria, ed è responsabile di una serie di modifiche, quali l'aumento di peso, l'aumento della glicemia e del tono infiammatorio, che sono necessarie e, addirittura benefiche, nel contesto di una gravidanza ottimale, per sostenere la crescita del feto e il successivo periodo di allattamento (9). Con l'avanzare dell'età, il microbiota intestinale può però subire delle importanti modifiche, con seria compromissione della sua struttura. Nelle persone particolarmente longeve, l'ecosistema microbico intestinale presenta un assetto generalmente infiammato e pro-infiammatorio, con riduzione della biodiversità e l'incremento di patobionti, ovvero microrganismi generalmente subdominanti, capaci di prendere il sopravvento in condizioni di infiammazione (10).

La dieta è sicuramente l'esempio più rimarcabile di plasticità del microbiota intestinale. I batteri intestinali sono in grado di rispondere a cambiamenti nelle abitudini alimentari in maniera estremamente rapida (1-3 giorni sono più che sufficienti) ma anche individuo-specifica, ovvero le variazioni correlate alla dieta non sono in grado di sormontare la variabilità inter-individuale nella composizione del microbiota. Tuttavia, nel lungo termine, persone che condividono certi profili alimentari presentano anche un'architettura simile del microbiota intestinale (11).

Metabolismo dei componenti della dieta

Il microbiota ha il potenziale di degradare una vasta gamma di substrati che raggiungono il colon, quali polisaccaridi complessi, amido e amminoacidi. In particolare, la fermentazione di polisaccaridi complessi coinvolge l'instaurarsi di consorzi simbiotici, in cui fermentatori primari e secondari agiscono in concerto tra loro. Quale esempio, i polisaccaridi complessi possono raggiungere il colon ancora intrappolati nella matrice di cellulosa oppure già in forma solubile. Nel primo caso, sono degradati ad acetato dai ruminococchi, cellulolitici specializzati, mentre nel secondo caso sono convertiti in butirrato dai membri dei *Clostridium* cluster IV e XIVa, come *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia intestinalis* ed *Eubacterium rectale*. Diversamente, gli amidi sono fermentati in maniera preferenziale da membri di Bacteroidetes ad acetato, succinato e propionato. Questi microrganismi sono estremamente eclettici dal punto di vista metabolico, capaci di degradare anche i polisaccaridi del muco intestinale e di utilizzare le diverse fonti carbonare sulla base della loro disponibilità (2). Il risultato metabolico principale è rappresentato da gli *Short-Chain Fatty Acids* (SCFA) quali l'acetato, il propionato e il butirrato, ma anche idrogeno, che è la principale fonte energetica dei fermentatori secondari, quali i metanogeni (con produzione di metano), i solforiduttori (come *Bilophila wadsworthia*, con produzione di idrogeno solforato) e gli acetogeni (come *Blautia hydrogenotrophica*, con produzione di acetato). Il metabolismo degli amminoacidi è, invece, a carico di microrganismi quali enterococchi, enterobatteri, e membri appartenenti ai *Clostridium* cluster I e XI, e comporta la generazione di prodotti metabolici diversi, quali acidi grassi a catena ramificata, metaboliti fenolici e indolici, e metilammine (12). In particolare, la trimetilammina può essere convertita, da una flavin monoossigenasi epatica, in trimetilammina-N-ossido (TMAO), molecola a cui è stato attribuito un ruolo nella patogenesi delle malattie cardiovascolari, in quanto pro-aterogena, e capace di stimolare l'attivazione e l'aggregazione piastrinica, con aumentato rischio di trombosi (13).

Diversamente, gli SCFA sono metaboliti microbici con un ruolo chiave e multifattoriale nella fisiologia dell'ospite. Sono a tutti gli effetti molecole capaci di trasdurre segnali, che agiscono come inibitori delle istonedeacetilasi (con conseguente acetilazione degli istoni e attivazione della trascrizione di determinati geni, tra cui un fattore di trascrizione specifico delle cellule T regolatorie) e come ligandi di *G-Protein Coupled Receptors* (GPCR), attraverso i quali scatenano tutta una serie di effetti relativi al controllo dell'appetito, all'estrazione e all'immagazzinamento di energia (14).

Co-evoluzione microbiota-ospite: l'esempio degli Hadza, cacciatori-raccoglitori

La recente caratterizzazione del microbiota intestinale di una popolazione di cacciatori-raccoglitori, gli Hadza della Tanzania, il cui stile di vita è altamente simile a quello dei nostri antenati nel Paleolitico, ha consentito di apprezzare quanto la co-evoluzione microbiota-ospite sia responsabile della nostra flessibilità fisiologica e dell'adattamento all'ambiente (15). Gli Hadza non coltivano piante, non allevano animali e consumano cibi *wild*, quali carne, miele, frutti del baobab, bacche e tuberi. Quest'ultimi, in particolare, costituiscono un alimento estremamente importante per gli Hadza, in quanto disponibili tutto l'anno. Le fibre che li costituiscono sono particolarmente resistenti alla digestione, per cui vengono masticate a lungo e, in parte, eliminate.

Il microbiota intestinale degli Hadza rappresenta un nuovo equilibrio, benefico e simbiotico nel loro habitat naturale, perfettamente adatto e adattato al loro stile di vita. Esso, infatti, presenta:

- aumentata abbondanza di batteri capaci di degradare le fibre, quali *Prevotella* e *Treponema*;
- assenza di bifidobatteri, verosimilmente per l'assenza di prodotti agro-pastorali nella loro dieta;
- arricchimento di batteri opportunisti, come proteobatteri e spirochete, presumibilmente derivanti dall'ambiente con cui gli Hadza sono a stretto contatto;
- divergenza correlata al sesso nella struttura del microbiota, con maggior abbondanza di *Treponema* nelle donne, probabilmente associata alla suddivisione del lavoro all'interno della comunità, con conseguente diversità della dieta tra uomini e donne.

In particolare, il microbiota degli Hadza presenta una elevata diversità rispetto a quello degli Italiani, utilizzati in questo studio come popolazione occidentale di riferimento.

Anche dal punto di vista funzionale, il microbioma degli Hadza risulta perfettamente adattato al loro stile di vita, con un arricchimento di geni coinvolti nel metabolismo di polisaccaridi. D'altro canto, nel microbioma degli italiani vi è, invece, una sovra-rappresentazione di geni coinvolti nel metabolismo di xenobiotici, indice di una risposta adattativa dei batteri intestinali alla continua esposizione agli xenobiotici, ubiquitari nei Paesi urbani industrializzati. Allo stesso modo, nel microbioma degli italiani, si ha una maggiore abbondanza di geni che conferiscono resistenza agli antibiotici, evidente conseguenza del loro uso massivo nei Paesi occidentali (16).

Recentemente, Sonnenburg e Sonnenburg (17) hanno formulato la *multiple hit hypothesis*, per cercare di spiegare come il microbiota delle società industrializzate sia cambiato e, soprattutto, abbia perso diversità nel corso del tempo. La diversità è stata probabilmente alterata in corrispondenza di diverse fasi della nostra storia evolutiva (agricoltura, introduzione di alimenti industriali e processati), e allo stesso tempo si è assistito ad una riduzione nella diversità e quantità di *Microbiota-Accessible Carbohydrates* (MAC), ovvero di polisaccaridi complessi, per noi indigeribili. Anche se la dieta è un mediatore chiave di diversità, gli avanzamenti scientifici che si sono susseguiti, hanno verosimilmente impedito la conservazione della diversità nel corso delle generazioni, e hanno probabilmente introdotto delle incompatibilità con la nostra biologia. Il microbiota intestinale delle popolazioni occidentali potrebbe quindi essere in realtà disbiotico, e predisporre l'individuo alle cosiddette malattie della civilizzazione (obesità, diabete di tipo II, malattie infiammatorie intestinali, sindrome del colon irritabile, cancro al colon retto, ecc.), proprio per la riduzione della diversità dell'ecosistema, unitamente alla perdita di componenti ancestrali, quali *Treponema*, *Prevotella*, *Xylanibacter* e *Succinivibrio*, capaci di degradare le fibre.

Conclusioni

Il microbiota intestinale è un importante partner simbiotico dell'uomo, capace di influenzare fortemente il metabolismo e il sistema immunitario, fornendo risposte adattative atte a fronteggiare i cambiamenti in variabili endogene e ambientali. Tuttavia, una serie di fattori dell'occidentalizzazione, come l'uso di antibiotici, la sanitizzazione degli ambienti, e il consumo di alimenti industriali e processati, stanno alterando profondamente, e forse irreversibilmente, l'ecosistema microbico intestinale. Bisogna pertanto porre estrema attenzione a conservare il rapporto di simbiosi mutualistica che condividiamo col nostro microbiota, partner eclettico ed essenziale per la nostra salute.

Bibliografia

1. Candela M, Turrone S, Biagi E, Carbonero F, Rampelli S, Fiorentini C, Brigidi P. Inflammation and colorectal cancer, when microbiota-host mutualism breaks. *World J Gastroenterol* 2014;20(4):908-22.
2. Koropatkin NM, Cameron EA, Martens EC. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol* 2012;10(5):323-35.
3. Thaïss CA, Zmora N, Levy M, Elinav E. The microbiome and innate immunity. *Nature* 2016;535(7610):65-74.
4. Honda K, Littman DR. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature* 2016;535(7610):75-84.
5. Sharon G, Sampson TR, Geschwind DH, Mazmanian SK. The central nervous system and the gut microbiome. *Cell* 2016;167(4):915-932.
6. Neuman H, Debelius JW, Knight R, Koren O. Microbial endocrinology: the interplay between the microbiota and the endocrine system. *FEMS Microbiol Rev* 2015;39(4):509-21.
7. Candela M, Biagi E, Maccaferri S, Turrone S, Brigidi P. Intestinal microbiota is a plastic factor responding to environmental changes. *Trends Microbiol* 2012;20(8):385-91.
8. Goodrich JK, Davenport ER, Beaumont M, Jackson MA, Knight R, Ober C, Spector TD, Bell JT, Clark AG, Ley RE. Genetic determinants of the gut microbiome in UK twins. *Cell Host Microbe* 2016;19(5):731-43.
9. Candela M, Biagi E, Turrone S, Maccaferri S, Figini P, Brigidi P. Dynamic efficiency of the human intestinal microbiota. *Crit Rev Microbiol* 2015;41(2):165-71.
10. Biagi E, Franceschi C, Rampelli S, Severgnini M, Ostan R, Turrone S, Consolandi C, Quercia S, Scurti M, Monti D, Capri M, Brigidi P, Candela M. Gut microbiota and extreme longevity. *Curr Biol* 2016;26(11):1480-5.
11. Quercia S, Candela M, Giuliani C, Turrone S, Luiselli D, Rampelli S, Brigidi P, Franceschi C, Bacalini MG, Garagnani P, Pirazzini C. From lifetime to evolution: timescales of human gut microbiota adaptation. *Front Microbiol* 2014;5:587.
12. Moco S, Candela M, Chuang E, Draper C, Cominetti O, Montoliu I, Barron D, Kussmann M, Brigidi P, Gionchetti P, Martin FP. Systems biology approaches for inflammatory bowel disease: emphasis on gut microbial metabolism. *Inflamm Bowel Dis* 2014;20(11):2104-14.
13. Zhu W, Gregory JC, Org E2, Buffa JA, Gupta N, Wang Z, Li L, Fu X, Wu Y, Mehrabian M, Sartor RB, McIntyre TM, Silverstein RL, Tang WH, DiDonato JA, Brown JM, Lusa AJ, Hazen SL. Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk. *Cell* 2016;165(1):111-24.
14. Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell* 2016;165(6):1332-45.
15. Schnorr SL, Candela M, Rampelli S, Centanni M, Consolandi C, Basaglia G, Turrone S, Biagi E, Peano C, Severgnini M, Fiori J, Gotti R, De Bellis G, Luiselli D, Brigidi P, Mabulla A, Marlowe F, Henry AG, Crittenden AN. Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nat Commun* 2014;5:3654.
16. Rampelli S, Schnorr SL, Consolandi C, Turrone S, Severgnini M, Peano C, Brigidi P, Crittenden AN, Henry AG, Candela M. Metagenome sequencing of the Hadza hunter-gatherer gut microbiota. *Curr Biol* 2015;25(13):1682-93.
17. Sonnenburg ED, Sonnenburg JL. Starving our microbial self: the deleterious consequences of a diet deficient in microbiota-accessible carbohydrates. *Cell Metab* 2014;20(5):779-86.

IMPATTO DELLA DIETA SUL MICROBIOTA INTESTINALE

Chiara Devirgiliis

Centro di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione, Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Roma

Introduzione

Il tratto gastro-intestinale dell'uomo ospita un complesso ecosistema microbico, costituito da batteri, lieviti e virus, che raggiunge nel colon il massimo grado di biodiversità e di numero di specie, con un titolo batterico pari a 10^{10} - 10^{12} CFU/mL (1, 2). Le specie commensali stabiliscono relazioni simbiotiche con l'ospite (3) giocando un ruolo chiave in processi metabolici cruciali, tanto che il microbiota intestinale viene considerato un "organo accessorio", costituito da un numero di cellule microbiche che supera di 10 volte quello delle cellule dell'individuo, e da un metagenoma, detto microbioma, che comprende un numero di geni 100 volte maggiore rispetto al genoma umano.

Per quanto riguarda la componente batterica, il microbiota intestinale è composto da due popolazioni principali appartenenti ai phyla dei Firmicutes e dei Bacteroidetes (4), a cui si aggiungono phyla meno abbondanti ma non per questo meno importanti, quali Actinobacteria, Verrucomicrobia, Proteobacteria, Fusobacteria e Cyanobacteria (2). Le proporzioni relative dei vari phyla si mantengono in equilibrio in condizioni di salute, mentre l'alterazione di una composizione microbica bilanciata, definita disbiosi, è spesso associata a disordini immuno-mediati e metabolici, testimoniando quindi che il microbiota intestinale rappresenta un importante fattore coinvolto nel mantenimento dello stato di salute dell'ospite (5).

Oligosaccaridi del latte e composizione del microbiota

Tra i fattori esogeni implicati nel mantenimento dell'eubiosi, la dieta gioca un ruolo chiave nell'influenzare la composizione e la distribuzione delle specie microbiche simbionti (6), agendo principalmente sull'equilibrio tra Bacteroidetes e Firmicutes. Già appena dopo la nascita, il tipo di allattamento definisce la composizione del microbiota intestinale del neonato, al punto che i bambini allattati al seno mostrano una maggiore biodiversità e una diversa composizione in specie microbiche rispetto ai bambini alimentati con latte artificiale. Il consumo di latte materno determina infatti la selezione e la colonizzazione dell'intestino del neonato da parte di specie naturalmente probiotiche, grazie alla presenza di carboidrati complessi e di oligosaccaridi che, agendo da prebiotici, stimolano la colonizzazione e lo sviluppo di bifidobatteri, noti per le loro caratteristiche benefiche per la salute, e di specie appartenenti al genere *Ruminococcus*, produttrici di metaboliti benefici (7, 8). Il microbiota dei neonati allattati artificialmente, invece, risulta più complesso e dominato dalla presenza di *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli* e *Clostridium difficile* (9). Gli oligosaccaridi del latte umano (*Human Milk Oligosaccharides*, HMO) sono carboidrati complessi non coniugati, estremamente abbondanti nel latte materno ma non in quello artificiale, i quali hanno recentemente ricevuto molta attenzione a causa dei loro potenziali benefici per il neonato allattato al seno. Mentre sta diventando evidente che la struttura

degli HMO determina la loro funzione specifica, la comprensione del destino metabolico degli HMO ingeriti è fondamentale per valutarne i ruoli biologici. Gli HMO sono stati a lungo considerati come metabolicamente “inerti” per l’ospite, poiché quantità considerevoli vengono espulse tramite le feci. Oggi è noto che gli HMO raggiungono intatti il colon, dove esplicano il loro effetto prebiotico promuovendo la colonizzazione dell’intestino dell’ospite da parte di batteri benefici. Gli HMO possono anche agire come recettori *decoy* (esca) e bloccare l’adesione dei patogeni microbici alle superfici epiteliali, contribuendo quindi al mantenimento di un microbiota sano. Gli oligosaccaridi che di solito vengono aggiunti al latte artificiale sono strutturalmente diversi dagli HMO e quindi molto probabilmente non sono equivalenti dal punto di vista funzionale.

Successivamente allo svezzamento e dopo l’infanzia, nell’adulto si definisce un microbiota abbastanza stabile, classificabile in una di tre varianti o “enterotipi”, in base ai generi dominanti (*Bacteroides*, *Prevotella* o *Ruminococcus*), che costituisce un *core* relativamente costante (10), anche se si osserva un’elevata variabilità tra i gruppi batterici presenti nell’intestino e una variabilità interindividuale nella composizione microbica. A sottolineare l’impatto che la dieta ha nella modulazione della microflora intestinale, gli enterotipi sopra descritti sono associati a regimi dietetici a lungo termine, e risultano difficilmente alterabili da interventi nutrizionali a breve termine (11). In particolare, l’enterotipo *Bacteroides* è associato al consumo di proteine animali e grassi saturi, mentre l’enterotipo *Prevotella* prevale in soggetti che seguono una dieta ricca di vegetali e carboidrati e povera di carne e prodotti lattiero-caseari (12). Entrambi gli enterotipi appartengono al phylum dei Bacteroidetes. Il terzo enterotipo, *Ruminococcus*, appartenente al phylum dei Firmicutes, è l’unico che non sembra essere chiaramente associato ad una particolare dieta.

Così come osservato nei neonati, anche nell’alimentazione del bambino e dell’adulto sembra che il consumo di carboidrati complessi sia associato ad un microbiota “salutare”, in cui prevalgono specie particolarmente benefiche per l’ospite. Alcuni lavori di alto valore scientifico pubblicati nell’ultimo decennio hanno dato un contributo significativo a queste evidenze, e sono considerati ormai un punto di riferimento importante. Nella pubblicazione di De Filippo *et al.* il paragone tra la microflora di due popolazioni di bambini africani e italiani nutriti con diete differenti (una di tipo “rurale”, ricca in fibre polisaccaridiche, l’altra di tipo occidentale, caratterizzata da elevate quantità di grassi e zuccheri semplici) ha rivelato che la dieta ricca in fibre porta ad un aumento di batteri appartenenti al phylum dei Bacteroidetes e ad un decremento dei Firmicutes (13). Questo effetto è opposto a quello riscontrato nei soggetti obesi, in cui è stato osservato che il rapporto tra i due phyla risulta spostato a favore dei Firmicutes (14). In particolare, rispetto ai bambini alimentati con dieta occidentale, i bambini che assumevano la dieta rurale presentavano una significativa prevalenza dei generi *Prevotella* e *Xylanibacter*, accompagnata da una maggiore produzione di acidi grassi a catena corta (*Short Chain Fat Acid*, SCFA), in particolare butirrato, propionato e acetato. È stato ipotizzato quindi che un profilo dietetico ricco in carboidrati complessi possa aver favorito nel tempo, nell’ecosistema microbico intestinale, la presenza di un maggior numero di specie batteriche in grado di metabolizzare la componente non digeribile dei carboidrati, producendo alti livelli di SCFA, che contribuiscono a rafforzare la protezione da infiammazione e malattie del colon (13).

Uno studio analogo condotto su una popolazione africana di cacciatori-raccoglitori della Tanzania ha mostrato un’aumentata biodiversità e abbondanza microbica, oltre alla prevalenza in particolare di *Prevotella*, rispetto alla popolazione italiana di controllo, confermando quanto già osservato in popolazioni la cui dieta è composta prevalentemente da prodotti vegetali. È inoltre interessante notare l’assenza di bifidobatteri riscontrata nei soggetti africani, probabilmente dovuta alla dieta priva di latte e prodotti caseari (15).

Effetti a breve e lungo termine della dieta

Le evidenze scientifiche accumulate finora suggeriscono quindi che il regime alimentare a lungo termine influenza la struttura e l'attività del microbiota intestinale, ma rimane ancora da chiarire quanto rapidamente e in modo riproducibile questo risponda a cambiamenti dietetici a breve termine. È stato dimostrato infatti che il consumo a breve termine di diete composte esclusivamente da prodotti animali o vegetali ha come conseguenza un cambiamento nella composizione della microflora intestinale, che porta a minimizzare le differenze inter-individuali di espressione genica microbica. Il consumo di prodotti animali causa un incremento di microrganismi bile-tolleranti (*Alistipes*, *Bilophila* e *Bacteroides*) e un decremento di generi microbici appartenenti al phylum dei Firmicutes capaci di metabolizzare polisaccaridi di origine vegetale (*Roseburia*, *Eubacterium rectale* e *Ruminococcus bromii*) (16).

Un'ipotesi che si sta consolidando è che esista un *core* di geni batterici, per cui individui con uno stesso fenotipo (es. obeso o normopeso), pur presentando differenti profili di microbiota intestinale, condividano funzioni geniche batteriche simili (9).

Un aspetto importante legato alla capacità della dieta di modulare la composizione del microbiota intestinale riguarda infine il contributo di batteri di origine alimentare ingeriti attraverso il consumo di prodotti fermentati o di formulazioni probiotiche. In particolare, batteri lattici e bifidobatteri potenzialmente probiotici, sono spesso naturalmente presenti in alimenti fermentati (17), e possono entrare in contatto con il microbiota residente nell'intestino umano attraverso la catena alimentare, qualora siano in grado di colonizzare, anche in modo transiente, il tratto gastro-intestinale. Un recente lavoro dimostra che le stesse specie impiegate nella produzione di alimenti fermentati si ritrovano tra i batteri del microbiota intestinale umano (16).

Il microbiota alimentare rappresenta un complesso ecosistema, soprattutto nel caso di prodotti fermentati tradizionali, ottenuti attraverso procedure che non prevedono l'impiego di ceppi starter selezionati e noti, ma si basano sull'attività fermentativa di comunità microbiche di origine naturale e normalmente presenti nelle materie prime. Molti prodotti lattiero-caseari freschi come yogurt, latticini fermentati e latticini, sono caratteristici del bacino mediterraneo e contengono un titolo elevato di batteri lattici. Il loro consumo può modulare positivamente il microbiota intestinale, riducendo ad esempio il rischio d'incidenza di cancro al colon (18). Questo argomento è relativamente nuovo ma molto promettente, anche grazie alle tecnologie innovative che stanno emergendo e a tale proposito recenti ricerche si stanno focalizzando sullo studio della composizione del microbiota alimentare e della sua interazione con il microbiota intestinale.

Conclusioni

È quindi evidente che esiste una relazione reciproca tra la dieta e il microbiota: da un lato la dieta influenza la composizione della microflora intestinale, dall'altro lato il valore nutritivo del cibo, il suo assorbimento e la sua trasformazione dipendono dalle caratteristiche del microbiota di ogni singolo individuo.

Se la dieta influisce in modo rilevante sulla selezione dei batteri che compongono il microbiota intestinale (e quindi, di conseguenza, sul microbioma), con possibili influenze sul rischio di sviluppare malattie e disordini metabolici (diabete, obesità, malattie cardiovascolari, ecc.), si potrebbero implementare strategie basate su modifiche delle abitudini alimentari mirate alla modulazione del microbiota intestinale verso un profilo sano.

Bibliografia

1. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 2006;7(7):688-93.
2. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 2010;90(3): 859-904.
3. Gerritsen J, Smidt H, Rijkers GT, de Vos WM. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes Nutr* 2011;6(3): 209-40.
4. Turnbaugh PJ, Gordon JI. The core gut microbiome, energy balance and obesity. *J Physiol* 2009;587(Pt 17): 4153-8.
5. Prakash S, Rodes L, Coussa-Charley M, Tomaro-Duchesneau C. Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics* 2011;5:71-86.
6. Flint HJ, Scott KP, Duncan SH, Louis P, Forano E. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes* 2012;3(4):289-306.
7. Bode L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* 2012;22(9):1147-62.
8. Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front Cell Infect Microbiol* 2012;2:104.
9. Power SE, O'Toole PW, Stanton C, Ross RP, Fitzgerald GF. Intestinal microbiota, diet and health. *Br J Nutr* 2014;111(3):387-402.
10. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* 2012;148(6):1258-70.
11. Gophna U. Microbiology. The guts of dietary habits. *Science* 2011;334(6052):45-6.
12. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, Bewtra M, Knights D, Walters WA, Knight R, Sinha R, Gilroy E, Gupta K, Baldassano R, Nessel L, Li H, Bushman FD, Lewis JD. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011;334(6052):105-8.
13. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, Collini S, Pieraccini G, Lionetti P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(33):14691-6.
14. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(31):11070-5.
15. Schnorr SL, Candela M, Rampelli S, Centanni M, Consolandi C, Basaglia G, Turrone S, Biagi E, Peano C, Severgnini M, Fiori J, Gotti R, De Bellis G, Luiselli D, Brigidi P, Mabulla A, Marlowe F, Henry AG, Crittenden AN. Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nat Commun* 2014;5:3654.
16. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA, Biddinger SB, Dutton RJ, Turnbaugh PJ. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014;505(7484):559-63.
17. Vaughan EE, de Vries MC, Zoetendal EG, Ben-Amor K, Akkermans AD, de Vos WM. The intestinal LABs. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002;82(1-4):341-52.
18. Del Chierico F, Vernocchi P, Dallapiccola B, Putignani L. Mediterranean diet and health: food effects on gut microbiota and disease control. *Int J Mol Sci* 2014;15(7):11678-99.

ASSE INTESTINO-CERVELLO, MICROBIOTA INTESTINALE E SINDROME DELL'INTESTINO IRRITABILE

Giovanni Bruno, Carola Severi

Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche, Divisione di Gastroenterologia, Policlinico Umberto I, Sapienza Università di Roma, Roma

Introduzione

La Sindrome dell'Intestino Irritabile (SII) è un disordine funzionale in cui il dolore addominale ricorrente è associato con la defecazione o con alterazioni dell'alvo in assenza di cause organiche identificabili (1). L'insorgenza dei sintomi deve avvenire almeno sei mesi prima della diagnosi e quest'ultimi devono essere presenti nel corso degli ultimi tre mesi come stabilito dai criteri diagnostici Roma IV per la SII (criteri nati da un gruppo di lavoro che definì i primi parametri nel 1992, denominati in seguito Roma I, nome che deriva dalla Fondazione Roma con sede in Virginia, Stati Uniti). Secondo tali criteri il dolore addominale ricorrente deve essere presente in media almeno 1 giorno a settimana negli ultimi 3 mesi associato a 2 o più dei seguenti criteri:

- 1) correlato con la defecazione;
- 2) associato con cambiamenti nella frequenza delle evacuazioni;
- 3) associato con cambiamenti nella forma (consistenza) delle feci.

La SII rappresenta uno dei disturbi gastrointestinali più frequenti con notevoli ripercussioni economiche sia dirette che indirette sul sistema sanitario. Si stima che questa patologia interessi circa il 10-20% della popolazione mondiale con una incidenza maggiore nel sesso femminile e con un tasso di prevalenza maggiore tra i 20 e i 50 anni.

In base alla frequenza delle evacuazioni e alla consistenza delle feci, misurata mediante la scala di Bristol, si identificano quattro sottogruppi di pazienti con SII (Figure 1 e 2) (1).

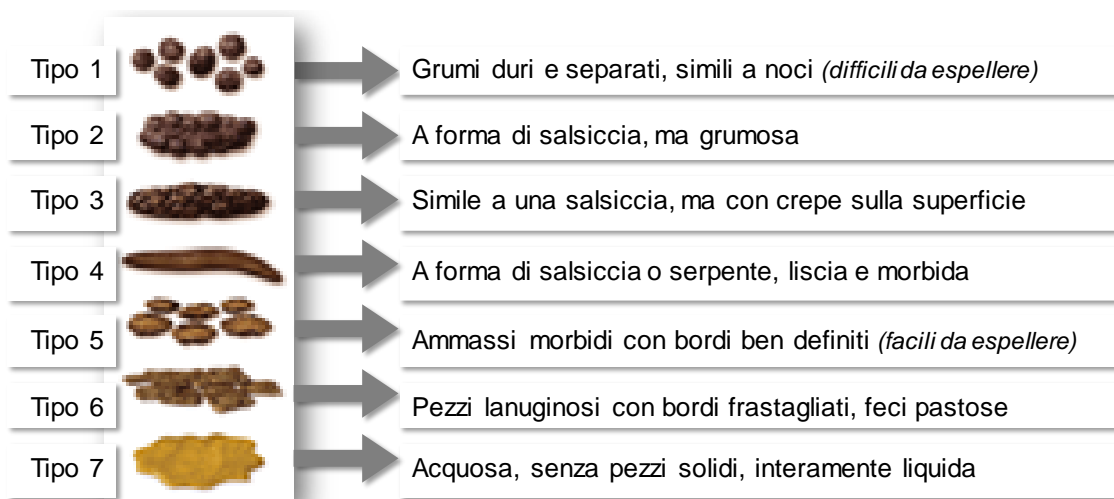


Figura 1. Scala delle feci secondo Bristol

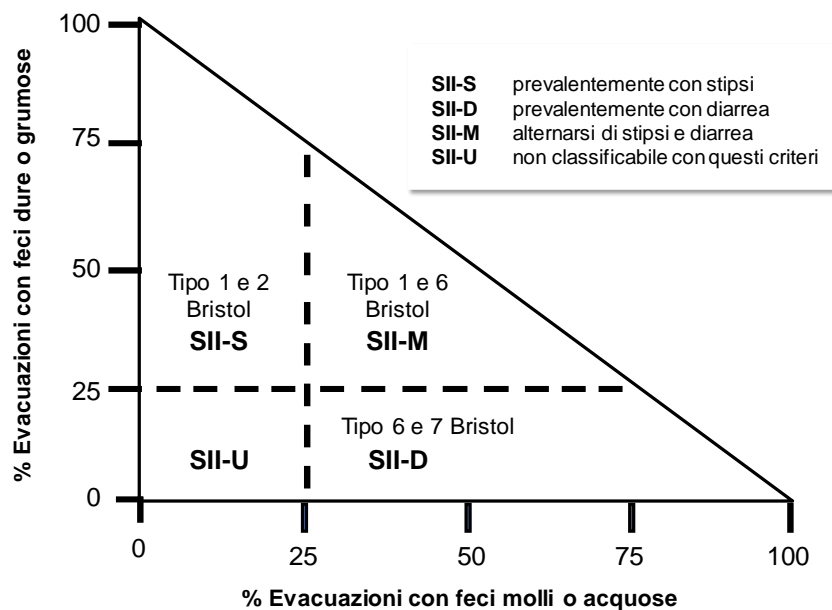


Figura 2. Sottotipi di Sindrome dell'Intestino Irritabile (SII) in correlazione con la scala delle feci di Bristol

Si ritiene che la SII sia una patologia multifattoriale che vede coinvolti nel suo sviluppo fattori psicologici, alterazioni motorie gastrointestinali così come un'aumentata sensibilità viscerale. Le evidenze suggeriscono che nella patogenesi della SII gioca un ruolo centrale l'asse intestino-cervello (2). Quest'ultimo è un sistema bidirezionale neuro-umorale complesso che agisce grazie ad una vasta rete di meccanismi attivi e passivi di tipo neurale, immunologici ed endocrini. È costituito da una serie di componenti fondamentali tra cui il Sistema Nervoso Centrale (SNC), fibre simpatiche e parasimpatice del Sistema Nervoso Autonomo (SNA), il Sistema Nervoso Enterico (SNE), il sistema neuroendocrino e neuroimmune.

La rete neuronale è costituita da fibre afferenti dall'intestino a strutture corticali del SNC e fibre efferenti dal SNC all'intestino che regolano, interagendo con il SNE, le funzioni di entrambi gli organi.

Per quanto riguarda il sistema neuroendocrino un ruolo chiave è svolto dall'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) che regola la risposta allo stress.

Durante il verificarsi di un evento stressante di qualunque natura, vi è il rilascio da parte dell'ipotalamo dell'ormone di rilascio corticotropo (CRH) che a sua volta agendo in modo pulsatile sull'ipofisi stimola il rilascio di ormone adrenocorticotropo (ACTH) con conseguente produzione di cortisolo da parte del surrene.

Sembra che nei pazienti affetti da SII vi sia una incapacità dopo uno stress acuto di modulare l'asse HPA. Si ritiene infatti che una non adeguata risposta a fattori stressanti possa essere coinvolta nell'avvio, nella persistenza e nella gravità dei sintomi nei soggetti con SII (3).

Attualmente all'interno di questa fitta rete di componenti costitutivi appare sempre più rilevante, per lo svolgimento dei normali processi fisiologici e nello sviluppo di patologie, il ruolo

del microbiota intestinale. Pertanto, alla luce delle attuali conoscenze, secondo alcuni autori è più corretto parlare di asse microbiota-intestino-cervello (Figura 3).

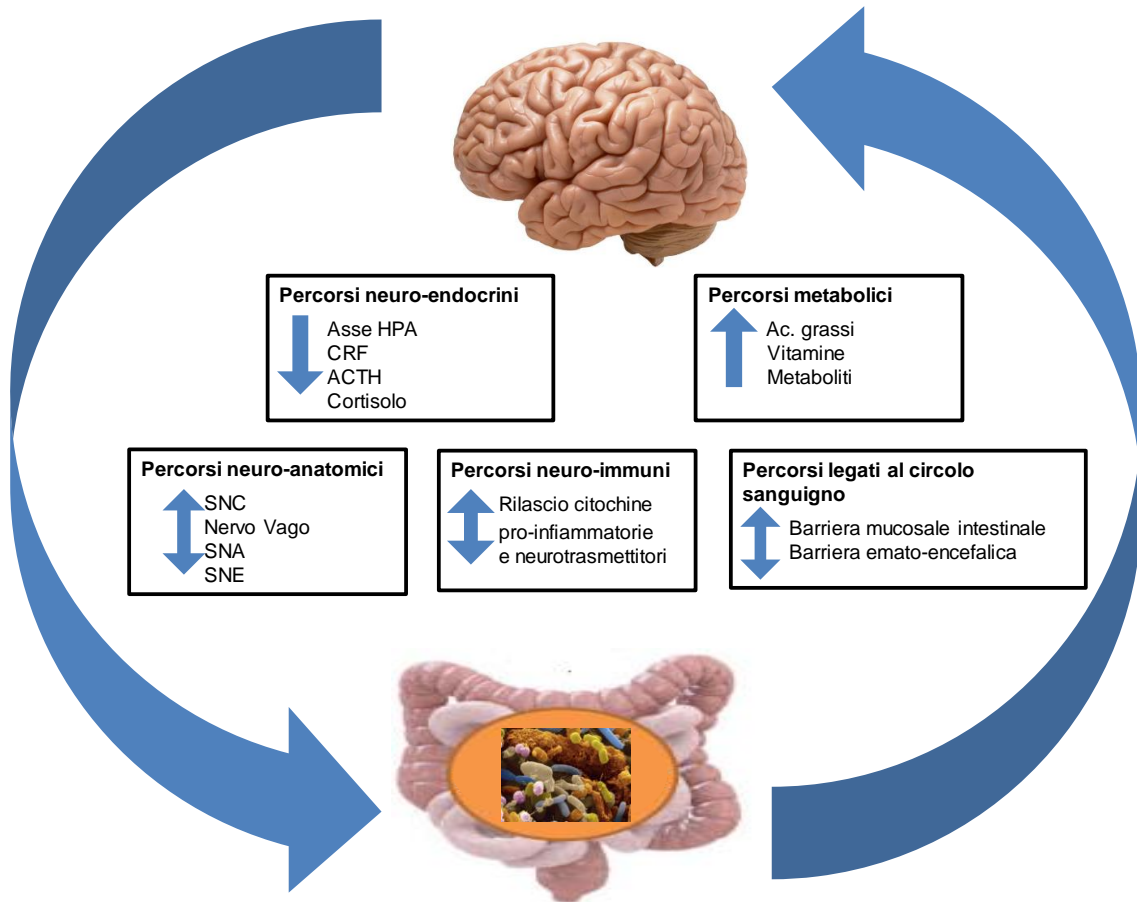


Figura 3. Asse microbiota-intestino-cervello e possibili percorsi di comunicazione

Microbiota intestinale umano

Il microbiota intestinale è un ecosistema complesso costituito soprattutto da batteri, ma anche virus, funghi, archea, protozoi, parassiti ed elminti. Finora sono stati identificati circa 100 trilioni di batteri (un numero 10 volte maggiore delle cellule del corpo umano) che contengono più di 17 milioni di geni (100 volte il numero dei geni umani) con un peso di circa 1000 grammi (4, 5). Sono stati identificati più di nove phyla di cui quattro sono i principali: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria*. I primi due di solito sono quelli maggiormente rappresentati nella vita adulta. Nel soggetto sano vi è una collaborazione di tipo mutualistico tra il microbiota e l'ospite umano, infatti l'intestino dell'ospite rappresenta l'ambiente ideale per la crescita e la

sopravvivenza batterica, viceversa la flora intestinale svolge diverse funzioni sia in ambito immunologico, metabolico e strutturale. Le attuali evidenze scientifiche suggeriscono che una sua alterazione (disbiosi) sia implicata nella patogenesi di svariate patologie riguardanti diversi organi e apparati, tra queste anche la SII (6).

Patogenesi della SII

Come già accennato, la SII è un disturbo neuromotorio associato ad una disregolazione dell'asse intestino-cervello su base multifattoriale. Per quanto riguarda i fattori psicologici l'influenza dello stress nello sviluppo delle alterazioni intestinali riguardanti in particolare la motilità, le percezioni viscerali, le secrezioni e la permeabilità intestinale presenti nella SII è stata ampiamente studiata. Le odierne conoscenze suggeriscono però che risposte aberranti allo stress possono essere legate al microbiota intestinale. Uno studio pubblicato da Sudo *et al.* ha evidenziato che in modelli animali germ-free vi è una inadeguata risposta allo stress dovuta ad una eccessiva produzione di ACTH e corticosteroidi dopo uno stress acuto che si riduce parzialmente modulando il microbiota tramite trapianto di flora batterica intestinale e totalmente, con la somministrazione di probiotici (*Bifidobacterium infantis* nello specifico) (7). D'altro canto l'induzione precoce di un evento stressante è in grado di causare in modelli animali delle alterazioni nel microbiota stesso con cambiamenti a lungo termine dell'asse HPA rispetto ai controlli. Pertanto il microbiota intestinale può influenzare i sistemi neuronali che regolano la risposta endocrina allo stress e una sua alterazione può essere un elemento chiave nella patogenesi della SII.

Per quanto riguarda la motilità intestinale, nei modelli animali germ-free si osservano profonde alterazioni anatomico-funzionali quali un rallentamento nel tempo di transito intestinale e di svuotamento gastrico, dilatazione del cieco e flaccidità del colon in toto. Queste alterazioni regrediscono con l'inoculo di flora batterica intestinale verosimilmente attraverso l'azione di metaboliti prodotti dalla fermentazione batterica. Tali composti agiscono attraverso diversi meccanismi:

- stimolazione dell'attività peristaltica attraverso la riduzione del pH intraluminale indotta dalla produzione di acidi grassi a catena corta (*Short Chain Fatty Acids*, SCFA) e acidi organici;
- effetto osmotico (aumento della massa fecale);
- distensione viscerale per aumentata produzione di gas intestinali (es. anidride carbonica, idrogeno e metano) (8, 9).

Il microbiota e i suoi metaboliti agiscono anche sui neuroni enterici e sulle cellule muscolari lisce tramite il rilascio diretto o indiretto di neurotrasmettitori (quali l'acido gamma-amminobutirrico o *Gamma-Aminobutyric Acid*-GABA, la serotonina, acetilcolina, melatonina, istamina e ossido nitrico) e di peptidi gastrointestinali (es. grelina, leptina, galanina, motilina) in grado di agire sulla motilità gastroenterica (10, 11).

Infine il microbiota è direttamente coinvolto nella modulazione della sensibilità viscerale. In modelli animali, la disbiosi, indotta mediante somministrazione di antibiotici, comporta delle modificazioni nelle risposte nocicettive e motorie dovute ad una aumentata espressione dei recettori *Toll-like 4* e *7* dell'immunità innata e una riduzione di quelli per i cannabinoidi e gli oppioidi ad azione antinocicettiva (12).

A conferma che la SII possa essere correlata ad alterazioni del microbiota vi è anche l'evidenza che in circa il 10% (in alcuni studi la percentuale è nettamente maggiore) dei pazienti, dopo un episodio di gastroenterite si sviluppa la SII, definita SII post-infettiva, dove si ritiene che l'agente infettivo sia in grado di modificare il normale profilo microbico intestinale con successivo

sviluppo della patologia. Altra evidenza dell'influenza del microbiota nello sviluppo di SII è rappresentata dalla sua insorgenza a seguito della disbiosi indotta dall'antibiotico-terapia (13, 14).

Tuttavia, le ricerche sulla disbiosi associata a SII non hanno finora mostrato dei risultati concordanti. Dai dati ad oggi disponibili, sembra che le alterazioni cruciali del microbiota nella SII siano rappresentate da un aumento del rapporto *Firmicutes/Bacteroidetes* con riduzione della diversità, diminuzione di Lattobacilli e Bifidobatteri con aumento di Streptococchi e Ruminococchi nei pazienti con SII rispetto ai gruppi di controllo (15).

Strategie terapeutiche della SII

Data la forte correlazione tra disbiosi e SII, si stanno sperimentando diverse strategie terapeutiche, che mirano a modificare il microbiota alterato e a ripristinare uno stato di eubiosi, di seguito descritte.

Probiotici

I probiotici sono organismi vivi che se somministrati in quantità adeguate apportano un beneficio nell'ospite. Sono stati pubblicati i risultati di diversi studi clinici controllati sui possibili benefici dei probiotici nella SII. Le limitazioni maggiori di questi studi però sono rappresentate dalle diversità di disegno dello studio, nonché dalle dosi e dai ceppi di probiotici somministrati. Ciò nonostante, le evidenze attuali suggeriscono l'utilità della somministrazione di probiotici nell'alleviare i sintomi tipici della SII. In particolare, la somministrazione di preparati contenenti Bifidobatteri ha mostrato una riduzione del dolore/fastidio addominale, una riduzione del gonfiore e della distensione addominale e una riduzione nel numero delle evacuazioni nel sottogruppo con diarrea (SII-D) rispetto al gruppo placebo (16).

Trapianto di microbiota fecale

Il trapianto di microbiota fecale (*Foecal Microbiota Transplant*, FMT) consiste nella somministrazione delle feci provenienti da un donatore sano all'interno del tratto gastroenterico di un soggetto ricevente con lo scopo di guarire malattie specifiche legate ad una alterazione del microbiota. Numerose pubblicazioni scientifiche hanno ampiamente dimostrato l'alta efficacia di questa metodica nel trattamento delle infezioni ricorrenti da *Clostridium difficile*, un'infezione di solito contratta da pazienti debilitati sottoposti a trattamenti antibiotici che ne modificano il microbiota. Partendo da questi presupposti, la manipolazione del microbiota intestinale potrebbe cambiare la fisiologia e la manifestazione della malattia nella SII. In uno studio su 13 pazienti con SII (9 SII-D, 3 SII-C, 1 SII-M), il 70% ha presentato risoluzione o miglioramento dei sintomi dopo FMT (17). In un altro gruppo di 45 pazienti con stipsi cronica funzionale, trattati con FMT, è stato osservato un rapido miglioramento della defecazione nell'89% dei casi, miglioramento che si è mantenuto in 18 dei 30 pazienti (60%) contattati a distanza di 9-19 mesi (18).

Antibiotici

Attualmente l'unico antibiotico che sembra apportare benefici nei pazienti con SII è rappresentato dalla rifaximina, un antibiotico non assorbibile con struttura simile alla rifampicina. Le evidenze maggiori provengono da due studi multicentrici (TARGET 1 e TARGET 2) basati

su un totale di 1260 pazienti affetti da SII senza stipsi. Si è osservato un miglioramento globale nei pazienti trattati con rifaximina rispetto al placebo (40.7% verso 31.7%) e un miglioramento in sintomi specifici quali il gonfiore, il dolore addominale e la consistenza delle feci (19). Tuttavia, resta da definire il ruolo di questo antibiotico nei pazienti con SII-C.

Dieta

La composizione della flora intestinale è in grado di modificarsi e adattarsi alla dieta dell'ospite. Tutto quello che non viene assorbito diventa infatti una fonte di nutrimento per la comunità microbica residente nel lume intestinale. Pertanto, è stato ampiamente documentato che il microbiota interindividuale varia a seconda del tipo di dieta (es. la relazione tra 'provenienza geografica diversa-dieta diversa-diverso microbiota'). Questa adattabilità microbica si riflette sui tipi e sui livelli dei metaboliti prodotti (es. butirrato, metano). Un tipico esempio è la dieta a basso contenuto di oligosaccaridi, disaccaridi, monosaccaridi fermentabili e polioli (FODMAP). Questo tipo di dieta può provocare delle modificazioni nella composizione del microbiota con scomparsa o attenuazione dei sintomi da SII (20).

Conclusioni e prospettive future

La sindrome dell'intestino irritabile è una patologia multifattoriale che coinvolge nella sua genesi diversi meccanismi. Attualmente le evidenze suggeriscono che nei pazienti con SII vi è una alterazione del microbiota intestinale o un vero e proprio stato di disbiosi. Queste modificazioni microbiche si riflettono e possono alterare a più livelli alcuni sistemi di comunicazione propri dell'asse intestino-cervello con conseguente sviluppo della patologia. Inoltre, grazie al numero sempre crescente di studi e al miglioramento delle tecnologie che mirano a comprendere meglio questo multiforme sistema microbico non è escluso che si potranno sviluppare delle strategie terapeutiche mirate per prevenire o guarire patologie dovute ad alterazioni del microbiota intestinale umano.

Bibliografia

1. Mearin F, Lacy BE, Chang L, Chey WD, Lembo AJ, Simren M, Spiller R. Bowel disorders. *Gastroenterology* 2016;150:1393-407.
2. Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, Severi C. The gut-brain axis: interaction between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann Gastroenterol* 2015;28(2):203-9.
3. Kennedy PJ, Quigley E, Cryan JF, Dinan TG, Clarke G. A sustained hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to acute psychosocial stress in irritable bowel syndrome. *Psychol Med* 2014;44(14):3123-34.
4. Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* 1977;31:107-33.
5. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomics sequencing. *Nature* 2010;464:59-65.

6. Bennet SM, Ohman L, Simren M. Gut microbiota as potential orchestrators of irritable bowel syndrome. *Gut Liver* 2015;9(3):318-31.
7. Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu XN, Kubo C, Koga Y. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol* 2004;558:263-75.
8. Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M, Rowland I. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 1998;80 Suppl 1:S147-71.
9. Thompson JS, Quigley EM, Adrian TE. Qualitative changes in enteric flora and short-chain fatty acids after intestinal resection. *Dig Dis Sci* 1998;43(3):624-31.
10. Sobko T, Huang L, Midtvedt T, Norin E, Gustafsson LE, Norman M, Jansson EA, Lundberg JO. Generation of NO by probiotic bacteria in the gastrointestinal tract. *Free Radic Biol Med* 2006;41(6):985-91.
11. Petra AI, Panagiotidou S, Hatziagelaki E, Stewart JM, Conti P, Theoharides TC. Gut-Microbiota-Brain Axis and Its Effect on Neuropsychiatric Disorders with Suspected Immune Dysregulation. *Clin Ther* 2015;37(5):984-95.
12. Aguilera M, Cerdà-Cuellar M, Martínez V. Antibiotic-induced dysbiosis alters host-bacterial interactions and leads to colonic sensory and motor changes in mice. *Gut Microbes* 2015;6:10-23.
13. Quigley EM. Bacterial flora in irritable bowel syndrome: role in pathophysiology, implications for management. *J Dig Dis* 2007; 8: 2-7.
14. Kassinen A, Krogius-Kurikka L, Mäkivuokko H, Rinttilä T, Paulin L, Corander J, Malinen E, Apajalahti J, Palva A. The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects. *Gastroenterology* 2007;133:24-33.
15. Bhattarai Y, Muniz Pedrego DA, Kashyap PC. Irritable bowel syndrome: a gut microbiota-related disorder? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2017;312(1):G52-G62.
16. Brenner DM, Moeller MJ, Chey WD, Schoenfeld PS. The utility of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2009;104(4):1033.
17. Pinn DM, Aroniadis OC, Brandt LJ. Is fecal microbiota transplantation the answer for irritable bowel syndrome? A single-center experience. *Am J Gastroenterol* 2014;109(11):1831-2.
18. Andrews P, Borody TJ, Shortis NP, Thompson S. Bacteriotherapy for chronic constipation – long term follow-up. *Gastroenterology* 1995;108: A563.
19. Pimentel M, Lembo A, Chey WD, Zakko S, Ringel Y, Yu J, Mareya SM, Shaw AL, Bortey E, Forbes WP. Rifaximin therapy for patients with irritable bowel syndrome without constipation. *N Engl J Med* 2011;364:22-32.
20. Nanayakkara WS, Skidmore PM, O'Brien L, Wilkinson TJ, Garry RB. Efficacy of the low FODMAP diet for treating irritable bowel syndrome: the evidence to date. *Clin Exp Gastroenterol* 2016;9:131-42.

MEDICINA INTEGRATA E PATOLOGIE CRONICO-DEGENERATIVE

Rosaria Ferreri

Centro Ospedaliero di Medicina Integrata, ASL 9, Ospedale di Pitigliano, Grosseto

Introduzione

In Europa le malattie cronicodegenerative rappresentano la principale causa di morte (86%) e oltre il 75% di tutte le malattie. Si tratta di una vera epidemia con forti ripercussioni socio-sanitarie ed economiche per tutti i Paesi, poichè possono essere anche particolarmente invalidanti e incidere negativamente sulla qualità di vita della persona. Inoltre, data la numerosità e varietà di queste patologie, risulta molto difficile la gestione dei pazienti sia da un punto di vista sociosanitario che, soprattutto, terapeutico. La multimorbilità, il ricorso a multiterapie e la ridotta funzionalità del metabolismo rappresentano un serio ostacolo al successo del trattamento standard utilizzato. Partendo dall'assunto che è bene "curare il malato e non solo la malattia", tipico di tutte le discipline non convenzionali dette anche olistiche perché considerano la persona nella sua complessità (mente e corpo), e dei nuovi approcci di cure integrate, questa trattazione è volta alla comprensione di alcuni fenomeni chiave delle patologie croniche, necessaria per pianificare una adeguata terapia integrata.

Quella che stiamo vivendo oggi può essere considerata una vera e propria rivoluzione epidemiologica: da un lato si assiste alla diminuzione nei Paesi occidentali delle patologie infettive acute che hanno gravato per millenni sulla popolazione ma che hanno anche contribuito a modellare il nostro sistema immunitario. Dall'altro lato, si osserva un incremento esponenziale delle patologie cronicodegenerative su base infiammatoria e neoplastica come le patologie del sistema endocrino-metabolico (obesità e sindrome metabolica) e del sistema immunocompetente (allergie e malattie autoimmuni); le malattie del neurosviluppo (patologie dello spettro autistico), quelle neuropsichiatriche e neurodegenerative (demenza, sclerosi multipla, Alzheimer, ecc.); le malattie cardiovascolari, i tumori e altre patologie che riconoscono nel meccanismo dell'"infiammazione silente" il loro *primum movens*.

Innesco infiammatorio

I fenomeni infiammatori possono iniziare anche molto precocemente, infatti sono stati evidenziati anche in bambini di soli 3 anni di vita, e sono favoriti da situazioni come l'obesità, la "malnutrizione" e lo stress (di varia origine). I processi infiammatori si accompagnano all'aumento dell'espressione di fattori di trascrizione come l'NF-kB (ovvero il fattore di trascrizione per la catena leggera k delle immunoglobuline o *Nuclear Factor k chain transcription in B cells*) che a sua volta stimola il rilascio delle citochine pro-infiammatorie. Queste ultime oltre a determinare alterazioni funzionali sistemiche, possono penetrare nel cervello alterando il metabolismo della serotonina e della dopamina, riducendo la sensibilità delle cellule agli ormoni glucocorticoidi, la cosiddetta "resistenza dei recettori dei glucocorticoidi" (*glucocorticoid receptor*, GCR). Da questo squilibrio deriva un'ulteriore attivazione dell'NF-kB come risposta adattativa per contrastare la predetta resistenza: senza la regolazione dovuta ai glucocorticoidi

aumentano sia la durata che l'intensità della risposta infiammatoria con conseguente aumento del rischio di comparsa o progressione di patologie infiammatorie croniche come le malattie cardiovascolari e il diabete. Queste patologie sono caratterizzate da una flogosi di basso grado con iperproduzione di citochine pro-infiammatorie e riduzione di citochine antinfiammatorie. Tali alterazioni possono anche essere determinate dalla presenza di interferenti ambientali, tra cui l'inquinamento atmosferico oppure la carenza di micronutrienti che possono alterare la funzionalità mitocondriale con aumento di ossidanti nel citoplasma e invecchiamento cellulare.

Malnutrizione e obesità come innesco

L'obesità, una condizione associata ad una infiammazione cronica di bassa intensità, è caratterizzata dall'aumento generale delle citochine circolanti e dei marcatori di infiammazione. Tale patologia ha inizio proprio nel tessuto adiposo, probabilmente a causa di segnali aberranti che le cellule adipose stesse inviano a vari tessuti e organi, incluso il sistema immunitario, innescando una risposta infiammatoria e alterazioni immunologiche sia locali che sistemiche (1). In condizioni di obesità il tessuto adiposo viscerale si infiamma per l'azione combinata di adipociti e macrofagi. Gli adipociti aumentano in numero (iperplasia) e dimensioni (ipertrofia), mentre i macrofagi infiltrano il tessuto adiposo aggregandosi attorno ad adipociti in disfacimento e passando dal fenotipo di tipo 2 (antinfiammatorio) a quello di tipo 1 (pro-infiammatorio), con rilascio di citochine pro-infiammatorie come il fattore di necrosi tumorale α o *tumor necrosis factor* α (TNF- α) e interleuchina 6 (IL-6) (2).

Nuovi “marcatori” del processo infiammatorio

Nel monitoraggio del processo infiammatorio, utile per valutare l'efficacia di un trattamento terapeutico, accanto ai 'vecchi' marcatori del processo infiammatorio come la velocità di eritrosedimentazione (VES), la Proteina C-Reattiva (PCR) e il fibrinogeno, possono essere utilizzati dei 'nuovi' marcatori (citochine e proteine di fase acuta) prodotti in risposta al processo infiammatorio indotto dall'obesità e dallo stress cellulare. Recentemente la Federazione Internazionale per il Diabete (*International Diabetes Federation, IDF*) ha incluso nella definizione dei criteri per la diagnosi di sindrome metabolica la PCR, l'amiloide A (AA), il TNF- α , l'IL-6 e l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno 1 (PAI1). Un'altra molecola che può considerarsi indicatore di infiammazione è l'omocisteina, un aminoacido solforato, che non entra nella composizione delle proteine, il cui aumento è espressione di una alterazione del metabolismo della metionina e può derivare da carenze vitaminiche e/o enzimatiche. L'omocisteina è un predittore di rischio per diverse malattie quali quelle cardiovascolari, renali, la malattia di Alzheimer e alcune demenze, nonché per la pre-eclampsia e i difetti del tubo neurale. L'aumento di omocisteina favorisce il suo passaggio nel sangue dove, in presenza di ossigeno, si trasforma in omocistina, creando di fatto un radicale superossido che può indurre un danno/disfunzione endoteliale, primum movens di patologie cardiovascolari e neurologiche sia acute che croniche.

La cosiddetta iperomocisteinemia congenita è una condizione legata alla mutazione di un gene che codifica per l'enzima metilentetraidrofolato reduttasi (MTHFR) responsabile della trasformazione della metionina in cisteina; in questa condizione si può osservare un aumento di omocisteina influenzato anche dalla dieta povera di vegetali, o dall'assunzione di farmaci, ecc.

Strategia dietetica personalizzata

È quindi evidente che lo studio delle malattie cronico-degenerative può essere affrontato in modo nuovo utilizzando un approccio medico integrato che si rivolga non solo alla determinazione di *marker* dell'infiammazione ma anche dello stato metabolico e nutrizionale individuale, e delle risposte personali ai nutrienti e ai trattamenti. L'individuazione del cosiddetto "terreno costituzionale" può favorire una migliore diagnosi indispensabile per elaborare una strategia dietetica personalizzata.

In questa ottica risulta facile comprendere che il processo infiammatorio, per essere "costruttivo", deve avere una durata limitata nel tempo e non deve essere di un grado eccessivo, altrimenti determinerà un sovvertimento della struttura (*functio lesa*) con conseguente alterazione dell'omeostasi. Il processo è di per sé autoregolato, ma perché proceda correttamente occorre avere integro un patrimonio di sostanze dotate di potere "tampone" sui processi infiammatori.

Assunzione di folati

Sono state individuate, ad esempio, alcune molecole, la più nota delle quali è l'acido folico, in grado di entrare nel metabolismo dell'omocisteina e di neutralizzarla. Per il trattamento farmacologico delle forme di carenza o nei casi di aumentato fabbisogno di folati (es. durante la gravidanza), esistono tre diversi preparati:

- acido folico;
- acido folinico;
- 5-metiltetraidrofolato (5-MTHF).

In caso di iperomocisteinemia la supplementazione di folati deve essere fatta esclusivamente con 5-MTHF, vitamina B9, perché passa direttamente in circolo senza subire nessuna metabolizzazione a livello intestinale od epatica come avviene per l'acido folico e l'acido folinico.

Inoltre il 5-MTHF ha un effetto persistente che va ben oltre la sospensione della supplementazione fino a sei mesi dalla somministrazione ed è indipendente dalla dose somministrata, che dipende dall'immagazzinamento nei globuli rossi del folato in forma di glutammato. IL 5-MTHF ha due azioni combinate: abbassa direttamente il livello di omocisteina impedendone l'accumulo, riducendo il rischio connesso al suo aumento, e agisce direttamente sulla formazione dell'ossido nitrico (NO), un vasodilatatore e antiaggregante piastrinico, migliorando così la funzione endoteliale.

Questo esempio dimostra che le abitudini alimentari possono influire in maniera determinante sullo stato di salute dell'individuo.

Riduzione dell'apporto calorico

Tra i cambiamenti che più influenzano lo stato di salute vi è l'aumento dell'introito calorico, la diminuzione della massa magra (fino al rischio di perdita della massa muscolare o sarcopenia), la riduzione dell'acqua corporea e l'aumento della massa grassa che sfociano nel sovrappeso e nell'obesità. Un altro fattore che può giocare un ruolo molto importante nel determinare lo stato infiammatorio di un soggetto è la riduzione dell'introito di acidi grassi insaturi omega 3 a favore degli omega 6, insieme all'aumento dell'apporto di grassi saturi, anche di provenienza vegetale come ad esempio l'olio di palma.

La riduzione dell'introito calorico del 30-50%, con concomitante adeguata assunzione di proteine, vitamine e sali minerali, può rappresentare un'utile strategia anti-infiammatoria, come dimostrato in molti studi (3), in grado di ridurre la produzione di tutte le citochine

proinfiammatorie, di rallentare l'invecchiamento e di aumentare la durata della vita in molti modelli animali (es. vermi, moscerini della frutta, lieviti, topi, ratti, cani) (4). Nei topi, l'aumento della durata della vita associato alla restrizione calorica è tanto maggiore quanto più precocemente viene iniziata la riduzione dell'introito calorico; ma un aumento significativo della vita massima si può osservare anche quando la restrizione calorica viene iniziata in animali adulti (12 mesi di età, che equivale all'incirca a 50 anni di età in un uomo). I meccanismi alla base dell'effetto *anti-aging* della restrizione calorica sono complessi e non del tutto chiariti; tuttavia, sembra che la riduzione dei fattori di crescita (es. *insulin growth factor 1*, IGF-1, insulina) e dell'attività delle vie di segnale dell'insulina/IGF-1, insieme alla riduzione dell'infiammazione, alla protezione contro lo stress ossidativo e ad altre modificazioni dell'assetto metabolico e neuroendocrino siano i fattori principali che promuovono salute e longevità negli animali in restrizione calorica. In termini generali, in presenza di una riduzione dell'apporto calorico (ma con un adeguato e corretto apporto di nutrienti) l'organismo rallenta i processi di invecchiamento e potenzia i sistemi deputati al riparo del danno. Solo venti anni fa pochi ricercatori sospettavano l'esistenza di singoli geni capaci di regolare la durata della vita, poiché l'invecchiamento è un processo incredibilmente complesso che coinvolge numerosi tessuti e sistemi, influenzato da migliaia di geni; tra i geni che possono favorire la longevità, quelli coinvolti nei segnali insulinici e nella resistenza allo stress sembrano essere fra i più significativi. Inoltre sono studiati attivamente le sirtuine, enzimi deacetilasici NAD-dipendenti (nicotinammide adenina dinucleotide, NAD), coinvolti nel silenziamento genico (5); altri sistemi importanti sono quello insulina/IGF-1 e il *mammalian target of rapamycin*, bersaglio della rapamicina (mTOR) che probabilmente mediano gli effetti sull'invecchiamento della restrizione calorica.

Uso di antiossidanti

Le teorie dell'invecchiamento considerano i radicali liberi come elementi centrali del processo di senescenza, che si ritiene dovuto ad usura e consunzione (*wear and tear*) particolarmente a livello molecolare, essendo le specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) generate come sottoprodotti del metabolismo. I radicali liberi vengono prodotti anche quando il metabolismo viene velocizzato (esempio nell'attività sportiva); il consumo di ossigeno infatti aumenta e in seguito all'ossidazione si formano più radicali liberi che, se non adeguatamente neutralizzati, possono danneggiare i tessuti (*in primis* quello dei vasi sanguigni).

Poiché i radicali liberi danneggiano le strutture cellulari attirando elettroni nel tentativo di restaurare l'equilibrio, esistono sistemi difensivi endogeni, enzimatici e non enzimatici, ad attività antiossidante che inattivano i radicali liberi. Fra gli antiossidanti, un ruolo di particolare rilievo è svolto da quelli che sono definiti "antiossidanti primari", ovvero molecole che agiscono sul primo radicale libero, il radicale superossido prodotto a livello mitocondriale, prevenendo così la formazione dei ROS.

In una piramide ideale di molecole antiossidanti, troveremo al vertice la superossidodismutasi (SOD), insieme a tutta una serie di sostanze presenti nella verdura e nella frutta, specie quelle dalla colorazione rossa, gialla, arancione, verde e blu: questi colori indicano, infatti, la presenza di polifenoli, come flavonoidi e resveratrolo, di carotenoidi, come licopene e carotene, di tocoferoli e di antocianine, tutte sostanze dotate di importanti attività biologiche. Ecco perché un'alimentazione ricca di frutta e verdura è raccomandata sempre e a maggior ragione nell'età avanzata.

Di fronte a situazioni più complesse, si può intervenire in maniera più articolata:

- con l'alimentazione tenendo presente che alcuni alimenti possono aiutare a regolare vari processi fisiologici offrendo un valido sostegno nei processi metabolici e nelle risposte immunitarie;

- con la fitointegrazione, che permette di utilizzare concentrazioni più elevate di fitoderivati utili all'uomo quando necessario.

Parafrasando Ippocrate il cibo sia la tua medicina, e la tua medicina il cibo.

Conclusioni

L'apporto dietetico può quindi rappresentare uno dei fondamentali approcci di trattamento integrato per contrastare le patologie che affliggono il nostro millennio, in particolare quelle cronico-degenerative su base infiammatoria. Conoscere e modificare opportunamente abitudini alimentari scorrette, o integrare carenze di fattori specifici, per garantire un apporto bilanciato di tutti quei componenti del cibo capaci di attenuare o prevenire l'infiammazione è di sicuro un aspetto che dovrebbe essere ben considerato nelle strategie integrate volte al mantenimento dello stato di salute e alla prevenzione delle malattie.

Bibliografia

1. Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard JP. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab* 2008;34(1):2-11.
2. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 2005;46:2347-55.
3. Weindruch R, Walford RL, Fligiel S, Guthrie D. The retardation of aging by dietary restriction in mice: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake. *J Nutr* 1986;116:641-54.
4. Pugh TD, Klopp RG, Weindruch R. Controlling caloric consumption: protocols for rodents and rhesus monkeys. *Neurobiol Aging* 1999;20:157-651.
5. Fahy GM, West MD, Coles LS, Harris SB. *The future of aging: pathways to human life extension*. Berlino: Springer; 2010.

PARTE TERZA
Stile di vita, alimentazione e gestione dello stress
nella prevenzione e cura delle malattie

ALIMENTI FUNZIONALI E NUTRIGENOMICA

Beatrice Scazzocchio, Rosaria Vari, Sara Del Papa, Roberta Masella
Centro di riferimento Medicina di Genere, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Molti studi epidemiologici hanno messo in evidenza la capacità di alcuni alimenti di esercitare effetti benefici sulla salute, sia garantendone un miglioramento che riducendo il rischio di malattia, in particolare delle malattie cronico-degenerative nell'insorgenza delle quali l'alimentazione svolge un ruolo determinante (1). Gli alimenti che aggiungono al loro valore nutrizionale specifico una funzione salutistica vengono definiti 'alimenti funzionali'. Il termine venne coniato in Giappone negli anni '80 e da allora è stato ampiamente utilizzato attribuendogli via via significati differenti. Ciò ha generato e tuttora genera, una grande confusione, alimentata dalla mancanza a livello istituzionale, di una chiara definizione dei termini e di una legislazione specifica su questa categoria di alimenti.

Vale la pena quindi citare la definizione riportata nel 1999 all'interno del *Consensus Document* stilato nell'ambito dei lavori del gruppo di studio FuFoSE (*Functional Food Science in Europe*) promosso dalla Commissione europea e coordinato dall'ILSI (*International Life Science Institute*) (2). Secondo tale documento, un alimento funzionale deve:

- possedere effetti addizionali oltre quelli più strettamente nutritivi dovuti alla presenza di componenti, generalmente micronutrienti, che interagiscono selettivamente con una o più funzioni fisiologiche dell'organismo (biomodulazione) in modo tale che risultino evidenti un miglioramento dello stato di salute e di benessere e/o una riduzione del rischio di malattia;
- essere un alimento naturale non modificato, non una pillola, una capsula, o un integratore alimentare;
- esercitare la sua funzione nelle quantità normalmente previste da una dieta equilibrata;
- dimostrare attraverso modelli sperimentali e successivi studi clinici un effetto misurabile sulla salute dell'uomo, cioè i suoi effetti devono essere scientificamente documentati e accertati.

Questo non ha fatto completa chiarezza, anche perché nel frattempo la definizione di cibo funzionale è stata estesa anche a quegli alimenti nei quali alcuni componenti sono stati aggiunti, o modificati, o eliminati mediante processi biotecnologici per aumentarne l'efficacia, la biodisponibilità ecc. Inoltre, l'alimento funzionale viene chiamato anche con il termine nutraceutico molto spesso utilizzato per indicare il componente attivo dell'alimento o un integratore. Il quadro è così complesso che recentemente in un interessante lavoro sono stati analizzati i significati attribuiti ai termini comunemente utilizzati nei lavori scientifici in campo nutrizionale (3) e si è evidenziato come ai termini 'alimento funzionale' e 'nutraceutico' non corrisponda una soddisfacente e chiara definizione comune. Al contrario, termini come 'alimento' o 'regime alimentare' sono molto ben definiti e hanno un chiaro e condiviso significato.

Dieta mediterranea e alimenti funzionali

La dieta mediterranea, conosciuta come uno dei migliori regimi alimentari per la riduzione del rischio di malattia (4), è caratterizzata da un elevato consumo di frutta e verdura, cereali integrali, legumi, pesce azzurro e olio extravergine di oliva; alimenti funzionali ampiamente studiati e sui quali si sono raccolte evidenze scientifiche tali da supportare un loro ruolo protettivo sulla salute (1). Questa capacità è legata alla presenza in essi di componenti biologicamente attivi, fra i quali vitamine, acidi grassi, fitocomposti, probiotici, in grado di modulare attività cellulari fondamentali o di espletare attività protettive come quella antiossidante, antitrombotica, anticancerogena, ecc. L'individuazione dei componenti attivi contenuti negli alimenti funzionali, così come la definizione della loro efficacia e del meccanismo d'azione richiede un'intensa attività di ricerca che si snoda attraverso un percorso lungo e articolato (Figura 1) al termine del quale è possibile arrivare a definire strategie nutrizionali mirate.

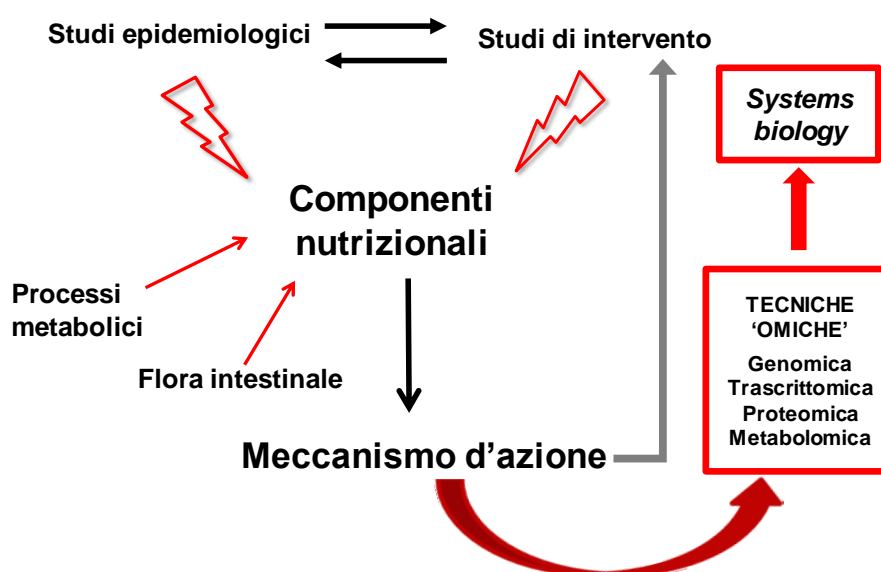


Figura 1. Schematizzazione della attività di ricerca per la definizione di strategie nutrizionali personalizzate

Analisi epidemiologiche permettono di associare il consumo di specifiche categorie di alimenti, o singoli alimenti, ad un miglioramento dello stato di benessere o ad una diminuzione del rischio di malattia. Il dato epidemiologico deve trovare conferma in studi di intervento che, seguendo protocolli ben definiti e controllati, devono dimostrare che il consumo di quello specifico alimento o gruppo di alimenti da parte di popolazioni omogenee e numericamente rappresentative è responsabile degli effetti salutistici osservati nella popolazione generale. Individuato l'alimento funzionale, bisogna identificare i componenti attivi responsabili dell'azione protettiva e il loro meccanismo di azione. Il percorso è piuttosto impervio ed è complicato da vari fattori, primo fra tutti il fatto che i potenziali componenti attivi in un alimento sono numerosi; inoltre, non sempre il componente attivo viene ingerito tal quale, ma molto spesso si forma all'interno dell'organismo grazie a processi metabolici dell'organismo stesso o della flora intestinale. Sia l'individuazione dei componenti bioattivi sia la definizione del loro

meccanismo di azione, almeno nella fase iniziale, si avvalgono di sistemi sperimentali cellulari *in vitro* che, semplificando il contesto di studio, permettono di rivelarne più facilmente i meccanismi di azione. I risultati ottenuti vanno in seguito confermati in modelli animali e infine nell'uomo. È bene sottolineare infatti che per poter trasferire dal piano sperimentale a quello preventivo/terapeutico i dati ottenuti in sistemi cellulari, questi devono essere confermati con studi di intervento mirati a dimostrare *in vivo* l'effetto osservato *in vitro*.

Nutrigenomica

La possibilità di migliorare la conoscenza dei meccanismi di azione di molti alimenti funzionali è cresciuta significativamente negli ultimi anni grazie all'opportunità di studiare a livello molecolare cosa succede quando un sistema biologico (da una singola cellula ad un organismo in toto) viene 'trattato' con specifici alimenti o loro componenti funzionali.

La nutrigenomica, un nuovo campo della ricerca in nutrizione, studia i meccanismi con i quali gli alimenti funzionali possono influenzare l'espressione dei geni sia a livello di trascrizione in RNA messaggero, che di traduzione in molecole proteiche, che di produzione di metaboliti; in altre parole la nutrigenomica studia come i nutrienti possono modificare il trascrittoma, il proteoma e il metaboloma modulando quindi la funzionalità cellulare. Gli avanzamenti ottenuti in questo campo sono stati resi possibili dallo sviluppo delle nuove tecniche 'omiche', cioè la genomica, la trascrittomica, la proteomica e la metabolomica che permettono di ottenere un profilo quanto mai dettagliato delle caratteristiche funzionali della cellula a livello molecolare. Attraverso tali tecniche si genera una considerevole mole di dati che possono essere analizzati e utilizzati soltanto mediante un approccio bioinformatico nell'ambito della cosiddetta *systems biology* (Figura 2).

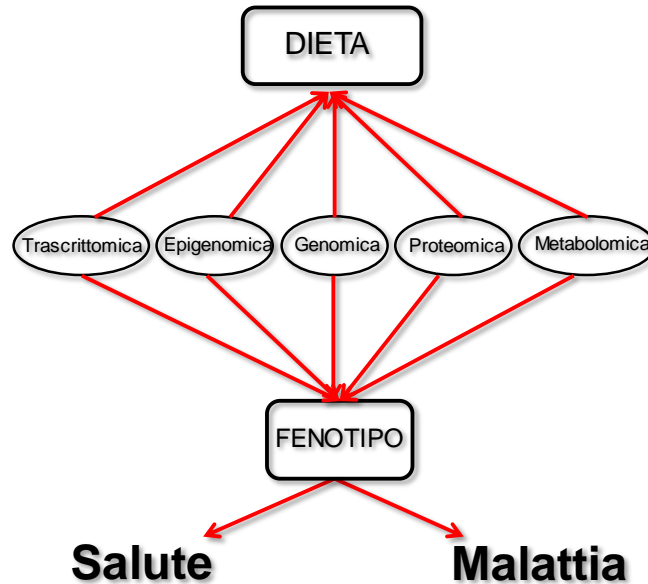


Figura 2. Rappresentazione schematica di come l'alimentazione può interferire con il codice genetico e di come l'organismo risponde modificando il suo fenotipo

L'obiettivo finale degli studi nutrigenomici è quello di comprendere a quale livello l'alimentazione interferisce con il codice genetico e come l'individuo, in base alle sue caratteristiche personali, risponde a queste interferenze, indirizzandosi verso uno stato di salute o di malattia, così da definire strategie nutrizionali mirate e personalizzate che permettano di aumentare l'efficacia dell'intervento nutrizionale stesso.

Polifenoli dell'olio extravergine di oliva

Un esempio di studio clinico è il progetto spagnolo PREDIMED (*PREvenición con Dieta MEDiterránea*) avviato nel 2003 che aveva l'obiettivo di verificare l'efficacia della dieta mediterranea nella prevenzione di malattie cardiovascolari. Si tratta di uno studio a bracci paralleli, randomizzato e multicentrico che ha coinvolto più di 7000 soggetti, donne e uomini, ad alto rischio cardiometabolico perché affetti da diabete di tipo 2 o perché presentavano almeno 3 fattori di rischio come fumo, obesità/sovrappeso, ipercolesterolemia, ipertensione ecc. I soggetti sono stati divisi in tre gruppi; uno di questi consumava una dieta mediterranea con utilizzo di almeno 30/40 grammi al giorno di olio ExtraVergine di Oliva (EVO); un altro consumava una dieta mediterranea con utilizzo giornaliero di 30 grammi di frutta secca oleosa (noci/mandorle/nocciole); il gruppo di controllo, infine, seguiva una classica dieta a basso contenuto di grassi (5). La sperimentazione è durata sei anni con follow-up annuali. Il dato sulla curva di mortalità per cause cardiovascolari è apparso estremamente interessante poiché mostrava una chiara e significativa riduzione delle morti per eventi cardiovascolari acuti nei due gruppi a dieta mediterranea rispetto a quello di controllo; la dieta mediterranea con olio EVO, inoltre, riduceva significativamente la mortalità per tutte le cause (5). Il consumo delle due diete mediterranee arricchite con olio EVO o frutta secca determinava una modifica del profilo trascrittomico, cioè una diversa espressione di alcuni geni (6) a vario titolo coinvolti nel funzionamento del sistema cardiovascolare, nel trasporto del colesterolo dalle cellule al fegato e nei processi infiammatori.

Numerosi altri studi (7, 8) hanno dimostrato una evidente attività protettiva dell'olio EVO sulla salute; è quindi lecito chiedersi quale siano i componenti in esso contenuti che possano contribuire a tali effetti.

Da sempre l'attività benefica dell'olio EVO è stata attribuita all'alto contenuto di acidi grassi monoinsaturi, ma la letteratura è ormai concorde nel ritenere che le proprietà salutistiche dell'olio EVO siano anche dovute all'elevata presenza di polifenoli. Questi costituiscono una famiglia di circa 8000 fitocomposti, variamente rappresentati negli alimenti vegetali caratteristici della dieta mediterranea. In base alla loro struttura chimica possono essere suddivisi in diverse classi, fra le quali acidi fenolici, alcoli fenolici, stilbeni, lignani e flavonoidi. Da un punto di vista chimico essi sono derivati del benzene e presentano un numero variabile di anelli aromatici e di gruppi idrossilici; questa complessa struttura chimica può mostrare capacità antiossidanti di notevole grado.

Tuttavia, i polifenoli sono generalmente poco assorbiti a livello intestinale e i loro livelli ematici risultano piuttosto bassi (circa 1%) rispetto alle quantità (10-100 mg) effettivamente assunte con gli alimenti. Ciò ha messo in discussione la loro possibile funzione antiossidante visto che nel sangue sono presenti, in quantità molto più elevata, altri forti antiossidanti come la vitamina E, cosa che rende improbabile una possibile competizione dei polifenoli con essi nello svolgimento di difese antiossidanti.

Inoltre, durante l'assorbimento i polifenoli vengono ampiamente modificati dagli enzimi intestinali e/o dalla microflora del colon e una volta assorbiti sono ulteriormente metabolizzati; spesso i componenti bioattivi sono quelli che derivano dalle trasformazioni all'interno

dell'organismo e presentano strutture chimiche completamente diverse da quella originaria potenzialmente antiossidante (9).

La modalità di azione dei polifenoli è risultata molto complessa, infatti negli ultimi anni numerosi studi sia *in vivo* che *in vitro* hanno dimostrato che questi composti possono modulare l'espressione genica e regolare vie di segnale intracellulari, nonché attività enzimatiche e recettoriali; in questo modo essi possono influire sulla funzionalità cellulare. In particolare, i polifenoli dell'olio EVO contribuiscono a ridurre la concentrazione delle *oxidized Low-Density Lipoproteins* (oxLDL) plasmatiche (10), aumentano la concentrazione del colesterolo HDL (colesterolo legato a lipoproteine ad alta densità o *High Density Lipoprotein cholesterol*) (11), e sono in grado di aumentare le difese antiossidanti endogene incrementando l'espressione e l'attività di enzimi come la glutazione perossidasi e la glutazione reduttasi (12). Infine, essi sono capaci di modulare direttamente l'espressione di geni implicati in vie metaboliche e di segnale cruciali (12, 13).

Attività biologiche delle antocianine

Una classe di polifenoli di forte interesse nutrizionale è quella dei flavonoidi e al suo interno la famiglia delle antocianine, la cui assunzione giornaliera è di molto superiore (180-250 mg/die) a quella degli altri polifenoli alimentari.

La cianidina-3-glucoside (C3G) è una delle antocianine più abbondanti nella frutta (circa il 90%); essa viene velocemente assorbita e metabolizzata in metaboliti con spiccata attività biologica come l'acido protocatecuico (PCA) (14). Il PCA appartiene alla classe degli acidi fenolici derivati dall'acido idrossibenzoico. Il suo contenuto nelle piante commestibili è generalmente molto basso, ad eccezione di alcuni frutti rossi, come i lamponi (83 mg/kg), ma anche le olive nere (210 mg/kg) e la cicoria rossa (250 mg/kg), tuttavia la sua concentrazione nei fluidi biologici dell'uomo può ritenersi molto più alta della semplice quantità ingerita perché esso rappresenta il principale metabolita delle antocianine. Interessanti metanalisi hanno dimostrato che le antocianine e i loro metaboliti esercitano un'ampia gamma di funzioni benefiche e protettive per la salute (15).

Recentemente, uno studio condotto su dati raccolti in grandi coorti negli Stati Uniti, ha dimostrato che a consumi crescenti di antociani corrispondeva una riduzione del rischio di comparsa di diabete di tipo 2 (16). Altri studi di intervento hanno dimostrato che la supplementazione con antociani, in soggetti diabetici determinava un miglioramento dei parametri di ossidazione, infiammazione e insulino-resistenza (17).

Diversi studi suggeriscono che tali effetti potrebbero essere determinati dalla loro capacità di regolare l'omeostasi del glucosio, regolando vie di segnale coinvolte nella risposta delle cellule target all'insulina. In particolare, è stato dimostrato che la C3G e il PCA hanno un'azione insulino-simile, in adipociti omentali, promuovendo lo spostamento del trasportatore del glucosio, il *Glucose transporter type 4* (GLUT4) alla membrana cellulare e quindi l'incorporazione del glucosio. A livello molecolare essi sono in grado di attivare componenti della via di segnale dell'insulina, come il substrato del recettore dell'insulina-1 o *insulin receptor substrate 1* (IRS1), la chinasi inibente l'apoptosi (Akt), e il fattore di trascrizione recettore gamma attivato dai proliferatori dei perossisomi o *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma* (PPAR γ) aumentando l'espressione di uno dei suoi geni target, l'adiponectina, noto per la sua capacità di migliorare la risposta all'insulina e ridurre l'infiammazione (18, 19) (Figura 3).

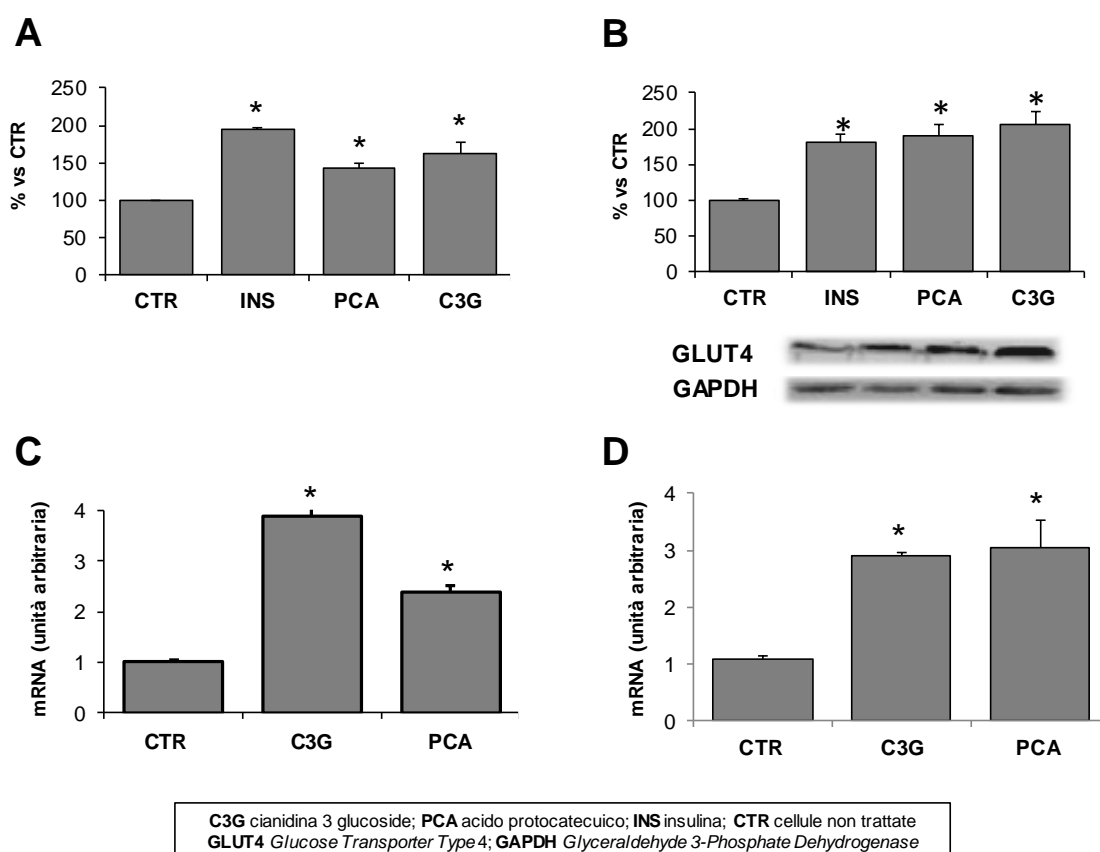


Figura 3. Adipociti primari umani isolati da biopsie di tessuto adiposo viscerale trattati con C3G o con il suo metabolita PCA: incorporazione del glucosio (A); traslocazione del GLUT4 sulla membrana plasmatica (le cellule trattate con INS 100nM sono state utilizzate come controllo positivo) (B); espressione di RNA messaggero di PPAR γ e adiponectina (C e D)
 * $p < 0,05$ verso CTR

Conclusioni

Per arrivare a definire strategie nutrizionali mirate è necessario raccogliere dati scientifici di qualità che permettano di raggiungere un elevato grado di evidenza scientifica attraverso la raccolta di dati epidemiologici e la conduzione di studi clinici di intervento controllati, randomizzati e possibilmente a doppio cieco e studi su sistemi cellulari *in vitro* al fine di individuare l'alimento funzionale, i componenti attivi e il loro meccanismo di azione. Negli ultimi anni gli studi di nutrigenomica hanno evidenziato l'esistenza di interazioni tra alimenti e geni, ponendo le basi per progredire verso interventi nutrizionali personalizzati in grado di aumentarne l'efficacia e di diminuire i costi per il Servizio Sanitario Nazionale.

Bibliografia

1. Sofi F, Macchi C, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Mediterranean diet and health status: an updated meta-analysis and a proposal for a literature-based adherence score. *Public Health Nutr* 2014;17(12):2769-82.
2. Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus document. *Br J Nutr* 1999;81:S1-S27.
3. Aronson JK. Defining 'nutraceuticals': neither nutritious nor pharmaceutical. *Br J Clin Pharmacol* 2017;83(1):8-19.
4. Schwingshackl L, Hoffmann G. Adherence to Mediterranean diet and risk of cancer: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Int J Cancer* 2014;135(8):1884-97.
5. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventós RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez JA, Martínez-González MA; PREDIMED Study Investigators. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med* 2013;368(14):1279-90.
6. Castañer O, Corella D, Covas MI, Sorlí JV, Subirana I, Flores-Mateo G, Nonell L, Bulló M, de la Torre R, Portolés O, Fitó M; PREDIMED study investigators. *In vivo* transcriptomic profile after a Mediterranean diet in high-cardiovascular risk patients: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2013;98(3):845-53.
7. Martínez-Lapiscina EH, Clavero P, Toledo E, San Julián B, Sanchez-Tainta A, Corella D, Lamuela-Raventós RM, Martínez JA, Martínez-González MÁ. Virgin olive oil supplementation and long-term cognition: the PREDIMED-NAVARRA randomized trial. *J Nutr Health Aging* 2013;17(6):544-52.
8. Fitó M, de la Torre R, Covas MI. Olive oil and oxidative stress. *Mol Nutr Food Res* 2007 Oct;51(10):1215-24.
9. D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Sczzocchio B, Masella R. 2010. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *Int J Mol Sci* 11:1321-1342.
10. Fitó M, Cladellas M, de la Torre R, Martí J, Alcántara M, Pujadas-Bastardes M, Marrugat J, Bruguera J, López-Sabater MC, Vila J, Covas MI; members of the SOLOS Investigators. Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis* 2005;181(1):149-58.
11. Weinbrenner T, Fitó M, de la Torre R, Saez GT, Rijken P, Tormos C, Coolen S, Albaladejo MF, Abanades S, Schroder H, Marrugat J, Covas MI. Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidative status in men. *J Nutr* 2004;134(9):2314-21.
12. Vari R, D'Archivio M, Filesi C, Carotenuto S, Sczzocchio B, Santangelo C, Giovannini C, Masella R. Protocatechuic acid induces antioxidant/detoxifying enzyme expression through JNK-mediated Nrf2 activation in murine macrophages. *J Nutr Biochem* 2011;22(5):409-17.
13. Farràs M, Valls RM, Fernández-Castillejo S, Giralt M, Solà R, Subirana I, Motilva MJ, Konstantinidou V, Covas MI, Fitó M. Olive oil polyphenols enhance the expression of cholesterol efflux related genes *in vivo* in humans. A randomized controlled trial. *J Nutr Biochem* 2013;24(7):1334-9.
14. Vitaglione P, Donnarumma G, Napolitano A, Galvano F, Gallo A, Scalfi L, Fogliano V. Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *J Nutr* 2007;137:2043-2048.
15. Guo X, Yang B, Tan J, Jiang J, Li D. Associations of dietary intakes of anthocyanins and berry fruits with risk of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Clin Nutr* 2016;70(12):1360-1367.
16. Wedick NM, Pan A, Cassidy A, Rimm EB, Sampson L, Rosner B, Willett W, Hu FB, Sun Q, van Dam RM. Dietary flavonoid intakes and risk of type 2 diabetes in US men and women. *Am J Clin Nutr* 2012;95(4):925-33.

17. Li D, Zhang Y, Liu Y, Sun R, Xia M. Purified anthocyanin supplementation reduces dyslipidemia, enhances antioxidant capacity, and prevents insulin resistance in diabetic patients. *J Nutr* 2015;145(4):742-8.
18. Scazzocchio B, Vari R, Filesi C, D'Archivio M, Santangelo C, Giovannini C, Iacovelli A, Silecchia G, Li Volti G, Galvano F, Masella R. Cyanidin-3-O- β -glucoside and protocatechuic acid exert insulin-like effects by upregulating PPAR γ activity in human omental adipocytes. *Diabetes* 2011;60(9):2234-44.
19. Scazzocchio B, Vari R, Filesi C, Del Gaudio I, D'Archivio M, Santangelo C, Iacovelli A, Galvano F, Pluchinotta FR, Giovannini C, Masella R. Protocatechuic acid activates key components of insulin signaling pathway mimicking insulin activity. *Mol Nutr Food Res* 2015;59(8):1472-81.

ESIGENZE NUTRIZIONALI IN FASCE DI ETÀ SENSIBILI

Marco Silano

Dipartimento Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Salute Pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

La prevalenza delle malattie cronicodegenerative è in drammatico aumento in tutto il mondo. L'obesità e le malattie ad essa correlate quali gli eventi cardio-vascolari e il diabete mellito di tipo 2 sono direttamente o indirettamente responsabili di quasi la metà della mortalità globale. In questo scenario, sono ulteriori elementi di preoccupazione l'età media di sviluppo delle malattie cronicodegenerative che si sta abbassando, nonché l'esplosione di una vera e propria epidemia di queste condizioni nei Paesi in transizione e in via di sviluppo (1). Come sarà descritto più nel dettaglio nel paragrafo successivo, le conseguenze dell'obesità nei Paesi in transizione e in via di sviluppo possono essere più gravi che nei Paesi industrializzati, per le condizioni socio-economiche e sanitarie che influenzano sfavorevolmente l'outcome a lungo termine. La prevenzione dell'obesità e delle condizioni associate è pertanto una strategia decisiva per la promozione della salute della popolazione. Una strategia di prevenzione efficace deve essere mirata, precoce, e indirizzata alle fasce di età sensibili all'intervento. Quindi l'identificazione delle fasce di età sensibili è di fondamentale importanza per la prevenzione.

Ipotesi “fetale” di Barker

L'epidemiologo David Barker nel 1995 pubblicò per la prima volta la sua ipotesi, secondo la quale la malnutrizione materna, soprattutto durante il secondo e terzo trimestre di gravidanza, determina un rallentamento, per scarso apporto di nutrienti, ossigeno e fattori di crescita, della divisione cellulare e quindi una crescita non omogenea e proporzionale degli organi e tessuti. Quindi la mancanza di adeguato nutrimento al feto anche solo per un breve periodo, può sfociare nella riduzione permanente del numero delle cellule in quegli organi e tessuti che in quel preciso momento erano in più rapida crescita (2). L'intuizione scientifica di Barker consiste nell'aver individuato una correlazione tra l'adattamento a una condizione intra-uterina sfavorevole, manifestata attraverso un basso peso alla nascita (quello che lo stesso Barker chiamò *thrifty phenotype*, o fenotipo a risparmio energetico) e lo sviluppo di patologie cronicodegenerative durante la seconda e terza età, in particolare coronaropatie, ipertensione e diabete mellito di tipo 2. Lo stesso Barker, successivamente, identificò diversi meccanismi patogenetici, metabolici e ormonali, alla base di questa correlazione, mediati da un aumento dei livelli materno-fetali circolanti di cortisolo, insulina, di fattore di crescita insulino-simile (*Insulin-like Growth Factor 1*, IGF-1) e ormone della crescita (3).

Pertanto, la teoria di Barker ha identificato un'epoca estremamente sensibile al danno nutrizionale e di conseguenza gli sforzi per prevenire le malattie cronicodegenerative sono stati indirizzati al mantenimento del benessere materno-fetale.

Modello del *life-course*

Negli ultimi anni, accanto al modello sopra descritto, sono stati identificati altri modelli teorici che spiegano come un danno possa essere nel tempo, un fattore di rischio per lo sviluppo a distanza di patologie cronico-degenerative. Va precisato che questi modelli non sono del tutto alternativi a quanto teorizzato da Barker, quanto piuttosto si sovrappongono alla teoria barkeriana del *thrifty phenotype*. Il modello epidemiologico del *life-course* infatti prevede che il rischio di sviluppare patologie in epoche successive non dipenda dagli stimoli ambientali avvenuti in maniera puntiforme in una sola epoca, quanto piuttosto che si verifichi un accumulo del rischio in tutti i periodi precedenti a quello in cui la patologia si manifesta. Inoltre, i fattori di rischio interdipendenti, interagiscono tra di loro attraverso una catena di eventi che amplifica il rischio (4, 5).

Inoltre, in questa visione, gli aspetti nutrizionali non sono i soli da considerare, ma anche i fattori biologici e socio-economici partecipano all'accumulo del rischio. Alla luce di quest'ultima considerazione, è facile comprendere come il rischio legato alla malnutrizione in generale e all'obesità, nello specifico, sia maggiore nei Paesi in transizione. In questi, infatti, da una parte la globalizzazione sta portando pattern alimentari fino a poco tempo fa caratteristici dell'Occidente, dall'altra le condizioni socio-economiche e soprattutto igieniche non sono migliorate altrettanto velocemente, rendendo le conseguenze di pattern alimentari squilibrati e carenti più pericolose a lungo termine. Inoltre, le malattie infettive ancora endemiche in questi Paesi, aggravano gli effetti di una alimentazione squilibrata.

Integrandosi con l'ipotesi fetale, il modello del *life-course* identifica quindi che qualsiasi epoca o periodo della vita è sensibile al rischio nutrizionale; semplificando si possono individuare le seguenti fasi: vita fetale, prima e seconda infanzia, adolescenza e vita adulta. Ciascuna di queste fasi è collegata alla successiva nel formare un circolo vizioso durante il quale il rischio si accumula, fino allo sviluppo dell'evento patologico. Il momento più importante di questo circolo vizioso è la gravidanza, quando la malnutrizione materna determina un ambiente intrauterino sfavorevole, che compromette l'outcome del feto, che alla nascita si trova già in una situazione svantaggiosa da affrontare.

A tal proposito, il modello del *life-course* si differenzia da quello di Barker per diversi punti. Innanzitutto, un ambiente intra-uterino sfavorevole allo sviluppo fetale si determina in seguito allo stato di nutrizione che la futura mamma ha presentato per tutta la vita fino a quel momento e non durante la sola gravidanza. Inoltre, un ambiente intra-uterino sfavorevole è responsabile di un danno i cui meccanismi non sono solo quelli endocrino/metabolici, ma anche e soprattutto le modifiche epigenetiche del genoma fetale. In altre parole, la malnutrizione e altre *noxae* patogene materne alterano l'espressione di alcuni geni del nascituro, rendendo trans-generazionali gli effetti della malnutrizione materna (6). Inoltre, si pensi all'ulteriore effetto dannoso di stili di vita non salutari trasmessi attraverso la quotidianità dalla madre al bambino, il cui genoma viene orientato verso l'attivazione di *cluster* infiammatori e sensibilizzanti agli stimoli ambientali. Una bambina nata e cresciuta in questo *setting* genetico e ambientale a sua volta, da adulta, non sarà certamente in grado di offrire le condizioni per una gravidanza ottimale.

Come già accennato in precedenza, il modello epidemiologico del *life-course* non è solo basato sugli effetti del mal-nutrizione (intesa come eccesso o difetto di apporto calorico e/o pattern alimentari squilibrati), ma anche di altri fattori ambientali, quali fumo, consumo di alcol e sedentarietà, i quali hanno un peso diverso nelle diverse epoche della vita. Per esempio, l'abitudine al fumo rappresenta, accanto alla nutrizione, il fattore ambientale più condizionante durante l'adolescenza.

Uno dei problemi del modello del *life-course* è l'identificazione di indicatori di accumulo del rischio, soprattutto in età adulta. Per il momento, la statura e la lunghezza delle gambe, il peso e il quoziente intellettivo sono misure che durante l'infanzia correlano con alcune patologie

cronico-degenerative dell'adulto, mentre mancano indicatori del rischio futuro oltre questa età. Avere indicatori durante tutto il corso della vita permette soprattutto di valutare l'efficacia degli interventi preventivi messi in atto e indirizzati nei confronti degli adolescenti, degli adulti e della terza età. Per rendere più complicato il quadro, va considerato che gli indicatori sono malattia e genere-specifici, pertanto c'è ancora molta ricerca epidemiologica da fare in questo ambito, affinché il modello del *life-course* possa avere un'applicazione pratica.

È fuor di dubbio che attualmente il carico maggiore per i Sistemi Sanitari Nazionali, non solo Europei, ma di tutto il mondo è rappresentato dall'assistenza ai pazienti della terza età. La vita media si sta allungando, purtroppo le malattie cronic-degenerative in queste persone si sommano l'una alle altre, molto spesso dando quadri di poli-patologie che sono difficili, oltre che costosi, da trattare e che determinano immobilità e difficoltà ad alimentarsi provocando un ulteriore aggravamento del quadro clinico generale. Pertanto la possibilità di intervenire in questa fase della vita con misure efficaci sarebbe fondamentale, previa identificazione di indicatori e di misure conseguenti. Il modello del *life-course* potrebbe dare un contributo specifico e innovativo proprio nella diminuzione del carico di patologie nella terza età.

Conclusioni

In conclusione, tutte le età ed epoche della vita rappresentano un momento di sensibilità e fragilità della popolazione da un punto di vista nutrizionale; d'altra parte interventi preventivi possono essere indirizzati nei confronti di persone di qualsiasi età. Squilibrati *pattern* nutrizionali non sono il solo fattore di rischio; la sedentarietà e il fumo partecipano in maniera significativa all'accumulo del predetto rischio nel corso della vita. La globalizzazione ha portato nei Paesi in transizione gli stili di vita occidentali, i quali interagendo con condizioni socio-economiche, ancora degradate in questi Paesi, determinano un accumulo maggiore del rischio.

Bibliografia

1. World Health Organization. *Global status report on noncommunicable diseases 2014*. Geneva: WHO; 2014.
2. Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* 1995;311:171.
3. Phillips DI, Barker DJ, Fall CH, Seckl JR, Whorwood CB, Wood PJ, Walker BR. Elevated plasma cortisol concentrations: a link between low birth weight and the insulin resistance syndrome? *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:757-60.
4. Kuh D, Ben-Shlomo Y, Lynch J, Hallqvist J, Power C. Life course epidemiology. *J Epidemiol Community Health* 2003;57:778-83.
5. Darnton-Hill I, Nishida C, James WP. A life course approach to diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. *Pub Health Nutr* 2004;7:101-21.
6. Soubry A, Murphy SK, Wang F, Huang Z, Vidal AC, Fuemmeler BF, Kurtzberg J, Murtha A, Jirtle RL, Schildkraut JM, Hoyo C. Newborns of obese parents have altered DNA methylation patterns at imprinted genes. *Int J Obes* 2015;39:650-7.
7. Herman DR, Baer MT, Adams E, Cunningham-SaboL, Duran N, Johnson DB, Yakes E. Life course perspective: evidence for the role of nutrition. *Matern Child Health J* 2014;18:450-61.

METABOLISMO E ATTIVITÀ FISICA

Silvia Migliaccio (a), Emanuela Greco (b)

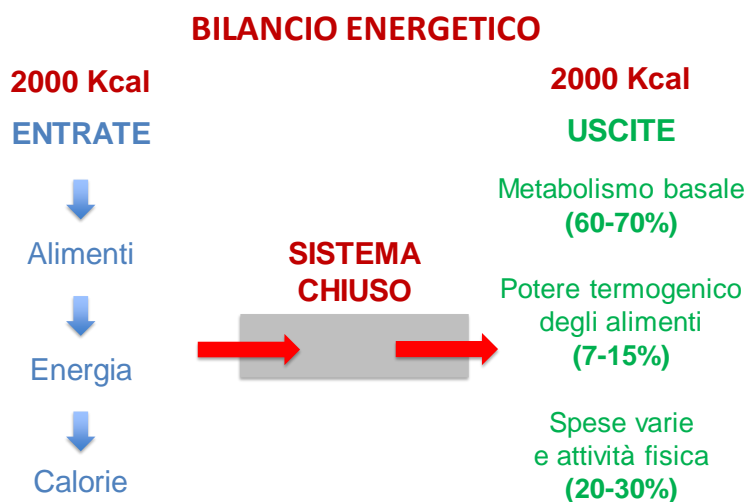
(a) Dipartimento di Scienze Motorie, Umane e della Salute, Unità di Endocrinologia, Università degli Studi di Roma Foro Italico, Roma

(b) Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Fisiopatologia Medica, Endocrinologia e Scienza dell’Alimentazione, Sapienza Università di Roma, Roma

Introduzione

Con il termine “metabolismo” (dal greco μεταβολή= cambiamento) si individua l’insieme delle modificazioni chimiche che mantengono le funzioni basali per il sostegno vitale all’interno delle cellule di tutti gli organismi viventi. Tali reazioni sono catalizzate da enzimi e permettono agli organismi di crescere e riprodursi, mantenere le proprie strutture e rispondere alle sollecitazioni esogene. Per dispendio energetico totale (kcal/die, kJ/die) si intende invece la quantità di energia che un organismo utilizza nell’unità di tempo (24 ore) per il mantenimento delle proprie caratteristiche strutturali e funzionali e per le altre attività volontarie, quali l’attività fisica. Inoltre bisogna tener conto che un’ulteriore quota di energia deve essere considerata in età evolutiva, gravidanza, allattamento o in caso di patologie (1).

Quindi, il dispendio energetico totale indica il fabbisogno di energia che deve essere introdotta con la dieta per soddisfare il bilancio energetico, con il quale si intende un sistema che si considera in equilibrio quando entrate (energia introdotta con gli alimenti) e uscite (dispendio energetico) si equivalgono (Figura 1).



Maggiori necessità in: gravidanza, allattamento, accrescimento

Figura 1. Schema riassuntivo del bilancio energetico

In particolare, le componenti del dispendio energetico totale possono essere suddivise in:

- *metabolismo basale*: la quantità di energia utilizzata a riposo, a digiuno da 12-14 ore, in stato termico neutrale e rilassamento psico-fisico; questa quota equivale al 60-75% del dispendio energetico totale ed è riconducibile per il 70-80% alla massa magra (organi e massa muscolare);
- *dispendio energetico da attività fisica*: l'aumento del dispendio energetico totale conseguente a un qualsiasi movimento del corpo; deve essere considerata come la percentuale più variabile del dispendio energetico totale ($\approx 20-40\%$);
- *termogenesi da alimenti*: l'incremento postprandiale del metabolismo basale, dovuto a digestione, assorbimento e metabolismo; può variare dal 7-13% del dispendio energetico totale in relazione alla composizione della dieta.

Ciascuna di queste componenti può essere misurata o stimata attraverso equazioni di regressione.

Nella pratica clinica si utilizzano, per la stima del metabolismo basale, le equazioni di regressione, che tengono conto del genere, dell'età, del peso e/o statura, della massa magra determinata mediante plicometria, *Bioelectrical Impedance Analysis* (BIA) o *Dual Energy X-Ray Absorptiometry* (DEXA).

La stima del dispendio energetico totale può essere ottenuta moltiplicando il metabolismo basale per un coefficiente che esprime il Livello di Attività Fisica (LAF). Questa è una grandezza adimensionale che definisce livelli diversi di sedentarietà/impegno motorio (Tabella 1); in genere il valore è compreso tra 1,4-2. Conoscendo il costo energetico delle principali attività, espresso come PAR (*Physical Activity Ratio*), il LAF è calcolato ponderando i rispettivi PAR per i tempi dedicati ad ogni singola attività nell'arco delle 24 ore:

$$\text{LAF} = [(\text{PAR1} \times \text{T1} + \text{PAR2} \times \text{T2} + \dots + \text{PARn} \times \text{Tn}) / (\text{T1} + \text{T2} + \dots + \text{Tn})]$$

Tabella 1. Profili di sedentarietà/impegno motorio e dispendio energetico totale secondo i livelli di attività fisica

Livello di sedentarietà		DE-AF	LAF
FAO/WHO/UNU 2004*	IOM 2005**		
Sedentario-poco attivo LAF = 1,4-1,69	Sedentario LAF = 1,00-1,39	19% di DET	1,4
	Poco attivo LAF = 1,40-1,59	28% di DET	1,6
Attivo o moderatamente attivo LAF = 1,70-1,99	Attivo LAF = 1,60-1,89	35% di DET	1,8
Molto attivo LAF = 2,00-2,40	Molto attivo LAF = 1,90-2,50	40% di DET	2,0

DE-AF Dispendio Energetico da Attività Fisica; **LAF** Livelli di Attività Fisica; **DET** Dispendio Energetico Totale

* *Human energy requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation*. Rome: Food and Agriculture Organization; 2004. (FAO Food and Nutrition Technical Report Series No. 1).

** *Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Consensus Study Report*. Washington, DC: Institute of Medicine (IOM); 2005.

In alternativa è possibile definire il profilo di Attività Fisica (AF) mediante questionari, quali l'*International Physical Activity Questionnaire* – IPAQ, che quantifica l'AF svolta nell'arco di una settimana, utilizzando come unità di misura il MET (*Metabolic Equivalent Task*; 1 MET = $3,5 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ di $\text{O}_2 \approx 1 \text{ kcal/kg/ora}$). Il MET indica il costo energetico di ciascun tipo di AF ed

è calcolato in base alla quantità di O₂ consumata a riposo in 1 minuto. Secondo Pate e collaboratori le diverse tipologie di AF possono essere classificate come: leggere <3 MET; moderate 3-6 MET; intense >6 MET. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (*World Health Organization, WHO*) suggerisce un impegno settimanale di 450-700 MET, a prescindere dall'età, ovvero almeno 100 minuti di AF leggera o 70 minuti di AF più sostenuta (2).

I nutrienti (carboidrati, proteine, grassi, vitamine, minerali e acqua), introdotti con gli alimenti, rappresentano sostanze essenziali di cui il corpo necessita per le sue funzioni (3). In particolare, il modello della dieta mediterranea (Figura 2), ne garantisce la giusta distribuzione nell'arco della giornata, volta al raggiungimento e al mantenimento di un corretto stato di salute (4).

- I principi fondamentali alla base del modello alimentare della dieta mediterranea prevedono:
- un abbondante consumo di alimenti di origine vegetale (cereali, pasta, pane, legumi, verdura e frutta fresca);
 - basso consumo di prodotti di origine animale e caseari (preferire carne bianca e pesce);
 - basso consumo di bevande alcoliche;
 - uso del piatto unico (assicura la presenza di tutti i nutrienti);
 - usare come condimento olio di oliva (possibilmente extra-vergine).

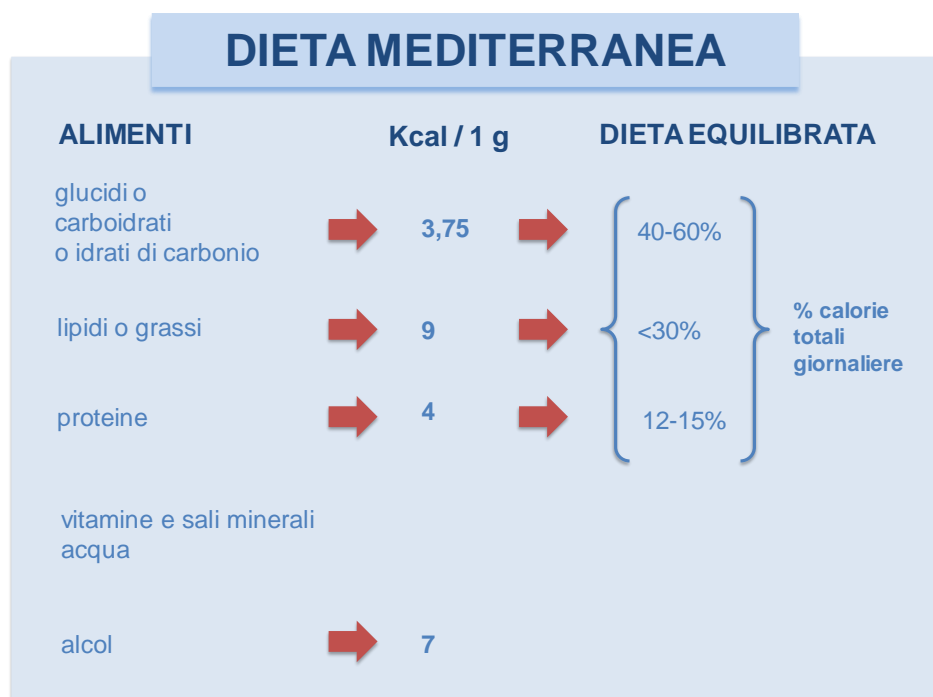


Figura 2. Distribuzione dei nutrienti secondo il modello della dieta mediterranea

Nel momento in cui si verifica un'alterazione dell'equilibrio del bilancio energetico, in eccesso o in difetto, si sviluppano delle alterazioni della composizione corporea, quali magrezza e obesità. L'obesità è una patologia caratterizzata da un eccesso di tessuto adiposo che predispone l'individuo al rischio di sviluppare patologie croniche quali malattie cardiovascolari, polmonari, metaboliche, osteoarticolari e tumorali (5). Un numero sempre più elevato di studi dimostrano come l'obesità, e quindi l'eccesso di tessuto adiposo, non debba essere considerata soltanto sulla base dell'Indice di Massa Corporea (IMC), ma anche e soprattutto della composizione corporea dell'individuo, intesa come percentuale di massa grassa e massa magra e della loro distribuzione

(6). Grazie alla valutazione della composizione corporea è anche possibile evidenziare la presenza o meno di sarcopenia, condizione caratterizzata da riduzione di massa e forza muscolare.

Il nostro gruppo di ricerca ha recentemente osservato, in una popolazione di soggetti obesi, una relazione indiretta tra livelli di fibrinogeno e massa magra, nonché un'importante correlazione tra livelli di massa magra, vitamina D, osteocalcina e IGF il fattore di crescita insulino-simile 1 (*Insulin-like Growth Factor 1* o IGF-1) dimostrando che la perdita di massa muscolare e la sarcopenia nei soggetti obesi sono associati con livelli cronici di infiammazione e con il peggioramento dello stato di benessere metabolico e scheletrico (6). Tutto ciò ha evidenziato una interazione funzionale importante tra muscolo, tessuto adiposo e tessuto osseo. Infine, nella stessa popolazione, abbiamo dimostrato come la riabilitazione nutrizionale e motoria, somministrando a ciascun paziente arruolato un programma nutrizionale personalizzato, elaborato secondo il modello della dieta mediterranea e un programma personalizzato di allenamento, migliori significativamente l'indice di massa corporea e la composizione corporea, nonché l'attività di cellule mesenchimali *in vitro* (7, 8).

Conclusioni

In conclusione tali risultati suggeriscono come livelli più elevati di massa magra nella popolazione obesa correlino con un miglior profilo metabolico, indicando la necessità di sviluppare programmi per incrementare l'attività fisica nelle persone obese, al fine di mantenere una massa muscolare ottimale.

Bibliografia

1. Greco EA, Pinto A. Valutazione del dispendio energetico. *L'Endocrinologo* 2017;18(2):40-1.
2. Ainsworth BE, Haskell WL, Whitt MC, Irwin ML, Swartz AM, Strath SJ, O'Brien WL, Bassett DR Jr, Schmitz KH, Emplaincourt PO, Jacobs DR Jr, Leon AS. Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities. *Med Sci Sports Exerc* 2000;32(9 Suppl):S498-504.
3. Società Italiana di Nutrizione Umana. *LARN: Livelli di Assunzione di Riferimento di Nutrienti ed energia per la popolazione italiana, IV revisione*. Milano: SICS Editore, 2014.
4. Polito A, Scalfi L, Ciarapica D, Barnaba L. Energia. In: Donini LM, Giusti AM, Pinto A, del Balzo V (Ed.). *Alimentazione e nutrizione umana. III edizione di Fondamenti di nutrizione umana*. Roma: Pensiero Scientifico Editore; 2016. p 169-98.
5. Greco EA, Lenzi A, Migliaccio S. The pathophysiological basis of bone tissue alterations associated with eating disorders. *Horm Mol Biol Clin Invest* 2016;28(3):121-132.
6. Fornari R, Francomano D, Greco EA, Marocco C, Lubrano C, Wannenes F, Papa V, Bimonte VM, Donini LM, Lenzi A, Aversa A, Migliaccio S. Lean mass in obese adult subjects correlates with higher levels of vitamin D, insulin sensitivity and lower inflammation. *J Endocrinol Invest* 2015;38(3):367-72.
7. Emerenziani GP, Gallotta MC, Migliaccio S, Greco EA, Marocco C, di Lazzaro L, Fornari R, Lenzi A, Baldari C, Guidetti L. Differences in ventilatory threshold for exercise prescription in outpatient diabetic and sarcopenic obese subjects. *Int J Endocrinol* 2016;2016:6739150.
8. VM, Fittipaldi S, Marocco C, Emerenziani GP, Fornari R, Guidetti L, Poggiogalle E, Nicolai E, Di Luigi L, Donini LM, Baldari C, Lenzi A, Greco EA, Migliaccio S. Physical activity and hypocaloric diet recovers osteoblasts homeostasis in women affected by abdominal obesity. *Endocrine* 2016 Dec 16. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1007/s12020-016-1193-1.

MEDICINA INTEGRATA E STILI DI VITA

Andrea Geraci

Centro Nazionale Salute Globale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

I contenuti di un corso dedicato allo studio dello ‘stato molecolare’ dell’individuo e le sue modificazioni legate al contesto nel quale è inserito, possono essere descritti da diversi punti di vista. Possiamo pensare l’individuo, la persona come un sistema complesso costituito a sua volta da altri sistemi complessi come gli apparati, gli organi, i tessuti, le cellule, le molecole, gli atomi, i radicali liberi. Ma possiamo inquadrare la stessa persona all’interno di quei sistemi complessi che sono l’ambiente familiare, di lavoro, quello sociale in generale ma anche l’ambiente vero e proprio fatto di aria più o meno pura, di acqua, di elementi vegetali e animali di cui ci cibiamo, e poi l’inquinamento elettromagnetico con cui ci confrontiamo, per non dimenticare, andando un po’ più lontano, le influenze di sole e luna. La luce del sole, lo diamo per scontato e non ci riflettiamo mai abbastanza, fa crescere le piante di cui ci nutriamo noi e gli animali, ci stimola pigmenti e vitamine, ci migliora l’umore.

Il sistema solare e l’atomo hanno molto in comune: macro e microcosmo. E noi siamo in mezzo. Antiche tradizioni mediche orientali riprese da alcune occidentali più recenti come l’omeopatia e la medicina antroposofica mettono in evidenza la corrispondenza tra determinati metalli, organi umani e i pianeti del sistema solare (Tabella 1) (1).

Tabella 1. Corrispondenze tra pianeti, metalli e organi umani

Pianeta	Metallo	Organo
Saturno	Piombo	Milza
Giove	Stagno	Fegato
Marte	Ferro	Cistifellea
Sole	Oro	Cuore
Venere	Rame	Reni
Mercurio	Mercurio	Polmoni
Luna	Argento	Cervello

Viste queste corrispondenze si può utilizzare ad esempio il metallo di Marte, il ferro, opportunamente trattato con i procedimenti di preparazione omeopatica o antroposofica, per curare alcuni squilibri della cistifellea.

Ecco allora che quando si considera la salute umana si pone l’attenzione a diversi fattori e ci possiamo far aiutare dal nostro occhio, dal microscopio o da un telescopio per capire come fare a mantenere lo stato di salute ed evitare l’insorgenza di tutte quelle patologie cronico-degenerative che sono ampiamente influenzate dal nostro stile di vita.

Dalle medicine tradizionali alla medicina integrata

Fino a qualche decennio fa approcci come l'agopuntura o la fitoterapia venivano considerati medicine alternative, poi il termine più usato è stato non-convenzionale quindi complementare. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (*World Health Organization*, WHO) le medicine tradizionali provenienti dai vari continenti e presenti come tradizioni all'interno delle varie società/nazioni anche da millenni sono una somma di conoscenze, abilità e pratiche basate su teorie, credenze ed esperienze appartenenti a differenti culture, usate per il mantenimento della salute, come pure per la prevenzione, la diagnosi e la cura di malattie fisiche o mentali (2). In un altro recente documento WHO viene auspicato che gli stati membri, e quindi i relativi Ministeri della Salute, sfruttino il potenziale contributo delle medicine tradizionali per la salute, il benessere e l'assistenza sanitaria centrata sulla persona, promuovendo l'uso sicuro ed efficace delle medicine tradizionali e regolamentando la ricerca e "integrando" prodotti, trattamenti, professionisti e prassi nei sistemi sanitari (3).

Numerose culture antiche ci tramandano esperienze e conoscenze soprattutto nell'ambito dell'uso di piante medicinali per la cura, la prevenzione e il benessere. Altre sostanze studiate sono quelle di origine minerale, animale e prodotti biologici. Vi sono poi tutta una serie di trattamenti e di insegnamenti che possono essere considerati una vera fonte di buoni consigli come ad esempio terapie che si esplicano direttamente sul fisico come i massaggi, alcune ginnastiche, l'agopuntura e la moxibustione, l'elioterapia o approcci che sono indirizzati alla parte più elevata dell'uomo come musica, canto, pittura, modellaggio, scultura, euritmia, le cosiddette terapie artistiche. Vi sono poi tutta una serie di indicazioni per corretti stili di vita e approcci alla vita come l'approccio olistico-spirituale, l'autodeterminazione, la meditazione, lo yoga, ecc.

Una generica classificazione delle terapie tradizionali/non convenzionali o approcci integrati suddivide in 5 grandi tipologie i principali trattamenti:

1. sistemi medici strutturati (es. medicina tradizionale cinese/agopuntura, ayurveda, omeopatia, medicina antroposofica);
2. terapie biologiche (es. integratori alimentari, floriterapia di Bach);
3. manipolazioni fisiche e ginnastiche (es. shiatsu, osteopatia, chiropratica);
4. medicina energetica (es. cromoterapia, reiki);
5. interventi sulla connessione mente-corpo (es. yoga, meditazione, arteterapia).

Se andiamo su uno dei più utilizzati motori di ricerca in campo biomedico, PUBMED, possiamo osservare come l'empirismo di secoli di esperienze trovi oggi molto spesso la sua validazione con metodi moderni, attraverso un enorme e sempre crescente numero di lavori scientifici sui diversi trattamenti ma soprattutto sulle piante e le singole molecole di origine vegetale.

Educazione alla salute oggi

Come può essere utilizzata oggi la medicina integrata? Intanto dovremmo ascoltare i consigli sani che ci risuonano, che siano delle antiche tradizioni, del nostro psicoterapeuta, del nostro medico di fiducia o del dietologo. L'agopuntura, i massaggi, possono sciogliere molti squilibri fisici, poi abbiamo numerosi rimedi naturali che possono integrare le terapie convenzionali, per poi arrivare al farmaco di sintesi ovviamente soprattutto nelle urgenze e in molte situazioni patologiche importanti. Parlando di prevenzione delle patologie croniche, le cosiddette malattie non trasmissibili, sono soprattutto gli stili di vita corretti, i positivi approcci alla vita e una dieta sana gli elementi per una prevenzione pienamente efficace.

Equilibrio di corpo, mente, spirito non sono poi cose così lontane da noi! Quando comprenderemo meglio quanto questo abbia a che fare con la nostra salute faremo un salto di qualità nell'ambito dell'educazione sanitaria. Da troppo tempo ci siamo abituati a delegare ai medici il nostro stato di salute. Dovremo pian piano entrare nell'ottica che ciascuno di noi è l'artefice del proprio stato di salute e non affidarci passivamente a medici e medicine. Lo faremo in una fase di malattia conclamata, ma il nostro obiettivo sarà lavorare per non arrivare a quella fase. Abbiamo tutte le potenzialità per non ammalarci o per guarire. Gli antichi filosofi (che erano anche terapeuti) parlavano della nostra interiore scintilla divina, per cui termini che oggi si usano sempre più hanno una valenza molto profonda: autostima, resilienza, pensiero positivo sono concetti che ci invitano a raggiungere il nostro equilibrio interiore, punto di partenza per uno stato di benessere psico-fisico. Al giorno d'oggi noi possiamo attingere alla medicina tradizionale cinese, tibetana o ayurvedica, dalla medicina antroposofica, dagli insegnamenti di Ildegarda di Bingen, tutta una serie di consigli utili come quelli secondo cui l'equilibrio psico-fisico-spirituale, il giusto distacco ("impermanenza") dagli eventi stressanti, una sana moralità, i pensieri positivi, l'interesse per l'arte, la creatività, creano salute.

Quello che ci aspetta è lavorare su consapevolezza, stili di vita e approcci alla vita di ogni giorno, sui rapporti sociali e sullo stress psicosociale, sapendo che quelli sbagliati nuocciono alla salute e che non siamo il cestino di pensieri negativi altrui. Dobbiamo essere consapevoli profondamente degli effetti dell'abuso di alcol e di cosa provochiamo a noi stessi se entriamo nel vortice delle droghe, del fumo di sigaretta, nel gioco d'azzardo. Ci dovremmo ricordare un pò più spesso che avere una qualità ottimale del sonno (ritmo, quantità sufficiente e lontano da inquinamento acustico) è un rimedio che non ha eguali perché diamo per scontato ciò che di miracoloso avviene ogni notte: il recupero delle energie fisiche e mentali. Questo è uno dei principali insegnamenti della medicina antroposofica, dell'ayurveda e della medicina tradizionale cinese. Una costante attività fisica, adeguata all'età e al contesto personale è un altro aiuto riconosciuto oggi come fondamentale nella prevenzione di numerose malattie. Alle ginnastiche, allo sport si possono associare il pilates (ginnastica più recente e di origine occidentale) o arti marziali orientali come il *tai chi* e il *chi gong*, che aiutano l'individuo nel giusto equilibrio psico-fisico. Lo psicoterapeuta poi o alcune letture antiche, frutto di saggezze millenarie, possono rendere ciascuno di noi capace di lavorare responsabilmente su credenze ed emozioni il più precocemente possibile (le *life skills* sono una vera prevenzione soprattutto per i giovani, secondo le indicazioni della WHO) (4).

Ciascuno di noi deve fare i conti con le ferite infantili che inevitabilmente e indistintamente si porta con sé. Ferite con cui facciamo giornalmente i conti e che segnano il rapporto col nostro presente: è necessario liberarci dalle paure, dai sensi di colpa, dal senso di rifiuto, dalle amarezze, dalle gelosie, dalle tensioni. Dovremmo ritrovare noi stessi, avere fiducia in noi stessi, seguire antiche ma sempre attuali indicazioni secondo cui il non attaccamento alle cose, alle persone, alle situazioni, il distacco dal materialismo, l'empatia verso cose, animali, persone, occupazioni, il vivere il presente (qui e ora) ci possono dare gli strumenti per combattere lo stress cronico psicosociale, e quindi le numerose patologie croniche e psicosomatiche. Infatti molte malattie del nostro tempo sono la conseguenza del disagio sociale e relazionale come ad esempio la sindrome metabolica, la lombo-sciatalgia, la cefalea tensiva, la colite ulcerosa, la malattia di Crohn, l'ulcera gastro-duodenale, l'eczema cutaneo, la psoriasi, i disturbi dell'alimentazione come anoressia e bulimia e i disturbi cardiocircolatori come cardiopatia ischemica e ipertensione essenziale.

Attualità italiana della medicina integrata: le istituzioni coinvolte

In Italia esiste un certo numero di leggi e normative riguardanti la pratica delle cosiddette medicine non-convenzionali e anche l'utilizzo delle sostanze naturali, che a seconda della formulazione possono essere commercializzate seguendo normative ben precise (Tabella 2).

Tabella 2. Sostanze naturali e principali normative italiane

Tipo di prodotto	Riferimento legislativo	Esempio
Medicinale	DL.vo 219/2006* Art. 1 "Definizioni"	<i>Valeriana officinalis</i> Comprese
Medicinale vegetale tradizionale	DL.vo 219/2006* Art. 21 "Registrazione di medicinali di origine vegetale basata sull'impiego tradizionale"	<i>Pelargonium sidoides</i> Gocce, compresse <i>Rhodiola rosea</i> Comprese
Medicinale omeopatico	DL.vo 219/2006* Art. 16-20 Norme speciali applicabili ai medicinali omeopatici	<i>Calcarea carbonica 30 CH</i> granuli
Integratore alimentare	DL.vo 164/2004 "Attuazione della direttiva 2002/46/CE relativa agli integratori alimentari"	Estratto secco di: <i>Bupleurum chinense</i> radice <i>Glycyrrhiza uralensis</i> radice e rhizoma <i>Citrus aurantium</i> frutto: ES titolato al 4% in sinefrina
Novel food	Regolamento (CE) 258/1997 sui nuovi prodotti e i nuovi ingredienti alimentari	Yogurt addizionato a fitosteroli
Dispositivo medico	DL.vo 46/1997 "Attuazione della direttiva 93/42/CEE, concernente i dispositivi medici"	Spray orale: <i>Commiphora myrra</i> <i>Salvia officinalis</i> <i>Citrum limonum</i> <i>Mentha piperita</i> <i>Echinacea purpurea</i> <i>Matricaria recutita</i> <i>Eucalyptus globulus</i>
Cosmetico	DL.vo 50/2005 "Attuazione delle direttive 2003/15/CE e 2003/80/CE, in materia di prodotti cosmetici"	Crema (contro la cellulite) <i>Paullinia cupana</i> Extract, <i>Hedera helix</i> Extract, <i>Centella asiatica</i> Extract
Biocida	Direttiva 98/8/CE relativa all'immissione sul mercato dei biocidi	<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i> (piretro)

* "Attuazione della direttiva 2001/83/CE (e successive direttive di modifica) relativa ad un codice comunitario concernente i medicinali"

Quindi di volta in volta potremo parlare di farmaco, medicinale vegetale tradizionale, di farmaco omeopatico, di integratore alimentare, di dispositivo medico, di novel food, di antiparassitario e ciascuno di essi presenta una propria legislazione e dei riferimenti istituzionali, soprattutto Ministero della Salute e Agenzia Italiana del Farmaco, mentre l'Istituto Superiore di Sanità offre di volta in volta le consulenze scientifiche per i vari prodotti.

Per quanto riguarda le professioni sanitarie esistono fondamentalmente le linee guida della Federazione Nazionale degli Ordini dei Medici Chirurghi e degli Odontoiatri (FNOMCeO). In occasione del Consiglio Nazionale FNOMCeO del 12 dicembre 2009, furono emanate le “Linee guida per la formazione nelle medicine e pratiche non convenzionali riservate ai medici chirurghi e odontoiatri della FNOMCeO”. In quel documento si consideravano pratiche di pertinenza medica e se ne davano le relative norme per la formazione dei medici, l’agopuntura, la fitoterapia, l’omeopatia, l’omotossicologia, la medicina antroposofica, l’ayurvedica e la medicina tradizionale cinese (5).

Più recentemente la Conferenza Stato-Regioni ha redatto i criteri e le modalità per la formazione e il relativo esercizio dell’agopuntura, della fitoterapia e dell’omeopatia da parte dei medici chirurghi e odontoiatri (6). Sono stati istituiti presso numerosi Ordini Provinciali dei Medici Chirurghi e degli Odontoiatri i Registri, cioè gli elenchi dei medici che praticano anche le medicine non convenzionali. Ad esempio presso quello di Milano vi sono elenchi di medici che praticano agopuntura, fitoterapia, medicina antroposofica, medicina ayurvedica, medicina tradizionale cinese, farmacoterapia cinese, omeopatia, omotossicologia, osteopatia. A Roma c’è il Registro di agopuntura, fitomedicina, omeopatia, omotossicologia. Presso l’Ordine di Palermo si fa istanza d’iscrizione negli elenchi delle medicine non convenzionali per agopuntura, fitoterapia, medicina omeopatica, omotossicologia, medicina antroposofica.

Stress oggi: un aiuto dal passato

Sono numerosi gli approcci integrati che possono essere di giovamento nei momenti più o meno lunghi di stress e quindi come coadiuvanti nelle fasi acute e croniche di molteplici stati di malattia o, come viene detto in medicina tradizionale cinese, di disequilibrio. Seguono alcuni brevi esempi e raccomandazioni sull’uso di trattamenti integrati.

Fitoterapia

Le cosiddette piante adattogene sono utili nei periodi di stress prolungato, come può essere ad esempio la preparazione di un esame scolastico impegnativo. Il termine adattogeno fu elaborato nel 1947 dal farmacologo sovietico Nikolai Lazarev. Le caratteristiche di queste piante sono quelle di far aumentare la resistenza dell’organismo, prevengono o antagonizzano i disturbi causati da agenti stressanti, presentano una minima tossicità. Sono dei regolatori metabolici che incrementano le capacità dell’organismo ad adattarsi agli stimoli ambientali. Astragalo, ginseng, centella, rodiola, eleuterococco sono tra le piante più utilizzate e studiate in questo campo (7).

Nella tradizione ayurvedica vi sono molte piante studiate e utilizzate da lungo tempo per patologie croniche. Le più studiate sono sicuramente la witania e la curcuma. La witania (*Withania somnifera*) può avere effetti ricostituenti e rivitalizzanti (adattogena) ma anche attività immunostimolante e antineoplastica (*in vitro*), anti-microbica, anti-infiammatoria, neuroprotettiva, cardioprotettiva e proprietà antidiabetiche (8). La curcuma (*Curcuma longa*), la cui componente curcumina è tra le molecole più studiate negli ultimi anni, presenta attività antiossidante e antimicrobica molto potente e ha dimostrato di essere attiva contro varie malattie croniche tra cui alcuni tipi di cancro, il diabete, l’obesità, alcune patologie cardiovascolari, polmonari, neurologiche e autoimmuni (9).

Agopuntura

L'agopuntura in generale può essere anche una prima scelta di trattamento in un certo numero di stati patologici, ad esempio nausea, vomito e dolore. Una pubblicazione della WHO (10) indica questo approccio appartenente alla medicina tradizionale cinese come efficace in numerose patologie croniche e anche in campo oncologico in caso di dolore, edema, dispnea, mobilità e riabilitazione, leucocitopenia, nausea, sintomi vasomotori, per migliorare la qualità della vita, per stimolare il sistema immunitario e in caso di xerostomia (secchezza della bocca) post-chemio/radioterapia. Ultimamente gli studi scientifici che confermano l'esistenza dei meridiani e i relativi agopunti descritti millenni fa sono sempre più numerosi. Ad esempio Zhang e collaboratori hanno descritto le strutture tridimensionali di due specifici agopunti denominati Zhongji (RN3) and Zusanli (ST36) (11).

Approcci mente-corpo

Arte come terapia, la musica che fa stare meglio: non sono slogan ma frutto di recenti studi scientifici che negli ultimi anni sono sempre più numerosi. L'arte-terapia creativa in combinazione con la terapia fisica convenzionale può ridurre in modo significativo la depressione, migliorare le funzioni fisiche e aumentare la qualità della vita rispetto alla terapia fisica da sola (12). La musica può regolarizzare la pressione sanguigna sistolica e dovrebbe essere considerata come una componente della cura dei pazienti ipertesi (13). La meditazione e approcci simili come la *mindfulness* (genericamente definita "consapevolezza"), sono sempre più utilizzate negli hospice (cure palliative) per la gestione del dolore fisico e psichico (14, 15). La meditazione è utilizzata anche per il mantenimento di uno stato di salute e di benessere. Infatti ansia, dolore, depressione, stress, insonnia possono essere associati a numerose malattie croniche (16). È stato inoltre dimostrato con studi di *neuroimaging* come la meditazione possa determinare delle modificazioni anatomico funzionali in sede cerebrale e ri-equilibrare la concentrazione ematica di alcuni neuromediatrici, citochine e ormoni (17).

Conclusioni

L'approccio globale o, come si dice ultimamente, olistico alla persona considerata da diversi punti di vista, assume sempre più importanza. È fondamentale quindi contrastare lo stress sia esso molecolare o psicosociale. Puntiamo l'attenzione sia alle molecole che ai fattori legati allo stile di vita, all'ambiente in senso lato, allo stress e alla nutrizione. Sono tutti elementi che influenzano tale "stato molecolare" della persona considerata come un sistema complesso influenzata a sua volta da tanti sistemi complessi. Oggi è molto importante sapere che la maggior parte delle patologie cronic-degenerative possono essere combattute attraverso una prevenzione che vede in una dieta equilibrata, in sani stili di vita e saggi approcci alla vita, una forza che le può contrastare. Esistono poi tutta una serie di sostanze naturali e di approcci terapeutici non farmacologici che possono integrare le terapie convenzionali: bisogna approfondire ulteriormente le conoscenze sulla loro efficacia, nonché sulla sicurezza e la qualità.

Bibliografia

1. Pelikan W. *I sette metalli*. Milano: Edizioni Arcobaleno; 2002.

2. World Health Organization. *General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine*. Geneva: WHO; 2000.
3. World Health Organization. *WHO Traditional Medicine Strategy T&CM 2014-2023*. Geneva: WHO; 2014.
4. World Health Organization. *Life skills education for children and adolescents in schools*. Geneva: WHO; 1997. Disponibile all'indirizzo: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/63552/1/WHO_MNH_PSF_93.7A_Rev.2.pdf; ultima consultazione 13/04/17.
5. Federazione Nazionale degli Ordini dei Medici Chirurghi e degli Odontoiatri. *Linee guida per la formazione nelle medicine e pratiche non convenzionali riservate ai medici chirurghi e odontoiatri della FNOMCeO*. Roma: Consiglio Nazionale FNOMCeO; 2009.
6. Italia. Accordo 7 febbraio 2013. Conferenza permanente per i rapporti tra lo Stato, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano. *Accordo tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano concernente i criteri e le modalità per la formazione e il relativo esercizio dell'agopuntura, della fitoterapia e dell'omeopatia da parte dei medici chirurghi e odontoiatri*.
7. Capasso F, Grandolini G, Izzo AA. *Fitoterapia*. Cernusco S/N (Milano): Ed Springer-Verlag; 2006.
8. Dar NJ, Hamid A, Ahmad M. Pharmacologic overview of *Withania somnifera*, the Indian Ginseng. *Cell Mol Life Sci* 2015;72(23):4445-60.
9. Kunnumakkara AB, Bordoloi D, Padmavathi G, Monisha J, Roy NK, Prasad S, Aggarwal BB. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *Br J Pharmacol* 2017;174(11):1325-48.
10. World Health Organization. *Acupuncture: review and analysis of reports on controlled clinical trials*. Geneva: WHO; 2002.
11. Zhang D, Yan X, Zhang X, Liu C, Dang R, Xiao T, Zhu P. Synchrotron radiation phase-contrast X-ray CT imaging of acupuncture points. *Anal Bioanal Chem* 2011;401(3):803-8.
12. Kongkasuwan R, Voraakhom K, Pisolayabutra P, Maneechai P, Boonin J, Kuptniratsaikul V. Creative art therapy to enhance rehabilitation for stroke patients: a randomized controlled trial. *Clin Rehabil* 2016;30(10):1016-1023.
13. do Amaral MA, Neto MG, de Queiroz JG, Martins-Filho PR, Saquetto MB, Oliveira Carvalho V. Effect of music therapy on blood pressure of individuals with hypertension: A systematic review and Meta-analysis. *Int J Cardiol* 2016;214:461-4.
14. Marchand WR. Mindfulness meditation practices as adjunctive treatments for psychiatric disorders. *Psychiatr Clin North Am* 2013;36(1):141-52.
15. Reich RR, Lengacher CA, Kip KE, Shivers SC, Schell MJ, Shelton MM, Widen RH, Newton C, Barta MK, Paterson CL, Farias JR, Cox CE, Klein TW. Baseline immune biomarkers as predictors of MBSR(BC) treatment success in off-treatment breast cancer patients. *Biol Res Nurs* 2014;16(4):429-37.
16. Khoury B, Knäuper B, Schlosser M, Carrière K, Chiesa A. Effectiveness of traditional meditation retreats: A systematic review and meta-analysis. *J Psychosom Res* 2017;92:16-25.
17. Jindal V, Gupta S, Das R. Molecular mechanisms of meditation. *Mol Neurobiol* 2013;48(3):808-11.

STILI DI VITA E MALATTIE DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE: DIETA ED ESERCIZIO FISICO

Maria Antonietta Ajmone Cat (a), Luisa Minghetti (b)

(a) *Centro Nazionale Ricerca e Valutazione Preclinica e Clinica dei Farmaci, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Servizio Coordinamento e Supporto alla Ricerca, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Introduzione

Il concetto di “stile di vita”, utilizzato in ambito sociologico per definire l’insieme dei comportamenti comuni di un certo gruppo sociale, e in psicologia per descrivere il principio unificante che organizza, nell’individuo, la direzione dell’azione, la meta, le tendenze e le aspirazioni, è oggi ampiamente utilizzato anche in campo medico.

In tale ambito, si definisce in particolare come stile di vita “sano” il risultato delle scelte di vita salutari operate da ciascun individuo e dell’esclusione di abitudini che possono influenzare in modo negativo la durata di vita media. Tra queste, ricadono non solo abitudini universalmente riconosciute come dannose per la salute, quali l’abuso di alcol e il tabagismo, ma anche l’alimentazione scorretta e l’inattività fisica, meno fortemente percepite come dannose.

Secondo l’Organizzazione Mondiale della Sanità (*World Health Organization, WHO*), questi sono quattro dei principali fattori di rischio implicati nell’insorgenza di alcune tra le patologie croniche oggi più diffuse (diabete di tipo 2, malattie cardiovascolari, tumori), responsabili dell’86% delle morti e del 75% delle spese sanitarie in Europa e in Italia.

Il rischio totale di ammalare di una patologia cronica è il risultato di una complessa interazione tra i fattori di rischio descritti, a cui si aggiunge l’importante effetto della predisposizione genetica individuale.

Studi di popolazione, condotti su ampie casistiche, suggeriscono che questi stessi fattori di rischio sono importanti anche nello sviluppo delle patologie neurodegenerative, la cui prevalenza è in drammatica ascesa per il progressivo invecchiamento della popolazione mondiale. L’insorgenza o il decorso di tali patologie nei soggetti geneticamente predisposti risultano ritardati, anche di anni, in soggetti che seguono uno stile di vita sano, limitando i fattori di rischio.

Sulla base di queste e di altre evidenze, negli ultimi anni si è venuta affermando, anche a livello governativo, la necessità di intervenire su uno o più di tali fattori di rischio attraverso strategie di tipo preventivo. Solo per citare uno dei primi importanti provvedimenti al riguardo, il Ministero della Salute, nel 2007, ha istituito una “Piattaforma nazionale sull’alimentazione, l’attività fisica e il tabagismo” con il compito di formulare proposte e attuare iniziative, in coerenza con il programma nazionale “Guadagnare salute: rendere facili le scelte salutari”.

Il tema è fortemente sentito anche a livello comunitario e, nel 2010, la Commissione Europea ha approvato la *Joint Programming Initiative “A Healthy Diet for a Healthy Life”* (JPI-HDHL) con lo scopo di creare un’area operativa di ricerca multidisciplinare europea sulla prevenzione delle patologie legate all’alimentazione e a stili di vita non salutari. L’ambizioso obiettivo che si pone la JPI-HDHL è quello secondo cui entro il 2030 i cittadini Europei abbiano la motivazione, la capacità e l’opportunità di seguire una dieta sana ed equilibrata e avere un livello soddisfacente di attività fisica.

Come recentemente emerso da un'indagine della WHO Europa, particolare attenzione deve essere rivolta al periodo peri-concezionale fino alla prima infanzia, poiché un crescente numero di evidenze scientifiche individuano in questa fase dello sviluppo una finestra temporale sensibile durante la quale possono essere poste le basi molecolari per l'insorgenza di patologie croniche a lungo termine. Nel 2015, è stato elaborato il documento *Fiscal policies for diet and the prevention of noncommunicable diseases*, secondo il quale è ragionevole e auspicabile che gli stati membri usino leve fiscali per incentivare la scelta di una dieta sana, a cominciare da cibi e bevande dedicate all'infanzia, e promuovere in tal modo la salute globale della popolazione.

I meccanismi biochimici e molecolari attraverso i quali gli alimenti e l'attività motoria esercitano i loro effetti benefici sulla salute umana cominciano ad essere individuati e documentati grazie ad approcci sperimentali multidisciplinari che analizzano le modificazioni dell'espressione genica (transcrittoma), dell'espressione proteica (proteoma), del profilo lipidico (lipidoma) e dei prodotti del metabolismo (metaboloma) conseguenti alla loro regolare introduzione nella dieta e nello stile di vita.

Alimentazione equilibrata come cura

Per quanto riguarda le proprietà degli alimenti, ad esempio, la nutrigenomica analizza le possibili correlazioni tra i nutrienti contenuti negli alimenti e le modificazioni della struttura del DNA e dell'espressione genica; la nutrigenetica studia invece la correlazione tra le caratteristiche genetiche individuali e la risposta dell'organismo ai singoli nutrienti.

La WHO ha sviluppato un modello di "*Nutrient profiling*" per la classificazione degli alimenti in base alla loro composizione nutrizionale, assegnando loro un punteggio in base all'effettiva capacità di promuovere la salute e ridurre il rischio di malattia. Un alimento o un suo elemento vengono considerati "funzionali" (comunemente definiti "nutraceutici"), se le sperimentazioni *in vitro*, *in vivo*, su modelli animali e sull'uomo ne dimostrano l'influenza positiva su una o più funzioni specifiche dell'organismo.

Grazie a tali approcci, accanto ai benefici di una dieta ricca di frutta e verdura, pesce, olio di oliva (la cosiddetta dieta mediterranea) è emersa l'importanza, in particolari circostanze, dell'arricchimento della dieta di specifici microelementi presenti in tali cibi (quali sali minerali, vitamine, acidi grassi omega-3, iodio, acido folico, polifenoli), in grado di promuovere la salute dell'organismo, le funzioni cognitive e la salute mentale e di prevenire o ostacolare lo sviluppo di numerose patologie, incluse quelle a carico del sistema nervoso.

A livello cerebrale, tali molecole agiscono su vie di segnalazione molecolare talora convergenti o interconnesse, capaci di promuovere la sopravvivenza neuronale, il metabolismo energetico, la produzione di neurotrofine, l'integrità e la fluidità di membrana, il trasporto del glucosio, l'espressione di geni a funzione neuroprotettiva, e di ridurre il danno ossidativo e la neuroinfiammazione.

Molto lavoro deve essere ancora fatto per una esaustiva comprensione delle possibili azioni sinergiche dei diversi nutrienti e sull'individuazione dei concreti benefici della dieta mediterranea per la salute mentale e cardiometabolica, in soggetti sani o affetti da patologie croniche.

Gli elementi nutrizionali per i quali sono stati suggeriti effetti sulla prognosi o sul rischio di sviluppare patologie neurodegenerative croniche, quali il morbo di Alzheimer o la Sclerosi Multipla (SM), sono molteplici, sebbene manchino conferme definitive attraverso studi clinici opportunamente condotti su un numero adeguato di pazienti, in fasi definite di malattia, e randomizzati in modo da distribuire equamente tra i gruppi altri fattori confondenti (es. altri elementi della dieta o supplementi utilizzati).

Ad esempio, nel caso della SM, studi osservazionali hanno suggerito che bassi livelli di Vitamina D siano associati ad un decorso più severo della patologia; così come il consumo di elementi particolarmente allergenici, quali proteine del latte e glutine, potrebbero aggravare gli *outcomes* dei pazienti con SM. Viceversa, numerosi studi preclinici suggeriscono che antiossidanti, probiotici, vitamina B12 e acidi grassi polinsaturi possano attenuare la risposta immunitaria in pazienti con SM, migliorandone lo stato di salute generale.

I meccanismi che si ritengono mediare gli effetti negativi o positivi dei diversi nutrienti esaminati sul decorso e sullo sviluppo della SM includono effetti generali su infiammazione e risposta immunitaria ed effetti su aspetti specifici della patologia, quali la demielinizzazione (1, 2). Uno studio recente basato sull'analisi dei risultati di un questionario somministrato a pazienti con SM sulle loro abitudini alimentari rafforza l'ipotesi di un'associazione significativa tra sane abitudini alimentari e migliore salute mentale e fisica, nonché minore livello di disabilità (3). Tali osservazioni suggeriscono che interventi nutrizionali mirati debbano essere presi in considerazione come possibile trattamento complementare di questa e altre patologie su base infiammatoria e suggeriscono l'importanza di disegnare studi clinici adeguati per verificare in maniera definitiva tale ipotesi.

Benefici dell'attività fisica per la salute

Oltre alla dieta, l'esercizio fisico è elemento fondamentale dello stile di vita salutare, con un ruolo benefico di per sé, e sinergico rispetto a quello di specifici nutrienti, influenzando molteplici funzioni dell'organismo.

Secondo le definizioni della WHO per attività fisica si intende il movimento corporeo prodotto dai muscoli scheletrici che comporti un dispendio energetico - incluse le attività effettuate lavorando, giocando, dedicandosi alle faccende domestiche, viaggiando e impegnandosi in attività ricreative” mentre per esercizio si intende “una sottocategoria dell'attività fisica, caratterizzata dal fatto di essere pianificata, strutturata, ripetitiva e volta a migliorare o a mantenere uno o più aspetti della forma fisica (4).

Sia l'attività fisica di intensità moderata che quella vigorosa apportano benefici alla salute. L'intensità delle diverse forme di attività fisica varia a seconda delle persone. Per risultare benefica per la salute cardiorespiratoria, ogni attività fisica dovrebbe essere praticata in sessioni di almeno 10 minuti di durata.

La WHO raccomanda:

- per bambini e adolescenti: 60 minuti al giorno di attività di intensità da moderata a vigorosa;
- per gli adulti (dai 18 anni): 150 minuti a settimana di attività di intensità moderata.

Sempre secondo l'informativa WHO sopracitata, l'inattività fisica è il quarto più importante fattore di rischio di mortalità a livello mondiale e causa del 6% di tutti i decessi. Come fattore di rischio, l'inattività fisica è superata soltanto dall'ipertensione arteriosa (13%) e dal tabagismo (9%) e si attesta allo stesso livello di rischio dell'iperglicemia (6%). È stato stimato che circa 3,2 milioni di persone muoiono ogni anno nel mondo perché non sono abbastanza attive. L'inattività fisica è in aumento in molti Paesi, rendendo più pesante il carico delle malattie non trasmissibili e ripercuotendosi negativamente sulla salute in tutto il mondo. Le persone insufficientemente attive presentano un rischio di mortalità dal 20 al 30% più elevato rispetto a persone impegnate in almeno mezz'ora di attività fisica di intensità moderata nella maggior parte dei giorni della settimana. Nel 56% degli Stati membri della WHO sono in atto politiche per contrastare l'inattività fisica. Gli Stati membri della WHO hanno concordato di ridurre del 10% l'inattività fisica entro il 2025.

Un'attività fisica regolare di intensità moderata (ad esempio camminare, andare in bicicletta o praticare sport) apporta benefici significativi alla salute. Ad ogni età, i benefici dell'attività fisica superano i potenziali danni, ad esempio quelli legati ad incidenti. Livelli di attività fisica regolari e adeguati aumentano il benessere muscolare e cardiorespiratorio e migliorano la salute ossea, sono fondamentali per l'equilibrio energetico e il controllo del peso, riducono il rischio di cadute e di fratture dell'anca o delle vertebre, riducono il rischio di ipertensione, cardiopatia ischemica, ictus, diabete, tumore della mammella e del colon e depressione.

La relazione tra attività fisica, cervello e patologie neurodegenerative e cerebrovascolari è meno conosciuta ma recentemente è diventata un argomento di grande interesse e di ricerca clinica e preclinica. Numerosi studi longitudinali convergono nel rafforzare l'idea che, come per la dieta, l'attività fisica abbia effetti protettivi anche sul cervello, attivando meccanismi neuroprotettivi che promuovono l'attività cognitiva sia in individui sani, sia in individui affetti da patologie neurologiche caratterizzate da deficit cognitivi, come la malattia di Alzheimer, il morbo di Parkinson, o malattie psichiatriche, come depressione e schizofrenia. Studi clinici indicano che l'attività fisica diminuisce l'atrofia cerebrale associata all'invecchiamento e riduce il rischio di demenza, anche indipendentemente dalla dieta. Effetti benefici dell'esercizio fisico sono stati riportati anche in modelli animali di patologie autoimmuni-neuroinfiammatorie come la SM, attraverso l'attivazione di molteplici meccanismi che coinvolgono la regolazione dell'espressione di fattori neurotrofici, la modulazione del sistema recettoriale adrenergico ed effetti immunomodulatori negli organi periferici e nel sistema nervoso centrale (5).

Negli ultimi anni si è fatto inoltre strada il concetto del muscolo scheletrico come vero e proprio "organo endocrino" in grado, se adeguatamente sollecitato, di produrre una serie di sostanze, tra le quali le miochine, in grado di attraversare la barriera emato-encefalica e agire a livello cerebrale stimolando l'espressione di fattori neurotrofici come il *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF). Il muscolo, inoltre, è in grado, così come il fegato, di produrre un altro fattore trofico, chiamato *Insulin like Growth Factor 1* (IGF-1), capace di superare la barriera emato-encefalica e di promuovere i processi di neurogenesi (6).

Nonostante gli effetti benefici di un'attività fisica moderata sul cervello, alcuni studi hanno correlato livelli di attività fisica estremi e acuti ad un aumentato livello di citochine pro-infiammatorie, stress ossidativo e una eccessiva produzione di corticosteroidi, con conseguenti sequele neurologiche e disfunzioni cognitive. L'attività fisica provoca dunque un aumento dei livelli di citochine pro o anti-infiammatorie, inibitori di citochine, chemochine e ormoni, a seconda dell'intensità e durata di tale esercizio. È pertanto opportuno contrastare il rischio di sedentarietà promuovendo un'attività fisica moderata e adeguata all'età e alle condizioni generali di salute dell'individuo. Più recentemente è emersa anche l'azione positiva di una attività fisica adeguata e sotto il controllo medico nel ridurre gli effetti collaterali di terapie fortemente invalidanti come la chemioterapia dei tumori e per migliorare le condizioni di vita dei pazienti oncologici lungo sopravvivenza (7).

Tutte le evidenze a favore degli effetti benefici indicano la necessità di studi sistematici e a lungo termine che definiscano in maniera rigorosa il ruolo dell'esercizio fisico nella prevenzione e nella gestione delle patologie cronico-degenerative e che consentano l'elaborazione di protocolli scientificamente validati.

Conclusioni

Insieme alle strategie preventive indicate per la riduzione degli altri risaputi fattori di rischio per le patologie croniche, le politiche volte alla promozione dell'attività fisica promettono di avere grande efficacia nel ridurre drasticamente gli effetti nocivi di stili di vita scorretti sulla salute e

sul benessere psico-fisico della popolazione globale. Al riguardo, la *Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020* (Piano di azione globale per la prevenzione e il controllo delle malattie non trasmissibili 2013-2020) della WHO, promuove l'attività fisica quale fattore trainante per la salute e il benessere della Regione europea, con particolare attenzione all'incidenza di malattie non trasmissibili associate a livelli insufficienti di attività fisica e a comportamenti sedentari. Essa riguarda tutte le forme di attività fisica praticabili nel corso della vita (8).

Bibliografia

1. von Geldern G, Mowry EM. The influence of nutritional factors on the prognosis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2012;8: 678-89.
2. Riccio P, Rossano R. Nutrition facts in multiple sclerosis. *ASN Neuro* 2015;7(1).
3. Hadgkiss EJ, Jelinek GA, Weiland TJ, Pereira NG, Marck CH, van der Meer DM. The association of diet with quality of life, disability, and relapse rate in an international sample of people with multiple sclerosis. *Nutr Neurosci* 2015;18(3):125-36.
4. Ministero della Salute. *Informativa OMS: Attività fisica*. Roma: Ministero della Salute; 2014. (Informativa n. 384). Disponibile all'indirizzo: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2177_allegato.pdf; ultima consultazione 19/06/2017.
5. Svensson M, Lexell J, Deierborg T. Effects of physical exercise on neuroinflammation, neuroplasticity, neurodegeneration, and behavior: what we can learn from animal models in clinical settings. *Neurorehabil Neural Repair* 2015;29(6):577-89.
6. Phillips C, Baktir MA, Srivatsan M, Salehi A. Neuroprotective effects of physical activity on the brain: a closer look at trophic factor signaling. *Front Cell Neurosci* 2014;8:170.
7. Cox CL, Montgomery M, Oeffinger KC, Leisenring W, Zeltzer L, Whitton JA, Mertens AC, Hudson MM, Robison LL. Promoting physical activity in childhood cancer survivors: results from the Childhood Cancer Survivor Study. *Cancer* 2009; 115(3):642-54.
8. World Health Organization. *Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020*. Geneva: WHO; 2013. Disponibile all'indirizzo: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/94384/1/9789241506236_eng.pdf; ultima consultazione 19/06/2017.

STRESS COME FATTORE DI RISCHIO DI MALATTIA: INTERAZIONE TRA SISTEMA NERVOSO, ENDOCRINO E IMMUNITARIO

Alessandra Berry, Francesca Cirulli

Centro di Riferimento Scienze Comportamentali e Salute Mentale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Studi epidemiologici dimostrano chiaramente come condizioni stressanti protratte nel tempo possano avere profonde ripercussioni sulla salute umana. Negli ultimi anni si sono andati sempre più definendo i contorni di una nuova disciplina che studia gli effetti delle mutue e complesse interazioni che coinvolgono i sistemi nervoso, endocrino e immunitario. Questa disciplina, nota come Psiconeuroendocrinoimmunologia, si focalizza sui meccanismi mediante i quali le emozioni e lo stress possono influenzare l'insorgenza, la progressione e la remissione di una patologia, incluse le malattie autoimmuni, infettive, neoplastiche, psichiatriche e metaboliche. Ciò ha avuto un forte impatto nella ricerca preclinica e clinica tale da influenzare la nascita di società scientifiche e riviste *peer-reviewed* dedicate.

Tuttavia, gli specifici meccanismi alla base delle diverse risposte allo stress che contribuiscono a renderlo un così importante fattore di vulnerabilità individuale non sono stati ancora del tutto compresi. Quindi lo stress, e le emozioni negative ad esso associate, possono rappresentare un importante elemento in grado di influenzare processi patologici e, più in generale, la qualità della vita.

Lo stress può essere definito come qualsiasi cambiamento nell'ambiente interno o esterno che porta a una variazione dell'omeostasi di un organismo. In organismi complessi, il Sistema Nervoso Centrale (SNC) gioca un ruolo chiave nella percezione degli stimoli stressanti attraverso l'interpretazione di situazioni in grado di rappresentare potenziali pericoli (1). Il cervello è quindi in grado di innescare una molteplicità di segnali molecolari inter-cellulari che causano risposte fisiologiche e comportamentali adattive altamente coordinate e specie-specifiche, volte a fronteggiare al meglio la reale o presunta minaccia. Tra queste vanno menzionate un aumento dello stato attentivo, della gittata cardiaca, la mobilitazione di riserve energetiche e la soppressione delle risposte immunitarie. Questa variazione dell'omeostasi (allostasi), che nel breve termine è funzionale per risolvere la situazione stressante, se protratta nel tempo (stress cronico) può esitare in una vera e propria sindrome da adattamento. In questo caso, l'accumulo del carico allostatico e il depauperarsi delle risorse energetiche possono portare a gravi conseguenze che includono un'aumentata vulnerabilità all'insorgenza o alla progressione di processi patologici su base individuale (es. malattie infettive, autoimmuni, processi neoplastici, patologie metaboliche e di origine psichiatrica ecc.) (2).

Un modello molto semplificato di come l'organismo risponde allo stress vede l'attivazione del sistema simpato-adreno-midollare, con il conseguente rilascio di catecolamine (adrenalina e noradrenalina), e neuroendocrino, principalmente identificato come asse ipotalamo-ipofisi-surrene (più comunemente noto come asse HPA, dall'inglese *Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis*). In seguito all'attivazione da parte dello stimolo stressogeno, l'ipotalamo inizia a secernere l'ormone di rilascio della corticotropina (*Corticotropin-Releasing Hormone*, CRH) il quale, stimolando l'adenoipofisi, porta a sua volta alla secrezione e al rilascio in circolo di corticotropina

(*Adrenocorticotropic Hormone*, ACTH) e infine a un aumento della secrezione e del rilascio da parte delle ghiandole surrenali degli ormoni glucocorticoidi (GC, cortisolo nei primati umani e non umani). Questi ormoni, in condizioni basali, regolano una varietà di funzioni fisiologiche attraverso dei recettori definiti come *Glucocorticoid Receptor* (GR) e *Mineralocorticoid Receptor* (MR). Tra queste regolazioni va menzionata l'azione di soppressione/controllo del sistema immunitario (es. inibendo la funzione del fattore nucleare kB, NF-kB, un effettore intracellulare in grado di regolare l'espressione genica delle citochine pro-infiammatorie) e il controllo di inibizione a *feed-back* dell'asse HPA. Quest'ultimo processo è di fondamentale importanza per riportare i GC circolanti a livelli basali evitando un'eccessiva esposizione di tessuti centrali e periferici all'azione neurotossica e catabolica di questi ormoni, oltre che per ripristinare la normale funzione immunitaria (1). Per quanto riguarda l'espressione di questi recettori, a livello centrale sono entrambi ampiamente presenti nel sistema limbico, il circuito cerebrale coinvolto nella modulazione delle emozioni e nell'elaborazione di processi cognitivi e di risposte comportamentali a situazioni stressanti (3). Perifericamente, cellule del sistema immunitario quali linfociti, monociti/macrofagi e granulociti esprimono i recettori per i GC (ma anche per le catecolamine) i quali sono in grado di regolare la secrezione di citochine e la produzione di anticorpi, la proliferazione, la migrazione cellulare e l'attività citolitica in questi tipi cellulari (4).

Per quanto riguarda la “comunicazione psico-neuro-endocrino-immunitaria”, la maggior parte delle evidenze sperimentali suggerisce che diversi sistemi (endocrino, nervoso e immunitario) interagiscono e sono in grado di rispondere a stimoli di differente natura in maniera coordinata grazie all'intermediazione del CRH e dell'interleuchina-1 (IL-1). In particolare, questa citochina pro-infiammatoria, prodotta dai macrofagi, è in grado di agire direttamente sull'ipotalamo per stimolare la secrezione di CRH che, a sua volta, determina a cascata, la secrezione dell'ACTH con il conseguente aumento della secrezione dei GC che, come precedentemente accennato, sono in grado di esercitare un'azione di blocco sull'iperattivazione della funzione immunitaria (5). Un altro interessante esempio della comunicazione tra sistema nervoso e immunitario, in relazione ad alterati stati emozionali, vede coinvolto il *Nerve Growth Factor* (NGF). Questa neurotrofina, che svolge una ben nota azione neurotrofica, neuroplastica e neuroprotettiva sulle cellule nervose, in seguito a forti emozioni è in grado di attivare il sistema immunitario. Ad esempio, in condizioni di stress, l'NGF è in grado di indurre a livello delle cellule cutanee (che possiedono recettori specifici) una iperproliferazione dei cheratinociti e una conseguente attivazione infiammatoria (mediante degranolazione dei mastociti) portando alla comparsa delle placche infiammate tipiche della psoriasi (6).

Stress come fattore di rischio per la salute umana

Esistono enormi differenze nella percezione dello stress e nelle capacità individuali di affrontare eventi avversi o traumatici. Tali differenze sono il risultato di aspetti genetici (es. polimorfismi di geni coinvolti nella regolazione del tono dell'umore, nella plasticità sinaptica ecc.) e ambientali (esperienze precoci) ma soprattutto della loro interazione, che in fasi critiche dello sviluppo determineranno il fenotipo adulto di un organismo anche attraverso cambiamenti epigenetici (2).

L'ontogenesi dei mammiferi è un processo graduale che ha inizio in utero e, per le specie altriciali (cioè dipendenti dai genitori alla nascita), tra cui anche l'uomo, si completa dopo la nascita. Il programma di sviluppo è specie-specifico e mostra un elevato livello di plasticità che è funzionale per consentire all'organismo l'adattamento a quello che sarà l'ambiente futuro (vita adulta). In particolare, è possibile individuare delle vere e proprie “finestre di plasticità” durante le quali l'organismo è particolarmente sensibile agli effetti ambientali. Questo processo è

funzionale alla generazione di una varietà di fenotipi più idonei a differenti contesti ambientali garantendo il successo a livello individuale e della specie (7). Tuttavia, è importante notare che, se da un lato questi periodi sensibili rappresentano un'opportunità per lo sviluppo ottimale dell'individuo, dall'altro possono trasformarsi in periodi di potenziale vulnerabilità agli effetti dello stress (7, 8). A tal proposito, l'ipotesi dell'insulto multiplo ci aiuta a capire come lo stress possa diventare una traccia persistente di vulnerabilità nella fisiologia dell'individuo, al pari della predisposizione genetica, e nello stesso tempo un fattore di rischio per l'insorgenza e il decorso di aspetti patologici in età adulta (9). Sebbene questo modello si riferisca principalmente alle patologie di origine psichiatrica e abbia come bersaglio lo sviluppo del sistema nervoso centrale e neuroendocrino, è comunque importante sottolineare che esso può essere applicato ad altri tipi di patologie quali ad esempio quelle metaboliche o autoimmuni che, tra l'altro, sono spesso osservabili anche in comorbidità con aspetti psichiatrici (10).

Per quanto riguarda le patologie di origine infiammatoria/immunitaria, una recente revisione della letteratura suggerisce uno stretto legame tra alterazioni della funzione neuroendocrina, come conseguenza dello stress percepito in fasi precoci della vita, e della funzione immunitaria (11). Ad esempio, i maltrattamenti subiti durante l'infanzia sarebbero in grado di interferire con il programma di sviluppo dell'asse HPA portando, in età adulta, a un'iperattivazione del sistema in risposta allo stress e a un'eccessiva secrezione di cortisolo. Questo ormone, che in condizioni acute, inibisce i processi infiammatori (evitando reazioni eccessive del sistema immunitario), se presente con livelli cronicamente elevati nel torrente circolatorio, può portare a una forma di insensibilità ai GC. Tale fenomeno, a sua volta stimola le cellule del sistema immunitario a produrre citochine proinfiammatorie innescando così forme infiammatorie croniche.

Un esempio pratico è quello degli abusi infantili che vengono anche associati a un'eccessiva attivazione simpatica (con conseguente aumento della produzione di citochine proinfiammatorie) e una reazione parasimpatica attenuata, una condizione compatibile con alterazioni associate a stati infiammatori (12, 13). L'esposizione a eventi traumatici durante fasi precoci dello sviluppo è stata associata ad alterazioni dell'espressione genica attraverso modifiche epigenetiche anche di geni coinvolti direttamente o indirettamente nella regolazione della funzione immunitaria. Sono stati osservati elevati livelli di metilazione del gene *Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1* (NR3C1), che codifica per il recettore dei GC, associati a una ridotta espressione ippocampale, in soggetti maschi vittime di suicidio con un'infanzia caratterizzata da relazioni sociali altamente problematiche. Inoltre, elevati livelli di mRNA codificante per il recettore *Toll-like 4* (TLR4), implicato nei sistemi di difesa legati all'immunità innata, sono stati osservati in adolescenti cresciuti in ambienti caratterizzati da scarse condizioni socio-economiche suggerendo una più elevata propensione a sviluppare processi infiammatori in età adulta (11).

Sebbene le evidenze sopra-menzionate si riferiscano esclusivamente a eventi stressanti occorsi in epoca post-natale, è importante ricordare che fasi dello sviluppo, quali quelle che caratterizzano la vita intrauterina, sono ugualmente importanti nel determinare effetti di lungo termine sullo stato di salute/malattia. Gli studi seminali di Barker sull'incidenza di alcune patologie croniche nell'uomo (es. cardiovascolari o metaboliche, queste ultime spesso associate a processi infiammatori), come conseguenza di condizioni avverse sperimentate in utero, hanno ampiamente confermato l'importanza dell'ambiente prenatale nel normale sviluppo fetale (14). A questo proposito è molto interessante notare come un crescente numero di evidenze ritenga l'ambiente pre-natale come un importante determinante di lungo termine dello stato di buona/cattiva salute durante l'invecchiamento. In particolare, studi recenti hanno messo in luce come stress di tipo metabolico (obesità materna o diete ad alto contenuto calorico in gravidanza) possano avere un'azione ad ampio spettro nel programmare l'organismo verso un fenotipo caratterizzato da un'elevata vulnerabilità ad un invecchiamento patologico associato ad un aumentato stress ossidativo e a infiammazione cronica (15).

Conclusioni

In parziale controtendenza rispetto a branche della ricerca altamente settoriali, la Psiconeuroendocrinoimmunologia propone una visione altamente integrata di mente e corpo e attribuisce alla neurobiologia delle emozioni un ruolo chiave per l'insorgenza, la progressione e la remissione di diverse patologie. Questo contributo ha cercato di chiarire come lo stress, e le emozioni negative ad esso associate, possano lasciare una traccia persistente di vulnerabilità nella fisiologia dell'individuo e rappresentare un importante fattore di rischio per l'insorgenza e il decorso di aspetti patologici in età adulta. Tuttavia, è importante notare che, se da un lato i periodi sensibili nell'ontogenesi dei mammiferi sono delle potenziali finestre di vulnerabilità agli effetti dello stress, dall'altro possono trasformarsi in incredibili opportunità per lo sviluppo ottimale dell'individuo mediate dagli effetti di esperienze positive e da stili di vita appropriati, sperimentati a partire dalla vita prenatale che hanno il potenziale di gettare le basi per un'esistenza libera da patologie invalidanti e caratterizzata da un invecchiamento in buona salute.

Ringraziamenti

Si ringraziano le Dott.sse Irene Pistella e Carla Raggi per la rilettura critica del testo. Si ringraziano inoltre Alessia di Francesco, Stella Falsini e Luigia Cancemi per il reperimento delle voci bibliografiche e la formattazione del testo.

Bibliografia

1. Sapolsky RM. Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. *Exp Gerontol* 1999;34(6):721-32.
2. Cirulli F, Berry A. Early developmental trajectories of brain development: new directions in the search of early determinants of health and longevity. In: Laviola G, Macri S (Ed.). *Adaptive and maladaptive aspects of developmental stress*. 3. New York: Springer; 2013.
3. De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 1998;19(3):269-301.
4. Padgett DA, Glaser R. How stress influences the immune response. *Trends Immunol* 2003;24(8):444-8.
5. Schmidt ED, Janszen AW, Wouterlood FG, Tilders FJ. Interleukin-1-induced long-lasting changes in hypothalamic corticotropin-releasing hormone (CRH)-neurons and hyperresponsiveness of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *J Neurosci* 1995;15(11):7417-26.
6. Cirulli F, Alleva E. The NGF saga: from animal models of psychosocial stress to stress-related psychopathology. *Front Neuroendocrinol* 2009;30(3):379-95.
7. Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, Deb D, D'Udine B, Foley RA, Gluckman P, Godfrey K, Kirkwood T, Lahr MM, McNamara J, Metcalfe NB, Monaghan P, Spencer HG, Sultan SE. Developmental plasticity and human health. *Nature* 2004;430(6998):419-21.
8. Bateson P. Fetal experience and good adult design. *Int J Epidemiol* 2001;30(5):928-34.
9. Cirulli F, Francia N, Berry A, Aloe L, Alleva E, Suomi SJ. Early life stress as a risk factor for mental health: role of neurotrophins from rodents to non-human primates. *Neurosci Biobehav Rev* 2009;33(4):573-85.
10. Berry A, Cirulli F. The p66(Shc) gene paves the way for healthspan: evolutionary and mechanistic perspectives. *Neurosci Biobehav Rev* 2013;37(5):790-802.

11. Fagundes CP, Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Stressful early life experiences and immune dysregulation across the lifespan. *Brain Behav Immun* 2013;27(1):8-12.
12. Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol* 2005;5(3):243-51.
13. Tracey KJ. Reflex control of immunity. *Nat Rev Immunol* 2009;9(6):418-28.
14. Barker DJ. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)* 1998;95(2):115-28.
15. Iozzo P, Holmes M, Schmidt MV, Cirulli F, Guzzardi MA, Berry A, Balsevich G, Andreassi MG, Wesselink JJ, Liistro T, Gómez-Puertas P, Eriksson JG, Seckl J. Developmental ORIGins of Healthy and Unhealthy AgeiNg: the role of maternal obesity--introduction to DORIAN. *Obesity facts* 2014;7(2):130-51.

STRESS PSICOSOCIALE E *LIFE SKILLS*

Anna De Santi

Dipartimento di Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

La salute non è solo assenza di malattia, ma è qualcosa di molto più grande: è vivere con ritmi che rispettano i propri limiti, è abitare in un ambiente sano e accogliente, è svolgere un lavoro che realizza e gratifica, è nutrire il corpo e la mente con cibi e pensieri sani, è avere buone relazioni con gli altri e stare bene con sé stessi, è stimarsi, amarsi, rispettarci, coltivare i propri interessi e sviluppare i propri talenti.

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (*World Health Organization*, WHO) il 70% delle malattie di tutto il mondo (malattie cardiovascolari, diabete, cancro, ipertensione arteriosa e obesità) originano da cattivi stili di vita come diete malsane, carenza di attività fisica e stress psicologico.

Evidenze scientifiche dimostrano che un numero limitato di comportamenti contribuisce in larga misura a determinare alcune tra le maggiori cause di morte che colpiscono la nostra società, come le malattie cardiocircolatorie, il cancro e gli incidenti. Questi comportamenti, spesso maturati in giovane età, comprendono il consumo di tabacco, sostanze psicotrope, alcol, diete non salutari, un'attività fisica e comportamenti sessuali inadeguati. Tali problemi possono essere prevenuti o modificati da semplici cambiamenti negli stili di vita che comportano grandi risultati.

È dimostrato inoltre che l'insorgenza di alcune malattie dipende spesso da cattivi stili di vita che devono tener conto anche di una situazione generale che si traduce in problematiche di salute di cui ci dobbiamo occupare e preoccupare non solo ora ma soprattutto nel prossimo futuro in quanto la disoccupazione e la povertà ma anche l'ansia e la depressione risulteranno presto essere la seconda causa di sofferenza nel nostro Paese attualmente caratterizzato da:

- *Aumento dei disturbi mentali*

La WHO riporta che il 20% degli adolescenti soffre di un problema dello sviluppo emozionale o del comportamento, uno su otto di un disturbo mentale e una persona su quattro soffre di un disturbo mentale durante la sua vita.

- *Gravi conseguenze economiche*

Gli studi condotti in questi ultimi anni mostrano quanto il benessere socioeconomico vada di pari passo con il benessere fisico.

- *Forte legame tra disturbi psichici e fisici.*

Malessere esistenziale

Per quanto riguarda i giovani, dalla sintesi delle principali recenti analisi sugli adolescenti italiani emerge che una notevole percentuale di ragazzi intervistati ha riportato problemi riguardanti il malessere esistenziale, la mancanza di fiducia in sé stessi, la mancanza di capacità progettuali e di obiettivi a lungo termine, la riluttanza ad assumersi responsabilità e il rimando delle scelte di vita importanti. Tra le principali ricerche analizzate citiamo lo studio multicentrico

del *Health Behaviour in School-aged Children* (HBSC) riguardante i comportamenti collegati alla salute in ragazzi di età scolare (www.hbsc.org) svolto in collaborazione con l'Ufficio Regionale dell'Organizzazione Mondiale della Sanità per l'Europa nel 1982 e promosso da Inghilterra, Finlandia e Norvegia, che conta oggi 43 Paesi partecipanti. Tale ricerca, che si propone di incrementare la comprensione dei fattori e dei processi che possono influire sulla salute degli adolescenti al fine di orientare le pratiche di promozione di salute e le politiche rivolte ai giovani sia a livello nazionale che internazionale, ha rilevato nel 2014 che nella sessione "Benessere" negli ultimi sei mesi la percentuale dei ragazzi italiani che hanno riportato mal di testa, mal di stomaco, mal di schiena, morale basso, irritabilità o cattivo umore, nervosismo, testa che gira e difficoltà nell'addormentarsi, ovvero tutti sintomi classificati come vaghi o aspecifici, risulta al primo posto tra i Paesi europei partecipanti.

Secondo molti studi orientati alla ricerca del benessere, per cambiare stile di vita sono necessari:

- una motivazione, che ci induce a comprendere ed eventualmente ad intervenire sulle conseguenze del nostro stile di vita (se insano);
- il contributo di esperti che aiutano a mantenere o a correggere il nostro stile di vita;
- il volersi bene ed essere felici.

Questo è sempre stato l'obiettivo principe: sentirsi bene, stare bene, essere felici, attirare emozioni ed eventi positivi.

Strumenti del benessere

Per stare bene, raggiungere e mantenere il benessere, cioè sentirsi bene, in forma, in piena funzionalità fisica, psichica e spirituale, con capacità di sviluppare interessi, relazioni sociali e affettive, di sentirsi a proprio agio nella società, in condizioni di soddisfare dignitosamente le proprie necessità e aspirazioni, una delle metodologie che il Dipartimento di Salute Mentale della WHO (già nel 1993) ha confermato essere di evidente efficacia, consiste nella formazione alle *life skills* ovvero alle abilità psicosociali dell'area personale, sociale, interpersonale, cognitiva e affettiva dell'individuo. Tale metodologia, consigliata per la promozione dell'Educazione alla Salute soprattutto nell'ambito scolastico, permette l'assunzione di comportamenti positivi che consentono di affrontare efficacemente le sfide della vita quotidiana.

Quindi, oltre agli antidoti allo stress che considerano che la persona resistente allo stress abbia un alto livello di congruenza, una percezione di una discrepanza minima tra Sé ideale e Sé percepito e una capacità di *coping* (far fronte ai problemi) adeguate, le *life skills* o abilità di vita che la WHO propone per mettersi in relazione con gli altri e affrontare i problemi, le pressioni e gli stress della vita quotidiana, approfondite da autori come Goleman, Seligman e Wiseman sono le seguenti:

- *Capacità di prendere decisioni* (decision making)
Competenza che aiuta ad affrontare in modo costruttivo le decisioni nelle diverse situazioni e contesti di vita. La capacità di elaborare in modo attivo il processo decisionale può avere implicazioni positive sulla salute attraverso una valutazione delle diverse opzioni e delle conseguenze che esse implicano.
- *Capacità di risolvere problemi* (problem solving)
Competenza che permette di affrontare in modo costruttivo i diversi problemi, i quali, se lasciati irrisolti, possono causare stress mentale e tensioni fisiche.

- *Creatività*
Competenza che aiuta ad affrontare in modo versatile tutte le situazioni della vita quotidiana; contribuisce sia alla capacità di prendere decisioni che alla capacità di risolvere problemi, permettendo di esplorare le alternative possibili e le conseguenze delle diverse opzioni.
- *Senso critico*
Abilità nell’analizzare informazioni ed esperienze in modo oggettivo, valutandone vantaggi e svantaggi, al fine di arrivare a una decisione più consapevole. Il senso critico può contribuire alla promozione della salute permettendo di riconoscere e valutare i diversi fattori che influenzano gli atteggiamenti e il comportamento, quali ad esempio le pressioni dei coetanei e l’influenza dei mass media.
- *Comunicazione efficace*
Consiste nel sapersi esprimere, sia verbalmente che non verbalmente, in modo efficace e congruo alla propria cultura e in ogni situazione particolare. Significa esprimere opinioni e desideri, ma anche bisogni e sentimenti; essere in grado di ascoltare in modo accurato, comprendendo l’altro. Significa inoltre essere capaci, in caso di necessità, di chiedere aiuto.
- *Capacità di relazionarsi con gli altri*
Abilità di interagire e relazionarsi con gli altri in modo positivo sapendo creare e mantenere relazioni significative, fondamentali per il benessere psico-sociale, sia in ambito amicale che familiare. Tale competenza permette anche la possibilità di interrompere le relazioni, quando necessario, in modo costruttivo.
- *Autocoscienza*
Autoconsapevolezza o conoscenza di sé, del proprio carattere, dei propri punti forti e deboli, dei propri desideri e bisogni. Abilità di comprensione dello stress. Prerequisito indispensabile per una comunicazione efficace, per relazioni interpersonali positive e per la comprensione empatica degli altri.
- *Empatia*
Capacità di comprendere gli altri, di “mettersi nei loro panni”, anche in situazioni non familiari. Abilità di migliorare le relazioni sociali, l’accettazione e la comprensione degli altri.
- *Gestione delle emozioni*
Capacità di riconoscere le emozioni in sé stessi e negli altri. Abilità di provare emozioni intense, come rabbia e dolore. Consapevolezza di come le emozioni influenzano il comportamento e capacità di gestione delle stesse.
- *Gestione dello stress*
Capacità di riconoscere le cause di tensione e di stress della vita quotidiana e nel controllarle.

Conclusioni

Una delle difficoltà maggiori per intraprendere un corretto stile di vita è quello di innescare il “cambiamento”. Sulla carta tutti siamo convinti che fumare, ubriacarsi, essere sedentari ecc. faccia male, ma quasi sempre c’è qualcosa che ci sfugge e che ci fa perpetuare lo stesso atteggiamento sbagliato. Le *life skills* sono realmente uno strumento che ci può rendere più forti,

più strutturati e consapevoli delle nostre potenzialità. Abbiamo la capacità di stare bene, di cambiare in meglio, a qualsiasi età, se solo lo vogliamo.

Bibliografia di riferimento

- Astin JA, Shapiro SL, Eisenberg DM, Forsys KL. Mind-body medicine: state of the science, implications for practice. *J Am Board Fam Pract* 2003;16(2):131-47.
- Bottaccioli F. *Psiconeuroendocrinoimmunologia*. Milano: RED; 2005.
- Canali S, Pani L. *Emozioni e malattia. Dall'evoluzione biologica al tramonto del pensiero psicosomatico*. Milano: Mondadori; 2003.
- De Santi A, Guerra R, Morosini P. (Ed.). La promozione della salute nelle scuole: obiettivi di insegnamento e competenze comuni. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2008. (*Rapporti ISTISAN* 08/1).
- De Santi A, Guerra R, Filipponi F e Minutillo A (Ed.). La promozione della salute nelle scuole. Prevenzione dell'obesità e promozione di uno stile di vita fisicamente attivo. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2009. (*Rapporti ISTISAN* 09/6).
- De Santi A, Guerra R, Filipponi F e Minutillo A (Ed.). La promozione della salute nelle scuole. Prevenzione delle dipendenze. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2009. (*Rapporti ISTISAN* 09/23).
- Dolto F. *Adolescenza*. Milano: Mondadori; 2005.
- Goleman D. *Intelligenza emotiva. Che cosa è e perché può renderci felici*. Milano: Rizzoli; 1996.
- Einstein A. *Pensieri, idee, opinioni*. Roma: Newton Compton; 2015.
- Hendren R, Birrell Weisen R, Orley J. *Mental health programmes in schools*. Geneva: Division of Mental Health, World Health Organization; 1994. Disponibile all'indirizzo: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/62308/1/WHO_MNH_PSF_93.3_Rev.1.pdf; ultima consultazione 20/10/2017.
- Marchino L, Mizrahi M. *Il corpo non mente*. Milano: Pickwick; 2014.
- Pert B C. *Molecole di emozioni*. Milano: Editori Associati SpA; 2005.
- Seligman ME. *Imparare l'ottimismo*. Firenze: Giunti; 1996.
- Servan-Schreiber D. *Guarire*. Milano: Pickwick; 2013
- Tenzin G (Dalai Lama), Goleman D. *Le emozioni che fanno guarire. Conversazioni con il Dalai Lama*. Milano: Mondadori; 2009.
- Wiseman R. *Fattore fortuna*. Milano: Sonzogno; 2003.

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di ottobre 2017, 2° Suppl.*

*Stampato in proprio
Settore Attività Editoriali – Istituto Superiore di Sanità*

Roma, ottobre 2017