Annali

dell'Istituto Superiore di Sanità

Rivista trimestrale dell' Istituto Superiore di Sanità

Direttore dell'Istituto Superiore di Sanità e Responsabile scientifico
Giuseppe Benagiano

Direttore responsabile
Vilma Alberani

Redattore capo
Enrico Alleva

Comitato di redazione
Vilma Alberani, Enrico Alleva, Sergio Caroli, Eugenia Dogliotti, Filomena Mazzei, Paolo Pasquini, Edoardo Pozio, Stefano Vella

Redazione e composizione
Gabriele Baldi, Antonella Martino Santucci, Federica Napolitani Cheyne, Laura Radiciotti, Franco Timitilli

Pubblicazione
Gli *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* appaiono in fascicoli trimestrali e speciali, preparati e composti dal Servizio per le Attività Editoriali dell'Istituto Superiore di Sanità e stampati dall'Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato.

Direzione e Redazione
Servizio per le Attività Editoriali
Istituto Superiore di Sanità
Viale Regina Elena, 299
00161 Roma
Tel. +39-0649901
Fax +39-0649902253
e-mail: segr-sae@iss.it

Gli articoli scientifici e la corrispondenza ad essi relativa vanno indirizzati alla Redazione della rivista. Le "Istruzioni agli Autori" degli *Annali* sono pubblicate in ciascun fascicolo.

Abbonamenti
Gli abbonamenti sono curati dall'Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato. La corrispondenza relativa agli abbonamenti e all'acquisto di singoli fascicoli deve essere indirizzata a:
Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato
Direzione editoriale - Settore abbonamenti
Via Marciana Marina, s.n.c.
00199 Roma
Tel. +39-0685084131/0685084126
Fax +39-0685084117

Condizioni di abbonamento - Anno 2000
Annuale:
Italia Lit 110 000 (€ 56,81); estero Lit 130 000 (€ 67,14).
Un fascicolo trimestrale:
Italia Lit 35 000 (€ 18,08); estero Lit 40 000 (€ 20,66).
L'importo dovrà essere versato sul conto corrente postale n. 387001 intestato all'Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato specificando la causale del versamento: "abbonamento agli *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*".

Il periodico può essere oggetto di scambio con riviste di interesse per l'Istituto Superiore di Sanità. La corrispondenza relativa va indirizzata alla Redazione della rivista.

Gli *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* sono indicizzati da:
- CHEMABS
- EMBASE/Excerpta Medica
- MEDLINE
- PASCAL

L'indice del contenuto dei singoli fascicoli è disponibile su Internet: www.iss.it

ISSN 0021-2571

© Istituto Superiore di Sanità 2000. Tutti i diritti sono riservati.
Reg. Stampa - Tribunale di Roma n. 482/85 del 29 ottobre 1985

Roma, 2000 - Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato P.V.

Annali dell'Istituto Superiore di Sanità is a quarterly periodical edited by the Istituto Superiore di Sanità.

Director General of the Istituto Superiore di Sanità and Scientific Director
Giuseppe Benagiano

Director
Vilma Alberani

Editor-in-chief
Enrico Alleva

Editorial Committee
Vilma Alberani, Enrico Alleva, Sergio Caroli, Eugenia Dogliotti, Filomena Mazzei, Paolo Pasquini, Edoardo Pozio, Stefano Vella

Editing and composition
Gabriele Baldi, Antonella Martino Santucci, Federica Napolitani Cheyne, Laura Radiciotti, Franco Timitilli

Publication
Annali dell'Istituto Superiore di Sanità is printed quarterly and in special issues; it is prepared and composed by the Editorial Service of the Istituto Superiore di Sanità and printed by the Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato.

Direction and Editorial Office
Servizio per le Attività Editoriali
Istituto Superiore di Sanità
Viale Regina Elena, 299
00161 Roma, Italy
Tel. +39-0649901
Fax +39-0649902253
e-mail: segr-sae@iss.it

Papers to be presented for publication should be addressed to the Editorial Office. "Instructions to Authors" are printed in each issue.

Subscription information
The official bookseller agency for *Annali* is Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato.
Correspondence concerning subscriptions and purchase of separate issues should be addressed to:
Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato
Direzione editoriale - Settore abbonamenti
Via Marciana Marina, s.n.c.
00199 Roma, Italy
Tel. +39-0685084131/0685084126
Fax +39-0685084117

Subscription terms - Year 2000
Annual: Lit 110 000/€ 56,81 (Italy);
Lit 130 000/€ 67,14 (other countries).
Each quarterly issue: Lit 35 000/€ 18,08 (Italy);
Lit 40 000/€ 20,66 (other countries).

The journal can be exchanged with periodicals of interest to the Istituto Superiore di Sanità. Requests of exchange agreements should be addressed to the Editorial Office.

Annali dell'Istituto Superiore di Sanità is indexed in:

- CHEMABS
- EMBASE/Excerpta Medica
- MEDLINE
- PASCAL

The tables of contents of *Annali* are available on Internet: www.iss.it

ISSN 0021-2571

© Istituto Superiore di Sanità 2000. All rights reserved.
Reg. Stampa - Tribunale di Roma n. 482/85 del 29 ottobre 1985

Roma, 2000 - Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato P.V.

Annali

dell'Istituto Superiore di Sanità

Volume 36, n. 1, 2000

Contenuto / Contents

Sezione I / Section I

RECENTI PROGRESSI IN MEDICINA DELLE TOSSICODIPENDENZE

A cura di **Roberta Pacifici** e **Paolo Nencini**

Prefazione - **Paolo Nencini** e **Roberta Pacifici** ..... p. 1

L'approccio tossicologico alla clinica delle tossicodipendenze: scelta ragionata delle scale di intensità della dipendenza - **Maria Caterina Grassi, Francesca Pisetzky** e **Paolo Nencini** ..... p. 3

Il ruolo del laboratorio nella clinica delle tossicodipendenze - **Roberta Pacifici, Annunziata Lopez, Manuela Pellegrini** e **Piergiorgio Zuccaro** ..... » 9

L'analisi di farmaci e sostanze d'abuso nella matrice cheratinica - **Simona Pichini, Piergiorgio Zuccaro, Manuela Pellegrini, Annunziata Lopez** e **Roberta Pacifici** ..... » 17

Alcol, droga, farmaci e sicurezza stradale - **Santo Davide Ferrara, Silvano Zancaner, Giampietro Frison, Raffaele Giorgetti, Rossella Snenghi, Sergio Maietti, Franca Castagna, Franco Tagliaro** e **Luciano Tedeschi** ..... » 29

L'approccio psichiatrico alla clinica delle tossicodipendenze: la comorbidità psichiatrica nel paziente tossicodipendente - **Paolo Girardi, Barbara Cozzani, Michele De Marco Cervino** e **Roberto Tatarelli** ..... » 41

Fattori psicobiologici di rischio e vulnerabilità agli psicostimolanti in soggetti adolescenti e modelli animali - **Giovanni Laviola, Walter Adriani, M. Livia Terranova** e **Gilberto Gerra** ..... » 47

Le infezioni sessualmente trasmesse nella popolazione di tossicodipendenti - **Giovanni Rezza, Francesca Farchi** e **Massimo Giuliani** ..... » 63

Proprietà immunomodulanti dell'ecstasy (MDMA) - **Roberta Pacifici, Piergiorgio Zuccaro, Magi Farré, Simona Pichini, Simonetta Di Carlo, Pere N. Roset, Jordi Ortunõ, Jordi Segura, Cándido Hernádez-López** e **Rafael de La Torre** ..... p. 69

Artificial neural networks e loro applicazioni in medicina delle tossicodipendenze - **Paolo Massimo Buscema** ..... » 77

Sezione II / Section II

RICERCHE E METODOLOGIE / RESEARCH AND METHODOLOGY

Genetica molecolare e malattie dell'apparato scheletrico - **Alessandra Renieri, Nicola Giordano, Simone Geraci** e **Carlo Gennari** ..... p. 89

Orologi biologici circadiani: meccanismi molecolari autorigeneranti che mantengono il ritmo - **Simona Gaudi, Grigor Zoraqi, Vincenzo Falbo** e **Domenica Taruscio** ..... » 99

Analisi molecolare del gene della proteina di regolazione acuta della steroidogenesi *(StAR)* negli incidentalomi surrenalici - **Stefania Caiola, Antonio Stigliano, Ettore Maroccia** e **Vincenzo Toscano** ..... » 111

Principi di bioetica e prevenzione da rischi ambientali: possibili interpretazioni - **Carlo Petrini** » 117

RECENSIONI, COMMENTI E SEGNALAZIONI / BOOK REVIEWS, NOTES AND COMMENTS ..... p. 131

PUBBLICAZIONI DELL'OMS / WHO PUBLICATIONS ..... p. 135

Istruzioni per gli Autori

Gli *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* pubblicano rassegne, monografie, articoli originali, brevi note tecniche nei diversi campi attinenti alla sanità pubblica.

PRESENTAZIONE DEI MANOSCRITTI. - I lavori devono essere inviati alla Redazione degli *Annali*, Servizio per le Attività Editoriali, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma.

Possono essere presentati solo lavori originali, ovvero che non siano stati pubblicati né presentati per la pubblicazione altrove, in lingua italiana o, preferibilmente, in lingua inglese.

Tutti i lavori saranno sottoposti a revisione da parte di persone qualificate.

Gli Autori che intendano richiedere la pubblicazione di fascicoli monografici o rassegne su argomenti tecnici e scientifici devono consultare in anticipo la direzione o la redazione della rivista.

I dattiloscritti devono essere presentati (possibilmente anche su *floppy disk*) in duplice copia di cui una originale con doppia spaziatura ed ampi margini. Essi, ed in particolare le tabelle e la bibliografia, devono essere accuratamente riguardati dagli Autori.

I lavori devono essere scritti nel modo più conciso possibile compatibilmente con la chiara comprensione del testo; le tabelle e le figure devono essere presentate solo se necessarie per la documentazione dei risultati.

Il titolo, su pagina separata, deve essere seguito dai nomi completi degli Autori (nome per esteso e cognome) e dall'indicazione del Laboratorio e dell'Istituto di appartenenza, città e stato. Deve inoltre essere chiaramente indicato il nome dell'Autore al quale dovrà essere indirizzata la corrispondenza, il suo indirizzo, numero di telefono e fax.

Di regola i lavori originali devono essere suddivisi in sezioni (per es.: Introduzione, Materiali e metodi, Risultati, Conclusione). In ogni caso, titoli di capitoli e sottocapitoli vanno chiaramente indicati alla Redazione.

Ogni articolo deve essere necessariamente accompagnato da:

- un *riassunto* in italiano ed un *summary* in inglese (contenente la traduzione del titolo) presentati su pagine separate, di circa 120 parole ciascuno;

- *parole chiave* (descrittori o soggetti) in italiano e inglese, fino a un numero massimo di cinque.

Si danno di seguito alcune indicazioni sulla lunghezza dei contributi che potrebbero essere presentati per la pubblicazione sugli *Annali*, intendendosi come pagina dattiloscritta una pagina di 72 battute per 30 righe.

La *breve nota* non dovrà superare le 11 pagine dattiloscritte comprese la bibliografia essenziale (che non dovrà superare i 15 riferimenti bibliografici), una tabella e una figura.

L'*articolo* non dovrà superare le 20 pagine dattiloscritte inclusa la bibliografia (circa 40 riferimenti). Non più di tre tabelle e due figure, di formato convenzionale, possono essere accluse al testo.

La *rassegna* non dovrà superare le 28 pagine dattiloscritte inclusa la bibliografia (non più di 120 riferimenti). Quattro tabelle e tre figure possono essere accluse al testo.

PRESENTAZIONE DEL TESTO SU FLOPPY DISK. - Si prega vivamente di presentare il testo anche su floppy disk. Sono accettati preferibilmente dischetti da 3.5 pollici, Macintosh o IBM compatibili, formattati a 720/1.44 Mb, usando i programmi Microsoft Word versione MS-DOS o Windows, WordPerfect o altri programmi registrati in ASCII.

Per le figure e i grafici, registrare nel dischetto in formato: WMF, Excel, Freehand (per PC-IBM compatibili); Freehand-illustrator (versione 6) Excel (per Macintosh).

TABELLE E FIGURE. - Le *tabelle* devono essere presentate su pagina separata; ciascuna tabella deve essere fornita di un titolo e deve poter essere comprensibile anche senza riferimenti al testo. All'interno della tabella, ciascuna colonna deve riportare in alto l'indicazione di ciò a cui i dati in essa contenuti si riferiscono (unità di misura o altro). Vanno evitate linee di divisione orizzontali o verticali se non quelle necessarie per la chiarezza e leggibilità della tabella stessa.

Le *figure* (disegni, grafici e fotografie) devono essere presentate su pagine separate in forma adatta per la riproduzione. Le fotografie dovranno essere chiare stampe su carta lucida. Sul retro di ciascuna ne dovrà essere indicato l'orientamento, insieme al nome del primo autore dell'articolo cui si riferisce e alla numerazione (numero della figura).

Le *didascalie* delle figure devono essere dattiloscritte in pagina separata e devono fornire una sufficiente spiegazione dell'oggetto.

Tabelle e figure devono avere numerazione progressiva e indipendente (in numeri arabi) ed essere chiaramente citate all'interno del testo.

CONVENZIONI. - Tutti i termini in lingua straniera o in latino devono essere scritti in corsivo o sottolineati. Si possono usare abbreviazioni o simboli solo se questi siano largamente adottati nella letteratura scientifica (p. es. DNA, ATP, DDT). Ogni altra abbreviazione può essere adottata solo in seguito all'indicazione del suo significato sia nel testo che nel riassunto e non dovrà apparire nel titolo. Una lista delle abbreviazioni usate nel testo può, ove necessario, essere fornita su pagina separata.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI. - Tutti i riferimenti bibliografici devono essere numerati nel testo fra parentesi quadre, ad es. [1, 2, 3-6], e riportati alla fine dell'articolo in ordine di citazione, secondo il seguente modello:

DINARELLO, C.A. & WOLFF, S.M. 1993. Mechanisms of disease: the role of interleukin-1 in disease. *N. Engl. J. Med.* **328**(2): 106-113.

I titoli dei periodici devono essere abbreviati in conformità con la *Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI)*.

I libri o parti dei medesimi devono essere riportati in bibliografia secondo i seguenti esempi:

1. SPILKER, B. 1991. *Guide to clinical trials*. Raven Press, New York.

2. *Quantitative nuclear cardiography*. 1975. R.N. Pierson, J.P. Kriss, R.H. Jones & W.J. MacIntyre (Eds).Wiley, New York.

3. VANNGARD, N. 1972. Copper proteins. In: *Biological applications of electron spin resonance*. H.M. Swartz, J.R. Bolton & D.C. Borg (Eds). Wiley, New York. p. 411-447.

I lavori pubblicati in Atti di congressi dovranno essere riportati secondo il seguente esempio:

1. MELROSE, J.C. 1970. Thermodynamics of surface phenomena. In: *Proceedings of international conference on thermodynamics*. Cardiff, 1-4 April 1970. P.T. Landsberg (Ed.). Butterworths, London. p. 273-286.

Tutti i riferimenti citati nel testo dovranno essere riportati in bibliografia e viceversa.

AUTORIZZAZIONI E RICONOSCIMENTI. - Le citazioni estese e i materiali illustrativi ripresi da pubblicazioni precedenti debbono essere accompagnati dalle autorizzazioni originali rilasciate dagli Autori e dalle Case editrici, in conformità con le norme che regolano il copyright.

ESTRATTI. - Per ogni lavoro saranno inviati 100 estratti gratuiti all'Autore responsabile della corrispondenza con la Redazione, il quale avrà il compito di suddividerli tra gli eventuali co-autori. Estratti oltre questo numero potranno essere richiesti dagli Autori alla Redazione degli *Annali* al momento della restituzione delle bozze.

Instructions to Authors

Annali dell'Istituto Superiore di Sanità (Annals of the Italian National Health Institute) publish reviews, monographic issues, original articles, brief and technical notes in the different fields of public health.

PRESENTATION OF THE MANUSCRIPT. - Manuscripts should be sent to: Annali dell'Istituto Superiore di Sanità, Redazione, Viale Regina Elena, 299 - 00161 Rome, Italy.

All works presented for publication on *Annali* must be original and are submitted for review to qualified referees.

Authors who wish to submit for publication on *Annali* monographic issues or technical reviews should contact the Direction or Editorial Office in advance.

Manuscripts should be written as concisely as possible to allow a clear understanding of the text and presented in two copies and also, if possible, on floppy disk; tables and figures should be kept to a minimum and must be presented only if necessary for the documentation of results. The title, on a separate sheet, should be followed by the complete name of the Authors and the Laboratory or Institute where they work, town and country. The name and address, telephone and telefax numbers of the corresponding Author should also be indicated.

Original articles should normally be organized into different sections (i.e.: Introduction, Materials and methods, Results, Conclusions).

Each article must be accompanied by:

- a *summary* (with the title translated) both in Italian and in English, of about 120 words, presented on separate sheet and in two copies;
- *key words* (descriptors or subjects) in Italian and English, up to a maximum number of five.

The specifications that follow have been developed from our editorial experience and represent what is needed to provide a final printed article that meets the requirements of our publication.

The *brief note* should not exceed 11 typed pages (72 strokes per line, maximum 30 lines) including: 15 references, one table and one figure.

The *article* should have a length of about 20 typed pages including about 40 references. No more than three tables and two figures, of conventional size, may be provided.

The *review* should be about 28 typed pages long, including no more than 120 references. Four tables and three figures may be provided.

PRESENTATION OF THE TEXT ON FLOPPY DISK. - The Authors are kindly requested to present their manuscripts also on floppy disk.

Only disks with the following characteristics will be accepted: 3.5 inches (720/1.44 Mb), Macintosh or IBM compatible, using Microsoft Word MS-DOS or Windows version, WordPerfect or other programmes registered in ASCII.

Figures and graphs should be registered in: WMF, Excel or Freehand (for PC-IBM compatible); Freehand-illustrator (version 6) or Excel (for Macintosh).

TABLES AND FIGURES. - *Tables* should be typewritten on a separate sheet (presented in two copies) and preceeded by a title; they should be understandable also without reference to the text.

Figures (drawings, diagrams) must have a size appropriate for reproduction. Photographs must be provided in the form of high quality glossy paper and they must bear an indication of their orientation for a right arrangement in the text. The number of figure and the name of the first author should also be indicated in the back.

Captions of figures and photographs should be typewritten on a separate sheet and must contain a sufficient explanation of their object.

Tables and figures should be numbered in Arabic numerals in a consecutive and independent way and must be referred to in the text.

CONVENTIONS. - All Latin or foreign words should be underlined. You should use internationally accepted abbreviations, if possible (e.g. DNA, ATP, DDT). All other abbreviations should be spelled out in full the first time they occur in the text, followed by the shortened term in parentheses; afterwards use the abbreviation only.

REFERENCES. - All references in the text must be numbered in square parentheses, i.e. [1, 2, 3-6], and mentioned at the end of the article, in the order in which they are quoted, as in the following example:

DINARELLO, C.A. & WOLFF, S.M. 1993. Mechanisms of disease: the role of interleukin-1 in disease. *N. Engl. J. Med.* **328**(2): 106-113.

Titles of periodicals should be abbreviated in accordance with the *Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI)*. Books or parts of them should appear in the references according to the following examples:

1. SPILKER, B. 1991. *Guide to clinical trials*. Raven Press, New York.

2. *Quantitative nuclear cardiography*. 1975. R.N. Pierson, J.P. Kriss, R.H. Jones & W.J. MacIntyre (Eds).Wiley, New York.

3. VANNGARD, N. 1972. Copper proteins. In: *Biological applications of electron spin resonance*. H.M. Swartz, J.R. Bolton & D.C. Borg (Eds). Wiley, New York. p. 411-447.

Contributions in proceedings should be cited as in the following example:

1. MELROSE, J.C. 1970. Thermodynamics of surface phenomena. In: *Proceedings of international conference on thermodynamics*. Cardiff, 1-4 April 1970. P.T. Landsberg (Ed.). Butterworths, London. p. 273-286.

The Authors should check that each reference cited in the text appears in bibliograpy and viceversa.

References should not include the ones referring to works submitted for publication but not yet accepted or unpublished results, etc. These can be mentioned in the text in parentheses.

LICENCES AND AGREEMENTS. - Extended quotations and illustrative material taken from other publications must be accompanied by the original permission granted by the Authors and by the publisher.

REPRINTS. - One hundred reprints for each article will be sent, free of charge, to the corresponding Author who will distribute them among the co-authors. A higher number of reprints may be requested from the Authors to the Editorial Office of *Annali* at the moment of the return of proofs.

Sezione I / Section I

RECENTI PROGRESSI IN MEDICINA DELLE TOSSICODIPENDENZE

A cura di

Roberta Pacifici *(a)* e **Paolo Nencini** *(b)*

(a) Laboratorio di Biochimica Clinica, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(b) Istituto di Farmacologia Medica e Servizio Speciale Antidroga, Università degli Studi "La Sapienza", Roma

Ann. Ist. Super. Sanità, vol. 36, n. 1 (2000), p. 1

Prefazione

Il numero monografico che gli *Annali* hanno dedicato alle tossicodipendenze raccoglie testi che coprono molteplici, ma pur sempre omogenei, aspetti del problema. Tema centrale è la diagnostica: diagnostica clinica (tossicologica e psichiatrica), diagnostica di laboratorio. Il tema è quindi di immediato interesse applicativo e i contenuti degli articoli non tradiscono le aspettative. Il primo lavoro, ad esempio, fornisce agli operatori del settore strumenti per la diagnosi dello stato di dipendenza da droghe di semplice e rapida applicazione. Già validati nella lingua originale (l'inglese) per confronto con più complessi ed indaginosi strumenti, tali questionari appaiono particolarmente utili in contesti "difficili", quali quelli di accettazione e ricovero ospedalieri. Giustamente, gli autori ne auspicano una rapida diffusione anche in Italia.

Due articoli affrontano poi le questioni metodologiche della diagnostica di laboratorio. Puntuale è la differenziazione che viene fatta dei percorsi analitici in funzione degli obiettivi perseguiti. Le metodiche di screening ben si adattano alle necessità assistenziali, ma non certo a quelle legali ed amministrative, dove è anche richiesta la conferma del dato analitico. Di notevole interesse è la disamina sui pregi e sui limiti della ricerca delle sostanze d'abuso nella matrice cheratinica, o più prosaicamente, nei capelli. L'importanza dell'utilizzo delle procedure analitiche per determinare l'incidenza delle intossicazioni da sostanze d'abuso in particolari contesti è sottolineata dallo studio condotto sui guidatori delle notti del fine settimana. Di sicuro allarme socio-sanitario è infatti il dato che quasi un terzo dei guidatori risultava "legalmente ebbro" e il 15% di essi presentava droghe d'abuso nelle urine.

La comorbidità psichiatrica nel paziente tossicodipendente è problema di grande attualità che viene affrontato analizzando le fondamentali componenti psicopatologiche che caratterizzano i disturbi da sostanze d'abuso. Ne deriva una proposta di classificazione dei soggetti tossicodipendenti in differenti aree nosografiche, a ciascuna delle quali è attribuito un differente itinerario terapeutico. In un certo senso complementare a questo è l'articolo sulle basi psicobiologiche della pulsione verso gli psicostimolanti, particolarmente intensa in quegli adolescenti con più marcata personalità di ricerca di nuove esperienze (*novelty seeking*). L'impulsività del tossicodipendente, oltre agli effetti stessi delle droghe, lo pongono inoltre a rischio di diffusione di malattie sessualmente trasmesse. Come sottolineato in un altro lavoro, l'assunzione di sostanze d'abuso è infatti associata ad una diminuita capacità del consumatore di attuare misure di prevenzione. Tornando alle droghe adolescenziali, di sicuro interesse è lo studio sulle proprietà immunomodulanti dell'ecstasy. Effetti assai complessi e di cui sarà importante tenere conto nella valutazione dei fattori patogenetici che concorrono alla tossicità a lungo termine dell'ecstasy.

La monografia si chiude con un articolo dedicato alle intelligenze artificiali, che, in quanto metodologie di indagine delle dinamiche complesse e dunque non lineari, sembrano trovare proprio nelle tossicodipendenze un loro fertile campo di applicazione. Affascinante appare quindi la proposta di Buscema riguardo il loro uso nella diagnostica delle tossicodipendenze e di estrema utilità la sintetica descrizione che l'autore fa dei principi di queste metodologie ancora così poco diffuse.

Paolo Nencini *(a)* e Roberta Pacifici *(b)*

(a) Istituto di Farmacologia Medica e Servizio Speciale Antidroga, Università degli Studi "La Sapienza, Roma
(b) Laboratorio di Biochimica Clinica, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Ann. Ist. Super. Sanità, vol. 36, n. 1 (2000), pp. 3-8

L'approccio tossicologico alla clinica delle tossicodipendenze: scelta ragionata delle scale di intensità della dipendenza

Maria Caterina GRASSI, Francesca PISETZKY e Paolo NENCINI

Istituto di Farmacologia Medica e Servizio Speciale Antidroga, Università degli Studi "La Sapienza" , Roma

Riassunto. - Metodologie rapide ma affidabili atte a valutare la dipendenza da sostanze psicoattive sono ritenute particolarmente necessarie soprattutto per quelle condizioni ambientali che non consentono una lunga intervista con i tossicodipendenti. A questo riguardo sono stati recentemente proposti questionari di facile e rapida somministrazione. Abbiamo studiato un campione di 87 tossicodipendenti da eroina utilizzando alcuni di questi questionari quali l'SDS *(severity of dependence scale)*, il CAGE *(cut down, annoyed, guilty, eye-opener)*, e scale analogiche visive di autovalutazione (VAS, *visual analogical scales*) in associazione con scale per una valutazione clinica quantitativa della sindrome da astinenza da oppiacei e da alcol da noi messe a punto. Le risposte ottenute sono state valutate in relazione ai dati dell'esame obiettivo e di laboratorio. I risultati preliminari dimostrano che la somministrazione di scale di valutazione rapida rappresentano un metodo affidabile per valutare la dipendenza da sostanze psicoattive nonché per individuare la corretta terapia farmacologica.

Parole chiave: sindrome da dipendenza alla droga, scale di valutazione della dipendenza, tossicodipendenza, abuso, eroina.

Summary *(Drug dependence syndrome: evaluation of dependence severity by rapid diagnostic questionnaires).* - Fast but reliable approaches to evaluate the dependence syndrome to psychoactive substances are needed, particularly in those environmental conditions that do not allow a long interview with the drug addict. In this direction, easy to be administered questionnaires have been recently proposed. We used some of these questionnaires, such as SDS *(severity of dependence scale)* CAGE *(cut down, annoyed, guilty, eye-opener)* and VAS *(visual analogical scales)* in association with scales for clinical quantitation of alcohol and opiate withdrawal syndrome, to study a sample of 87 heroin addicts. Answers obtained were compared with clinical examination data and specific laboratory determinations. Our preliminary results demonstrate that the use of fast evaluation scales represents a reliable approach to estimate the dependence syndrome as well as to identify pharmacological therapies to be administered.

Key words: drug dependence syndrome, dependence evaluation scales, drug addiction, abuse, heroin.

La sindrome da dipendenza alla droga

Abitualmente il comportamento d'assunzione cronica non terapeutica di sostanze psicoattive viene indicato con il termine di *tossicodipendenza* ovvero con quello di *abuso*. Tuttavia l'attribuzione a tali termini di significati equivalenti è fonte di ambiguità. Infatti il termine tossicodipendenza fà riferimento al legame che si è stabilito tra il soggetto e il farmaco, attribuendo la ricerca e l'assunzione del farmaco all'instaurarsi di definite esigenze farmacologiche. Mentre l'espressione abuso di droghe è indice di assunzione disordinata di droga tale da creare problemi esistenziali o legali, senza far riferimento agli aspetti più strettamente farmacotossicologici propri della tossicodipendenza. L'introduzione del concetto di *sindrome di dipendenza da alcol*, con l'identificazione degli elementi semeiotici di riferimento di tale sindrome [1], ha notevolmente influenzato la nosografia del consumo voluttuario di sostanze psicoattive, poiché questa stessa sindrome è stata considerata applicabile alla dipendenza da droghe e ridefinita *sindrome da dipendenza alla droga* [2, 3].

La sindrome da dipendenza alla droga sembra più adeguata nel definire la complessità del legame che intercorre tra la droga e il suo consumatore. In sintesi è incentrata sulla perdita da parte del soggetto della capacità di controllare l'assunzione della sostanza, indipendentemente dalle cause di tale perdita. Della sindrome fanno parte i seguenti elementi [4]:

- elevata salienza del comportamento di assunzione della droga: l'assunzione diviene prioritaria rispetto ad ogni altra attività, per quanto importante essa sia;
- impoverimento del repertorio comportamentale: una parte notevole della giornata viene regolarmente dedicata al reperimento ed alla assunzione della droga;
- compulsività dell'uso: il soggetto è incapace di esercitare un controllo sulla quantità e sulla frequenza dell'uso;

- dipendenza fisica: per alcune droghe, la necessità di evitare la sindrome d'astinenza può costituire una ulteriore ragione di assunzione della droga;

- vulnerabilità alle recidive: la dipendenza si ripropone con grande rapidità se il soggetto, dopo un periodo più o meno lungo di astinenza, sperimenta nuovamente la droga.

Strumenti diagnostici per la valutazione della sindrome da dipendenza alla droga

L'identificazione degli elementi costitutivi la sindrome da dipendenza alla droga ha portato alla formulazione di strumenti diagnostici atti a valutare le componenti psico-comportamentali della dipendenza. Tra questi vi sono il DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual, American Psychiatric Association, 1994) [5], l'ICD-10 (International Classification of Diseases) [6, 7] e l'EuropASI [8], versione europea dell'Addiction Severity Index (ASI) [9, 10].

Il DSM-IV raggruppa le sostanze psicoattive in 11 classi - oppiacei, alcol, benzodiazepine, cocaina, anfetamine, allucinogeni, fenciclidina, cannabis, tabacco, sostanze volatili, caffeina - e definisce i criteri per diagnosticare la dipendenza e l'abuso da sostanze psicoattive.

Le due categorie diagnostiche - dipendenza e abuso - differiscono perché la seconda non richiede la presenza né dell'uso compulsivo della sostanza, né della comparsa della tolleranza e dell'astinenza, basandosi sulle sole conseguenze negative dell'assunzione ripetuta della sostanza stessa. Il requisito minimo per la diagnosi di *dipendenza* consiste invece nella positività per almeno tre dei sette criteri previsti. Un aumento nel numero di criteri positivi è chiaro indice di più intensa dipendenza.

Questi protocolli, che dimostrano l'unidimensionalità e l'indipendenza dei criteri diagnostici della dipendenza e dell'abuso, hanno un riconosciuto valore diagnostico [11]. Le verifiche sul campo hanno infatti confermato l'assunto teorico, proprio del modello della sindrome da dipendenza da droga, che la tossicodipendenza, lungi dall'essere un fenomeno dicotomico, si dispone lungo un *continuum* di intensità, dall'abuso alla dipendenza [12-19].

L'ASI, messo a punto nel 1980 negli USA, consente parimenti di valutare le conseguenze dell'abuso di droghe [9]. Lo strumento originale è stato sottoposto a validazione, aggiornato ed ampliato fino alla pubblicazione della quinta edizione nel 1990 [10]. Nel 1993 se ne è sviluppata una versione europea uniforme all'ASI chiamata EuropASI (Convegno di Amburgo del settembre 1993) [8]. Il questionario EuropASI è articolato su sette aree problematiche: a) condizione medica; b) situazione occupazionale/di sostentamento; c) uso di alcol; d) uso di altre sostanze psicoattive; e) situazione legale; f) situazione familiare e sociale; g) condizione psicologica e psichiatrica.

Gli strumenti descritti richiedono tempi di somministrazione molto lunghi. L'EuropASI, ad esempio, di elaborata struttura, comporta un complesso colloquio con il paziente che dura in media non meno di un'ora e mezzo. Questi test pertanto non possono essere utilizzati di routine in quei contesti nei quali la disponibilità di tempo per l'esame del paziente è limitata. Tipico, da questo punto di vista, è il caso del tossicodipendente ospedalizzato per patologie intercorrenti, per il quale la consulenza del tossicologo ha, il più delle volte, carattere d'urgenza e si svolge in tempi ristretti.

Scale di valutazione rapida della dipendenza e dell'astinenza

Tutto questo ha comportato la necessità di sviluppare strumenti di rapida applicazione per la valutazione della tossicodipendenza. In questo ambito, di particolare utilità si sono rilevati l'SDS, il CAGE ed il VAS.

L'SDS *(severity of dependence scale)* è stato considerato particolarmente utile per valutare la dipendenza da droghe, escluso l'alcol [20]. Si tratta di un questionario messo a punto per avere una scala breve, facilmente somministrabile ai pazienti e che consenta di valutare il grado di dipendenza causato dalle diverse "droghe illecite".

E' formato da cinque domande tutte orientate all'apprezzamento dell'intensità del controllo esercitato dalla droga sul comportamento del soggetto (Tab. 1). I soggetti completano l'SDS solo per la principale droga d'abuso assunta nell'ultimo anno. Ogni domanda ha 4 livelli di risposta con punteggio da 0 a 3. Il punteggio totale sarà compreso tra 0 (nessuna dipendenza) e 15 (dipendenza estrema).

E' stato dimostrato che i punteggi dell'SDS sono correlati ai comportamenti dell'assunzione di droghe che indicano la dipendenza quali: dose, frequenza dell'uso, durata dell'uso, uso giornaliero e grado di contatto con altri abusatori di sostanze psicoattive [20]. Le proprietà psicometriche della scala sono risultate efficaci anche in rapporto a classi diverse di sostanze d'abuso e a differenti procedure di reclutamento dei soggetti [20-22]. L'SDS è di facile comprensione ed il questionario può essere completato dalla maggior parte dei soggetti in meno di 1 minuto.

Il questionario CAGE per la valutazione della dipendenza da alcol, messo a punto da Ewing e Rouse nel 1970 [23] e validato da Mayfield nel 1974 [24], è presto divenuto uno dei più efficaci strumenti di *screening* rapido per l'alcolismo, dimostratosi valido anche in situazioni di emergenza [23, 24]. Si tratta di un questionario di valutazione della dipendenza, costituito da quattro domande (il termine CAGE è l'acronimo formato dall'iniziale della parola chiave di ciascuna delle

quattro domande nella loro versione originale, *C: cut down; A: annoyed; G: guilty; E: eye-opener*) . Il punteggio del questionario è compreso fra 0 e 4 (Tab. 2). Una positività al CAGE (valori superiori a 2) indica all'intervistatore una elevata probabilità della presenza di alcolismo. Quattro risposte affermative risultano essere patognomoniche per l'alcolismo. Il CAGE, inoltre, è facile, rapido da somministrare ed è anche poco intimidatorio rispetto ad altri questionari [25].

Le cosiddette scale analogiche visive di autovalutazione VAS *(visual analogical scales)*, si sono rivelate di grande ausilio per una valutazione rapida della tossicodipendenza [26-28]. Il nostro servizio ne ha adottate 3: la prima per l'eroina, la seconda per la cocaina e la terza per l'alcol. Le scale sono linee orizzontali lunghe 100 millimetri con la scritta "nessuna voglia" all'estremità sinistra e "mai avuta tanta voglia in vita mia" all'estrema destra. Al soggetto si richiede di indicare il "desiderio" di eroina, alcol, cocaina, che ha avuto nella settimana precedente il ricovero, mettendo un segno rispettivamente su ciascuna linea.

Tabella 1. - Questionario SDS (*)

SDS

Completa il seguente questionario per la droga che più frequentemente hai assunto nell'ultimo anno

1) Ritieni che ti sia sfuggito il controllo dell'uso di ..... ?

- ❑ mai o quasi mai
- ❑ a volte
- ❑ spesso
- ❑ sempre o quasi

2) Ti preoccupa l'idea di saltare una dose?

- ❑ mai o quasi mai
- ❑ a volte
- ❑ spesso
- ❑ sempre o quasi

3) Ti preoccupa fare uso di ..... ?

- ❑ mai o quasi mai
- ❑ a volte
- ❑ spesso
- ❑ sempre o quasi

4) Hai mai desiderato di poter smettere?

- ❑ mai o quasi mai
- ❑ a volte
- ❑ spesso
- ❑ sempre o quasi

5) Quanto hai trovato difficile smettere o stare senza?

- ❑ per niente
- ❑ poco
- ❑ molto
- ❑ impossibile

(*) SDS: scala di valutazione dell'intensità della dipendenza

Tabella 2. - Questionario CAGE (*)

CAGE

Se non sei astemio completa il seguente questionario

Hai mai sentito il bisogno di bere meno?	(SI) (NO)
Ti da fastidio che qualcuno ti critichi perché bevi?	(SI) (NO)
Ti sei mai sentito in colpa perché bevi?	(SI) (NO)
Ti è mai capitato che il bere fosse la prima azione della mattina?	(SI) (NO)

(*) Il termine CAGE è l'acronimo formato dall'iniziale della parola chiave di ciascuna delle quattro domande nella loro versione originale (C: cutdown; A: annoyed; G: guilty; E: eye-opener).

Scale per la valutazione dell'astinenza da oppiacei (SAO) e da alcol-sedativi (SAA)

Per l'astinenza da alcol, Sullivan *et al*. [29] hanno messo a punto una checklist (CIWA-Ar : Clinical Institute for Withdrawal Assessment for Alcohol scale) di 10 sintomi e segni che consente di quantificare l'intensità della sindrome da astinenza e di monitorare le risposte ai trattamenti. Tale scala tuttavia è molto complessa prevedendo per ogni punto sette livelli di intensità.

Per poter disporre di uno strumento più agile, abbiamo derivato dal CIWA-Ar una *checklist* che, pur mantenendo i 10 punti originari, prevede solo 2 livelli, 0 e 1, per ogni punto. Il punteggio totale quindi va da 0 a 10. Questa scala di astinenza alcolica (SAA) prevede la presenza dei seguenti sintomi e segni: 1. nausea e vomito; 2. tremori; 3. sudorazione; 4. ansia; 5. agitazione; 6. allucinazioni tattili; 7. allucinazioni uditive; 8. allucinazioni visive; 9. sensazione di "testa piena"; 10. obnubilamento del sensorio.

Per la valutazione del grado di astinenza da oppiacei abbiamo infine adattato la scala di Jasinsky [30], parimenti composta da 10 tra sintomi e segni caratteristici di tale astinenza. La scala dell'astinenza da oppiacei (SAO) da noi utilizzata è quindi costituita dalla presenza di: 1. midriasi; 2. ansia; 3. sudorazione; 4. piloerezione; 5. rinorrea; 6. sbadigli; 7. nausea e vomito; 8. dolori osteomuscolari; 9. insonnia; 10. diarrea.

Strumenti per l'individuazione di nuove sostanze d'abuso

Nel caso della identificazione della classe d'appartenenza di nuove sostanze d'abuso, di notevole utilità si è rivelato l'uso di opportuni questionari miranti

ad individuare effetti psicotropi soggettivi caratteristici delle varie classi di droghe. Particolarmente utile in questo ambito si è rivelato il questionario dell'Addiction Research Center Inventory (ARCI) [31].

L'ARCI originale prevede 550 domande del tipo "vero" o "falso" ed è quindi di difficile impiego. Di largo uso è divenuta una versione breve dell'ARCI consistente in cinque scale, relative a varie sostanze psicoattive, per un totale di 49 domande [32-34]. Le scale sono: A (gruppo delle anfetamine), che misura gli effetti dose-correlati delle anfetamine; BG (gruppo della benzedrina), che misura l'aumento della capacità intellettuale indotta dalle anfetamine; MBG (gruppo della morfina-benzedrina), che misura l'euforia indotta dalle droghe; PCAG (gruppo del pentobarbital, clorpromazina e alcol), che misura la sedazione; LSD, che misura la disforia.

Tabella 3. - Caratteristiche demografiche di 87 tossicodipendenti da eroina

Caratteristiche dei tossicodipendenti	Uomini n. tot. 58 (67%)	Donne n. tot. 29 (33%)
Età (anni)	35,4 + 0,9 [a]	32,8 + 0,95
Età di inizio dell'uso di droghe (anni)	17,1 + 0,6 [a]	20,0 + 1,2
Età della prima somministrazione di eroina (anni)	19,7 + 0,7	21,0 + 1,3
Anni di eroina	15,7 + 0,9 [a]	11,1 + 1,3
Dose di eroina dichiarata (g/die)	1,3 + 0,2	1,7 + 0,3
Anni di metadone	7,1 + 0,9	6,0 + 1,2
Metadone: dose prescritta (mg/die)	25,0 + 2,3	30,6 + 3,9
Benzodiazepine: dose prescritta [b] (mg/die)	10,0 + 2,1	12,0 + 3,3

I dati sono espressi come medie ± ES; [a] $P < 0,05$ (test di Tukey); [b] espressa in mg equivalenti di diazepam. Si noti la significativa differenza di età tra uomini e donne e come gli uomini presentino una storia più lunga di tossicodipendenza.

Tabella 4. - Valori delle scale di astinenza (SAO) e di dipendenza da eroina (VAS e SDS) in funzione del pregresso uso di eroina

Uso dichiarato di eroina nell'ultimo:	n.	SAO (0-10)	VAS per eroina (0-100 mm)	SDS per eroina (0-15)
giorno/settimana	61	2,8 ± 0,2 [a]	44,0 ± 4,6 [a]	8,5 ± 0,4
mese/anno	23	1,6 ± 0,3	20,6 ± 5,8	7,8 ± 0,8

I dati sono espressi come medie ± ES. Gli intervalli di misura sono indicati tra parentesi. [a] $P < 0,05$ vs mese/anno; t-test.

Tabella 5. - Determinazioni urinarie per morfina al momento dell'intervista in funzione delle scale di astinenza (SAO) e di dipendenza (VAS e SDS) da eroina

Morfina	n. (%)	SAO (0-10)	VAS per eroina (0-100 mm)	SDS per eroina (0-15)
Urine positive	55 (75%)	2,2 + 0,2	44,2 + 4,6 [a]	8,5 + 0,4
Urine negative	18 (25%)	2,6 + 0,4	24,2 + 5,4	7,6 + 0,9

I dati sono espressi come medie ± ES. Gli intervalli di misura sono indicati tra parentesi. [a] $P < 0,05$ vs urine negative; t-test.

La somministrazione dell'ARCI durante una consulenza tossicologica urgente non è tuttavia praticabile data la sua complessità.

L'esperienza in pazienti tossicodipendenti ospedalizzati

Il Servizio Speciale Antidroga dell'Università di Roma "La Sapienza" effettua consulenze a soggetti tossicodipendenti ricoverati presso il Policlinico Umberto I a causa di problemi medici o chirurgici correlati o non all'uso delle sostanze d'abuso. Esso è rivolto a pazienti che necessitano un intervento del tossicologo per proseguire una terapia già intrapresa presso il SerT di competenza o per iniziare una terapia in sostituzione delle "droghe" assunte abitualmente al di fuori del ricovero ospedaliero. Il contesto nel quale si svolge la visita tossicologica non consente una lunga interazione tra medico e paziente.

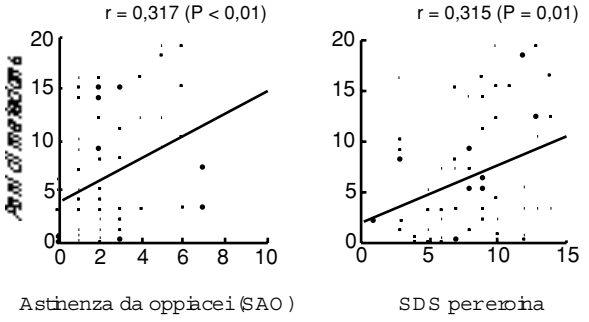


Fig. 1. - Valori della scala di astinenza da oppiacei (SAO) e dell'intensità della dipendenza da eroina (SDS) in funzione della storia di assunzione di metadone.

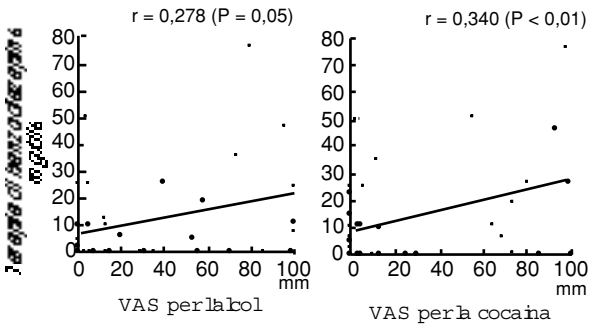


Fig. 2. - Valori "dell'intensità del desiderio" per alcol e cocaina (VAS), nella settimana precedente al ricovero, in funzione della terapia di benzodiazepine prescritta. Le dosi di benzodiazepine sono espresse in mg equivalenti di diazepam.

Per una valutazione rapida ma accurata dell'uso che il paziente fa delle sostanze psicoattive (quali sostanze, quale il grado di dipendenza e di astinenza), abbiamo utilizzato i questionari SDS, CAGE, le scale di intensità del desiderio di droga (VAS) e astinenza (SAA e SAO) vagliandone attentamente l'accuratezza diagnostica sulla base di riscontri anamnestici, clinici e di laboratorio. Sono qui riportati i risultati ottenuti dall'osservazione di 87 pazienti con uso continuativo di eroina, osservati presso il Policlinico di Roma nel periodo aprile - novembre 1998 (Tab. 3).

I dati ottenuti dimostrano come l'uso del VAS insieme al SAO consenta una corretta valutazione dell'intensità dell'astinenza sulla base dei riscontri clinici e di laboratorio. Infatti coloro che facevano uso giornaliero di eroina, sulla base di quanto riferito dal paziente e confermato dalla positività urinaria per morfina, avevano punteggi della scala di astinenza da oppiacei (SAO) significativamente più elevati rispetto a coloro che assumevano eroina saltuariamente, dato in accordo con quanto riferito dal paziente e con la negatività dell'urina al momento dell'osservazione. Inoltre i pazienti che assumevano abitualmente eroina avevano valori del VAS per eroina doppi rispetto a coloro che assumevano eroina saltuariamente (Tab. 4, 5).

Infine i valori della scala di astinenza da oppiacei (SAO) e quelli dell'intensità della dipendenza per l'eroina (SDS), aumentavano significativamente in funzione della storia di metadone riferita dal paziente (analisi di regressione $r = 0,317$; $P < 0,01$ per SAO e $r = 0,315$; $P = 0,01$ per SDS per l'eroina) (Fig. 1);

Interessante notare che l'intensità del desiderio di alcol e cocaina, rilevato col VAS per le due rispettive droghe d'abuso risulta essere predittivo della dose di benzodiazepine da somministrare al paziente, sulla base del riscontro clinico. Calcolando, infatti, le rette di regressione del VAS per alcol e cocaina in funzione della terapia di benzodiazepine prescritta, si ottengono indici di correlazione significativi per l'alcol ($r = 0,278$; $P = 0,05$) e per la cocaina ($r = 0,340$; $P < 0,01$) (Fig. 2). Il VAS può convenientemente indicare pertanto la dose di benzodiazepine da somministrare al paziente.

Per quanto concerne l'uso del CAGE, del VAS per l'alcol e della scala di astinenza da alcol-sedativi (SAA), dati iniziali indicano, in accordo con la letteratura, valori di CAGE superiori a 2 e VAS elevati per alcol nel caso dei pazienti che dichiaravano uso di alcol in quantità maggiore di 60 g/die.

In conclusione, lo studio preliminare condotto dalla nostra unità operativa conferma, sulla base della verifica anamnestica, clinica e laboratoristica, la validità delle scale di valutazione rapida nel trattamento della tossicodipendenza, specie se usate in associazione, sia per definire l'intensità della dipendenza sia per individuare la terapia farmacologica.

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 12 gennaio 2000.

BIBLIOGRAFIA

1. EDWARDS, G. & GROSS, M.M. 1976. Alcohol dependence: provisional description of a clinical syndrome. *Br. Med. J.* **1**: 1058-1061.

2. KOSTEN,T.R., ROUNSAVILLE, B.J., BABOR. T.F., SPITZER, R.L. & WILLIAMS, J.B.W. 1987. Substance-use disorders in DSM-III-R: evidence for the dependence syndrome across different psychoactive substances. *Br. J. Psychiatry* **151**: 834-843.

3. STRIPP, A.M., BURGESS, P.M., PATTISON, P.E., PEAD, J. & HOLMAN, C.P. 1990. An evaluation of the psychoactive substance dependence syndrome in its application to opiate users. *Br. J. Addict.* **85**: 621-627.

4. NENCINI, P. 2000. Tossicodipendenze. *Enciclopedia Medica Italiana.* Aggiornamento II. p. 5850-5881.

5. AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. 1997. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders. DSM-IV.* APS, Washington, DC. p. 181-183.

6. EDWARDS, G., ARIF, A. & HODGSON, R. 1981. Nomenclature and classification of drug- and alcohol- related problems: a WHO memorandum. *Bull. WHO* **59**: 225-242.

7. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1992. *The ICD-10 mental and behavioral disorders: clinical descriptions and diagnostic guidelines*. WHO, Geneva.

8. BLANKEN, P., HENDRIKS, V., FAHRNER, E.M., GSELLHOFER, B., KUFNER, H., HARTGERS, C., KOKKEVI, A., POZZI, G., TEMPESTA, E. & UCHTENHAGEN, A. 1995. EuropASI adattamento europeo dell'*Addiction Severity Index*. *Boll. Farmacodip. Alc.* **18**(2): 7-45.

9. McLELLAN, A.T., LUBORSKY, L., WOODY, G.E. & O'BRIEN, C.P. 1980. An improved diagnostic evaluation instrument for substance abuse patients: the Addiction Severity Index. *J. Nerv. Mental Dis.* **168**: 26-33.

10. FUREMAN, B., PARIKH, G., BRAGG, A & McLELLAN, A.T. 1990. *Addiction Severity Index. 5. ed. A guide to training and supervising ASI interviews based on the past ten years.* The University of Pennsylvania & Veterans Administration Center for Studies on Addiction, Philadelphia.

11. FEINGOLD, A. & ROUNSAVILLE, B. 1995. Construct validity of the dependence syndrome as measured by DSM-IV for different psychoactive substances. *Addiction* **90**: 1661-1669.

12. SKINNER, H.A. & GOLDBERG, A.E. 1986. Evidence for a drug dependence syndrome among narcotic users. *Br. J. Addict.* **81**: 479-484.

13. SUTHERLAND, G., EDWARDS, G., TAYLOR, C., PHILLIPS, G.T., GOSSOP, R. & BRADY, R. 1986. The measurement of opiate dependence. *Br. J. Addict.* **81**: 485-494.

14. KOSTEN, T.R., ROUNSAVILLE, B.J., BABOR, T.F., SPITZER, R.L. & WILLIAMS, J.B.W. 1987. Substance-use disorders in DSM-III-R: evidence for the dependence syndrome across different psychoactive substances. *Br. J. Psychiatry* **151**: 834-843.

15. HASIN, D.S., GRANT, B.G., HARFORD, T.C. & ENDICOTT, J. 1988. The drug dependence syndrome and relate disabilities, *Br. J. Addict.* **83**: 45-55.

16. BRYANT, K.J., ROUNSAVILLE, B.J. & BABOR, T.F. 1991. Coherence of the dependence syndrome in cocaine users. *Br. J. Addict.* **86**: 1299-1310.

17. HASIN, D.S., MUTHUEN, B., WISNICKI, K.S. & GRANT, B. 1994. Evidence of the bi-axial dependence concept: a test in the general population. *Addiction* **89**: 573-579.

18. MORGENSTERN, J., LANGENBUCHER, J. & LABOUVIE, E.W. 1995. The generalizability of the dependence syndrome across substances: an examination of some properties of the proposed DSM-IV dependence criteria. *Addiction* **89**: 1105-114.

19. HASIN, D.S., LI, Q., McCLOUD, S. & ENDICOTT, J. 1996. Agreement between DSM-III-R, DSM-IV and ICD-10 alcohol diagnoses in US community-sample heavy drinkers. *Addiction* **91**(10): 1517-1527.

20. GOSSOP, M., DARKE, S., GRIFFITH, P., HANDO, J., POWIS, B., HALL, W. & STRANG, J. 1995. The severity of dependence scale (SDS) psychometric properties of the SDS in English and Australian samples of heroin, cocaine and amphetamine users. *Addiction* **90**: 607-614.

21. CHURCHILL, A.C., BURGESS, P.M., PEAD, J. & GILL, T. 1993. Measurement of the severity of amphetamine dependence. *Addiction* **88**: 1335-1340.

22. TOPP, L. & MATTICK, R.P. 1997. Choosing a cut-off on the severity of dependence scale (SDS) for amphetamine users. *Addiction* **92**(7): 839-845.

23. EWING, J.A. & ROUSE, B.A. 1970. Identifying the hidden alcoholic. In: *29th International Congress on alcohol and drug dependence*. Sidney, Australia, February 3 1970.

24. MAYFIELD, D.G., McLEOD, G. & HALL, P. 1974. The CAGE questionnaire. Validation of a new alcoholism screening instrument. *Am. J. Psychiatry* **131**: 1121-1123.

25. EWING, J.A. 1984. Detecting alcoholism. The CAGE questionnaire. *JAMA* **252**(14): 1905-1907.

26. HAYES, M.H.S. & PATTERSON, D.G. 1921. Experimental development of the graphic rating scale. *Psychol. Bull.* **18**: 98-99.

27. MAXWELL, C. 1978. Sensitivity and accuracy of the visual analogical scale. A psycho-physical classroom experiment. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **6**: 15-24.

28. NICHOLSON, A.N. 1978. Visual analogue scales and drug effects in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **6**: 3-4.

29. SULLIVAN, J.T., SYKORA, K., SCHNEIDERMAN, J., NARANJO, C.A. & SELLERS, E.M. 1986. Assessment of alcohol withdrawal: the revised clinical institute withdrawal assessment for alcohol scale (CIWA-Ar). *Br. J. Addict.* **84**: 1353-1357.

30. JASINSKI, D.R. 1977. Assessment of the abuse potentiality of morphine-like drugs (methods used in man). In: *Drug addiction. I.* W.R. Martin (Ed.). Springer-Verlag, Berlin. p. 197-258.

31. HILL, E.H., HAERTZEN, C.A., WOLBACH, A.B. jr & MINER, E.J. 1963. The Addiction Research Center Inventory, Appendix. *Psychopharmacologia* **4**: 184-205.

32. MARTIN, W.R., SLOAN, J.W., SAPIRA, J.D. & JASINSKI, D.R. 1971. Physiologic, subjective, and behavioral effects of amphetamine, methamphetamine, ephedrine, phenmetrazine, and methylphenidate in man. *Clin. Pharmacol. Ther.* **12**: 245-258.

33. BIGELOW, G.E. 1991. Human drug abuse liability assessment: opioids and analgesics. *Br. J. Addict.* **86**: 1615-1628.

34. NENCINI, P., ABDULLAHI, M.A. & ABDULLAHI, S.E. 1986. Subjective effects of Khat chewing in humans. *Drug Alcohol Dep.* **18**: 97-105.

Ann. Ist. Super. Sanità, vol. 36, n. 1 (2000), pp. 9-16

Il ruolo del laboratorio nella clinica delle tossicodipendenze

Roberta PACIFICI *(a)*, Annunziata LOPEZ *(b),* Manuela PELLEGRINI *(a)*
e Piergiorgio ZUCCARO *(a)*

(a) Laboratorio di Biochimica Clinica, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(b) Istituto di Medicina Legale, Università degli Studi "La Sapienza" , Roma

Riassunto. - Il laboratorio di tossicologia clinica interviene in due settori precisi nella tematica della tossicodipendenza eseguendo sia analisi finalizzate alla diagnosi e al trattamento dei tossicodipendenti sia analisi per scopi amministrativi e medico-legali. Un laboratorio che analizza sostanze d'abuso nei liquidi biologici deve garantire l'affidabilità e la validità della prestazione erogata operando in un sistema di qualità. E' possibile differenziare laboratori che svolgono solo analisi di *screening* con tecniche immunochimiche e laboratori che svolgono analisi di conferma, le uniche che abbiano valore medico-legale, con tecniche cromatografiche. La matrice di elezione in questo tipo di analisi è l'urina, sebbene in alcuni casi specifici l'analisi sui capelli può affiancare quella tradizionale. Il laboratorio deve essere sottoposto ad un aggiornamento continuo tramite corsi di riqualificazione del personale, seguire le nuove scoperte scientifiche e le normative utilizzando anche siti internet specifici.

Parole chiave: organizzazione del laboratorio, analisi, sostanze d'abuso, liquidi biologici.

Summary *(The role of the clinical toxicological laboratory).* - Clinical toxicological laboratory is involved in two different topics related to drug addiction: tests devoted to diagnosis and treatment of addicted and analyses for administrative and forensic purposes. A laboratory which analyses drugs of abuse has to guarantee reliability and performance of its services working with a quality system. It can be possible to differentiate between laboratories which perform only screening tests with immunological methods and laboratories which execute confirmations with a forensic meaning using chromatographic techniques. The primary biological matrix for this kind of tests is urine, although in some specific cases hair analysis can be a support of traditional investigations. Internet sites on specific topics can be of assistance for questions of different nature to be faced by a clinical toxicological laboratory.

Key words: laboratory organization, drugs of abuse testing, biological fluids.

Introduzione

I settori di intervento di un laboratorio di tossicologia clinica sono principalmente due: il primo riguarda le analisi finalizzate alla diagnosi e al trattamento dei tossicodipendenti afferenti alle strutture pubbliche e private; il secondo riguarda analisi per scopi amministrativi e medico-legali. In questo caso, le richieste possono arrivare dalle commissioni medico-legali che si occupano del rilascio di patenti di guida o del porto d'armi, dalle forze dell'ordine che si occupano dell'accertamento dello stato di ebbrezza o assunzione di sostanze stupefacenti nella guida o anche da enti pubblici e privati che compiano accertamenti sui lavoratori le cui mansioni comportino rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi.

I servizi pubblici per le tossicodipendenze (SERT) sono coinvolti non solo nel primo settore ma anche nel secondo per gli adempimenti posti dal DRP 309/1990 riguardante il testo unico delle leggi in materia di disciplina degli stupefacenti e sostanze psicotrope, prevenzione, cura e riabilitazione dei relativi stati di tossicodipendenza (*GU* n. 255 del 31 ottobre 1990).

La riforma del Servizio Sanitario Nazionale negli ultimi anni ha portato a delegare alle regioni gran parte delle attività sopraelencate lasciando alla autorità centrale compiti di indirizzo e di coordinamento. Inoltre, nel DPR del 14 gennaio 1997 sono stati indicati requisiti minimi strutturali, tecnologici ed organizzativi per l'esercizio dell'attività sanitaria da parte delle strutture pubbliche e private (*GU* n. 42 del 20 febbraio 1997).

Se tutto questo coinvolge solo in minima parte le strutture di riabilitazione, educative ed assistenziali per i tossicodipendenti in quanto riporta agli atti di intesa tra Stato e Regione, per quanto riguarda invece i laboratori di analisi, il tradizionale concetto del controllo della qualità (inteso come controllo di qualità interno ed esterno) viene ampliato ad un concetto di un miglioramento continuo della qualità. Ecco quindi che

il significato di qualità nella accezione più ampia del termine esce dall'ambito prettamente industriale dove è nato ed entra nell'ambito dei servizi.

Organizzazione del laboratorio

Al laboratorio di analisi viene chiesto di svolgere un servizio che sia il risultato di attività svolte sia nell'interfaccia tra fornitore e cliente che all'interno dell'organizzazione per soddisfare le aspettative del cliente. Nell'ambito sanitario queste aspettative sono quelle che il cliente-utente richiede, cioè l'affidabilità e la garanzia della qualità della prestazione che viene erogata. Diventa necessario quindi costruire un sistema di qualità inteso come: la struttura organizzativa, le responsabilità, le procedure, i processi di produzione e le risorse che si mettono in atto per la conduzione della qualità [1].

Di tutti questi punti, prenderemo in considerazione quelli strettamente peculiari per un laboratorio di tossicologia clinica [2-5].

In primo luogo tratteremo della struttura organizzativa logistica e della raccolta del campione biologico. Riguardo ai locali, un laboratorio che esegue dosaggi di sostanze d'abuso è un laboratorio particolare per la valenza medico-legale dei dati che in esso si producono e quindi deve essere separato dagli altri settori del laboratorio di analisi. Il locale dove viene raccolta l'urina deve essere allestito in modo che, pur salvaguardando il riserbo individuale, si possa comunque assicurare l'identità, l'integrità e l'autenticità del campione.

L'urina è considerata matrice di elezione in questo tipo di analisi, in quanto consente un prelievo non invasivo, la possibilità di campionare grandi volumi e la possibilità di determinare le sostanze e i loro metaboliti a distanza di giorni dall'assunzione. Vi sono però degli svantaggi legati alla scarsa rilevanza clinica delle concentrazioni trovate e al rischio che l'aggiunta di sostanze possa variare il volume di urina o le sue caratteristiche chimico-fisiche. Per questo si rende necessario controllare visivamente il momento del prelievo e alcuni parametri chimico-fisici come il pH, la temperatura e la densità. Inoltre è importante determinare il valore urinario della creatinina. In uno studio eseguito su 100 campioni si è visto infatti che concentrando campioni urinari con valori di creatinina inferiori a circa 4 μmoli/litro fino ad un valore di 9 μmoli/litro si aveva un aumento della positività mantenendo lo stesso *cut-off*: nel caso della morfina tale aumento era del 14%, mentre per i cannabinoidi e per le benzodiazepine era del 5% [6].

Per quel che concerne le procedure, per poter essere sicuri della identità del campione è necessario allestire una catena di custodia che parta dal momento del prelievo fino al momento di arrivo al laboratorio di analisi. Inoltre è importante che il campione venga diviso in due aliquote per poter procedere alle controanalisi in caso di contestazione.

Le metodiche analitiche utilizzate in un laboratorio che analizza sostanze d'abuso nelle urine sono di due tipi: metodiche iniziali e metodiche di conferma [7-9].

Le metodiche iniziali escludono i campioni che non contengono la sostanza e quelli in cui la concentrazione è al disotto di una concentrazione soglia o *cut-off*. Il *cut-off* è una soluzione amministrativa scelta per stabilire e discriminare i campioni positivi da quelli negativi.

Le tecniche immunochimiche più usate sono: radioimmunologiche, immunoenzimatiche, immunofluorescenti a luce polarizzata, e di inibizione dell'agglutinazione.

Per quanto riguarda i test immunochimici, la sensibilità e la specificità sono funzione dell'anticorpo utilizzato che può essere policlonale o monoclonale. La maggior parte dei test oggi in commercio ha una specificità di gruppo, cioè non riconosce il singolo analita ma la classe di sostanze.

Oltre ai test sopraelencati esistono i test speditivi o monotest che sono quei test che consentono la determinazione di una o più sostanze d'abuso e dei loro metaboliti ad un valore soglia stabilito senza apparecchiature e in tempi ridotti. Si basano sugli stessi principi dei test immunochimici e sono affidabili se usati correttamente dallo stesso personale di laboratorio. Il loro utilizzo tiene conto del numero e finalità delle analisi da eseguire, del costo dei reattivi e del personale a disposizione. Possono essere utilizzate anche in strutture diverse dal laboratorio di analisi. Un test speditivo, così come tutti gli immunochimici è un test che non può fare diagnosi se non confermato con un metodo cromatografico.

Le analisi di conferma servono a verificare che non ci siano falsi positivi a causa della non specificità dei test iniziali. Quindi devono poter identificare i singoli analiti, avere una sensibilità uguale o maggiore al valore soglia dei test iniziali, devono poter fornire un dato quantitativo e devono basarsi su principi chimico-fisici diversi da quelli dei test iniziali. Le metodiche comunemente utilizzate per i test di conferma sono: la cromatografia liquida accoppiata con rivelatori di varia natura (ad assorbimento di luce ultravioletta, elettrochimico, ecc.), la gascromatografia con rivelatore a cattura di elettroni o a ionizzazione di fiamma, ma soprattutto la gascromatografia accoppiata ad uno spettrometro di massa, considerata tecnica di elezione.

La Tab. 1 riporta le concentrazioni soglia proposte per i test iniziali per definire la positività nell'urina per le varie classi di sostanze d'abuso; la Tab. 2 riporta invece i *cut-off* proposti nelle analisi di conferma per la quantificazione dei singoli analiti nelle urine. Sarebbe auspicabile che tutti i laboratori utilizzassero stessi valori di *cut-off* e uniformassero le procedure per poter confrontare i risultati delle analisi eseguite in tutto il territorio nazionale. Questi valori di *cut-off* sono stati inseriti in una "proposta di linee guida per le analisi delle

Tabella 1. - Concentrazione soglia *(cut-off)* nei test iniziali per la positività delle classi di sostanze nelle urine

Classe di sostanze	Concentrazione
Oppiacei	300 ng/ml[(a)]
Cocaina metaboliti	300 ng/ml
Cannabinoidi	30 ng/ml
Amfetamine ed analoghi	1000 ng/ml
Benzodiazepine	500 ng/ml
Metadone	300 ng/ml

(a) 25 ng/ml per test immunochimico specifico per la morfina libera.

sostanze d'abuso nei liquidi biologici" che l'Istituto Superiore di Sanità ha preparato per gli operatori del SSN [10]. Alcune regioni hanno recepito queste proposte, altre regioni le hanno modificate e integrate secondo le loro esigenze. In ogni caso, secondo il DPR del 1997 riguardante i "requisiti minimi" è responsabilità delle singole Regioni approntare linee guida per i percorsi diagnostici.

Oltre ai fluidi biologici che vengono normalmente usati nella determinazione di sostanze d'abuso e loro metaboliti, cioè l'urina ed in alcuni rari casi il sangue, da diversi anni si è posta l'attenzione sulla possibilità di analisi di matrici biologiche non convenzionali quali: saliva, sudore, capelli, peli pubici, peli ascellari ed infine unghie [11, 12].

Tra queste, i capelli sono stati la matrice biologica su cui si è focalizzato l'interesse della ricerca internazionale. Il motivo che ha portato ad utilizzare le matrici non convenzionali nelle analisi farmaco-tossicologiche risiede soprattutto nella possibilità di incrementare la finestra di tempo in cui la sostanza d'abuso è rilevabile in tale matrice. Infatti, se questa finestra di tempo è solo di ore nel caso del sangue, diventa di alcuni giorni nel caso dell'urina e di mesi nel caso dei capelli [13].

La Fig. 1 illustra un possibile meccanismo di incorporazione di droghe e metaboliti durante la crescita del capello. E' chiaro che nella parte prossimale del capello, quella cioè vicina alla cute, è possibile rilevare una esposizione immediatamente precedente al prelievo, mentre spostandosi nella parte distale, nella punta, si determina una esposizione passata. Ricordando inoltre che la velocità di crescita del capello varia da 0,8 a 1,3 cm al mese, con una media intorno al cm/mese, l'analisi dei segmenti della lunghezza di 1 cm potrebbe fornire, in teoria, l'esposizione avvenuta in ogni singolo mese. La possibilità di una correlazione tra l'analisi segmentale del capello e l'esposizione mensile può essere problematica a causa di diversi fattori come ad esempio la crescita non sempre costante del capello. Infatti, ogni bulbo pilifero (e quindi anche del capello) possiede un proprio ciclo di crescita distribuito nel seguente modo: uno stadio di crescita detto "anagenico" (l'unico stadio in cui avverrebbe l'incorporazione delle droghe), uno stadio intermedio detto "catagenico" e uno stadio di riposo detto "telogenico". Questa crescita "irregolare" (ossia ogni singolo capello può trovarsi in una fase di crescita differente per cui la crescita media diventa irregolare) comporta dei limiti teorici nella valutazione del significato della presenza di una droga in un certo punto della intera lunghezza di un capello [14].

Per chiarire meglio questo punto possiamo fare un esempio. Se preleviamo 7 cm di capelli a due assuntori, uno che ha ripreso a drogarsi da tre mesi dopo una sospensione di 4 mesi e un altro che non si droga più da un mese, vediamo come nel primo caso in teoria avremo i 3 cm prossimali alla radice positivi e gli altri 4 negativi, nel secondo caso esiste la possibilità che il primo cm

Tabella 2. - Concentrazione soglia *(cut-off)* nei test di conferma per la quantizzazione delle singole sostanze nelle urine

Classe di sostanze		Concentrazione
Oppiacei		
Morfina (libera+coniugata)		300 ng/ml
Morfina 3-glucuronide	*(a)*	
Morfina 6-glucuronide	*(a)*	
6-monoacetilmorfina	*(b)*	
Codeina		300 ng/ml
Cocaina metaboliti		
Benzoilecgonina		150 ng/ml
Ecgoninametilestere	*(b)*	
Cannabinoidi		
Delta 9 tetraidrocannabinolo-acido carbossilico		15 ng/ml
Glucuronide del delta 9 tetraidro-cannabinolo-acido carbossilico	*(b)*	
Amfetamine e analoghi		
Amfetamina		500 ng/ml
Metamfetamina		500 ng/ml
3,4 metilendiossimetamfetamina (MDMA)		1000 ng/ml
Metilendiossiamfetamina (MDA)		1000 ng/ml
Benzodiazepine		
7 amminoflunitrazepam		500 ng/ml
Nordiazepam		500 ng/ml
Oxazepam		500 ng/ml
Metadone		300 ng/ml
2 etilidene-1,5-dimetil-3,3-difenil-pinolidene (EDDP)	*(b)*	

(a) Metabolita presente nell'urina che può essere dosato tal quale oppure insieme alla morfina in seguito ad un processo di idrolisi (acida o enzimatica) per rompere il legame con il glucuronide. *(b)* Altro metabolita presente nell'urina.

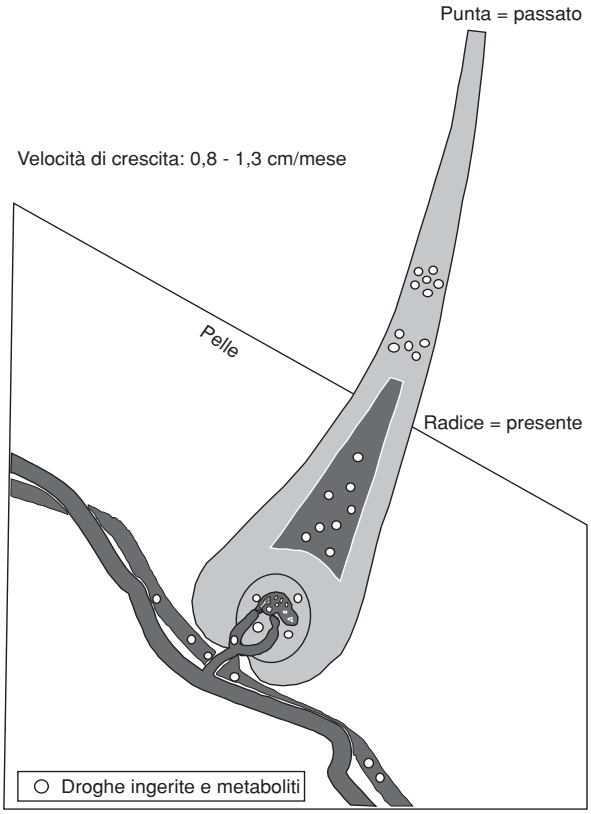


Fig. 1. - Meccanismo di incorporazione di droghe e metaboliti durante la crescita del capello.

prossimale risulti negativo, mentre gli altri positivi. Per distinguere le due situazioni è dunque necessaria un'analisi segmentale, la quale necessita però di grandi quantità di capelli, poiché l'analisi dei 7 cm *in toto*, risultando positiva in entrambi i casi, non permette alcuna differenziazione. Possiamo quindi concludere che la matrice cheratinica permette con chiarezza l'individuazione della esposizione media negli ultimi mesi, mentre il rilievo dell'esposizione mensile risulta di più difficile interpretazione.

Ricordiamo infine che i markers dell'abuso di droga nella matrice cheratinica possono essere diversi da quelli presenti nelle urine: nel caso della cocaina, nelle urine è presente quasi esclusivamente la benzoilecgonina, mentre nei capelli è la cocaina la sostanza più abbondante, lo stesso per la nicotina, marker principale dell'esposizione al fumo di sigarette che troviamo nei capelli, mentre nelle urine è presente il suo principale metabolita la cotinina [15, 16].

In base a tutte queste considerazioni, i laboratori di analisi nella clinica delle tossicodipendenze possono essere così classificati:

1) laboratori di I livello che eseguono analisi preliminari, utilizzano metodi immunochimici, non attuano la catena di custodia, però eseguono controlli di qualità interni e partecipano a programmi di valutazione esterna della qualità;

2) laboratori di II livello che attuando una catena di custodia, avendo la possibilità di utilizzare sia metodiche immunochimiche, che metodiche cromatografiche per l'analisi di diverse matrici biologiche (sangue, urina, capelli), partecipando a programmi di valutazione esterna di qualità, possono fornire risultati che hanno valore medico-legale.

Determinazioni analitiche

Prenderemo ora in esame alcune problematiche analitiche che si possono presentare in un laboratorio di tossicologia clinica in situazioni reali nella determinazione di sostanze d'abuso in liquidi biologici.

Oppiacei

La Fig. 2 illustra il metabolismo dell'eroina, la sostanza d'abuso per la quale sono maggiori le richieste di analisi da parte dei servizi territoriali. Il suo metabolita primario è la 6-monoacetilmorfina, metabolizzata rapidamente in morfina, la quale per coniugazione con l'acido glucuronico si trasforma in morfina-3 e morfina-6-glucuronide. La 6-monoacetilmorfina è una sostanza con azione farmacologica simile a quella della eroina, e che condivide con la droga parente un azione circa 10 volte più potente della morfina sul modello animale. [17]

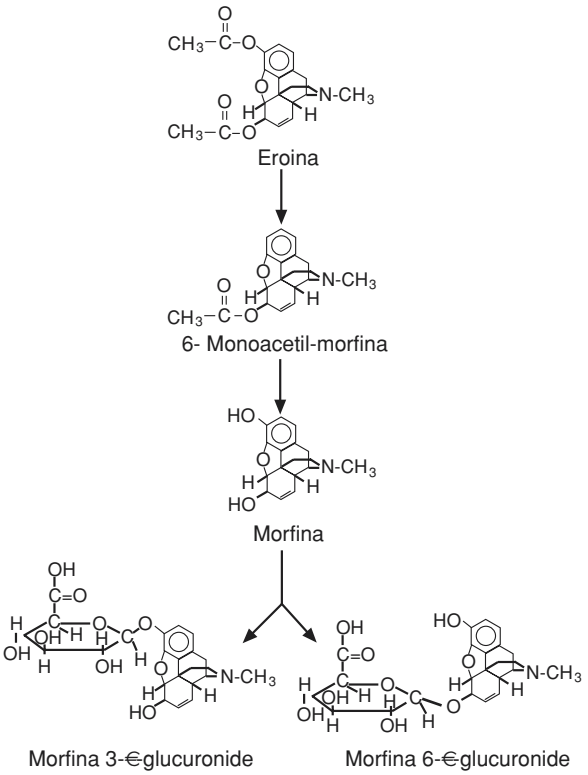


Fig. 2. - Metabolismo dell'eroina.

Il tempo di rilevamento dei metaboliti dell'eroina, dopo somministrazione di una singola dose intramuscolare di 6 mg di eroina in uno studio controllato su sei soggetti, nell'urina varia rispetto alla sostanza presa in considerazione: la 6-monocetilmorfina si rileva dopo entro le prime ore dopo la somministrazione della sostanza parente però poi scompare, la morfina libera intorno alle 20 ore se consideriamo un *cut-off* di 25 ng/ml, ma la morfina totale con il *cut-off* a 300 ng/ml si rileva per 25 ore, mentre con un *cut-off* a 40 ng/ml il tempo di rilevamento aumenta fino a 46 ore [18].

Cocaina

La Fig. 3 illustra il metabolismo della cocaina. I metaboliti evidenziabili nelle urine sono: la benzoilecgonina, ma anche la cocaina stessa e l'ecgonina-metilestere [19]. Utilizzando diverse vie di somministrazione della cocaina (endovena, intranasale e fumata) è possibile dimostrare sia nel caso della cocaina che in quello della benzoilecgonina che dopo un'ora l'andamento delle curve farmacocinetiche è lo stesso indipendentemente dalla via di somministrazione [20]. Quando la cocaina è assunta a dosi diverse e attraverso diverse vie di somministrazione il recupero maggiore (tra il 30 e il 50%) si ha per la benzoilecgonina, seguita dalla ecgonina metilestere e infine in piccolissima percentuale dalla cocaina.

In una simulazione dell'*excretion rate* della cocaina, benzoilecgonina ed ecgonina metilestere si evidenzia che con 100 mg endovena di cocaina, il tempo di rilevabilità della benzoilecgonina in urina può raggiungere le 60 ore [21].

Le ditte costruttrici di kit hanno tenuto conto che il metabolita che si rileva nelle urine è la benzoilecgonina e per questo la maggior parte degli anticorpi dei kit in commercio sono specifici per la benzoilecgonina con una bassa *cross*-reattività nei confronti della cocaina. C'è però almeno un kit che presenta un'alta percentuale di *cross*-reattività nei confronti della cocaina e che potrebbe essere usato per la determinazione della cocaina nel capello [7].

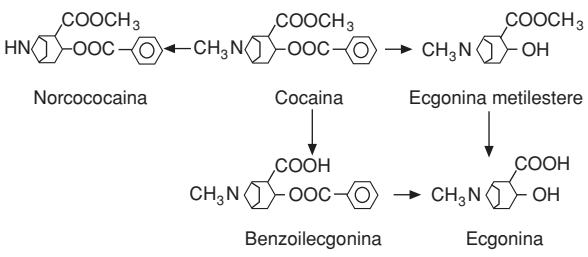


Fig. 3. - Metabolismo della cocaina.

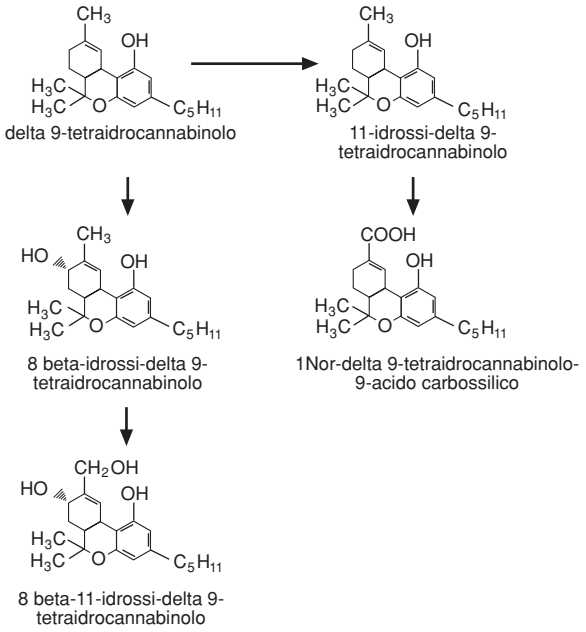


Fig. 4. - Metabolismo del delta-9-THC.

Marijuana

In Fig. 4 è presentato il metabolismo del delta-9-THC, principale principio attivo della marijuana, nell'uomo. Recenti studi hanno dimostrato che le concentrazioni di 11-nor-9-carbossi-delta-9-tetraidrocannabinolo nelle prime urine raccolte dopo aver fumato una sigaretta con una percentuale di 1,75 e 3,55% rispettivamente di THC sono rispettivamente di 47 e 73,5 ng/ml [22, 23]. Il metabolita in entrambi i casi è rilevabile dopo 3 ore circa, la concentrazione di picco invece nel primo caso è di 7 ore circa, mentre nel secondo si arriva alle 14 ore [24]. Infine, si osserva anche in questo caso che il tempo di rilevamento dei metaboliti della marijuana nelle urine è funzione della dose somministrata e del *cut-off* stabilito. A conferma di ciò uno studio nel 1997 [25] dimostra che abbassando il *cut-off* sia dei metodi di screening da 50 ng/ml a 20 ng/ml che di quelli di conferma da 10 a 5 ng/ml, la percentuale di positività per i cannabinoidi su 6427 urine testate aumenta da un 2,8 ad un 4,4 %. Infatti durante un *follow-up* di circa 100 giorni di un fumatore di cannabis che diminuisce nel tempo le dosi assunte, l'utilizzo di un *cut-off* di 100 ng/ml permette d accertare la positività ai cannabinoidi nelle urine solo nei momenti di recente consumo, mentre un *cut-off* di 20 ng/ml consente di monitorare il soggetto in tutto il periodo. La misura contemporanea della creatinina urinaria si rivela interessante in quanto correla perfettamente con quella dei cannabinoidi urinari. Questo conferma che nelle determinazioni urinarie può essere importante fornire non solo le concentrazioni di una droga, ma anche il rapporto sostanza/creatinina al fine di normalizzare i valori con la diluizione dell'urina [26].

Amfetamine

Si tratta di un gruppo di sostanze d'abuso la cui analisi nelle urine e l'interpretazione dei risultati è resa difficile da molti fattori:

- un numero elevato di composti che nell'uomo producono amfetamine. Alcuni di questi composti sono utilizzati su prescrizione medica [27];
- alcuni farmaci che *cross*-reagiscono nei test immunochimici (es. efedrina, ferifluramina fenilpropanolamina, ecc.) [28];
- la possibilità di alcalinizzare le urine (es. con assunzione di bicarbonato sodico) che diminuisce l'escrezione urinaria delle amfetamine, le quali permangono più a lungo nelle urine ma in concentrazioni che possono essere al di sotto del *cut-off* stabilito, prolungandone l'effetto farmacologico [29];
- possibilità di falsi positivi in gascromatografia/spettrometria di massa per modificazioni strutturali di principi attivi durante il processo analitico [30].

Sono stati proposti due tipi di soluzioni a questo ultimo problema. La soluzione metodologica prevede di variare le condizioni di analisi gascromatografica delle amfetamine abbassando ad esempio la temperatura dell'iniettore per evitare le modificazioni strutturali di sostanze per pirolisi o aggiungendo un agente chimico (es. periodato di sodio) che con una reazione di riduzione blocchi eventuali interferenti cromatografici. La soluzione amministrativa, adottata ad esempio dal Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA), ha stabilito che per confermare in gascromatografia/spettrometria di massa come positivo un campione per la metamfetamina, utilizzando un *cut-off* di 500 ng/ml, bisogna trovare positivo lo stesso campione per l'amfetamina utilizzando un *cut-off* di 200 ng/ml [31].

La Fig. 5 presenta infine il metabolismo completo dell'MDMA in assuntori della sostanza. Sebbene ci siano pubblicazioni internazionali riguardanti l'argomento, il pattern metabolico completo di queste sostanze è ancora oggetto di studio [32].

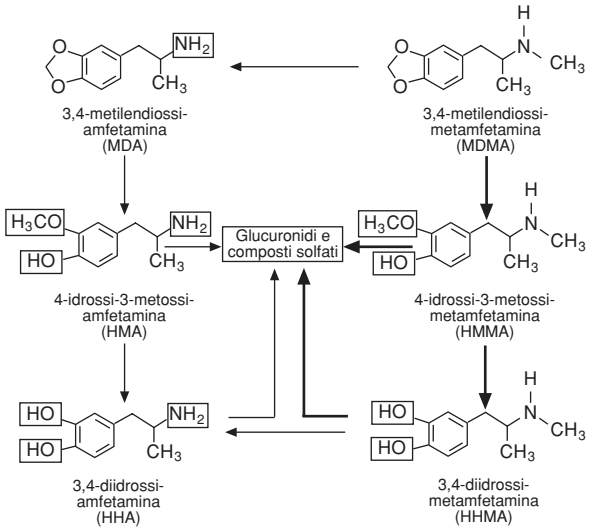


Fig. 5. - Metabolismo completo dell'MDMA in assuntori della sostanza.

Conclusioni

Dopo aver esaminato alcune delle problematiche amministrative e analitiche di un laboratorio di tossicologia clinica, concludiamo facendo riferimento ai rapporti che intercorrono tra un laboratorio di analisi che analizzi sostanze d'abuso nei liquidi biologici e i servizi (SERT).

A tale scopo si può far riferimento alla circolare del Ministero della Sanità del 30 settembre 1994 (*GU* n. 241 del 14 ottobre 1994) riguardante le linee guida per i trattamenti sostitutivi nei tossicodipendenti, in cui viene ribadita l'importanza non solo del recupero totale ma, laddove non sia possibile per la presenza di patologie quali ad esempio l'HIV, il mantenimento in vita del paziente, cioè la ritenzione del paziente al servizio. Nel caso della terapia metadonica, non è utile un monitoraggio della terapia da parte del laboratorio in quanto vari studi [33] hanno messo in luce che parametri farmacocinetici calcolati su volontari sani non sono stati utili per calcolare la dose di metadone e hanno mostrato una mancanza di correlazione tra la dose di metadone amministrata e i livelli ematici misurati in soggetti eroinomani in trattamento. Rimane comunque compito del laboratorio verificare la presenza/assenza del metadone e dell'eroina nelle urine dei soggetti in trattamento. Questa verifica può avere diverse ripercussioni da parte dei servizi che possono intervenire o con un aumento del dosaggio del farmaco o un aumento dell'intervento psicosociale o con la sospensione del trattamento con farmaci sostitutivi. Spesso in passato una positività alla morfina nelle urine veniva considerata come unico elemento per decidere una sospensione del trattamento. Ora invece l'approccio è integrato e quindi la positività non viene utilizzata ai fini di un intervento punitivo e viene posta attenzione ad ogni diniego del paziente per la possibilità di un falso positivo.

Sono attivi a tutt'oggi (12/01/2000) alcuni siti Internet dove è possibile trovare informazioni e fonti legislative che possono aiutare gli operatori nel loro lavoro, quali: il sito della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare SiBioC (www.sibioc.it), quello del Bollettino delle Farmacodipendenze e Alcolismo del Ministero della Sanità (www.unicri.it/min.san.bollettino) e quello del Centro Tossicologico Forense dell'Università di Padova (www.cbft.unipd.it/cbtf/activ.htlm).

Ringraziamenti

Si ringrazia Claudia Mortali per la preziosa collaborazione nel reperimento del materiale bibliografico.

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 12 gennaio 2000.

BIBLIOGRAFIA

1. JANSEN, R.T.P., BLATON, V., BURNETT, D., HUISMAN, W., QUERALTO, JM. & ZERAH, S. 1997. European Communities Confederation of Clinical Chemistry: essential criteria for quality system of medical laboratories. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **35**(2): 123-132.

2. DHHS/SAMSHA. 1998. Mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs (1994). *Fed. Reg.* **63**(219): 63483-63484.

3. DE LA TORRE, R., SEGURA, J., DE ZEEUW, R. & WILLIAM, J. 1997. Recommendations for the reliable detection of illicit drugs in urine in the European Union, with special attention to the workplace. *Ann. Clin. Biochem.* **34**: 399-444.

4. ZUCCARO, P., PICHINI, S., ALTIERI, I., PELLEGRINI, M. & PACIFICI, R. 1998. Procedure per l'analisi delle sostanze d'abuso nelle urine e organizzazione di un laboratorio di tossicologia analitica. *Ligand Assay* **3**(1): 12-20.

5. FERRARA, D., TEDESCHI, L., FRISON, G. & BRUSINI, G. 1998. Quality control in toxicological analysis. *J. Chromatogr. B* **713**: 227-243.

6. LUCERI, F., GODI, F., & MESSERI, G. 1997. Reducing false-negative tests in urinary drugs of abuse screening. *J. Anal. Toxicol.* **2**: 244-245.

7. BRAITHWAITE, R.A., JARVIE, D.R., MINTY, P.S.B., SIMPSON, D. & WIDDOP, B. 1995. Screening for drugs of abuse. I. Opiates, amphetamines and cocaine. *Ann. Clin. Biochem.* **32**: 123-153.

8. SIMPSON, D., BRAITHWAITE, R.A., JARVIE, D.R., STEWART, M.J., WALKER, S., WATSON, J.W. & WIDDOP, B. 1997. Screening for drugs of abuse. II. Cannabinoids, lysergic acid diethylamide, buprenorphine, methadone, barbiturates, benzodiazepines and other drugs. *Ann. Clin. Biochem.* **34**: 460-510.

9. PEAT, M.A. 1988. Analytical and technical aspects of testing for drug abuse: confirmatory procedures. *Clin. Chem.* **34**(3): 471-473.

10. ZUCCARO, P., PICHINI, S., ALTIERI, I. & PACIFICI, R. 1996. *Proposta di linee guida per l'analisi delle sostanze d'abuso nei liquidi biologici*. Istituto Superiore di Sanità, Roma. (Rapporti ISTISAN, 96/29).

11. PICHINI, S., ALTIERI, I., ZUCCARO, P. & PACIFICI, R. 1996. Drug monitoring in non conventional fluids and matrices. *Clin. Pharmacokinet.* **30**(3): 211-228.

12. PALMERI, A., PICHINI, S., PACIFICI, R., ZUCCARO, P. & LOPEZ, A. 2000. Drugs in nails. *Clin. Pharmacokinet.* **38**(2): 95-110.

13. KIDWELL, D.A. & BLANK, D.L. 1995. Mechanisms of incorporation of drugs into hair and the interpretation of hair analysis data. In: *Hair testing for drugs of abuse: international research on standards and technology.* E.J. Cone, M.J. Welch & M.B. Grigson Babeki (Eds). National Institute on Drug Abuse, NIH, Rockville, MD. p. 19-90.

14. SACHS, H. 1995. Theoretical limits of the evaluation of drug concentrations in hair due to irregular hair growth. *Forensic Sci. Int.* **70**: 53-61.

15. HARKEY, M.R., HENDERSON, G.L & ZHOU, C. 1991. Simultaneous quantification of cocaine and its major metabolites in human hair by mass-chromatography/chemical ionization mass-spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* **15**: 260-265.

16. PICHINI, S., ALTIERI, I., PELLEGRINI, M., PACIFICI, R. & ZUCCARO, P. 1997. Hair analysis for nicotine and cotinine: evaluation of extraction procedures, hair treatments, and development of reference material. *Forensic. Sci. Int.* **84**: 243-252.

17. OSBORNE, R., JOEL, S., TREW, D. & SLEVIN, M. 1990. Morphine and metabolite behaviour after different routes of morphine administration: demonstration of the importance of active metabolite morphine-6-glucuronide. *Clin. Pharmacol. Ther.* **47**: 12-19.

18. CONE, E.J. WELCH, P., MITCHELL, J.M. & PAUL, B.D. 1991. Forensic drug testing for opiates. I. Detection of 6-acetylmorphine in urine as an indicator of recent heroin exposure; drug and assay considerations and detection times. *J. Anal. Toxicol.* **15**: 1-7.

19. CONE, E.J. 1995. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cocaine. *J. Anal. Toxicol.* **19**: 459-479.

20. AMBRE, J., RUO, T.I., NELSON, J. & BELKNAP, S. 1988. Urinary excretion of cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester in human. *J. Anal. Toxicol.* **12**: 301-306.

21. AMBRE, J. 1985. The urinary excretion of cocaine and metabolites in humans: a kinetic analysis of published data. *J. Anal. Toxicol.* **9**: 241-245.

22. HUESTIS, M.A., MITCHELL, J.M. & CONE, E.J. 1995. Detection times of marijuana metabolites in urine by immunoassay and GC-MS. *J. Anal. Toxicol.* **19**: 443-449.

23. HUESTIS, M.A., MITCHELL, J.M. & CONE , E.J. 1996. Urinary excretion profiles of 11-Nor-9-carboxy-Δ^9-tetrahydrocannabinol in humans after single smoked doses of marijuana. *J. Anal. Toxicol.* **20**: 441-452.

24. HUESTIS, M.A., HENNINGFIELD, J.E. & CONE, E.J. 1992. Blood cannabinoids. I. Absorption of THC and formation of 11-OH-9-THC and THCCOOH during and after smoking marijuana. *J. Anal. Toxicol.* **16**: 276-282.

25. WINGERT, W.E. 1997. Lowering cutoffs for initial and confirmation testing for cocaine and marijuana: large scale study of effects on the rates of drug-positive results. *Clin. Chem.* **43**(1): 100-103.

26. LAFOLIE, P., BECK, O., BLENNOW, G., BORÉUS, L., BORG, S., ELWIN, C.E., KARLSSON, L., ODELIUS, G. & HJEMDAHL, P. 1991. Importance of creatinine analyses of urine when screening for abused drugs. *Clin. Chem.* **37**: 1927-1931.

27. ELSOHLY, M.A. & JONES, A.B. 1995. Drug testing in the workplace: could a positive test for one of the mandated drugs be for reasons other than illicit use of the drug? *J. Anal. Toxicol.* **19**: 450-458.

28. ELSOHLY, M.A., STANFORD, D.F., SHERMAN, D., SHAH, H., BERNOT, D. & TURNER, C.E. 1992. A procedure for eliminating interferences from ephedrine and related compounds in the GC/MS analysis of amphetamine and methamphetamine. *J. Anal. Toxicol.* **16**: 109-111.

29. SMITH-KIELLAND, A., SKUTERUD, B. & MŸRLAND, J. 1997. Urinary excretion of amphetamine after termination of drug abuse. *J. Anal. Toxicol.* **21**: 325-329.

30. HORNBECK, C.L., CARRIG, J.E. & CZARNY, R.J. 1993. Detection of a GC/MS artifact peak as methamphetamine. *J. Anal. Toxicol.* **17**: 257-263.

31. VALENTINE, J.L., KEARNS, G.L., SPARKS, C., LETZIG, L., VALENTINE, C.R., SHAPPELL, S.A., NERI, D.F. & DEJOHN, C.A. 1995. GC/MS determination of amphetamine and methamphetamine in human urine for 12 hours following oral administration of dextro-methamphetamine: lack of evidence supporting the established forensic guidelines for methamphetamine confirmation. *J. Anal. Toxicol.* 19: 581-590.

32. HELMLIN, H.J., BRACHER, K., BOURQUIN, D., VONLANTHEN, D., BRENNEISEN, R. & STYK, J. 1996. Analysis of 3,4 methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its metabolites in plasma and urine by HPLC-DAD and GC-MS. *J. Anal. Toxicol.* **20**: 432-440.

33. WOEFF, K., ROSTAMI-HODJEGAN, A., SHIRES, S., HAY, A.W.M., FEELY, M., CALVERT, R., RAISTRICK, D. & TUCKER, G.T. 1997. The pharmacokinetics of methadone in healthy subjects and opiate users. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **44**: 325-334.

Ann. Ist. Super. Sanità, vol. 36, n. 1 (2000), pp. 17-27

L'analisi di farmaci e sostanze d'abuso nella matrice cheratinica

Simona PICHINI *(a)*, Piergiorgio ZUCCARO *(a)*, Manuela PELLEGRINI *(a)*,
Annunziata LOPEZ *(b)* e Roberta PACIFICI *(a)*

(a) Laboratorio di Biochimica Clinica, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(b) Istituto di Medicina Legale, Università degli Studi "La Sapienza", Roma

Riassunto. - L'analisi dei capelli per la determinazione di xenobiotici è un *addendum* ideale all'analisi del sangue o delle urine poiché fornisce informazioni che non sarebbero disponibili attraverso l'analisi di queste ultime matrici biologiche. D'altra parte esistono ancora parecchi punti da chiarire affinché questa analisi possa essere accettata routinariamente in ambito medico legale per quantificare il consumo di una determinata sostanza o l'esposizione ad essa. Il presente studio illustra le ipotesi riguardanti il meccanismo di incorporazione di xenobiotici nei capelli e dei fattori di variabilità che intervengono su questa incorporazione, le metodologie per la raccolta dei capelli, l'estrazione degli analiti e la loro determinazione, ed infine la presentazione e l'analisi dei risultati.

Parole chiave: capelli, farmaci, sostanze d'abuso, tossicologia analitica.

Summary *(Hair analysis of drugs and drugs of abuse)*. - Hair analysis of xenobiotics is an ideal *addendum* to blood and urine analysis because it can reveal information that is not available through analysis of the other two specimens. However, there are still some unresolved issues that may affect the legal acceptance of hair testing to quantify drug consumption or exposition. The present paper shows hypotheses on mechanisms of drug incorporation in the hair shaft, variability factors pending on incorporation, methodology for hair collection and extraction, analytes determination and finally data presentation and interpretation.

Key words: hair analysis, drugs, drugs of abuse, analytical toxicology.

Introduzione

In questi ultimi anni l'analisi dei capelli viene utilizzata routinariamente come strumento per determinare l'uso pregresso di farmaci, sostanze d'abuso e più in generale di xenobiotici in tossicologia clinica, tossicologia forense e medicina sociale [1-5].

In particolare, la ricerca di farmaci e sostanze stupefacenti nei capelli può essere utilizzata per provare un uso, un abuso o un misuso protratto nel tempo e per caratterizzarne l'intensità e la sua storia [6, 7]. Per questo motivo la determinazione nei capelli può essere richiesta in caso di:

- morti correlate all'uso di farmaci e/o sostanze d'abuso;
- valutazione della inidoneità alla guida;
- responsabilità criminale;
- affidamento della custodia di minori;
- esposizione prenatale a farmaci e sostanze d'abuso.

L'analisi dei capelli per la determinazione di xenobiotici è un *addendum* ideale all'analisi del sangue o delle urine poiché fornisce informazioni che non sarebbero disponibili attraverso l'analisi di queste ultime matrici biologiche.

D'altra parte, esistono ancora parecchi punti da chiarire affinché questa analisi possa essere accettata routinariamente in ambito medico-legale per quantificare il consumo di una determinata sostanza o l'esposizione ad essa.

Nel 1989, negli Stati Uniti, il National Institute of Standards and Technology (NIST), supportato inizialmente dal National Institute of Justice e più tardi dal National Institute on Drug Abuse (NIDA), ha avviato un progetto di ricerca su una serie di problemi riguardanti l'analisi dei capelli per farmaci e sostanze d'abuso. La ricerca è stata focalizzata su quattro aspetti principali: 1) sviluppo e valutazione dei metodi utilizzati per estrarre gli analiti dal capello e per analizzare gli estratti; 2) indagine sull'influenza di fattori ambientali (contaminazione esterna con sostanze d'abuso, effetto di trattamenti cosmetici, ecc.) sui livelli di analiti determinati nel capello; 3) sviluppo di materiali di riferimento per verificare l'accuratezza delle analisi; 4) studi collaborativi per valutare la performance dei vari laboratori e per determinare il miglior approccio analitico. Questo studio si è concluso formalmente nel 1995 con la stesura di un documento *Hair testing for drugs of abuse. International research on standard and technology*

che riportava sostanzialmente lo stato dell'arte di quanto fatto dai vari gruppi di ricerca sull'argomento, senza però trovare un'armonizzazione tra le diverse metodologie proposte [8].

Nell'ambito del primo meeting europeo sull'analisi dei capelli, tenutosi a Genova nel giugno 1996, la nascente Society of Hair Testing ha redatto un documento di consenso, successivamente pubblicato, riguardante gli aspetti interpretativi dell'analisi dei capelli e i criteri per ottenere un risultato corretto e con valore medico-legale [9]. Questo documento teneva conto del punto di vista dei vari studiosi presenti al meeting e delle legislazioni vigenti negli stati europei e si prefiggeva lo scopo di una armonizzazione di procedure sui temi sopra menzionati. Non è stato invece preso in esame il problema della uniformità delle procedure analitiche che devono essere utilizzate dai laboratori di analisi di una stessa regione, di uno stesso stato e nell'Unione Europea al fine di ottenere un risultato quanto più possibile omogeneo e confrontabile [10].

Nell'analisi della matrice cheratinica è inoltre importante:

- considerare la eventuale possibilità di una contaminazione esterna;
- stabilire una definizione precisa di risultato positivo;
- identificare e quantificare gli analiti in laboratori qualificati con una metodologia analitica standardizzata;
- effettuare un controllo interno di qualità e partecipare a programmi di valutazione esterna di qualità.

Tutto ciò assume una importanza particolare considerando il fatto che non esiste al momento un materiale di riferimento vero e proprio se non un materiale "certificato" consistente o in matrice cheratinica validata per la presenza di alcuni analiti da parte di laboratori di riferimento, o in matrice cheratinica con quantità certificata di analiti depositati sulla superficie esterna della matrice stessa [11].

Il presente lavoro consiste di una parte teorica sulle ipotesi riguardanti il meccanismo di incorporazione di xenobiotici nei capelli e dei fattori di variabilità che intervengono su questa incorporazione e di una parte generale, che illustra l'analisi del capello dal momento della raccolta al momento della quantificazione degli analiti estratti dall'interno del capello riportando i diversi metodi di lavaggio, digestione, estrazione degli analiti e loro determinazione e quantificazione.

Meccanismi di incorporazione di xenobiotici nei capelli

Sono stati proposti due principali modelli teorici per spiegare l'incorporazione di xenobiotici nei capelli, sebbene quale sia il vero meccanismo non sia stato ancora provato [12].

Un primo modello ipotizza che farmaci e sostanze d'abuso siano incorporati all'interno di "regioni" del capello direttamente a contatto con i capillari sanguigni a livello del bulbo pilifero durante l'istogenesi del capello. Quando poi il capello cresce, queste regioni diventerebbero inaccessibili all'ambiente esterno. Un modello alternativo, che trova maggior consenso dalla gran parte del mondo scientifico, si basa sulla teoria di una minima incorporazione di xenobiotici dal circolo sanguigno a regioni del bulbo pilifero durante la formazione del capello. La maggior fonte di incorporazione proverrebbe dal contatto con xenobiotici contenuti nel sudore, ghiandole sebacee e dalla escrezione transdermica via strato corneo sia durante il processo di formazione del capello sia dopo che il capello è spuntato. Secondo questo ultimo modello non esisterebbero "regioni" inaccessibili all'ambiente esterno. Di fatto, è stato dimostrato che capelli immersi in soluzioni acquose contenenti cocaina, morfina o codeina, una volta analizzati per il contenuto di queste sostanze risultano "positivi" sebbene sottoposti ai normali processi di lavaggio eseguiti prima dell'analisi vera e propria. A conferma di ciò, il ruolo del sudore risulterebbe essere quello di un veicolo acquoso di xenobiotici. Questa evidenza ha creato una grande divergenza di opinioni sul significato e sulla presenza di farmaci e sostanze d'abuso nel capello.

Sebbene i due principali modelli teorici sopra esposti siano entrambi sufficienti per spiegare l'incorporazione di xenobiotici nei capelli, altri aspetti quali ad esempio: la presenza nel capello di un elevato rapporto farmaco parente/metabolita, di sostanze ad emivita molto breve e chimicamente labili, la differente concentrazione di alcuni xenobiotici in capelli di diverso colore o di individui di razze differenti rimangono da chiarire.

Un approccio biochimico che tiene conto delle varie proprietà chimico-fisiche dei capelli sembrerebbe fornire una spiegazione esaustiva alle variabili riscontrate nella matrice cheratinica [13].

Il concetto biochimico si basa su: principi di trasporto biologico attraverso membrane, principi di biotrasformazione, affinità di xenobiotici per la melanina. L'assorbimento di farmaci e sostanze d'abuso avverrebbe nel follicolo pilifero in crescita attraverso la membrana cellulare delle cellule della matrice, localizzate attorno alla papilla vascolarizzata del follicolo, e la membrana cellulare dei melanociti, situati all'apice della papilla.

E' noto che il trasporto attraverso le membrane dipende dalla grandezza e dalla forma di una molecola, dal suo legame con le proteine plasmatiche che ne limita la diffusione, dal suo coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua che ne indica la lipofilicità e dal suo pKa, che per un dato pH ne determina la percentuale di forma non-ionizzata che diffonde attraverso la membrana. Il punto isoelettrico delle fibre cheratinizzate del capello è circa 6. Ciò indica la natura acida del capello e spiega l'incor-

porazione preferenziale delle sostanze di natura basica, favorita inoltre anche dal pH acido (range: 4,5-6,7) del sudore. Inoltre, i principi di trasporto attraverso le membrane spiegherebbero la maggiore concentrazione di farmaco (o sostanza d'abuso) parente rispetto al metabolita (o metaboliti) più idrofili. A conferma di ciò, alcuni autori [14] hanno individuato uno scarso accumulo di metaboliti della cocaina (benzoilecgonina ed ecgonina metilestere) nella matrice cheratinica di animali trattati con i metaboliti stessi.

Inoltre, sebbene nel follicolo siano presenti enzimi catalizzatori di trasformazioni metaboliche di fase I (idrossilazione, metilazione, ecc.) e II (coniugazione), l'attività enzimatica sembrerebbe essere scarsa, così come nelle cellule epiteliali della pelle, e limitata nel tempo poiché ristretta alle cellule follicolari nella parte più bassa del bulbo. Questo fornirebbe una ulteriore spiegazione dell'elevato rapporto farmaco parente/ metabolita nella fibra cheratinica.

Durante la cheratinizzazione, una volta che le cellule della matrice lasciano la regione del bulbo, sembrerebbe esclusa la diffusione delle sostanze inglobate verso la circolazione sistemica da cui provenivano, principalmente per un processo di deidratazione. Questo processo porterebbe ad una concentrazione di xenobiotici all'interno della cellula che a causa di un alterato gradiente di concentrazione comincerebbero a migrare verso l'esterno. L'ipotesi più verosimile è che alla fine del processo gli xenobiotici si concentrerebbero sulla membrana cellulare o negli spazi intercellulari. Un'altra possibilità è che gli xenobiotici una volta all'interno della cellula vengano catturati dai prodotti di differenziazione cellulare, quali proteine del filamento di cheratina o granuli di melanina. In questo ultimo caso, le sostanze si accumulerebbero sulla loro superfice poiché i polimeri della melanina tendono ad agire come "assorbenti biologici".

I granuli di melanina sono prodotti all'interno dei melanociti, una popolazione cellulare altamente specializzata del follicolo, con un pH intracellulare nel range 3-5, il quale favorisce l'accumulo di sostanze di natura basica. Molti autori hanno dimostrato con studi *in vivo* ed *in vitro* l'affinità della melanina per vari farmaci e sostanze d'abuso [12, 15, 16]. Sono state ipotizzate due possibili modalità di legame tra xenobiotici e la melanina. Le sostanze con affinità per la melanina potrebbero legarsi alla melanoproteina durante la melanogenesi creando un gradiente di concentrazione e quindi un flusso all'interno dei melanociti piuttosto che verso le cellule della matrice, o potrebbero accumularsi sulla superficie dei granuli a causa della formazione di un complesso farmaco-melanina. Questa teoria sarebbe confermata da molti studi nei quali si dimostra che la concentrazione di sostanze quali ad esempio aloperidolo, ofloxacina, cocaina, metadone è maggiore nei capelli con pigmentazione rispetto a quelli senza pigmentazione [17].

La letteratura più recente riconosce le difficoltà e le incertezze riguardanti l'interpretazione dei risultati e invita alla cautela nell'utilizzo del dato analitico delle analisi dei capelli a causa della non alta specificità diagnostica risultando indaginoso risalire alla dose, alla frequenza e al periodo di tempo di consumo di uno xenobiotico. Infatti, oltre al problema della contaminazione esterna non eliminabile, che però interessa soprattutto le sostanze possibilmente presenti in fase di vapore, una serie di fattori di variabilità, di seguito illustrati, influenza l'analisi degli xenobiotici nel capello.

Fattori di variabilità nell'analisi di xenobiotici nel capello

Effetto della contaminazione esterna

L'analita che crea maggiore discussione è la cocaina, in quanto soprattutto negli Stati Uniti, la sostanza in forma di "crack" viene fumata e quindi la contaminazione esterna in individui non fumatori è altamente probabile [12].

Per questo motivo alcuni autori hanno suggerito un approccio rigoroso e esaustivo riguardo la decontaminazione del capello nel caso dell'analisi della cocaina [18]. Innanzitutto, il capello viene valutato in quanto al suo danneggiamento misurando la percentuale di incorporazione del blu di metilene. L'efficacia della decontaminazione successiva dipende da questo dato. Maggiormente il capello risulta danneggiato più blanda deve essere la decontaminazione successiva. Un capello non danneggiato viene lavato con etanolo anidro per eliminare il grasso e la polvere (2 min a temperatura ambiente). Quindi si eseguono tre lavaggi (2 min a temperatura ambiente) in tampone fosfato a pH neutro. Se il capello risulta danneggiato i lavaggi in tampone vengono sostituiti da miscele di acqua-etanolo dal 5 al 1%. I criteri per stabilire la valutazione del danneggiamento non vengono però riportati. I lavaggi con tampone fosfato vengono esaminati, così come l'estratto di capelli, e i dati raccolti sottoposti ad una trattazione matematica riportata in Tab. 1. Se un campione non rientra in uno dei tre criteri di *cut-off*, a causa di un valore inferiore rispetto a quelli elencati in tabella, viene considerato "contaminato".

Questo approccio matematico ha subito negli anni varie contestazioni e sembra non essere definitivo rispetto al problema dell'individuazione della contaminazione esterna.

Effetto della via di somministrazione

L'unico studio che ha investigato l'effetto della via di somministrazione sulla incorporazione di xenobiotici nel capello riguarda la incorporazione di cocaina

Tabella 1. - Criteri della cinetica di lavaggio per la definizione di contaminazione esterna nell'analisi della cocaina in matrice cheratinica

$$R_1 = \frac{\text{concentrazione della sostanza nell'estratto}}{\text{(concentrazione della sostanza nell'ultimo lavaggio)}}$$

$$R_2 = \frac{\text{concentrazione della sostanza nell'estratto}}{\text{(somma delle concentrazioni della sostanza nei tre lavaggi)}}$$

$$R_3 = \frac{\text{concentrazione della sostanza nei tre lavaggi}}{\text{(concentrazione della sostanza nell'ultimo lavaggio) x 3}}$$

Esempio valori di *cut-off* nel caso della cocaina:
$R_1 = 10$; $R_2 = 0{,}33$; $R_3 = 1{,}3$.

deuterata in 25 volontari sani di sesso e razza differente [16]. Sia la somministrazione intranasale che quella endovena risultavano associate ad una grande variabilità nella quantità di sostanza incontrata nelle varie sezioni di capello, in assenza di una correlazione dose somministrata-concentrazione nel capello.

Sembrerebbe quindi che le differenti concentrazioni di analita trovate nei capelli di soggetti che assumono o dichiarano di aver assunto la medesima dose di farmaco o sostanza d'abuso sono legate alle variazioni interindividuali del metabolismo, e dipendenti dalle differenti vie di somministrazione utilizzate.

Effetto della dose

Al momento, i pochi dati disponibili [19] sull'esistenza di una relazione dose-risposta tra la sostanza somministrata e la concentrazione nella matrice cheratinica sono indice della scarsa conoscenza sull'argomento. Se da una parte alcuni autori suggeriscono che la matrice cheratinica possa essere utilizzata nel monitoraggio terapeutico dei farmaci somministrati nei mesi precedenti [5], altri autori [12, 20, 21] sostengono che l'idea di utilizzare i capelli per accertare se un paziente abbia preso un medicamento secondo la prescrizione è assolutamente inapplicabile a causa della grande variazione individuale nell'incorporazione di farmaci e sostanze d'abuso in matrice cheratinica. Malgrado alcuni studi abbiano individuato una correlazione dose-risposta nel caso di fenobarbital, carbamazepina, metadone, nicotina, aloperidolo, clorpromazina, ofloxacina, diversamente altre ricerche hanno dimostrato mancanza di correlazione nel caso di carbamazepina, nicotina, metadone, diazepam, eroina, morfina e cocaina [19].

Questi risultati contraddittori non sono sorprendenti, considerando l'elevato numero di fattori che possono intervenire nell'indebolire o eliminare la relazione dose-risposta. Tra questi, sicuramente errori metodologici legati alla raccolta dei dati (in particolare nel caso di questionari riguardanti le sostanze d'abuso) visto che maggiori correlazioni sono state calcolate nel caso di somministrazioni controllate o di grandi studi popolazionali. Altri fattori possono intervenire come fattore di errore nella individuazione di una correlazione dose-risposta: lo stadio di crescita del capello, le sue proprietà chimico-fisiche (colore, melanina, ecc.) ed eventuali trattamenti cosmetici.

Effetto dello stadio di crescita del capello

Ogni bulbo pilifero (e quindi anche del capello) possiede un proprio ciclo di crescita dai quattro ai sei anni o più distribuiti nel seguente modo: uno stadio di crescita che può durare dai quattro ai sei anni detto "anagenico" (l'unico stadio in cui avverrebbe l'incorporazione dei farmaci), uno stadio intermedio di alcune settimane detto "catagenico"e uno stadio di riposo di alcuni mesi detto "telogenico". Questa crescita "irregolare" (ossia ogni singolo capello può trovarsi in una fase di crescita differente per cui la crescita media diventa irregolare) comporta dei limiti teorici nella valutazione del significato della presenza di uno xenobiotico in un certo punto della intera lunghezza di un capello. Per questo, alcuni autori [22] suggeriscono di utilizzare una sezione di capelli di 6 cm prossimale alla radice quando si voglia escludere il consumo di una certa sostanza nell'ultimo anno. Inoltre, sempre per lo stesso motivo, la determinazione di una concentrazione di pochi ng di uno xenobiotico in una sezione di uno o pochi cm prossimale alla radice non è necessariamente prova di una assunzione recente di una bassa dose, ma potrebbe essere dovuta ad una assunzione passata di una dose elevata dello xenobiotico che ancora è possibile rilevare in una parte del capello finora all'interno del cuoio capelluto.

Infine, occorre ricordare che uno dei meccanismi di incorporazione di xenobiotici nei capelli prevede l'intervento del sudore e delle ghiandole sebacee, la cui quantità e velocità di secrezione potrebbe essere soggetta a variabilità interindividuale.

Effetto della razza

Una serie di studi ha messo in evidenza la diversa incorporazione di alcuni xenobiotici in capelli di soggetti di razze differenti. In particolare, alcuni studi *in vitro* su capelli di soggetti asiatici, africani e caucasici mostrano una incorporazione differenziale di cocaina secondo la scala: capelli di asiatici > capelli di africani > capelli di caucasici [12]. A conferma di ciò è stata riportata una maggiore incorporazione di cocaina in capelli di soggetti non caucasici o africani rispetto a soggetti caucasici. Mentre per alcuni autori [23] la differenza sarebbe dovuta

essenzialmente al diverso contenuto di melanina in capelli provenienti da soggetti di differenti etnie, secondo altri [16] la sola differenza nel contenuto di melanina non basterebbe a spiegare la diversità di incorporazione di questa droga nel capello. Interverrebbero infatti altri fattori quali differenze nella secrezione di sebo o sudore, anch'essi coinvolti nell'incorporazione di sostanze nel capello.

Effetto dell' età

L'età di un soggetto sembrerebbe influenzare l'incorporazione di xenobiotici nei capelli per due ragioni principali: il differente rapporto tra i diversi stadi di crescita del capello nelle diverse età della vita e la eventuale presenza di capelli privi di pigmentazione (capelli bianchi). Nel neonato, il capello in tutta la sua lunghezza è sempre stato utilizzato quale riferimento di una esposizione durante tutti i nove mesi di vita intrauterina e una serie di evidenze mostrerebbero che nei primi anni di vita ci sarebbe una maggiore accumulazione di xenobiotici nella matrice cheratinica a causa di una crescita rallentata del capello. D'altra parte, poiché nei capelli non pigmentati la incorporazione di xenobiotici è minore rispetto a quelli pigmentati a causa dell'assenza di melanina [24], è necessario tenere in considerazione, per una corretta quantificazione la eventuale presenza di capelli bianchi.

Effetto dei trattamenti cosmetici sulla quantità di analita presente nel capello

E' noto che i comuni trattamenti cosmetici quali decolorazione, tintura o permanente e in certa misura anche le normali cure di igiene, influenzano sia l'incorporazione di xenobiotici nel capello che la loro stabilità una volta presenti nella matrice cheratinica [25, 26].

Per quanto riguarda le normali cure igieniche, alcuni autori [27] sostengono che la quantificazione di farmaci e sostanze d'abuso nei capelli va corretta considerando il danneggiamento del capello dovuto all'uso di shampoo alcalini (calcolato misurando la percentuale di incorporazione del blu di metilene), sebbene non riportano una trattazione matematica della correzione da applicare.

D'altra parte, per quanto riguarda i trattamenti cosmetici veri e propri, tutti i metodi di decolorazione (che vengono usati da soli o prima di procedere ad una tintura) consistono in trattamenti ossidativo-alcalini contenenti 6-12% di perossido di idrogeno con un attivatore quale persolfato d'ammmonio o di potassio. La "permanente" si basa sull'apertura dei legami disulfuro dei capelli da parte di mercaptani e sul ripristino di parte di questi legami in una nuova posizione da parte di una lozione neutralizzante che contiene il 2% di perossido di idrogeno. Evidenze sperimentali indicano che la composizione chimica di questi prodotti cosmetici e le condizioni del trattamento sono in grado di ridurre la concentrazione nella matrice cheratinica di molte sostanze [25]. Infatti, nel caso di 6-monoacetilmorfina, morfina, codeina, cocaina e benzoilecgonina la concentrazione nel capello si può ridurre fino ad un 10% di quella iniziale in seguito a trattamenti cosmetici e quindi in caso di concentrazioni iniziali intorno ad 1 ng/mg di capelli c'è il rischio di arrivare al disotto del limite di sensibilità di 0,1 ng/mg capelli proposto da alcuni autori per evidenze medico-legali [6]. Tutto ciò fa concludere che nell'analisi di farmaci e sostanze d'abuso nella matrice cheratinica è necessario conoscere e tenere in considerazione la "storia cosmetica" dei capelli in esame.

Tempo di rilevamento di un analita nel capello dopo l' assunzione

Una evidenza ulteriore del fatto che il sudore gioca un ruolo importante nell'incorporazione degli xenobiotici nei capelli si ottiene dal breve intervallo di tempo che è stato rilevato nel caso di alcune sostanze (codeina, cocaina, amfetamina) tra la somministrazione di una sostanza e la possibilità di rilevarla nel capello [28]. La cotinina, metabolita della nicotina, è stata determinata nella barba di alcuni soggetti tre giorni dopo una somministrazione di una dose unica *per os* di nicotina [29]. Questo significherebbe il mancato trasferimento attraverso il sudore in contrasto con quanto riportato per altre sostanze (es. codeina) quantificabili nella barba un giorno dopo la loro somministrazione. Ciò sarebbe dovuto al valore del pKa della cotinina, più basso di quello degli oppiacei, che non favorirebbe la sua diffusione dal plasma ad un mezzo più acido quale la saliva.

Determinazione di xenobiotici nella matrice cheratinica

Prelievo dei capelli

Il prelievo dei capelli deve essere effettuato nel rispetto dei diritti legali, etici ed umani della persona da personale adeguatamente addestrato.

I capelli devono essere prelevati nella zona nucale, avendo cura di operare il taglio a partire dall'attaccatura al cuoio capelluto.

Il taglio deve essere eseguito con forbici pulite con una piccola quantità di alcol e ben asciutte.

E' necessario prelevare una quantità di capelli di almeno 200 mg, al fine di poter eventualmente effettuare più di un'analisi su uno stesso campione.

Una volta tagliati i capelli, se lunghi possono essere fissati con uno spago annodato il più vicino possibile alla parte dei capelli prossimale al cuoio capelluto, in

modo da evidenziare il segmento iniziale. Se corti, i capelli devono essere fissati ad un foglio di carta tramite pinze di metallo anche in questo caso evidenziando il segmento iniziale dei capelli.

In ogni caso, i capelli vanno conservati in busta di carta, riportando su di essa la data del prelievo e il numero di identificazione del campione. La busta va conservata a temperatura ambiente.

Al momento del prelievo è necessario riempire una scheda che riporti tutti i dati del soggetto inclusi gli eventuali trattamenti cosmetici subiti di capelli (permanente, tinture, decolorazioni) poiché è noto che tali trattamenti potrebbero creare interferenze analitiche e modificare attraverso reazioni chimiche gli analiti in esame modificandone quindi il quantitativo presente inizialmente nella matrice cheratinica [25, 26].

Lavaggio e preparazione del campione

E' necessario operare un lavaggio dei capelli per eliminare i grassi ed i contaminanti ambientali di diversa natura che potrebbero creare interferenze a livello analitico ed infine escludere una contaminazione esterna da parte degli analiti in esame. D'altra parte, i solventi utilizzati nel lavaggio devono essere tali da poter eliminare per quanto più possibile le sostanze esogene (depositate nella parte esterna del capello) senza di fatto estrarre le sostanze contenute all'interno del capello. In questo senso, è anche importante il tempo di contatto tra liquido di lavaggio e superficie da lavare. In realtà, dagli studi effettuati in questi ultimi anni si è evidenziato che non è possibile indicare un solvente o una serie di solventi che possano decontaminare in maniera quantitativa la parte esterna del capello, senza intervenire sulle sostanze contenute nella parte interna [12].

Dei vari metodi riportati nella letteratura internazionale vengono di seguito elencati i quattro più comunemente utilizzati dai ricercatori:

- due lavaggi successivi con diclorometano, ognuno della durata di 5 min;
- tre lavaggi della durata di 5 min con acqua distillata, acetone ed etere di petrolio rispettivamente;
- un lavaggio a 37 °C per 15 min con alcol etilico o metilico;
- un lavaggio di 15 min con alcol etilico anidro seguito da tre lavaggi di 30 min con tampone fosfato (0,01 M, pH 5,5).

Per circa 100-200 mg di capelli è necessario utilizzare almeno 5-10 ml di solvente. L'ultimo lavaggio, raccomandato dalla Society of Hair Testing, è particolarmente indicato qualora ci sia sospetto di contaminazione esterna da fumo di cannabis o di cocaina. In generale, comunque, al fine di poter valutare la possibilità di contaminazione passiva si raccomanda:

- l'identificazione dei metaboliti delle sostanze parenti;
- il calcolo del rapporto metabolita/sostanza parente;
- l'esame dei solventi di lavaggio al fine di individuare l'eventuale presenza della sostanza;
- l'identificazione di concentrazioni soglia *(cut-off)* per i vari analiti.

Al termine del lavaggio, il campione può essere asciugato a temperatura ambiente con carta bibula o in corrente d'azoto per eliminare più velocemente i residui di solvente.

Una volta asciutti, i capelli devono essere triturati con forbici ben pulite in modo da ottenere segmenti di circa 0,1-0,3 cm di lunghezza o meglio possono essere polverizzati tramite mulino a palle. Quest'ultima procedura è da ritenersi di elezione, in quanto facilita la successiva digestione della matrice cheratinica rendendo massima la superficie di penetrazione del solvente.

Nel caso si voglia eseguire un esame segmentale dei capelli, sarà necessario innanzitutto poter disporre di una quantità iniziale maggiore di campione al fine di avere per ogni segmento una quantità di almeno 20-20 mg. A tale scopo, la ciocca di capelli in esame andrà distribuita su carta bibula fissando le due estremità con pinze di metallo e quindi si procederà al taglio dei vari segmenti (di solito di 1 cm) a partire dalla punta fino alla estremità vicina all'attaccatura al cuoio capelluto. Tali segmenti, riconoscibili con un numero progressivo che verrà attribuito a ciascuno di essi, andranno poi ulteriormente triturati o polverizzati.

I capelli triturati o polverizzati verranno infine trasferiti e pesati in contenitori in vetro (5 ml) con tappo a vite dove verranno trattati con un solvente opportuno al fine di estrarre dall'interno della matrice gli analiti di interesse.

Digestione della matrice cheratinica

Scopo delle procedure di digestione è quello di estrarre in maniera selettiva e quantitativa gli analiti di interesse dall'interno della matrice cheratinica, senza modificare chimicamente gli analiti stessi [30].

La completa dissoluzione del capello assicura il rilascio quantitativo degli analiti contenuti all'interno, però le severe condizioni chimiche spesso utilizzate per ottenere la digestione totale del capello possono sia distruggere analiti di interesse, sia estrarre sostanze aspecifiche interferenti al momento dell'analisi. Per questo esistono una serie di procedure applicabili a più analiti e talune specifiche per le varie classi di sostanze [31-35].

In generale si possono distinguere quattro tipi principali di digestione della matrice cheratinica.

Digestione enzimatica. - Consiste nella digestione del capello a caldo (37-45 °C) per periodi di tempo che vanno da tre ore a tutta la notte in soluzioni tampone specifiche contenenti enzimi. Gli enzimi più comunemente utilizzati sono: €-glucuronidasi-

arilsulfatasi e pronasi. Questo tipo di digestione richiede lo stretto controllo di una serie di variabili quali: temperatura, pH, attività enzimatica e perciò la ripetibilità del processo può rivelarsi non ottimale. E' da tener presente inoltre che la €-glucuronidasi-arilsulfatasi nel caso degli oppiacei causa la trasformazione in morfina della monoacetilmorfina, considerata quest'ultima il marker reale del consumo di eroina. Questo tipo di digestione necessita di una estrazione successiva degli analiti liberati dalla matrice.

Digestione basica. - Consiste nella digestione del capello a temperatura ambiente o a caldo (fino a 100 °C) per periodi di tempo da una ora a tutta la notte con soluzioni di idrossido di sodio a diversa molarità (la più usata è solitamente 1M). La digestione basica assicura la completa dissoluzione della matrice cheratinica, ma provoca l'idrolisi di alcuni analiti di interesse quali ad esempio eroina, monoacetilmorfina, cocaina. E' quindi sconsigliata nella ricerca di queste sostanze, mentre viene comunemente utilizzata nella ricerca di cannabinoidi, benzodiazepine e nicotina. Questo tipo di digestione necessita di una estrazione successiva degli analiti liberati dalla matrice.

Digestione acida. - Consiste nella digestione del capello a temperatura ambiente o a caldo (fino a 100 °C) per periodi di tempo da una ora a tutta la notte con soluzioni di acido cloridrico a diversa molarità (la più usata è solitamente 0,1 M). La digestione acida non assicura la completa dissoluzione della matrice cheratinica, e d'altra parte provoca idrolisi parziale o totale (in funzione del tempo e della temperatura di digestione) di sostanze quali ad esempio eroina e monoacetilmorfina. E' quindi generalmente sconsigliata nella ricerca di oppiacei, a meno che non si sia valutato in precedenza il processo di idrolisi su soluzioni di standard di riferimento. Questo tipo di digestione necessita di una estrazione successiva degli analiti liberati dalla matrice.

Digestione in alcol metilico. - Consiste nella digestione del capello a temperatura ambiente o a caldo (fino a 56 °C) per periodi di tempo da alcune ore a tutta la notte. La digestione in alcol metilico non assicura la completa dissoluzione della matrice cheratinica, e il suo potere estrattivo è estremamente ridotto rispetto alle digestioni precedentemente citate. D'altra parte, con questo tipo di digestione i processi di idrolisi sono del tutto assenti. Si tratta di una digestione della matrice cheratinica applicabile quando si hanno a disposizione metodi di analisi specifici e sensibili. Non necessita di una estrazione successiva degli analiti liberati dalla matrice.

Estrazione degli analiti

Ad esclusione del trattamento con alcol metilico, i processi di digestione richiedono una successiva estrazione degli analiti di interesse dalla matrice complessa, principalmente per eliminare la presenza di interferenti analitici. I processi estrattivi principalmente utilizzati sono: l'estrazione con solventi o miscele di solventi non miscibili con la fase acquosa utilizzata nella digestione (estrazione liquido-liquido) e l'estrazione della fase acquosa sopra menzionata per ripartizione tra una fase solida inserita in una cartuccia di plastica o vetro e un solvente di eluizione non miscibile appunto con la fase solida (estrazione in fase solida, SPE). Le miscele di solventi utilizzati nella estrazione liquido-liquido sono generalmente toluene-alcol butilico, cloroformio-isopropanolo, cloruro di metilene-isopropanolo in diverse proporzioni. Per l'estrazione in fase solida, si utilizzano colonnine riempite con fase stazionaria apolare (C18, Bond-Elut Certify, Isolute HC) o con fase adsorbente (Extrelut).

Esiste infine la possibilità di evitare la digestione del capello e la successiva estrazione degli analiti utilizzando l'estrazione con fluidi supercritici [36, 37]. Si tratta di fluidi che si trovano ad una pressione ed ad una temperatura superiori a quelle dello stato critico, definito come uno stato intermedio tra il liquido e il gas. Il fluido più utilizzato, grazie alla facilità di impiego, miscibilità con molti solventi, mancanza di tossicità e di costo moderato, è il biossido di carbonio, che essendo però solo debolmente polare necessita di aggiunta di modificatori organici (alcol metilico, trietilammina, acqua) per l'estrazione di analiti dalla matrice cheratinica. L'estrazione con fluidi supercritici necessita di una apparecchiatura particolare, con una camera di estrazione che possa creare le condizioni di pressione e temperatura necessarie per ottenere il fluido supercritico e nella quale avviene il contatto con la matrice cheratinica polverizzata. Al termine del tempo di contatto, la camera viene depressurizzata e il fluido supercritico viene intrappolato in una fase solida o in un solvente. Questa metodica, sebbene promettente nel senso di rapidità, efficienza e specificità, risulta però ancora costosa e di difficile operatività.

Metodi immunochimici

I test immunochimici possono essere utilizzati come metodi iniziali, al fine di analizzare in poco tempo un gran numero di campioni in maniera economica, efficace e standardizzata e di escludere i campioni che risultano negativi, ossia i campioni che non contengono la sostanza o la classe di sostanze oppure quelli in cui la concentrazione è al disotto di un valore soglia *(cut-off)*. Negli ultimi anni vari ricercatori hanno verificato la possibilità di adattare kit validati per l'analisi di farmaci e sostanze d'abuso nel sangue o nelle urine all'analisi del capello [38-40] in quanto a tutt'oggi non esistono in commercio test di screening per la matrice cheratinica. Tuttavia, qualora ci sia l'esigenza di effettuare analisi su un largo numero di campioni con bassa probabilità di

risultati positivi, è possibile utilizzare uno screening iniziale. Le metodiche che si possono usare sono tutte immunochimiche: radioimmunologiche (RIA), immunoenzimatiche (EIA), ad immunofluorescenza a luce polarizzata (FPIA) o ad inibizione dell'agglutinazione (HI) con anticorpo policlonale o monoclonale. Un primo problema nasce dal fatto che nei capelli le sostanze presenti non sono sempre le stesse che si trovano in concentrazioni elevate nell'urina (come per esempio l'eroina e la 6-monoacetilmorfina nei capelli di assuntori di eroina o cocaina nei capelli di assuntori di cocaina). Quindi nasce l'esigenza di scegliere test immunochimici altamente specifici per queste sostanze o con alta cross reattività. Inoltre, poiché varia il tipo di matrice biologica a cui il test è applicato, è necessario procedere ad una validazione della metodica secondo linee guida per la convalida di metodi immunochimici. Tale convalida consiste in linea generale nella verifica della linearità della curva di taratura in matrice cheratinica, correggendo in questo modo il possibile effetto matrice. In breve, si costruisce una curva su capelli di controllo (nei quali dopo analisi in gas cromatografia/spettrometria di massa è risultata assente la presenza degli analiti in esame) addizionati con concentrazioni scalari di analiti (quelle per cui esiste una linearità nelle condizioni standard) e si controlla se le differenze tra i vari punti siano statisticamente significative. Ciò esprime la possibilità di differenziare statisticamente campioni con concentrazioni diverse di analiti. Una volta individuato un range di concentrazioni in cui la curva risulta lineare, è necessario testare la sensibilità (percentuale di veri positivi) e la specificità (percentuale di falsi positivi) diagnostica del metodo per costruire la curva ROC *(relative operating curve)* che permette l'eventuale calcolo del *cut-off* con la massima efficienza. Al momento come non esistono test iniziali specifici per i capelli, non esistono valori soglia ufficiali, secondo i quali giudicare un campione positivo o negativo per il consumo di una determinata sostanza.

Riguardo al cosiddetto "effetto matrice", molto dipende dal tipo di digestione che si è operata. La digestione in HCl o in alcol metilico portano ad avere campioni in cui oltre agli analiti in esame sono presenti costituenti della matrice cheratinica, che interferiscono aspecificamente nella reazione antigene-anticorpo. Inoltre è necessario che il campione da analizzare, se digerito con acidi o alcali, venga neutralizzato affinché non si denaturino le proteine anticorpali, o che una eventuale digestione enzimatica sia fatta con un enzima che non attacchi le stesse proteine.

Quindi, il risultato di questi test iniziali, sempre qualitativo, può orientare l'analizzatore nell'esecuzione di analisi successivi. Inoltre, poiché al momento non esistono valori soglia ufficiali per la definizione di un campione positivo o negativo per la presenza di una sostanza nella matrice cheratinica, al disotto dei quali il campione venga considerato negativo, la scelta di considerare un campione negativo senza averlo esaminato con metodiche cromatografiche è del tutto personale.

Metodi cromatografici

Le analisi di conferma sono definite come quelle analisi che servono a verificare che non ci siano stati risultati falsi positivi dovuti alla non specificità dei test iniziali. Devono essere specifiche per i singoli analiti, e con una sensibilità uguale o maggiore al valore soglia stabilito nei test preliminari, e devono fornire un dato quantitativo. Nel caso della matrice cheratinica, poiché non esistono veri e propri test di screening neanche si può parlare di vere e proprie "analisi di conferma". Ciò nonostante, la Society of Hair Testing raccomanda, a prescindere dalla esecuzione o meno di una analisi di screening, l'utilizzo di metodologie di analisi quali gas-cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa o "ogni altra tecnologia di specificità e selettività uguali o maggiori" [9]. Come tecnica separativa è possibile utilizzare anche la cromatografia liquida a patto che il rivelatore sia sempre uno spettrometro di massa. Questa esigenza di un rivelatore "assoluto" è dovuta sia alla complessità della matrice cheratinica e quindi della possibile presenza di interferenti analitici, sia al fatto che nella maggior parte dei casi i risultati delle analisi assumono valore medico-legale. Ciò non esclude che per la esecuzione di studi clinici su pazienti in trattamento con una determinata sostanza si possa utilizzare la cromatografia liquida con un rivelatore convenzionale: ad assorbimento di luce ultravioletta, a serie di fotodiodi, ecc. [41]. Come già riportato nelle linee guida per l'analisi di sostanze d'abuso nei liquidi biologici [10], le metodiche cromatografiche vanno validate, in questo caso nella matrice cheratinica, prima di essere applicate per l'analisi di campioni reali.

Presentazione dei dati

La concentrazione di farmaci e sostanze d'abuso nei capelli è nello stesso range di quella presente nelle urine. Però, la quantità di campione utilizzato nell'analisi dei capelli è approssimatamente una volta su mille di quella utilizzata nel caso delle urine (considerando una densità teorica di 1,000 nel caso dell'urina 1 ml = 1 g) [6]. Questo vuol dire che la quantità di xenobiotico da determinare è nell'ordine dei picogrammi-nanogrammi.

Solitamente per ogni singola analisi si utilizza un quantitativo minimo di capelli dai 50 ai 100 mg, sebbene nel caso di analisi segmentali del capello (quando si utilizza 1 cm o 2 cm per ogni analisi) e nel caso di capelli di neonati difficilmente si riesce ad ottenere questo quantitativo. Bisogna comunque tener presente che il metodo di analisi non dovrebbe operare routinariamente al limite di quantificazione (LOQ) affinché il risultato della determinazione analitica possieda una certa precisione ed accuratezza.

Il risultato finale delle analisi va espresso in ng di xenobiotico/mg di capelli. Accanto al risultato quantitativo andrà espressa la lunghezza in cm del segmento analizzato e la sua distanza dalla base del cuoio capelluto.

Interpretazione dei risultati

Il meccanismo di incorporazione di farmaci e sostanze d'abuso nel capello è un processo complesso influenzato, come è stato illustrato, da molte variabili.

Non sono state stabilite concentrazioni "soglia" *(cut-off)* ufficiali dei vari xenobiotici nel capello che permettano di dichiarare la positività o la negatività rispetto all'utilizzo o meno di una certa sostanza. Esiste una unica proposta riguardante gli oppiacei e cocaina secondo cui concentrazioni di 6-monoacetilmorfina inferiori a 0,5 ng/mg di capello e di cocaina inferiori a 1 ng/mg di capello escluderebbero il consumo; valori di 6-monoacetilmorfina inferiori a 2 ng/mg di capello e di cocaina inferiori a 4 ng/mg di capello indicherebbero un consumo basso; valori di 6-monoacetilmorfina tra 2 e 10 ng/mg di capello e di cocaina tra 4 e 20 ng/mg di capello indicherebbero un consumo medio e valori di 6-monoacetilmorfina superiori a 10 ng/mg di capello e di cocaina superiori a 20 ng/mg di capello indicherebbero un consumo elevato [42].

Alcuni autori sostengono che una contaminazione esterna del capello non possa a priori essere esclusa [12]. In effetti, mentre per alcuni analiti (oppiacei, amfetamine, benzodiazepine, antidepressivi triciclici, antiepilettici) la presenza nella matrice cheratinica implica con una certa sicurezza il consumo, in altri casi (cocaina, cannabinoidi, nicotina) l'effetto di una contaminazione esterna può essere presente. Inoltre, sostanze incorporate nel capello non sono protette né fisicamente, né chimicamente da cambiamenti e che il dato della matrice cheratinica debba sempre essere accoppiato ad un altro dato di positività dell'analita in una differente matrice biologica.

Doping e capelli

In accordo con la definizione del Comitato Olimpico Intenazionale si considera *doping* l'assunzione da parte di partecipanti a competizioni sportive di sostanze appartenenti a categorie proibite di agenti farmacologici o l'uso di metodologie o tecniche proibite quali ad esempio l'uso di emotrasfusione o l'uso di sostanze che alterino l'integrità e la validità del campione di urine [43, 44].

Le classi di sostanze proibite sono le seguenti: stimolanti, narcotici, agenti anabolizzanti, diuretici e ormoni peptidici e glucoproteici. Sostanze soggette ad una certa restrizione sono: alcol, cannabis, anestetici locali, corticosteroidi e beta-bloccanti.

Al momento, la determinazione delle sostanze sopra elencate nella matrice cheratinica non viene utilizzata per provare il consumo delle sostanze stesse da parte di atleti. Questo non vuol dire che non possa essere utilizzata, ma affinché possa esserlo si deve poter dimostrare che l'analisi del capello fornisce una informazione analitica non solo retrospettiva, ma di miglior qualità rispetto all'analisi delle urine. Questo perché nel caso di molte delle sostanze proibite (es. beta-bloccanti o stimolanti) l'evidenza di un uso retrospettivo non implica l'abuso e usualmente si tratta di sostanze che non vengono consumate antecedentemente ad una gara, ma immediatamente prima di essa e quindi l'analisi delle urine è la più opportuna per rivelare questo tipo di assunzione. Nel caso invece di assunzione cronica di sostanze nei mesi precedenti alle gare (es. agenti anabolizzanti o beta-agonisti con effetto anabolizzante) l'analisi del capello presenta sia il vantaggio della retrospettività che quello della miglior qualità della informazione. Questa ultima caratteristica è particolarmente vera nel caso dell'analisi segmentale del capello che permette di analizzare diverse sezioni del capello corrispondenti a periodi di tempo successivi e poter individuare non solo un uso protratto nel tempo ma anche un uso di dosi elevate di agente dopante alternato a periodi di sospensione dall'uso.

In letteratura sono presenti metodologie di analisi per alcuni beta-agonisti quali ad esempio il clembuterolo e per il testosterone [39, 45-47]. In realtà, la presenza di testosterone nei capelli come evidenza di assunzione di preparazioni farmaceutiche contenenti anabolizzanti è stata contestata, poiché parrebbe che le concentrazioni incontrate (nell'ordine delle centinaia di picogrammi) potrebbero provenire dal testosterone endogeno, sebbene quantitativi di testosterone maggiori di almeno tre deviazioni standard rispetto alla media di valori incontrati in individui non consumatori di steroidi anabolizzanti può sicuramente far sospettare il consumo di tali sostanze. L'unica prova certa di assunzione di anabolizzanti sarebbe la determinazione degli esteri di testosterone quali: enantato, undecanoato ecc. Al momento esiste in letteratura solo la possibilità di determinare queste ultime sostanze nei capelli in caso di morti dovute ad overdosi di steroidi anabolizzanti o in caso di assunzioni croniche a concentrazioni elevate [47]. Non esistono invece studi clinici che dimostrino se una singola assunzione o assunzioni croniche per brevi periodi siano dimostrabili con la determinazione di esteri di testosterone e composti correlati nel capello.

Conclusioni

L'analisi dei capelli è uno degli strumenti più promettenti per l'accertamento dell'uso ripetuto e continuo di xenobiotici quali ad esempio droghe d'abuso

e farmaci. Gli studi effettuati sui meccanismi di crescita del capelli e sull'incorporazione delle sostanze di interesse tossicologico nella matrice cheratinica riportati brevemente nei paragrafi precedenti dimostrano che tale reperto è utilizzabile al fine della ricerca di sostanze esogene e/o loro metaboliti e che le tecniche normalmente a disposizione forniscono quei requisiti necessari di sensibilità e specificità per evidenziare gli analiti in tale matrice. D'altra parte, gli stessi studi hanno evidenziato ambiti di problematicità che rendono difficoltosa e delicata l'interpretazione del dato analitico, specialmente quello quantitativo.

Altri studi hanno evidenziato una grande variabilità interindividuale dovuta a differenze razziali e alle differenti abitudini igienico-cosmetiche dei soggetti. Di questi fattori di variabilità si dovrà tenere conto nel valutare correttamente i dati quantitativi da analisi su capelli o loro segmenti. Non essendo ancora certi ed univoci i meccanismi di incorporazione e le fasi di crescita del capello, la valutazione cronologica delle assunzioni di xenobiotici è assai delicata; i fattori di variabilità possono essere molteplici e contrastanti e una non accurata ed attenta valutazione dei dati quantitativi potrebbe portare a conclusioni inesatte e fuorvianti.

Quanto evidenziato, è ancora più essenziale quando il dato analitico debba portare a implicazioni forensi. La comunità scientifica non ha ancora preso una posizione univoca sulla utilizzabilità in campo forense dei test su capelli. Questioni quali l'interpretazione di un risultato negativo o di un risultato positivo devono essere risolte in maniera definitiva. Allo stato attuale la matrice cheratinica può fornire dati utili ai fini forensi a condizione che il dato analitico venga inquadrato in una ben più ampia serie di analisi condotte anche su altre matrici biologiche.

Ringraziamenti

Si ringrazia Claudia Mortali per la preziosa collaborazione nel reperimento del materiale bibliografico.

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 12 gennaio 2000.

BIBLIOGRAFIA

1. VALENTE, D., CASSANI, M., PIGLIAPOCHI, M. & VANSETTI, G. 1981. Hair as the sample in assessing morphine and cocaine addiction. *Clin. Chem.* **27**: 1952-1953.

2. KINTZ, P. 1997. *Drug testing in hair*. CRC Editions, London.

3. SACHS, H. 1997. History of hair analysis. *Forensic Sci. Int.* **84**: 7-16.

4. GROPPER, B.A. 1995. Research and development on drug testing by hair analysis. In: *Hair testing for drugs of abuse. International research on standards and technology.* National Institute on Drug Abuse, Rockville, MD. (NIDA Research Monograph, NIH Publication, no. 95-3727). p. 7-18.

5. UEMATSU, T. 1993. Therapeutic drug monitoring in hair samples. *Clin. Pharmacokinet.* **25**: 83-87.

6. MOELLER, M.R. 1996. Hair analysis as evidence in forensic cases. *Ther. Drug Monit.* **18**: 444-449.

7. HUESTIS, M.A. 1996. Judicial acceptance of hair tests for substances of abuse in the united states courts scientific, forensic and ethical aspects. *Ther. Drug Monit.* **18**: 456-459.

8. NIDA Research Monograph. 1995. *Hair testing for drugs of abuse. International research on standards and technology.* National Institute on Drug Abuse, Rockville, MD. (NIH Publication, no.95-3727).

9. SOCIETY OF HAIR TESTING. 1997. Statement of the Society of Hair Testing concerning the examination of drugs in human hair. *Forensic Sci. Int.* **84**: 3-6.

10. ZUCCARO, P., PICHINI, S., ALTIERI, I. & PACIFICI, R. 1996. *Proposta di linee guida per l'analisi delle sostanze d'abuso nei liquidi biologici*. Istituto Superiore di Sanità, Roma. (Rapporti ISTISAN, 96/29).

11. WELCH, M.J., SNIEGOSKI, L.T., ALLGOOD, C.C. & HABRAM, M. 1993. Hair analysis for drugs of abuse: evaluation of analytical methods, environmental issues, and development of reference materials. *J. Anal. Toxicol.* **17**: 389-398.

12. KIDWELL, D.A. & BLANK D.L. 1995. Mechanisms of incorporation of drugs into hair and the interpretation of hair analysis data. In: *Hair testing for drugs of abuse. International research on standards and technology.* National Institute on Drug Abuse, Rockville, MD. (NIDA Research Monograph, NIH Publication, no. 95-3727). p. 19-90.

13. PÖTSCH, L., SKOPP, G. & MOELLER, M.R. 1997. Biochemical approach on the conservation of drug molecules during hair fiber formation. *Forensic Sci. Int.* **84**: 25-35.

14. NAKAHARA, Y. & KIKURA, R. 1994. Hair analysis for drugs of abuse. VII. The incorporation rates of cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester into rat hair and hydrolysis of cocaine in rat hair. *Arch. Toxicol.* **68**: 54-59.

15. JOSEPH, R.E., SU, T. & CONE, E.J. 1996. *In vitro* binding studies of drugs to hair: influence of melanin and lipids on cocaine binding to caucasoi and africoid hair. *J. Anal. Toxicol.* **20**: 338-344.

16. HENDERSON G.L., HARKEY, M.R., ZHOU, C., JONES, R.T. & JACOB III, P. 1996. Incorporation of isotopically labeled cocaine and metabolites into human hair: dose-response relationship. *J. Anal. Toxicol.* **20**: 1-12.

17. Hair analysis in forensic toxicology. 1995. *Proceedings of the 1995 International Conference and Workshop*. Abu Dhabi, Arab Emirates, November 19-23, 1995. R.A. De Zeeuw, I. Al Hosni, S. Al Munthiri & A. Maqbool (Eds).

18. BAUMGARTNER, W.A. & HILL, V.A. 1993. Sample preparation techniques. *Forensic Sci. Int.* **63**: 121-135.

19. KINTZ, P. 1995. Testing human hair for opiates and cocaine by gas chromatography/mass spectrometry after acid or enzyme hydrolysis. In: *Hair testing for drugs of abuse. International research on standards and technology.* National Institute on Drug Abuse, Rockville, MD. (NIDA Research Monograph, NIH Publication, no. 95-3727). p. 186-195.

20. KINTZ, P., BUNDELI, P., BRENNEISEN, R. & LUDES, B. 1998. Dose-concentration relationships in hair from subjects in a controlled heroin-manintenance program. *J. Anal. Toxicol.* **22**: 231-236.

21. TRAQUI, A., KINTZ, P. & MANGIN, P. 1995. Hair anlysis: a worthless tool for therapeutic compliance monitoring. *Forensic Sci. Int.* **70**: 183-189.

22. SACHS, H. 1995. Theoretical limits of the evaluation of drug concentrations in hair due to irregular hair growth. *Forensic Sci. Int.* **70**: 53-61.

23. JOSEPH, R.E., SU, T. & CONE, E.J. 1996. *In vitro* binding studies of drugs to hair: influence of melanin and lipids on cocaine binding to caucasoi and africoid hair. *J. Anal. Toxicol.* **20**: 338-344.

24. ROTHE, M., PRAGST, F., THOR, S. & HUNGER, J. 1997. Effect of pigmentation on the drug deposition in hair of grey-haired subjects. *Forensic Sci. Int.* **84**: 53-60.

25. JURADO, C., KINTZ, P., MENEDEZ, M. & REPETTO, M. 1997. Influence of the cosmetic treatment of hair on drug testing. *Int. J. Legal Med.* **110**: 159-163.

26. SKOPP, G., PÖTSCH, L. & MOELLER, M.R. 1997. On cosmetically treated hair-aspects and pitfalls of interpretation. *Forensic Sci. Int.* **84**: 43-52.

27. BAUMGARTNER, W.A., HILL, V.A. & BLAHD, W. H. 1989. Hair analysis for drugs of abuse. *J. Forensic Sci. Int.* **34**: 1433-1453.

28. CONE, E.J. 1990. Testing human hair for drugs of abuse. I. Individual dose and time profiles of morphine and codeine in plasma, saliva, urine, and beard compared to drug-induced effects on pupils and behavior. *J. Anal. Toxicol.* **14**: 1-7.

29. GWENT, S.H., WILSON, J.F., TSANACLIS, L.M. & WICKS, J.F.C. 1995. Time course of appearance of cotinine in human beard hair after a single dose of nicotine. *Ther. Drug Monit.* **17**: 195-198.

30. CHIAROTTI, M. 1993. Overview of extraction methods. *Forensic Sci. Int.* **63**: 161-170.

31. CIRIMELE, V., KINTZ, P. & MANGIN, P. 1995. Comparison of different extraction procedures for drugs in hair of drug addicts. In: *Hair testing for drugs of abuse. International research on standards and technology.* National Institute on Drug Abuse, Rockville, MD. (NIDA Research Monograph, NIH Publication, no. 95-3727). p. 277-288.

32. SACHS, H. & MOELLER, M.R. 1995. Quantitative results of drugs in hair using different extraction methods. In: *Hair testing for drugs of abuse. International research on standards and technology.* National Institute on Drug Abuse, Rockville, MD. (NIDA Research Monograph, NIH Publication no. 95-3727). p. 196-211.

33. POLETTINI, A.C., STRAMESI, C., VIGNALI, M. & MONTAGNA, M. 1997. Determination of opiates in hair. Effects of extraction methods on recovery and stability of analytes. *Forensic Sci. Int.* **84**: 259-269.

34. ROTHE, M. & PRAGST, F. 1995. Solvent optimization for the direct extraction of opiates from hair samples. *J. Anal. Toxicol.* **19**: 236-40.

35. PICHINI, S., ALTIERI, I., PELLEGRINI, M., PACIFICI, R. & ZUCCARO, P. 1997. The analysis of nicotine and cotinine: evaluation of extraction procedures, hair treatments, and development of reference material. *Forensic Sci. Int.* **84**: 243-252.

36. EDDER, P., STAUB, C., VEUTHEY, J.L., PIERROZ, I. & HAERDI, W. 1994. Subcritical fluid extraction of opiates in hair of drug addicts. *J. Chromatogr. B* **658**: 75-86.

37. STAUB, C. 1997. Supercritical fluid extraction and hair analysis: the situation in 1996. *Forensic Sci. Int.* 84: 295-304.

38. CASSANI, M. & SPIEHLER, V. 1993. Analytical requirements, perspectives and limits of immunological methods for drugs in hair. *Forensic Sci. Int.* **63**: 175-184.

39. SEGURA, J. 1995. Possibilities of ELISA methodologies for hair analysis. In: *Hair analysis in forensic toxicology. Proceedings of the 1995 International Conference and Workshop*. Abu Dhabi, Arab Emirates, November 19-23, 1995. R.A. de Zeeuw, I. Al Hosani, S. Al Munthiri & A. Maqbool (Eds). p. 351-369.

40. SEGURA, J., STRAMESI, C., REDÓN, VENTURA, M., SANCHEZ, C. J., GONZÁLEZ, G., SAN, L. & MONTAGNA, M. 1999. Immunological screening of drugs of abuse and gas-chromatographic-mass spectrometric confirmation of opiates and cocaine in hair. *J. Chromatogr. B* **724**: 9-21.

41. PICHINI, S., ALTIERI, I., PELLEGRINI, M., PACIFICI, R. & ZUCCARO, P. 1999. Analysis of opiates in human hair by high-performance liquid chromatography. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* **22**: 873-884.

42. PÉPIN, G. & GAILLARD, Y. 1997. Concordance between self-reported drug use and findings in hair about cocaine and heroin. *Forensic Sci. Int.* **84**: 37-41.

43. SEGURA, J. 1991. Doping in sport: old and new aspects of a worrying problem. *J. Forensic Sci. Soc.* **31**: 229-230.

44. SEGURA, J. 1996. Doping control in sports medicine. *Ther. Drug Monit.* **18**: 471-476.

45. POLETTINI, A., SEGURA, J., GONZALEZ, G., DE LA TORRE, X. & MONTAGNA, M. 1995. Clenbuterol and beta-adrenergic drugs detected in hair of treated animals by ELISA. *Clin. Chem.* **41**: 945-946.

46. POLETTINI, A., MONTAGNA, M., SEGURA, J. & DE LA TORRE, X. 1996. Determination of beta-2-agonists in hair by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **31**: 47-54.

47. THIEME, D., GROSSE, J., SACHS, H. & MUELLER, R.K. 1998. Detection of several anabolic steroids of abuse in human hair. In: *Recent advances in doping analysis*. W. Schänzer, H. Geyer & A. Gotzmann (Eds). Mareck-Engelke. p. 9-29.

Ann. Ist. Super. Sanità, vol. 36, n. 1 (2000), p. 29-40

Alcol, droga, farmaci e sicurezza stradale

Santo Davide FERRARA, Silvano ZANCANER, Giampietro FRISON, Raffaele GIORGETTI, Rossella SNENGHI, Sergio MAIETTI, Franca CASTAGNA, Franco TAGLIARO e Luciano TEDESCHI

Servizio di Tossicologia Forense e Antidoping, Azienda Ospedaliera e Università degli Studi, Padova

Riassunto. - Al fine di studiare l'incidenza del fenomeno "guida sotto l'influenza di alcol e stupefacenti" nella regione Veneto è stato svolto un servizio di accertamenti tossicologico-forensi su conducenti di autoveicoli nelle notti tra venerdì e sabato e tra sabato e domenica a partire dal 1994. Si è proceduto ad uno screening clinico rapido su 7952 conducenti, 1399 dei quali sono stati sottoposti ad un accertamento tossicologico-forense completo, comprensivo di: a) anamnesi generale e mirata; b) esame obiettivo mirato al rilievo di segni di assunzione recente di sostanze psicoattive, di astinenza o di patologie droga-correlate; c) prelievo in doppio (per analisi ed eventuali controanalisi) di campioni di sangue e di urina; d) analisi chimico-tossicologiche impiegando tecniche immunochimiche e cromatografiche. Il 56,7% dei conducenti esaminati aveva una alcolemia rilevabile; il 30,4% si trovava in stato di ebbrezza da alcol (alcolemia > 80 mg/100ml); il 15,7% dei conducenti esaminati si trovava alla guida in stato di intossicazione da stupefacenti; le sostanze psicoattive rilevate con maggior frequenza sono, in ordine decrescente, cannabinoidi, stimolanti (cocaina ed amfetamine), oppiacei.

Parole chiave: alcol, sostanze psicoattive, sicurezza stradale, conducenti.

Summary *(Alcohol, drugs and traffic safety).* - Deaths due to road accidents during weekends have become a worrying phenomenon in Italy. With the aim of highlighting the role of psychotropic substances (alcohol, drugs of abuse) in causing road accidents, a survey based on clinical and chemico-toxicological analyses has been carried out on car drivers in the Veneto region during night weekends since 1994. Rapid clinical screening was carried out on 7952 drivers. 1399 of these, suspected to be under the influence of psychotropic substances, were subjected to complete clinical and toxicological ascertainment involving the following procedures: a) anamnesis, aiming at evidence of possible current or past use of psychotropic substances; b) objective clinical examination, aiming at finding evidence of recent (signs of acute or chronic intoxication) or past use (signs of withdrawal or associated organic pathologies) of psychotropic substances; c) double sampling of blood and urine and chemico-toxicological analysis using immunochemical, GC-HS and GC/MS-SIM techniques. As well as many data of social and behavioural interest, processing of results demonstrated that: a) 56.7% of the drivers examined had consumed alcoholic beverages; b) 30.4% had BACs higher than the threshold permitted in Italy (80 mg/100 ml); c) 15.7% of drivers were found to be under the influence of drugs of abuse or psychoactive drugs; d) the most frequently found substances were (in order): cannabinoids, stimulants (cocaine, amphetamines), opiates.

Key words: alcohol, psychoactive substances, traffic safety, drivers.

Introduzione

Gli incidenti stradali sono causa importante di morbidità e di problemi sociali in tutto il mondo.

L'entità e la gravità epidemica del fenomeno sono testimoniate dai rilevanti costi economici annui (450 miliardi di dollari nel mondo; 70 miliardi di ECU in Europa; 10 miliardi di ECU in Italia). Si tratta del valore economico del singolo soggetto, delle risorse professionali perdute, dei costi di ospedalizzazione, ai quali si aggiungono i danni materiali ai veicoli e alle cose, la perdita di produttività, i costi di giustizia e quelli derivanti dai crescenti oneri di assicurazione.

L'insufficienza di contrasto e di controllo, esercitata dalla vigente normativa sul complesso delle variabili fin qui esposte, è ancora più rilevante nei confronti dell'influenza comportamentale esercitata dall'abuso epidemico di farmaci, alcol e droghe.

Il crescente innalzamento dell'età media della popolazione, la conseguente diffusione delle patologie croniche, il correlato ampio consumo di farmaci ad effetto psicoattivo e disabilitante, contribuiscono a moltiplicare i fattori di rischio e a suscitare "neo-interazioni farmacotossicologiche" capaci di gravi conseguenze comportamentali.

Il presente lavoro intende trattare brevemente il ruolo svolto dai farmaci e dalle sostanze psicoattive nella genesi della disabilità e degli incidenti stradali e fornire i presupposti, i criteri, i metodi applicativi ed i risultati della campagna di prevenzione in corso

di realizzazione nel Veneto dal 1994, con la collaborazione dell'Assessorato Regionale alla Sanità, della Croce Rossa Italiana, del Compartimento della Polizia Stradale del Veneto e dell'Istituto di Medicina Legale dell'Università di Verona.

Studi psicofarmacologici di "interazione uomo-macchina"

L'espressione "interazione uomo-macchina" si riferisce al complesso di azioni e abilità richieste nella conduzione di veicoli a motore e di macchinari complessi, come quelli industriali. L'alcol, le droghe ed i farmaci possono influire sulle funzioni psicosensoriali alla base di tali abilità.

Risultati sperimentali concordanti dimostrano che:

- l'alcol, le droghe e taluni farmaci compromettono in modo rilevante la performance in specifiche azioni correlate alla guida;
- esistono ampie differenze tra gli effetti di diversi farmaci appartenenti alla stessa classe terapeutica;
- gli operatori sanitari (medici, autorità sanitarie ecc.) e gli utenti della strada sono per lo più ignari di questi effetti e di queste differenze.

Allo scopo di verificare lo stato delle conoscenze sperimentali è stata esaminata la letteratura internazionale pubblicata nell'ultimo decennio, utilizzando ricerche computerizzate nelle più vaste banche di dati, articoli di revisione comparsi su riviste specializzate, atti di convegni internazionali [1].

In particolare, sono stati considerati 381 studi sperimentali su 198 sostanze, appartenenti alle classi farmacologiche indicate in Tab. 1.

I dati di ogni lavoro sono stati estrapolati e caricati su un database, distinguendo: sostanza investigata; classe farmacologica; dose impiegata; effetti del farmaco sulla performance psicomotoria nelle categorie *test di guida reale* (RDT: *real driving test*), *simulatore di guida* (DS: *driving simulator*) e *test di laboratorio* (LT: *laboratory test*).

Nell'ambito dei LT, sono state distinte le seguenti funzioni neuropsichiche: test di attenzione; test di ondeggiamento del corpo; test cognitivi; test di fusione della luce intermittente; tempi di reazione a stimoli diversi; test di coordinazione sensomotoria; test di vigilanza; test visivi.

La valutazione degli effetti di ogni dose impiegata per ogni farmaco, dedotta dalla significatività statistica rispetto al placebo, ha condotto ad una delle seguenti conclusioni:

- il farmaco produce una compromissione delle funzioni esplorate: "disabilità";
- il farmaco produce una variazione positiva delle funzioni esplorate: "miglioramento";
- il farmaco non produce effetti sulle funzioni esplorate: "nessun effetto".

Tabella 1. - Classi farmacologiche indagate in studi sperimentali

Classi farmacologiche	
Anestetici	Benzodiazepine
Antibiotici	Beta bloccanti
Anticolinergici	Cannabinoidi
Anticolinesterasici	FANS
Anticonvulsanti	Ipnotici
Antidepressivi	Narcotici
Antiemetici	Neurolettici
Antistaminici	Ormoni
Antipertensivi	Psicostimolanti
Barbiturici	Tranquillanti

Sono stati valutati gli effetti dei farmaci in test di guida reale, al simulatore di guida e su test di laboratorio, quantificando quindi il numero dei risultati classificati come disabilità, miglioramento o nessun effetto.

Gli effetti delle singole sostanze sulla performance psicomotoria sono stati quindi indagati, valutandoli in termini di disabilità, miglioramento o nessun effetto. Ogni sostanza è stata assegnata ad una delle succitate categorie se il 70% dei risultati dei test forniva risultati concordanti. In caso contrario, la sostanza è stata posta nella categoria "risultati non conclusivi". In accordo con questo criterio sono state identificate le sostanze che producono disabilità (Tab. 2). In tale tabella non sono riportate le droghe (cocaina, eroina, amfetamine, cannabinoidi, allucinogeni, solventi), per le quali l'effetto disabilitante è riconosciuto da tempo.

In conclusione, sussiste un generale consenso sulla capacità di produrre disabilità alla guida per le seguenti classi di sostanze: allucinogeni, cannabinoidi, narcotici, solventi.

Per altre classi di sostanze, inclusa la quasi totalità di quelle esaminate nel presente studio, l'introduzione di nuove molecole caratterizzate da maggiore efficacia terapeutica ed effetti collaterali marginali, non consente di esprimere un giudizio definitivo sull'effetto di disabilità alla guida. Per tali classi farmacologiche è idoneo un oculato impiego delle sole molecole dotate di vantaggioso rapporto rischio/beneficio.

Interazione alcol-farmaci

Effetti collaterali insoliti si possono produrre quando l'alcol viene assunto in associazione con altri farmaci.

Per esempio, dopo l'ingestione di alcol, i pazienti trattati con ipoglicemizzanti orali possono presentare sintomi sgradevoli simili a quelli sofferti dai pazienti che assumono disulfiram. Interazioni del genere si possono produrre con il metronidazolo o con le cefalosporine.

Tabella 2. - Farmaci che provocano disabilità

Benzodiazepine	Narcotici	Antidepressivi	Antistaminici	Neurolettici	Miscellanea
Adinazolam	Alfentanil	Amitriptilina	Cinnarizina	Clorpromazina	Atropina
Diazepam	Buprenorfina	Doxepina	Clorfeniramina	Olanzapina	Ioimbina
Flunitrazepam	Butorfanolo	Imipramina	Clemastina	Tioridazina	Ioscina
Lorazepam	Codeina	Mianserina	Difenidramina		Ketamina
Midazolam	Destropropossifene	Trazodone	Triprolidina		Penbutololo
N-desmetiladinazolam	Fentanile				Propofol
Nitrazepam	Morfina				Scopolamina
Oxazepam	Nalbufina				Tiopentale
Quazepam	Ossicodone				Zolpidem
Temazepam	Pentazocina				Zopiclone
Triazolam					

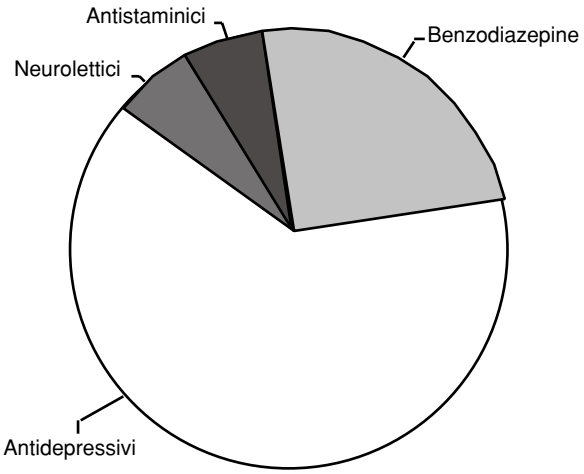


Fig. 1 . - Classi farmacologiche che dimostrano un incremento dell'effetto disabilitante con l'alcol.

L'associazione di alcol e di un ipoglicemizzante orale può anche provocare fluttuazioni imprevedibili delle concentrazioni plasmatiche del glucosio, a causa di un effetto ipoglicemizzante additivo dell'alcol.

Nelle Fig. 1 e 2 è riportata la distribuzione per classi farmacologiche degli effetti additivi e moltiplicativi con alcol. Si nota una rappresentazione elevata degli antidepressivi e delle benzodiazepine, tra i farmaci che producono potenziamento, e degli antistaminici, tra quelli che determinano effetti additivi con alcol.

La lettura critica delle risultanze degli studi sperimentali denota la necessità di ulteriori approfondimenti e verifiche.

Innanzitutto, è opportuna una verifica degli effetti dei farmaci e delle droghe i cui risultati non sono univoci nei test di laboratorio, mediante l'impiego di test di guida reale e del simulatore di guida.

Per quanto concerne gli studi di interazione tra farmaci, droghe ed alcol, si impongono osservazioni sperimentali sui trattamenti concretamente disposti dai sanitari, che conducano alla evidenziazione degli effetti combinati delle sostanze e dei meccanismi dinamico-cinetici che li sottendono. La corretta conduzione metodologica dei trial ed una adeguata valutazione statistica possono delineare con precisione le associazioni che comportano un rischio per la sicurezza della guida.

In virtù della convergenza dei risultati di psico-farmacologia sperimentale, gli allucinogeni, i cannabinoidi, i narcotici e i solventi compromettono l'abilità di guida.

Tra gli anticolinergici, gli antidepressivi, i barbiturici, le benzodiazepine, gli ipnotici ed i neurolettici sono presenti farmaci in grado di determinare disabilità e farmaci per i quali le conclusioni non sono definitive.

Fra gli ansiolitici e gli antistaminici, coesistono farmaci che determinano disabilità ed altri, di più recente sintesi, privi di effetti sull'abilità di guida.

Gli psicostimolanti (amfetamine e cocaina) modificano la percezione del rischio da parte del conducente (*risk taking*) inducendo l'incapacità di valutare i rischi connessi con il proprio comportamento; ne consegue che il conducente presenta alterazioni comportamentali estremamente pericolose per la sicurezza di guida.

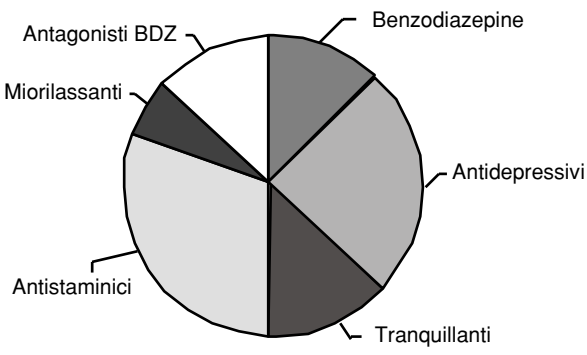


Fig. 2. - Classi farmacologiche che dimostrano un effetto additivo con l'alcol.

Infine, nella valutazione degli effetti di disabilità prodotti dai farmaci nello specifico caso clinico, deve essere riservata particolare attenzione al rapporto rischio/beneficio tra farmacoterapia e sindrome patologica da trattare.

Studi di epidemiologia

La ricerca epidemiologica supporta le risultanze degli studi sperimentali esaminando la prevalenza di alcol, farmaci e droghe in diverse popolazioni di utenti della strada.

I principali aspetti della ricerca epidemiologica riguardano:

a) la natura e l'entità del ruolo svolto dalle suddette sostanze nella genesi degli incidenti stradali;

b) la determinazione delle diversità qualitative tra gli incidenti alcol- e farmaco/droga-correlati rispetto ad altri tipi di incidenti;

c) le cause dell'aumento del rischio in determinate sottopopolazioni;

d) l'impiego dei dati ottenuti ai fini della elaborazione di programmi di prevenzione.

Le rilevazioni epidemiologiche sono utili a definire la situazione locale, valutare l'efficacia delle contromisure e dei programmi di prevenzione adottati.

In letteratura sono riportati studi su: conducenti, come popolazione a rischio; conducenti e pedoni deceduti; conducenti e pedoni feriti.

A titolo esemplificativo, le Fig. 3 e 4 mostrano le percentuali di positività per alcune sostanze in studi condotti su conducenti e pedoni deceduti in diversi contesti nazionali [2-15].

Solo pochi autori esprimono un giudizio sul ruolo causale o concausale svolto dalle sostanze nel determinismo dei sinistri. In maggioranza, gli autori ritengono possibile o probabile il ruolo svolto dalle sostanze identificate e non escludono mai una relazione causale fra la sostanza e il sinistro.

Gli studi effettuati su cadavere e su feriti confermano che i farmaci ipnotici e sedativi raddoppiano il rischio di incidente stradale; dati non conclusivi sono disponibili per i tranquillanti, i cui consumatori sono di per sé a maggior rischio di incidente.

Il fenomeno della disabilità alla guida indotta da anestetici è rilevante solo in pazienti anestetizzati in regime ambulatoriale.

Dagli studi epidemiologici potrebbe dedursi che i consumatori di oppiacei non presentino un elevato rischio di incidenti stradali. Tuttavia, la variabilità metodologica degli studi condotti suggerisce prudenza nel trarre conclusioni generali e consiglia lo svolgimento di ulteriori studi.

La mancanza di studi epidemiologici sistematici ed esaurienti non permette alcuna valutazione sugli allucinogeni, i cui effetti di disabilità alla guida sono dimostrati dagli studi di interazione uomo-macchina.

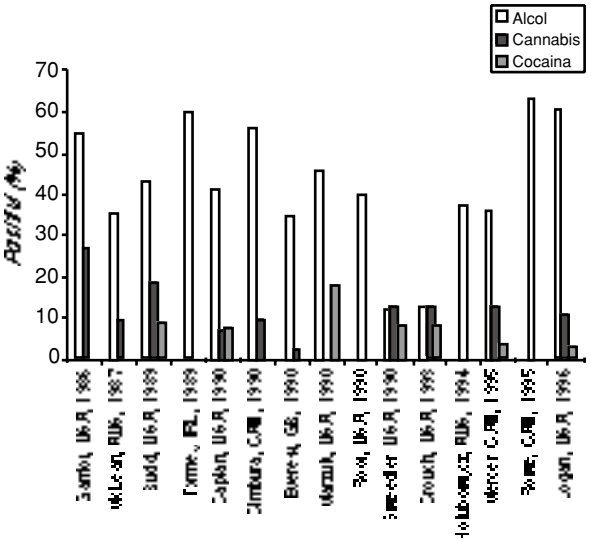


Fig. 3. - Conducenti e pedoni deceduti. Distribuzione delle sostanze nei liquidi biologici.

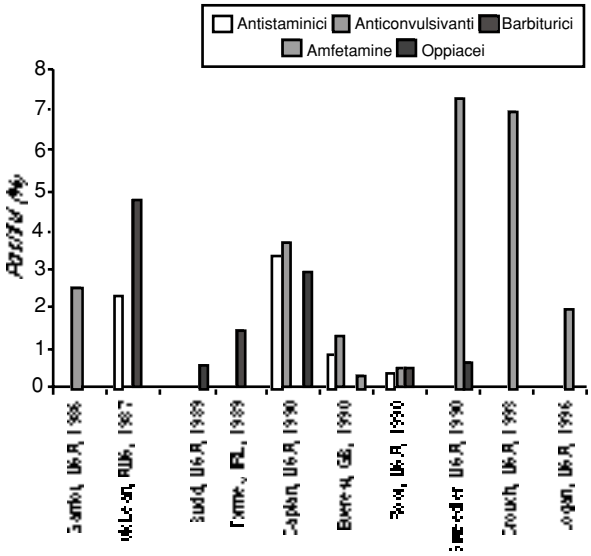


Fig. 4. - Conducenti e pedoni deceduti. Distribuzione delle sostanze nei liquidi biologici.

Studi europei e nordamericani dimostrano una significativa incidenza di consumatori di cannabis tra le vittime o i feriti di sinistri stradali. La difficoltà di valutazione dei gruppi di popolazione di controllo resta l'ostacolo più rilevante alla incontrovertibile dimostrazione del ruolo svolto dai cannabinoidi nella genesi degli incidenti.

Malgrado la loro bassa incidenza (2-3%) gli antistaminici meritano una particolare attenzione per il loro accertato effetto sedativo, sinergico con altre sostanze psicotrope.

Considerazioni simili possono trarsi per gli ormoni e i farmaci cardiovascolari (3-5% di prevalenza).

I solventi (benzene, acetato di etile e simili) meritano attenzione, in quanto oggetto di sporadico consumo voluttuario per inalazione e per il loro accertato effetto di disabilità alla guida.

Un contributo minimale alla sinistrosità può essere infine attribuito ai bassi livelli di monossido di carbonio prodotti dal fumo di tabacco in ambiente confinato ed in attualità di guida dei veicoli.

Riferimenti legislativi e applicativi

Le disposizioni normative contenute nel codice della strada (DL.vo 285/92 e successive modifiche) e nel correlato regolamento di attuazione DPR n. 495/1992) prevedono la contestazione su strada da parte degli operatori di polizia giudiziaria del reato di guida in stato d'intossicazione da alcol, stupefacenti e sostanze psicotrope (art.186-187).

L'analisi della normativa di merito, di seguito esposta, vuole richiamare l'esigenza di un profilo di linee guida comportamentali, utili per lo svolgimento degli accertamenti giudiziari su titolari di patente di guida, circolanti su strada.

L'effettuazione dei controlli tossicologico-forensi su conducenti di veicoli, previsti dagli art. 186 e 187 del codice della strada, pone complesse problematiche giuridiche, medico-legali e tossicologico-forensi in ordine alla liceità degli stessi, alla procedura giudiziaria e tossicologico-forense di esecuzione, ai doveri del medico e dell'intera struttura sanitaria chiamati a svolgere gli accertamenti.

La contestazione della condotta illecita da parte degli operatori di polizia giudiziaria avviene in accordo alle procedure previste dallo stesso codice, diversificate nei casi di ebbrezza da alcol (art. 186) rispetto alle sostanze stupefacenti e psicotrope (art. 187). La procedura è attivata, a discrezione degli organi di polizia giudiziaria, in caso di incidente o quando si abbia motivo di ritenere che il conducente del veicolo si trovi in uno stato di alterazione psicofisica derivante dall'uso di alcol, stupefacenti e sostanze psicotrope.

Le operazioni di contestazione del reato di guida in stato di ebbrezza da alcol avvengono attraverso le procedure e gli strumenti previsti nell'art. 379 del DPR n. 495 del 16/12/1992, recante il regolamento di esecuzione e di attuazione del codice della strada. L'accertamento dello stato di intossicazione avviene attraverso l'analisi dell'aria alveolare espirata, tramite etilometro. Il conducente è considerato in stato di ebbrezza alcolica quando la concentrazione alcolemica, corrisponde o supera gli 0,8 g/l, risultando la stessa da due determinazioni concordanti, effettuate ad un intervallo di tempo di 5 minuti.

Il contenzioso sollevato dall'applicazione di questo articolo è confluito nella produzione di sentenze di terzo grado con la definizione dei seguenti orientamenti di Cassazione: l'analisi alcolimetrica è considerata a tutti gli effetti indagine di polizia giudiziaria, urgente ed indifferibile, stante la naturale modificabilità del dato che costituisce elemento probatorio di reato; la convalida dell'atto urgente avviene successivamente e correlatamente all'obbligo per la polizia giudiziaria di informare l'autorità giudiziaria, tramite verbale entro quarantotto ore dal rilevamento del dato. Altro aspetto significativo riguarda il valore facoltativo dell'indagine etilometrica che può essere sostituita per motivate ragioni da rilevamenti diretti della polizia giudiziaria (es. alitosi etilica, eloquio sconnesso, deambulazione alterata); analogamente, può essere assunto come prova ogni altro elemento circostanziale emergente nel processo penale (es. dati clinico-documentali).

L'accertamento del reato di guida sotto l'influenza da sostanze stupefacenti o psicotrope avviene tramite "l'eventuale immediato accompagnamento del conducente", per il prelievo di campioni di liquidi biologici, presso le strutture pubbliche di cui all'art. 2, comma 1, lettera b) del DM n. 186 del 12/7/90, recante il "Regolamento concernente la determinazione delle procedure diagnostiche e medico-legali per accertare l'uso abituale di sostanze stupefacenti o psicotrope...". In accordo a quanto previsto dal decreto tali strutture devono essere "... adeguatamente attrezzate in condizioni di sicurezza clinica"; nell'espletamento delle procedure diagnostiche deve essere escluso il " ... ricorso a metodiche invasive". Per l'accertamento dello stato di intossicazione da stupefacenti e sostanze psicotrope devono essere seguite le modalità stabilite con decreto (tutt'oggi in attesa di emanazione!) del Ministro della Sanità di concerto con i Ministri dell'Interno e dei Lavori Pubblici.

La legittimità costituzionale dell'effettuazione di accertamenti tossicologico-forensi su conducenti di autoveicoli, su disposizione della polizia giudiziaria trova eccezionale fondamento negli stessi dettati normativi degli articoli 186 e 187 del codice della strada, purché risultino tassativamente seguite le modalità di accertamento previste dal legislatore. L'accertamento degli stati di ebbrezza da stupefacenti e sostanze psicotrope, è effettuato su richiesta della polizia giudiziaria, presso le strutture pubbliche ex art. 2 del DM 186/90, secondo le modalità previste dal decreto ministeriale; la mancata emanazione potrebbe tradursi a tutt'oggi nella non obbligatorietà del conducente di sottoporsi ad accertamenti disposti dalla polizia giudiziaria.

Allo stato attuale della norma, il prelievo ematico coercitivo a scopo giudiziario è considerato un atto invasivo e quindi illecito, rispetto alla semplice visita o ispezione che il magistrato può ordinare ai fini di giustizia.

La legittimità dei controlli tossicologici forensi su conducenti (ex art. 186 e 187) può derivare quindi solo dall'espressione da parte del soggetto interessato di

consenso valido alla effettuazione di esame clinico o di prelievo di campioni biologici per l'esecuzione di indagini di laboratorio. Tale situazione potrebbe scaturire anche dalla richiesta personale del conducente sospettato del compimento dell'illecito, posto che in ogni ambito di accertamento giudiziario, rimane al soggetto indagato la possibilità di dimostrare la mancata violazione della norma.

Relativamente alle modalità d'informativa sugli esiti dell'accertamento sanitario, si ricorda che la facoltà di rilasciare copia delle cartelle cliniche ed ogni altra certificazione sanitaria riguardante i cittadini assistiti dalla struttura ospedaliera è propria della direzione sanitaria. Nel caso di reato perseguibile d'ufficio (ad es. guida in stato di ebbrezza da alcol, stupefacenti e sostanze psicotrope, ex art. 186-187 del codice della strada) l'autorità giudiziaria diventa legittima destinataria della notizia di reato (art. 331 del CPP). In tale ambito ogni ufficiale di polizia giudiziaria rappresenta il legittimo tramite per l'inoltro della denuncia. La direzione sanitaria - e non il singolo sanitario - potrà pertanto consegnare i risultati di tali accertamenti direttamente alla polizia giudiziaria. Nell'ambito degli obblighi di informativa del medico "incaricato di pubblico servizio", il sanitario dipendente di servizio pubblico ha l'obbligo di denunciare all'autorità giudiziaria (o ad altra autorità che abbia l'obbligo di riferire alla autorità giudiziaria) i reati perseguibili di ufficio, dei quali abbia avuto notizia nell'esercizio o a causa delle sue stesse funzioni di servizio (art. 362 del codice penale). In tale contesto normativo, la guida in stato di ebbrezza da sostanze psicoattive, costituisce reato perseguibile di ufficio e quindi oggetto di obbligatoria denuncia all'autorità giudiziaria (e/o alla polizia giudiziaria eventualmente richiedente, in quanto a sua volta soggetto di invio di obbligatoria denuncia). Nel caso specifico, l'autorità giudiziaria competente è rappresentata dalla Procura della Repubblica presso il Tribunale. Tale dovere può essere adempito tramite l'immediata comunicazione alla direzione sanitaria, la quale nella sua veste di responsabile della custodia della documentazione sanitaria, dovrà presentare denuncia nei casi di intossicazione da sostanze psicoattive emergenti nel corso dell'espletamento delle attività diagnostico-cliniche che configurino l'ipotesi di reato perseguibile di ufficio.

Per concludere, l'analisi dell'attuale impianto normativo del codice della strada rivela le ragioni dell'ambiguità e disomogeneità che caratterizzano la realtà territoriale nazionale relativamente alla prevenzione dei reati di guida in stato d'intossicazione da alcol, droghe o sostanze psicotrope.

L'ipergarantismo del codice stradale contrappone l'Italia agli altri paesi europei, più coerenti nel perseguire modelli istituzionali di ricerca della sicurezza sociale.

Ancor prima di un'eventuale introduzione dell'inevaso regolamento applicativo, risulta inderogabile una radicale ed innovativa revisione dell'attuale assetto normativo, fondata sulla adozione di una criteriologia di accertamento, uniforme ed affidabile, per la contestazione degli illeciti previsti dall'art. 186 e 187.

A prescindere dall'evidente necessità di tutela della salute della collettività, va sottolineata l'ingenuità dell'ideologia garantista che sostiene l'attuale assetto normativo, fondato sull'utilizzo di indagini di valenza presuntiva (analisi etilometrica e screening chimico-tossicologici su urina) e quindi di limitata affidabilità probatoria. La mancata adozione di procedure idonee, relative alla tipologia del campione biologico, alla metodica analitica, alla garanzia della catena di custodia ed alla certificazione di qualità dei laboratori implicati, incide sui diritti individuali in misura più grave rispetto alla presunta invasività di un campionamento ematico. L'ottimizzazione procedurale dei controlli tossicologico-forensi su conducenti è quindi un obiettivo da perseguire, insieme ad un integrato sviluppo di una rete di programmi istituzionali di trattamento che consenta di trasformare la sanzione penale ad amministrativa nell'incentivazione motivazionale alla riabilitazione. In tal senso sarebbe opportuno creare una rete d'intervento integrato, coinvolgente le strutture di trattamento e le strutture deputate a vario titolo nell'attuazione dei controlli giudiziari ed amministrativi.

Servizio di prevenzione degli incidenti stradali nella regione Veneto

L'incidenza e la prevalenza di alcol e sostanze psicoattive nella popolazione dei conducenti *non* coinvolti in incidenti stradali non sono mai state indagate in Italia.

La situazione di allarme sociale scatenata dall'elevato numero di giovani deceduti in sinistri stradali nei fine settimana (decessi noti come "stragi del sabato sera") ha indotto il Servizio di Tossicologia Forense e Antidoping (STFA) dell'Azienda Ospedaliera di Padova ad attivare una campagna regionale di controlli sanitari tossicologico-forensi, di concerto con il Compartimento della polizia stradale della regione Veneto, con la Croce Rossa Italiana e con l'Istituto di Medicina Legale dell'Università di Verona [17-19].

La campagna regionale si è proposta di:

a) rilevare la prevalenza del fenomeno "guida sotto l'influenza di alcol e sostanze psicoattive" nella regione Veneto;

b) istituire un servizio permanente con finalità di prevenzione del fenomeno;

c) collaborare alla repressione dei comportamenti a rischio, sanzionati dal codice della strada;

d) elaborare procedure tecniche di accertamento clinico e chimico-analitico per la diagnosi degli stati di intossicazione.

Materiali e metodi

La campagna di accertamenti tossicologico-forensi si è svolta in due distinte sessioni:

- la prima, dalle ore 01:00 alle 07:00 delle notti tra sabato e domenica dei mesi di giugno, luglio, agosto, dicembre 1994 e di gennaio, agosto, settembre e dicembre 1995;
- la seconda, tuttora in corso, dalle ore 01:00 alle 07:00 delle notti tra venerdì e sabato e tra sabato e domenica a partire dal luglio 1997.

Il servizio è svolto in costante collaborazione con personale di pattuglia del Compartimento della polizia stradale del Veneto e con volontari della Croce Rossa Italiana.

Mezzi e personale

Ciascuna delle équipe sanitarie è formata da 1 medico legale esperto in accertamenti di idoneità alla guida in ambito tossicologico-forense e 3 volontari della Croce Rossa Italiana. Il personale sanitario opera all'interno di una autoambulanza/camper della Croce Rossa Italiana, attrezzata con strumentazione per rianimazione, ambulatorio mobile, toilette chimica.

Le pattuglie della polizia stradale sono dotate di autovelox ed etilometro. In ciascun fine settimana hanno operato da 2 a 7 équipes sanitarie.

Procedura

Ciascun accertamento tossicologico-forense è preceduto da una fase preliminare, a cura della polizia stradale, volta alla:

- identificazione del conducente;
- valutazione delle sue condizioni psicofisiche ai sensi degli art. 186 e 187 del codice della strada;
- eventuale analisi dell'aria espirata mediante etilometro;
- richiesta di consenso all'accertamento.

Nei casi di sospetto di guida sotto l'influenza di alcol e sostanze psicoattive il conducente è accompagnato a cura degli agenti di polizia presso l'ambulanza/camper attrezzata della Croce Rossa per essere sottoposto ad accertamento clinico e tossicologico-forense. La fase di accertamento clinico e tossicologico-forense prevede:

- l'informazione testimoniata sulle finalità e modalità dell'accertamento;
- la richiesta di consenso all'accertamento clinico e all'eventuale prelievo di liquidi biologici;
- la certificazione dell'eventuale rifiuto dell'accertamento clinico e la segnalazione alla polizia stradale;
- uno "screening clinico rapido" di semeiotica tossicologica (oculare e neurologica).

In caso di sospetto "clinico" di pregressa assunzione di sostanze psicoattive si procede ad accertamento clinico specialistico completo, mediante l'applicazione di un protocollo standardizzato, comprensivo di:

- raccolta anamnestica;
- esame obiettivo, mirato ad evidenziare segni riconducibili a consumo recente o pregresso di sostanze psicoattive, intossicazione, astinenza, patologie correlate al consumo delle stesse;
- analisi di screening su urina o saliva impiegando uno o più dispositivi monouso immunochimici per lo screening di classi di droghe d'abuso (Syva Rapid Test, Merck Triage);
- prelievo in doppio (per analisi ed eventuali controanalisi) di campioni di sangue ed urina;
- garanzia di catena di custodia mediante l'adozione di apposita modulistica per la registrazione delle fasi operative relative a ciascun campione biologico.

Identificazione, trasporto, conservazione dei campioni e verifica della catena di custodia

Nel corso delle operazioni di prelievo si compila l'apposito verbale di prelievo di campioni biologici che riporta elementi rilevanti per le successive indagini chimico-analitiche. Tra questi, la natura dei liquidi biologici, il livello alcolemico risultante dalle determinazioni effettuate dalla polizia stradale mediante etilometro, l'eventuale sintetica segnalazione della possibile classe di sostanze psicoattive coinvolta, in relazione all'accertamento anamnestico-clinico effettuato dal medico, le dichiarazioni del soggetto relative alla eventuale assunzione di farmaci.

I campioni di sangue ed urina prelevati in doppio sono identificati da una etichetta che riporta il nome e la firma del conducente, posti in due contenitori e sigillati dal medico esaminatore al termine dell'accertamento su strada. Il medico esaminatore provvede quindi a delegare il personale della polizia stradale alla trasmissione dei campioni al laboratorio entro 5 ore dal prelievo. Delle operazioni di trasporto e consegna al laboratorio viene redatto apposito verbale.

Il personale del laboratorio, esaminata la corretta compilazione del modulo "catena di custodia" e l'integrità dei sigilli, procede alla individuazione della scatola destinata all'analisi e alla controanalisi. La confezione sigillata destinata alla controanalisi viene conservata a - 20 °C per i successivi 4 mesi. Il contenitore destinato all'analisi, dopo la rimozione del sigillo, subisce alcune verifiche relative alla integrità dei campioni biologici, alla loro natura e alla esatta corrispondenza con i nominativi riportati sul verbale di prelievo. Al termine delle operazioni il personale provvede a compilare l'apposito quadro dello stampato "catena di custodia" dove viene indicato l'esito della verifica e, in caso di mancata corrispondenza con quanto registrato sul verbale di prelievo, la tipologia delle divergenze e i motivi che impediscono la prosecuzione dell'indagine.

Indagini chimico-tossicologiche

Le indagini chimico-tossicologiche vengono condotte sui campioni di sangue ed urina seguendo protocolli analitici differenziati [20] per le analisi di screening e conferma.

Le analisi di screening sono effettuate con tecnica immunochimica, estesa alle seguenti classi di sostanze: amfetamine, cannabinoidi, cocaina, metadone, oppiacei, etanolo. In particolare, le determinazioni immunochimiche su sangue sono ottenute mediante pretrattamento estrattivo del campione con dimetilformammide. Inoltre la ricerca di composti acidi, basici e neutri sui campioni di urina viene ottenuta mediante tecnica HPLC multicolonna automatizzato (REMEDi, BioRad).

Le analisi di conferma per le succitate classi di sostanze sono effettuate con tecnica GC-MS e GC-HS-FID [18, 19]. Il protocollo di analisi prevede l'allestimento, sia per il sangue che per l'urina, di un campione di controllo, di un campione *blank*, di uno standard a bassa concentrazione (ST1) e di uno a concentrazione 4 volte maggiore di ST1. I valori assoluti delle concentrazioni degli standard sono stabiliti in relazione alla classe di composti ed alla matrice biologica. Il dato quantitativo è ottenuto mediante analisi di regressione su tre punti. L'identificazione della sostanza con GC-MS è effettuata mediante calcolo dei rapporti relativi di tre risposte ioniche specifiche con tolleranza massima del 20%.

In particolare, gli specifici analiti determinati e/o identificabili per classi di sostanze sono:

amfetamine: amfetamina, fenilpropanolamina, metamfetamina, metilendiossiamfetamina (MDA), metilendiossimetilamfetamina (MDMA), metilendiossietilamfetamina (MDEA), N-metil-3,4-metilendiossifenil-2-butanamina (MBDB), standard interno metilendiossipropilamfetamina (MDPA);

cannabinoidi: Δ-9-tetraidrocannabinolo (Δ-9-THC), Δ-9-THC-acido carbossilico (Δ-9-THC-COOH), standard interni D_3-THC, D_3-THC-COOH;

cocaina: ecgonina metilestere, cocaina, cocaetilene, benzoilecgonina, standard interno D_3-benzoilecgonina;

metadone: 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (EDDP), metadone, standard interno benzexolo;

oppiacei: morfina, diidrocodeina, codeina, etilmorfina, acetilcodeina, 6-acetilmorfina, eroina, standard interno nalorfina;

etanolo: etanolo, standard interno n-propanolo.

Per l'etanolo è stato adottato un *cut-off* di 10 mg/100 ml.

Il trattamento del campione prevede l'uso della estrazione in fase solida (Bond Elut Certify, Varian) per amfetamine, cannabinoidi, cocaina, oppiacei, dell'estrazione liquido/liquido supportata (Extrelut 3, Merck) per metadone e il campionamento dello spazio di testa per etanolo. La separazione cromatografica è ottenuta con programmata di temperatura mediante colonna capillare HP Ultra 1 da 12 m e colonna impaccata 60/80 Carbopack B/ 5% Carbowax 20M da 1,8 m per etanolo. Le analisi del metadone e dell' etanolo avvengono senza derivatizzazione, mentre gli analiti delle classi amfetamine, cannabinoidi, cocaina, oppiacei sono analizzati come trimetilsililderivati.

Tabella 3. - Caratteristiche generali della popolazione esaminata

Caratteristiche	n.	%
Sesso		
Maschio	1331	95,14
Femmina	68	4,86
Stato civile		
Celibe/nubile	1215	87,54
Coniugato	137	9,87
Separato	33	2,38
Divorziato	3	0,21
Non rilevato	11	
Luogo di provenienza		
Discoteca	593	42,63
Altro locale pubblico	443	31,85
Abitazione	223	16,03
Altro	132	9,49
Non rilevato	8	
Occupazione		
Occupato	1231	88,31
Non occupato	76	5,45
Studente	83	5,95
Pensionato, altro	4	0,29
Non rilevata	5	
Età (anni)		
< 20	185	13,31
21-25	572	41,15
26-30	351	25,25
31-35	168	12,08
> 35	114	8,21
Non rilevata	9	
Scolarità		
Nessuna	2	0,15
Licenza elementare	51	3,71
Licenza media inferiore	649	47,16
Diploma professionale	361	26,24
Diploma media superiore	270	19,6
Diploma di laurea	43	3,12
Non rilevata	23	
Patente di guida		
A	6	0,43
B	1158	84,09
B	1158	84,09
C	104	7,55
D-E-F	97	7,04
Nessuna	12	
Non rilevata	22	

Epicrisi tossicologico-forense

Completate le indagini chimico-tossicologiche, per ciascun conducente si procede all'integrazione dei dati clinici e analitici, formulando un giudizio tossicologico-forense.

I risultati dell'accertamento sono quindi inoltrati alla polizia stradale per l'attivazione delle procedure amministrative e/o penali del caso.

Risultati

I risultati esposti si riferiscono agli accertamenti condotti dal giugno 1994 al luglio 1999.

Sono stati condotti screening clinici rapidi su 7952 conducenti. Per 1546 di essi è stato richiesto il consenso all'effettuazione di un accertamento tossicologico-forense completo; 88 soggetti, che non hanno accettato di fornire alcun campione biologico e 59 conducenti che hanno rifiutato di sottoporsi ad analisi dell'aria espirata e all'accertamento clinico, sono stati perseguiti, ai sensi degli art. 186 e 187 del nuovo codice della strada, per guida in stato di ebbrezza da alcol e sotto l'influenza di sostanze stupefacenti.

La Tab. 3 espone le caratteristiche della popolazione finale (n. 1399) sottoposta ad esame clinico completo e ad analisi chimico-tossicologiche di almeno uno dei due campioni biologici richiesti (1226 campioni di sangue, 1155 campioni di urina).

La Fig. 5 presenta le frequenze dei valori della concentrazione ematica di alcol (*blood alcohol concentration,* BAC) emersi dall'analisi dei 1226 campioni di sangue. La Fig. 6 mostra le frequenze dei conducenti in stato di ebbrezza da alcol e risultati positivi per sostanze psicoattive sul campione totale di 1399 conducenti. La Fig. 7 riporta la tipologia delle sostanze psicoattive rinvenute nei liquidi biologici. La Fig. 8 espone le frequenze della poliassunzione di sostanze psicoattive.

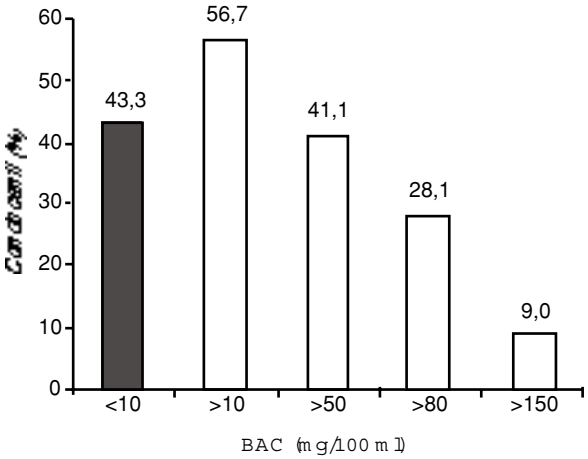


Fig. 5. - Alcol. Frequenza nella popolazione alla guida di veicoli. BAC: blood alcohol concentration. La prima colonna indica i negativi (grigio scuro); le altre indicano i positivi con differenti livelli di alcol nel sangue.

Discussione e conclusioni

La letteratura internazionale, comprensiva degli studi di psicofarmacologia e di epidemiologia, dimostra che l'alcol, le droghe ed alcune classi di farmaci producono disabilità alla guida ed un'elevata percentuale di incidenti stradali.

La campagna di prevenzione condotta nella regione Veneto ha evidenziato una elevata incidenza di conducenti alla guida in stato di ebbrezza da alcol o sotto l'influenza di droghe.

La situazione osservata nella regione Veneto è probabilmente estrapolabile a molte altre regioni aventi condizioni socioeconomiche sovrapponibili.

Nel nostro paese è pertanto confermato che il comportamento umano e la correlata assunzione di sostanze psicoattive (alcol e/o droghe) determina un elevato rischio di incidente stradale.

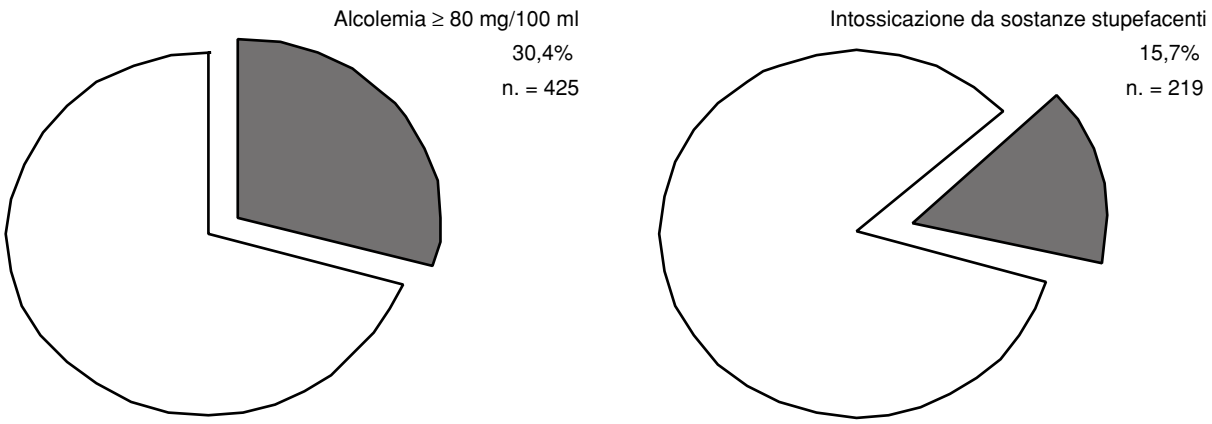


Fig. 6. - Intossicazione da alcol e droga. Frequenza nella popolazione alla guida di veicoli.

Il protocollo metodologico validato nella campagna di prevenzione possiede i requisiti di accuratezza, sicurezza di qualità e garanzia dei diritti individuali, indispensabili in un ambito che comporta sanzioni penali ed amministrative per il conducente contravventore.

In particolare, i risultati della campagna di prevenzione condotta nella regione Veneto si prestano alle seguenti considerazioni.

Alcol

Il 56,7% dei conducenti presentava una alcolemia rilevabile (Fig. 5), mentre il 30,4% si trovava in stato di ebbrezza da alcol (BAC > 80 mg/100 ml, Fig. 6). Inoltre, considerato che anche bassi livelli alcolemici (< 50 mg/100 ml) inducono disabilità alla guida [21, 22], circa il 40% dei conducenti esaminati si trovava in condizioni psicofisiche alterate.

In un numero notevole di conducenti (9,0%) è stata rilevata una concentrazione ematica di alcol etilico superiore a 150 mg/100 ml; si tratta di una concentrazione che si associa frequentemente ad uno stato di dipendenza da alcol, piuttosto che ad un consumo occasionale di quantità elevate di alcol etilico. In questi casi l'applicazione delle sanzioni previste dall'art. 186 risulta inefficace, in assenza di accertamenti di revisione dei requisiti psicofisici per la patente di guida; la mera sospensione della patente non impedisce che il conducente alcol-dipendente torni a guidare in tempi spesso brevi.

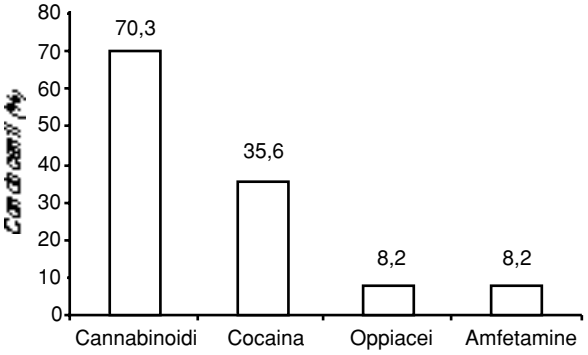


Fig. 7. - Droghe nei liquidi biologici. Frequenza nei conducenti intossicati.

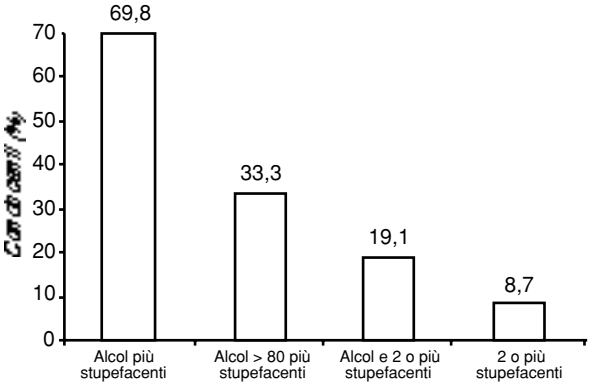


Fig. 8. - Alcol e droga. Frequenza di poliassunzione nei conducenti intossicati.

La valutazione comparata del complesso dei dati desunti dallo studio consente di stimare che circa *il 4-5% dei conducenti circolanti la notte dei fine settimana si trova in stato di ebbrezza alcolica*. La stima è stata condotta sulla base dei seguenti parametri: numero di conducenti fermati dalla polizia stradale con criterio random; numero di conducenti fermati dalla polizia stradale per violazioni di norme del codice della strada; numero di accertamenti clinici rapidi effettuati dal personale medico; numero di accertamenti tossicologico-forensi completi effettuati dal personale medico; percentuale di soggetti in stato di intossicazione da alcol e droghe nella popolazione sottoposta a prelievo di liquidi biologici.

La rilevante presenza di conducenti alla guida con livelli alcolemici elevati testimonia della carenza di efficaci provvedimenti di prevenzione, repressione e riabilitazione.

La normativa vigente non consente di identificare e riabilitare la popolazione "recidiva a rischio", fin qui trattata con le stesse modalità impiegate per un assuntore occasionale di alcol.

L'attuale impiego dell'etilometro è indaginoso, poco flessibile e di limitata affidabilità. L'effetto deterrente sulla popolazione a rischio può essere meglio ottenuto con metodiche rapide che consentano di effettuare migliaia di test/ora *(random breath test)*. L'identificazione dei conducenti positivi deve essere seguita dall'applicazione di indagini di secondo livello su campioni ematici.

Per i conducenti sanzionati devono essere previsti adeguati protocolli terapeutici e riabilitativi, utili a prevenire la reiterazione del pericolo e a promuovere la riabilitazione dell'individuo.

Il fulcro dell'azione preventiva deve consistere nella modificazione dei comportamenti connessi all'assunzione di bevande alcoliche mediante articolati programmi di educazione, volti a diffondere la consapevolezza dell'incompatibilità tra assunzione di alcol e guida.

Ulteriori misure consistono nella rigorosa applicazione di procedure di rilascio/rinnovo della patente, volte ad individuare i soggetti a rischio e a differire il rilascio al conseguimento di risultati terapeutici.

Droghe

L'integrazione degli accertamenti clinici e chimico-tossicologici ha consentito di stabilire che il 15,7% dei conducenti testati si trovava alla guida in stato di intossicazione da droghe.

I cannabinoidi costituiscono la classe in assoluto più rappresentata (70,3%; Fig. 7), seguiti dagli psicostimolanti (cocaina e amfetamine) e dagli oppiacei. Le percentuali indicate in Fig. 7 superano il 100% in ragione della frequente assunzione di più sostanze da parte dello stesso conducente (Fig. 8). Nella medesima Fig. 8 è rilevabile l'elevata incidenza con cui le sostanze stupefacenti sono assunte in combinazione con alcol, ovvero con risultante incremento esponenziale del grado di disabilità e del rischio di sinistro stradale.

In Tab. 4 sono riportati, per ogni classe di sostanze psicoattive, le specifiche sostanze determinate nei campioni di sangue e le rispettive concentrazioni minime e massime rilevate.

La valutazione comparata del complesso dei dati desunti dallo studio consente di stimare che circa *l'1-2% dei conducenti circolanti nelle notti dei fine settimana è sotto l'influenza di droghe*. Tale stima scaturisce dalla disamina dei numeri e della percentuale già citati a proposito dell'alcol.

Sussistono evidenze sperimentali ed epidemiologiche circa il ruolo disabilitante delle droghe. Le sostanze identificate nella popolazione studiata alterano l'abilità alla guida mediante un effetto di sedazione (es. oppiacei, ipnotici ecc.) o di alterata percezione del rischio (es. cocaina, amfetamine).

Il ruolo disabilitante delle droghe è acuito dalla contemporanea assunzione di alcol. Nei conducenti sotto l'influenza di droghe tale associazione è stata rilevata nel 67,5% dei casi. Oltre il 20% dei predetti aveva assunto due o più droghe.

In analogia con quanto sopra segnalato a proposito dell'alcol, la normativa esistente è inadeguata per identificare e curare tale popolazione a rischio.

A titolo esemplificativo, si pensi alla quotidiana e non contrastata abitudine del tossicodipendente che si reca in auto presso il Servizio per le Tossicodipendenze per assumere la terapia metadonica. La rilevante frequenza di conducenti alla guida sotto l'influenza di droghe testimonia della inefficacia dei provvedimenti di prevenzione, repressione e riabilitazione.

L'identificazione dei conducenti alla guida in stato di intossicazione da droghe necessita di procedure che prevedano l'effettuazione di accertamenti clinici svolti da personale medico qualificato ed analisi su sangue ed urina. Tali procedure devono anche prevedere protocolli di prelievo, trasporto, stoccaggio ed analisi dei campioni biologici, idonei a tutelare i diritti dell'esaminato.

Un più efficace e tempestivo intervento repressivo può essere attuato impiegando una struttura mobile (camper) attrezzato per eseguire: l'esame clinico; lo screening rapido di sostanze stupefacenti su urina; immediate ed accurate analisi chimico-tossicologiche di conferma su campioni biologici, idonee a porsi come prova giudiziaria ed a comminare immediate sanzioni amministrative.

Tabella 4. - Tipologia e concentrazioni delle sostanze psicoattive rilevate nei campioni di sangue

	Concentrazione (ng/ml)	
	min	**max**
Cocaina		
Benzoilecgonina	17,5	890
Cocaina	29	410
Cannabinoidi		
Δ^9-THC-COOH	0,1	125
Δ^9-THC	15	24
Oppiacei		
Morfina	2,4	621
Codeina	2	47
6-Acetilmorfina	12	152
Amfetamine		
MDMA	21	266
MDEA	4	93
MDA	2	62
Metamfetamina	3	3
Amfetamina	81	81
Metadone		
Metadone	44	260
EDDP	2	12

Per i conducenti sanzionati devono essere previsti adeguati protocolli terapeutici e riabilitativi, utili a prevenire la reiterazione del pericolo e a promuovere la riabilitazione dell'individuo.

Ulteriori misure consistono nella rigorosa applicazione di procedure di rilascio/rinnovo della patente, volte ad individuare i soggetti a rischio e a differire il rilascio al conseguimento di risultati.

Raccomandazioni

La campagna di prevenzione condotta ha dimostrato la necessità di:

a) standardizzare a livello nazionale la metodologia dei controlli tossicologici su strada, prevedendo specificamente:

- procedure di intervento, sia da parte delle forze di polizia giudiziaria (criteri di individuazione dei conducenti a rischio), sia da parte del personale medico (criteri di accertamento clinico, effettuazione dei prelievi di liquidi biologici), in modo da garantire un medesimo trattamento a tutti i conducenti esaminati;
- tipologia dei materiali impiegati;
- procedure concernenti la catena di custodia dal prelievo dei campioni biologici all'acquisizione dei risultati analitici;
- procedure e metodiche analitiche;
- stoccaggio e conservazione di campioni biologici sigillati per controanalisi;

- valutazione conclusiva del singolo caso, comprensiva dell'integrazione dei dati clinici e chimico-tossicologici;

b) riformare l'attuale normativa e definire un regolamento applicativo, comprensivo dell'abbassamento dell'attuale tasso-limite alcolemico, di un sistema tabellare delle sostanze disabilitanti e di linee-guida sugli accertamenti clinici e laboratoristici, finalizzate al rilascio, ritiro e alla revisione della patente di guida;

c) promuovere una campagna nazionale di *prevenzione* sui rischi del consumo di alcol, droghe e psicofarmaci in relazione alla guida;

d) promuovere misure sanitarie di riabilitazione nei confronti dei conducenti recidivi alla guida sotto l'influenza di alcol e/o droghe;

e) promuovere una specifica formazione nei confronti del personale medico, di laboratorio e di polizia, impegnato nell'attività di prevenzione e controllo.

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 12 gennaio 2000.

BIBLIOGRAFIA

1. FERRARA, S.D., GIORGETTI, R. & ZANCANER, S. 1994. Psychoactive substances and driving. State of the art and methodology. *Alcohol Drugs Driv.* **10**: 1-55.

2. BUDD, R.D., MUTO, J.J. & WONG, J.K. 1989. Drugs of abuse found in fatally injured drivers in Los Angeles County. *Drug Alcohol Depend.* **23**: 153-158.

3. CAPLAN, Y.H., LEVINE, B.S. & GOLDBERGER, B.A. 1990. Drugs in driver fatalities: a preliminary study in the State of Maryland. In: *Alcohol, drugs & traffic safety T-'89.* M.W. Perrine (Ed.). National Safety Council, Chicago. p. 824-828.

4. CIMBURA, G., LUCAS, D.M., BENNETT, R.C. & DONELSON, A.C. 1990. Incidence and toxicological aspects of cannabis and ethanol detected in 1394 fatally injured drivers and pedestrians in Ontario (1982-1984). *J. Forensic Sci.* **35**: 1035-1041.

5. CROUCH, D.J., BIRKY, M.M., GUST, S.W., ROLLINS, D.E., WALSH, J.M., MOULDEN, J.V., QUINLAN, K.E. & BECKEL, R.W. 1993. The prevalence of drugs and alcohol in fatally injured truck drivers. *J. Forensic Sci.* **38**: 1342-53.

6. EVEREST, J.T. & TUNBRIDGE, R.J. 1990. The incidence of drugs in road accident fatalities in Great Britain. In: *Alcohol, drugs & traffic safety T-'89.* M.W. Perrine (Ed.). National Safety Council, Chicago. p. 595-601.

7. GARRIOTT, J.C., DI MAIO, V.J. & RODRIGUEZ, R.G. 1986. Detection of cannabinoids in homicide victims and motor vehicle fatalities. *J. Forensic Sci.* **31**: 1274-1282.

8. HOLUBOWYCZ, O.T., KLOEDEN, C.N. & MCLEAN, A.J. 1994. Age, sex and blood alcohol concentration of killed and injured drivers, riders, and passengers. *Accid. Anal. Prev.* **26**: 483-92.

9. LOGAN, B.K. & SCHWILKE, E.W. 1996. Drug and alcohol use in fatally injured drivers in Washington State. *J. Forensic Sci.* **41**: 505-510.

10. MARZUK, P.M., TARDIFF, K., LEON, A.C., STAJIC, M., MORGAN, E.B. & MANN, J.J. 1990. Prevalence of recent cocaine use among motor vehicle fatalities in New York. *JAMA* **263**: 250-256.

11. MCLEAN, S., PARSONS, R.S., CHESTEMAN, R.B., DINEEN, R., JOHNSON, G. & DAVIE, W. 1987. Drugs, alcohol and road accidents in Tasmania. *Med. J. Australia* **147**: 6-11.

12. MERCER, G.W. & JEFFERY, W.K. 1995. Alcohol, drugs, and impairment in fatal traffic accident in British Columbia. *Accid. Anal. Prev.* **27**: 335-343.

13. ROOT, I. 1990. Drugs of abuse and fatal automobile accidents. In: *Alcohol, drugs & traffic safety T-'89.* M.W. Perrine (Ed.). National Safety Council, Chicago. p. 602-607.

14. ROWE, B., MILNER, R., JOHNSON, C. & BOTA, G. 1994. The association of alcohol and night driving with fatal snowmobile trauma: a case-control study. *Ann. Emerg. Med.* **24**: 842-848.

15. SWEEDLER, B.M. & QUINLAN, K.E. 1990. Alcohol and drugs among fatally injured drivers of heavy trucks. In: *Alcohol, drugs & traffic safety T-'89.* M.W. Perrine (Ed.). National Safety Council, Chicago. p. 332-336.

16. TORMEY, W.P., CROSSE, H. & PIERCE, A. 1989. Chemical toxicology for the Coroner. *Hum. Toxicol.* **8**: 375-379.

17. FERRARA, S.D., ZANCANER, S., GIORGETTI, R., FENATO, F., POMA, G., TEDESCHI, L., MAIETTI, S., SNENGHI, R. & MONTISCI, M. 1997. Sostanze psicoattive e disabilità alla guida. Studio epidemiologico su conducenti di veicoli nella regione Veneto. *Riv. Ital. Med. Leg.* **19**: 389-410.

18. MAIETTI, S., TEDESCHI, L. & FERRARA, S.D. 1996. Alcohol and psychoactive drugs in blood and urine of car drivers. The Veneto region experience. In: *Proceedings of the 34th International TIAFT meeting.* Interlaken, Swiss. p. 124-132.

19. *Alcol, droga, farmaci e incidenti stradali.* 1999. S.D. Ferrara (Ed.). Cleup, Padova.

20. TEDESCHI, L., FRISON, G., CASTAGNA, F. & FERRARA, S.D. 1992. Comprehensive EIA/GC screening and GC/MS confirmation of psychoactive substances in blood and urine. In: *Methodology in man-machine interaction and epidemiology on drugs and traffic safety.* S.D. Ferrara & R. Giorgetti (Eds). ARFI, Padova. p. 147-166.

21. FERRARA, S.D., ZANCANER, S. & GIORGETTI, R. 1994. Low blood alcohol concentrations and driving impairment. *Int. J. Legal Med.* **106**: 169-177.

22. GIORGETTI, R., ZANCANER, S., BRUSINI, G., CASTAGNA, F., FENATO, F., ROSSI, A. & FERRARA, S.D. 1995. Low blood alcohol concentrations and psychomotor performance in tolerating and non-tolerating subjects. In: *Alcohol, drugs and traffic safety T'95.* C.N. Kloeden & A.J. McLean (Eds). NHRMC, Adelaide, Australia. p. 640-646.

23. CHRISTENSEN, L.Q., NIELSEN, L.M. & NIELSEN, S.L. 1990. Traffic accidents and drivers suspected for drug influence. *Forensic Sci. Int.* **45**: 273-280.

24. CHRISTOPHERSEN, A.S., GJERDE, H., BJORNEBOE, A., SAKSHAUG, J. & MØRLAND, J. 1990. Screening for drug use among norwegian drivers suspected of driving under influence of alcohol or drugs. *Forensic Sci. Int.* **45**: 5-14.

25. ZANCANER, S., GIORGETTI, R., DAL POZZO, C., MOLINARI, G., SNENGHI, R. & FERRARA, S.D. 1997. Driving under the influence of drugs. Correlation between clinical signs and type of intoxication. In: *Alcohol, drugs and traffic safety T'97.* C. Mercier-Guyon (Ed.). Annecy, France. p. 757-767.

Ann. Ist. Super. Sanità, vol. 36, n. 1 (2000), p. 41-46

L'approccio psichiatrico alla clinica delle tossicodipendenze: la comorbidità psichiatrica nel paziente tossicodipendente

Paolo GIRARDI, Barbara COZZANI, Michele DE MARCO CERVINO e Roberto TATARELLI

Dipartimento di Scienze Psichiatriche e Medicina Psicologica,
Università degli Studi "La Sapienza", Roma

Riassunto. - Gli autori analizzano i principali modelli teorici adottati nella comprensione e nel trattamento delle tossicodipendenze: morale, medico, psicodinamico, psichiatrico con particolare riferimento ai concetti di *comorbidità* e di *dual diagnosis*. Si fa rilevare come tali approcci conducano invariabilmente ad una dicotomia apparentemente insanabile tra un modello di "difetto/processo" e un modello di "conflitto/sviluppo". L'ipotesi proposta nel presente lavoro tenta invece di conciliare le opposte concezioni del problema in una visione unitaria che, tenendo conto delle fondamentali componenti psicopatologiche (discontrollo degli impulsi e dipendenza) che caratterizzano i disturbi da abuso di sostanze, raggruppa i pazienti tossicodipendenti in tre aree nosografiche sottolineando per ognuna il diverso approccio terapeutico.

Parole chiave: comorbidità, discontrollo degli impulsi, tossicodipendenza.

Summary *(Psychiatric approach to drug-abuse disorders)*. - The authors analyze the most important theoretical models in the field of drug addiction: the moral, the medical, the psychodynamic and the psychiatric model, with particular reference to the concepts of comorbidity and dual diagnosis. It is pointed out as these approaches invariably lead to a dichotomy between the "defect/process" model and the "conflict/development" model. The proposed hypothesis is an attempt to reconcile the opposite points of view in an unitary vision: on the basis of the fundamental psychopathological elements (drive dyscontrol and dependence), the addicts are so distributed into three areas, different for nosography and treatment.

Key words: drug addiction, dual diagnosis, disorders of impulse control.

Introduzione

Il problema dell'abuso di sostanze psicotrope è stato affrontato a partire da modelli teorici apparentemente diversi.

Il *modello morale*, che gode di un certo consenso in alcune società e in determinati ambiti terapeutici, ritiene il soggetto "vizioso" interamente responsabile del proprio comportamento di abuso e colpevole per la propria dipendenza. Oppure il "vizio" deriva dalla società corrotta incapace di trasmettere all'individuo valori morali e senso di appartenenza. Tale modello è applicato maggiormente al campo delle tossicodipendenze che non a quello dell'alcolismo per la notevole sovrapposizione che si rileva tra abuso di droga e criminalità. La conseguenza operativa di tale modello oscilla tra un approccio punitivo a orientamento legale (repressione del "vizio") e un approccio riabilitativo (creazione di un "uomo nuovo") / preventivo (lotta alla "disgregazione familiare e sociale").

Il *modello medico*, che in un primo tempo sollevava il soggetto "malato" da qualsiasi responsabilità imputando la dipendenza a un'innata predisposizione su base genetica poco o per nulla influenzata da fattori psicologici e/o ambientali, si assesta oggi su un'ipotesi di "multifattorialità" che dà maggiore enfasi al ruolo giocato dall'ambiente nella genesi di una tossicodipendenza. La conseguenza operativa di tale modello oscilla tra un approccio terapeutico di tipo cronico sostitutivo o avversivo e un approccio biopsicosociale "fasico" di intervento sulla crisi.

In entrambi i casi, come si vede, il tossicodipendente è visto o come un individuo primariamente "difettoso" (eticamente o geneticamente) o come una vittima (in ragione di una specifica vulnerabilità?) del suo ambiente. Il principale obiettivo dei trattamenti risultanti da tali modelli è comunque il controllo del comportamento di abuso.

La psichiatria si è occupata poco delle tossicodipendenze e in maniera confusiva e marginale: è sempre stata presente una difficoltà ad accettare il fatto che il comportamento tossicomanico sia in sé un disturbo psicopatologico primario, rivolgendo un'attenzione distratta e snob soltanto ai disturbi da uso di sostanze come fenomeno secondario (delirio di gelosia dell'alcolista, ad esempio), quindi non endogeni né psicogeni, quindi non degni di studi approfonditi.

La questione nosografica

Il DSM-IV [1] descrive le tossicodipendenze sia come disturbi mentali primari (disturbi da uso di sostanze con i concetti correlati e di gravità crescente di uso, misuso, abuso, dipendenza e *addiction*), sia come disturbi secondari (disturbi indotti da sostanze).

In questo senso colpisce, tra le altre, la contraddizione epistemologica insita nel DSM-IV, quando tratta l'abuso di sostanze ora come disturbo primario in asse I, ora come sintomo, in asse II, del disturbo *borderline* di personalità; ci pare questo uno dei tanti indicatori di quell'atteggiamento snobistico e imbarazzato nutrito dall'accademia psichiatrica nei confronti della tossicomania, che ha contribuito a generare l'attuale livello di confusione nosografico e terapeutico in questo ambito.

Attraverso un approccio psicopatologico è invece possibile, a nostro avviso, spostare il *focus* dal comportamento (tossicomania) al vissuto (tossicofilia) del paziente tossicomane. Ma questo vissuto è solo correlato con l'abuso di sostanze o riguarda anche qualcos'altro? Più precisamente il vissuto del paziente tossicomane è esso stesso un vissuto psicopatologicamente alterato? E, in caso di risposta affermativa, tale vissuto psicopatologicamente alterato:

1) è dovuto all'uso di sostanze?
2) concomita con l'uso di sostanze?
3) si esprime attraverso l'uso di sostanze?

Certamente l'uso di sostanze psicotrope determina alterazioni del vissuto soggettivo che, in certi casi, possono raggiungere il livello psicotico, ma è sicuramente troppo semplicistico ipotizzare che l'abuso in quanto entità nosografica primaria a sé stante racchiuda ed esaurisca tutta la psicopatologia del tossicomane. Gran parte della recente letteratura sulla *dual diagnosis*, come pure i tentativi di classificazione delle tossicodipendenze secondo variabili personologiche e psicopatologiche, sottolineano la notevole difficoltà di reperire nella realtà clinica "tossicomanie pure", derivanti cioè unicamente da una costituzionale intensificazione di istanze "tossicofiliche" presenti in una personalità priva di altri elementi psicopatologici. Tale assunto è confermato anche dall'osservazione clinica del fatto che di rado l'abuso è indiscriminato: nella maggior parte dei casi "specifiche sostanze vengono scelte per specifici effetti psicologici e farmacologici [quasi che] l'affetto più doloroso sia quello che determina la scelta della droga" [2] e anche negli individui politossicomanici l'avvicendarsi delle preferenze rispetto alla sostanza di abuso ricalca l'alternarsi degli stati psicopatologici di base.

Assodato quindi che la tossicodipendenza raramente afferisce a un evento psicopatologico isolato, resta da comprendere in che modo i disturbi psichici si associno al comportamento di abuso: concomitano semplicemente con esso o vi sono legati in rapporto di causalità?

Seguendo l'impostazione ateorica che i curatori hanno inteso imprimere al DSM, l'eventuale presenza di altro disturbo psichico si associa alla tossicodipendenza secondo il modello di comorbidità mutuato dalla medicina generale, cioè "due o più malattie, distinte per etiopatogenesi (o, se l'etiopatogenesi è sconosciuta, distinte per fisiopatologia di organo o sistema), presenti nello stesso individuo nel periodo di tempo preso in esame".

Intendendo per organo o sistema le aree o funzioni psichiche e per malattie (pressoché inesistenti in psichiatria) le sindromi-disturbi, cioè "le costellazioni di sintomi correlati che si presentano insieme o in momenti diversi del decorso e che si modificano ed evolvono in modo caratteristico", la suddetta definizione di comorbidità si trasforma in "concorrenza di due o più sindromi, distinguibili nosograficamente a prescindere dalla patogenesi, presenti nello stesso individuo nel periodo di tempo preso in esame" [3].

A partire dalla primitiva osservazione che circa l'80% dei tossicodipendenti rispondono ai criteri diagnostici per almeno un altro disturbo psichiatrico, negli ultimi 10 anni numerosi studi [4-6] si sono occupati di comorbidità tra alcolismo/tossicodipendenza e altri disturbi psichiatrici. Per agevolare tali complessi processi diagnostici e rendere più omogenee le diagnosi di operatori diversi (spesso medici di base o di pronto soccorso) sono state messe a punto, soprattutto negli USA, varie interviste semistrutturate capaci di fornire, in un tempo relativamente breve, *dual diagnosis* affidabili [7].

I più comuni disturbi psichiatrici associati all'alcolismo e alle tossicodipendenze sono: depressione, disturbi d'ansia, disturbi somatoformi, schizofrenia e disturbi di personalità. Una notevole percentuale di tali associazioni consiste, in realtà, in una falsa comorbidità, essendo spesso i sintomi ansiosi, depressivi o psicotici una conseguenza diretta e transitoria dell'intossicazione e trattandosi quindi di una chiara associazione tra disturbi da uso di sostanze e indotti da sostanze. Dal momento che diversi sintomi recedono con la cessazione dell'abuso, molti autori suggeriscono di valutare la comorbidità dopo 2-4 settimane di astinenza.

In genere la persistenza di un disturbo psichico dopo molti mesi di astinenza è suggestiva di un disordine primario, anche se alcuni autori preferiscono attribuire i caratteri di primarietà al disturbo che, in ordine di tempo, compare per primo. E' bene sottolineare, però, che l'enfasi posta sul concetto di gerarchia dei disturbi può talora condurre a un misconoscimento dell'uno o dell'altro con conseguenze terapeutiche inefficaci e destinate al fallimento.

Il *modello psicoanalitico* ha affrontato i problemi correlati all'abuso e alla dipendenza da alcol e droga in maniera più complessa seguendo, nel corso del tempo, due diverse direttive teoriche, che sono come vedremo, le medesime degli altri approcci. Infatti, da un lato lo ha

considerato fenomeno primario, derivante, per dirla con Freud, da "un'intensificazione costituzionale dell'importanza erogena della zona labiale" [8]; dall'altro lo ha inquadrato come meccanismo difensivo secondario finalizzato al controllo di stati psicopatologici di varia natura. I primi contributi psicoanalitici (ancora nell'ambito di una psicologia pulsionale) rifacendosi direttamente all'accenno succitato di Freud sulle future tendenze alcoliche e tabagiche dei bambini "succhiatori di pollici", enfatizzavano il ruolo della fissazione-regressione alla fase orale, come causa diretta della condotta di abuso. In questo senso il tossicomane agirebbe governato dal principio del piacere, in virtù di un'intrinseca debolezza dell'Io, che viene così ad essere caratterizzato, alla stregua dei perversi e degli psicopatici, dall'incapacità a tollerare le frustrazioni e dalla ricerca pervicace di gratificazioni. Più tardi, in concomitanza con il progressivo evolversi del concetto di malattia da una visione ottocentesca fondata sul modello della "degenerazione" a una concezione più "multifattoriale", gli psicoanalisti allargano il loro campo di interesse dalle pulsioni alle motivazioni, ai vissuti, ai traumi del singolo individuo. In questo clima maturano le concettualizzazioni di S. Rado [9] che, analizzando gli effetti delle droghe, li distingue in due categorie:

1) gli *effetti farmacologici* che, fornendo una barriera difensiva contro l'eccessiva stimolazione interna e/o promuovendo le funzioni dell'Io, fungono da "sostegno dell'Io al servizio della realtà";

2) gli *effetti tossici* che, realizzando una condizione di benessere di tipo sessuale ("orgasmo farmacotossico"), determinano "una soggiogazione dell'Io da parte dell'Es, una distruzione delle relazioni dell'Io con la realtà" [9].

In uno scritto successivo tale autore pone in risalto le componenti narcisistiche presenti nelle personalità dei tossicomani che si manifestano in termini di intolleranza alle frustrazioni e alla sofferenza fino a strutturare una depressione "carica di tensione" *(preliminary depression)* che trova nell'incontro con la droga un sollievo tanto immediato quanto effimero: la cosiddetta *pharmacothymia* [10]. In ambito psicoanalitico quindi la tossicomania, che in un primo momento, pur rientrando nel campo più vasto delle perversioni e delle psicopatie, aveva assunto i caratteri di entità diagnostica a se stante, in un'elaborazione successiva viene inquadrata come una risposta dell'Io che agisce in controbilanciamento dinamico ad angosce e perturbazioni affettive. Quale meccanismo attivo di ripristino dell'omeostasi psichica, la tossicomania perde specificità categoriale per diventare una condizione transnosografica. Diventa, in questo senso, plausibile una risposta tossicomanica dell'Io a difetti affettivi di natura differente, che affondano le loro radici in stadi ontogeneticamente distinti, seppure tutti molto precoci. Spostando l'attenzione dall'Es al Super-Io molti autori enfatizzano il ruolo assunto dalle sostanze psicotrope nel tacitare un'istanza superegoica troppo sviluppata [11]. Per dirla con Freud "il Super-Io è solubile in alcol". Gli autori successivi accostano sempre più la tossicomania ai concetti di ciclotimia e bipolarità fino a inquadrare la tossicodipendenza come equivalente maniaco-depressivo in costante oscillazione tra fasi di benessere/euforia (l'intossicazione) e fasi di svuotamento/depressione (l'astinenza) [12]. Altri autori, rilevando nell'idea dominante il nucleo psicopatologico che sostanzia i comportamenti tossicomanici come quelli bulimici accostano la tossicomania al concetto di "psicosi monosintomatica" [13] in cui è facile riconoscere echi della "monomania" di Esquirol e della "monomania impulsiva" tra cui Kraepelin annoverava la dipsomania. Numerosi altri sono stati i contributi delle varie scuole psicoanalitiche all'argomento, ma ciò che nello specifico risulta più interessante è notare come, fin dalle prime teorizzazioni, il pensiero psicodinamico abbia oscillato tra le due ipotesi della vulnerabilità e dell'automedicazione al pari degli altri modelli esplicativi di tossicodipendenza e alcolismo. La psicologia del Sé, soprattutto nei suoi sviluppi post-kohutiani, ha fatto invece ricorso alla teoria degli affetti e della regolazione affettiva per spiegare la dinamica del comportamento tossicodipendente. Secondo tale teoria, all'interno della normale interazione madre-bambino, la madre cerca di abbassare l'eccitamento del proprio bambino quando questi è sovreccitato e di destare interesse e vitalità nel proprio bambino quando questi è "depresso". A sua volta il bambino risponde con comportamenti simmetrici eccitando una madre "depressa" e voltandosi e ritraendosi davanti a una madre "iperstimolante". Secondo le ricerche cliniche degli psicologi del Sé i comportamenti tossicodipendenti nascono in persone che hanno incontrato ripetuti fallimenti empatici del *caregiver* nella reciproca regolazione affettiva. Tale esperienza determina un "principio organizzatore invariante" secondo il quale non è possibile utilizzare il rapporto con esseri umani, e tantomeno con se stessi, nella regolazione degli affetti: gli esseri umani, inclusi se stessi, vengono sentiti come inaffidabili e incapaci nel regolare gli affetti propri ed altrui. Al contrario si ritiene che solo le sostanze concrete, esterne abbiano le qualità di costanza e di affidabilità che mancano agli esseri umani. Da qui il ricorso all'uso di droghe che possono garantire al soggetto un'esperienza "concreta" di regolazione affettiva "affidabile e costante". La droga diviene così quell'*oggetto sé* finalmente affidabile che il tossicomane ha cercato inutilmente nel *caregiver* quando era in rapporto con questi e in se stesso quando era in rapporto con il *caregiver*.

Considerata la complessità dell'argomento affrontato e le contraddizioni epistemologiche in cui inciampa anche un approccio limpidamente ateorico come quello propugnato dall'American Psychiatric Association per la nosografia del DSM, riteniamo si debba necessariamente andare verso una visione più globale e problematica del fenomeno in questione.

Come abbiamo visto, chiunque si è occupato di tossicomanie ha abbracciato una delle due "fedi", l'una intraprendendo crociate e guerre sante contro l'altra: per altro gli eserciti si sono costituiti in maniera trasversale alle professionalità e ai presupposti epistemologici dei singoli soldati, di modo che l'uno e l'altro accampamento esibiscono psicoanalisti, epidemiologi, operatori sociali, psichiatri biologici, clinici (pochi), moralisti (troppi).

Gli stendardi issati recano il vessillo del "difetto/processo" o del "conflitto/sviluppo". Da un lato la tossicomania è interpretata come un disturbo della condotta di tipo impulsivo di matrice psicopatica le cui radici si ritrovano inscritte nei geni e\o in un precocissimo disturbo dello sviluppo, in ogni caso talmente connaturato all'individuo da rendere vana ogni speranza di progetto terapeutico diverso dalla contenzione farmacologica, sociale o fisica. Dall'altro lato, si ritiene che la risposta tossicomanica derivi da stimoli patogeni altri, siano essi interni (personologici o di sottostante psicopatologia) o esterni (sociali e\o familiari), configurandosi comunque come disturbo secondario passibile di terapia e riabilitazione.

La clinica come sempre ci viene in soccorso: indipendentemente dalla divisa indossata e dalla religione abbracciata, il clinico si confronta di continuo, nel campo delle tossicodipendenze, sia con insuccessi e ricadute dei pazienti, così come con insperate remissioni e trasformazioni nosologiche inattese. In particolare, questi fenomeni di viraggio transnosografico non possono tutti essere messi in relazione diretta con gli effetti intossicativi o astinenziali delle sostanze, essendo possibile rintracciarne segnali nelle anamnesi prima degli esordi tossicomanici, negli alberi genealogici e, prospetticamente, anche dopo lunghe sospensioni dalla sostanza utilizzata.

Una proposta nosologica

L'ipotesi proposta tenta di correlare in maniera laica e concreta i due diversi approcci, assumendo che, con ogni probabilità, convivono in ogni soggetto tossicomane i due fenomeni di sviluppo\conflitto e di processo\difetto, in proporzioni differenti a seconda del singolo caso. A tale scopo ci rifaremo alla formulazione epistemologica di "spettro psicopatologico" [14], estremamente in voga nella psichiatria contemporanea dopo l'orgia smembratrice del DSM, secondo cui "insieme di sindromi (più o meno simili dal punto di vista fenomenico, ma comunque distinguibili) accomunate in un ordine da una comune determinazione, (...) che rimanda ad una sottostante ipotesi patogenetica (sia essa implicita o esplicita). Lo spettro deve avere confini chiari, definiti, stabili. La determinazione su cui si basa è una caratteristica patogenetica comune a tutti gli elementi (le sindromi) che ne appartengono, senza la quale nessuna sindrome può farne parte" [3].

I disturbi correlati a sostanze si inscrivono secondo noi in due insiemi psicopatologici distinti, le cui determinanti sarebbero:

a) discontrollo degli impulsi;

b) dipendenza.

Il primo dei due insiemi risponde pienamente, a nostro avviso, ai criteri individuati da Aragona e Vella [14] nella definizione di spettro, intagliandosi una nicchia nel più ampio (e più generico e impreciso) "spettro ossessivo". Si è visto, ed è un'altra delle contraddizioni a proposito dell'argomento in questione, che nessuno degli autori che si sono interessati all'argomento ha inserito i disturbi da uso compulsivo di sostanze tra le sindromi comprese nello spettro. La materia è probabilmente tanto sfaccettata da sgomentare il ricercatore fino alla negazione dell'evidenza: il tossicomane che assume una sostanza d'abuso potenzialmente mortale, aldilà di ogni considerazione di convenienza personale, microsociale o macrosociale, alla ricerca di un piacere non rimandabile né sublimabile in altro modo, è l'emblema stesso della patologia d'impulso. L'area individuata dallo spettro del discontrollo degli impulsi ricalca a grandi linee lo spazio compreso un tempo entro i confini nosologici occupati dalla psicopatia. Il concetto di impulso costituisce il principio unificante di una serie di sindromi che vanno dal gioco d'azzardo patologico alle perversioni sessuali alla bulimia e, in particolare, sottende in maniera più o meno significativa, tutte le condizioni di abuso di sostanze (Tab. 1).

Tuttavia, il problema del discontrollo degli impulsi non esaurisce, come abbiamo già detto, tutta la psicopatologia delle tossicomanie, né delle altre sindromi ad esse patogeneticamente legate intorno al nucleo dell'impulso. Esiste a nostro avviso un altro insieme sindromico che si sovrappone parzialmente a quello appena preso in considerazione e che, soltanto secondo una prospettiva psicodinamica, possiamo definire spettro (Tab. 1).

E' lo spettro della dipendenza: con questo termine intendiamo la necessità di collocare al di fuori di sé, in un oggetto esterno, funzioni normalmente egoiche quali l'autostima e la capacità di tollerare frustrazione e affetti depressivi. Il concetto in questione è, come si vede, molto più articolato e molto meno biologicamente derivabile di quello di impulso, riferendosi a strutture psichiche più complesse ed evolutivamente recenti. Inoltre, il nucleo unificante dello spettro della dipendenza giace su un altro piano: potremo dire che se il problema degli impulsi rimanda ad un ordine genetico-biologico, quello della dipendenza rimanda ad un ordine personologico che a quell'altro si sovrappone, modificando la forma dei singoli elementi in maniera patoplastica. E' il fenotipo che si sviluppa dal genotipo: per questo motivo i confini di un insieme determinato genotipicamente saranno molto più netti e definiti di uno determinato fenotipicamente.

Tabella 1. - Insiemi di sindromi che costituiscono i concetti di spettro del discontrollo degli impulsi e spettro della dipendenza e loro sovrapposizione parziale

Spettro del discontrollo degli impulsi	Spettro della dipendenza
Abuso e dipendenza da sostanze	Abuso e dipendenza da sostanze
Parafilie	Disturbi dell'umore
Anoressia nervosa	Disturbo di panico con agorafobia
Bulimia nervosa	Fobia specifica
Disturbo esplosivo intermittente	Fobia sociale
Cleptomania	Parafilie
Piromania	Anoressia nervosa
Gioco d'azzardo patologico	Bulimia nervosa
Tricotillomania	Disturbo *borderline* di personalità
Disturbo antisociale di personalità	Disturbo istrionico di personalità
Disturbo *borderline* di personalità	Disturbo narcisistico di personalità
Disturbi da deficit di attenzione e da comportamento dirompente	Disturbo evitante di personalità
	Disturbo dipendente di personalità

La confusione che potrebbe derivare dall'utilizzare insieme due ordini di significato differenti, può essere superata in questo modo: esiste a nostro avviso una sovrapposizione parziale tra il dominio della dipendenza e quello dell'impulso che va considerata nell'aspetto proprio nosografico e insieme nosologico (Fig. 1).

Da un punto di vista nosografico, i due spettri condividono, come si vede, una serie di sindromi che sono caratterizzate da entrambi i principi unificatori. E' chiaro che rinvenire nello stesso individuo, nello stesso momento o in fasi differenti, due o più di queste sindromi non può rigorosamente essere ritenuto un fenomeno di comorbidità, bensì di "pseudocomorbidità", condividendo le due sindromi processi patogenetici comuni. Al contrario, la concorrenza di disturbi consustanziati da "dimensioni" differenti, appartenenti, quindi, a spettri differenti, può, a ragione, essere definita, comorbidità, sempre che non sia ipotizzabile che le due sindromi condividano altre caratteristiche dimensionali comuni.

Da un punto di vista nosologico, il discorso è molto più complesso: si tratta di postulare che ogni singola storia di tossicomania possa essere posta lungo un *continuum* che va dalla massima dipendenza e il minimo discontrollo pulsionale alla minima dipendenza e massimo discontrollo pulsionale. Si individuano così tre gruppi di pazienti:

1) area psicopatica, caratterizzata dalla scarsa comorbidità psicopatologica al di fuori dello spettro impulsivo e da una peggiore *compliance*. Il trattamento farmacologico, psicoterapico e sociale deve in questi casi andare nella direzione di un contenimento e del rinforzo dell'autocontrollo;

2) area affettiva, caratterizzata da una più vasta (pseudo)comorbidità psicopatologica di categorie distanti nosograficamente e da una compliance migliore. Il trattamento farmacologico, psicoterapico e sociale deve essere modulato sulla base della diagnosi comorbile, essendo l'esperienza tossicomanica un occasione e un tentativo di autoterapia, più che un sintomo primario;

3) area *borderline*, caratterizzata dalla coesistenza in proporzione variabile di elementi psicopatici e affettivi, da una ricca e variabilissima comorbidità, che diventa "pseudo" o vera in relazione alle dimensioni prese in considerazione nel singolo caso e che dimostra una compliance oscillante e instabile. La terapia è di difficilissima gestione dovendo a sua volta oscillare da una posizione più repressiva e sintomatica ad una più incisiva e, presumibilmente, etiologica.

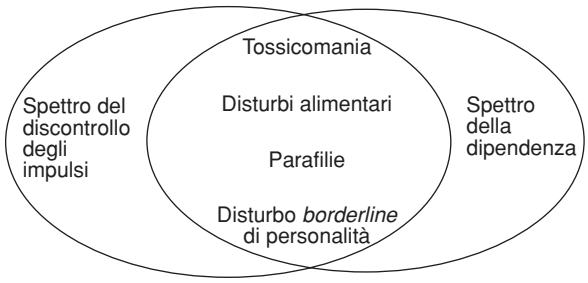


Fig. 1. - Sovrapposizione nosografica parziale tra il dominio della dipendenza e quello dell'impulso.

Gli studi epidemiologici più recenti e più rigorosi, la nostra pratica clinica nella gestione delle tossicodipendenze, l'osservazione che tutte le sindromi hanno subito trasformazioni nosografiche enormi sotto l'influsso della sempre maggiore diffusione delle sostanze d'abuso confermerebbero la nostra impostazione teorica e stimolano a continuare con costanza su questa linea di ricerca.

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 12 gennaio 2000.

BIBLIOGRAFIA

1. AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. 1994. *Diagnostic and statistic manual of mental disorders*. 4. ed. Washington, DC.

2. GABBARD, G. O. 1995. Disturbi da uso di sostanze psicoattive e disturbi dell'alimentazione. In: *Psichiatria psicodinamica*. (trad. it.) Raffaello Cortina Editore, Milano.

3. VELLA, G. & ARAGONA, M. 1998. La comorbidità in psichiatria. *NOO=4*: 37-62.

4. CRAWFORD, V. 1996. Comorbidity of substance misuse and psychiatric disorders. *Curr. Op. Psychiatry* **9**: 231-234.

5. BROONER, R.K., KING, V.L. *et al*. 1997. Psychiatric and substance use comorbidity among treatment-seeking opioid abusers. *Arch. Gen. Psychiatry* **54**: 71-80.

6. DIXON, L., MCNARY, S. & LEHMAN, A. 1997. One-year follow-up of secondary *versus* primary mental disorder in person with comorbid substance use disorders. *Am. J. Psychiatry* **154**: 1610-1612.

7. ZIEDONIS, D. & BRADY, K. 1997. Dual diagnosis in primary care. *Med. Clin. North America* **4**: 1017-1036.

8. FREUD, S. 1905. Tre saggi sulla teoria sessuale. In: *Opere*. (trad. it. 1970) Bollati Boringhieri, Torino.

9. RADO, S. 1926. The psychic effects of intoxicants: An attempt to evolve a psycho-analytical theory of morbid cravings. *Int. J. Psychoanal*. **7**: 396-413.

10. RADO, S. 1933. The psychoanalysis of pharmacothymia. *Psychoanal. Quart*. **2**: 1-23.

11. SIMMEL, E. 1928. Psychoanalytic treatment in a sanatorium. *Int. J. Psychoanal*. **9**: 83-97.

12. GLOVER, E. 1939. *Psychoanalysis*. Bale, London.

13. BENEDEK, T. 1936. Dominant ideas and their relation to morbid cravings. *Int. J. Psychoanal*. **17**: 40-56.

14. ARAGONA, M. & VELLA, G. 1998. Lo spettro in psicopatologia. *NOO=4*: 3-36.

Ann. Ist. Super. Sanità, vol. 36, n. 1 (2000), pp. 47-62

Fattori psicobiologici di rischio e vulnerabilità agli psicostimolanti in soggetti adolescenti e modelli animali

Giovanni LAVIOLA *(a)*, Walter ADRIANI *(a)*, M. Livia TERRANOVA *(a)* e Gilberto GERRA *(b)*

(a) Laboratorio di Fisiopatologia di Organo e di Sistema, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(b) Dipartimento Dipendenze Patologiche, Ser.T - AUSL, Parma

Riassunto. - Nell'uomo, la fase di transizione adolescenziale risulta associata con un rischio elevato di sviluppare abuso di sostanze e/o tossicodipendenza. Durante questa fase dello sviluppo, il cervello e specifici sistemi fisiologici ormonali attraversano un processo cruciale di riorganizzazione, che ha luogo in contemporanea con notevoli mutamenti nello sviluppo psicosociale. Recentemente, la pulsione verso la ricerca di sensazioni e stimoli nuovi (*novelty-seeking*), una caratteristica della personalità che è tipica dell'età adolescenziale, è stata identificata come un fattore di rischio per la vulnerabilità psicobiologica all'offerta nei riguardi delle cosiddette "droghe" ad es. psicostimolanti, quali l'MDMA ("ecstasy") e l'amfetamina (ANF). Studi effettuati su modelli animali indicano l'esistenza di un substrato neurobiologico (le vie mesolimbiche cerebrali) comune sia alla motivazione naturale per stimoli nuovi che agli effetti gratificanti degli psicostimolanti. Nella presente rassegna, vengono fornite una serie di evidenze sperimentali che documentano la presenza caratteristica, in un modello animale di transizione adolescenziale, di una serie di comportamenti "estremi" (o paradosso) e di una elevata *novelty-seeking*. Una comprensione più profonda degli effetti degli psicostimolanti durante l'adolescenza, e dell'interazione fra i fattori genetici, neurobiologici, psicosociali ed ambientali che la sottendono, può rivelarsi estremamente utile al fine di sviluppare strategie di prevenzione più efficaci.

Parole chiave: plasticità neurobiologica, adolescenza, modelli animali, ontogenesi del comportamento, ricerca di sensazioni, psicostimolanti.

Summary *(Psychobiological risk factors for vulnerability to psychostimulants in human adolescents and animal models).* - Adolescence is associated with an increased risk of developing drug abuse/dependence. During this ontogenetic phase, brain and hormonal systems are still undergoing crucial maturational rearrangements, which take place together with significant modifications in psychosocial development. However, the neurohormonal and behavioural facets of adolescence have been poorly investigated in relation to the vulnerability to psychostimulants such as MDMA ("ecstasy") and amphetamine. Novelty-seeking, a temperamental/behavioural trait that is typical of this age period, might substantially contribute to psychobiological vulnerability to drugs. In animal models of periadolescence, the search for novel stimuli and sensations actually shares a common neurobiological substrate (the reward-related brain mesolimbic pathways) with psychostimulants. Periadolescent mice are characterized by an unbalanced and "extremes-oriented" behaviour and by elevated levels of novelty-seeking. A deeper understanding of psychostimulant effects during adolescence, and the interaction between genetic, neurobiologic, psychosocial, and environmental factors, will lead to earlier and more effective prevention strategies.

Key words: neural plasticity, periadolescence, animal models, ontogeny of behaviour, novelty seeking, psychostimulants.

Introduzione

Sebbene possa essere una esperienza comune a molti di venire occasionalmente a contatto con un certo numero di sostanze psicoattive (incluse le cosiddette "droghe d'abuso"), è evidente che non tutti prendono a farne un uso eccessivo né sviluppano tossicodipendenza. E' quindi di estrema rilevanza identificare i fattori di rischio legati alla probabilità di sviluppare farmacodipendenza ed i problemi ad essa connessi. Tali fattori comprendono le caratteristiche proprie della persona o dell'ambiente per lo più sociale [1]. L'uso di droghe sembra infatti rappresentare una delle possibili risposte (disadattative) messe in atto dall'individuo che si trovi esposto a un certo numero di fattori di rischio [2, 3]. Per questi motivi, uno sforzo considerevole di ricerca è stato dedicato allo studio di quei fattori che rendono alcuni individui più vulnerabili di altri. Queste differenze individuali possono essere ricondotte a fattori genetici o ambientali, e, più ragionevolmente, all'interazione fra questi [4, 5].

La cosiddetta vulnerabilità all'offerta di sostanze ricreazionali o di abuso varia, in uno stesso soggetto, con l'età. Un rischio maggiore di sviluppare abuso di sostanze, assieme ai problemi ad esso connessi, sembra infatti associarsi alla fase dell' adolescenza [1]. Di fatto, indagini epidemiologiche ci dicono che l'esperienza con

diversi generi di agenti psicoattivi è particolarmente diffusa durante questa fase della vita di un individuo [6]. Molti adolescenti fanno uso inizialmente, data anche la piena disponibilità, di tabacco e/o alcol e possono poi proseguire con marijuana e infine con psicostimolanti e/o narcotici [7]. L'esposizione a una serie elevata di fattori di rischio sembra facilitare il consumo di sostanze; il numero di questi fattori sarebbe inoltre positivamente correlato con l'uso di sostanze nel tempo, svolgendo dunque, un vero e proprio ruolo eziologico [1, 3, 8]. L'adolescenza è un periodo ontogenetico unico, durante il quale è ancora presente una notevole plasticità cerebrale, che si avvale di meccanismi neuroanatomici, neurochimici e neurofisiologici. Alla maturazione biologica del cervello corrispondono transizioni significative nello sviluppo cognitivo, emotivo e sociale, così come alterazioni nel comportamento specifiche di questa età [3, 9-11]. La sensibilità agli effetti delle sostanze psicotrope è caratterizzata inoltre da aspetti cosiddetti "paradosso"; il che starebbe a indicare uno stato di sviluppo e di organizzazione neurobiologica differenziale.

Durante l'adolescenza, le influenze dell'ambiente si trovano dunque a interagire con le particolari discontinuità neurobiologiche e psicosociali tipiche di questa fase dello sviluppo, ed è tramite queste che l'ambiente predisporrebbe o proteggerebbe, in certo qual modo, l'individuo dall'abuso e/o dalla dipendenza da droghe. Tuttavia, sebbene sia ben noto che è proprio durante l'adolescenza che ha inizio, nella maggior parte dei casi, un uso e abuso di sostanze, sono relativamente scarsi gli studi che hanno preso in esame le variabili psicobiologiche potenzialmente responsabili di questa tendenza. Inoltre, sorprendentemente, gli studi effettuati hanno coinvolto quasi esclusivamente individui adulti, e pochissimo si conosce circa le conseguenze a lungo termine che l'esposizione ad agenti psicoattivi può avere durante questa fase di maturazione ontogenetica. I dati epidemiologici indicano che l'età del primo approccio con sostanze può influenzare notevolmente il successivo uso di droga, così come l'insorgenza dei problemi ad esso collegati. Effettivamente, sembra esserci una correlazione positiva tra l'età del primo approccio e la probabilità di passare da un uso ricreazionale all'abuso e alla dipendenza [8, 12, 13]. L'esposizione acuta o cronica alla droga, specie se precoce, potrebbe ad esempio interferire con i normali processi di maturazione ormonale, così come con lo sviluppo di adeguate competenze cognitive e psicosociali che trovano il loro corso naturale durante l'adolescenza.

Gli studi passati qui in rassegna verteranno sulle caratteristiche neurocomportamentali specifiche degli adolescenti, dando particolare rilievo ai fattori che contribuiscono all'uso e all'abuso di sostanze, nell'intenzione di mostrare quanto lo studio di questa fase ontogenetica possa essere importante per la ricerca nel campo delle tossicodipendenze. L'integrazione di dati della ricerca sperimentale e di studi epidemiologici, ci permette una comprensione più completa e ricca dei processi di sviluppo e della particolare vulnerabilità degli adolescenti.

Un tratto temperamentale particolare, la cui rilevanza è stata evidenziata sia dagli studi epidemiologici che da quelli sperimentali, consiste nella cosiddetta "ricerca di sensazioni" o "ricerca di novità". Secondo Zuckerman [14], tale tratto si caratterizza "per la necessità continua di sperimentare sensazioni varie, nuove e complesse" che si suppone siano gratificanti. Tanto il coinvolgimento in attività rischiose e stressanti, che vengono di solito evitate dalla maggior parte delle persone (per es. parapendio, ecc.), quanto l'uso di sostanze ricreazionali legali o meno, sarebbero maggiormente frequenti negli individui che presentano valori elevati di *novelty seeking* [15]. In una rassegna di Arnett [16], gli adolescenti risultano statisticamente sovra-rappresentati rispetto agli adulti, nel gruppo che si mostra notevolmente motivato alla ricerca di sensazioni nuove. Sembra dunque che negli adolescenti la ricerca continua di sensazioni nuove e l'esigenza di venire a contatto con stimoli "forti" possano rendere conto in certo qual modo del livello elevato "di curiosità" e della facilità del primo approccio nei riguardi di sostanze potenti ad azione psicoattiva.

La ricerca di sensazioni nuove è inoltre stata associata ai tre gruppi di tratti comportamentali (impulsività, aggressività, ricerca di gratificazione) che il modello biochimico sviluppato da Zuckerman [17] mette in relazione con tre neurotrasmettitori specifici, quali dopamina (DA), noradrenalina (NE) e serotonina (5-HT). Altri modelli psicobiologici di personalità (proposti da autori quali Depue, Cloninger o Gray; vedi rassegna [17]) sottolineano la relazione che esisterebbe tra i meccanismi comportamentali sia animali che umani, le caratteristiche della personalità nell'uomo e la attività funzionale dei neurotrasmettitori monoaminergici. E' anche probabile che le più recenti acquisizioni della genetica molecolare arrivino a produrre risultati più diretti e definitivi. E' stata recentemente confermata [18] l'ipotesi che i livelli di *novelty seeking* sarebbero almeno ascrivibili in parte a differenze genetiche a livello dei recettori per la dopamina (DA): i soggetti portatori di un allele particolare del recettore D4 mostrerebbero valori più alti di *novelty seeking* rispetto a soggetti con un genotipo normale.

In questo ambito, sono fondamentali gli studi di Netter *et al.* [19]. Per quanto riguarda il ruolo di parametri fisiologici, soggetti con elevata *novelty seeking* mostrano risposte fortemente attenuate ad agonisti del sistema serotoninergico (5-HT) (es. ipsapirone), considerate indice di ridotta capacità funzionale. Effettivamente, nei soggetti *novelty seekers* è stato evidenziato un deficit serotonergico di base e alterazioni nei sistemi monoaminergici e nei livelli di cortisolo (l'ormone dello

stress), che sarebbero probabilmente indipendenti dall'abuso cronico di sostanze psicostimolanti [17]. Come illustrato più avanti, ricerche in questo senso sono state condotte nel laboratorio clinico afferente al gruppo di Gerra [2]. E' stato specificamente studiato il rapporto fra livelli di *novelty seeking* e una serie di parametri ormonali in risposta alla stimolazione farmacologica, in funzione della storia di uso o meno di psicostimolanti (vedi capitolo "Reazione alla *novelty*, attività dell'asse HPA ed effetti dell'amfetamina").

Nonostante le evidenze sperimentali riguardo la marcata neurotossicità [20, 21], un numero considerevole di adolescenti sono sempre più implicati nell'uso ricreazionale di stimolanti amfetamino-simili quali l'MDMA (3,4-methylene-dioxy-methamphetamine) o "ecstasy", uno psicostimolante di sintesi che deve i suoi effetti al rilascio sia di serotonina che di dopamina da parte dei terminali nervosi. Gli effetti del MDMA sul sistema nervoso centrale sono stati ampiamente studiati negli animali di laboratorio [22, 23]. Gli inibitori della sintesi della dopamina sembrano indurre cambiamenti significativi negli effetti dell'ecstasy [24], il che confermerebbe l'ipotesi di una implicazione del sistema dopaminergico [25]. Tale evidenza giustificherebbe le proprietà gratificanti di quest'ultima [26]. Droghe di questa tipologia vengono usate nelle feste da ballo, nei *raves* e negli *after hour* insieme alla musica *techno*, nel tentativo di ridurre la percezione di affaticamento e di aumentare la resistenza fisica ed emotiva [21, 27, 28]. Gli effetti previsti della MDMA, così come vengono riferiti da coloro che la assumono, includono il miglioramento del tono dell'umore, il sentirsi "più vicini" agli altri, l'esaltazione delle sensazioni e delle percezioni "sensuali", l'attivazione delle capacità intuitive, l'attivazione generale [29, 30], suggerendo che questo stimolante amfetamino-simile attiverebbe anche nell'uomo le vie monoaminergiche preposte alle normali regolazioni degli stati emozionali e fisiologici [20, 31, 32].

Gli scarsi protocolli sperimentali condotti su soggetti umani [26] hanno per ora chiarito relativamente poco dei rapporti fra le caratteristiche temperamentali, quali impulsività e aggressività, e l'uso di questo specifico agente psicostimolante, come anche delle conseguenze biologiche e psicologiche di un uso cronico di MDMA. Per questo motivo, in una ricerca clinica molto recente [2], un certo numero di adolescenti assuntori di MDMA, che non presentavano dipendenza da altre sostanze o abuso di alcol, e che non avevano assunto altre sostanze psicoattive per periodi prolungati, sono stati sottoposti a una serie di prove neuroendocrine e psicometriche. Le loro risposte ad uno stress di tipo psicologico, come pure a un'iniezione di d-fenfluramina (farmaco stimolante serotonergico specifico) sono state confrontate con quelle di soggetti di controllo (in buona salute e non assuntori di sostanze). Molti studi clinici avevano precedentemente indicato che le risposte ormonali alla iniezione di agonisti di un determinato neurotrasmettitore rappresentano uno strumento potente per lo studio della funzionalità di questi stessi sistemi (recettori di DA e di 5-HT). I risultati ottenuti indicano che gli assuntori di MDMA, valutati almeno tre settimane dopo la sospensione dell'uso della stessa, appaiono caratterizzati da una risposta al farmaco significativamente ridotta per quanto riguarda il cortisolo e la prolattina. Erano anche evidenziabili la presenza di uno stato depressivo, disforia, elevata aggressività e un punteggio elevato nel comportamento di *novelty seeking* (Fig. 1 e Tab. 1). Si poteva dunque concludere che uno psicostimolante quale l'MDMA potrebbe essere stato inconsapevolmente utilizzato da questi individui in quanto farmaco di auto-medicazione, in grado cioè di compensare una possibile disfunzione di base delle vie monoaminergiche e principalmente del sistema 5-HT [17].

Come verrà chiarito più avanti, la presente rassegna si avvale della potenzialità euristica del metodo comparativo. Le reazioni di *novelty seeking* hanno infatti fornito un modello di base tanto negli animali quanto negli esseri umani. Il modello proposto da Zuckerman [17] è stato inizialmente sviluppato sulla base di studi psicometrici e comportamentali condotti su soggetti umani. Tuttavia, gli avanzamenti correnti sono basati in

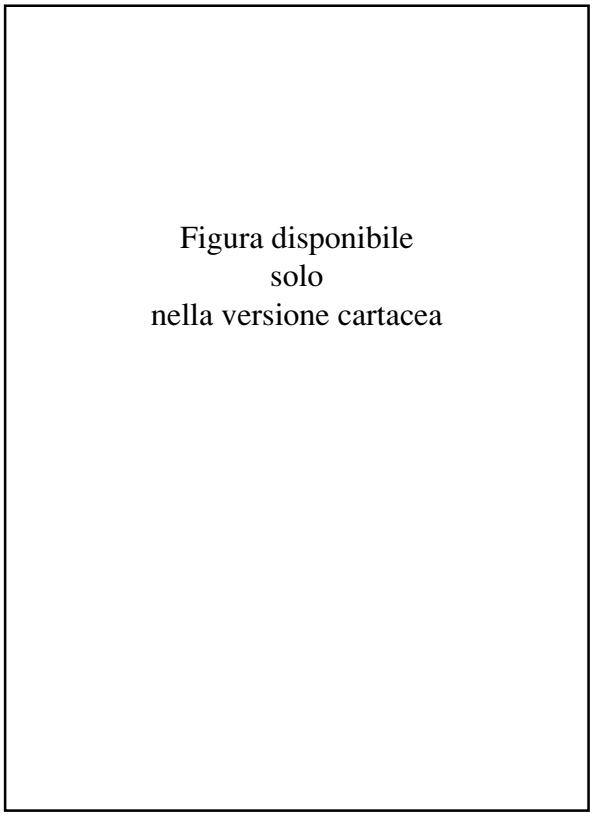


Fig. 1. - Profilo temporale dei livelli di prolattina (pannello superiore) e cortisolo (pannello inferiore) in seguito ad una somministrazione di d-fenfluramina. *Simboli pieni:* individui osservati durante la tarda adolescenza, consumatori di ± 3,4-methylene-dioxymethamphetamine (MDMA). *Simboli vuoti:* volontari normali (n. 15). Riprodotto per gentile concessione da [2].

Tabella disponibile
solo
nella versione cartacea

gran parte sugli studi condotti su altre specie (topi, ratti, gatti e scimmie) e i dati sperimentali e di correlazione tendono a supportare il modello. Un metodo comparativo per studiare la *novelty seeking* viene quindi proposto come un mezzo utile per studiare le basi biologiche e le eventuali regolazioni genetiche di tale caratteristica temperamentale [14].

Nei roditori altriciali, quali ratti e topi, sono state descritte alcune caratteristiche comportamentali e fisiologiche riferibili, anche se con una certa cautela, a quelle evidenziate in soggetti umani caratterizzati da una elevata tendenza alla ricerca di sensazioni forti. L'esplorazione ambientale rappresenta una funzione fondamentale del repertorio comportamentale dei mammiferi, che per ovvie ragioni di adattamento sono biologicamente "disegnati" per prestare più attenzione alle informazioni nuove che non a quelle familiari, e in quanto tali sono essenzialmente cercatori di informazioni. In effetti, i roditori che sono stati studiati sembrano essere attratti tanto dagli stimoli nuovi quanto da variazioni di intensità di quelli familiari [33, 34]. L'esperienza della novità sarebbe associata ad un'attivazione del sistema dopaminergico mesolimbico, misurabile per esempio nell' innalzamento dei livelli di dopamina all'interno dell'area cerebrale del *nucleus accumbens* [35]. Ancora, le lesioni di questa area, indotte da una neurotossina, inibiscono l'espressione del comportamento di *novelty seeking* [36, 37]. Effettivamente, queste stesse aree cerebrali sarebbero coinvolte massicciamente nei fenomeni di gratificazione, indotta sia da stimoli naturali salienti quanto dalle droghe di abuso quali gli psicostimolanti [38-41]. Di conseguenza, la soddisfazione di una pulsione per la *novelty* appare avere la maggior parte delle caratteristiche degli eventi di gratificazione naturali [42].

Nel corso degli ultimi anni, sono state da noi studiate le differenze relative all'età nel comportamento esplorativo di ratti e topi, nel tentativo di identificarne le discontinuità comportamentali e fisiologiche in risposta alla *novelty*. I risultati qui passati in rassegna suggeriscono alcune considerazioni teoriche generali.

Novelty seeking e periadolescenza

Una notevole importanza psicobiologica e clinico-terapeutica sembra avere l'identificazione di periodi ontogenetici critici caratterizzati da aumentati livelli basali di *novelty seeking*, come forse anche da una certa accresciuta sensibilità biologica agli effetti delle sostanze di abuso. La *sensation seeking*, che nell'uomo include la *novelty seeking*, declina con l'età, dopo aver raggiunto un picco nell'adolescenza [14]. Tuttavia, le informazioni sperimentali disponibili nei modelli animali sono ancora scarsamente esplicative, probabilmente perché esse derivano principalmente dallo studio di soggetti adulti [43, 44]. Infatti, sebbene un declino della *novelty-seeking* con l'età sia stato evidenziato anche nel ratto [4], non erano disponibili studi sistematici sulla periadolescenza, definita come il periodo ontogenetico che comprende i 7-10 giorni che precedono l'inizio della pubertà (a circa 40 giorni d'età in ratti e topi) ed i primissimi successivi [11]. L'indagine su un modello animale di transizione adolescenziale è apparsa dunque quantomai necessaria.

Come dimostrato da Spear e Brake e anche da altri autori [11, 9, 45], l'espressione della motivazione esplorativa, che è in gran parte indipendente dall'attività locomotoria generale dell'animale, è maggiore in ratti adolescenti che non in soggetti più giovani o rispettivamente più maturi. Da un punto di vista sociale, gli animali periadolescenti sono inoltre caratterizzati da un elevato coinvolgimento nelle componenti affiliative e ludiche del repertorio comportamentale [46-52], e questa età rappresenta un periodo cruciale per lo sviluppo sociale, anche in quanto - in sintonia con il prepotente rilascio puberale degli ormoni androgeni - dal gioco sociale comincia ad emergere un comportamento agonistico e di lotta simile a quello adulto [53-57]. E' stato proposto da diversi autori che tale profilo comportamentale - facilitando l'espressione dell'esplorazione dell'ambiente e delle interazioni sociali - possa nel suo insieme risultare altamente adattivo per la particolare "nicchia ecologica" occupata dagli animali periadolescenti [11, 46, 49, 58].

Novelty-seeking *(paradigma di scelta libera) ed effetti acuti dell'amfetamina*

In un primo studio condotto nel topo, è stata studiata l'interazione fra una particolare propensione naturale a ricercare stimoli nuovi (*novelty seeking*) e gli effetti di una somministrazione ripetuta ed intermittente con d-amfetamina (ANF). Effettivamente, secondo Bardo *et al*. [59] - che recentemente hanno passato in rassegna gli studi sull'associazione psicobiologica fra la tendenza alla *novelty-seeking* e la propensione all'uso di sostanze psicostimolanti - queste diverse esperienze presenterebbero un substrato neurobiologico comune, vale a dire l'attivazione delle vie dopaminergiche mesolimbiche cerebrali [35, 60, 18], notoriamente collegate ai fenomeni di gratificazione [38-41].

Per fare più luce sulla natura di tali processi e dei sottostanti meccanismi neurobiologici, è stata da noi sviluppata una procedura sperimentale [61] che ha permesso da una parte la familiarizzazione dell'animale con un compartimento specifico di un apparato sperimentale e dall'altra l'associazione ripetuta di tale compartimento con la somministrazione di ANF. Durante questo periodo di addestramento, topi adulti e periadolescenti (33-43 giorni) venivano assegnati a tre diversi gruppi di trattamento, che prevedevano la somministrazione con differenti dosi di ANF (0, 2 o 10 mg/kg i.p.) per tre giorni, e posti in un compartimento familiare di un apparato sperimentale bipartito. Dopo un periodo di 48 ore di *wash-out* dall'ultima iniezione, gli animali venivano esaminati in un paradigma di preferenza per la novità basato sulla scelta libera (*free-choice novelty)*. A tal fine, gli animali venivano disposti al momento del test nel compartimento familiare, associato in precedenza,durante il pretrattamento rispettivamente con ANF o con SAL. Inoltre, per valutare gli effetti acuti della droga sulle prestazioni *novelty-seeking*, agli animali veniva somministrata, come *challenge*, SAL o una dose standard di ANF (2 mg/kg). In accordo con i risultati della letteratura [43, 44, 62], quando ai topi veniva permesso, mediante l'apertura di un divisorio, di muoversi liberamente dal compartimento familiare verso un ambiente (l'altro lato dell'apparato) ad essi completamente sconosciuto, tutti i soggetti mostravano - indipendentemente dalla propria storia individuale di pretrattamento - uno stato di eccitazione motoria e una spiccata preferenza per l'ambiente nuovo. A conferma della nostra ipotesi di lavoro, gli animali periadolescenti trascorrevano una percentuale significativamente più elevata di tempo nel compartimento nuovo, rispetto agli adulti, indicando che un livello più elevato di *novelty-seeking* può essere considerato caratteristico di questa età (Fig. 2, pannello superiore sinistro). Quando si trovavano nell'ambiente nuovo, i periadolescenti esprimevano inoltre, quale altra caratteristica tipica dell'età, un'attivazione locomotoria indotta dalla *novelty*, più elevata rispetto agli adulti [45].

Se, come abbiamo visto, le indagini epidemiologiche segnalano che la *novelty-seeking* è in genere più elevata durante l'adolescenza [14], allora la dimostrazione di un profilo in questo senso conferma la validità di questo modello animale e l'utilità del paradigma sperimentale. Da una prospettiva eco-etologica, è durante il periodo dell'adolescenza che i roditori lasciano il nido e cominciano ad esplorare l'ambiente circostante [58]. In questo senso, i livelli elevati di *novelty-seeking* e di *arousal* indotto dalla novità acquistano una valenza notevolmente adattiva per animali di questa età. La possibilità di nuove esperienze avrebbe inoltre un valore più elevato di gratificazione per i periadolescenti che per soggetti più maturi, e si può pertanto ipotizzare che i sistemi regolatori del sistema nervoso centrale che sottostanno al comportamento di *novelty-seeking* siano regolati a livelli basali differenti nei due gruppi d'età.

Per quanto riguarda gli effetti acuti dell'ANF, una risposta differente veniva evidenziata a seconda dell'età dei soggetti (Fig. 2, pannello superiore destro): con un

Figura disponibile
solo
nella versione cartacea

Fig. 2. - Livelli di *novelty-seeking* misurati come percentuale di tempo trascorso nel compartimento nuovo dai topi delle due età durante il test. Durante il periodo di pre-trattamento (giorni 1, 2 e 3), i topi ricevevano una iniezione giornaliera di ANF (pre-trattamento: 0, 2, o 10 mg/kg) immediatamente prima di essere posti per 20 min nel compartimento familiare. Durante il test (giorno 5), agli animali veniva somministrata SAL (pannello di sinistra) o ANF (2 mg/kg, pannello di destra) ed erano poi posti nel compartimento familiare. Dopo 20 min, una partizione era rimossa e i topi potevano liberamente accedere ad un compartimento nuovo dell'apparato per 15 min. *Pannelli superiori.* Dati presentati in funzione dell'età dei soggetti. *Pannelli inferiori.* Dati presentati in funzione dell'età e del pre-trattamento dei soggetti. ** $P < 0,01$, nel confronto dei gruppi pre-trattati con ANF con i controlli pre-trattati con SAL (n. 10). Riprodotto per gentile concessione da [45].

notevole incremento nei livelli di *novelty seeking* nei topi adulti, mentre una riduzione importante caratterizzava i periadolescenti. E' noto che la risposta all'ANF è fortemente legata alla linea di base [63]. Abbiamo visto che nell'esperimento attuale gli animali adulti mostravano un livello basale di *novelty-seeking* più basso rispetto ai periadolescenti. Dunque, la stimolazione acuta da parte dell'ANF sembrerebbe necessaria per sensibilizzare negli adulti i sistemi regolatori che sottostanno al comportamento di *novelty-seeking*, permettendo a questi soggetti di raggiungere i livelli elevati mostrati dai periadolescenti. In accordo con questo ragionamento, la sovra-stimolazione legata alla somministrazione acuta di ANF sembra produrre invece nei periadolescenti una riduzione profonda della *novelty seeking*, tanto che si può ipotizzare che quest'ultima abbia apparentemente perso le sue proprietà incentivanti. Nell'insieme, i differenti livelli basali, come pure le differenze di età nella risposta alla ANF, sembrano interpretabili come indice, durante la periadolescenza, d'uno spostamento a sinistra nel profilo di risposta a campana agli stimolanti.

Proprietà motivazionali condizionate dell' amfetamina

Nei roditori, l'associazione ripetuta fra la somministrazione di psicostimolanti e la permanenza in un determinato ambiente, dotato di caratteristiche distinte determina una serie di risposte condizionate [64, 65]. Nell'esperimento qui riferito, la motivazione *incondizionata* verso l'esplorazione di un ambiente nuovo è stata posta direttamente a confronto con una motivazione incentivante *condizionata*, cioè l'approccio verso uno specifico ambiente, associato ripetutamente in precedenza con ANF [61]. Una influenza notevole assumeva a questo riguardo l'età dei soggetti e la storia di pretrattamento specifica a ciascuno di essi. Infatti, in risposta a una stimolazione acuta con ANF, venivano evidenziati effetti significativi di trascinamento dell'esperienza precedente con la stessa sostanza (Fig. 2, pannello destro in basso). Infatti, nel gruppo degli adulti, i soggetti con una storia di trattamento con ANF 2 mostravano una preferenza per l'ambiente nuovo significativamente minore rispetto ai controlli (soggetti con storia di trattamento con SAL). In accordo con dati precedenti [69], tali risultati sembrano suggerire che le proprietà incentivanti condizionate dell'ANF erano in grado di svalutare notevolmente, durante il test, la motivazione incondizionata verso la *novelty* . Un profilo opposto veniva evidenziato per i topi con una storia di trattamento con ANF 10, i quali trascorrevano invece sensibilmente più tempo nell'ambiente nuovo rispetto ai soggetti degli altri due gruppi. In questo caso, si può supporre che un *arousal* eccessivo, indotto da un dosaggio elevato di ANF durante il pretrattamento, abbia prodotto un'avversione condizionata per lo scompartimento ad essa associato in precedenza: di fronte alla possibilità di scegliere liberamente, questi soggetti cercavano quindi rifugio nell'altro compartimento [61, 65, 66].

Per contro, nessun effetto di trascinamento della storia veniva evidenziato negli animali periadolescenti. Poiché, come vedremo anche in seguito, dopo la somministrazione acuta di ANF 10, soltanto i soggetti adulti esibivano frequenze elevate di comportamento stereotipato, è probabile che i topi periadolescenti non abbiano avvertito le componenti negative (vedi di seguito, stesso capitolo) degli effetti dell'ANF [66, 67], e non abbiano pertanto sviluppato avversione condizionata all'ambiente ad essa associato. In risposta alla somministrazione di ANF, i roditori mostrano generalmente, in funzione del dosaggio, un profilo di iperattività locomotoria o una sindrome di comportamento stereotipato [65, 68, 69]. L'iperattività locomotoria è prodotta da determinati dosaggi di ANF, così come da altre sostanze di abuso [68]. Si ritiene che alla espressione di tale comportamento contribuisca il rilascio di dopamina a livello del *nucleus accumbens* [69]. Poiché lo stesso substrato neuronale sembrerebbe modulare sia la gratificazione soggettiva che l'espressione dell'eccitazione locomotoria, l'iperattività indotta da ANF è stata considerata come un indice indiretto di gratificazione [70], in certo qual modo assimilabile all'euforia indotta da questa droga negli esseri umani. Si ritiene inoltre che l'espressione di comportamenti stereotipati possa rientrare in un meccanismo messo in atto al fine di fare fronte ad un *arousal* eccessivo indotto dalla sostanza [71, 72]. A causa dell'esperienza di *poor-welfare* (contesto nel quale la frequenza di questi comportamenti compulsivi aumenta considerevolmente), le stereotipie potrebbero facilmente essere alla base delle proprietà avversive dell'ANF [65-67, 73]. I risultati della dettagliata analisi comportamentale effettuata in questo studio sembrano confermare tale ipotesi. Occorre notare la comparsa di una notevole differenza relativa all'età. Il gruppo di topi adulti esprimeva, con frequenza elevatissima, il comportamento di *compulsive licking*, una tipica stereotipia indotta dall'ANF. D'altra parte, i soggetti periadolescenti mostravano, a parità di dosaggio, una maggiore sensibilizzazione della risposta locomotoria, senza evidenza del comportamento stereotipato tipico degli adulti. Si può ipotizzare che i soggetti più giovani non avrebbero sperimentato una condizione di *poor welfare* con conseguente mancanza di sviluppare avversione condizionata per l'ambiente associato al pretrattamento (Fig. 2, pannello a destra in basso). In generale, questi risultati indicano indirettamente che i periadolescenti potrebbero essere in qualche misura "protetti" dalle proprietà avversive dell'ANF, e invece maggiormente vulnerabili a stati interni di gratificazione, rispetto ad animali più maturi.

Nel corso dello stesso studio, un'altra differenza interessante relativa all'età è emersa con l'applicazione di una metodologia statistica multivariata [45] che permette che ciascun comportamento specifico sia rappresentato in uno spazio multidimensionale. Il comportamento di base dei periadolescenti (gruppo SAL) era sbilanciato verso le attività dirette verso se stessi: gli animali di questo gruppo risultavano raggruppati più vicino al polo del *grooming* (autopulizia della pelliccia), mentre il corrispondente gruppo di adulti occupava una posizione intermedia sullo stesso asse. In seguito alla somministrazione acuta con ANF, veniva osservato uno spostamento significativo dei soggetti dal polo di *grooming* al polo opposto di *crossing-rearing* (comportamenti di movimento ed esplorazione verso l'ambiente). Di nuovo, lo spostamento esibito dai soggetti giovani era particolarmente più pronunciato di quello mostrato dagli adulti. Sembra quindi che i topi periadolescenti esprimano in generale una serie di comportamenti maggiormente sbilanciati ed estremi (*extremes-directed behaviours*) rispetto agli adulti, e questo risultato costituisce una ulteriore conferma che la periadolescenza rappresenta un'età peculiare, sia da un punto di vista comportamentale che farmacologico [1].

Modificazioni relative all'età in risposta alla somministrazione cronica di psicostimolanti

Sviluppo di sensibilizzazione: il caso della cocaina

Malgrado l'abuso di sostanze sia oggi un tema di importanza critica soprattutto nella fascia della popolazione adolescente [10, 45, 66], sono ancora limitate le caratterizzazioni in età evolutiva degli effetti che un uso cronico di sostanze psicoattive può avere sui meccanismi cerebrali della gratificazione. Le alterazioni indotte direttamente da queste sostanze potrebbero a loro volta, per un processo a cascata, generare modifiche tali nei meccanismi di rinforzo, da rendere più probabile l'uso compulsivo della sostanza stessa. La somministrazione cronica di un agente psicoattivo dà luogo in genere a una riduzione della ampiezza degli effetti di questo ad una somministrazione successiva. Questo fenomeno, caratterizzato da uno spostamento a destra nella curva dose-risposta, è noto come tolleranza. Per contro, alcuni regimi di somministrazione producono invece una risposta accentuata ad ogni somministrazione successiva della stessa sostanza. Questo fenomeno è associato con uno spostamento a sinistra nella curva dose-risposta ed è conosciuto come "tolleranza inversa" o sensibilizzazione [74]. Entrambi questi processi (tolleranza e sensibilizzazione) si pensa possano contribuire in modo importante nello sviluppo della farmacodipendenza sia nell'uomo che in modelli animali [75].

Individui giovani, intorno o subito dopo la pubertà, segnalano effetti trascurabili dopo aver "sniffato alcune linee" di cocaina, di modo che sembrerebbe logico che essi possano sentirsi spinti a ripetere tale esperienza per vedere che cosa può accadere [76]. Tuttavia, altre evidenze indicano che la progressione nell'uso della cocaina sembra essere più rapida fra i soggetti adolescenti che fra i soggetti adulti. Un risultato che suggerisce che la cocaina può avere un potenziale "di aggancio" più marcato fra gli adolescenti che fra gli individui maturi [77]. Tali indicazioni sono di particolare importanza poiché è proprio durante l'adolescenza che si hanno solitamente le prime esperienze con sostanze psicoattive [78].

I fenomeni di sensibilizzazione sono stati scarsamente studiati in modelli animali dell'età evolutiva, ed è importante ricordare a questo proposito che importanti riorganizzazioni ontogenetiche hanno luogo, durante questa fase, nei sottostanti sistemi neurobiologici. A loro volta tali processi potrebbero dar conto dei livelli differenti di vulnerabilità alle droghe nelle diverse età [66, 79, 80]. I risultati sopra riportati con l'ANF vanno nella stessa direzione di uno studio relativamente recente condotto in un'altra specie di roditori, il ratto [66], che ha evidenziato importanti differenze relative all'età.

Lo sviluppo della sensibilizzazione comportamentale alla cocaina si sviluppava con caratteristiche tipiche dell'età [66], con gli animali periadolescenti che mostravano, contrariamente agli adulti, una maggiore sensibilizzazione agli effetti di attivazione locomotoria (Fig. 3, pannelli superiori), mentre nei soli adulti era presente un profilo di sensibilizzazione di comportamenti stereotipati, quali lo *head bobbing* e il *focussed sniffing*. Tali risultati suggeriscono nuovamente che, in funzione dell'età, componenti distinte del repertorio comportamentale sono influenzate dalla somministrazione intermittente e ripetuta delle stesse dosi della sostanza. La frequenza ridotta delle stereotipie indotte dalla droga, nell'adolescente, può inoltre essere interpretata come un indice della presenza di componenti affettive differenziali stimolate dalla cocaina negli animali delle due classi di età [65, 73, 81].

L'incremento nell'espressione di una determinata risposta comportamentale indotto dalla somministrazione di psicostimolanti si ritiene associato a un incremento della funzionalità del sistema dopaminergico. Una serie di studi ha evidenziato cambiamenti biochimici e funzionali indotti a livello del sistema dopaminergico in seguito a una esposizione prolungata a psicostimolanti [82, 83]. Per esempio, l'aumentato rilascio di DA dai terminali dei neuroni nigrostriatali e mesolimbici, è stato postulato per spiegare una condizione indotta di subsensitività a livello degli autorecettori DA e quindi un ridotto tono inibitorio da parte di questi, come conseguenza di una stimolazione farmacologica ripetuta.

Tali alterazioni in meccanismi neurobiologici si ritiene svolgano un ruolo importante nel fenomeno della sensibilizzazione comportamentale [83]. E' dunque possibile che diversi livelli di plasticità della funzione dopaminergica siano alla base delle differenze relative all'età nella risposta alla somministrazione ripetuta agli psicostimolanti.

Ancora, queste differenze tra età potrebbero riflettere differenze anatomiche nell'ontogenesi di tale plasticità. In tal senso va tenuto presente che la iper-locomozione indotta dagli psicostimolanti sarebbe dovuta alla stimolazione delle aree mesolimbiche dopaminergiche, mentre l'induzione di comportamenti stereotipati sarebbe associata ad un incremento della funzione a livello extrapiramidale [69]. Ci sono evidenze che i neuroni *nigrostriatal* presenti in ratti immaturi siano meno sensibili agli effetti inibitori di dosi cumulative di amfetamina rispetto ai neuroni di ratti adulti [84]. E' stato anche ipotizzato che le vie nigrostriatali e/o il trasportatore della dopamina nei periadolescenti possano differire da quelli dei ratti adulti [10]. Il meccanismo neurochimico che sarebbe responsabile della ridotta sensibilità agli psicostimolanti in animali periadolescenti è tuttavia ancora non chiarito, dato che la maggior parte degli indici di funzionalità dopaminergica, compreso il numero di cellule neuronali, la densità dei terminali dopaminergici, la densità del trasportatore ed il numero dei recettori sarebbero giunti ormai a maturazione entro questa età [85]. Tuttavia, alcuni studi neurofarmacologici

Figura disponibile
solo
nella versione cartacea

Fig. 3. - *Pannelli superiori.* Numero di attraversamenti *(matrix crossings)* mostrati da femmine di ratto delle due età iniettate con cocaina (10 mg/kg) durante il test. Gli istogrammi bianchi indicano gli effetti acuti della cocaina negli animali pre-trattati con SAL, mentre gli istogrammi ombreggiati rappresentano gli animali che hanno ricevuto una somministrazione ripetuta di cocaina (10 o 20 mg/kg una volta al giorno per 4 giorni; n. 8-10 in ciascun gruppo). *Pannelli inferiori.* Frequenza dello *stereotyped sniffing* mostrato da femmine di ratto (gli animali sono gli stessi dei pannelli superiori). Riprodotto per gentile concessione da [66].

suggeriscono un grado differenziale di maturazione funzionale, durante la fase periadolescenziale, per quanto riguarda gli autorecettori dopaminergici nelle aree mesolimbiche e striatali [11, 86].

Nello studio appena illustrato [66], sono stati anche monitorati il consumo di cibo e la crescita corporea in funzione della somministrazione cronica con cocaina. Alterazioni per questi parametri sono state riscontrate solamente nei maschi adulti, e non nei periadolescenti di entrambi i sessi. Ciò suggerisce la partecipazione di una componente ormonale, consistente per es. nella presenza di livelli elevati di testosterone, che renderebbero i maschi adulti più suscettibili degli animali giovani (immaturi sessualmente) e delle femmine. Sono presenti infatti in letteratura evidenze per un rapporto inverso fra i livelli di testosterone plasmatico e gli effetti acuti dell'amfetamina o della cocaina, come pure fra i livelli dell'ormone e la sensibilizzazione comportamentale osservata dopo un trattamento cronico con queste sostanze [66, 87-91].

L'interazione fra la reazione alla *novelty*, il sistema fisiologico di risposta allo stress e gli psicostimolanti

Reazione alla novelty*, attività dell'asse HPA ed effetti dell'amfetamina*

Come descritto precedentemente, gli individui caratterizzati da una elevata *sensation-novelty seeking* sono spesso coinvolti in attività ad elevato rischio potenzialmente stressanti che vengono generalmente evitate dalle altre persone [15]. La ricerca continua di stimoli nuovi può dar conto in questi soggetti dei livelli elevati di irrequietezza e di curiosità sfrenata, e in tal senso anche della facilità nei primi approcci alle droghe [1, 6]. Questi dati portano a ipotizzare che l'esperienza connessa con il rischio e la novità, come pure l'uso di sostanze psicostimolanti, possano avere un valore incentivante maggiore per gli adolescenti che non per i soggetti più maturi [45].

In questo contesto, ha suscitato recentemente un notevole interesse scientifico lo studio dell'interazione fra il sistema di gratificazione cerebrale, sotteso cioè dalle vie mesolimbiche dopaminergiche, e il sistema ormonale di risposta allo stress, vale a dire l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA). Sarebbe stata dimostrata un'azione stimolatoria sull'asse HPA da parte del sistema dopaminergico mesolimbico [92, 93]. Effettivamente, lesioni dei neuroni dopaminergici presenti nella area tegmentale ventrale danno luogo a una riduzione considerevole del rilascio di corticosterone (CORT) sia in condizioni basali che in seguito a stress [94]. Lo stato funzionale dell'asse HPA modula d'altro canto gli effetti di gratificazione degli psicostimolanti [95-98], e il CORT indurrebbe effetti gratificanti di per sé, come si evince

dal fatto che esso viene prontamente auto-somministrato dagli animali [99]. Inoltre, una disregolazione nel *feedback* negativo della secrezione di CORT, in risposta a una condizione di stress, è stata associata al tipico profilo comportamentale di *novelty-seeking*, a una elevata reattività a stimoli nuovi, e a una vulnerabilità specifica verso gli psicostimolanti [4, 97]. Ancora, oltre ai loro effetti comportamentali classici, gli psicostimolanti attivano l'asse HPA e stimolano la secrezione sia dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) che di CORT [100]. Tenendo conto di tutte queste considerazioni e poiché la maggior parte di questi studi sperimentali sono stati anch'essi condotti pricipalmente su soggetti adulti [59], è parso necessario estendere tali indagini ad un modello animale di transizione adolescenziale [3].

Esposizione forzata ad un ambiente nuovo

Sono presenti in letteratura due principali paradigmi sperimentali, impiegati al fine di caratterizzare la reazione degli animali alla novità [4, 59, 101]. Nel primo, cioè il paradigma di scelta libera (che è stato adottato nello studio descritto nel capitolo precedente), al momento del test il soggetto può muoversi liberamente fra il compartimento nuovo e quello familiare. In questo caso, ratti e topi esibiscono solitamente una spiccata preferenza per l'ambiente nuovo [43, 44, 61, 62, 102] senza mostrare alcun aumento significativo dei livelli di CORT [103]; il che starebbe a indicare la mancanza di un concomitante stato di stress. Per contro, nel paradigma di esposizione forzata (*forced novelty*), i soggetti sono posti in un ambiente nuovo dal quale non possono fuggire. In queste circostanze, ratti e topi mostrano una risposta integrata di stress, che consiste in un comportamento di iperattività - un misto di tentativi di fuga e di esplorazione [42, 104, 105] - e in un rapido innalzamento dei livelli di CORT [103, 106, 107].

Come riportato in precedenza, i topi periadolescenti esibiscono livelli più elevati di *novelty-seeking* nel paradigma di scelta libera, rispetto agli adulti [45]. In quello studio, si era ipotizzato che tali differenze comportamentali fra i soggetti delle due età fossero collegate alla particolare funzionalità dell'asse HPA. L'analisi è stata pertanto estesa al profilo locomotorio ed ormonale che emerge nel paradigma sperimentale della *forced novelty*. Va inoltre sottolineato che discontinuità relative all'età nella risposta a una condizione di stress psicologico sono state indicate come possibili fattori psicobiologici di rischio per la vulnerabilità all'offerta di sostanze ricreazionali [45, 66, 108].

Effetti acuti dell'amfetamina sull'attività locomotoria

Un primo esperimento [9] ha caratterizzato il comportamento espresso in un ambiente nuovo, in condizioni di *forced novelty*, e in seguito ad una somministrazione acuta con ANF in topi sia adulti che periadolescenti. Per quanto riguarda la misura di locomozione, i risultati indicano (Fig. 4, pannelli superiori) che rispetto agli adulti, i soggetti di controllo periadolescenti (gruppo SAL) sono caratterizzati da elevati livelli basali di attività. Questo dato può essere interpretabile come un *deficit* di abituazione agli stimoli nuovi, caratteristico dei soggetti periadolescenti. Risultati della letteratura indicano infatti che ratti e topi periadolescenti sarebbero caratterizzati da elevati livelli basali di attivazione, con *deficit* apparenti di attenzione per quanto riguarda le indicazioni ambientali salienti [11]. Come previsto, la somministrazione di un dosaggio di ANF 2 produceva in generale un aumento dell'attività locomotoria ed esplorativa. Tuttavia, un profilo di iperattività meno pronunciato era tipico dei periadolescenti rispetto agli adulti. Dati della letteratura indicano che soggetti osservati intorno a questa età sarebbero caratterizzati da una peculiare ipo-responsività agli effetti acuti di agonisti dopaminergici quali cocaina

Figura disponibile
solo
nella versione cartacea

Fig. 4. - *Pannelli superiori.* Attività locomotoria (numero di interruzioni di fotocellule ad infrarossi/secondo). Gli animali sono stati iniettati con SAL o ANF (2 o 10 mg/kg) ed immediatamente posti in un ambiente nuovo (n. 10). * P < 0,05, ** P < 0,01, nei confronti multipli fra le due età. *Pannelli centrali.* Livelli plasmatici di corticosterone misurati come incremento percentuale rispetto alla *baseline*. Gli animali sono gli stessi dei pannelli superiori. *Pannello inferiore.* Durata media di un episodio di comportamento stereotipato *lick-gnaw* (durata totale/frequenza). Gli animali sono gli stessi dei pannelli superiori. ** P < 0,01 nei confronti multipli fra le due età.
Riprodotto per gentile concessione da [9].

e amfetamina. Gli stessi soggetti presenterebbero invece una risposta comportamentale accentuata ad un antagonista quale l'aloperidolo [10, 11, 45, 66, 109].

Come sottolineato da Spear e Brake [11], i ratti periadolescenti mostrano, rispetto ad animali più giovani o rispettivamente più maturi, alterazioni di risposta psicofarmacologica che sembrano ascrivibili non tanto ad una specifica riduzione di concentrazione della sostanza a livello cerebrale, quanto ad alterazioni specifiche di sensibilità neurobiologica. Per verificare questa ipotesi, Spear e Dendel [11] hanno esaminato i livelli cerebrali di amfetamina in ratti di entrambi i sessi e di varie età dopo un'iniezione di 5 mg/kg. A diversi intervalli di tempo dopo l'iniezione, i livelli cerebrali di ANF non differivano fra soggetti di 35 giorni, di 45 giorni e adulti. Tuttavia, mentre la risposta comportamentale all'ANF risultava molto simile nei ratti adulti e in quelli più giovani, i soggetti di 45 giorni esibivano una risposta relativamente attenuata all'ANF. Questi risultati sarebbero in accordo con quelli di Campbell *et al*. [109] in cui la attenuazione relativa all'età nella sensibilità agli effetti farmacologici risultava sostanzialmente indipendente dalla via di somministrazione adottata (p.o., i.p., oppure i.c.v.), la quale veniva variata sistematicamente nel tentativo di escludere una potenziale influenza farmacocinetica.

Un certo numero di fattori di maturazione possono contribuire a questo fenomeno, uno dei quali sembrerebbe consistere in una attenuazione temporanea nell'efficacia funzionale delle proiezioni mesolimbiche dopaminergiche, con conseguente ridotta attività generale di tale sistema [11]. Studi recenti nel ratto hanno effettivamente riscontrato livelli ridotti di dopamina cerebrale in ratti periadolescenti [110, 111]. Inoltre, il profilo comportamentale e farmacologico tipico di soggetti osservati intorno a questa età risulta simile a quello di animali adulti che abbiano subito lesioni del sistema dopaminergico [11]. Un altro processo maturazionale potenzialmente coinvolto è costituito dallo sviluppo funzionale degli autorecettori per la dopamina, i quali raggiungerebbero un grado di maturazione funzionale proprio durante la periadolescenza. Effettivamente, la somministrazione di una dose bassa di apomorfina è in grado di ridurre l'attività locomotoria spontanea, probabilmente mediante l'attivazione degli autorecettori D2, in ratti di 35 giorni, ma non in quelli più giovani [112]. L'instaurarsi di questo controllo a feedback negativo potrebbe dunque essere responsabile di una transitoria iporesponsività all'interno del sistema mesolimbico.

Effetti acuti dell'amfetamina sul rilascio di corticosterone

Nello studio appena descritto (Fig. 4), sono state evidenziate anche importanti differenze di età dal punto di vista ormonale: i topi periadolescenti esibivano livelli basali di CORT circa doppi rispetto agli adulti (10,5 ± 4,5 contro 4,7 ± 1,9 μg/ml, rispettivamente). Tale profilo sembrerebbe indice di una funzionalità di base dell'asse HPA più marcata negli animali di questa età [113]. Questo dato può essere attribuito, almeno per i maschi, ad un'immaturità della funzione gonadica. Infatti, è stata ipotizzata un'azione inibitoria cronica - mediata dagli androgeni - sull'attività basale dell'HPA [88, 89], ed i roditori nel periodo peripuberale presenterebbero infatti un rapporto molto più basso tra peso testicolare e peso corporeo rispetto agli adulti [114].

Come indicato nella Fig. 4 (pannelli centrali), in seguito a un'esposizione forzata a un ambiente nuovo, i soggetti adulti iniettati con SAL mostravano un profilo di elevazione costante nei livelli di CORT durante la sessione, mentre soltanto una tendenza verso un lieve incremento era associata ai corrispondenti soggetti periadolescenti. Tali risultati indicano che la periadolescenza sarebbe associata nel topo ad una ridotta risposta neuroendocrina ad una condizione di stress psicologico prolungata. L'asse HPA sembra dunque essere in qualche modo iporesponsivo alle perturbazioni esterne durante questa fase dello sviluppo. Sono tuttavia presenti in letteratura anche risultati apparentemente contrastanti [115]. Come previsto in base alla letteratura [100, 116], la somministrazione di una dose di ANF 2 produceva un aumento notevole del rilascio di CORT nei soggetti adulti, mentre la dose elevata di ANF 10 esercitava un'azione apparentemente opposta, suggerendo la presenza di una curva dose-risposta con un profilo a campana.

Riguardo ai soggetti periadolescenti, in assenza di effetti della dose ANF 2, la somministrazione di un dosaggio elevato di ANF 10 induceva soltanto un aumento tendenziale nei livelli di CORT. Quindi, alla fase adolescenziale sembrerebbe corrispondere uno spostamento verso destra della curva dose-risposta dell'ANF, ovvero una marcata iporesponsività dell'asse HPA alla somministrazione di questo stimolante. Tali risultati sono particolarmente interessanti in considerazione della scarsità di studi dedicati alla ontogenesi degli effetti modulatori dell'ANF sui livelli di CORT. In uno studio recente, è stata riportata una riduzione ad opera dell'ANF dei livelli di CORT in animali di 18 giorni [108], mentre un profilo opposto risultava tipico di soggetti adulti [100, 108, 116]. Dall'insieme di questi dati, si può concludere che la periadolescenza avrebbe le caratteristiche d'un'età di transizione per quanto riguarda la funzione dell'asse HPA.

Una serie di studi recenti del gruppo di Kellogg [117, 118] hanno preso in esame il ruolo svolto, durante il periodo adolescenziale, dai processi di maturazione delle proiezioni dopaminergiche sensibili allo stress, e dei sistemi neuronali ad esse correlati. Sembra che le proiezioni noradrenergiche, che vanno dal tronco dell'encefalo all'ipotalamo - preposte alla capacità

dell'organismo di reagire o adattarsi appropriatamente a uno stress ambientale - non abbiano ancora completato la propria maturazione, e vadano invece ancora incontro a modifiche funzionali durante l'adolescenza. E' stato possibile dimostrare in questi studi, che una condizione di stress quale il *restraint* ridurrebbe il rilascio di norepinefrina (NE) ipotalamica nel ratto giovane (28 giorni), non avrebbe effetti nell'adolescente (42 giorni), producendo invece un rilascio massimale nel ratto adulto (70 giorni). La risposta ipotalamica noradrenergica allo stress varia dunque nel corso dello sviluppo adolescenziale.

Quindi, mentre i soggetti adulti affrontano uno stress aumentando il rilascio della NE, i soggetti giovani sembrano reagire diminuendone l'utilizzazione. Giovani e adolescenti sembrano rispondere ad uno stress ambientale conservando e limitando l'uso dei loro depositi endogeni del trasmettitore. La sensibilità allo stress da parte di questo sistema neurochimico sembra dunque essere ridotta durante l'adolescenza. Come sottolineato da Kellogg *et al*. [117, 118], poiché i sistemi in corso di maturazione sono anche maggiormente vulnerabili a possibili perturbazioni, i cambiamenti che avvengono a livello ipotalamico durante l'adolescenza potrebbero contribuire anche alla comparsa di sindromi psicopatologiche durante questa fase della vita.

Sindromi di stereotipie comportamentali indotte dall'amfetamina

Tenendo conto dei risultati degli studi passati in rassegna precedentemente [45, 65], è stata effettuata un'analisi fine del comportamento e del profilo di stereotipie stimolate dall'ANF [65]. In risposta alla somministrazione acuta di un dosaggio elevato, i periadolescenti esprimevano livelli elevati di attività locomotoria (Fig. 4, pannelli superiori). Per contro, diversamente dai periadolescenti, i soggetti adulti esibivano livelli quasi massimali di stereotipie comportamentali (Fig. 4, pannello inferiore). Tale profilo generale può essere interpretato nel contesto d'un modello di competizione della risposta. In questi animali, il profilo di comportamento stereotipato risultava particolarmente interessante, poiché ogni singolo episodio compulsivo era molto intenso, con una durata di parecchi minuti.

Le sindromi di comportamento stereotipate sono state attribuite ad una stimolazione delle vie dopaminergiche presenti nell'area del *caudato-putamen* [68, 69]. I risultati riportati possono essere interpretati alla luce di una recente caratterizzazione ontogenetica dei recettori dopaminergici cerebrali nel ratto. Intorno alla pubertà (40 giorni), si osserva una sovraespressione dei recettori striatali dopaminergici, mentre la densità di questi recettori segue successivamente un profilo in discesa, fino a raggiungere i livelli tipici degli adulti [119]. Le aree cerebrali quali lo *striatum* e il *nucleo accumbens* sembrano maturare ad un ritmo differente, e l'organizzazione neuronale raggiunta durante la periadolescenza risulterebbe particolarmente differente da quella degli adulti. Come descritto da Teicher *et al*. [120], tali risultati sosterrebbero l'ipotesi che una sovraproduzione ed eliminazione di sinapsi e di recettori durante l'adolescenza possa rappresentare un fattore permissivo nei riguardi di un certo numero di disordini psichiatrici ad insorgenza precoce, quali ad es. la schizofrenia, la sindrome di iperattività con o senza deficit d'attenzione, e probabilmente anche l'abuso di sostanze. Questi dati preclinici concordano inoltre con dati clinici, che hanno dimostrato una notevole sovraproduzione ed eliminazione dei recettori D1 e D2 nelle zone striatali durante l'infanzia e l'adolescenza [121].

Come detto precedentemente, una certa scuola di pensiero ritiene che le sterotipie possano inquadrarsi come un meccanismo comportamentale (antistress) messo in atto nel tentativo di fare fronte a un *arousal* eccessivo indotto dalla ANF [71, 72]. I risultati presenti, ottenuti nei topi adulti, sembrerebbero in accordo con questa ipotesi, poiché i soggetti trattati con ANF 10 mostravano allo stesso tempo una sindrome di comportamento stereotipata molto intensa e una riduzione dei livelli di CORT. La letteratura su questo tema non è tuttavia univoca, e sono presenti anche risultati contrastanti [100, 108, 122]. Appare in ogni caso molto interessante che una risposta integrata neuroendocrina e comportamentale di tal genere risulti per lo più assente nel topo periadolescente.

In accordo con i risultati precedenti, è stata osservata negli animali periadolescenti una risposta ridotta ad una somministrazione acuta con ANF. Analogamente, si è visto che i periadolescenti mostrano una sensibilità ridotta all'ANF in un paradigma di preferenza condizionata [45], come pure una notevole resistenza a sviluppare *taste-aversion* [123]. Una volta considerati nel loro insieme, questi dati supportano l'ipotesi di una generale iporesponsività agli effetti acuti degli psicostimolanti nei soggetti periadolescenti, sia da un punto di vista comportamentale, ormonale e motivazionale [11]. Questo profilo complesso e integrato è stato associato a discontinuità evolutive nei sistemi dopaminergici mesolimbico e striatale [119].

In base a queste considerazioni, si potrebbe inizialmente concludere che, almeno per quanto riguarda gli effetti acuti degli psicostimolanti, i periadolescenti sarebbero in qualche modo protetti, e che godrebbero quindi di un certo grado generale di "invulnerabilità" nei riguardi del rischio di sviluppare una dipendenza farmacologica. Tuttavia, come descritto da Ramsay e Wood [124], tale iniziale insensibilità agli effetti delle cosiddette droghe potrebbe costituire invece un rischio maggiore. Effettivamente è plausibile pensare che gli adolescenti della nostra specie, proprio perché

inizialmente insensibili, possano più facilmente ripetere più volte nel tempo le loro esperienze con sostanze psicotrope, e sviluppare problemi collegati all'abuso (mediati ad es. da sensibilizzazione e/o tolleranza). In questo senso, racconti anedottici riportano che soggetti giovani, quindi intorno o subito dopo la pubertà, riporterebbero effetti trascurabili in seguito alla assunzione per via intranasale di alcune "linee" di cocaina [76]. Tuttavia la progressione nell'uso di questa sostanza sembrerebbe invece essere più rapido fra questo gruppo che non fra soggetti più maturi [77]. Per quanto riguarda i modelli animali, come descritto in precedenza, in seguito a una somministrazione ripetuta ed intermittente di cocaina o di ANF, una sensibilizzazione più marcata della risposta locomotoria sarebbe tipica dei soggetti periadolescenti [45, 66]. Visto che le medesime aree cerebrali (cioè, soprattutto il *nucleo accumbens*) sarebbero implicate sia nell'iperattività locomotoria che nella modulazione della gratificazione indotta dall'ANF [41, 70], si può ipotizzare che i soggetti intorno a questa età sviluppino invece una sensibilità maggiore alle proprietà gratificanti degli psicostimolanti in seguito a esperienze ripetute, e andrebbero quindi incontro ad una maggiore "vulnerabilità" psicobiologica all'offerta di sostanze psicotrope, con un rischio più marcato di sviluppare una condizione di tossicodipendenza.

Osservazioni conclusive

Durante il periodo dell'infanzia e dell'adolescenza, importanti sistemi neurobiologici sono ancora protagonisti di notevoli processi di riorganizzazione ontogenetica. La strutturazione finale del cervello e il numero di neuroni e di assoni disponibili sembrano essere stabiliti molto precocemente durante l'infanzia. Il cervello, tuttavia conserva ancora durante l'adolescenza una elevata plasticità e nel corso di tale periodo ha luogo in effetti un processo integrato di sovraproduzione e eliminazione di sinapsi e una maturazione finale di specifici sistemi neurotrasmettitoriali [3]. Inoltre, i principali livelli ormonali presentano drammatici cambiamenti, come conseguenza dell'insorgere della pubertà. Parallelamente a tali processi biologici, si presentano transizioni significative nelle competenze conoscitive, psicologiche e sociali dell'individuo. Tuttavia, come sollevato da Witt [3], una scarsa attenzione investigativa è stata rivolta alla comprensione del ruolo svolto dalle variabili ambientali durante l'adolescenza, compresa l'esperienza, specie se protratta, con un certo numero di sostanze psicotrope. Questi fattori possono avere conseguenze drammatiche sull'organismo in sviluppo, sia da un punto di vista neurobiologico che psicofisiologico, predisponendo (o viceversa proteggendo) l'individuo per quanto riguarda il rischio di sviluppare abuso e/o dipendenza da sostanze. Una maggiore comprensione degli effetti degli psicostimolanti durante l'adolescenza, e dell'interazione fra fattori genetici, neurobiologici, psicosociali ed ambientali, potrebbe dar luogo all'elaborazione di strategie più precoci e possibilmente più efficaci di trattamento e prevenzione.

Elevati livelli di *novelty-seeking* sono tipici degli adolescenti della nostra specie [14], il che può forse spiegare i primi approcci con un certo numero di agenti psicoattivi. Come sembrano indicare gli studi con modelli animali, i topi periadolescenti trascorrono una percentuale significativamente maggiore di tempo in un compartimento nuovo, rispetto agli adulti [45]. Questi risultati suggeriscono che, attraverso le varie specie di mammiferi, l'adolescenza emerge come una fase caratterizzata da una forte pulsione per la ricerca di stimoli nuovi. Inoltre, in modelli animali, l'esperienza volontaria con stimoli nuovi si rivela in grado di attivare il sistema cerebrale della gratificazione, in modo similare a ciò che si riscontra in seguito alla somministrazione con sostanze d'abuso [59]. Il fatto che uno stimolo naturale, quale l'esperienza di *novelty* volontaria, sia in grado di agire sugli stessi meccanismi cerebrali della gratificazione, sui quali esercitano la propria azione importante anche le cosiddette droghe, potrebbe dar conto a livello neurobiologico (anche se, è bene ripeterlo, a fini puramente speculativi) di alcune evidenze epidemiologiche. Secondo queste infatti, gli individui *sensation/novelty seekers* sarebbero anche molto più rappresentati tra i gruppi di popolazione coinvolti nell'abuso di droghe rispetto ad altri. Tali considerazioni suggerirebbero l'esigenza di raggiungere tali individui con interventi di prevenzione mirati.

Infine, si presuppone spesso che la pressione esercitata dalle variabili sociali, dai coetanei e da altre variabili socio-psicologiche, sia alla base del manifestarsi di un certo grado di devianza comportamentale tipica di alcuni adolescenti. Non viene tuttavia sufficientemente considerata l'importanza del contributo esercitato in tale processo da una importante componente biologica: lo sviluppo ancora in corso, negli adolescenti, per quanto riguarda determinati parametri anatomici, fisiologici e comportamentali. Pertanto, è altamente auspicabile in questo contesto, una comprensione più profonda di tali fattori psicobiologici, e i risultati degli studi svolti in tal senso dovrebbero essere considerati nei programmi di prevenzione e salute pubblica.

Ringraziamenti

Questa ricerca è stata svolta come parte del progetto "Fattori psicobiologici di rischio o di protezione per i disordini del comportamento e la vulnerabilità all'offerta di sostanze ricreazionali in età evolutiva" (responsabile Giovanni Laviola) Istituto Superiore di Sanità, Roma, e Ministero per La Solidarietà Sociale, "Fondo Nazionale per la Lotta alla Droga". Siamo riconoscenti a E. Alleva, G. Bignami, F. Chiarotti e L.P. Spear per l'interazione preziosa nel corso

degli anni. La ricerca originale riportata in questo articolo è stata possibile anche grazie all'importante contributo fornito da F. Cirulli e A. Zaimovic. Desideriamo ringraziare Angelina Valanzano per la sua disponibilità ed elevata competenza tecnica.

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 12 gennaio 2000.

BIBLIOGRAFIA

1. COMPAS, B.E., HINDEN, B.R. & GERHARDT, C.A. 1995. Adolescent development. Pathways and processes of risk and resilience. *Annu. Rev. Psychol.* **46**: 265-293.

2. GERRA, G., ZAIMOVIC, A., GIUCASTRO, G., MAESTRI, D., MONICA, C., SARTORI, R., CACCAVARI, R. & DELSIGNORE, R. 1998. Serotonergic function after (±)3,4-methylene-dioxymethamphetamine (ecstasy) in humans. *Int. Clin. Psychopharmacol.* **13**: 1-9.

3. WITT, E.D. 1994. Mechanisms of alcohol abuse and alcoholism in adolescents. A case for developing animal models. *Behav. Neural Biol.* **62**: 168-177.

4. DELLU, F., PIAZZA, P.V., MAYO, W., LE MOAL, M. & SIMON, H. 1996. Novelty-seeking in rats. Biobehavioral characteristics and possible relationship with the sensation-seeking trait in man. *Neuropsychobiology* **34**: 136-145.

5. LAVIOLA, G. & TERRANOVA, M.L. 1998. The developmental psychobiology of behavioural plasticity in mice. The role of social experiences in the family unit. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **23**: 197-213.

6. MATHIAS, R. 1996. Students' use of marijuana, other illicit drugs, and cigarettes continued to rise in 1995. *NIDA Notes* **11**: 8-9.

7. YAMAGUCHI, K. & KANDEL, D.B. 1984. Patterns of drug use from adolescence to young adulthood. III. Predictors of progression. *Am. J. Publ. Health* **74**: 673-681.

8. NEWCOMB, M.D. 1985. Identifying high-risk youth. Prevalence and patterns of adolescent drug abuse. *NIDA Res. Mon. Series* **156**: 7-37.

9. ADRIANI, W. & LAVIOLA, G. 1999. A unique hormonal and behavioral hyporesponsivity to both forced novelty and d-amphetamine in periadolescent mice. *Neuropharmacology* **39**: 334-346.

10. BOLANOS, C.A., GLATT, S.J. & JACKSON, D. 1998. Subsensitivity to dopaminergic drugs in periadolescent rats. A behavioral and neurochemical analysis. *Dev. Brain Res.* **111**: 25-33.

11. SPEAR, L.P. & BRAKE, S.C. 1983. Periadolescence: age-dependent behavior and psycho-pharmacological responsivity in rats. *Dev. Psychobiol.* **16**: 83-109.

12. ANTHONY, J.C. & PETRONIS, K.R. 1995. Early-onset drug use and risk of later drug problems. *Drug Alcohol Dep* **40**: 9-15.

13. BRESLAU, N. & PETERSON, E.L. 1996. Smoking cessation in young adults. Age at initiation of cigarette smoking and other suspected influences. *Am. J. Pub. Health* **86**: 214-220.

14. ZUCKERMAN, M. 1994. *Behavioral expressions and biosocial bases of sensation seeking*. Cambridge University Press, Cambridge.

15. WILLS, T.A., VACCARO, D. & MCNAMARA, G. 1994. Novelty seeking, risk taking and related constructs as predictors of adolescent substance use: An application of Cloninger's theory. *J. Subst. Ab.* **6**: 1-20.

16. ARNETT, J. 1992. Reckless behavior in adolescence: A developmental perspective. *Dev. Rev.* **12**: 339-373.

17. ZUCKERMAN, M. 1996. The psychobiological model for impulsive unsocialized sensation seeking: A comparative approach. *Neuropsychobiology* **34**: 125-129.

19. NETTER, P., HENNIG, J. & ROED, I.S. 1996. Serotonin and dopamine as mediators of sensation seeking behavior. *Neuropsychobiology* **34**: 155-165.

20. MCCANN, U.D., RIDENOUR, A., SHAHAM, Y. & RICAURTE, G.A. 1994. Serotonin neurotoxicity after (±)3,4-methylene-dioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). A controlled study in humans. *Neuropsychopharmacology* **10**: 129-138.

21. RANDALL, T. 1992. Ecstasy-fueled "rave" parties become dances of death for English youths. *JAMA* **269**: 1505-1506.

22. RICAURTE, G.A., DELANNEY, L.E., IRWIN, I. & LANGSTON, J.W. 1988. Toxic effects of MDMA on central serotonergic neurons in the primate. Importance of route and frequency of drug administration. *Brain Res.* **446**: 165-168.

23. SCHMIDT, C.J. 1987. Neurotoxicity of the psychedelic amphetamine, methylene-dioxy-methamphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **240**: 1-7.

24. BRODKINN, J., MALYALA, A. & NASH, J.F. 1993. Effect of acute monoamine depletion on 3,4-methylene-dioxymethamphetamine-induced neurotoxicity. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **45**: 647-653.

25. CADET, J.L., LADENHEIM, B., HIRATA, H., ROTHMAN, R.B., ALI, S. & CARLSON, E. 1995. Superoxide radicals mediate the biochemical effects of methylene-dioxymethamphetamine (MDMA): Evidence from using CUZn-superxide dismutase transgenic mice. *Synapse* **21**: 169-176.

26. McCANN, U.D. & RICAURTE, G.A. 1993. Reinforcing subjective effects of (±)3,4-methylene-dioxymethamphetamine ("ecstasy") may be separable from its neurotoxic actions. Clinical evidence. *J. Clin. Psychopharmacol.* **13**: 214-217.

27. GERRA, G., ZAIMOVIC, A., CHITTOLINI, B., GIUCASTRO, G., PALLADINO, M., GAGGIOTTI, M.T. & CACCAVARI, R. 1996. Methylene-dioxymethamphetamine. Neuroendocrine and behavioural aspects. *Quaderno di Psichiatria* **3**: 159-167.

28. GREEN, A.R., CROSS, A.J. & GOODWIN, G.M. 1995. Review of the pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylene-dioxymethamphetamine (MDMA or "ecstasy"). *Psychopharmacology* **119**: 247-260.

29. GREER, G. & STRASSMAN, R.J. 1985. Information on "ecstasy" (letter). *Am. J. Psychiatry* **142**: 1391.

30. SOLOWIJ, N., HALL, W. & LEE, N. 1992. Recreational MDMA use in Sydney. A profile of "Ecstasy" users and their experiences with the drug. *Br. J. Addiction* **87**: 1161-1172.

31. KATZ, M.M., MAAS, J.W., FRAZER, A., KOSLOW, S.H., BOWDEN, C.L., BERMAN, N. *et al.* 1994. Drug-induced actions on brain neurotransmitter system and changes in the behaviors and emotions of depressed patients. *Neuropsychopharmacology* **11**: 89-100.

32. YOUNG, L.T., WARSH, J.J., KISH, S.J., SHANNAK, K. & HORNYKEIWICZ, O. 1994. Reduced brain 5-HT and elevated NE turnover and metabolites in bipolar affective disorder. *Biol. Psychiatry* **35**: 121-127.

33. RENNER, M.J. & SELTZER, C.P. 1991. Molar characteristics of exploratory and investigatory behavior in the rat *(Rattus norvegicus). J. Comp. Psychol.* **105**: 326-339.

34. WILZ, K.J. & BOLTON, R.L. 1971. Exploratory behavior in response to the spatial rearrangement of familiar stimuli. *Psychon. Sci.* **24**: 117-118.

35. REBEC, G.V., CHRISTIANSEN J.R.C., GUERRA, C. & BARDO, M.T. 1996. Phasic increases in extracellular dopamine during a free-choice novelty task as measured by fast-scan voltammetry. *Soc. Neurosci. Abstr.* **22**: 159.

36. FINK, J.S. & SMITH, G.P. 1980. Mesolimbic and mesocortical dopaminergic neurons are necessary for normal exploratory behavior in rats. *Neurosci. Lett.* **17**: 61-65.

37. PIERCE, C.R., CRAWFORD, C.A., NONNEMAN, A.J., MATTINGLY, B.A. & BARDO, M.T. 1990. Effects of forbrain dopamine depletion on novelty-induced place preference behavior in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **36**: 321-325.

38. HOEBEL, B.G., MONACO, A.P., HERNANDEZ, L., AULISI, E.F., STANLEY, B.G. & LENARD, L. 1983. Self-injection of amphetamine directly into the brain. *Psychopharmacology* **81**: 158-163.

39. ROBBINS, T.W. & EVERITT, B.J. 1996. Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr. Opinion Neurobiol.* **6**: 228-236.

40. ROBERTS, D.C., CORCORAN, M.E. & FIBIGER, H.C. 1977. On the role of ascending catecholaminergic systems in intravenous self-administration of cocaine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **6**: 615-620.

41. WISE, R.A. 1996. Neurobiology of addiction. *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**: 243-251.

42. RENNER, M.J. 1990. Neglected aspects of exploratory and investigatory behavior. *Psychobiology* **18**: 16-22.

43. BARDO, M.T., NEISEWANDER, J.L. & PIERCE, R.C. 1988. Novelty-induced place preference behavior in rats. Effect of opiate and dopaminergic drugs. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **32**: 683-689.

44. MISSLIN, R. & ROPARTZ, P. 1981. Effects of metamphetamine on novelty-seeking behavior by mice. *Psychopharmacology* **75**: 39-43.

45. ADRIANI, W., CHIAROTTI, F. & LAVIOLA, G. 1998. Elevated novelty seeking and typical d-amphetamine sensitization in periadolescent compared to adult mice. *Behav. Neurosci.* **112**: 1152-1166.

46. CIRULLI, F., TERRANOVA, M.L. & LAVIOLA, G. 1996. Affiliation in periadolescent rats. Behavioral and corticosterone response to social reunion with familiar and unfamiliar partners. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **54**: 99-105.

47. MEANEY, M.J. & STEWART, J. 1981. A descriptive study of social development in the rat (*Rattus norvegicus*). *Animal Behav.* **29**: 34-45.

48. PANKSEPP, J. 1981. The ontogeny of play in rats. *Dev. Psychobiol.* **14**: 327-332.

49. TERRANOVA, M.L., CIRULLI, F. & LAVIOLA, G. 1999. Behavioral and hormonal effects of partner familiarity in periadolescent rat pairs upon novelty exposure. *Psychoneuro-endocrinology* **24**: 639-656.

50. TERRANOVA, M.L., LAVIOLA, G. & ALLEVA, E. 1993. Ontogeny of amicable social behavior in the mouse: Gender differences and ongoing isolation outcomes. *Dev. Psychobiol.* **26**: 467-481.

51. TERRANOVA, M.L., LAVIOLA, G., DEACETIS, L. & ALLEVA, E. 1998. A description of the ontogeny of mouse agonistic behavior. *J. Comp. Psychol.* **112**: 3-12.

52. THOR, D.H. & HOLLOWAY, W.R. 1984. Developmental analyses of social play behavior in juvenile rats. *Bull. Psychon. Soc.* **22**: 587-590.

53. BARKLEY, M.S. & GOLDMAN, B.D. 1977. A Quantitative study of serum testosterone, sex accessory organ growth, and the development of intermale aggression in the house mouse. *Horm. Behav.* **8**: 208-218.

54. BENTON, D. & BRAIN, P.F. 1979. Behavioural comparison of isolated, dominant and subordinate mice. *Behav. Proc.* **4**: 211-219.

55. BRONSON, F.H. 1989. *Mammalian reproductive biology*. University of Chicago Press, Chicago.

56. MCKINNEY, T.D. & DESJARDINS, C. 1973. Postnatal development of the testis and fighting behaviour and fertility in mice. *Biol. Reprod.* **9**: 279-294.

57. WILLIAMS, E. & SCOTT, J.P. 1953. The development of social behavior patterns in the mouse, in relation to natural periods. *Behaviour* **6**: 35-65.

58. GALEF, B.G. 1981. The ecology of weaning: Parasitism and the achievement of independence by altricial mammals. In: *Parental Care in Mammals* D.J. Gubernick & P.H. Klopfer (Eds). Plenum Press, New York. p. 211-241.

59. BARDO, M.T., DONOHEW, R.L. & HARRINGTON, N.G. 1996. Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. *Behav. Brain Res.* **77**: 23-43.

61. LAVIOLA, G. & ADRIANI, W. 1998. Evaluation of unconditioned novelty seeking and d-amphetamine conditioned motivation in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **59**: 1011-1020.

62. HUGHES, R.N. 1968. Behavior of male and female rats with free choice of two environments differing in novelty. *Animal Behav.* **16**: 92-96.

63. GLICK, S.D. 1 MILLOY, S. 1973. Rate-dependent effects of d-amphetamine on locomotor activity in mice. Possible relationship to paradoxical amphetamine sedation in minimal brain dysfunctions. *Eur. J. Pharmacol.* **24:** 266-268.

64. LAVIOLA, G., DELL'OMO, G., ALLEVA, E. & BIGNAMI, G. 1992. Ontogeny of cocaine hyperactivity and conditioned place preference in mice. *Psychopharmacology* **107**: 221-228.

65. LAVIOLA, G., DELL'OMO, G., CHIAROTTI, F. & BIGNAMI, G. 1994. D-Amphetamine conditioned place preference in developing mice. Relation with changes in activity and stereotypies. *Behav. Neurosci.* **108**: 514-524.

66. LAVIOLA, G., WOOD, R.D., KUHN, C., FRANCIS, R. & SPEAR, L.P. 1995. Cocaine sensitization in periadolescent and adult rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **275:** 345-357.

67. LETT, B.T. 1988. Enhancement of conditioned preference for a place paired with amphetamine produced by blocking the association between place and amphetamine-induced sickness. *Psychopharmacology* **95**: 390-394.

68. KELLY, P.H., SEVIOUR, P.W. & IVERSEN, S. 1975. Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum. *Brain Res.* **94**: 507-522.

69. STATON, D.M. & SOLOMON, P.R. 1994. Microinjections of d-amphetamine into the nucleus accumbens and caudate-putamen differentially affect stereotipy and locomotion in the rat. *Physiol. Psychol.* **12**: 159-162.

70. WISE, R.A. & BOZARTH, M.A. 1987. A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol. Rev.* **94**: 469-492.

71. JONES, G.J., MITTLEMAN, G. & ROBBINS, T.W. 1989. Attenuation of amphetamine-stereotypy by mesostriatal dopamine depletion enhances plasma corticosterone. Implications for stereotypy as a coping response. *Behav. Neural Biol.* **51**: 80-91.

72. MITTLEMAN, G., JONES, G.H. & ROBBINS, T.W. 1991. Sensitization of amphetamine-stereotypy reduces plasma corticosterone. Implications for stereotypy as a coping response. *Behav. Neural Biol.* **56**: 170-182.

73. WALL, A., HINSON, R.E., SCHMIDT, E., JOHNSON, C. & STREATHER, A. 1990. Place conditioning with d-amphetamine: The effect of the CS-UCS interval and evidence of a place avoidance. *Anim. Learn. Behav.* **18**: 393-400.

74. STEWART, J. & BADIANI, A. 1993. Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs. *Behav. Pharmacol.* **4**: 289-312.

75. GOUDIE, A.J. & EMMETT-OGLESBY, M.W. 1989. *Psychoactive drugs: tolerance and sensitization*. Humana Press, New Jersey.

76. WEISS, R.D., MIRIN, S.M. & BARTEL, R.L. 1994. *Cocaine*. American Psychiatric Press, Washington.

77. ESTROFF, T.W., SCHWARTZ, R.H. & HOFFMAN, N.G. 1989. Adolescent cocaine abuse. Addictive potential, behavioral and psychiatric effects. *Clin. Pediatr.* **28**: 550-555.

78. JOHANSON, C. & FISHMAN, M.W. 1989. The pharmacology of cocaine related to its abuse. *Pharmacol. Rev.* **41**: 3-52.

79. McDOUGALL, S.A., DUKE, M.A., BOLANOS, C.A. & CRAWFORD, C.A. 1994. Ontogeny of behavioral sensitization in the rat. Effects of direct and indirect dopamine agonists. *Psychopharmacology* **116**: 483-490.

80. WOOD, R.D., TIRELLI, E., SNYDER, K.J., HEYSER, C.J., LAROCCA, T.M. & SPEAR, L.P. 1998. Evidence for behavioral sensitization to cocaine in preweanling rat pups. *Psychopharmacology* **138:** 114-123.

81. MASON, G.J. 1991. Stereotypies. A critical review. *Anim. Behav.* **41**: 1015-1037.

82. KALIVAS, P.W., SORG, B.A. & HOOKS, M.S. 1993. The pharmacology and neural circuitry of sensitization to psychostimulants. *Behav. Pharmacol.* **4**: 315-334.

83. YI, S. & JOHNSON, K.M. 1990. Chronic cocaine treatment impairs the regulation of synaptosomal ^{3}H-DA release by D_2 autoreceptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **36**: 457-461.

84. TRENT, F., NAKAMURA, S. & TEPPER, J.M. 1991. Amphetamine exerts anomalous effects on dopaminergic neurons in neonatal rats *in vivo*. *Eur. J. Pharmacol.* **204**: 265-272.

85. LIN, M. & WALTERS, D.E. 1994. Dopamine D2 autoreceptors in rats are behaviorally functional at 21 but not 10 days of age. *Psychopharmacology* **114**: 262-268.

86. SHALABY, I.A., DENDEL, P.S. & SPEAR, L.P. 1981. Differential functional ontogeny of presynaptic receptor regulation. *Develop. Brain Res.* **1**: 434-439.

87. BECKER, J.B., ROBINSON, T.E. & LORENS, K.A. 1982. Sex differences and estrus cycle variations in amphetamine-elicited rotational behavior. *Eur. J. Pharmacol.* **80**: 65-72.

88. HANDA, R.J., BURGESS, L.H., KERR, J.E. & O'KEEFE, J.A. 1994. Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Horm. Behav.* **28**: 464-476.

89. HANDA, R.J., NUNLEY, K.M., LORENS, S.A., LOUIE, J.P., MCGIVERN, R.F. & BOLNOW, M.R. 1994. Androgen regulation of adrenocorticotropin and corticosterone secretion in the male rat following novelty and foot shock stressors. *Physiol. Behav.* **55**: 117-124.

90. ROBINSON, T.E., BECKER, J.B. & PRESTY, S.K. 1982. Long-term facilitation of amphetamine-induced rotational behavior and striatal dopamine release produced by a single exposure to amphetamine. Sex differences. *Brain Res.* **253**: 231-241.

91. FORGIE, M.L. & STEWART, J. 1994. Sex differences in the locomotor-activating effects of amphetamine. Role of circulating testosterone in adulthood. *Physiol. Behav.* **56**: 639-644.

92. FULLER, R.W., SNODDY, H.D., MASON, N.R., CLEMENS, J.A. & BEMIS, K.G. 1983. Elevation of serum corticosterone in rats by dopamine agonists related in structure to pergolide. *Neuroendocrinology* **36**: 285-290.

93. FULLER, R.W. & SNODDY, H.D. 1981. Elevation of serum corticosterone concentrations in rats by pergolide and other dopamine agonists. *Endocrinology* **109**: 1026-1032.

94. CASOLINI, P., KABBAJ, M., LEPRAT, F., PIAZZA, P.V., ROUGE-PONT, F., ANGELUCCI, L., SIMON, H., LE MOAL, M. & MACCARI, S. 1993. Basal and stress-induced corticosterone secretion is decreased by lesion of mesencephalic dopaminergic neurons. *Brain Res.* **622**: 311-314.

95. PIAZZA, P.V. & LE MOAL, M. 1996. Pathophysiological basis of vulnerability to drug abuse. Role of an interaction between stress, glucocorticoids, and dopaminergic neurons. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**: 359-378.

96. PIAZZA, P.V. & LE MOAL, M. 1998. The role of stress in drug self-administration. *Tr. Pharmacol. Sci.* **19**: 67-74.

97. PIAZZA, P.V., MACCARI, S., DEMINIERE, J.M., LE MOAL, M., MORMEDE, P. & SIMON, H. 1991. Corticosterone levels determine individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **88**: 2088-2092.

98. BADIANI, A., MORANO, M.I., AKIL, H. & ROBINSON, T.E. 1995. Circulating adrenal hormones are not necessary for the development of sensitization to the psychomotor activating effects of amphetamine. *Brain Res.* **673**: 13-24.

99. PIAZZA, P.V., DEROCHE, V., DEMINIERE, J.M., MACCARI, S., LE MOAL, M. & SIMON, H. 1993. Corticosterone in the range of stress-induced levels possess reinforcing properties: Implications for sensation-seeking behaviors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 11738-11742.

100. SWERDLOW, N.R., KOOB, G.F., CADOR, M., LORANG, M. & HAUGER, R.L. 1993. Pituitary-adrenal axis responses to acute amphetamine in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **45**: 629-637.

101. WELKER, W.I. 1957. "Free" versus "forced" exploration of a novel situation by rats. *Psychol. Rep.* **3**: 95-108.

102. GRIEBEL, G., BELZUNG, C., MISSLIN, R. & VOGEL, E. 1993. The free-exploratory paradigm: An effective method for measuring neophobic behaviour in mice and testing potential neophobia reducing drugs. *Behav. Pharmacol.* **4**: 637-644.

103. MISSLIN, R., HERZOG, F., KOCH, B. & ROPARTZ, P. 1982. Effects of isolation, handling and novelty on the pituitary-adrenal response in the mouse. *Psychoneuroendocrinology* **7**: 217-221.

104. BLANCHARD, R.J., KELLEY, M.J. & BLANCHARD, D.C. 1974. Defensive reactions and exploratory behavior in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **87:** 1129-1133.

105. EXNER, M. & CLARK, D. 1993. Behaviour in the novel environment predicts responsiveness to d-amphetamine in the rat. A multivariate approach. *Behav. Pharmacol.* **4**: 47-56.

106. FILE, S.E. & PEET, L.A. 1980. The sensitivity of the rat corticosterone response to environmental manipulations and to chronic chlordiazepoxide treatment. *Physiol. Behav.* **25**: 753-758.

107. HENNESSY, M.B., HEYBACH, J.P., VERNIKOS, J. & LEVINE, S. 1979. Plasma corticosterone concentrations sensitively reflect levels of stimulus intensity in the rat. *Physiol. Behav.* **22**: 821-825.

108. CIRULLI, F., ADRIANI, W. & LAVIOLA, G. 1997. Sexual segregation in infant mice: Behavioral and neuroendocrine responses to d-amphetamine administration. *Psychopharmacology* **134**: 140-152.

109. CAMPBELL, A., BALDESSARINI, R.J. & TEICHER, M.H. 1988. Decreasing sensitivity to neuroleptic agents in developing rats. Evidence for a pharmacodynamic factor. *Psychopharmacology* **94**: 46-51.

110. ANDERSEN, S.L. & GAZZARA, R.S. 1993. The ontogeny of apomorphine-induced alterations of neostriatal dopamine release: effects of spontaneous release. *J. Neurochem.* **61**: 2247-2255.

111. NOMURA, Y., YOTSUMOTO, I. & OKI, K. 1981. Age-related changes in the central catecholaminergic function and its interaction with methamphetamine during postnatal life in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.* **33**: 264-266.

112. SHALABY, I.A. & SPEAR, L.P. 1980. Psychopharmacological effects of low and high doses of apomorphine during ontogeny. *Eur. J. Pharmacol.* **67**: 451-459.

113. HENNING, S.J. 1978. Plasma concentrations of total and free corticosterone during development in the rat. *Am. J. Physiol.* **235**: E451-E456.

114. FLICKINGER, C.J., HERR, J.C., BARAN, M.L. & HOWARDS, S.S. 1995. Testicular development and the formation of spermatic granulomas of the epididymis after obstruction of the vas deferens in immature rats. *J. Urol.* **154**: 1539-1544.

115. STONE, E.A. & QUATERMAIN, D. 1988. Greater behavioral effect of stress in immature as compared to mature male mice. *Physiol. Behav.* **63**: 143-145.

116. KNYCK, E.T. & EISENBERG, R.M. 1979. Effect of amphetamine on plasma corticosterone in the conscious rat. *Neuroendocrinology* **29**: 110-118.

117. CHOI, S. & KELLOGG, C.K. 1996. Adolescent development influences functional responsiveness of noradrenergic projections to the hypothalamus in male rats. *Dev. Brain Res.* **94**: 144-151.

118. CHOI, S., WEISBERG, S.N. & KELLOGG, C.K. 1997. Control of endogenous norepinephrine release in the hypothalamus of male rats changes over adolescent development. *Dev. Brain Res.* **98**: 134-141.

119. TEICHER, M., ANDERSEN, S.L. & HOSTETTER, J.C. 1995. Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. *Dev. Brain Res.* **89**: 167-172.

120. TEICHER, M.H., ANDERSEN, S.L., GLOD, C.A. *et al.* 1997. Neuropsychiatric disorders of childhood and adolescence. In: *Textbook of neuropsychiatry.* S.C. Yudofsky & R.E. Hales (Eds). 3. ed. American Psychiatric Press, Washington, DC. p. 903-941.

121. SEEMAN, P., BZOWEJ, N., GUAN, H., BERGERON, C., BECKER, L.E., REYNOLDS, G.P., BIRD, E.D., RIEDERE, P., JELLINGER, K., WATANABE, S. & TOURTELLOTTE, W.W. 1987. Human brain receptors in children and aging adults. *Synapse* **1**: 399-404.

122. SPANGLER, R., ZHOU, Y., SCHLUSSMAN, S.D., HO, A. & KREEK, M.J. 1997. Behavioral stereotypies induced by a "binge" cocaine administration are independent of drug-induced increases in corticosterone levels. *Behav. Brain Res.* **86**: 201-204.

123. INFURNA, R.N. & SPEAR, L.P. 1979. Developmental changes in amphetamine-induced taste aversions. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **11**: 31-35.

124. RAMSAY, D.S. & WOODS, S.C. 1997. Biological consequences of drug administration. Implications for acute and chronic tolerance. *Psychol. Rev.* **104**: 170-193.

Ann. Ist. Super. Sanità, vol. 36, n. 1 (2000), pp. 63-68

Le infezioni sessualmente trasmesse nella popolazione di tossicodipendenti

Giovanni REZZA, Francesca FARCHI e Massimo GIULIANI

Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - Le sostanze stupefacenti d'abuso o quelle usate a scopo ricreativo hanno numerosi effetti sul comportamento sessuale, effetti che variano in ragione del tipo, quantità, modalità di assunzione e periodo d'uso. L'assunzione di queste sostanze è associata ad una diminuita capacità del consumatore di attuare misure di prevenzione contro le malattie sessualmente trasmesse o le gravidanze indesiderate, e negli ultimi anni molta attenzione è stata posta a questa associazione soprattutto dopo l'espansione dell'epidemia da HIV. Vengono presentati gli studi più recenti su questo argomento e condotti su diverse popolazioni di tossicodipendenti che utilizzano numerosi tipi di sostanze assunte per via parenterale o inalatoria.

Parole chiave: tossicodipendenza, malattie sessualmente trasmesse, epidemiologia.

Summary *(Sexually transmitted diseases among drug abusers).* - Abused drugs have several effects on sexual behaviour, which are related to the type, quantity, modality of assumption, and duration of abuse. Specifically, persons under the influence of drugs may fail to practice safe sex, increasing the risk of acquiring sexually transmitted diseases (STD) and of unplanned pregnancies. In recent years, many studies have been conducted to explore the association between drug use and the risk of STD, including HIV infection. The present paper is a review of these studies, which have been conducted in different parts of the world and among individuals with various modalities of drug assumption.

Key words: drug use, sexually transmitted diseases, epidemiology.

Introduzione

L'associazione fra abuso di sostanze, comportamento sessuale e malattie sessualmente trasmesse (MST) costituisce un connubio noto da tempo, tanto da essere entrato nel linguaggio comune diventando oggetto di esplicito riferimento nel titolo di alcune canzoni (es. *sex, drug and rock'nd roll*) o di velato riferimento verso alcune "desiderabili" preferenze maschili (es. Bacco, Tabacco e Venere).

Negli ultimi anni tuttavia l'emergenza di nuove MST, la progressiva espansione dell'infezione da HIV e la modificazione dello spettro delle sostanze abusate verso un più largo consumo di droghe stimolanti hanno risvegliato nei ricercatori l'esigenza di comprendere meglio le caratteristiche di questa complessa associazione. Anche se la quasi totalità degli studi è stata condotta utilizzando modelli trasversali di indagine (meno accurati dei metodi longitudinali) per valutare differenze nel rischio MST in non assuntori di droghe rispetto agli assuntori, i dati raccolti sembrano concordare su un aumentato rischio di infezioni sessuali tra questi ultimi.

Molte sostanze stupefacenti, soprattutto se utilizzate a scopo ricreativo, hanno effetti sulla sessualità e molte di queste sono spesso utilizzate proprio per correggere problemi sessuali sottostanti o più semplicemente per aumentare il risultato dell'atto sessuale. Viene infatti ritenuto che l'uso di sostanze stimolanti determini un miglioramento della performance sessuale soprattutto attraverso l'induzione di un comportamento più disinibito, l'accrescimento della libido e del desiderio, un incremento del rendimento sessuale o un accrescimento del piacere e della durata dell'orgasmo.

Tuttavia le azioni che queste sostanze determinano sul comportamento sessuale non hanno sempre un effetto "stimolante" e soprattutto variano considerevolmente in funzione del loro tipo, quantità, modalità di assunzione e periodo d'uso [1] (Tab.1). Anche l'uso di farmaci psicotropi come di alcuni antidepressivi può avere importanti effetti di stimolazione sul comportamento sessuale [2].

Una caratteristica invece in comune a tutte le sostanze d'abuso, alcol compreso, è quella di agire deprimendo le capacità di controllo volontario del comportamento, determinando nello specifico un aumento del rischio di due importanti esiti biologici del rapporto sessuale: le malattie sessualmente trasmesse e le gravidanze indesiderate.

Studi condotti su popolazioni di pazienti psichiatrici hanno mostrato come il comportamento sessuale sotto l'effetto di droghe, psicofarmaci o alcol sia più spesso in questi individui associato a MST o a gravidanze indesiderate. Uno studio su 239 pazienti psichiatrici

Tabella 1. - Effetti di alcune sostanze d'abuso su alcuni parametri del comportamento sessuale

Sostanza	Effetto					
	Inibizione	Libido	Potenza	Erezione	Qualità orgasmo	Durata coito
Acido lisergico (LSD)	α	ε	ε	ε	ε	ε
Amilnitriti	α	ε	δ	δδ	δδδ	δδδ
Anfetamine	αα	δ	ε	ε	δδ	δδ
Cocaina	ααα	δ (αα)	δδ	δ (α)	δδ	δδ
Crack	αα	?	δ	?	δ	ε
Ecstasy	α	?	?	?	?	?
Eroina	α	ααα	αα	α	α	α
Marijuana	αα	ε / α	ε (αα)	ε	ε	ε

?: effetto non noto; ε : effetto non rilevabile; α: moderata depressione; αα: depressione; ααα: significativa depressione; δ: moderato aumento; δδ: aumento; δδδ: significativo aumento. Tra parentesi sono indicati gli effetti in caso di uso prolungato.

istituzionalizzati ha mostrato che tra i maschi l'uso inalatorio di cocaina cristallizzata (crack) durante i rapporti sessuali era associato a un inadeguato uso del preservativo e a rapporti con partner a rischio [3].

Per queste ragioni lo stretto connubio tra uso di sostanze psicotrope o stupefacenti e comportamento sessuale è stato oggetto di molta attenzione da parte della letteratura biomedica degli ultimi 20 anni.

Droghe e comportamento sessuale negli adolescenti

L'uso di droghe o di sostanze stimolanti in età precoce è oggi indicato tra i fattori maggiormente implicati nell'aumento del rischio di contrarre MST negli adolescenti.

Un'indagine condotta in Germania nel 1995 su oltre 3000 adolescenti tra i 14 e i 24 anni, ha stimato prevalenze d'uso di "ecstasy" (3,4-metilenediossimetamfetamina o MDMA) e di allucinogeni rispettivamente variabili tra il 3% e il 4% tra i maschi, e tra il 2% e il 3% tra le femmine. L'indagine ha inoltre mostrato, rispetto ad un'indagine analoga condotta cinque anni prima, un aumento della diffusione d'uso di circa il doppio nella stessa popolazione [4]. Negli Stati Uniti un recente studio sui comportamenti a rischio dei giovani mostra come il 26,2% degli studenti delle scuole superiori abbia già fatto uso di marijuana e il 2,1% di droghe per via endovenosa [5].

In uno studio condotto a Brooklyn, New York, attraverso la rilevazione di oppiacei nelle urine, l'11% di un campione di 111 giovani tra i 18 e i 21 anni, quasi tutti (89%) sessualmente attivi, risulta consumatore di cocaina. Inoltre il 24% di questi giovani aveva una infezione da *Chlamydia trachomatis* in atto, e il 50% anticorpi anti-HSV2 [6]. Tra i giovani, l'associazione tra comportamento sessuale a rischio e uso di cocaina e di marijuana è stata segnalata da uno studio condotto su un campione di 3054 studenti arruolati nelle scuole di Boston, Massachusetts, nel 1993 [7]. Anche in un studio olandese su un campione di adolescenti le attività di consumo di sostanze a scopo ricreazionale si associavano ad un elevato tasso di ricambio del "partner" e ad un frequente scambio di sesso per droga [8].

Negli ultimi anni l'attenzione è stata soprattutto rivolta all'associazione tra uso di droghe e comportamenti sessuali a rischio per la diffusione dell'infezione da HIV.

In uno studio condotto su 3220 omosessuali maschi sieronegativi per HIV, un incremento del rischio di sesso non protetto è risultato associato con eccessivo uso di alcol (OR: 1,66; IC: 1,18-2,33), problemi di alcol nel passato (OR: 1,25; IC: 1,05-1,48), ed uso attuale di droga (OR: 1,26; IC: 1,08-1,48). L'esame di associazioni con specifiche droghe ha messo in evidenza un'associazione con uso corrente di cocaina ed altri stimolanti (OR: 1,25; IC: 1,018-1,55), allucinogeni (OR: 1,40; IC: 1,10-1,77), e inalanti quali i nitriti (leggero: OR: 1,61; IC: 1,35-1,92), (pesante: OR: 2,18; IC: 1,48-3,20) [9]. Altri autori hanno mostrato come il tasso di fallimento del preservativo aumenti con l'uso di anfetamine e di alcol [10].

La stretta relazione tra uso di droghe e MST è stata sottovalutata soprattutto a causa della estrema diffusione dell'infezione da HIV fra gli assuntori di eroina per via endovenosa, che ha spostato su questa popolazione l'attenzione circa le modalità di acquisizione e

trasmissione parenterale delle infezioni, piuttosto che su quella per via sessuale. Ciò del resto pareva giustificato dal fatto che la frazione di infezioni da HIV attribuibile alla modalità parenterale era sicuramente predominante tra gli iniettori di eroina rispetto alla trasmissione sessuale.

E' invece da riconsiderare il ruolo che tra i tossicodipendenti per via endovenosa la trasmissione sessuale ha avuto nella diffusione dell'infezione da HIV, e questo soprattutto tra le donne tossicodipendenti che negli studi di coorte hanno mostrato tassi di incidenza di HIV più elevati rispetto ai maschi, probabilmente proprio quale effetto cumulativo del rischio parenterale e di quello sessuale [11, 12].

Tossicodipendenza e MST

Molti studi hanno confermato un impatto maggiore delle MST tra i tossicodipendenti rispetto ai coetanei non tossicodipendenti dello stesso sesso. In particolare, in uno studio di Webster *et al.* la frequenza di MST riportata dai tossicodipendenti era considerevolmente più elevata rispetto agli studenti universitari della stessa età usati come controlli (19% *vs* 5% negli uomini, e 8% *vs* 0,3% nelle donne) [13].

Un'elevata frequenza di MST nei tossicodipendenti è peraltro riportata in diversi studi. In 243 tossicodipendenti olandesi, l'8% dei maschi ed il 16% delle femmine riportava una storia di sifilide, rispettivamente il 32% ed il 60% gonorrea, ed il 5% e 22% herpes genitale [14]. In uno studio statunitense oltre un terzo dei maschi tossicodipendenti e più della metà delle femmine intervistate in uno studio australiano riportavano una storia positiva per almeno una MST nel corso della loro vita [15].

Di particolare interesse è oggi il capitolo relativo alla acquisizione di MST negli individui che utilizzano sostanze psicoattive per via non parenterale. Si sta attualmente osservando una generale diminuzione delle infezioni da HIV e di quelle da virus epatitici, dovute alla via parenterale, con un declino dell'uso di eroina per via iniettiva nelle nuove generazioni di utilizzatori, e un parallelo aumento dell'uso di sostanze "stimolanti", anche di sintesi. In aumento tra i tossicodipendenti è l'abuso di droghe assunte per inalazione diretta o attraverso inalazione dopo combustione [16]. Anche alcune nuove modalità di assunzione, come quella condotta o aspirando o inalando dalla bocca di un altro utilizzatore la sostanza *(shotgun)* potrebbero aprire la strada a modalità miste di trasmissione di malattie infettive, in cui la via respiratoria, quella sessuale e parenterale si sovrappongono.

Quando si considerano gli effetti diretti delle droghe sul comportamento preventivo e sulla performance sessuale, non va dimenticato che altre variabili di tipo "ambientale" legate più propriamente al mercato della droga sembrano condizionare una maggiore velocità di circolazione di infezioni sessualmente trasmesse, come alcuni comportamenti legati al traffico, al consumo e all'approvvigionamento delle sostanze.

Nella seconda metà degli anni '80, negli Stati Uniti si osservò un improvviso quanto imprevisto aumento di casi di sifilide, soprattutto in quarantenni eterosessuali residenti in aree urbane disastrate e appartenenti a minoranze etniche e di bassa condizione socio-economiche [17] (Fig. 1). Indagini epidemiologiche evidenziarono l'importante contributo apportato dallo scambio di sesso per droga, specialmente tra i consumatori per via inalatoria di crack, nel diffondere questa nuova epidemia [18]. Alcune indagini sono arrivate recentemente a dimostrare come circa un quarto dei pazienti con sifilide primaria o secondaria fossero, in quegli anni, consumatori di cocaina [19]. L'aumento della sifilide in questo gruppo di popolazione ebbe importanti implicazioni. L'aumento mostrò infatti un parallelo incremento nel numero di casi di sifilide congenita e impose la necessità di ostacolare la trasmissione dell'HIV in queste minoranze marginali, dopo che messaggi di educazione sanitaria indirizzati fino ad allora alla popolazione generale sembravano non averle raggiunte. In particolare, altri studi hanno mostrato come la riemergenza della sifilide congenita, fosse da associare all'uso continuato di cocaina da parte della madre [20]. Tali risultati sono stati anche confermati dal riscontro di una forte associazione fra positività per anticorpi anti-treponemici nella madre, sifilide congenita, e positività per i cataboliti della cocaina all'analisi del meconio [21].

Diversi studi sono stati condotti per valutare le caratteristiche del comportamento sessuale in consumatori di cocaina e di crack. Tra le donne afferenti ad un centro MST in California, quelle che facevano uso di crack erano anche quelle che riferivano comportamenti sessuali a più elevato rischio [22]. Altri studi hanno dimostrato che le donne che utilizzano crack hanno una più alta probabilità di avere un alto numero di partner e rapporti sessuali non protetti se riportano

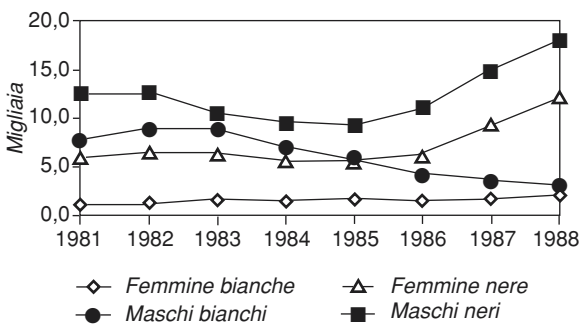


Fig. 1. - Casi segnalati di sifilide in adulti per sesso e razza negli Stati Uniti.

scambio di sesso per droga. Tali donne risultano anche a rischio più elevato di MST e di assumere droghe prima e durante l'atto sessuale [23, 24].

Un altro studio condotto su 372 donne newyorkesi ha mostrato che l'uso tra queste di crack si associa ad un rischio triplo di avere una MST rispetto alle non utilizzatrici (OR = 2,9: LC 95%: 1,6-5,5) e soprattutto della sifilide (OR = 12,8, $p < 0,05$) se il consumo è recente [25]. Anche studi che confrontano caratteristiche socio-comportamentali di tossicodipendenti fumatori rispetto ai non fumatori di crack mostrano differenze sostanziali nella attitudine al rischio sessuale [26].

Per quanto riguarda le altre sostanze psicotrope, è stato segnalato che l'uso di marijuana da 1 a 2 volte alla settimana aumenta il rischio (OR: 2,27; IC: 1,01-5,13) di MST [27]. Secondo quanto osservato in 337 omosessuali maschi inizialmente sieronegativi, l'uso continuo di inalanti (nitriti) e di anfetamine sembra aumentare il rischio di infezione da HIV, al contrario di quanto avviene per chi ne fa un uso episodico [28]. L'uso non iniettivo di anfetamine, come di ecstasy, si correla ad un aumento di rapporti sessuali anali tra gli individui eterosessuali, ad un non uso del preservativo e a un aumento del rischio per HIV ed altre MST [29].

Dati scarsi o segnalazioni aneddotiche sono disponibili per le altre sostanze stupefacenti assunte per via parenterale. E' stato segnalato un più elevato rischio di infezione HIV negli assuntori di anfetamine per via endovenosa rispetto agli eroinomani [30]. Ugualmente gli assuntori di cocaina, indipendentemente dalle modalità di assunzione utilizzate, mostrano un più elevato rischio di infezione da HIV rispetto agli assuntori di eroina per via endovenosa [31].

Su 200 tossicodipendenti arruolati in uno studio svedese, il 51% dei maschi e il 20% delle femmine riferiscono di preferire rapporti sessuali sotto l'effetto di anfetamine. Questo comportamento si associa nei maschi ad un aumento del rischio di HIV e può essere considerato un indicatore attendibile di uso inadeguato del preservativo [32].

L'uso inadeguato del preservativo e storia di malattie a trasmissione sessuale e prostituzione sono riportati anche dal 55% di un campione di 651 detenute in Nord Carolina per reati legati all'uso di droghe. In un terzo di queste donne era riportato l'uso di crack per via esclusivamente inalante, e questo era considerato un fattore fortemente associato con l'acquisizione dell'infezione da HIV attraverso i rapporti eterosessuali [33].

Droga, prostituzione e MST

Lo scambio di sesso per droga o per denaro finalizzato al suo acquisto, è un fenomeno conosciuto non da molto tempo e le sue associazioni con il rischio di MST è confermato da una ricca produzione scientifica degli ultimi vent'anni.

Prostitute/i che usano crack riferiscono di avere più spesso rapporti sessuali con tossicodipendenti per via endovenosa (il 30% delle prostitute e il 41% dei prostituti) o con persone con infezione da HIV (l'8% ed il 19%), una storia di MST (73% e 93%), ed un incostante uso del preservativo in poco oltre il 50% degli atti sessuali.

Pratiche a rischio più elevato vengono inoltre riportate da prostitute/i che lavoravano nelle *crack-house* o in edifici abbandonati, soprattutto quelle che accettano di venire pagate direttamente col crack. Nella maggioranza di questi casi l'attività di prostituzione era iniziata prima dell'uso del crack. Più del 25% delle prostitute intervistate risultava essere infetta con HIV (27,9%), mentre oltre un terzo aveva contratto la sifilide (37,5%) e due terzi (66,8%) l'infezione da *Herpes simplex* di tipo 2 (HSV2) [34].

Nel 1994 quando si verificò a Jackson, Missisipi, una epidemia a *cluster* di ulcere genitali (da *Haemophilus ducrey*, *Herpes simplex*, *Treponema pallido*), i risultati di uno studio caso-controllo mostrarono che anche negli uomini la presenza della MST era associato all'uso di crack ed allo scambio di sesso per droga o soldi, oltre che ad una aumentata promiscuità sessuale [35]. In uno studio condotto a Columbus e Dayton, in Ohio, lo scambio di sesso per droga era inversamente associato (OR = 0,31; IC 95%: 0,11-0,88) con l'uso costante del preservativo, contrariamente allo scambio di sesso per soldi [36].

Anche in un campione di 67 travestiti prostituti latinoamericani, afferenti ad un centro per l'infezione da HIV di Roma, è stata mostrata una forte associazione tra l'uso di cocaina ed eroina e sifilide [37].

Alcune recenti osservazioni suggeriscono una larga diffusione di droghe sintetiche tra le prostitute dell'Est europeo e questo sembra associato alla diffusione tra queste di MST e soprattutto di sifilide. Circa il 10% di un campione di 107 giovani prostitute arruolate in un recente studio in Russia riferisce di usare correntemente l'ecstasy [38].

Conclusioni

In conclusione, le MST e l'infezione da HIV risultano aumentate nelle persone che utilizzano droghe a prescindere dalla via di assunzione utilizzata. Tuttavia il panorama del problema che emerge dai numerosi studi disponibili, mostra una sovrapposizione fra gruppi eterogenei di popolazione identificabili sia in base alle caratteristiche della sostanza utilizzata che alla sua modalità di assunzione.

Negli studi, il rischio aumentato di MST/HIV è spesso messo in relazione all'adozione di pratiche sessuali più a rischio negli assuntori, e ad una mancata utilizzazione di metodi di barriera, soprattutto del preservativo.

Sono necessari ulteriori studi per valutare quale sia il reale ruolo dell'uso delle droghe nella determinazione di comportamenti sessuali a rischio soprattutto quelli che confrontino più che assuntori e non assuntori, le caratteristiche del comportamento preventivo negli stessi soggetti, sotto l'effetto con quelle in assenza degli effetti della sostanza [39]. Altri studi sono anche necessari per valutare il rischio infettivo in assuntori di droghe sintetiche, utilizzate oggi più a scopo ricreazionale che come vere sostanze d'abuso.

In conclusione, la ormai certa associazione tra uso di droghe e comportamenti sessuali a rischio fa ritenere che attività di *counselling* mirate alla riduzione e prevenzione dell'uso di droghe possa avere effetti positivi anche sull'adozione di comportamenti sessuali più sicuri. Individui che completano programmi di *counselling* mirati alla riduzione dell'abuso di cocaina hanno infatti mostrato di adottare comportamenti sessuali più sicuri e più stabili nel tempo rispetto a quelli che interrompono prematuramente il programma [40].

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 12 gennaio 2000.

BIBLIOGRAFIA

1. HERTOFT, P. 1982. *Sessuologia clinica.* Ed. Ferro, Milano.

2. CHEBILI, S., ABAOUB, A., MEZOUANE, B. & LE GOFF, J.F. 1998. Les antidepressives et la stimolation sexuelle: une comparation. *Enchephale* **24**: 180-184.

3. MENON, A.S. & POMERANTZ, S. 1997. Substance use during sex and unsafe sexual behaviors among acute psychiatric inpatients. *Psychiatr. Serv.* **48**: 1070-1072.

4. SCHUSTER, P., LIEB, R., LAMERTZ, C. & WITTCHEN, H.U. 1998. Is the use of ecstasy and hallucinogens increasing? Results from a community study. *Eur. Addict. Res.* **4**: 75-82.

5. KANN, L., KINCHEN, S.A., WILLIAMS, B.I., ROSS, J.G., LOWRY, R., HILL, C.V., *et al.* 1998. Youth risk behavior surveillance in United States, 1997. *J. Sch. Health* **68**: 355-369.

6. FRIEDMAN, S.R., CURTIS, R., JOSE, B., NEAIGUS, A., ZENILMEN, J. *et al.* 1997. Sex, drugs, and infections among youth. Parenterally and sexually transmitted diseases in a high-risk neighborhood. *Sex. Trans. Dis.* **24**: 322-326.

7. SHRIER, L.A., EMANS, S.J., WOODS, E.R. & DURANT, R.H. 1997. The association of sexual risk behavior and problem drug behaviors in high school students. *J. Adolesc. Health* **20**: 377-383.

8. van den HOEK, J.A.R. 1997. STD control in drug users and street young. *Genitourin. Med.* **73**: 240-244.

9. WOODY, G.E., DONNEL, D., SEAGE, G.R., *et al.* 1999. Non-injection substance use correlates with risky sex among men having sex with men: data from HIVNET. *Drug Alcohol Depend.* **53**(3): 197-205.

10. STONES, E., HEAGERTY, P., VITTINGHOFF, E. *et al.* 1999. Correlates of condom failure in a sexually active cohort of men who have sex with men. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **20**(5): 495-501.

11. REZZA, G., NICOLOSI, A., ZACCARELLI, M. *et al.* 1988. Understanding the dynamics of the HIV epidemic among Italian intravenous drug users: a cross-sectional versus a longitudinal approach. *JAIDS* **7**(5): 500-503.

12. SHOEMBAUM, E.E., HARTEL, D., SELWYN, P.A. *et al.* 1989. Risk factors for human immunodeficiency virus infection in intravenous drug users. *N. Engl. J. Med.* **321**: 874-879.

13. WEBSTER, I.W., WADDY, N., JENKINS, L.V. *et al.* 1977. Health status of a group of narcotic addicts in a methadone treatment programme. *Med. J. Aust.* **2**: 485-491.

14. VAN DEN HOEK, J.A.R., VAN HAASTRECHT, H.J.A. & COUTHINO, R.A. 1990. Heterosexual behavior of intravenous drug users in Amsterdam: implications for AIDS epidemic. *AIDS* **4**: 449-453.

15. ROSS, M.W., GOLD, J., WODAK, A. & MILLER, M.E. 1991. Sexually transmissible diseases in injecting drug users. *Genitourin. Med.* **67**: 32-36.

16. PERLMAN, D.C., HENMAN, A.R., KOCHEMS, L., PAONE, D., SALOMON, N. & DE JARLAIS, D.C. 1998. Doing a shotgun: a drug use practice and its relationship to sexual behaviors and infection risk. *Soc. Sci. Med.* **48**: 1441-1448.

17. CATES, W. jr & TOOMEY, K.E. 1990. Sexually transmitted diseases. Overview of the situation. *Primary Care* **17**: 1-27.

18. CENTER FOR DISEASE CONTROL. 1988. Relationship of syphilis to drug use and prostitution - Connecticut and Philadelphia, Pennsylvania. *MMWR* **37**: 755-758.

19. WILLIAMS, L.A., KLAUSNER, J.D., WHITTINGTON, W.L., HANDSFIELD, H.H., CELUM, C. & HOLMES, K.K. 1999. Elimination and reintroduction of primary and secondary syphilis. *Am. J. Public. Health.* **89**: 1093-1097.

20. Mc FARLIN, B.L. & BOTTOMS, S.F. 1996. Maternal syphilis: the next pregnancy. *Am. J. Perinatol.* **13**: 513-518.

21. SISON, C.G., OSTREA, E.M. jr, REYES, M.P. & SALARI, V. 1997. The resurgence of congenital syphilis: a cocaine-related problem. *J. Pediatr.* **130**: 289-292.

22. HSER, Y.I., CHOU, C.P., HOFFMAN, V. & ANGLIN, M.D. 1999. Cocaine use and high-risk sexual behavior among STD clinic patients. *Sex. Trans. Dis.* **26**: 82-86.

23. LOGAN, T.K., LEUKEFELD, C. & FARABEE, D. 1998. Sexual and drug use behaviors among women crack users: implications for prevention. *AIDS Educ. Prev.* **10**: 327-340.

24. WILSON, T.E., MINKOFF, H., DEHOVITZ, J., FELDMAN, J. & LANDESMAN, S. 1998. The relationship of cocaine use and human immunodeficiency virus serostatus to incident sexually transmitted diseases among women. *Sex. Trans. Dis.* **25**: 70-75.

25. DEHOVITZ, J.A., KELLY, P., FELDMAN, J., SIERRA, M.F., CLARKE, L., BROMBERG, J. *et al.* 1994. Sexually transmitted diseases, sexual behavior, and cocaine use in inner-city women. *Am. J. Epidemiol.* **140**: 1125-1134.

26. SEMAAN, S., KOTRANSKI, L. & COLLIER, K. 1998. Temporal trends in HIV risk behaviors of out-of-treatment injection drug users and injection drug users who smoke crack. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **19**: 274-281.

27. BOYER, C.B., SHAFER, M.A., TEITLE, E., WIBBELSMAN, C.J., SEEBERG, D. & SHACTHER, J. 1999. Sexually transmitted diseases in a health mainteinance organization teen clinic: association of race, partner's age, and marijuana use. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **153**: 838-844.

28. CHESNEY, M.A., BARRETT, C.D. & STALL, R. 1998. Histories of substance use and risk behavior: precursors to HIV seroconversion in homosexual men. *Am. J. Public Health* **88**(1): 113-116.

29. MOLITOR, R., TRUAX, S.R., RUIZ, J.D. & SUN, R.K. 1998. Association of methamphetamine use during sex with risky sexual behaviors and HIV infection among non-injection drug users. *West. J. Med.* **168**: 93-97.

30. CROFTS, N., HOPPER, J.L., MILNER, R. *et al.* 1994. Blood-borne virus infectious among Australian injecting drug users: implications for spread of HIV. *Eur. J. Epidemiol.* **10**(6): 687-694.

31. HUDGINS, R., MCCUSKER, J. & STODDARD, A. 1995. Cocaine use and risky injection and sexual behaviors. *Drug Alcohol Depend.* **37**: 7-14.

32. KALL, K. & NILSONNE, A. 1995. Preference for sex on amphetamine: a marker for HIV risk behavior among male intravenous amphetamine users in Stockholm. *AIDS Care* **7**: 171-188.

33. COTTEN-OLDENBURGH, N.U., JORDAN, B.K., MARTIN, S.L. & KUPPER, L 1999. Women inmates' risky sex and drug behaviors: are they related? *Am. J. Drug Alcohol Abuse* **25**: 129-149.

34. JONES, D.L., IRWIN, K.L., INCIARDI, J., BOWSER, B., SHILLING, R., WORD, C. *et al.* 1998. The high-risk sexual practices of crack-smoking sex workers recruited from the streets of three American cities. The Multicenter Crack Cocaine and HIV infection Study. *Sex. Transm. Dis.* **25**: 187-193.

35. MERZ, K.J., WEISS, J.B., WEBB, R.M., LEVINE, W.C., LEWIS, J.S., ORLE, K.A. *et al.* 1998. An investigation of genital ulcers in Jackson, Missisipi, with use of a multiplex polymerase chain reaction assay: high prevalence of chancrioid and HIV infection. *J. Infect. Dis.* **178**: 1060-1066.

36. SIEGAL, H.A., FALCK , R.S., WANG, J. & CARLSON, R.G. 1999. History of sexually transmitted diseases infection, drug-sex behaviors, and the use of condoms among midwestern users of injection drugs and crack cocaine. *Sex. Transm. Dis.* **23**: 277-282.

37. GATTARI, P., SPEZIALE, D., GRILLO, R., CATTANI, P., ZACCARELLI, M., SPIZZICHINO, L. & VALENZI, C. 1994. Syphilis serology among tranvestite prostitutes attending an HIV unit in Rome, Italy. *Eur. J. Epidemiol.* **10**: 683-686.

38. KUROVA, T., SHOUBNIKOVA, M., MALCEVA, A. & MARDH, P.A. 1998. Prostitution in Riga, Latvia. A socio-medical matter of concern. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **77**: 83-86.

39. FORTENBERRY , J.D., ORR, D.P., KATZ, B.P., BRIZENDINE, E.J. & BLYTHE, M.J. 1997. Sex under the influence. *Sex. Transm. Dis.* **24**: 313-321.

40. SHOPTAW, S., FROSCH, D., RAWSON, R.A. & LING, W. 1997. Cocaine abuse counseling as HIV prevention. *AIDS Educ. Prev.* **9**: 511-520.

Ann. Ist. Super. Sanità, vol. 36, n. 1 (2000), pp. 69-75

Proprietà immunomodulanti dell'ecstasy (MDMA)

Roberta PACIFICI *(a)*, Piergiorgio ZUCCARO *(a)*, Magi FARRÉ *(b)*, Simona PICHINI *(a)*, Simonetta DI CARLO *(a)*, Pere N. ROSET *(b)*, Jordi ORTUÑO *(b)*, Jordi SEGURA *(b)*, Cándido HERNÁNDEZ-LÓPEZ *(b)* e Rafael DE LA TORRE *(b)*

(a) Laboratorio di Biochimica Clinica, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(b) Unitat de Farmacologia, Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Universitat Autònoma de Barcelona e Universitat Pompeu Fabra, Barcellona

Riassunto. - L'esposizione *in vitro* all'ecstasy (3,4-metilendiossimetamfetamina, MDMA) altera alcuni parametri immunitari quali la funzione regolatoria delle cellule T, l'attività citotossica dei linfociti T, l'attività delle cellule *natural killer* e la funzione dei macrofagi. Nel ratto, la somministrazione di MDMA produce una soppressione della risposta linfoproliferativa e una diminuzione dei linfociti circolanti, accompagnata da un aumento del corticosterone plasmatico. E' stata ipotizzata un'azione diretta dell'MDMA sui linfociti ovvero un'azione indiretta mediata dall'asse adreno-pituitario (asse AP) e/o dal sistema nervoso simpatico (SNS). Il trattamento acuto con MDMA su volontari sani produce una disfunzione immune che si correla alle caratteristiche farmaceutiche e quindi alle concentrazioni plasmatiche di MDMA. Si osserva una diminuzione delle cellule T $CD4^+$, della risposta funzionale dei linfociti a stimoli mitogenici ed un incremento del numero di cellule natural killer circolanti. Un contemporaneo aumento del cortisolo plasmatico supporta l'ipotesi della liberazione, indotta dall'MDMA del fattore di rilascio della corticotropina dall'ipotalamo e conseguente attivazione dell'asse AP e del SNS.

Parole chiave: ecstasy, disfunzione immune, modello animale, uomo.

Summary *(Immunomodulating properties of ecstasy, MDMA)*. - *In vitro* exposure to ecstasy (3,4-methylenedioxymethamphetamine, MDMA) alters some immune parameters such as T-cell regulatory function, cytotoxic T-lymphocyte activity, natural killer cell activity and macrophage function. Administration of MDMA in rats produces a suppression of lympho-proliferation response and a decrease in circulating lymphocytes, accompanied by an increase in plasma corticosterone. It was postulated a direct action of MDMA on lymphocytes or rather an indirect action mediated by the hypothalamic pituitary adrenal axis (HPA-AXIS) and/or the sympathetic nervous system (SNS). Acute MDMA treatment effected on healthy-volunteers produces an immune dysfunction associated with pharmaceutical characteristics and so with MDMA plasma concentrations. There is a decrease in $CD4^+$ T-cells and functional responsiveness of lymphocytes, while percentage of natural killer cells increases. A contemporany rise of cortisol plasma concentrations supports the hypothesis of MDMA-induced release of corticotrophin-releasing factor from the hypothalamus and subsequent HPA-axis and SNS activation.

Key words: ecstasy, immune dysfunction, animal model, human.

Introduzione

L'ecstasy (3,4-metilendiossimetamfetamina, MDMA) è un derivato amfetaminico con potenti effetti sulla trasmissione serotoninergica. La droga, sintetizzata nel 1912 ma mai posta sul mercato, divenne popolare negli anni '70 e '80 grazie agli effetti di euforia, simpatia, intimità con l'intorno ed empatia provocati dal suo consumo. Queste proprietà sono state definite "entactogene" da alcuni autori [1] e sono state alla base del suo uso in psicoterapia durante gli anni '80 fin quando la sostanza non è stata inclusa nella Tab. 1 della lista delle sostanze psicotrope [2].

L'ecstasy è divenuta popolare in Europa e nel Nord America negli ultimi dieci anni. Viene consumata principalmente dai giovani in ambienti di musica e ballo *(raves parties)* e talvolta in ritrovi di un numero più limitato di persone [1]. L'uso ricreazionale dell'MDMA provoca effetti secondari indesiderati quali perdita di appetito, rigidità della mandibola, bruxismo, mal di testa, nausea, sudorazione, dolori muscolari, affaticamento ed insonnia. L'ecstasy può anche causare tossicità acuta che si manifesta con vari sintomi quali ipertermia maligna, emorragia cerebrale, crisi epilettiche, epatite, rabdomiolisi, coagulazione intravascolare disseminata e blocco renale acuto [3]. L'abuso di MDMA può portare anche ad intossicazione grave e morte [4].

Studi nel modello animale hanno evidenziato una neurotossicità a carico del sistema serotoninergico sia dopo una somministrazione singola, sia dopo dosi ripetute di MDMA. Inoltre, nonostante non sia stato del tutto comprovato, la neurotossicità viene considerata il maggior effetto secondario a lungo termine del consumo dell'ecstasy nell'uomo [5-7].

Alcuni effetti osservati dopo somministrazione dell'MDMA in studi clinici con volontari sani, come ad esempio un forte aumento del cortisolo plasmatico, inducono a considerare questa droga come un *chemical stressor* [8]. Si è osservato che lo stress può produrre una disfunzione del sistema immunitario e un'alterazione nella distribuzione periferica delle cellule immuni [9]. Al momento comunque esiste un numero molto limitato di studi riguardanti gli effetti di questa droga ricreazionale sul sistema immunitario.

Il sistema immunitario è un sistema altamente regolato e come tale presenta un gran numero di bersagli potenziali per la modulazione. Questa modulazione può assumere la forma dell'immunosoppressione, che si manifesta come un'aumentata suscettibilità alle infezioni; oppure può assumere la forma dell'immunostimolazione, che può portare all'ipersensibilità (allergia) o a malattie autoimmuni [10].

Questa rassegna illustra i dati sperimentali provenienti da studi *in vitro* su modello animale e nell'uomo ed *in vivo* su modello animale riguardanti l'interazione dell'MDMA e di altre amfetamine naturali e sintetiche sul sistema immunitario ed inoltre presenta i risultati di uno studio riguardante la somministrazione di una dose unica di MDMA su volontari sani.

Studi *in vitro* su modello animale e nell'uomo

Sono stati effettuati studi *in vitro* concernenti gli effetti immunomodulanti dell'MDMA e di altre amfetamine sostituite su splenociti, macrofagi peritoneali e leucociti mononucleati murini di sangue periferico [11, 12]. In particolare furono esaminati molti parametri chiave della funzione immune quali: proliferazione dei linfociti B, funzione regolatoria delle cellule T valutata come produzione di citochine da parte delle cellule T $CD4^+$, attività citotossica dei linfociti T (TLC), attività delle cellule *natural killer* (NK) ed infine la funzione dei macrofagi, misurata come produzione delle citochine IL6 e del fattore di necrosi tumorale (TNF).

L'esposizione *in vitro* all'MDMA in un range di concentrazioni 0,0001-100 mM non presenta effetti sulla proliferazione delle cellule B. Riguardo alle citochine prodotte dalle cellule T $CD4^+$, l'MDMA induce la soppressione della produzione della IL2 ad alte dosi (100 mM), una stimolazione a basse dosi (0,0001 mM) ed un'assenza di effetto a dosi intermedie (0,001-10 mM). Al contrario, l'esposizione all'MDMA non provoca nessuna modificazione nella produzione della IL4, probabilmente a causa di una alterazione differenziale nella funzione delle cellule T da parte di questa sostanza. La stimolazione degli TLC viene soppressa solo a dosi di MDMA 100 mM. Questa osservazione è probabilmente in correlazione con la modulazione della produzione di IL2. Inoltre, l'esposizione all'MDMA provoca una stimolazione della funzione delle cellule NK nel range di concentrazioni: 0,0001-1,0 mM valutata ad un rapporto cellula effettrice/cellula bersaglio di 100:1. Questo aumento ha un andamento a campana della curva dose-risposta con un massimo a 0,01 mM. Infine i macrofagi esposti all'MDMA mostrano un trend di diminuzione nella produzione del TNF con l'aumentare delle concentrazioni di MDMA.

Al momento non esistono studi *in vitro* sull'uomo. Gagnon *et al*. hanno presentato alcuni risultati *in vitro* su linfociti mononucleati di sangue periferico umano testando alcune amfetamine sostituite in posizione 4, ma non l'MDMA [12]. Sia l'amfetamina che i composti sostituiti in posizione 4 inibiscono la proliferazione cellulare delle cellule T in risposta alla fitoemoagglutinina A (PHA). Le amfetamine sostituite risultano più potenti dell'amfetamina in questo disegno sperimentale. Inoltre queste amfetamine sintetiche sopprimono la proliferazione cellulare causata dal mitogeno specifico per le cellule B ed è interessante notare che solo l'amfetamina racemica e l'enantiomero *d*- sono attivi nella inibizione della proliferazione cellulare mentre l'enantiomero *l*- è inattivo. Infine questi autori hanno osservato un aumento nell'attività delle cellule NK con basse concentrazioni di amfetamina (*range:* 10^{-12} - 10^{-10} M).

Sebbene i dati appena illustrati siano stati i primi a mostrare l'effetto diretto dell'ecstasy sul sistema immunitario, gli studi *in vitro* presentano delle limitazioni. E' ben noto che alterazioni nell'attività del sistema nervoso centrale (SNC) possano influire sulla funzione immune attraverso cambiamenti neuroendocrini e attraverso l'attività del sistema nervoso simpatico (SNS) [13]. Viceversa, i prodotti del sistema immune possono modulare la funzione del SNC [14]. In particolare, l'MDMA agisce sui sistemi centrali monoaminergici liberando il fattore di rilascio della corticotropina (FRC) dalla eminenza mediana dell'ipotalamo e quindi attivando l'asse adreno-pituitario ipotalamico e il SNS, entrambi fattori che possono modulare la funzione e la distribuzione dei leucociti [15, 16]. Questi rapporti tra sistema neuroendocrino, simpatico ed immunitario non possono essere facilmente valutati mediante studi *in vitro*. Inoltre questi ultimi non possono dimostrare l'eventuale effetto dei metaboliti dell'MDMA sulla funzione immune. Infatti, la 3,4-metilendiossiamfetamina (MDA) e la 3-idrossi-4-metossimetamfetamina (HMMA), principali metaboliti

dell'ecstasy sono amfetamine 4 sostituite e quindi il loro contributo sull'effetto totale dell'MDMA a carico del sistema immunitario può essere rilevante.

Studi *in vivo* su modello animale

Gli studi effettuati con amfetamina su modello murino sembrano riprodurre alcuni dei risultati osservati *in vitro* [17, 18]. E' stato dimostrato che l'amfetamina diminuisce le popolazioni di cellule T e la linfoproliferazione stimolata dalla concanavalina A (Con A). Un effetto apparentemente contraddittorio è la soppressione della attività delle cellule NK dose-correlata. In ogni modo, le dosi utilizzate negli studi su modello animale sono molto più alte di quelle testate nel modello *in vitro* nel quale veniva riportata una attivazione a basse dosi. In effetti, nel periodo di astinenza di ratti trattati cronicamente con amfetamina, si osserva un aumento significativo dell'attività delle cellule NK [19]. Inoltre, uno studio suggerisce che la riduzione di linfoproliferazione da parte dell'amfetamina sembra essere indipendente dall'aumento indotto del cortisolo plasmatico, poiché il propanololo, un beta-bloccante non selettivo, si dimostra efficace nell'impedire l'immunodisfunzione [20]. Infine, in un protocollo di somministrazione cronica di *d*-amfetamina, questa droga facilita nei ratti l'immunosoppressione indotta mediante uno stimolo negativo *(foot shock stress)* [21] e contemporaneamente si osserva una riduzione nella percentuale di linfociti T e della reazione di ipersensibilità di tipo ritardato.

Per quanto concerne l'ecstasy, Connor *et al*. hanno condotto alcune ricerche utilizzando come modello animale femmine di ratto [22, 23]. In un primo protocollo essi hanno esaminato l'effetto di una dose singola di MDMA (20 mg/kg i.p.) sia sul numero di leucociti circolanti che sulla risposta funzionale dei linfociti alla stimolazione mitogenica con Con A. La somministrazione di MDMA produce una soppressione rapida (30 min) e prolungata (6 ore) della linfoproliferazione indotta e una diminuzione significativa nel numero totale di leucociti che persiste almeno sei ore dopo il trattamento. Queste alterazioni nella funzione immunitaria del ratto sono accompagnate da un aumento significativo del corticosterone plasmatico che inizia 30 min dopo la somministrazione della droga e che ritorna a valori basali in 6 ore. Si è ipotizzato che il risultato di una risposta alterata dei linfociti alla proliferazione indotta da Con A, in disaccordo con il risultato degli studi *in vitro*, possa essere dovuta all'effetto combinato dell'azione diretta dell'MDMA sui linfociti e all'attivazione dell'asse API e/o al SNS attraverso meccanismi centrali. Questa ipotesi è supportata da un aumento indotto dall'MDMA del corticosterone plasmatico, probabilmente responsabile della riduzione nel numero totale di leucociti. In ogni modo non si è potuto stabilire se la soppressione dell'attività linfocitaria indotta dall'ecstasy possa essere attribuita ad una aumentata attività del SNS o semplicemente a concentrazioni plasmatiche elevate di cortisone. Inoltre non risultava chiaro quale sottopopolazione linfocitaria risulti alterata dalla somministrazione di MDMA.

In uno studio successivo con differenti dosi di ecstasy (1,25-40 mg/kg i.p.), si è evidenziato che la somministrazione acuta di MDMA causa la riduzione di linfociti circolanti senza alterare significativamente il numero di neutrofili o monociti del sangue periferico. La diminuzione dei linfociti circolanti fu osservata a dosi di MDMA (10 mg/kg) che inducevano un aumento di corticosterone plasmatico, suggerendo l'intervento di una attivazione dell'asse API indotta dall'MDMA. Al contrario, l'ecstasy produceva una soppressione della funzione linfocitaria anche a dosi che non intervenivano sulle concentrazioni plasmatiche di corticosterone, assumendo quindi che la risposta ridotta dei linfociti alla stimolazione mitogenica potesse essere mediata da meccanismi indipendenti dai glucocorticoidi.

Studi *in vivo* nell'uomo

Uno studio pilota incrociato a doppio cieco e a doppia simulazione randomizzato condotto su quattro volontari sani consumatori di MDMA ha consentito di ottenere risultati preliminari sulla risposta immune cellulo-mediata dopo somministrazione di ecstasy [24].

Nello studio, approvato da un comitato etico istituzionale ed autorizzato dall'autorità sanitaria spagnola (DGFPS n. 98/112), i soggetti partecipavano in due differenti sessioni sperimentali assegnate casualmente in cui essi ricevevano dosi singole di 75 mg o 100 mg di MDMA (due soggetti per ognuna delle due concentrazioni) o placebo per via orale. Le diverse sessioni erano separate da una settimana di *washout*.

I campioni di sangue per la determinazione delle concentrazioni plasmatiche dell'ecstasy venivano raccolti prima del trattamento, a 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minuti e a 2, 3, 4, 6, 8, 10 e 24 ore dopo la somministrazione dell'MDMA. Questa ultima veniva quantificata nel plasma mediante gascromatografia e rivelatore ad azoto-fosforo [25].

Il cortisolo plasmatico veniva determinato mediante immunofluorescenza a luce polarizzata (FPIA).

I prelievi di sangue per i test immunologici venivano eseguiti prima del trattamento e a 1, 2, 6, e 24 ore dopo la somministrazione di ecstasy. Il sangue periferico veniva raccolto in provette sotto vuoto contenenti acido etilendiaminotetraacetico (0,47 *M*). Di ogni soggetto partecipante allo studio veniva valutato l'emocromo completo. Per la tipizzazione linfocitaria, 100 ml di sangue intero venivano trattati con 20 ml di anticorpo

monoclonale specifico. L'uso degli anticorpi monoclonali CD45/CD14 ha consentito di verificare la validità della finestra linfocitaria che comprendeva almeno 95% di linfociti e meno del 5% di altre cellule (granulociti, monociti e debris). L'uso di un pannello anticorpale a doppio colore consentiva di studiare le diverse sottopopolazioni linfocitarie (CD_3, CD_4, CD_8, CD_{19}, CD_3-CD_{16}/CD_{56}). La risposta funzionale dei linfociti alla stimolazione mitogenica era misurata mediante test di incorporazione della ^{3}H-timidina.

Sebbene la conta totale leucocitaria rimanga invariata, si nota una diminuzione nel rapporto tra i linfociti T $CD4^+$/$CD8^+$ così come nella percentuale di linfociti T maturi, probabilmente a causa della diminuzione nella percentuale e nel numero assoluto di cellule T-*helper*. Si osserva inoltre un decremento dose dipendente nella risposta funzionale dei linfociti alla stimolazione mitogenica (Fig. 1). Infatti, nei due soggetti trattati con 75 e 100 mg di MDMA, appena dopo un ora dalla somministrazione della droga, la proliferazione linfocitaria indotta da PHA diminuisce in media del 24,5% e 55,5%, rispettivamente, se paragonati al placebo. Similmente la percentuale di cellule T $CD4^+$ nei due partecipanti trattati con 75 e 100 mg di MDMA, diminuisce del 13,5% e 36% rispettivamente. Al contrario, si osserva un incremento significativo nella percentuale di cellule NK.

Il profilo della disfunzione immune indotta dall'ecstasy correla inoltre con la farmacocinetica di quest'ultima, ed un recupero parziale delle diverse funzioni immune si osserva dopo 24 ore.

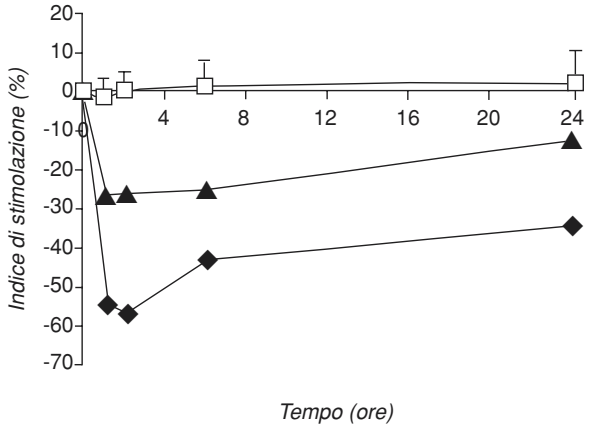


Fig. 1. - Proliferazione linfocitaria indotta da mitogeni nei diversi gruppi di trattamento dello studio pilota (n. = 4) nel tempo: MDMA 75 mg (▲, n. = 2), MDMA 100 mg (◆, n. = 2) e placebo (□). L'indice di stimolazione (IS %) si definisce come rapporto della media delle conte per minuto nel test di incorporazione della ^{3}H-timidina nelle culture stimolate con PHA rispetto alle culture non stimolate (media e DS).

Gli interessanti risultati ottenuti nello studio pilota hanno contribuito alla realizzazione di uno studio clinico su nove consumatori di ecstasy, che venivano trattati con una dose di 100 mg di MDMA, dose comunemente usata a scopo ricreazionale.

Anche in questo caso si è trattato di uno studio clinico incrociato a doppio cieco e a doppia simulazione randomizzato. Tutti i nove soggetti partecipavano in due differenti sessioni sperimentali, separate da una settimana di *washout*, assegnate a caso in cui veniva somministrata una dose orale di MDMA o placebo. Le condizioni sperimentali dello studio erano le stesse di quelle utilizzate nello studio pilota.

I campioni di sangue per i test immunologici venivano raccolti a 0, 1, 1,5, 2, 6, e 24 ore dopo la somministrazione di ecstasy.

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante l'analisi della varianza di misure ripetute, ponendo come variabili le condizioni di trattamento ed il tempo. L'errore quadratico medio ottenuto dalla combinazione delle due variabili permette il calcolo del *Tukey's honestly significant difference* necessario per eseguire tutte le possibili comparazioni accoppiate di ogni osservazione ai diversi tempi di trattamento. I test statistici erano considerati significativi quando p risultava minore di 0,05.

Il trattamento acuto con ecstasy produce una disfunzione immune. Questa disfunzione risulta dipendente dal tempo e mostra un parallelismo sia con le concentrazioni plasmatiche di MDMA che con la cinetica di stimolazione del cortisolo indotta dall'MDMA (Fig. 2). Tutte le alterazioni riguardanti i parametri immunologici testati presentavano un massimo tra 1 ora ed 1,5 ore dall'inizio del trattamento.

Così come nel caso dello studio pilota la conta totale leucocitaria rimane invariata. Nonostante ciò, è presente una diminuzione delle cellule T $CD4^+$ statisticamente significativa tra 1 e 24 ore dopo la somministrazione dell'ecstasy. Questa riduzione delle cellule T $CD4^+$ circolanti influisce negativamente sul rapporto CD4/CD8 così come sulla percentuale di linfociti T maturi (cellule T $CD3^+$).

Il trattamento con MDMA non mostra nessun effetto sulla percentuale di linfociti soppressori citotossici ($CD8^+$) e sui linfociti B ($CD19^+$). In contrasto con ciò, si verifica un aumento nella percentuale di cellule NK, statisticamente significativo tra 1 e 24 ore. Dopo 24 ore dal trattamento, sebbene i parametri immunologici che risultano modificati rimangano statisticamente differenti tra placebo e trattamento con MDMA, si evidenzia un *trend* di ritorno alle condizioni basali.

Come è possibile vedere nella Fig. 2, le concentrazioni plasmatiche di cortisolo non cambiano nel placebo mentre l'MDMA produce un aumento medio nel cortisolo plasmatico di 20 g/dl dopo due ore dalla somministrazione della droga.

Questi risultati confermano che l'assunzione di MDMA a dosi compatibili con quelle dell'uso ricreazionale causa profondi cambiamenti in alcuni parametri neuroendocrini ed immunologici e che questi cambiamenti avvengono molto rapidamente. Infatti, ad un ora dal trattamento con ecstasy si osserva una riduzione significativa nel numero di cellule T $CD4^+$, nel rapporto CD4/CD8, nel numero di cellule T $CD3^+$ ed un aumento delle cellule NK (Fig. 3). Sebbene, questi risultati non forniscano né una certezza di immunosoppressione né di immunostimolazione, la reazione del sistema immunitario alla somministrazione di MDMA appare come un'alterazione dell'equilibrio fisiologico o dell'omeostasi. Tutto ciò risulta interessante in quanto le stesse reazioni da parte del sistema immunologico sono state osservate nella risposta ad alcuni tipi di stress psicologico e fisico provocati in volontari sani [9] .

Infatti, volontari esposti ad un stress psicologico acuto mostravano un aumento significativo nella percentuale di cellule NK e una diminuzione nella percentuale di cellule T $CD4^+$ [9]. Queste osservazioni suggeriscono che l'ecstasy possa essere considerata un *chemical stressor*.

L'aumento di cortisolo plasmatico simile a quanto osservato nel ratto [22] si verifica parallelamente alle alterazioni della funzione immunitaria. Questi risultati sarebbero complementari con il fatto che in volontari sani l'MDMA provoca una stimolazione della secrezione

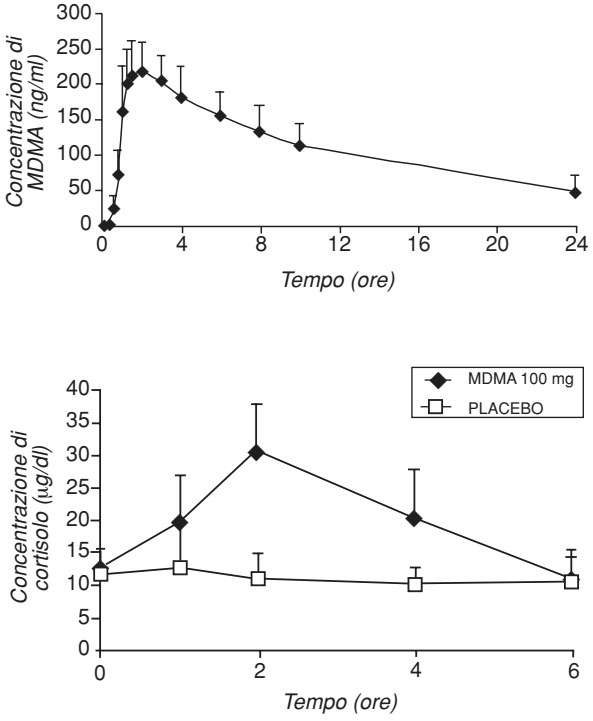


Fig. 2. - Concentrazione plasmatica di MDMA e cortisolo (media e DS, n. = 8 per ogni punto della curva) nel tempo nei gruppi di trattamento: MDMA 100 mg (◆) e placebo (□).

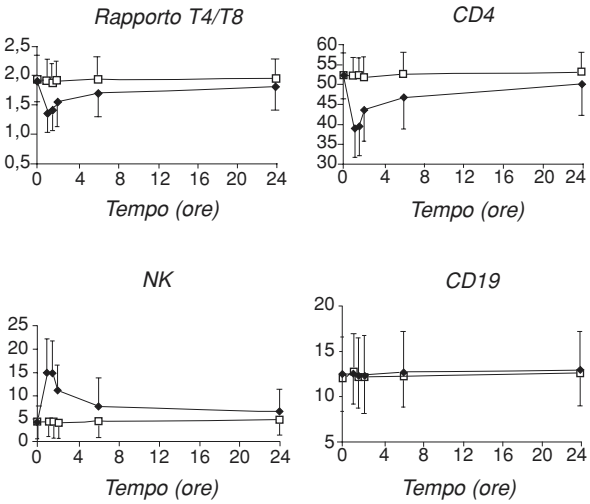


Fig. 3. - Parametri di immunofenotipizzazione linfocitaria nel tempo (media e DS, n. = 8 per ogni punto della curva) nei gruppi di trattamento: MDMA 100 mg (◆) e placebo (□). I valori sono espressi come percentuale della formula leucocitaria.

del cortisolo e della corticotropina (ACTH) [8]. E' da sottolineare che le alterazioni nella secrezione del cortisolo e nella funzione immunitaria sembrano essere dose-dipendenti. Una serie di evidenze indica che il fattore di rilascio della corticotropina (FRC) è il coordinatore della risposta allo stress [26]. Infatti pochi minuti dopo un stress acuto, l'FRC induce la produzione di corticosteroidi e catecolamine che rappresentano due delle maggiori classi di ormoni dello stress [27].

Differenti studi indicano che i corticosteroidi inibiscono molte funzioni dei linfociti e modificano la produzione di molte citochine e altri mediatori del processo infiammatorio [28]. Inoltre, l'aumento dei livelli di norepinefrina ed epinefrina, che accompagna lo stress, può produrre cambiamenti nella funzione dei linfociti generalmente provocando modificazioni di natura negativa nella funzione immune [29]. Dai dati ottenuti nel presente studio, non è comunque possibile definire il contributo specifico del cortisolo, della serotonina e delle catecolamine coinvolte nel meccanismo d'azione dell'MDMA sulla funzione immunitaria.

In conclusione, l'uso ricreazionale dell'MDMA altera l'omeostasi immunologica nell'uomo.

Conclusioni

I risultati ottenuti in questi studi e quelli riportati dalla letteratura sembrano indicare che l'ecstasy induce un effetto sulla funzione immunitaria diverso rispetto a quello svolto dall'amfetamina. Apparentemente l'MDMA non possiede alcun effetto *in vivo* sull'attività dei linfociti T citotossici e dei linfociti B, in contrasto

con quanto avviene nel caso dell'amfetamina. Nonostante ciò, le amfetamine sostituite in posizione 4 strutturalmente correlate all'MDMA sembrano possedere un effetto maggiore dell'amfetamina sulle cellule NK e sulla proliferazione dei linfociti T stimolata da PHA. La correlazione tra la farmacocinetica dell'MDMA e il profilo della disfunzione immunologica indotto da MDMA suggeriscono che il SNC possa mediare questa alterazione.

In questi studi sull'uomo è stato possibile valutare solo gli effetti della somministrazione acuta di MDMA. Tenendo in considerazione il particolare ambito di consumo di questa droga in cui l'abuso tende ad essere irregolare, l'impatto dell'MDMA sulla funzione immunitaria dovrebbe essere valutato in studi controllati con dosi ripetute o in studi longitudinali. I presenti risultati, tuttavia, inducono ad affermare che l'ingestione di MDMA può rappresentare un pericolo potenziale per la salute a causa di un aumentato rischio di malattie correlate alla disfunzione del sistema immunitario.

Ringraziamenti

Si ringraziano Claudia Mortali per la preziosa collaborazione nel reperimento del materiale bibliografico, Esther Menoyo e Isabel Sanchez per la collaborazione tecnica.

Questa ricerca è stata in parte finanziata dal Fondo d'Investigazione Sanitaria del Ministero della Sanità di Spagna FIS 97/1198, FIS 98/0081, CIRIT 95-SGR00432 e ISCIII 98/4344 e PNSD.

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 12 gennaio 2000.

BIBLIOGRAFIA

1. CAMÍ, J. & FARRÉ, M. 1996. Éxtasis, la droga de la ruta del bacalao. *Med. Clin. (Barc).* **106**: 711-716.

2. STEELE, T.D., McCANN, U.D. & RICAURTE, G.A. 1994. 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA: "ecstasy"): pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction* **89**: 539-551.

3. MCCANN, U., SLATE, S.O. & RICAURTE, G.A. 1996. Adverse reactions with 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA: "ecstasy"). *Drug Saf.* **15**: 107-115.

4. HENRY, J.A., JEFFREYS, K.J. & DAWLING, S. 1992. Toxicity and deaths from 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). *Lancet* **340**: 384-387.

5. GREEN, A.R. & GOODWIN, G.M. 1996. Ecstasy and neurodegeneration. *BMJ* **312**: 1493-1494.

6. RICAURTE, G.A., DELANNEY, L.E., WIENER, S.G., IRWIN, I. & LANGSTON, J.W. 1988. 5-Hydroxyindoleacetic acid in cerebrospinal fluid reflects serotonergic damage induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine in CNS of non-human primates. *Brain Res.* **474**: 359-363.

7. McHENNA, D.J. & PEROUTKA S.J. 1990. Neurochemistry and neurotoxicity of 3,4 methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). *J. Neurochem.* **54**: 14-22.

8. MAS, M., FARRÉ, M., DE LA TORRE, R., ROSET, P.N., ORTUÑO, J., SEGURA, J. & CAMÍ, J. 1999. Cardiovascular and neuroendocrine effects, and pharmacokinetics of MDMA in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **290**: 136-145.

9. BREZNITZ, S., BEN-ZUR, H., BERZON, Y., WEISS, D.W., LEVITAN, G. & TARCIC, N. 1998. Experimental induction and termination of acute psychological stress in human volunteers: effects on immunological, neuroendocrine, cardiovascular, and psychological parameters. *Brain Behav. Immun.* **12**: 34-52.

10. GLEICHMANN, E., KIMBER, I. & PURCHASE, I.F.H. 1989. Immunotoxicology: suppressive and stimulatory effects of drugs and environmental chemicals on the immune system. *Arch Toxicol.* **63**: 257-273.

11. HOUSE R.V., THOMAS, P.T. & BHARGAVA, H.N. 1995. Selective modulation of immune function resulting from *in vitro* exposure to methylenedioxymethamphetamine (ecstasy). *Toxicology* **96**: 59-69.

12. GAGNON L., LACROIX, F., CHAN, J. & BUTTAR, H.S. 1992. *In vitro* effects of "designer" amphetamines on human peripheral blood mononuclear leukocytes proliferation and on natural killer cell activity. *Toxicol. Letter.* **63**: 313-319.

13. BLACK, P.H. 1994. Central nervous system-immune system interactions: psychoneuroendocrinology of stress and its immune consequences. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**: 1-6.

14. BLACK, P.H. 1994. Immune system-central nervous system interactions: Effect and immunomodulatory consequences of immune system mediators on the brain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**: 7-12.

15. BATEMAN, A., SINGH, A., KRAL, T. & SOLOMON, S. 1989. The imune-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocr. Rev.* **10**: 92-112.

16. IRWIN, M. 1993. Stress-induced immune suppression. Role of the autonomic nervous system. *Ann. NY Acad. Sci.* **692**: 203-218.

17. FREIRE-GARABAL, M., BALBOA, J.L., NÚÑEZ, M.J., CASTAÑO, M.T., LLOVO, J.B., FERNÁNDEZ-RIAL, J.C. & BELMONTE, A. 1991. Effects of amphetamine on T-cell immune response in mice. *Life Sci.* **49**: 107-112.

18. NÚÑEZ-IGLESIAS, M., CASTRO-BOLANO, C., LOSADA, C., PEREIRO-RAPOSO, M.D., RIVEIRO, P., SÁNCHEZ-SEBIO, P., MAYÁN-SANTOS, J.M., REY-MENDEZ, M. & FREIRE-GARABAL, M. 1995. Effects of amphetamine on cell mediated immune response in mice. *Life Sci.* **58**: 29-33.

19. SWERDLOW, N.R., HAUGER, R., IRWIN, M., KOOB, G.F., BRITTON, K.T. & PULVIRENTI, L. 1991. Endocrine, immune, and neurochemical changes in rats during withdrawal from chronic amphetamine intoxication. *Neuropsychopharmacology* **5**: 23-31.

20. PEZZONE, M.A., RUSH, K.A., KUSNECOV, A.W., WOOD, P.G. & RABIN. B.S. 1992. Corticosterone-independent alteration of lymphocyte mitogenic function by amphetamine. *Brain Behav. Immunol.* **6**: 293-299.

21. BASSO, A.M., GIOINO, G., MOLINA, V.A. & CANCELA, L.M. 1999. Chronic amphetamine facilitates immunosuppression in response to a novel aversive stimulus: reversal by haloperidol pretreatment. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **62**: 307-314.

22. CONNOR, T.J., McNAMARA, M.G., FINN, D., CURRID, A., O'MALLEY, M., REDMOND, A.M., KELLY, J.P. & LEONARD, B.E. 1998. Acute 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) administration produces a rapid and sustained suppression of immune function in the rat. *Immunopharmacol.* **38**: 253-260.

23. CONNOR, T.J., McNAMARA, M.G., KELLY, J.P. & LEONARD, B.E. 1999. 3,4 methylenedioxymethamphetamine (MDMA: ecstasy) produces dose-dependent neurochemical, endocrine and immune changes in rat. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp*. **14**: 95-104.

24. PACIFICI, R., ZUCCARO, P., FARRÉ, M., PICHINI, S., DI CARLO, S., ROSET, P.N., ORTUÑO, J., SEGURA, J. & DE LA TORRE, R. 1999. Immunomodulating properties of MDMA alone and in combination with alcohol: a pilot study. *Life Sci.* **65**: 309-316.

25. ORTUÑO, J., PIZARRO, N., FARRÉ, M., MAS, M., SEGURA, J., CAMÍ, J., BRENNEISEN, R. & DE LA TORRE, R. 1999. Quantification of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its metabolites in plasma and urine by gas chromatogarphy with nitrogen-phosphorus detection. *J. Chromatogr*. **723**: 221-232.

26. DUNN, A.J. & BERRIDGE, C. W. 1990. Is corticotropin-releasing factor a mediator of stress responses? *Ann. NY Acad. Sci*. **579**: 183-191.

27. MELIA, K.R. & DUMAN, R.S. 1991. Involvement of corticotropin-releasing factor in chronic stress regulation of the brain noradrenergic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8382-8386.

28. WILCKENS, T. & DE RIJK, R. 1997. Glucocorticicoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. *Immunol. Today* **18**: 418-424.

29. CHELMICKA-SCHORR, E. & ARNASON, B.G.W. 1990. Nervous system-immune system interactions. *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis*. **68**: 67-90.

Ann. Ist. Super. Sanità, vol. 36, n. 1 (2000), pp. 77-85

Artificial neural networks e loro applicazioni in medicina delle tossicodipendenze

Paolo Massimo BUSCEMA

Semeion, Centro Ricerche di Scienze della Comunicazione, Roma

Riassunto. - Questo articolo presenta l'uso di una nuova tecnologia di elaborazione: il modello delle *artificial neural networks* (ANN). Noi introduciamo il lettore, in modo semplice, ai tipi di problemi per i quali questa tecnologia può essere usata dai ricercatori. Le ANN rappresentano una potente strada per capire, prevedere e simulare dinamiche complesse e caotiche. Noi crediamo che i settori sociali, la psicologia umana e i comportamenti, non sono lineari nella loro essenza, dunque necessitano di un'adeguata metodologia, come quella proposta dalle ANN, in grado di indagarli e comprenderli.

Parole chiave: sistemi previsionali, non lineare, intelligenza artificiale, fattori di rischio, sistemi adattivi.

Summary *(Artificial neural networks and their application in drug addiction medicine).* - This article presents the use of a new processing technology: artificial neural networks (ANN) modeling. We introduce the reader, in an easy way, to types of problems for which researchers can use this technology. ANN represents a powerful way for understanding, predicting, and simulating complex and chaotic dynamics. We believe that social fields, human psychology, and behaviors, which are nonlinear in their essence, need an adequate methodology such as ANN in order to best investigate and comprehend them.

Key words: prediction systems, non linear, artificial intelligence, risk factors, adaptive systems.

Introduzione

Le reti neurali artificiali (*artificial neural network,* ANN) sono una famiglia di metodi ispirati al funzionamento del cervello umano. Attualmente le ANN raccolgono modelli molto diversi tra loro. Le caratteristiche comuni delle varie ANN sono:

- gli elementi minimi di ogni ANN sono i nodi, detti anche *processing element* (PE), e le connessioni;
- ogni nodo di una ANN ha un proprio *input*, dal quale riceve le comunicazioni da parte degli altri nodi o dall'ambiente; un proprio *output*, tramite il quale comunica con nodi o con l'ambiente. Ed infine una funzione, $f(\bullet)$, tramite la quale trasforma il proprio *input* globale in *output*;
- ogni connessione è caratterizzata dalla forza tramite la quale coppie di nodi si eccitano o si inibiscono: i valori positivi indicano connessioni eccitatorie, quelli negativi indicano connessioni inibitorie;
- le connessioni tra i nodi possono modificarsi nel tempo. Questa dinamica innesca nell'intera ANN un processo di apprendimento. La legge con cui le connessioni si modificano nel tempo è detta "equazione di apprendimento";
- la dinamica complessiva di una ANN è legata al tempo: perché la ANN modifichi in modo opportuno le proprie connessioni è necessario che l'ambiente agisca sulla ANN più volte;
- quando le ANN sono usate per elaborare dati, questi ultimi sono il loro ambiente, quindi, perché una ANN elabori dei dati, questi ultimi devono venire sottoposti alla ANN più volte;
- la dinamica complessiva di una ANN è legata unicamente all'interazione locale dei suoi nodi. Lo stato evolutivo finale di una ANN, quindi, deve emergere "spontaneamente" dall'interazione di tutte le sue componenti (nodi);
- le comunicazioni tra nodi in ogni ANN tendono ad avvenire in parallelo. Tale parallelismo può essere sincrono o asincrono ed ogni ANN può enfatizzarlo in modo diverso. Una ANN deve, comunque, presentare qualche forma di parallelismo nella attività dei propri nodi;
- dal punto di vista teorico questo parallelismo non è connesso all'hardware nel quale le ANN sono implementate;
- ogni ANN deve presentare le seguenti componenti di architettura: tipo, numero di nodi e loro proprietà; tipo, numero delle connessioni e loro localizzazione; tipo di strategie di flusso del segnale; tipo di strategia di apprendimento.

Architettura delle ANN

Tipo, numero e proprietà dei nodi

I nodi di ogni ANN possono essere di tre tipi, secondo la posizione che occupano all'interno della ANN: i nodi di *input* sono i nodi che ricevono (anche) i segnali

dell'ambiente esterno della ANN; i nodi di *output* sono i nodi il cui segnale agisce (anche) sull'ambiente esterno della ANN; i nodi *hidden* sono i nodi che ricevono segnali solo da altri nodi della ANN e inviano il loro segnale solo ad altri nodi della ANN.

Il numero di nodi di *input* dipende dal modo in cui si vuole che la ANN legga l'ambiente. I nodi di *input* sono i sensori della ANN. Quando l'ambiente di una ANN è costituito da dati che si vuole che la ANN elabori, ogni nodo di *input* corrisponde ad un tipo di variabile di quei dati.

Il numero di nodi di *output* dipende dal modo in cui si vuole che la ANN agisca sull'ambiente. I nodi di *output* sono gli effettori della ANN. Quando l'ambiente di una ANN è costituito dai dati da elaborare, i nodi di *output* rappresentano le variabili attese o i risultati dell'elaborazione.

Il numero dei nodi *hidden* dipende dalla complessità della funzione che si intende mappare tra i nodi di *input* e i nodi di *output*.

I nodi di ogni ANN possono essere raggruppati in classi di nodi che condividono le stesse caratteristiche (proprietà).

Usualmente queste classi vengono definite strati *(layers)*.

Si distinguono diverse tipologie:

- ANN monostrato: tutti i nodi della ANN hanno le medesime caratteristiche;
- ANN multistrato: i nodi della ANN sono raggruppati in classi funzionali; es.: nodi che condividono le stesse funzioni di trasferimento del segnale; nodi che ricevono il segnale solo da nodi di altri strati e lo inviamo solo a nuovi strati, ecc;
- ANN senza strato (o geograficamente pertinenti): ogni nodo è specifico per la posizione che occupa nella ANN; es. i nodi più vicini comunicano più intensamente di quelli più lontani.

Tipo, numero e localizzazione delle connessioni

Ogni connessione può essere di tipo monodirezionale, bidirezionale, simmetrica, antisimmetrica e riflessiva (Fig. 1).

Il numero delle connessioni è proporzionale alle capacità di memorizzazione di una ANN. La localizzazione delle connessioni è opportuna come *preprocessing* metodologico del problema che una ANN deve affrontare, ma non è necessaria.

Una ANN nella quale non tutte le connessioni tra nodi o tra strati sono abilitate viene definita ANN con connessioni dedicate; nel caso contrario si parla di ANN a gradiente massimo.

In ogni ANN le connessioni possono essere: adattive, quando si modificano secondo l'equazione di apprendimento; fisse, quando restano su valori fissi per tutto il tempo dell'apprendimento; variabili, quando si modificano deterministicamente in base alla modifica di altre connessioni.

Tipo di strategie di flusso del segnale

In ogni ANN il segnale può procedere in modo lineare (dall'*input* all'*output*) o in modo complesso.

Si distinguono perciò due tipi di strategie di flusso:

- ANN *feed forward*: il segnale procede dall'*input* all'*output* della ANN attraversando tutti i nodi una sola volta;
- ANN con *feed back*: il segnale procede con *feed back* specifici, determinati a priori, o legati al verificarsi di particolari condizioni.

Le ANN con *feed back* sono note anche con il nome di ANN ricorrenti. Sono ANN più plausibili dal punto di vista biologico; vengono usate spesso anche per l'elaborazione di segnali temporali; sono più complesse da trattare dal punto di vista matematico.

Nell'uso industriale, quindi, vengono spesso impiegate con condizioni di *feed back* determinate a priori (per assicurarne la stabilità).

Tipi di strategie di apprendimento

Ogni ANN può apprendere nel tempo le caratteristiche dell'ambiente nel quale è immersa, o dei dati che le vengono presentati, in due modi (tra loro anche mescolabili) e cioè ricostruendo per approssimazione la funzione di densità di probabilità dei dati che riceve dall'ambiente, rispetto a vincoli preordinati oppure ricostruendo per approssimazione i parametri che risolvono l'equazione che connette i dati di ingresso (*input*) con quelli in uscita (*output*), rispetto a vincoli preordinati.

Il primo metodo è noto, nel modo delle ANN, come quantificazione vettoriale *(vector quantization)*; il secondo è il metodo della discesa del gradiente *(gradient descent)*.

Il metodo della quantificazione vettoriale articola le variabili di *input* in *output* in ipersfere di raggio definito.

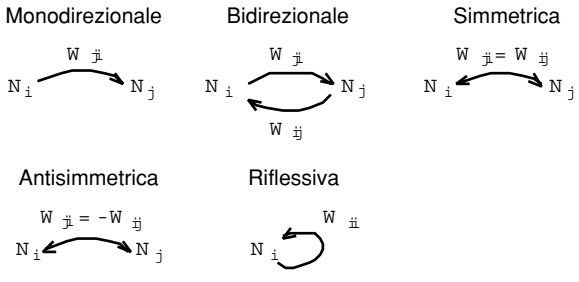


Fig. 1. - Rappresentazione di diversi tipi di connessione: monodirezionale, bidirezionale, simmetrica, antisimmmetrica e riflessiva.

Il metodo del gradiente discendente articola le variabili di *input* in *output* in iperpiani.

La differenza tra questi due metodi diventa evidente nel caso di ANN *feed forward* con almeno uno strato di unità *hidden*.

Tramite la quantificazione vettoriale le unità *hidden* codificano in modo locale i tratti più rilevanti del vettore di *input*.

A fine apprendimento, ogni unità *hidden* sarà un prototipo che rappresenta uno o più tratti rilevanti del vettore di *input*, in modo definito ed esclusivo.

Tramite il gradiente discendente, le unità *hidden* codificano in modo distribuito i tratti più rilevanti del vettore di *input*.

A fine apprendimento, ogni unità *hidden* tenderà a rappresentare parte dei tratti rilevanti dell'*input* in modo sfumato e non esclusivo.

Sinteticamente: la quantificazione vettoriale sviluppa un apprendimento locale, il gradiente discendente sviluppa un apprendimento distribuito o vettoriale.

Le differenze tra i due metodi sono notevoli.

L'apprendimento distribuito è più efficiente computazionalmente dell'apprendimento locale. E forse è anche più plausibile biologicamente (non sempre e non in tutti i casi).

Quando la funzione che connette l'*input* all'*output* è non lineare, l'apprendimento distribuito, a causa della tecnica del gradiente discendente, può bloccarsi in dei minimi locali.

L'apprendimento locale è spesso più rapido dell'apprendimento distribuito.

La regionalizzazione dell'*input* sull'*output* è più definita tramite la quantificazione vettoriale, di quella ottenuta tramite il gradiente discendente.

In fase di interrogazione di una ANN addestrata con quantificazione vettoriale, le risposte che questa può fornire non possono essere diverse da quelle sperimentate in fase di apprendimento; nel caso di una ANN addestrata con gradiente discendente le risposte possono essere diverse da quelle ottenute in fase di addestramento.

Questa caratteristica è talmente rilevante che sono state ideate delle famiglie di ANN che trattano il segnale in due passi: prima con il metodo della quantificazione e successivamente con il metodo del gradiente.

L'apprendimento locale permette al ricercatore di capire come la ANN ha interpretato e risolto il problema, l'apprendimento distribuito rende questo compito molto più complesso (ma non impossibile).

L'apprendimento locale è di tipo competitivo, l'apprendimento distribuito presenta aspetti sia competitivi che cooperativi tra i nodi.

Le ANN possono avere diverse strategie di apprendimento rispetto al compito che devono apprendere, e, quindi, a come viene calcolato l'errore che queste compiono durante la fase di addestramento. Si distinguono in ANN supervisionate, ANN monitorate, ANN nonsupervisionate o autopoietiche.

ANN supervisionate. - Sono quelle ANN il cui *output* desiderato è definito, per ogni vettore di *input*, fin dall'inizio dell'apprendimento. In questi casi l'errore è calcolato durante l'apprendimento con una qualche funzione che misura la distanza tra l'*output* desiderato *(target)*, che non muta nel tempo, e l'*output* prodotto dalla ANN, che muta nel tempo per assomigliare al proprio *target.*

Il vincolo di apprendimento delle ANN supervisionate è far coincidere il proprio *output* con il *target* prefissato.

La forma canonica di queste ANN è: $y = f(x, w^*)$ dove w^* è l'insieme di parametri che meglio approssima la funzione.

Le ANN supervisionate sono spesso dette eteroassociate, quando i loro nodi sono raggruppati in strati. Ciò perché il loro compito è quello di trovare dei parametri (pesi) ottimi per mappare un insieme X in un insieme Y (Fig. 2).

Queste ANN risultano utili quando la funzione da computare è non lineare.

Ricordiamo che una funzione è non lineare quando almeno una di queste equazioni è falsa:

$$f(cx) = cf(x)$$
$$f(x_1 + x_2) = f(x_1) + f(x_2)$$

Quando la funzione da computare è non lineare, le ANN eteroassociate, che usano la tecnica del gradiente discendente durante l'apprendimento, necessitano di almeno uno strato di nodi *hidden* (nel caso che le equazioni di trasferimento del segnale dall'*input* all'*output* di ogni nodo siano delle funzioni monotone).

Le ANN eteroassociate con almeno uno strato di nodi *hidden* possono essere considerati degli approssimatori universali di funzioni continue.

Quando la funzione da computare è lineare, è inutile e costoso computazionalmente utilizzare questo tipo di ANN.

Le ANN supervisionate possono essere utilizzate con profitto per molti tipi di problemi come problemi di stima di valori, che sono legati al tempo (previsioni temporali) o che sono nascosti nello spazio (previsioni spaziali) e problemi di classificazione, multinomiali (1 di N) e binomiali (M di N).

I problemi principali che vanno risolti prima di utilizzare questo tipo di ANN consistono nel comprendere come un problema reale è concettualizzabile (traducibile) in un problema adatto per una ANN e nel

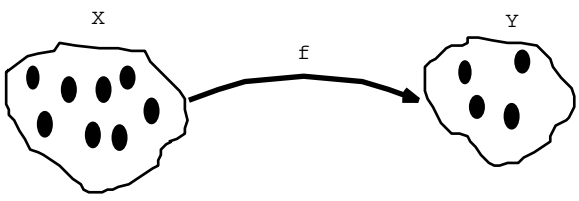


Fig. 2. - Mappatura di un insieme X in un insieme Y.

tradurre un problema di stima o di classificazione da una lingua ad un'altra. Chiunque crede che questa traduzione sia automatica commette una fondamentale ingenuità.

I passi sono normalmente: la concettualizzazione e l'individuazione delle variabili di *input*; l'opportuna concettualizzazione delle variabili del *target*; l'individuazione dell'insieme dei dati di apprendimento e di validazione; il *preprocessing* dei dati; la scelta della famiglia di ANN la cui architettura globale meglio rappresenta il problema da risolvere. Usualmente è opportuno scegliere ANN molto diverse tra loro dal punto di vista matematico; ciò perché è opportuno avere errori di natura diversa in fase di validazione. Questo permetterà di comporre le diverse soluzioni in qualche modo che sia migliore della soluzione offerta da ogni singola ANN. Infine bisogna selezionare i parametri interni delle ANN scelte in modo opportuno rispetto al problema. La covarianza tra le variabili di *input* spesso è un fattore chiave per la scelta dei valori di *default* di molti dei parametri interni di una ANN.

ANN monitorate. - Sono ANN supervisionate in modo particolare; il vettore di target di ogni *input* è l'*input* stesso.

Queste ANN vengono anche definite autoassociate. Naturalmente la funzione che caratterizza questa ANN è del tipo: $f(x, w^*) = 0$

Con un opportuno strato di nodi *hidden* di cardinalità molto inferiore a quella del vettore di *input* (e quindi di *target*), queste ANN sono state usate spesso per la compressione dei dati.

In realtà, queste ANN sono state a lungo sottovalutate dalla letteratura, in quanto, data la loro natura, possono computare solo funzioni lineari.

Al contrario, se usate come *preprocessing* per dati che successivamente possono venire elaborati con altre ANN o con algoritmi più complessi, il loro uso può essere fondamentale nella simulazione di scenari, nella definizione dinamica delle mappe cognitive *fuzzy*, nel *data mining* e nella interrogazione intelligente delle basi di dati (CAM: *content addressable memory*).

ANN nonsupervisionate o autopoietiche. - Sono ANN il cui *target* è dinamico e muta durante il tempo di addestramento. Per queste ANN, quindi, esiste solo un vettore di *input* fisso, mentre il vettore di *output* ha come proprio target il rispetto di alcuni vincoli formali esplicitati nella stessa equazione di apprendimento.

Per queste ANN, quindi, la fase di apprendimento, consiste nell'apprendere quale è il loro *target*.

Si tratta fondamentalmente di ANN che raggruppano o clusterizzano i propri dati secondo i tratti di similarità che riescono a scoprire tra i dati stessi di *input*.

Spesso, l'obiettivo di queste ANN consiste nel proiettare un vettore di *input* di M dimensioni in uno spazio di *output* di dimensioni S molto più piccole, mantenendo inalterate le proprietà topologiche del vettore di *input* di partenza (*self organizing maps* e *self-reflexive networks*).

In altri casi, lo scopo consiste nell'estrarre i tratti principali di un vettore di *input*, per utilizzarli come categorie di classificazione dinamica per nuovi *input*, simili e/o diversi *(adaptive resonance theory).*

Queste ANN possono essere utilizzate con profitto per il *preprocessing* dei dati (filtro), per l'individuazione dei *target* impliciti in una base di dati (autoclassificazione), per l'estrazione dei componenti principali in una base di dati e per la simulazione dinamica di scenari, a partire dalla variazione metrica di alcune variabili.

Nella Tab. 1 si presenta uno schema riassuntivo della semantica e della sintassi della ANN.

Uso delle ANN

Il capitolo precedente mostra una tassonomia dei tratti salienti delle ANN e permette di tracciare di ogni ANN esistente una carta di identità ragionevolmente precisa.

I vantaggi e svantaggi, invece, che le ANN hanno nei confronti di altre tecniche di analisi dei dati sono legati al modo in cui è stato rappresentato il problema, dal tipo di dati a disposizione e dal tipo specifico di ANN che si intendono usare.

Alcune caratteristiche generali d'uso delle ANN si possono, tuttavia, così definire: è conveniente usare ANN quando la funzione che si intende computare non è riducibile ad una funzione lineare, quando si hanno molti dati e quando nessun modello fisico-matematico è disponibile per approssimare in modo utile la funzione che li connette, quando le variabili in gioco sono molte e di natura diversa (metriche, categoriche, ecc.), quando si hanno molti dati, la attendibilità di alcuni dei quali è incerta.

D'altra parte non è conveniente usare ANN quando la funzione che si intende computare è lineare o riducibile ad una funzione lineare in modo utile ed economico; non è conveniente usare ANN quando si hanno pochi dati per permettere alla ANN di interpolare la funzione; non è conveniente usare ANN se già si dispone di un modello fisico-matematico del problema che risulti valido e utile; ed infine non è conveniente usare ANN, senza prima procedere ad una adeguata concettualizzazione del problema che si intende affrontare.

Dal punto di vista teorico non è utile assumere che ogni specifica base di dati ha una famiglia di ANN che approssima in modo ottimo la sua funzione.

E' più corretto ritenere che ogni base di dati possa essere letta da famiglie diverse di ANN, ciascuna delle quali fornisce una modellizzazione matematica diversa dalla stessa base di dati.

ANN diverse rispondono a domande diverse.

Questa osservazione lascia credere che di fronte ad una stessa base di dati ANN diverse possono cooperare, in sequenza e in parallelo, per modellizzare, in modi più opportuni le une rispetto alle altre, lo stesso problema.

Tabella 1. - Semantica e sintassi delle ANN

Tavola 1

	Tipo	Dinamica	Proprietà
Nodi	Input Output Hidden	Tipo di equazioni I → O	Nessuno strato (ogni nodo è diverso da ogni altro) Multistrato (ogni nodo è uguale a quelli del suo strato) Monostrato (ogni nodo è uguale agli altri)
Connessioni	Simmetriche Antisimmetriche Monodirezionali Bidirezionali Riflessive	Adattive Fisse Variabili	Connessioni massime Connessioni dedicate

Tavola 2

	Strategia di flusso	Strategia di apprendimento
Tipo di ANN	Feed forward Con feed back parametrico o adattivo Intranodo Intrastrato Tra strati Tra ANN	In relazione alla tecnica di approssimazione della funzione: gradiente discendente quantificazione vettoriale In relazione alle condizioni di apprendimento della funzione: supervisionate monitorate autopoietiche

ANN: artificial neural network.

Ciò permette di pensare ad una teoria degli organismi artificiali, nella quale ANN diverse siano organizzate per simulare processi complessi.

Una tale possibilità di ibridazione tra ANN apre la porta anche a schemi di ibridazione con altre metodiche di computazione: ad esempio sistemi esperti, sistemi Fuzzy, ANN e algoritmi genetici.

In questa direzione i ricercatori si sono già mossi, realizzando diverse applicazioni, accademiche e industriali.

Le Fig. 3A e 3B mostrano diverse organizzazioni di ANN per simulare processi complessi.

La Fig. 4 (A, B, C) e la Fig. 5 mostrano problemi pratici che possono essere risolti facendo lavorare più ANN insieme.

Applicazioni delle ANN all'abuso di sostanze psicotrope

Le applicazioni delle ANN in questo settore sono recenti e ancora poco numerose.

Nel 1992 il Centro Ricerche Semeion su incarico della regione Veneto tentò una prima applicazione di una semplice ANN *back propagation* [1] al riconoscimento di soggetti eroinomani.

Un campione di 47 soggetti eroinomani da almeno 3 anni fu selezionato in modo *random* all'interno della regione Veneto. Ognuno dei 47 soggetti faceva uso di eroina da almeno tre anni e non aveva iniziato nessun percorso di detossificazione strutturato.

Dallo stesso territorio fu selezionato sempre in modo *random* un campione di comparazione di 94 soggetti non eroinomani (*matching* 2:1). I criteri della selezione *random* di questo secondo campione furono il sesso e la fascia di età. Inoltre, ogni soggetto del campione di comparazione doveva presentare delle caratteristiche negative, che venivano controllate a posteriori. Se almeno una di queste non era rispettata, il soggetto veniva sostituito con una nuova selezione casuale.

Le caratteristiche negative erano le seguenti:

- il soggetto non doveva mai aver fatto uso di sostanze psicotrope, né per uso medico, né per altre ragioni (le informazioni erano ottenute dal soggetto stesso, dai familiari, dal medico di fiducia, dalla scuola o dal mondo lavorativo, e dalla USSL a cui il soggetto era iscritto);
- il soggetto non doveva aver mai ricevuto sanzioni penali (fonte: casellario giudiziario e tribunale);
- il soggetto aveva avuto un *curriculum* di studi non caratterizzato da particolari incidenti;
- il soggetto non aveva parenti stretti (genitori, fratelli, sorelle, figli) che avessero usato sostanze.

I soggetti per i quali queste informazioni non potevano essere accertate con un sufficiente grado di certezze venivano scartati. Il campione complessivo di

soggetti eroinomani (da ora TOX) e di soggetti non eroinomani (da ora NORM) fu di 141 casi (47 TOX + 94 NORM). A questo campione fu somministrata, tramite intervista diretta condotta da psicologi, un questionario di 112 *items* a scelta esclusiva. Tutti gli *items* del questionario includevano solo domande non specifiche al tema delle tossicodipendenze.

I 112 *items* erano una sotto articolazione delle seguenti aree del mondo psicologico e sociale dei soggetti: istruzione, occupazione, caratteristiche dei familiari, stile abitativo, caratteristiche dei partner sessuali, religione, situazione economica ed abitudini economiche, abitudini con l'alcol e le sigarette, rapporti con la giustizia, caratteristiche degli amici, tempo libero, salute fisica percepita, percezione delle figure di riferimento.

A somministrazione completata la correlazione tra ogni *items* e il campione di provenienza del soggetto era scarsa (Fig. 6).

L'intero campione fu usato per stabilire la capacità di discriminazione di una ANN tra soggetti TOX e soggetti NORM, a partire solo dai 112 *items*.

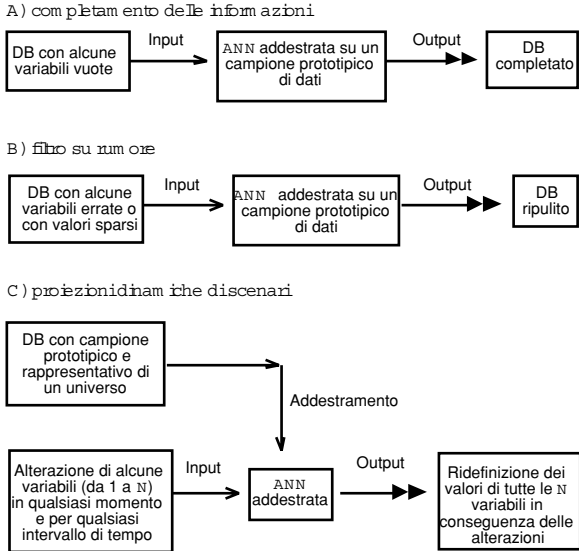


Fig. 4. - Problemi pratici che possono essere risolti facendo lavorare più ANN insieme.

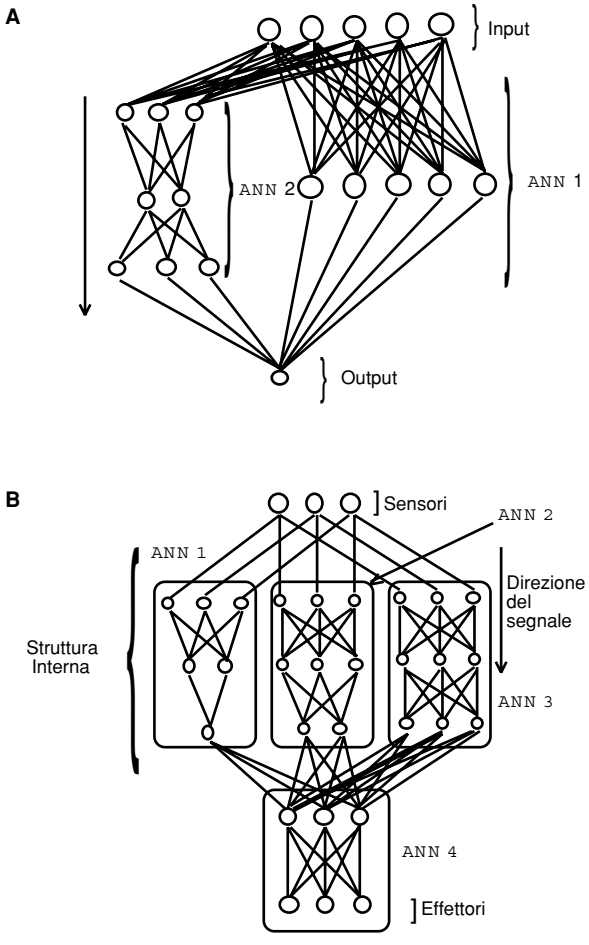


Fig. 3. - Diverse organizzazioni di ANN per simulare processi complessi. A: Modulo costituito da 2 ANN. B: Insieme di ANN di un organismo artificiale.

Il protocollo di validazione utilizzato fu il *training-testing protocol* con 3 gradi di cecità [2, 3]. Le funzioni di costo utilizzate per valutare le performances delle ANN furono le curve ROC *(receiving operating characteristic)*.

Furono addestrate 10 ANN *back propagation* e i risultati ottenuti sono riportati in Tab. 2.

Questa ricerca dimostrò la possibilità di discriminare soggetti eroinomani da soggetti non eroinomani, con una capacità stabile circa del 95%, utilizzando solo informazioni sui soggetti che fossero generiche e/o non dirette [2].

Negli anni successivi l'Ospedale Militare di Verona ha condotto una ricerca comparativa tra la valutazione effettuata tramite ANN e quella clinica, effettuata da psicologi e psichiatri dello stesso ospedale. Furono selezionati 170 soggetti, che erano già stati sottoposti a valutazione clinica, e fu loro somministrato il questionario di 112 *items* già validato nella precedente ricerca. Il campione di addestramento per le ANN fu lo stesso utilizzato in precedenza (94 NORM + 47 TOX). In fase iniziale la concordanza di giudizio tra clinici e ANN fu maggiore del 70%. Dopo 6 mesi si registrò che le ANN avevano valutato correttamente i 170 soggetti in almeno il 90% dei casi [4].

Tra il 1996 e il 1997 il Semeion estese il campione originario a 223 soggetti eroinomani e a 322 soggetti non eroinomani, in modo da avere dei campioni rappresentativi di tutto il nord Italia. I criteri per la selezione dei casi furono gli stessi di quelli utilizzati nella ricerca del 1992 in Veneto. Il bacino di selezione dei casi, tuttavia, fu esteso ad altre regioni del nord: Lombardia, Piemonte, Emilia-Romagna e Liguria.

Gli scopi di questa nuova ricerca erano tre:

a) usare le ANN per ridurre il numero degli *items* del questionario originario di 112 domande, mantenendo lo stesso grado di capacità discriminante;

b) misurare la capacità discriminante di diverse architetture di ANN;

c) ideare delle ANN in grado di individuare i prototipi dei soggetti TOX e dei soggetti NORM.

Le variabili del questionario furono ridotte da 112 a 47, e si riuscì a mantenere la capacità discriminante delle ANN sempre sopra il 95% (usando sempre ANN *back propagation*). Furono, inoltre, confrontate 8 architetture diverse di ANN sulla stessa base di dati. I risultati sono riportati in Tab. 3.

Dai risultati emerse che l'esito della classificazione era sensibile al tipo di architettura di ANN che si utilizzava; quindi, la scelta di una ANN al posto di un'altra rappresentava un punto strategico nell'affrontare un problema di classificazione.

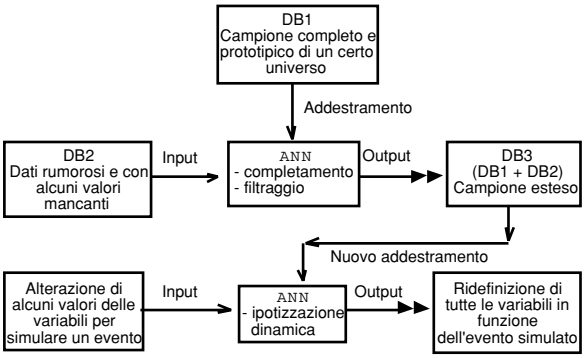


Fig. 5. - Problemi pratici che possono essere risolti facendo lavorare più ANN insieme: completamento, filtraggio e proiezione.

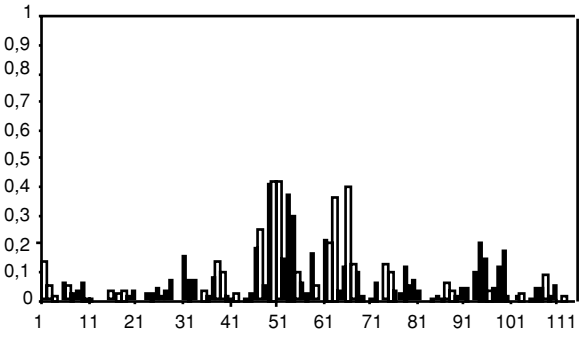


Fig. 6. - Coefficiente di correlazione (R2) tra i 112 items e il campione di provenienza del soggetto (TOX e NORM).

Inoltre, furono costruite una serie di ANN in grado di apprendere una qualsiasi funzione del tipo $f(x) = 0$ e poi interpolare dinamicamente tutte le loro variabili, in rapporto ai vincoli imposti dall'esterno. Queste ANN, sono note in letteratura come ANN autoassociate e sono utili nello svolgere lavori di *data mining* e di memoria associativa [3, 11].

Le ANN autoassociate ideate dal Semeion furono utilizzate per ricostruire i diversi prototipi di utilizzatore di eroina presenti nella base dati. Tutte le ANN utilizzate in questo lavoro furono prima validate, seguendo l'usuale protocollo di *training* e *testing* cieco, con risultati superiori al 95% [12].

Nel 1996 il Semeion e il Jerusalem Methadone Center hanno condotto una sperimentazione su 69 soggetti in trattamento metadonico. Di questi, 52 avevano completato il trattamento per tutta la durata di 3 anni, 11 avevano seguito il trattamento per un solo anno e 6 avevano abbandonato il trattamento prima della fine del primo anno. La base dati era composta di 39 variabili,

Tabella 2. - Curve ROC risultati ottenuti dalle 10 ANN back propagation

ANN n.	True positive ratio	Precisione	Specificità	False positive ratio
1	0,9211	0,9722	0,9388	0,0213
2	0,9487	0,9487	0,9574	0,0426
3	0,9737	0,9737	0,9787	0,0213
4	0,9487	0,9487	0,9574	0,0426
5	0,9737	1	0,9792	0
6	0,9487	0,9737	0,9583	0,0213
7	1	0,9268	1	0,0638
8	0,9474	0,9231	0,9565	0,0638
9	0,9737	1	0,9792	0
10	0,9231	0,973	0,9388	0,0213

ANN: artificial neural network; ROC: receiving operating characteristic.

Tabella 3. - Nomi, risultati, ideatori e referenze delle 8 ANN

Nome della ANN	Correttezza di classificazione (%)	Ideatore ANN	Riferimenti bibliografici
Fuzzy art map	91,54	S. Grossberg	Carpenter etal, 1992 [5]
LVQ	93,38	T. Kohonen	Kohonen, 1995 [6]
RBF (ver MD)	94,85	J. Moody etal.	Moody & Darken, 1989 [7]
Logicon projection	95,22	G. Wilensky etal.	Wilensky & Manukian, 1992 [8]
Back propagation	96,69	J. Rumelhart etal.	Rumelhart, 1986 [1]
Squash	96,69	M. Buscema	Buscema, 1994 [2]
Modular (ver Neuralware)	97,06	NeuralWare	NeuralWare, 1995 [9]
Squash soft max	97,43	M. Buscema	Buscema, 1998 [10]

ANN: artificialneuralnetwork.

metriche e simboliche, che definivano le caratteristiche socio-anagrafiche di ognuno dei 69 soggetti e l'esito della loro esperienza presso il centro di detossificazione. I ricercatori hanno utilizzato prima una ANN *back propagation* autoassociata, per computare la funzione implicita della base di dati, e successivamente, una ANN *constraints satisfaction* (CS) per simulare degli scenari terapeutici [13, 14]. La capacità di ricostruzione delle due ANN è stata validata tramite il protocollo *accuracy test* [3]. Le ANN hanno dimostrato di saper ricostruire in modo non ambiguo ciascuno dei 69 soggetti, a partire da pochissime informazioni in fase iniziale.

Le ANN, quindi, hanno evidenziato le variabili che motivavano il *drop out* prima della fine del primo anno, quelle che permettevano di proseguire il trattamento oltre il primo anno e, infine, quelle che consentivano di completare i tre anni di terapia. Inoltre, i ricercatori sono riusciti a evidenziare anche le caratteristiche prototipiche dei soggetti in rapporto all'esito del processo di detossificazione, in relazione al sesso e alla etnia. Infine, si sono sperimentati tramite le ANN dei percorsi terapeutici alternativi [15].

Nel 1996 alcuni ricercatori del Semeion hanno provato a validare le capacità di una nuova ANN creata nel 1995 da M. Buscema e denominata Metanet [14]. La base dati sulla quale Metanet è stata testata era composta di 113 casi di soggetti definiti "bevitori forti" e "bevitori deboli". La distinzione tra queste 2 classi era molto arbitraria: erano considerati bevitori forti quei soggetti che bevevano oltre 7 mezze pinte di birra al giorno e bevitori deboli quelli che bevevano meno di 7 mezze pinte di birra al giorno.

Questa base dati era del BUPA Medical Reaseach Ltd ed era stata utilizzata in precedenza per misurare la capacità previsionale di un sistema basato su algoritmi genetici, chiamato BEAGLE *(biologic evolutionary algorithm generating logical expressions).*

Le variabili indipendenti che definivano ognuno dei 113 soggetti della base dati erano 5: volume corpuscolare medio, fosfatasi alcalina, alamino transaminasi, aspartato transaminasi, gamma-glutamil transpeptidasi.

Nella ricerca sono stati effettuati diversi confronti tra BEAGLE, l'analisi discriminate e Metanet [16]:

a) capacità di classificare casi già visti in fase di addestramento: analisi discriminante 77%; BEAGLE 87%; Metanet 100%;

b) capacità di classificare casi nuovi mai visti prima: analisi discriminante 75,5%; BEAGLE 85%; Metanet 93,33%.

Nel 1995 l'Ospedale S. Eugenio di Roma e il Semeion provarono una applicazione delle ANN su una base dati di 179 donne, tra bulimiche e anoressiche. Ogni caso era classificato tramite 124 variabili tra cliniche, comportamentali, fisiche e biologiche.

Nella base dati, tuttavia, 14 variabili ematochimiche erano incomplete in 39 casi su 179.

Gli scopi dello studio furono, quindi, due: a) ricostruire in modo oggettivo le 14 variabili ematochimiche, tramite una ANN; b) verificare la capacità delle ANN di discriminare tra soggetti con vari gradi di bulimia e vari gradi di anoressia, utilizzando solo variabili che nelle conoscenze cliniche non sono diagnostiche di questi due disturbi.

Nello studio viene presentato un protocollo oggettivo per la ricostruzione tramite ANN di variabili metriche mancanti, senza alcun ricorso a procedure già note in statistica.

La ANN utilizzata per questo scopo è la versione del Semeion della Recirculation Net [14]. I risultati mostrano che alcuni variabili non sono ricostruibili in modo affidabile (errore medio del 30%), mentre altre vengono ricostruite in modo molto preciso (errore medio dal 1% al 8%).

La fase previsionale di questo studio mostra la capacità di una ANN di discriminare correttamente tra soggetti anorresici e bulimici in oltre l'87% dei casi, senza utilizzare variabili indipendenti notoriamente diagnostiche del disturbo [17].

Dal 1995 molte ricerche sono iniziate per valutare l'uso delle ANN e di altre tecniche legate alla teoria dei sistemi dinamici e adattivi nel settore degli usi e abusi di sostanze. Se è ancora troppo presto per fare un bilancio, non è troppo presto per intuire che questo approccio finirà con il migliorare gli studi in un campo ancora molto arretrato dal punto di vista delle tecniche di elaborazione dei dati.

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 12 gennaio 2000.

BIBLIOGRAFIA

1. *Parallel distributed processing*. vol.1. Foundations, explorations in the microstructure of cognition, vol.2 Psychological and biological models. 1986. D.E. Rumelhart & J.L. McClelland (Eds). The MIT Press, Cambridge, MA.

2. BUSCEMA, M. 1994. *Squashing theory. Modello a reti neurali per la previsione dei sistemi complessi.* Armando, Roma. (Collana Semeion).

3. BUSCEMA, M. 1998. Artificial neural networks and complex social systems. *Substance Use & Misuse* **33**(1): 1-220.

4. SPERI, L. *et al.* 1998. The use of artificial neuronal networks methodology in the assessment of "vulnerability" to heroin use among army corps soldiers: a preliminary study of 170 cases inside the military hospital of legal medicine of Verona. *Substance Use & Misuse* **33**(3): 555-586.

5. CARPENTER, G.A., GROSSBERG, S., MARKUZON, N., REYNOLDS, J.H. & ROSEN, D.B. 1992. *Fuzzy ArtMap: An adaptive resonance architecture for incremental learning of analog maps.* IJCNN, Baltimore. p. 309-314.

6. KOHONEN, T. 1995. Learning vector quantization. In: *The handbook of brain theory and neural networks.* M.A. Arbib (Ed.). A Bradford Book, The MIT Press, Cambridge, MA.

7. MOODY, J. & DARKEN, C.J. 1989. Fast learning in networks of locally tuned processing units. *Neur. Comput.* **1**: 281-294.

8. WILENSKY, G. & MANUKIAN, N. 1992. *The projection neural network.* vol. 2. IJCNN, Baltimore. p. 358-367.

9. NEURALWARE. 1995. *Neural computing.* NeuralWare Inc., Pittsburgh, PA.

10. BUSCEMA, M. 1998. Back propagation neural networks. *Substance Use & Misuse* **33**(2): 249-251.

11. *The handbook of brain theory and neural networks.* 1995. M.A. Arbib (Ed.). A Bradford Book, The MIT Press, Cambridge, MA.

12. BUSCEMA, M., INTRALIGI, M. & BRICOLO, R. 1998. Artificial neural networks for drug vulnerability recognition and dynamic scenarios simulation. *Substance Use & Misuse* **33**(3): 587-623.

13. BUSCEMA, M., DIDONÉ, G. e PANDIN, M. 1994. *Reti neurali autoriflessive, teoria, metodi, applicazioni e confronti.* Armando Editore, Roma. (Quaderni di Ricerca, n. 1).

14. BUSCEMA, M. 1998. Artificial neural networks and complex social systems. *Substance Use & Misuse* **33**(2): 221-916.

15. MASSINI, G. & SHABTAY, L. 1998. Use of constraint satisfaction network model for evaluation of the methadone treatments of drug addict. *Substance Use & Misuse* **33**(3): 623-656.

16. MAURELLI, G. *et al.* 1998. Artificial neural networks for the identifications of the differences between "light" and "heavy" alcoholics, starting from five nonlinear biological variables. *Substance Use & Misuse* **33**(3): 693-708.

17. BUSCEMA, M., MAZZETTI, M., SALVEMINI, V. *et al.* 1998. Application of artificial neural networks to eating disorders. *Substance Use & Misuse* **33**(3): 765-791.

Sezione II / Section II

RICERCHE E METODOLOGIE / RESEARCH AND METHODOLOGY

RECENSIONI, COMMENTI E SEGNALAZIONI / BOOK REVIEWS, NOTES AND COMMENTS

PUBBLICAZIONI DELL'OMS / WHO PUBLICATIONS

Ann. Ist. Super. Sanità, vol. 36, n. 1 (2000), pp. 89-98

Genetica molecolare e malattie dell'apparato scheletrico

Alessandra RENIERI *(a)*, Nicola GIORDANO *(b)*, Simone GERACI *(b)* e Carlo GENNARI *(b)*

(a) Genetica Medica, Dipartimento di Biologia Molecolare, Università degli Studi, Siena
(b) Istituto di Clinica Medica, Università degli Studi, Siena

Riassunto. - Gli autori descrivono i meccanismi molecolari che determinano l'insorgenza di alcune malattie dello scheletro, in particolare di quelle patologie che sono dovute ad un singolo difetto genico noto. Vengono infatti esaminate le malattie ereditarie secondarie a mutazione nei vari geni dei differenti collageni, e quelle secondarie a difetti primari in: a) proteine strutturali della cartilagine; b) enzimi o trasportatori per la solfatazione dei proteoglicani; c) fattori di trascrizione; d) fattori di crescita. Infine gli autori chiariscono l'importanza degli studi genetici su modelli animali, per comprendere l'eziopatogenesi di molte malattie ereditarie dell'uomo.

Parole chiave: genetica, eziopatogenesi, malattie dello scheletro.

Summary *(Molecular genetics and skeletal diseases).* - The authors describe the molecular mechanisms determining some skeletal diseases, in particular those due to a well-defined, single genic defect. In fact, they examine the hereditary disorders due to mutations in the genes encoding the different collagen types and the hereditary diseases secondary to the defects in: a) the structural proteins of cartilage; b) the enzymes and the sulfate transporters of proteoglycans; c) the transcription factors; d) the growth factors. At the end, the authors emphasize the importance of the genetic studies on animal models, for understanding the etiopathogenesis of many human hereditary disorders.

Key words: genetics, etiopathogenesis, skeletal diseases.

Introduzione

Lo scopo di questa rassegna è quello di fornire una attenta descrizione dei meccanismi molecolari di insorgenza di alcune malattie dell'apparato scheletrico, dovute ad un singolo difetto genetico noto, escludendo quelle patologie in cui le alterazioni ossee sono secondarie ad un'altra anomalia metabolica ben definita. L'identificazione del difetto genetico è il primo passo per cercare di capire la patogenesi molecolare del quadro morboso in oggetto [1]. A sua volta, la comprensione della patogenesi molecolare delle malattie monogeniche è di grande aiuto per il corretto inquadramento patogenetico delle malattie multifattoriali, di gran lunga più frequenti.

I difetti genetici che possono determinare quadri patologici a carico dell'apparato scheletrico riguardano non solo i diversi tipi di collagene presenti nel tessuto osseo e in quello cartilagineo, ma anche nuovi tipi di proteine che fino a poco tempo fa erano del tutto sconosciute. Questi aspetti sono attualmente oggetto di numerose ricerche, rese possibili anche dal rapido sviluppo di nuove tecniche e metodologie di laboratorio. Pertanto, le tematiche riguardanti la genetica molecolare delle malattie dello scheletro sono in continua evoluzione e necessitano di un costante aggiornamento.

Note di nosologia

Con il termine di *malattie del collagene* si intende l'insieme delle patologie dovute ad un difetto in una proteina appartenente alla superfamiglia dei collageni. Quest'ultima comprende 19 tipi distinti di collagene, indicati con i numeri romani dal I al IXX; inoltre ciascuna molecola può essere un omotrimero di catene ⁄ 1 (collagene II e III) oppure un eterotrimero di catene⁄ 1 e⁄ 2 (collagene I) o di catene⁄ 1⁄ 2⁄ 3 (collagene V, IX XI). Ogni catena è poi codificata da un gene distinto. Il numero di geni è pertanto molto superiore a 19: attualmente se ne conoscono almeno 30 [2]. I geni del collagene vengono indicati con una sigla composta dalle lettere COL seguita da un numero che indica il tipo di collagene, contraddistinto poi dal tipo di catena alfa (ad esempio, il gene COL1A1 è il gene della catena⁄ 1 del collagene di tipo I). I collageni quantitativamente più abbondanti sono il tipo I, che è la principale proteina dell'osso, il tipo II presente nella cartilagine e il tipo III localizzato nei tendini e nella parete delle grandi arterie. I difetti in questi tre tipi di collagene determinano malattie contraddistinte da ridotta densità della matrice ossea (osteoporosi e osteogenesi imperfetta per il tipo I), da alterazioni della cartilagine di accrescimento (condrodisplasie per il tipo II), da lassità dei tendini, dei

legamenti, nonché da fragilità della parete delle arterie (Ehlers-Danlos IV e aneurisma aortico familiare per il tipo III). Gli altri tipi di collagene, sebbene quantitativamente minori, svolgono importanti ruoli strutturali in vari organi e apparati; alcuni hanno perso la struttura fibrillare per formare le finissime maglie molecolari delle membrane basali che separano gli epiteli dal tessuto sottostante (tipo IV), altri costituiscono le fibrille ancoranti il derma e l'epidermide (tipo VII). Difetti in questi tipi di collagene determinano malattie prevalentemente renali (sindrome di Alport) o dermatologiche (epidermolisi bollosa) [3]. Complessivamente, il termine collagenopatie (malattie del collagene) risulta da una parte dispersivo, includendo malattie clinicamente non correlate, e dall'altra incompleto: infatti, il collagene non è l'unico costituente proteico delle strutture sopra descritte ed i difetti delle altre proteine possono causare malattie completamente sovrapponibili alle "collagenopatie"; ad esempio la displasia epifisaria multipla può essere dovuta sia a mutazioni nel collagene tipo IX sia a mutazioni nella proteina oligomerica della matrice della cartilagine (COMP) o nel gene del trasportatore del solfato.

Se ci riferiamo alle malattie dell'apparato scheletrico che si esprimono prevalentemente con turbe dell'accrescimento, riteniamo sia più appropriato usare il termine *osteocondrodisplasia*. Fino agli anni '60, i pazienti con nanismo disarmonico erano considerati in genere acondroplasici (soggetti con arti corti) o affetti da malattia di Morquio (soggetti con tronco corto). Oggi è noto che esistono più di 100 displasie scheletriche, classificate in base alle caratteristiche cliniche e radiografiche [4]. La nomenclatura di queste displasie è abbastanza confusionaria, essendo basata sulla sede del segmento scheletrico che appare radiologicamente alterato (displasia epifisaria, metafisaria ecc.), oppure sulla età di comparsa delle varie patologie (alla nascita, acondroplasia; più tardivamente, ipocondroplasia), o ancora sulle possibili manifestazioni cliniche associate (ipoplasia capelli-cartilagine nella sindrome tricorinofalangea di tipo I e II, polidattilia e difetto cardiaco congenito nella malattia di Ellis-van Creveld). Gli autori americani suggeriscono di sostituire il termine nanismo, che ha tra l'altro un'accezione dispregiativa nel linguaggio popolare , con quello di "displasia" che significa "alterata crescita" e che riflette con maggiore coerenza la patogenesi della malattia. Il termine osteocondrodisplasie include pertanto: a) i disordini da alterata densità, volume e mineralizzazione dell'osso (osteogenesi imperfetta, picnodisostosi); b) le condrodisplasie, che sono caratterizzate da difetti di crescita delle ossa appendicolari e/o del rachide.

La maggior parte delle displasie scheletriche sono quindi associate a bassa statura. Tuttavia, quando l'anomalia riguarda singole ossa o distretti scheletrici limitati non necessariamente vi è bassa statura; in questo caso è più appropriato parlare di *disostosi* [5]. Nelle disostosi sono incluse le craniosinostosi, le polisindattilie, la sindrome di Holt-Oram (detta anche sindrome cuore-mano), la disostosi cleidocranica. Quest'ultima è un difetto generalizzato di ossificazione, non associato a bassa statura e caratterizzato da clavicole ipoplasiche o assenti, ritardo di chiusura delle fontanelle, anomalie dentali e ritardo nello sviluppo scheletrico.

Infine una serie di fenotipi del tutto peculiari, il più noto dei quali è rappresentato dalla sindrome di Marfan, sono dovuti a difetti della principale componente del tessuto connettivo: la fibrillina. Fanno parte di questo spettro fenotipico la sindrome di Marfan, che determina una tendenza alla alta statura, la sindrome di Sprintzen-Goldberg e l'aracnodattilia contratturale congenita.

Malattie dovute ad alterata densità, volume e mineralizzazione del tessuto osseo

Differenti mutazioni nell'uno o nell'altro gene del collagene di tipo I, COL1A1 o COL1A2, sono responsabili dei quattro differenti tipi di osteogenesi imperfetta, che includono la forma letale neonatale e quadri più lievi, che si manifestano in età adolescenziale con poche fratture (fenotipo sovrapponibile ad una osteoporosi precoce) (Tab. 1). Mutazioni diverse negli stessi geni possono determinare una malattia completamente diversa, quale la sindrome di Ehler-Danlos tipo VII (vedi di seguito). Inoltre è stata provata l'esistenza di una quinta forma di osteogenesi imperfetta non dovuta a difetti del collagene [6, 7].

L'osteoporosi involutiva è una malattia multifattoriale, la cui eziologia è ascrivibile alla associazione tra fattori ambientali e costituzione genetica. Sappiamo che la densità della massa ossea è sottoposta a controllo poligenico, ma i geni responsabili sono ancora scarsamente definiti. Tra questi sono stati identificati il recettore della vitamina D [8], il recettore degli estrogeni [9] e la catena⁄ 1 del collagene di tipo I

Tabella 1. - Malattie dovute ad alterata densità, volume e mineralizzazione del tessuto osseo

Gene	Malattia
COL1A1 oppure COL1A2	Osteoporosi Osteogenesi imperfetta I Osteogenesi imperfetta IV Osteogenesi imperfetta III Osteogenesi imperfetta I
Catepepsina K	Picnodisostosi

Differenti mutazioni nel COL1A1 o COL1A2 determinano uno spettro fenotipico di differente gravità, dove l'osteoporosi rappresenta il fenotipo più lieve e la forma di osteogenesi imperfetta letale neonatale (tipo II) quello più grave.

(COL1A1). In particolare, i genotipi Ss e ss del COL1A1 sono stati evidenziati nel 54% degli osteoporotici e nel 27% dei controlli sani, conducendo ad un rischio relativo di 2,9 per i portatori dell'allele s [10]. In questo caso, la variazione di sequenza sul gene COL1A1 è situata nella regione di regolazione (promotore), in una zona che interagisce con un fattore di trascrizione (SF1). Questa variazione di sequenza da sola è innocua (polimorfismo), ma se si presenta in concomitanza con altri fattori genetici e ambientali contribuisce a creare il "fenotipo osteoporosi".

La picnodisostosi è una osteocondrodisplasia caratterizzata da bassa statura, osteosclerosi (aumentata densità ossea) e fragilità ossea; da tale malattia fu colpito il famoso pittore francese Toulouse-Lautrec. In tale quadro morboso, il difetto genetico non risiede in una proteina strutturale dell'osso, bensì in un enzima: una proteasi lisosomiale a cisteina (catepsina K). La catepsina K è una proteasi lisosomiale molto espressa negli osteoclasti e giuoca un ruolo importante nella fase di riassorbimento osseo [11].

Malattie dovute a difetti di crescita delle ossa appendicolari e/o colonna vertebrale

Le condrodisplasie sono un eterogeneo gruppo di malattie monofattoriali, caratterizzate da anormale crescita e sviluppo della cartilagine. La classificazione di tali quadri morbosi si basa sulle alterazioni radiografiche e istologiche evidenziabili, oltre che sulla loro modalità di trasmissione. Il difetto primario può risiedere in: a) proteine strutturali della cartilagine; b) enzimi o trasportatori per la solfatazione dei proteoglicani; c) fattori di trascrizione; d) fattori di crescita (o rispettivi recettori).

Proteine strutturali della cartilagine

I fenotipi condrodisplasici comprendono forme lievi e forme gravi (quali i quadri letali perinatali), sono dovuti a difetti del collagene di tipo II, COL2A1 [12], e sono rappresentati dalla sindrome di Stickler, dalla displasia spondiloepimetafisaria (tipo Strudwick), dalla displasia di Kniest, dalla displasia spondiloepifisaria, dalla ipocondrogenesi e dalla acondrogenesi tipo II (Tab. 2). Difetti del COL2A1 talvolta possono condurre anche a forme lievi di osteoartrosi primaria familiare [13]. Oltre al collagene di tipo II, la cartilagine possiede un altro collagene fibrillare, il tipo XI. Mutazioni nelle tre catene del collagene di tipo XI causano la sindrome di Stickler (Tab. 2). Tuttavia, è interessante evidenziare che solo le mutazioni in⁄ 1 e⁄ 3 determinano la sindrome di Stickler classica, mentre le mutazioni in⁄ 2 causano una sindrome di Stickler senza danno oculare: ciò accade perché il COL11A1 e il COL11A3, ma non il COL11A2, sono espressi nell'occhio [14].

Tabella 2. - Malattie dovute a difetto nelle proteine strutturali della cartilagine

Gene	Malattia
COL11A2	Artrosi primaria Osteocondrodisplasie AR e AD Stickler senza danno oculare
COL11A1 oppure COL11A3	Stickler
COL2A1	Stickler Displasia di Kniest Displasia spondiloepifisaria Acondrogenesi tipo 2
COL9A1 oppure COL9A2 oppure COL9A3	Displasia epifisaria multipla
COMP	Displasia epifisaria multipla Pseudocondroplasia
COL10A1	Condrodisplasia metafisaria

Possono essere coinvolti collageni fibrillari come il tipo II e XI, oppure collageni non fibrillari associati alle fibrille come il tipo IX, o ancora collageni brevi quali il tipo X. COL2A1 provoca fenotipi più gravi se il tipo di mutazione è rappresentato da una sostituzione di glicina, meno gravi se è costituito da una delezione o dalla creazione di un codone di stop. La COMP è una proteina strutturale non collagenica.

La displasia epifisaria multipla è una delle più comuni osteocondrodisplasie ereditarie. I sintomi e i segni comprendono la rigidità ed il dolore a livello delle grandi articolazioni, la malattia artrosica diffusa, la bassa statura e la presenza di dita tozze. Questa patologia è geneticamente eterogenea; infatti essa può essere dovuta a: a) mutazioni in un tipo di collagene non fibrillare associato alle fibrille, il collagene di tipo IX [15]; b) mutazioni nel trasportatore del solfato (forma recessiva, vedi in seguito); c) mutazioni nel gene della Proteina oligomerica della matrice della cartilagine (COMP).

Mutazioni nella COMP possono determinare oltre che la displasia epifisaria multipla anche la pseudocondroplasia [16]. Entrambe le malattie sono forme autosomiche dominanti di nanismo ad arti corti. Gli individui con pseudocondroplasia hanno mani tozze, lassità legamentosa, scoliosi ed anomalie delle epifisi e metafisi delle ossa lunghe. Nella displasia epifisaria multipla, le alterazioni radiologiche si evidenziano solo a livello dei centri epifisari. In entrambe le patologie, la degenerazione della cartilagine delle ossa lunghe conduce ad osteoartrosi precoce, che richiede spesso l'intervento del chirurgo ortopedico.

Alcune forme di condrodisplasie possono essere dovute a mutazioni in collageni specializzati: la displasia metafisaria (tipo Schmid) è dovuta a mutazioni nel dominio carbossiterminale del gene COL10A1, che codifica per un collagene molto particolare, il tipo X: esso è espresso solamente nei condrociti della placca metafisaria di accrescimento [17].

Enzimi o trasportatori per la solfatazione dei proteoglicani

La diminuita solfatazione dei proteoglicani può essere responsabile dei difetti meccanici della cartilagine e dell'osso; essi determinano lesioni ossee ed articolari, malformazioni scheletriche e nanismo, alterazioni simili a quelle della acondroplasia e della craniosinostosi. Attualmente, sono noti difetti in due geni-chiave del processo di solfatazione dei proteoglicani; in entrambi i casi l'anomalia genica è presente in omozigosi (entrambe le copie del gene sono mutate), a differenza dei casi di acondroplasia e craniodisostosi nei quali è sufficiente che la mutazione sia in eterozigosi (una sola copia del gene è mutata).

Uno di questi geni è il trasportatore del solfato DTDST, una proteina che trasloca gruppi $SO4^{--}$ all'interno della cellula. Mutazioni in DTDST provocano una serie di fenotipi condrodisplasici, la cui gravità è modulata dall'attività residua del trasportatore: conosciamo infatti la displasia diastrofica, che è un disordine moderatamente severo, e numerose malattie letali perinatali, quali la atelosteogenesi tipo II e la acondrogenesi IB [18-21] (Tab. 3). Molto recentemente è stato dimostrato che anche la forma autosomica recessiva di displasia epifisaria multipla è dovuta a difetti in questo gene [22].

Il secondo gene, recentemente identificato, è un enzima (ATPSK2) con doppia attività catalitica di ATP solforilasi (che forma adenosina 5'-fosfosolato cioè APS da ATP e solfato) e di APS kinasi (che fosforila ancora APS per generare 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosolfato) (PAPS). PAPS è la forma attiva di solfato che successivamente deve essere trasferita ai proteoglicani. Mutazioni in ATPSK2 sono state identificate in una famiglia affetta da una forma particolare di displasia spondiloepimetafisaria (SEMD tipo Pakistano): i pazienti presentano gli arti inferiori corti e incurvati, cifoscoliosi e artrosi precoce delle mani e delle ginocchia [23] (Tab. 3).

Recentemente è stato identificato il gene per la forma di displasia spondiloepifisaria tarda (X-linked) [24]. La funzione della proteina prodotta da tale gene non è ancora definita, sebbene sembri implicata nel trasporto vescicolare dal reticolo endoplasmatico all'apparato di Golgi. Successivi studi saranno necessari per definire l'esatto ruolo fisiologico di questa proteina.

Tabella 3. - Malattie dovute a difetto in enzimi o trasportatori per la solfatazione dei proteoglicani

Gene	Malattia
DTDST	Displasia epifisaria multipla (autosomica rec.) Displasia distrofica Atelosteogenesi tipo 2 Acondrogenesi tipo 1B
ATPSK2	Displasia spondiloepimetafisaria tipo Pakistano

I difetti nel trasportatore del solfato determinano fenotipi di differente gravità in relazione alla diversa attività funzionale residua.

Fattori di trascrizione

E' abbastanza semplice correlare il difetto di una proteina strutturale, abbondantemente espressa in uno specifico tessuto, con l'alterato sviluppo e le anomalie morfologiche del tessuto stesso. Le malattie sopra descritte ne sono un chiaro esempio. Tuttavia, una proteina viene espressa in un preciso tessuto e in un preciso tempo biologico, perché altre proteine dette "fattori di trascrizione" ordinano al gene di produrre la proteina stessa. Pertanto, difetti in fattori di trascrizione, che attivano specificamente il gene del collagene di tipo II, possono determinare le alterazioni che caratterizzano la condrogenesi (Tab. 4). SOX9 è un fattore di trascrizione che viene attivamente espresso nella cartilagine durante lo sviluppo embrionale e attiva COL2A1, il gene della catena⁄ 1 del collagene di tipo II [25]. Mutazioni in SOX9 causano la displasia camptomelica, una grave condrodisplasia caratterizzata da tibie incurvate, scapole ipoplasiche e ridotto numero di coste. Talvolta, i fattori di trascrizione non hanno un'unica funzione ma attivano geni diversi in tessuti diversi. SOX9 è espresso anche nella gonade indifferenziata di ambo i sessi e viene poi attivato nei maschi (dalla presenza del gene SRY) e represso nelle femmine [26]. Questo è il motivo per cui molti bambini affetti da displasia campomelica di sesso maschile (cariotipo XY con presenza del gene SRY determinante il sesso maschile) hanno differenziazione dei genitali esterni di tipo femminile (Fig. 1).

Non sempre sono noti il gene, i geni o il bersaglio del fattore di trascrizione (come nel caso di SOX9); spesso la denominazione del gene è legata al tipo di domini proteici funzionali che la proteina possiede (*homeobox* = HOX, *Tbox* = TBX, SRY-*type* MHC *box* = SOX), seguito da un numero progressivo (in ordine di scoperta) che identifica il gene stesso, appartenente ad una grande famiglia di geni omologhi. Mutazioni nell'omeogene HOXD13 causano polisindattilia [27]. Mutazioni nel gene GLI3 (un fattore trascrizionale con

Tabella 4. - Malattie dovute a difetto in fattori di trascrizione

Gene	Malattia
SOX9	Displasia camptomelica Displasia camptomelica e inversione di sesso
HOX13	Polisindattilia
GLI3	Polidattilia Cefalopolisindattilia di Greig Sindrome di Pallister-Hall
TBX3	Sindrome ulnare-mammaria (difetti post-assiali)
TBX5	Sindrome di Holt-Oram (difetti pre-assiali)
OSF2/CBFA1	Disostosi cleidocranica
TWIST	Sindrome di Saethre-Chotzen
SHOX	Bassa statura familiare Discondrosteosi

Alcuni fattori di trascrizione intervengono direttamente nella condrogenesi (SOX9) determinando, quando mutati, le condrodisplasie. Altri fattori di trascrizione alterano il patterning dello sviluppo scheletrico (TBX, HOXD13, GLI3), causando anomalie di segmentazione quali poli- e sindattilie. Infine altri fattori intervengono nella differenziazione degli osteoblasti (OSF2/CBFA1), divenendo responsabili di anomalie più generalizzate quali la disostosi cleidocranica.

un dominio proteico del tipo *zinc finger*) causano tre differenti fenotipi: cefalopolisindattilia di Greig, sindrome di Pallister-Hall e polidattilia post-assiale di tipo A [28, 29]. Tutti e tre questi disordini sono accomunati dalla presenza di un dito addizionale ben formato nell'asse posteriore del piede; nella cefalopolisindattilia di Greig è presente anche macrocefalia e nella sindrome di Pallister-Hall un amartoma ipotalamico e varie anomalie viscerali. Fattori di trascrizione del gruppo Tbox causano un'alterazione nella induzione e differenziazione mesodermica: TBX3 è mutato nella sindrome ulnare-mammaria (difetti post-assiali degli arti superiori, quali assenza della falange del dito V o del dito V *in toto* o della mano e/o avambraccio, ipoplasia mammaria e anomalie dentarie) [30]. Mutazioni in TBX5 causano difetti pre-assiali (radiali) degli arti superiori e del setto cardiaco, noti come sindrome di Holt-Oram [31].

I fattori di trascrizione sopra descritti alterano il "patterning" dello sviluppo scheletrico. Mutazioni in altri fattori invece alterano la differenziazione cellulare: OSF2/CBFA1 (fattore di differenziazione degli osteoblasti o *core binding factor*) è un attivatore trascrizionale della differenziazione degli osteoblasti; mutazioni in OSF2/CBFA1 determinano la displasia cleidocranica. Tali mutazioni sono rappresentate da sostituzioni aminoacidiche nel dominio legante il DNA o provocano la brusca interruzione della catena aminoacidica, in una delle due copie del gene; il gene mutato pertanto non produce una proteina funzionante, mentre la quantità prodotta dall'altro allele non è sufficiente a svolgere la normale induzione di differenziazione degli osteoblasti (aploinsufficienza) [32].

Infine, mutazioni nel gene TWIST, un fattore di trascrizione del tipo *helix-loop-helix*, sono responsabili di una variante di craniosinostosi che va sotto il nome di malattia Saethre-Chotzen [33]; si ipotizza che tra i bersagli di questo fattore di trascrizione ci siano i geni che producono i recettori dei fattori di crescita dei fibroblasti (FGFRs, vedi di seguito).

Un omeogene denominato SHOX *(short stature homeobox)*, localizzato sul braccio corto del cromosoma X nella regione pseuoautosomica, è responsabile della bassa statura idiopatica e contribuisce a costituire il fenotipo Turner [34]. Recentemente, mutazioni nello stesso gene sono state rilevate nella discondrosteosi tipo Leri-Weill, una displasia con accorciamento degli arti prevalentemente mesomelico, e nella deformità Madelung, caratterizzata da accorciamento e incurvamento del radio e sublussazione dorsale della parte distale dell'ulna [35].

Fattori di crescita (e rispettivi recettori)

I fattori di trascrizione attivano i geni perché, a loro volta, hanno ricevuto dei segnali che spesso giungono dall'esterno della cellula deputata alla produzione della proteina strutturale. Questi segnali originano da "fattori di crescita" che si attaccano a "recettori di fattori di crescita" sulla membrana cellulare. Pertanto le alterazioni della condrogenesi (encondrale o intramembranosa) possono essere dovute anche a difetti in fattori di crescita o in recettori di fattori di crescita (Tab. 5).

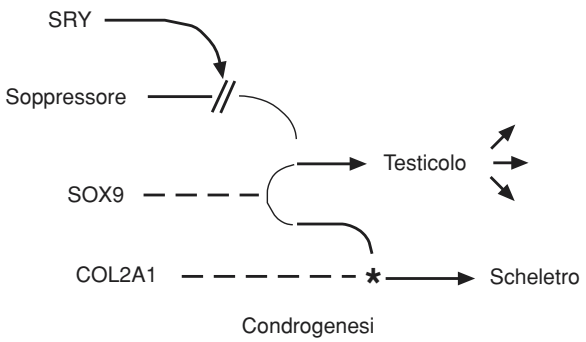


Fig. 1. - L'azione di SOX9 nella determinazione del sesso e nella condrogenesi in condizioni normali. Il gene SRY agisce indirettamente sulla gonade indifferenziata, determinandone lo sviluppo in senso maschile. Probabilmente SRY reprime un soppressore e consente che SOX9 attivi direttamente la gonade in senso maschile. Nella cartilagine l'azione di SOX9 è quella di attivare la trascrizione di COL2A1.

Tabella 5. - Malattie dovute a difetto in fattori di crescita o rispettivi recettori

Gene	Malattia
FGFR3	Ipocondroplasia Acondroplasia Nanismo tanatoforico Craniosinostosi (non classificate)
FGFR1 oppure FGFR2	Craniosinostosi (non classificate) Sindrome di Pfeiffer Sindrome di Crouson Sindrome di Jackson-Weiss Sindrome di Apert
CDMP	Displasia acromesomelica

Il recettore FGFR3 è ampiamente espresso a livello delle sedi di ossificazione encondrale: quando mutato determina prevalentemente anomalie delle ossa lunghe; viceversa FGFR2 è più espresso nelle sedi di ossificazione intramembranosa e determina prevalentemente anomalie delle ossa piatte.

I recettori dei fattori di crescita dei fibroblasti (FGFR) trasducono i segnali provenienti dai fattori di crescita dei fibroblasti (FGF), secondo il meccanismo dei recettori tirosin-kinasici, e giuocano un ruolo fondamentale nella crescita e differenziazione di molti tessuti derivanti dal mesenchima e dalla cresta ectodermica apicale dell'embrione. Una sostituzione aminoacidica nel dominio transmembranario del recettore tipo III dei fattori di crescita dei fibroblasti (FGFR3) è causa della più comune forma di bassa statura, che va sotto il nome di acondroplasia [36]. Differenti tipi di sostituzioni aminoacidiche del gene FGFR3 provocano un ampio spettro fenotipico che va dal nanismo tanatoforico alla ipocondroplasia [37]. Queste ultime displasie scheletriche sono dovute ad un disturbo della ossificazione encondrale, per attività sostitutiva del recettore che fisiologicamente agisce quindi da inibitore della crescita. Dall'altra parte, un disturbo della ossificazione intramembranosa è causa delle craniosinostosi, caratterizzate da prematura fusione delle suture del cranio. Mutazioni nel recettore tipo II (FGFR2) e, meno frequentemente, nel recettore tipo I dei fattori di crescita dei fibroblasti (FGFR1) sono responsabili della sindromi di Apert, di Pfeiffer, di Jackson-Weiss e di Crouson.

L'esatta dimensione e la morfologia di ciascun segmento osseo sono determinate da un complesso pattern di espressione dei differenti fattori di crescita. I *transforming growth factors* (TGF-€) sono una superfamiglia di fattori di crescita che regolano la proliferazione, la differenziazione, il riconoscimento e la morte cellulare. Appartiene a questa famiglia il sottogruppo del BMP, *bone morfogenetic protein*, che a sua volta comprende fattori solubili in grado di avviare una ossificazione encondrale in sede ectopica [38]. La "proteina morfogenetica derivata dalla cartilagine" (CDMP) appartiene a questa famiglia e quando essa è mutata in omozigosi determina la condrodisplasia acromesomelica: quest'ultima rappresenta il corrispettivo umano del modello murino di "brachipodismo" [39]. La condrodisplasia acromesomelica è una condrodisplasia che si manifesta con alterazioni morfologiche e strutturali delle articolazioni e con accorciamento delle ossa lunghe, accorciamento più marcato a livello distale che prossimale. Lo sviluppo dello scheletro appendicolare è quindi sotto il controllo di fattori distinti da quelli che influenzano lo scheletro craniofacciale o assiale.

Malattie dovute ad alterazione del tessuto connettivo

Le sindromi Ehlers-Danlos (SED) sono un gruppo di 9 entità cliniche variabili per estensione e gravità, ma tutte accomunate da fragilità cutanea e lassità legamentosa (Tab. 6). A seconda dei vari tipi di SED o delle età della vita in cui si manifestano, le alterazioni cutanee variano dalla cute iperelastica, alla dermatorexi (schisi cutanea), alla dermatocalasia (cute pendula). Nelle forme più gravi di malattia, vi è prematurità, mentre nelle forme IV VI e VII si associano aneurismi arteriosi, vene varicose, ernie, pneumotorace e/o emotorace. Nelle

Tabella 6. - Malattie dovute a difetto nelle proteine del tessuto connettivo

Gene	Malattia
COL5A1 oppure COL5A2 oppure COL5A3	Ehlers-Danlos II Ehlers-Danlos I
Lisil-idrossilasi	Ehlers-Danlos VI
COL3A1	Aneurismi intracranici o dell'aorta Sindrome Marfan-like Ehlers-Danlos IV (vascolare)
COL1A1 oppure COL1A2 oppure Peptidasi procollagene	Ehlers-Danlos VII (artrocalasia multipla congenita)
FBN1	Marfan
FBN2	Aracnocamptodattilia congenita

Mutazioni nel collagene di tipo V determinano la sindrome di Ehlers-Danlos tipo I, oppure la forma più lieve tipo II. Mutazioni nel collagene di tipo III causano la Ehlers-Danlos tipo IV o difetti vascolari non correlati alla lassità legamentosa. Mutazioni caratteristiche (assenza dell'esone 6) del COL1A1 o COL1A2 determinano la sindrome di Ehlers-Danlos tipo VII.

SED, è alterata la composizione delle fibrille del tessuto connettivo di molti tessuti quali la cute, i vasi (arterie, vene e capillari), la pleura ed il peritoneo, la parete intestinale, i legamenti, i tendini, la cartilagine e l'occhio (cornea e vitreo). Il difetto può avere sede in una proteina strutturale (collageni fibrillari I, III e V), oppure in enzimi modificatori: la lisil-idrossilasi per i collageni I e III, e la peptidasi del procollagene [40, 41]. Le forme dovute al difetto in questi due enzimi (VIA e VIIC) sono autosomiche recessive (mutazione in entrambe le copie del gene), a differenza delle altre varianti che sono autosomiche dominanti (Tab. 6).

Il collagene di tipo V regola il diametro del collagene di tipo I, esattamente come il tipo XI controlla quello di tipo II (vedi sopra). I tipi V e XI sono due collageni fibrillari associati, che si sostituiscono l'un l'altro nel vitreo (vedi sopra); difetti del collagene di tipo V causano la Ehlers-Danlos di tipo I o II. Il collagene di tipo III è il collagene prevalente nei vasi della cute e nei legamenti: quando esso è difettivo causa la Ehlers-Danlos di tipo IV [42]. La Ehlers-Danlos di tipo VII è dovuta o alla perdita del sito di taglio per la peptidasi (a causa di mutazioni che eliminano l'esone 6 del COL1A1 o COL1A2), ovvero al difetto dell'enzima di taglio (peptidasi del procollagene). In questo ultimo caso la malattia è più grave perché nessuna fibra è assemblata normalmente.

La sindrome di Marfan è caratterizzata da anomalie scheletriche, oculari (dislocazione del cristallino) e cardiovascolari (dilatazione o dissezione dell'aorta) ed è dovuta a mutazioni nel principale componente delle microfibrille del tessuto connettivo: la fibrillina (FBN1). Mutazioni diverse dello stesso gene determinano l'aracnodattilia congenita isolata e la sindrome di Sprintzen-Goldberg, una craniosinostosi con *abitus* marfanoide e aracnodattilia. Mutazioni in un gene analogo (FBN2) causano una patologia simile ma distinta che è l'aracnodattilia contratturale congenita [43].

Prospettive

Molte nozioni sul ruolo svolto dai vari geni e sugli effetti che ne conseguono quando avviene una mutazione, ci pervengono dagli studi condotti su modelli animali. In particolare, è possibile ottenere in laboratorio mutanti artificiali di topo per singoli geni noti. Tali topi si dicono *knock out mice*, nel caso in cui viene distrutto uno specifico gene, oppure *transgenic mice*, se al gene normale viene sostituito un gene mutato. Lo studio delle manifestazioni fenotipiche in questi mutanti animali fornisce chiare indicazioni sul ruolo svolto dalla specifica proteina anche nell'uomo. Topi mancanti del collagene di tipo IX sviluppano un fenotipo che è molto simile a quello dell'osteoartrosi primaria [44] a sua volta corrispettivo murino della displasia epifisaria. Topi mancanti del collagene di tipo X non presentano alcuna alterazione fenotipicamente evidente, [45] mentre i topi "transgenici" (per un collagene di tipo X con alterazione nella tripla elica) sviluppano una severa osteocondrodisplasia [46], corrispettivo murino della displasia metafisaria. Le mutazioni che causano l'assenza della proteina tendono a dare origine a fenotipi più lievi rispetto alle mutazioni che determinano la produzione di una catena alterata. Questo effetto è detto "dominante negativo" ed è tipico delle proteine multimeriche, dove la mutazione di una singola unità può interferire anche con il funzionamento della subunità normale. Topi "transgenici" per la catena / 2 del collagene di tipo V hanno una particolare fragilità e un'aumentata estensibilità della cute ed inoltre alterazioni corneali, causate dalla disorganizzazione delle fibrille [47]: tale evidenza ci ricorda da vicino le mutazioni del collagene di tipo V rilevate in pazienti con Ehlers-Danlos tipo I. Mutazioni del collagene XI causano condrodisplasia nel topo e sindrome di Stickler nell'uomo [14]. La creazione di un topo *knock-out* per FGFR3, topo che manifesta una condrodiplasia con allungamento delle ossa lunghe, ha permesso di stabilire il ruolo fisiologico svolto dal recettore FGFR3: tale recettore sembra inibire la crescita ossea; si ritiene pertanto che le patologie correlate al FGFR3 siano dovute ad attivazione costitutiva del recettore (guadagno di funzione) [48]. Embrioni di topi *knock out* per SOX9 non completano il loro sviluppo e mancano del tutto di cartilagine : ciò indica che il fattore di trascrizione SOX9 possiede molte funzioni e tra esse quella di determinare la differenziazione dei condrociti [49].

Dagli esempi sopra riportati, si evince che il modello murino è stato creato successivamente alla identificazione del gene umano, con lo scopo di indagare i meccanismi patogenetici di vari quadri morbosi nell'uomo. Altre volte, il modello murino appare indispensabile per identificare il gene coinvolto nel determinismo della malattia; ad esempio, è stato dimostrato che i topi *knock out* per il gene del Biglicano (Bgn) sono normali alla nascita, ma che successivamente sviluppano ritardo di crescita e ridotta mineralizzazione ossea [50]: potremmo quindi trovarci di fronte al modello murino della osteoporosi nell'uomo. Per inciso, ricordiamo che il Biglicano è un componente non collagenico della matrice extracellulare dell'osso e che esso si lega al collagene e al TGF-€. Studi futuri ci indicheranno se questo gene può contribuire alla patogenesi della osteoporosi involutiva. Talvolta, è lo studio dei mutanti murini naturali a consentirci di identificare un gene che potrebbe rivestire un ruolo importante anche nell'uomo: ttw è un topo mutante naturale che sviluppa ossificazione dei legamenti del rachide, ossificazione simile a quanto avviene in una comune forma di spondilopatia umana chiamata OPLL (ossificazione del legamento longitudinale posteriore del

rachide). Nel topo ttw, è mutato il gene della pirofosfatasi dei nucleotidi (NPPS), l'enzima che regola la mineralizzazione dell'osso e la calcificazione dei tessuti molli attraverso la produzione di pirofosfato, uno dei maggiori inibitori della calcificazione [51]. Molto recentemente è stato suggerito che NPPS possa essere coinvolto nell'uomo nella spondilopatia caratterizzata dalla ossificazione del legamento longitudinale posteriore [52].

Gli studi più recenti sottolineano la necessità di inquadrare lo sviluppo scheletrico come il prodotto di numerosi processi fisiologici, interdipendenti [53]. La crescita globale dello scheletro è regolata dall'ormone della crescita: la sua carenza determina il nanismo armonico ipofisario. La morfologia dei singoli segmenti ossei è guidata dall'accrescimento intramembranoso o encondrale: difetti a livello dei vari recettori per i fibroblasti alterano il normale sviluppo scheletrico. In epoca ancora più precoce, durante la vita embrionale, il controllo locale della morfologia dei singoli segmenti ossei viene svolto dai fattori di crescita dell'osso stesso (tra i quali i TGFb con le BMPs) e prima ancora dai fattori di trascrizione, quali gli omeogeni (SHOX). Infine, il rimodellamento osseo è regolato da fattori ormonali e dalle proteine della cartilagine: le loro alterazioni quantitative o qualitative possono provocare osteopetrosi oppure osteoporosi. Possiamo pertanto concludere, affermando che l'acquisizione di queste recenti conoscenze (geni per i collageni fibrillari e non fibrillari, geni per le proteine coinvolte nella formazione e nella solfatazione della matrice della cartilagine, geni per i fattori di crescita dell'osso e per i recettori dei fattori di crescita dei fibroblasti) è estremamente utile non solo per cercare di chiarire la fisiopatologia molecolare di molte malattie genetiche ereditarie, in genere piuttosto rare, ma anche quella di alcune patologie multifattoriali estremamente frequenti, quali la malattia artrosica e la osteoporosi.

Ringraziamenti

Si ringrazia il Dott. Andrea Superti-Furga per i preziosi suggerimenti apportati durante la stesura di questa rassegna.

Ricevuto il 20 settembre 1999.
Accettato il 4 gennaio 2000.

BIBLIOGRAFIA

1. THE TREACHER COLLINS SYNDROME COLLABORATIVE GROUP. 1996. Positional cloning of a gene involved in the pathogenesis of Treacher Collins syndrome. *Nat. Genet.* **12**: 130-136.

2. FRANCOMANO, C.A. 1995. Key role for a minor collagen. *Nat. Genet.* **9**: 6-8.

3. RENIERI, A., BRUTTINI, M., GALLI, L., ZANELLI, P., NERI, T., ROSSETTI, S., TURCO, A., HEISKARI, N., ZHOU, J., GUSMANO, R., MASSELLA, L., BANFI, G., SCOLARI, F., SESSA, A., RIZZONI, G., TRYGGVASON, K., PIGNATTI, P.F., SAVI, M,. BALLABIO, A. & DE MARCHI, M. 1996. X-linked Alport syndrome: an SSCP-based mutation survey over all 51 exons of the COL4A5 gene. *Am. J. Hum. Genet.* **58**: 1192-1204.

4. INTERNATIONAL WORKING GROUP ON CONSTITUTIONAL DISEASES OF BONE. 1998. International nomenclature and classification of the osteochondrodysplasias. *Am. J. Med. Genet.* **79**: 376-382.

5. RIMOIN, D.L. & LACHMAN, R.S. 1983. The Chondrodysplasias. In: *Principles and practice of medical genetics*. A.E.H Emery (Ed.).Churchill Livingston, New York. p. 703-735.

6. GLORIEUX, F.H., BISHOP, R., TRAVERS, P., ROUGHLEY, G., CHABOT, G., LANOUE, G., FASSIER, F., GLORIEUX, D., HOPKINS, E. & MARINI, J. 1997. Type V osteogenesis imperfecta. *J. Bone. Mineral. Res.* **12**: F653 (A).

7. AITCHISON, K., OGILVIE, D., HONEYMAN, M., THOMPSON, E. & SYKES, B. 1988. Homozygous osteogenesis imperfecta unlinked to collagen I genes. *Hum. Genet.* **78**: 233-236.

8. MORRISON, N.A., JIAN CHENG, QI, TOKITA, A., KELLY, P.J., CROFTS, L., NGUYEN, T.V., SAMBROOK, P.N. & EISMAN, J.A. 1994. Prediction of bone density from vitamine D receptor alleles. *Nature* **367**: 284-287.

9. KOBAYASHI, S., INOUE, S., HOSOI, T., OUCHI, Y., SHIRAKI, M. & ORIMO, H. 1996. Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. *J. Bone Miner. Res.* **11**: 306-311.

10. GRANT, S.F.A., REID, D.M., BLAKE, G., HERD, R., FOGELMAN, I. & RALSTON, S.H. 1996. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I a1 chain. *Nat. Genet.* **14**: 203-205.

11. GELB, B., SHI, G., CHAPMAN, H. & DESNICK, R. 1996. Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science* **273**: 1236-1238.

12. TILLER, G., POLUMBO, P., WEIS, M., BOGAERT, R., LACHMAN, R., COHN, D., RIMOIN, D. & EYRE, D. 1995. Dominant mutations in the type II collagen gene, COL2A1, produce spondyloepimetaphyseal dysplasia, Strudwick type. *Nat. Genet.* **11**: 87-89.

13. ALA-KOKKO, L., BALDWIN, C., MOSKOWITZ, R. & PROCKOP, D. 1990. Single base mutation in the type II procollagen gene (COL2A1) as a cause of primary osteoarthritis associated with a mild chondrodysplasia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **87**: 6565-6568.

14. VIKKULA, M., MARIMAN, E.C.M., LUI, V.C.H., ZHIDKOVA, N.I., TILLER, G.E., GOLDRING, M.B., VAN BEERSUM, S.E.C., DE WAAL MALEFIJT, M.C., VAN DEN HOOGEN, F.H.J., ROPERS, H-H., MAYNE, R., CHEAH, K.S.E., OLSEN, B.R., WARMAN, M.L. & BRUNNER, H.G. 1995. Autosomal dominant and recessive osteochondrodysplasias associated with the COL11A2 locus. *Cell* **80**: 431-439.

15. MUGARAKI, Y., MARIMAN, E.C.M., VAN BEERSUM, S.E.C., PERALA, M., VAN MOURIK, J.B.A., WARMAN, M.L., OLSEN, B.R. & HAMEL, B.C.J. 1996. A mutation in the gene encoding the a2 chain of the fibril-associated collagen IX, COL9A2, causes multiple epiphyseal dysplasia (EDM2). *Nat. Genet.* **12**: 103-105.

16. BRIGGS, M.D., HOFFMAN, S.M.G., KING, L.M., OLSEN, A.S., MOHRENWEISER, H., LEROY, J.G., MORTIER, G.R., RIMOIN, D.L., LACHMAN, R.S., GAINES, E.S., CEKLENIAK, J.A., KNOWLTON, R.G. & COHN, D.H. 1995. Pseudo-achndroplasia and multiple epiphyseal dysplasia due to mutations in the cartilage oligomeric matrix protein gene. *Nat. Genet.* **10**: 330-336.

17. WALLIS, G., RASH, B., SWEETMAN, W., THOMAS, J., SUPER, M., EVANS, G., GRANT, M. & BOOT-HANDFORD, R.P. 1994. Amino acid substitutions of conserved residues in the carboxyl-terminal domain of the alpha 1(X) chain of type X collagen occur in two unrelated families with metaphyseal chondrodysplasia type Schmid. *Am. J. Hum. Genet.* **54**: 196-178.

18. HÄSTBACKA, J., DE LA CHAPELLE, A., MAHTANI, M.M,. CLINES, G., REEVE-DALY, M.P., DALY, M., HAMILTON, B.A., KUSUMI, K., TRIVEDI, B., WEAVER, A. *et al*. 1994. The diastrophic dysplasia gene encodes a novel sulfate transporter: positional cloning by fine-structure linkage disequilibrium mapping. *Cell* **78**: 1073-1087.

19. HÄSTBACKA, J,. SUPERTI-FURGA, A., WILCOX, WR., RIMOIN, D.L., COHN, D.H. & LANDER, E.S. 1996. Atelosteogenesis type II is caused by mutations in the diastrophic dysplasia sulfate-transporter gene (DTDST): evidence for a phenotypic series involving three chondrodysplasias. *Am. J. Hum. Genet.* **58**: 255-262.

20. SUPERTI-FURGA, A., HÄSTBACKA, J., WILCOX, W., COHN, D., VAN DER HARTEN, H., ROSSI, A., BLAU, N., RIMOIN, D,. STEINMANN, B., LANDER, E. & GITZELMANN, R. 1996. Achondrogenesis type IB is caused by mutations in the diastrophic dysplasia sulphate transporter gene. *Nat. Genet.* **12**: 100-102.

21. SUPERTI-FURGA, A. 1994. A defect in the metabolic activation of sulfate in a patient with achondrogenesis type IB. *Am. J. Hum. Genet.* **55**: 1137-1145.

22. SUPERTI-FURGA, A., NEUMANN, L., RIEBEL, T., EICH, G., STEINMANN, B., SPRANGER, J. & KUNZE, J. 1999. Recessively inherited multiple epiphyseal dysplasia with normal stature, club foot, and double layered patella caused by a DTDST mutation. *J. Med. Genet.* **36**: 621-624.

23. UL HAQUE, M.F., KING, L.M., KRAKOW, D., CANTOR, R.M., RUSINIAK, M.E., SWANK, R.T., SUPERTI-FURGA, A., HAQUE, S., ABBAS, H., AHMAD, W., AHMAD, M. & COHN, D.H. 1998. Mutations in orthologous genes in human spondyloepimetaphyseal dysplasia and the brachymorphic mouse. *Nat. Genet.* **20**: 157-162.

24. GEDEON, A., COLLEY, A., JAMIESON, R., THOMPSON, E.M., ROGERS, J., SILLENCE, D., TILLER, G.E., MULLEY, J.C. & GECZ, J. 1999. Identification of the gene (SEDL) causing X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda. *Nat. Genet.* **22**: 400-404.

25. WRIGHT, E., HARGRAVE, M.R., CHRISTIANSEN, J., COOPER, L., KUN, J., EVANS, T., GANGADHARAN, U., GREENFIELD, A. & KOOPMAN, P. 1995. The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat. Genet.* **9**: 15-20.

26. GRAVES, J.A.M. 1997. Two uses for old SOX. *Nat. Genet.* **16**: 114-115.

27. MURAGAKI, Y., MUNDLOS, S., UPTON, J. & OLSEN, B.R. 1996. Altered growth and branching patterns in synpolydactyly caused by mutations in HOXD13. *Science* **272**: 548-551.

28. RADHAKRISHNA, U., WILD, A., GRZESCHIK, K-H. & ANTONARAKIS, S.E. 1997. Mutation in GLI3 in postaxial polydactyly type A. *Nat. Genet.* **17**: 269-270.

29. KALFF-SUSKE, M., WILD, A., TOPP, J., WESSLING, M., JACOBSEN, E.M., BORNHOLDT, D., ENGEL, H., HEUER, H., AALFS, C., AUSEMS, M., BARONE, R., HERZOG, A., HEUTINK, P., HOMFRAY, T., GILLESSEN-KAESBACH, G., KONIG, R., KUNZE, J., MEINECKE, P,. MULLER, D., RIZZO, R., STRENGE, S,. SUPERTI-FURGA, A. & GRZESCHIK, K.H. 1999. Point mutations throughout the GLI3 gene cause Greig cephalopolysyndactyly syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **8**: 1769-1777.

30. BAMSHAD, M., LIN, R.C,. LAW, D.J,. WATKINS, W.S., KRAKOWIAK, P.A., MOORE, M.E., FRANCESCHINI, P., LALA, R,. HOLMES, L.B., GEBUHR, T.C., BRUNEAU, B.G., SCHINZEL, A., SEIDMAN, J.G., SEIDMAN, C.E. & JORDE, L.B. 1997. Mutations in human TBX3 alter limb, apocrine and genital development in ulnar-mammary syndrome. *Nat. Genet.* **16**: 311-315.

31. BASSON, C.T., BACHINSKY, D.R., LIN, R.C., LEVI, T., ELKINS, J.A., SOULTS, J., GRAYZEL, D., KROUMPOUZOU, E., TRAILL, T.A., LEBLANC-STRACESKI, J.L., RENAULT, B., KUCHERLAPATI, R., SEIDMAN, J.G. & SEIDMAN, C.E. 1997. Mutations in human cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat. Genet.* **15**: 30-34.

32. LEE, B., THIRUNAVUKKARASU, K., ZHOU, L., PASTORE, L., BALDINI, A., HECHT, J., GEOFFROY, V., DUCY, P. & KARSENTY, G. 1997. Missense mutations abolishing DNA binding of the osteoblast-specific transcription factor OSF2/ CBFA1 in ckeidocranial dysplasia. *Nat. Genet.* **16**: 307-310.

33. HOWARD, T.D., PANZEKAS, W., GREEN, E.D., CHIANG, L.C., MA, N., ORTIZ DE LUNA, R.I., GARCIA DELGADO, C., GONZALES-RAMOS, M., KLINE, A.D. & JABS, E.W. 1997. Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Sarthre-Chotzen syndrome. *Nat. Genet.* **15**: 36-41.

34. RAO, E., WEISS, B., FUKAMI, M., RUMP, A., NIESLER, B., MERTZ, A., MUROYA, K., BINDER, G., KIRSCH, S., WINKELMANN, M., NORDSIEK, G., HEINRICH, U., BREUNING, M., RANKE, M., ROSENTHAL, A., OGATA, T. & RAPPOLD, G. 1997. Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat. Genet.* **16**: 54-62.

35. SHEARS, D.J., VASSAL, H.J., GOODMAN, F.R., PALMER, R.W., REARDON, W., SUPERTI-FURGA, A., SCAMBLER, P.J. & WINTER, R.M. 1998. Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene SHOX cause Leri-Weill dyschondrosteosis. *Nat. Genet.* **19**: 70-73.

36. SHIANG, R., THOMPSON, L., ZHU, Y., CHURCH, D., FIELDER,T., BOCIAN, M., WINOKUR, S. & WASMUTH, J. 1994. Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell* **78**: 335-342.

37. MUENKE, M. & SCHELL, U. 1995. Fibroblast-growth-factor receptor mutations in human skeletal disorders. *Trends Genet.* **11**: 308-313.

38. KINGSLEY, DM. 1994. What do BMPs do in mammmals? Clues from the mouse short-ear mutation. *Trends Genet.* **10**: 16-21.

39. THOMAS, J.T., LIN, K., NANDEDKAR, M., CAMARGO, M., CERVENKA, J. & LUYTEN, F.P. 1996. A human chondrodysplasia due to a mutation in a TGF-€ superfamily member. *Nat. Genet.* **12**: 315-317.

40. POPE, F.M. & BURROWS, N.P. 1997. Ehlers-Danlos syndrome has varied molecular mechanisms. *J. Med. Genet.* **34**: 400-410.

41. GIUNTA, C., SUPERTI-FURGA, A., SPRANGER, S., COLE, W.G. & STEINMANN, B. 1999. Ehlers-Danlos syndrome type VII: clinical features and molecular defects. *J. Bone Joint Surg. Am.* **81**: 225-238.

42. KONTUSAARI, S., TROMP, G., KUIVANIEMI, H., ROMANIC, A. & PROCKOP, D. 1990. A mutation in the gene for type III procollagen (COL3A1) in a family with aortic aneurysms. *J. Clin. Inv.* **86**: 1465-1473.

43. MASLEN, C., BABCOCK, D., RAGHUNATH, M. & STEINMANN, B. 1997. A rare branch-point mutation is associated with misplicing of fibrillin-2 in a large family with congenital contractural arachnodactyly. *Am. J. Hum. Genet.* **60**: 1389-1398.

44. FASSLER, R., SCHNEGELSBERG, P., DAUSMAN, J., SHINYA, T., MURAGAKI, Y., MCCARTHY, M., OLSEN, B. & JAENISCH, R. 1994. Mice lacking alpha 1 (IX) collagen develop noninflammatory degenerative joint disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**: 5070-5074.

45. ROSATI, R., HORAN, G., PINERO, G., GAROFALO, S., KEENE, D., HORTON, W., VUORIO, E., DE CROMBRUGGHE, B. & BEHRINGER, R. 1994. Normal long bone growth and development in type X collagen-null mice. *Nat. Genet.* **8**: 129-135.

46. JACENKO, O., LUVALLE, P. & OLSEN, B. 1993. Spondylometaphyseal dysplasia in mice carrying a dominant negative mutation in a matrix protein specific for cartilage-to-bone transition. *Nature* **365**: 56-61.

47. ANDRIKOPOULOS, K., LIU, X., KEENE, D.R., JAENISCH, R. & RAMIREZ, F. 1995. Targeted mutation in the col5a2 gene reveals a regulatory role for type V collagen during matrix assembly. *Nat. Genet.* **9**: 31-36.

48. DENG, C., WYNSHAW-BORIS, A., ZHOU, F., KUO, A. & LEDER, P. 1996. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* **84**: 911-921.

49. BI, W., DENG, J.M., ZHANG, Z., BEHRINGER, R.R. & DE CROMBRUGGHE, B. 1999. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat. Genet.* **22**: 85-89.

50. XU, T., BIANCO, P., FISHER, L.W., LONGENECKER, G., SMITH, E., GOLDSTEIN, S., BONADIO, J., BOSKEY, A., HEEGAARD, A.M., SOMMER, SATOMURA, K., DOMINGUEZ, P., ZHAO, C., KULKARNI, A.B., ROBEY, P.G. & YOUNG, MF. 1998. Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nat. Genet.* **20**: 78-82.

51. OKAWA, A., NAKAMURA, I., GOTO, S., MORIYA, H., NAKAMURA, Y. & IKEGAWA, S. 1998. Mutation in Npps in a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Nat. Genet.* **19**: 271-273.

52. NAKAMURA, I., IKEGAWA, S., OKAWA, A., OKUDA, S., KOSHIZUKA, Y., KAWAGUCHI, H., NAKAMURA, K., KOYAMA, T., GOTO, S., TOGUCHIDA, J., MATSUSHITA, M., OCHI, T., TAKAOKA, K. & NAKAMURA, Y. 1999. Association of the human NPPS gene with ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Hum. Genet.* **104**: 492-497.

53. ERLEBACHER, A., FILVAROFF, E.H., GITELMAN, S.E. & DERNCK, R. 1995. Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* **80**: 371-378.

Ann. Ist. Super. Sanità, vol. 36, n. 1 (2000), pp. 99-109

Orologi biologici circadiani: meccanismi molecolari autorigeneranti che mantengono il ritmo

Simona GAUDI, Grigor ZORAQI, Vincenzo FALBO e Domenica TARUSCIO

Laboratorio di Ultrastrutture, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - Gli orologi biologici circadiani sono oscillatori endogeni, autorigeneranti, i cui geni, espressi ritmicamente, controllano molti fenomeni biologici a complessità differente. Sono presenti dai procarioti all'uomo e le loro basi molecolari sembrano essere simili nella maggior parte degli organismi viventi.
In questo lavoro verranno descritti i meccanismi fondamentali alla base del funzionamento degli orologi biologici circadiani e discusso il loro possibile ruolo in alcune patologie umane.

Parole chiave: ritmi biologici, orologi biologici circadiani, malattie, meccanismi molecolari.

Summary (*Biological circadian clocks: selfsustaining molecular mechanisms that drive the rhythm*). - Biological circadian clocks are endogenous selfsustaining oscillators, where periodically expressed genes control functions at all levels of biological organization. These mechanisms are detectable from prokaryotes to humans, and their basic molecular components are common in most living organisms.
This rewiew focusses on the basic properties of biological circadian clocks and their possible involvement in human diseases.

Key words: biological rhythms, biological circadian clocks, diseases, molecular mechanisms.

Introduzione

Il tempo rappresenta una dimensione essenziale negli esseri viventi. Il tempo biologico è sia lineare (tempo cronologico) che ciclico (tempo periodico). La cronobiologia prende in considerazione gli eventi biologici ciclici, o periodici, che si ripetono con diverse frequenze e che vengono quindi definiti ritmi biologici [1].

L'attività ritmica è fondamentale per gli esseri viventi; un organismo, così come tutte le sue componenti, non funziona costantemente, ma presenta oscillazioni qualitative e quantitative nei suoi processi biologici. L'esistenza di ritmi biologici è una caratteristica peculiare di tutti gli organismi viventi, da quelli unicellulari all'uomo e sono presenti a tutti i livelli di organizzazione: dall'organismo, ai tessuti, alle cellule e alle strutture subcellulari [2].

Una distribuzione così generalizzata dei ritmi biologici giustifica l'interesse scientifico crescente per identificarne sia il valore funzionale che le basi cellulari e molecolari che ne garantiscono il mantenimento [3, 4].

Tra i ritmi biologici più studiati, in quanto giocano un ruolo fondamentale nelle funzioni degli esseri viventi, vi sono quelli con periodicità di circa 24 ore, definiti ritmi circadiani (*circa dies*: quasi un giorno) [5].

Tali ritmi sono di estrema importanza in quanto consentono all'organismo di sincronizzarsi e reagire adeguatamente ai cambiamenti ambientali.

Una delle prime osservazioni riguardo l'esistenza di una ritmicità circadiana nelle funzioni biologiche fu fatta da Jacques De Mairan nel 1729 [6]. Questo astronomo francese osservò che l'apertura e la chiusura delle foglie avveniva con periodicità giornaliera anche in condizioni sperimentali di buio assoluto e di temperatura costante; ne concluse quindi che doveva esistere un meccanismo interno di misurazione del tempo: un orologio biologico endogeno.

Il ritmo biologico mantenuto dall'organismo anche in condizioni di temperatura e luce costanti viene definito a corso libero *free-running* [7].

Numerose evidenze sperimentali hanno portato alla conclusione che l'esistenza e la conservazione di una ritmicità circadiana *free-running* è dovuta alla presenza di meccanismi altamente specializzati, endogeni, in grado di autorigenerarsi durante le 24 ore, definiti orologi biologici circadiani [8].

Tali orologi, detti anche *pacemaker*, sono preposti alla coordinazione centrale della cadenza ritmica di alcune funzioni biologiche a livello dell'organismo, in quanto consentono sia alla singola cellula che all'organismo di sincronizzarsi in relazione alle diverse necessità del periodo giorno/notte e rispondere con estrema efficienza alle variazioni ambientali.

Gli orologi biologici circadiani sono comparsi precocemente nell'albero filogenetico e quindi, si presuppone in loro l'esistenza di meccanismi comuni per tutte le specie dello spettro evolutivo [10-14].

Un sistema biologico circadiano è costituito in genere da tre componenti fondamentali e ben distinte:

a) la prima è definita *input* e consiste di uno o più segnali esogeni che mettono in relazione l'orologio biologico endogeno con l'ambiente geofisico che lo circonda; un esempio di *input* periodico circadiano è l'alternanza luce/buio (giorno/notte);

b) la seconda è l'orologio biologico propriamente detto, ovvero l'oscillatore endogeno autonomo, localizzato all'interno di ogni cellula;

c) la terza è indicata come *output* e consiste nella trasduzione della periodicità biologica dell'oscillatore in un cambiamento del comportamento cellulare, del tessuto, dell'organo e dell'organismo. Esempi di *output* sono: la secrezione ciclica ormonale, il ritmo attività-riposo, il ritmo dell'assunzione di cibo, la variazione giornaliera della temperatura corporea, ecc. [4].

Ogni orologio biologico circadiano è un oscillatore endogeno ed è costituito almeno in parte da un circuito a regolazione negativa in cui le proteine, responsabili dell'oscillazione, agiscono da repressori della trascrizione dei propri geni. Tale meccanismo dà origine, in associazione anche a fattori di regolazione positiva, a variazioni cicliche dei livelli di RNA e di proteine dell'orologio biologico che consentono il mantenimento del ritmo circadiano [3].

Tali orologi sono definiti autoscillanti in quanto, grazie alla presenza di circuiti endogeni complessi, sono in grado di mantenere il proprio ritmo e funzionare (oscillare) indipendentemente dalle condizioni ambientali.

L'orologio biologico circadiano propriamente detto è fortemente conservato nella maggior parte degli organismi viventi, pertanto deve possedere caratteristiche morfo-funzionali simili, mentre le componenti *input* e *output* possono essere diverse e specie-specifiche [4].

In alcune specie la sede di recezione dell'*input* ed il *pacemaker* coesistono in un unica struttura: le stesse cellule che contengono l'orologio circadiano sono anche la sede di recezione dell'*input*. In questo caso si parla di interazione diretta, un esempio è rappresentato dalla ghiandola pineale che negli uccelli, rettili e pesci è contemporaneamente la sede delle cellule fotosensibili (sede di recezione dell'*input*) e dell'attività del *pacemaker* [4, 12].

In altre specie, l'*input* e il *pacemaker* sono localizzate in strutture diverse. Nei mammiferi, ad esempio la retina raccoglie lo stimolo luminoso (*input*), questo viene trasmesso attraverso il fascio retino-ipotalamico all'orologio circadiano che ha sede nei nuclei soprachiasmatici (NSC). Gli NSC, localizzati nella parte anteriore dell'ipotalamo, sono costituiti da migliaia di neuroni che funzionano con attività circadiana e sono in rapporto anatomo-funzionale con la ghiandola pineale; questa a sua volta regola in modo circadiano la sua produzione di melatonina [15, 16].

L'evidenza sperimentale che gli NSC siano la sede di un importante *pacemaker* nei mammiferi, deriva da esperienze dirette di stimolazione e distruzione dei nuclei stessi. Nel ratto, a seguito della stimolazione elettrica e/o farmacologica di questi nuclei, si assiste ad uno slittamento di fase di alcuni ritmi circadiani [17]. Un esempio è rappresentato dall'iniezione diretta del fattore di crescita delle cellule neuronali (*nerve growth factor*, NGF) a livello degli NSC del criceto, che induce un avanzamento di fase del ritmo circadiano, paragonabile allo slittamento indotto dalla luce [18].

Nel ratto, lesioni a carico degli NSC portano ad un cambiamento dell'organizzazione del sonno: la gravità dell'alterazione del sonno è in funzione dell'ampiezza della regione lesa [19].

Esperimenti successivi nel criceto hanno dimostrato che la rimozione chirurgica di più del 75% degli NSC promuove l'annullamento della ritmicità circadiana dell'attività locomotoria, dell'assunzione di cibo, della pressione arteriosa, della temperatura corporea e della secrezione di alcuni ormoni, quali ad esempio la melatonina e la prolattina. Dopo questa drastica asportazione, le funzioni ritmiche non riprendono, ma possono essere ristabilite solo se vengono trapiantate cellule degli NSC di un altro criceto donatore; in tal modo si ottiene una ripresa delle funzioni ritmiche che mostrano tutte le caratteristiche del *pacemaker* circadiano dell'individuo donatore e non quelle del ricevente [17].

Numerosi dati sperimentali hanno evidenziato che nei mammiferi gli NSC rappresentano l'orologio biologico circadiano primario, dal quale dipende il controllo degli orologi circadiani secondari; tuttavia non è stato ancora completamente chiarito il meccanismo mediante il quale gli NSC modulano l'azione dei *pacemaker* periferici.

Gli NSC, in seguito alla stimolazione effettuata dall'*input* (es. la luce) inducono l'espressione differenziata di alcuni fattori di trascrizione, quali c-*fos* e *jun*B, che potrebbero dare inizio ad una serie di eventi a cascata responsabili della modulazione dell'azione del *pacemaker* principale. Dati sperimentali dimostrano che l'inibizione dell'azione di c-*fos* e *jun*B, mediante oligonucleotidi antisenso, annulla lo slittamento di fase del ciclo circadiano indotto dalla luce [20].

Recenti studi hanno evidenziato nella retina di criceto, la presenza di un altro oscillatore circadiano, geneticamente programmato che regola la sintesi di melatonina, avvalorando la tesi della coesistenza di molteplici oscillatori biologici negli organismi pluricellulari [21].

L'esistenza di più orologi biologici circadiani indipendenti all'interno di un unico organismo viene dimostrata anche in *Drosophila melanogaster*. Un esempio è costituito dai tubuli del Malpighi, che funzionando come un rene, agiscono anche da

fotorecettori indipendenti esprimendo geni tessuto-specifici in accordo con i ritmi circadiani [22]. Questi risultati dimostrano che le cellule di tessuti isolati sono in grado di compiere oscillazioni circadiane indipendenti, anche in assenza del controllo degli orologi superiori, quali ad esempio gli NSC dei mammiferi.

Pertanto, ogni organismo pluricellulare è regolato da un insieme di orologi biologici circadiani, questi includono sia i semplici orologi contenuti in una singola cellula che quelli più complessi presenti nel sistema nervoso centrale; il risultato delle loro interazioni porta ad una modulazione circadiana della fisiologia dell'organismo.

Il sistema circadiano dell'uomo è costituito da una molteplicità di oscillatori autorigeneranti che sono interconnessi e che a loro volta possono essere sincronizzati da fattori ambientali, denominati dal tedesco *Zeitebergs* (sincronizzatori). L'organizzazione temporale delle funzioni biologiche di un individuo viene assicurata dall'interazione di questi fattori [23].

Nell'uomo alcuni esempi di funzioni biologiche con andamento circadiano sono: la temperatura corporea, la produzione di vari ormoni, il ciclo sonno/veglia, la pressione arteriosa, la frequenza cardiaca.

L'andamento circadiano della temperatura corporea è sicuramente molto studiato, questa aumenta al risveglio, mentre diminuisce prima di andare a dormire; l'aumento mattutino della temperatura è evidente anche in assenza di luce e l'intero ritmo è mantenuto anche in pazienti sia sani che febbricitanti durante il riposo continuo. Ciascun individuo ha uno schema costante e caratteristico, e la curva crescente della temperatura corporea mostra una differenza misurabile tra individui. Il centro della termoregolazione è localizzato a livello dell'ipotalamo che agisce, pertanto, da orologio circadiano specifico per la termoregolazione [24].

Un altro esempio importante è rappresentato dalle variazioni nictemerali di ormoni, quali ad esempio il cortisolo e l'ormone tireotropo (*thyroid-stimulating hormone*, TSH).

In particolare, la regolazione circadiana dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrenalico può essere osservata nelle variazioni dei livelli di cortisolo che fluttuano fra valori massimi, osservabili nelle prime ore del mattino, e livelli minimi presenti intorno a mezzanotte. E' interessante notare che queste fluttuazioni sono abolite in condizioni patologiche, come nella sindrome di Cushing (caratterizzata da elevati livelli di cortisolo) [25].

In condizioni sperimentali che implichino un regime diverso di attività/sonno, l'aumento dei corticosteroidi plasmatici avviene durante il periodo del sonno, questo è stato ad esempio osservato in persone che lavorano abitualmente di notte e che quindi mostrano un adattamento del ritmo in cui le massime concentrazioni plasmatiche coincidono con l'inizio del lavoro [26].

Inoltre, una notevole ritmicità circadiana si manifesta anche nell'escrezione dell'adrenalina e dell'aldosterone. I livelli urinari di adrenalina raggiungono il massimo nel primo pomeriggio mentre i livelli di aldosterone salgono durante la mattina fino a raggiungere un massimo verso mezzogiorno. Studi sperimentali hanno evidenziato che, fra le altre attività, questa ritmicità surrenalica è responsabile della variazione circadiana nei livelli di eosinofili; la diminuzione del livello di eosinofili nel primo mattino è una conseguenza dell'aumento mattutino del livello plasmatico di corticosteroidi. Gli steroidi iniettati al mattino in soggetti normali provocano una diminuzione del livello di eosinofili mentre i soggetti affetti dalla malattia di Addison (caratterizzata da insufficienza di ormoni adrenocorticali) non mostrano una reazione simile [27].

Lo studio dei ritmi circadiani ha portato contributi anche in campo clinico mediante l'introduzione nella pratica medica della cronodiagnosi utile nel monitoraggio dell'ipertensione e delle malattie cardiovascolari [28, 29].

La grande attenzione rivolta all'identificazione e allo studio dei ritmi circadiani ha apportato enormi vantaggi nella individuazione di stati patologici legati alle alterazione del ritmo circadiano, le modificazioni del ciclo circadiano possono essere la causa di alcune malattie o avere valore predittivo per alcuni stati patologici.

Un settore sicuramente tuttora in via di sviluppo è rappresentato dalla cronoterapia, la possibilità cioè di poter identificare un tempo ottimale in cui somministrare il farmaco per poterne migliorare l'azione e diminuirne gli effetti collaterali [30].

Le differenze individuali della struttura del ritmo circadiano sono il risultato della complessa interazione di più fattori quali la variabilità genetica, lo stile di vita, l'età, lo stato di salute che contraddistinguono ogni singolo individuo.

Questa revisione della letteratura sugli orologi biologici circadiani vuole evidenziare le attuali conoscenze riguardo le basi genetiche dell'orologio vero e proprio; inoltre verranno brevemente analizzate le possibili correlazioni tra mutazioni a carico di alcuni geni fondamentali per il mantenimento del ritmo circadiano e l'insorgenza di determinate malattie.

Le componenti molecolari di un orologio biologico circadiano

Uno dei quesiti fondamentali nello studio degli orologi biologici circadiani è la comprensione del loro funzionamento. Per capire come gli orologi biologici circadiani siano in grado di autorigenerarsi e mantenere la loro periodicità di 24 ore, è necessario identificare le basi molecolari che consentono al congegno di funzionare (oscillare).

La forte pressione selettiva del ciclo giorno/notte ha verosimilmente fatto in modo che organismi evolutivamente molto distanti potessero sviluppare e conservare meccanismi simili e altamente vantaggiosi quali gli orologi biologici circadiani. Infatti, l'esistenza di questi orologi è stata individuata in specie evolutivamente molto distanti, quali batteri, funghi, insetti e mammiferi [13, 14].

L'isolamento e la caratterizzazione di alcuni mutanti del ritmo circadiano, in organismi quali *Cyanobatteria, Neurospora, Drosophila*, topo e uomo, hanno consentito l'identificazione di alcuni geni responsabili del funzionamento dell'orologio biologico circadiano [31-37].

Partendo dall'organismo meno complesso, quale la *Neurospora,* fino all'uomo, si illustreranno alcuni dei meccanismi di regolazione, sia positivi che negativi, alla base del funzionamento degli orologi biologici circadiani.

Neurospora

Il gene *frequency (frq)* è responsabile della sincronizzazione del ciclo di sporulazione asessuata in *Neurospora* [32].

L'isolamento di un mutante di questo gene ha portato alla formulazione di un modello di regolazione ciclica fondamentale per la comprensione del meccanismo di autorigenerazione dell'orologio biologico circadiano. Il gene *frq* codifica per due forme alternative di proteina FRQ, rispettivamente di 989 e di 890 aminoacidi, entrambe coinvolte nella sporulazione asessuata [33, 34]. I livelli di espressione di mRNA e la sintesi di proteine FRQ sono ciclici. Infatti, se si analizzano le oscillazioni a partire dalla mezzanotte, quando i livelli di mRNA e di proteine sono bassi, si osserva un aumento della trascrizione che raggiunge il suo massimo nelle 10-12 ore successive. Questo aumento della trascrizione di *frq* è dovuto all'azione di un eterodimero costituito da due proteine *whitecollar*1 (WC1) e *whitecollar*2 (WC2) [38]. Tali proteine sono elementi di regolazione positiva e presentano un dominio, denominato PAS, caratteristico di una superfamiglia di fattori di trascrizione (*per*, ARNT, *sim*: PAS). Questo dominio è responsabile dell'interazione tra proteine e quindi consente la formazione di omo-, eterodimeri.

Inoltre, le proteine WC1 e WC2 posseggono entrambe un dominio Zn finger in grado di legare specificamente il DNA; grazie alla presenza di questi domini l'eterodimero WC1-WC2 si lega al promotore del gene *frq* e ne promuove la trascrizione [39, 40]. Dopo un intervallo di tempo le proteine FRQ vengono sintetizzate nel citoplasma ed entrano nel nucleo dove interagiscono con il dimero WC1-WC2 [34, 41]. Questa interazione contrasta l'attivazione della trascrizione del gene *frq* da parte dell'eterodimero, e quindi la proteina FRQ regola negativamente la trascrizione del suo gene. Studi di cinetica hanno dimostrato che la proteina FRQ rimane nel nucleo ad alti livelli, mantenendo represso lo stato di trascrizione del gene *frq* fino a tarda notte. Durante questo periodo, la proteina FRQ precedentemente fosforilata, viene degradata; la mancata trascrizione del gene *frq* e la contemporanea degradazione del prodotto proteico abbassano i livelli della proteina FRQ, che non è più in grado di esercitare la sua regolazione negativa. Al mattino, in risposta alla luce, le proteine WC1 e WC2, attivano la trascrizione del gene *frq* dando inizio ad un nuovo ciclo di regolazione [38], come rappresentato schematicamente in Fig 1.

Drosophila

Nella *Drosophila* sono stati identificati 5 geni implicati nel funzionamento dell'orologio biologico circadiano: *period* (*per*) [42], *timeless* (*tim*) [43, 44], *Drosophila clock* (d*Clk*) [45], *cycle* (*Cyc*) [46], e *doubletime* (*dbt*) [47, 48].

L'analisi dell'espressione dei geni *per* e *tim* ha rivelato la loro natura ritmica. In particolare, i messaggeri di *per* e *tim,* all'inizio del giorno sono presenti a bassa concentrazione, poi, con il trascorrere delle ore, cominciano ad aumentare fino a raggiungere il livello massimo verso mezzogiorno [49, 50, 51]. Responsabili dell'aumento della trascrizione di questi messaggeri sono le proteine dCLK e CYC che agiscono come attivatori della trascrizione [45, 46].

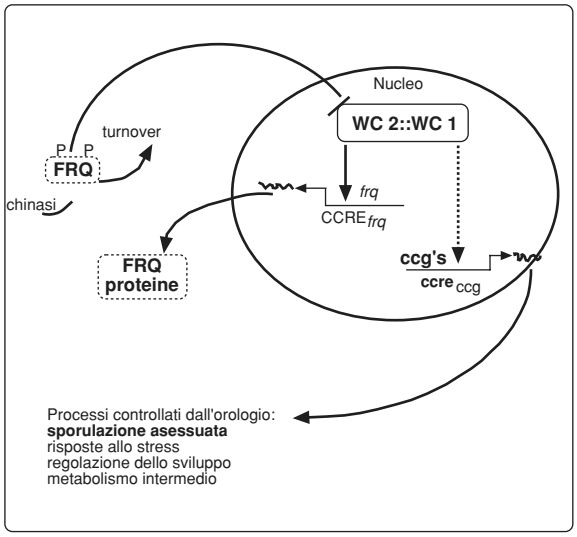


Fig. 1. - Elementi principali e ciclo di regolazione in *Neurospora*. Le linee con le frecce indicano una regolazione positiva, mentre quelle che terminano con una barra indicano una regolazione negativa. ccg: *clock controlled gene,* geni controllati dall'orologio; ccre: *circadian clock regulatory elements,* elementi regolatori dell'orologio circadiano.

La coespressione di *Clk* e *Cyc* e la formazione dell'eterodimero sono di fondamentale importanza per l'attivazione della trascrizione dei geni *per* e *tim*. Il gene *Clk* è espresso ritmicamente mentre *Cyc* sembra essere espresso costitutivamente [46].

Tali proteine sono caratterizzate dalla presenza del dominio PAS, responsabile della loro dimerizzazione, simile a quello di WC1, WC2 e di PER [52] e di un dominio *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH) in grado di legare il DNA [53].

Dopo 2-3 ore dal raggiungimento del livello massimo di trascrizione dei geni *per* e *tim*, inizia la sintesi delle proteine. Raggiunta la concentrazione critica, le proteine PER e TIM [54], formato l'eterodimero PER-TIM, vengono trasportate nel nucleo ed agiscono come regolatori negativi della loro trascrizione interagendo con il dimero CLK-CYC. I livelli dei messaggeri di *per* e *tim* cominciano a diminuire durante le 3 ore successive al tramonto. Verso mezzanotte, contemporaneamente alla diminuzione dei messaggeri di *per* e *tim*, si ha un innalzamento del livello di mRNA del gene *Clk* [55]. L'eterodimero PER-TIM in questo caso agisce come regolatore positivo della trascrizione di *Clk*.

Le proteine PER e TIM sono sintetizzate durante tutta la notte e vengono subito fosforilate dalla proteina DBT, prodotto del gene *dbt* [37, 48]. La fosforilazione influenza i livelli di accumulazione della proteina PER e sembra essere necessaria per il controllo della velocità della sua degradazione. Il controllo della cinetica di degradazione della proteina PER è uno dei punti nodali per il mantenimento dell'oscillazione dell'orologio biologico circadiano [48].

Verso mezzogiorno del giorno seguente i livelli di proteine PER e TIM hanno raggiunto livelli così bassi che non esiste più repressione della loro trascrizione, il dimero CLK-CYC attiva la trascrizione del gene *per* e ricomincia un nuovo ciclo circadiano (Fig. 2).

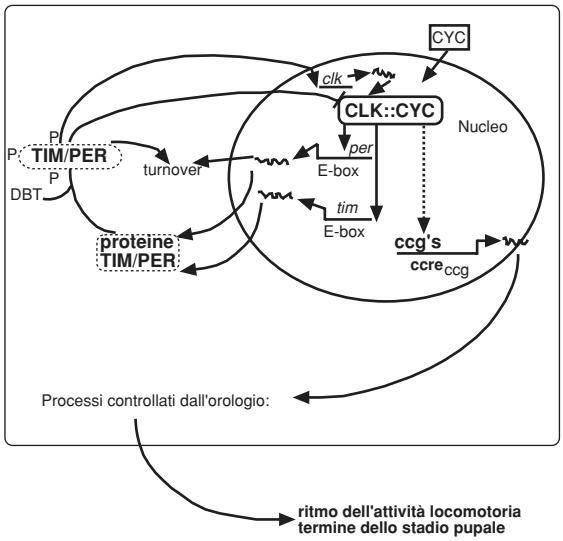


Fig. 2. - Elementi principali e ciclo di regolazione in *Drosophila*. Le linee con le frecce indicano una regolazione positiva, le linee a freccia discontinue mostrano un possibile meccanismo positivo di regolazione e quelle che terminano con una barra indicano una regolazione negativa. ccg: *clock controlled gene*, geni controllati dall'orologio; ccre: *circadian clock regulatory elements*, elementi regolatori dell'orologio circadiano.

Mammiferi

Uno dei punti cruciali per l'analisi molecolare del meccanismo circadiano nei mammiferi, è stata l'identificazione del mutante *clock* nel topo, che influenza sia la periodicità che la persistenza del ritmo circadiano. Nei mutanti *clock* si è osservato un ciclo di circa 25 ore nell'eterozigote, e di 27-28 ore nell'omozigote [56].

L'allele *clock* è un mutante dominante-negativo che codifica per una proteina deleta di 51 aminoacidi, chiamata CLOCKΔ19, nel dominio ritenuto importante per la regolazione della trascrizione [57, 58].

Lo studio della funzione della proteina CLOCK e gli esperimenti di *two-hybrid screen* [37] hanno consentito l'isolamento della proteina BMAL1, omologa alla proteina CYC di *Drosophila*.

Le due proteine CLOCK e BMAL1 posseggono il dominio PAS, che consente la loro associazione ad eterodimero; inoltre, sia CLOCK che BMAL1, sono caratterizzate dalla presenza di regioni bHLH specifiche per il legame con il DNA a livello delle sequenze E-box (CACGTG) [37].

Il mutante CLOCKΔ19 forma l'eterodimero con BMAL1, si lega fortemente alle sequenze E-box, ma non è in grado di attivare la trascrizione.

Nel topo e nell'uomo sono stati identificati tre differenti geni *per*, chiamati *mPer1*, *mPer2* e *mPer3* nel topo e *hPer1, hPer2 e hPer3* nell'uomo, ortologhi al gene *per* di *Drosophila*, espressi abbondantemente nel NSC e nella retina, ma presenti anche in altri tessuti; tutti questi geni sono stati localizzati su cromosomi diversi e sono presenti in un'unica copia [59-66].

La regione regolativa del gene *mPer1* presenta tre domini E-box che costituiscono le sequenze di legame dei domini bHLH dell'eterodimero CLOCK-BMAL1 [59]. Tale eterodimero si lega alle sequenze E-box ed attiva la trascrizione del gene *mPer1*. Si suppone che l'eterodimero CLOCK-BMAL1 interagisca anche con i geni *mPer2* e *mPer3,* ma al momento mancano evidenze sperimentali che lo dimostrino.

I prodotti dei tre geni *mPer1*, *mPer2* e *mPer3* sono caratterizzati dalla presenza del dominio PAS, ma non presentano alcuna regione che possa costituire un dominio putativo di legame al DNA [64].

In condizioni normali, i livelli di trascrizione di *mPer1*, iniziano ad aumentare a tarda notte, con successivo aumento della trascrizione dei geni *mPer2* e *mPer3*. Questi tre geni hanno un comportamento molto diverso in risposta alla luce; *mPer1* e *mPer2* sono fortemente indotti dalla luce [61], mentre *mPer3* risulta insensibile e l'espressione del suo messaggero rimane costante [67].

Alcune ore dopo l'inizio della trascrizione del gene *mPer1,* si ha un innalzamento dei livelli di proteina PER1 nel citoplasma. La proteina PER1 si associa, grazie al dominio PAS, alla proteina TIM, prodotto dell'espressione del gene *tim*, per formare l'eterodimero PER-TIM. Tale eterodimero entra nel nucleo ed interagisce con l'eterodimero CLOCK-BMAL1 bloccandone l'azione di regolatore positivo della trascrizione del gene *mPer1*.

Nei mammiferi l'espressione del gene *tim* è costitutiva e non sembra oscillare, come invece è stato osservato per il gene ortologo di *Drosophila*.

L'esistenza di tre diverse proteine, PER1, PER2 e PER3, ha fatto nascere l'ipotesi di una loro reciproca interazione per portare alla formazione di eterodimeri differenti PER-PER o PER-TIM con funzioni e ruoli diversificati all'interno dell'orologio biologico circadiano. Studi *in vitro* hanno dimostrano una forte associazione delle proteine PER-PER ed una più debole tra PER e TIM [67].

Recentemente è stato osservato che l'eterodimero CLOCK-BMAL1 non solo attiva la trascrizione di *per*, ma agisce da regolatore positivo anche per la trascrizione di alcuni geni che controllano l'*output*, quali la vasopressina [68].

In Fig. 3 è schematizzato il funzionamento dell'orologio biologico circadiano dei mammiferi [69].

Studi, effettuati in *Drosophila* e *Neurospora*, mettono l'accento sull'importanza delle modificazioni post-traduzionali che avvengono a carico delle diverse proteine coinvolte nel funzionamento dell'orologio biologico circadiano [34, 70]. Le velocità relative di fosforilazione e di degradazione delle proteine garantiscono la conservazione del ritmo circadiano. Nei mammiferi non è stata ancora identificata la presenza di una o più chinasi in grado di fosforilare le proteine oscillanti (es. PER1), per analogia non risulta difficile pensare che tale meccanismo di regolazione post-traduzionale intervenga anche nella generazione dell'orologio biologico circadiano dei mammiferi.

Possibile coinvolgimento dell'orologio biologico circadiano nello sviluppo

Durante l'embriogenesi, gli eventi che portano alla determinazione dei differenti tipi cellulari sono verosimilmente controllati attraverso *timers* dello sviluppo, che funzionano all'interno delle singole cellule [4].

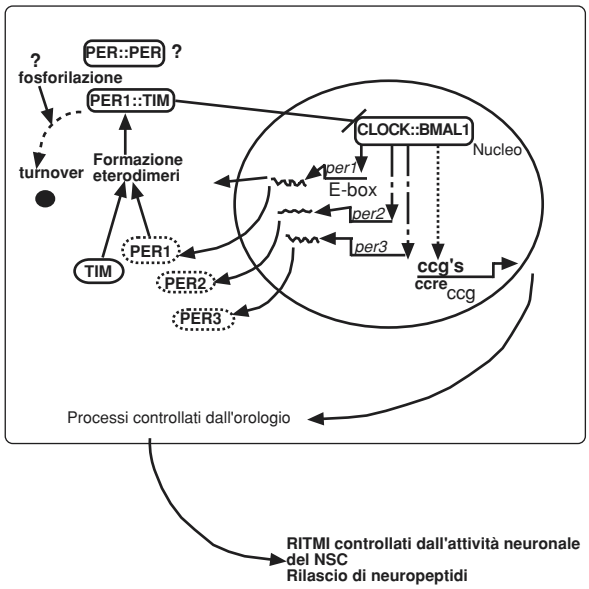


Fig. 3. - Elementi principali e ciclo di regolazione nei mammiferi. Le linee con le frecce indicano una regolazione positiva, le linee a freccia discontinue mostrano un possibile meccanismo positivo di regolazione e quelle che terminano con una barra indicano una regolazione negativa. ccg: *clock controlled gene*, geni controllati dall'orologio; ccre: c*ircadian clock regulatory elements*, elementi regolatori dell'orologio circadiano.

Un esempio alquanto significativo di come le cellule siano in grado di controllare la loro divisione secondo un ritmo ben prestabilito è dato dalla transizione da una divisione cellulare rapida e simmetrica ad una divisione lenta e asimmetrica dell'embrione di *Xenopus laevis*. Questa transizione avviene sempre alla dodicesima divisione dopo la fecondazione, quando l'embrione è ormai costituito da circa 2000 cellule, cioè allo stadio di blastomero. La durata della transizione è controllata da un orologio biologico che è intrinseco di ogni blastomero e non dipende dalle interazioni cellula-cellula [71].

Un altro esempio, ci viene dato dal differenziamento degli oligodendrociti. Sperimentalmente è stato osservato che due cellule figlie provenienti dallo stesso precursore, messe in coltura separatamente sono sottoposte ad un numero sincronizzato di divisioni cellulari e differenziano allo stesso tempo [72].

Orologi biologici che regolano lo sviluppo, come quelli sopraindicati, sono probabilmente ben distinti da quelli che governano i ritmi circadiani, anche se i meccanismi molecolari che controllano la proliferazione ed il differenziamento possono essere interconnessi con le funzioni cellulari oscillatorie.

Ad esempio, l'espressione dell'ortologo gene *hairy* di *Drosophila* nell'embrione di pollo, è controllato da un orologio molecolare che è legato alla formazione dei somiti. Il gene *hairy* è espresso ad impulsi ciclici con

una periodicità di 90 minuti, esattamente il tempo che occorre per formare un somita. Il movimento ad impulsi non dipende dal dislocamento della cellula o dalla propagazione di un segnale di attivazione, ed ogni cellula sembra possedere il suo proprio orologio funzionale [73].

Anche il ciclo di divisione cellulare può essere considerato un orologio biologico circadiano. La maggior parte delle cellule eucariotiche in coltura entrano in mitosi (divisione nucleare) con una periodicità di circa 24 ore. Questa è solo una coincidenza o le cellule milioni di anni fa, sono state sensibili ai cicli luce/buio? Se lo sono state, quello che noi oggi studiamo come ciclo cellulare potrebbe essere il risultato di un ciclo circadiano ancestrale [4].

Esistono numerosi studi diretti ad evidenziare le possibili correlazioni funzionali tra ciclo cellulare e ciclo circadiano [74].

Ipotesi sulle correlazioni fra desincronizzazione degli orologi biologici circadiani e malattie umane

Il grande interesse rivolto verso lo studio degli orologi biologici circadiani è dovuto al fatto che tali meccanismi interni regolano la nostra vita e dal loro corretto funzionamento dipende il nostro benessere.

Diversi eventi patologici, quali ad esempio la aumentata frequenza di disturbi cardiaci durante la mattina, la presenza di disturbi dell'umore legati alla stagione invernale, i disturbi del ciclo sonno/veglia, sono verosimilmente da mettere in relazione ai ritmi circadiani [75-78].

In particolare, molti autori hanno fornito evidenze sulla ricorrenza periodica circadiana di patologie quali ischemia ed infarto miocardico, morte cardiaca improvvisa ed ictus ischemico (cronocardiologia) [28].

Moltissime pubblicazioni hanno documentato il coinvolgimento del sistema circadiano nell'organizzazione temporale del rilascio degli ormoni corticosteroidei [79, 27], in alcuni disordini psichiatrici quali la schizofrenia e la depressione [80-84] e nei processi d'invecchiamento [85, 86].

Anomalie legate al funzionamento non sincrono dei ritmi circadiani sembrano essere la causa di disturbi associati al sonno quali: la sindrome di avanzamento della fase di sonno (ASPS), la sindrome di ritardo della fase di sonno (DSPS), l'alternanza irregolare del sonno/veglia [87].

Gli orologi biologici circadiani sono coinvolti nella regolazione di molte funzioni nell'uomo, per le quali al momento non esistono modelli sperimentali adeguati.

Per lo studio di condizioni così complesse come i disturbi del sonno, dell'umore e dell'invecchiamento, anomalie verosimilmente associate ad una mancata sincronizzazione del sistema circadiano, uno dei metodi più informativi è rappresentato dall'analisi genetica diretta di tutti i geni circadiani umani, identificati e sequenziati finora.

Inoltre, l'analisi di *linkage* può dare informazioni importanti riguardo ai determinanti genetici di tratti complessi.

Il gene *clock*, che riveste un ruolo centrale nel funzionamento dell'orologio circadiano, rappresenta uno dei geni principali per l'analisi genetica dei disordini associati al sistema circadiano.

L'identificazione di un *single nucleotide polimorphism* (SNP) può essere utilizzata per associare ad un dato polimorfismo un fenotipo ben determinato all'interno di una popolazione selezionata. Ad esempio, in una popolazione d'origine europea, a livello del nucleotide 3111 della sequenza del gene *clock*, nella regione 3' non tradotta, è stato identificato uno SNP, una variazione di sequenza C/T, in cui la frequenza dei differenti alleli è rispettivamente 0,27 (3111C) e 0,73 (3111T) [87].

Studi di *linkage disequilibrium* hanno evidenziato che l'allele 3111C è strettamente associato (P = 0,02) al fenotipo *evening type*, che si riferisce alla tendenza, di alcuni individui, a svolgere preferenzialmente le attività fisiche e mentali in una precisa fase della giornata, ovvero più tardi rispetto al fenotipo normale.

La distinzione tra *morning type* ed *evening type* è un fenomeno circadiano ben documentato [88-90] e l'associazione dell'allele 3111C con il tipo serale potrebbe rappresentare l'effetto diretto del polimorfismo sull'espressione del gene *clock* [87]. La presenza di SNP nella regione 3' non codificante del gene può influire sulla stabilità del messaggero e sulla lunghezza della sua vita media; pertanto, questo polimorfismo potrebbe avere effetti rilevanti sul livello finale di proteina CLOCK tradotta.

Nel topo, la regione al 3' non tradotta dell'RNA messaggero di *clock* è insolitamente lunga (6 Kb) e contiene numerosi segnali funzionali di poliadenilazione, che potrebbero avere un'importante funzione regolatrice; inoltre, tale polimorfismo si trova in una zona altamente conservata tra uomo e topo, e questo potrebbe indicare il suo valore funzionale [87].

L'ipotesi più accreditata rimane comunque quella in cui il polimorfismo sia un marcatore di uno o più cambiamenti polimorfici all'interno del gene *clock* o dei suoi elementi di regolazione, che solo l'analisi della sequenza potrà mettere in luce.

Nel nostro laboratorio abbiamo isolato il gene *Per1* di uomo (*hPer1*), sequenziato e caratterizzato la sua struttura genomica completa, ed analizzato la regione regolativa [91]. Anche nel caso del gene *hPer1* è stato identificato uno SNP, in posizione 2548 del cDNA, una sostituzione sinonima A/G al 3' della regione non codificante, che dopo studi di analisi di *linkage* non ha dimostrato alcuna associazione con il fenotipo *morning type* o *evening type* nella popolazione [92]. La sequenza completa del gene *hPer1* (introni/esoni) e delle sue regioni regolative potrà essere utilizzata per l'identificazione di nuovi polimorfismi presenti nella popolazione umana.

Conclusioni

Le recenti acquisizioni scientifiche hanno permesso l'identificazione e la comprensione dei principali meccanismi molecolari alla base dell'orologio biologico circadiano. Questo approccio, non solo ci permette di interpretare le diverse relazioni esistenti all'interno dell'orologio, ma anche di identificare quei determinanti genetici responsabili delle disfunzioni a carico dei sistemi circadiani.

Dall'analisi dei diversi meccanismi presenti negli organismi viventi è emerso che tutti gli orologi biologici circadiani conosciuti utilizzano dei circuiti comuni di regolazione; come riassunto in Fig. 4 all'interno di una singola cellula coesistono geni, e rispettivamente proteine, per la regolazione positiva (WC1, WC2, CLK, CYC, BMAL1) e negativa (FRQ, PER, TIM) dell'orologio, che interagendo tra loro, secondo rapporti ben determinati, garantiscono il mantenimento del ritmo circadiano [3, 93, 94].

Non è difficile prevedere che l'insorgenza di mutazioni a carico di questi geni possa alterare il complesso meccanismo di reciproco controllo tra i sistemi di regolazione positiva e negativa, e quindi essere la causa dell'insorgenza di patologie.

L'identificazione di sindromi legate ad un ritmo veglia/sonno anomalo, quali appunto l'avanzamento della fase di sonno (ASPS: *advanced sleep-phase syndrome*), rappresenta un modello altamente informativo per l'analisi genetica dei ritmi circadiani umani [95].

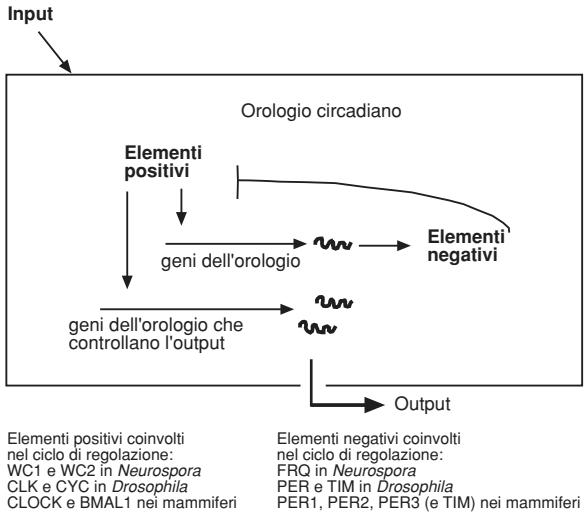


Fig. 4. - Elementi comuni che costituiscono il sistema circadiano. La natura oscillatoria del sistema circadiano è dovuta alla presenza di elementi negativi che sono in grado di rallentare l'espressione di se stessi e di elementi positivi che contrastano questa azione attivandone invece l'espressione.

Inoltre, l'allestimento di modelli animali che coinvolgono nuove mutazioni nei geni circadiani, potrebbe portare alla comprensione dell'etiopatogenesi e quindi allo sviluppo di terapie adeguate per la cura dei molteplici disturbi correlati all'esistenza di un ciclo circadiano desincronizzato.

Infine, viene ipotizzato che i ritmi circadiani asincroni possono anche essere responsabili dell'accentuarsi dei sintomi in patologie croniche quali la rinite allergica, l'asma, l'angina stabile, l'angina instabile, l'ipertensione, l'artrite reumatoide, l'osteoartrite, l'ulcera e l'epilessia [96].

Questa organizzazione temporale circadiana a livello di cellule, organi e organismi, potrebbe influenzare anche la natura e la qualità delle risposte agli interventi terapeutici.

Poiché il sistema metabolico cambia ritmicamente nel tempo ne consegue che un organismo quale l'uomo, è biochimicamente e fisiologicamente una entità differente a differenti stadi circadiani, pertanto egli reagisce differentemente ad un identico stimolo apportato a tempi differenti. La scelta di un tempo circadiano in cui somministrare i farmaci potrebbe migliorare l'efficacia del farmaco stesso e/o diminuire gli effetti collaterali indesiderati [30, 80].

Gli orologi biologici circadiani rappresentano quindi un sistema di regolazione cellulare, sostenuto da un fine processo di regolazione molecolare, i cui effetti influenzano il comportamento dell'intero organismo.

Una maggiore conoscenza dei loro meccanismi e dei loro fattori, endogeni ed esogeni, che possono alterarli potrebbe avere quindi ricadute di estrema importanza per la ricerca biomedica.

Ringraziamenti

Si ringrazia Natalia Mancino per la preziosa collaborazione nel reperimento del materiale bibliografico.

Ricevuto il 13 dicembre 1999.
Accettato il 14 febbraio 2000.

BIBLIOGRAFIA

1. CUGINI, P. 1993. Chronobiology: principles and methods. *Ann. Ist. Super. Sanità* **29**: 483-500.

2. PITTENDRIGH, C.S. 1993. Temporal organization: reflections of a Darwinian Clock-Watcher. *Annu. Rev. Physiol.* **55**: 17-54.

3. DUNLAP, J.C. 1999. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* **96**: 271-290.

4. SASSONE-CORSI, P. 1998. Molecular clocks: mastering time by gene regulation. *Nature* **392**: 871-874.

5. PITTENDRIGH, C.S. 1960. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *CSH Sym. Quant. Biol.* **25**: 159-184.

6. DE MARAIN. 1729. *Observation botanique*. Histoire de l'Académie Royale des Sciences, Paris. p. 352.

7. EDMUNDS, L.N Jr. 1983. Chronobiology at the cellular and molecular levels: models and mechanisms for circadian time keying. *Am. J. Anat.* **168**: 389-431.

8. GREEN, C.B. 1998. How cells tell time. *Trends Cell. Biol.* **8**: 224-230.

9. ASCHOFF, J. 1960. Exogenous and endougenous components in cyrcadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **25**: 11-28.

10. GOLDEN, S., ISHIURA, M., JOHNSON, C.H., & KONDO, T. 1997. Cyanobacterial circadian rhythms. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 327-354.

11. PITTENDRIGH, C.S., BRUCE, V.G., ROSENZWEIG, N.S. & RUBIN, M.L. 1959. A biological clock in *Neurospora*. *Nature* **184**: 169-170.

12. DEGUCHI, T. 1979. A circadian oscillator in cultured cells of chicken pineal gland. *Nature* **282**: 94-96.

13. HALL, J. C. 1995. Tripping along the trail to the molecular mechanisms of biological clocks. *Trends Neurosci.* **18**: 230-240.

14. SOGIN, M.L. 1994. The origin of eukaryotes and evolution into major kingdoms. In: *Early life on earth.* S. Bengston (Ed.). Nobel Symposium no 84. Columbia University Press, New York. p. 181-192.

15. *Suprachiasmatic nucleus: the minds clock.* 1991. D.C. Klein, R.Y. Moore & S.M. Reppert (Eds). Oxford University Press, New York.

16. FOULKES, N.S., BORJIGIN, J., SNYDER, S.H. & SASSONE-CORSI, P. 1997. Rhythmic transcription: the molecular basis of circadian melatonin synthesis. *Trends Neurosci.* **20**(10): 487- 492.

17. RALPH, M.R., FOSTER, R.G;, DAVIS, F.C. & MENAKER, M. 1990. Transplanted suprachiasmatic nucleous determines circadian period. *Science* **247**(4945): 975-978.

18. BINA, K.G. & RUSAK, B. 1996. Nerve growth factor phase shifts circadian activity rhythms in Syrian hamsters. *Neurosci. Lett.* **206**: 97-100.

19. MOURET, J., COINDET, J., DEBILLY, G. & CHOUVET, G. 1978. Suprachiasmatic nuclei lesions in the rat: alterations in sleep circadian rhythms. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **45** (3): 402-408.

20. SCHLINGENSIEPEN, K.H., WOLLINIK, F., KUNST, M., SCHLINGENSIEPEN, R., HERDEGEN, T. & BRYSCH, W. 1994. The role of Jun transcription factor expression and phosphorylation in neuronal differentiation, neuronal cell death, and plastic adaption *in vivo*. *Cell. Mol. Neurobiol.* **14**(5): 487-505.

21. TOSINI, G. & MENAKER, M. 1996. Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* **272**: 419-421.

22. PLAUTZ, J.D., KANEKO, M., HALL, J.C. & KAY, S.A. 1997. Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science* **278**: 1632-1635.

23. ASCHOFF, J. 1978. Circadian rhythms in man. *Arzneimittelforschung* **28**(10a): 1820-1827.

24. SATINOFF, E., LIRAN, J. & CLAPMAN, R. 1982. Aberrations of circadian body temperature rhythms in rats with medial preoptic lesions. *Am. J. Physiol.* **242**(3): 352-357.

25. COPINSCHI, G., VAV REETH, O. & VAN CAUTER, E. 1999. Biologic rhythms. Nyctemeral variation in man. *Presse Med.* **28**(17): 936-941.

26. CONROY, R.T., ELLIOTT, A.L. & MILLS, J.N. 1970. Circadian excretory rhythms in night workers. *Br. J. Ind. Med.* **27**(4): 356-363.

27. JENNINGS, B.H., ANDERSSON, K.E. & JOHANSSON, S.A. 1990. Assessment of the systemic effects of inhaled glucocorticosteroids: the influence of blood sampling technique and frequency on plasma cortisol and leucocytes. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **39**(2): 127-131.

28. OTSUKA, K., YAMANAKA, T., KUBO, Y., NAKAJIMA, S., CUGINI, P. & WATANABE, H. 1993. Chronobiology in cardiology. *Ann. Ist. Super. Sanità* **29**(4): 633-646.

29. KAWASAKI, T., CUGINI, P. & DI PALMA, L. 1993. Chronobiology approach to human hypertention. *Ann. Ist. Super. Sanità* **29**(4): 679-692.

30. WOOD, P.A. & HRUSHESKY, W.J. 1996. Circadian rhythms and cancer chemotherapy. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **6**: 299-343.

31. KONDO, T., TSINOREMAS, N., GOLDEN, S., JOHNSON, C.H., KUTSUNA, S. & ISHIURA, M. 1994. Circadian clock mutants of *cyanobacteria*. *Science* **266**: 1233-1236.

32. FELDMAN, J.F. & HOYLE, M. 1973. Isolation of circadian clock mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics* **75**: 605-613.

33. NAKASHIMA H, & ONAI, K. 1996. The circadian conidiation rhythm in *Neurospora crassa*. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **7**: 765-774.

34. GARCEAU, N., LIU, Y., LOROS, J.J. & DUNLAP, J.C. 1997. Alternative initiation of translation and time-specific phosphorylation yield multiple forms of the essential clock protein FREQUENCY. *Cell* **89**: 469-476.

35. MYERS, M.P., WAGER-SMITH, K., WESLEY, C..S, YOUNG, M.W. & SEHGAL, A. 1995. Positional cloning and sequence analysis of the *Drosophila* clock gene, timeless. *Science* **270**: 805-808.

36. RALPH, M.R. & MENAKER, M. 1988. A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* **241**: 1225-1227.

37. GEKAKIS, N., STAKNIS, D., NGUYEN, H., DAVIS, F., WILSBACHER, D.L., KING, D., TAKAHASHI J. & WEITZ, C. 1998. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* **280**: 1564-1569.

38. CROSTHWAITE, S.K., DUNLAP, J.C. & LOROS, J.J. 1997. *Neurospora* wc-1 and wc-2: transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity. *Science* **276**: 763-769.

39. BALLARIO, P. & MACINO, G. 1997. White collar proteins: PASsing the light signal in *Neurospora crassa*. *Trends Microbiol.* **5**: 458-462.

40. BALLARIO, P., TALORA, C., GALLI, D., LINDEN, H. & MACINO, G. 1998. Roles in dimerization and blue light photoreponse of the PAS and LOV domains of *Neurospora crassa* WHITE COLLAR proteins. *Mol. Biol.* **29**: 719-729.

41. LUO, C., LOROS, J.J. & DUNLAP, J.C. 1998. Nuclear localization is required for fonction of the essential clock protein FREQUENCY. *EMBO J.* **17**: 1228-1235.

42. KONOPKA, R.J. & BENZER, S. 1971. Clock mutants of Drosophila melanogaster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**: 2112-2116.

43. GEKAKIS, N., SAEZ, L., DELAHAYE-BROWN, A.M., MYERS, M.P., SEHGAL, A. & WEITZ, C.J. 1995. Isolation of timeless by PER protein interaction: defective interaction between timeless protein and long-period mutant PERL. *Science* **3**(270): 811-815.

44. MYERS, M., WAGER-SMITH, K., ROTHENFLUH-HILFIKER, A. & YOUNG, M. 1996. Light-induced degradation of TIMELESS and entrainement of the *Drosophila* circadian clock. *Science* **271**: 1736-1740.

45. ALLADA, R., WHITE, N.E., SO, W.V., HALL, J.C. & ROSBASH, M. 1998. A mutant *Drosophila* homolog of mammalian *Clock* disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell* **93**: 791-804.

46. DARLINGTON, T.K., WAGER-SMITH, K., CERIANI, M.F., STAKNIS, D., GEKAKIS, N., STEEVES, T.D.L., WEITZ C.J., TAKAHASHI, J.S. & KAY, S.A. 1998. Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science* **280**: 1599-1603.

47. KLOSS, B., PRINCE, J.L., SAEZ, L., BLAU, J., ROTHENFLUH, A., WESLEY, C.S. & YOUNG, M.W. 1998. The *Drosophila* clock gene *double-time* encodes a proteins closely related to human casein kinase I © *Cell* **94**: 97-107.

48. PRICE, J.L., BLAU, J., ROTHENFLUH, A., ADODEELY, M., KLOSS, B., & YOUNG, M.W. 1998. *Double-time* is a new *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* **94**: 83-95.

49. HARDIN, P.E., HALL, J.C. & ROSBASH, M. 1990. Feedback of the *Drosophila period* gene product on circadian cycling of its messanger RNA levels. *Nature* **342**: 536-540.

50. SEHGAL, A., ROTHENFLUH, A., HUNTER-ENSOR, M., CHEN, Y., MYER, M.P. & YOUNG, M.W. 1995. Rhytmic expression of *timeless*: a basis for promoting circadian cycles in period gene autoregulation. *Science* **270**: 808-810.

51. RUTILA, J.E., SURI, V., LE, M., SO, W.V., ROSBASH, M., & HALL, J.C. 1998. CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell* **93**: 805-813.

52. CREWS, S. 1998. Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev.* **12**: 607-620.

53. HAO, H., ALLEN, D.L. & HARDIN, P.E. 1997. A cycling element in the per promoter. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 3687-3693.

54. SAEZ, L. & YOUNG, M.W. 1996. Regulation of nuclear entry of the *Drosophila* clock proteins period and timeless. *Neuron* **17**: 911-920.

55. LEE, C., BAE, K. & EDERY, I. 1998. The *Drosophila* CLOCK proteins undergoes daily rhythms in abundance, phosphorylation, and interaction with PER-TIM complex. *Neuron* **21**: 857-867.

56. VITATERNA, M., KING, D. P., CHANG, A. M., KORNHAUSER, J.M., LOWEREY, P.L., MC DONALD, D., DOVE, W.F., PINTO, W.L., TUREK, F.W. & TAKAHASHI, J.S. 1994. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science* **264**: 719-725.

57. KING, D.P., ZHAO, Y.Z., SANGORAM, A.M., WILSBACHER, L.W., TANAKA, M., ANTOCH, M.P., STEEVES, T.D., VITATERNA, M.H., KORNHAUSER, J.M., LOWEREY, P.L., TUREK, F.W. & TAKAHASHI, J.S. 1997. Positional cloning of the mouse circadian *Clock gene*. *Cell* **89**: 641-653.

58. KING, D.P., VITATERNA, M.H., CHANG, A.M., DOVE, W.F., PINTO, L.H., TUREK, F.W. & TAKAHASHI, J.S. 1997. The mouse Clock mutation behaves as an antimorph and maps within the W^{19H} deletion, distal of Kit. *Genetics* **146**: 1049-1060.

59. SUN, Z.S., ALBRECHT, U., ZHUCHENKO, O., BAILEY, J., EICHELE, G. & LEE, C.C. 1997. *RIGUI*, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila period* gene. *Cell* **90**: 1003-1011.

60. TEI, H., OKAMURA, H., SHIGEYOSHI, Y., FUKUHARA, C., OZAWA, R., HIROSE, M. & SAKAKI, Y. 1997. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila period* gene. *Nature* **389**: 512-516.

61. ALBRECHT, U., SUN, Z.S.O., EICHELE, G. & LEE, C.C. 1997. A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mPer1* and *mPer2*, to light. *Cell* **91**: 1055-1064.

62. SHERMAN, L., ZYLKA, M., WEAVER, D., KOLAKOWSKI, JR.L.F. & REPPERT, S. 1998. Two *period* homologs: Circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* **19**: 1261-1269.

63. TAKUMI, T., MATSUBARA, C., SHIGEYOSHI, Y., TAGUCHI K., YAGITA, K., MAEBAYASHI, Y., SAKAKIDA, Y, OKUMURA, K, TAKASHIMA, N. & OKAMURA, H. 1998. A new mammalian period gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* **3**: 167-176.

64. ZYLKA, M., SHERMAN, L., WEAVER, D. & REPPERT, S. 1998. Three *period* homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* **20**: 1103-1110.

65. TAKUMI, T., TAGUCHI, K., MIYAKE, S., SAKAKIDA, Y., TAKASHIMA, N., MATSUBARA, C., MAEBAYASHI, Y., OKUMURA, K., TAKEKIDA, S., YAMAMOTO, S., YAGITA, K., YAN, L., YOUNG, M.W. & OKAMURA, H. 1998. A light-independent oscillatory gene mPer3 in mouse SCN and OVLT. *EMBO J.* **17**: 4753-4759.

66. SHIGEYOSHI, Y., TAGUCHI, K., YAMAMOTO, S., TAKEIDA, S., YAN, L., TEI, H., MORIYA, S., SHIBATA, S., LOROS, J.J., DUNLAP, J.C. & OKAMURA, H. 1997. Light-induced resetting of mammalian circadian clock is associated with rapid induction of mPer1 transcript. *Cell* **91**: 1043-1053.

67. TAKUMI, T., NAGAMINE, Y., MIYAKE, S., MATSUBARA, C., TAGUCHI, K., TAKEKIDA, S., SAKAKIDA, Y., YAMAGUCHI, S., NISHIKAWA, K. *et al*. 1999. A mammalian homolog of *Drosophila* timeless, highly expressed in the SCN, and retina, forms a complex whith mPER1. *Genes Cells* **4**: 67-75.

68. SILVER, R., SOOKHOO, A.I., LE SAUTER, J., STEVENS, P., JANSEN, H.T. & LEHMAN, M.N. 1999. Multiple regulatory elements result in regional specificity in circadian rhythms of neuropeptide expression in mouse SCN. *NeuroReport*. **10**(15): 3165-3174.

69. JIN, X., SHEARMAN, L., WEAVER, D., ZYLKA, M., DE VRIES, G. & REPPERT, S. 1999. A molecular mechanism regulating *output* from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* **96**: 57-68.

70. EDERY, I., ZWIEBEL, L.J., DEMBINSKA, M.E. & ROSHBASH, M. 1994. Temporal phosphorylation of the *Drosophila* period protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2260-2264.

71. GRAINGER, R.M. & GURDON, J.B. 1989. Loss of competence in amphibian induction can take place in single nondividing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 1900-1904.

72. TEMPLE, S. & RAFF, M.C. 1986. Clonal analysis of oligodendrocyte development in culture: evidence for a developmental clock that counts cell divisions. *Cell* **14**: 773-779

73. PALMEIRIM, I., HENRIQUE, D., ISH-HOROWICZ, D. & POURQUIE, O. 1997. Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell* **28**: 639-648.

74. EDMUNDS, L.N. Jr. 1997. Regulation in cell division cycles by circadian oscillators: signal trasduction between clocks. In: *Physiology and pharmacology of biological rhythms*. P.H. Redfern & B. Lemmer (Eds). Springer-Verlag, New York. p. 29-53.

75. KRAFT, M. & MARTIN, R.J. 1995. Chronobiology and chronotherapy in medicine. *Dis. Mon.* **41**: 501-75.

76. TEICHER, B.A., ARA, G., BUXTON, D., LEONARD, J. & SCHAUB, R.G. 1997. Optimal scheduling of interleukin 12 and chemotherapy in the murine MB-49 bladder carcinoma and B16 melanoma. *Clin. Cancer Res.* **3**: 1661-1667.

77. RODENBECK, A., HUETHER, G., RUTHER, E. & HAJAK, G. 1998. Altered circadian melatonin secretion patterns in relation to sleep in patients with chronic sleep-wake rhythm disorders. *J. Pineal. Res.* **25**: 201-210.

78. REILLY, T., WATERHOUSE, J. & ATKINSON, G. 1997. Aging, rhythms of physical performance, and adjustment to changes in the sleep-activity cycle. *Occup. Environ. Med.* **54**: 812-816.

79. VAN CAUTER, E.V., POLONSKY, K.S., BLACKMAN, J.D., ROLAND, D., STURIS, J., BYRNE, M.M. & SCHEEN, A.J. 1994. Abnormal temporal patterns of glucose tolerance in obesity: relationship to sleep-related growth hormone secretion and circadian cortisol rhythmicity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **79**: 1797-805.

80. MORGAN, R. & CHEADLE, A.J. 1976. Circadian body temperature in chronic schizophrenia. *Br. J. Psychiatry* **129**: 350-354.

81. KUPFER, D.J., FOSTER, F.G., COBLE, P., MCPARTLAND, R.J. & ULRICH, R.F. 1978. The application of EEG sleep for the differential diagnosis of affective disorders. *Am. J. Psychiatry* **135**: 69-74.

82. WEHR, T.A., GOODWIN, F.K., WIRZ-JUSTICE, A., BREITMAIER, J. & CRAIG, C. 1982. 48-hour sleep-wake cycles in manic-depressive illness: naturalistic observations and sleep deprivation experiments. *Arch. Gen. Psychiatry* **39**: 559-565.

83. CZEISLER, C.A., KRONAUER, R.E., MOONEY, J.J., ANDERSON, J.L. & ALLAN, J.S. 1987. Biologic rhythm disorders, depression, and phototherapy. A new hypothesis. *Psychiatr. Clin. North. Am.* **10**: 687-709.

84. WEHR, T.A. 1996. A "clock for all seasons" in the human brain. In: *Hypothalamic integration of circadian rhythms*. R.M. Buijs, A. Kalsbeek, H.G. Romijn, C.M.A. Pennartz. & M. Mirmiran, (Eds). Elsevier Press, Amsterdam. p. 321-342.

85. VAN COEVORDEN, A., MOCKEL, J., LAURENT, E., KERKHOFS, M., L'HERMITE-BALERIAUX, M., DECOSTER, C., NEVE, P. & VAN CAUTER, E. 1991. Neuroendocrine rhythms and sleep in aging men. *Am. J. Physiol.* **260**: 651-661.

86. OLIVERIO, A., ALLEVA, E. & CASTELLANO, C. 1980. A genetic approach to behavioral ontogeny and aging in the mouse. In: *The psychobiology of aging: problems and perspectives*. Stein (Ed.). Elsevier, North Holland. p. 35-46.

87. RICHARDSON, G.S. & MALIN, H.V., 1996. Circadiam rhythm sleep disorders: pathophysiology and treatment *J. Clin. Neurophysiol.* **13**: 117-131.

88. KATZENBERG, D., YOUNG, T., FINN L., LIN L., KING D.P., TAKAHASHI, J. & MIGNOT, E. 1998. A CLOCK polymorphism associated with human diurnal preference. *Sleep* **21**: 569-576.

89. HORNE, J.A. & OSTBERG, O. 1976. A self assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *Int. J. Chronobiol.* **4**: 97-110.

90. POSEY, T.B. & FORD, J.A. 1981. The morningness-eveningness preference of college students as mesured by the Horne and Ostberg questionnaire. *Int. J. Chronobiol.* **7:** 141-144.

91. FALBO, V., ZORAQI, G.K., FALCHI, M., IOSI, F., PARADISI, S. & TARUSCIO, D. 1999. Struttura genomica del gene umano *PER1 (hPer1)*-ortologo umano del gene *period (PER)* di *Drosophila*. In: *Riassunti di comunicazioni e poster.* Atti del 2. Congresso Nazionale della Società Italiana di Genetica Umana. Orvieto, 29 settembre - 1 ottobre 1999. Università degli Studi, Perugia. p. 15.

92. KATZENBERG, D., YOUNG, T., LIN L., FINN L. & MIGNOT, E. 1999. A human period gene *(hPER1)* polymorphism is not associated with diurnal preference in normal adults. *Psychiatr. Genet.* **9**: 107-109.

93. DUNLAP, J.C. 1998. An end in the beginning. *Science* **280**: 1548-1549.

94. GREEN, B.C. 1998. Time marches on. *Trends Cell. Biol.* **8**: 342-343.

95. JONES, C.R., CAMPBELL, S.S., ZONE, S.E., COOPER, F., DE SANO, A., MURPHY, P.J., JONES, B., CZAJKOWSKI, L. & PTCEK, L.J. 1999. Familial advanced sleep-phase syndrome: A short-period circadian rhythm variant in humans. *Nat. Med.* **5**: 1062-1065.

Ann. Ist. Super. Sanità, vol. 36, n. 1 (2000), pp. 111-115

Analisi molecolare del gene della proteina di regolazione acuta della steroidogenesi *(StAR)* negli incidentalomi surrenalici

Stefania CAIOLA *(a)*, Antonio STIGLIANO *(a),* Ettore MAROCCIA *(a)*
e Vincenzo TOSCANO *(b)*

(a) Laboratorio di Biochimica Clinica, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(b) II Endocrinologia, Dipartimento di Fisiopatologia Medica,
Università degli Studi "La Sapienza", Roma

Riassunto. - La proteina di regolazione acuta della steroidogenesi (StAR) è indispensabile nel meccanismo della steroidogenesi. Il suo ruolo è quello di permettere l'ingresso del colesterolo dal citoplasma all'interno dei mitocondri. Mutazioni del gene *StAR* sono implicate nell'iperplasia surrenalica lipoidea congenita. Gli incidentalomi surrenalici sono neoformazioni del surrene frequentemente scoperte durante l'esecuzione di esami radiologici, effettuati per problematiche diagnostiche diverse. Poiché sovente negli incidentalomi si osservano difetti della steroidogenesi, è possibile ipotizzare il coinvolgimento di alterazioni del gene *StAR* nella loro eziologia. In questo lavoro è stata studiata la presenza di mutazioni del gene *StAR* in queste neoplasie. L'analisi mutazionale del gene *StAR,* condotta su 32 tumori surrenalici, ha evidenziato una mutazione *missense* nell'esone V del gene di uno dei tumori esaminati. Questa è la prima evidenza di una alterazione del gene *StAR* negli incidentalomi surrenalici.

Parole chiave: incidentalomi surrenalici, proteina di regolazione acuta della steroidogenesi (StAR).

Summary *(Molecular analysis of* StAR *gene in adrenal incidentalomas)*. - The steroidogenic acute regulatory protein (StAR) plays an essential role in steroidogenesis, facilitating cholesterol entry into the inner compartment of mitochondria. Mutations (either transitions or transversions) of *StAR* gene have been described as a cause of lethal forms of congenital lipoid adrenal hyperplasia. Adrenal incidentalomas are frequently discovered during radiologic examinations performed in patients with diagnosis for other diagnostic problems. Enzymatic defects along the steroidogenetic cascade are observed with high frequence in these patients. Aim of the present study was to asses the involvement of alteration of the *StAR* gene in incidentally discovered adrenal masses (incidentalomas). The mutational analysis of 32 incidentalomas demonstrated a "missense" mutation in exon five of the gene in one of the tumors analysed. This is the first evidence of an alteration of the *StAR* gene in adrenal incidentalomas.

Key words: adrenal incidentalomas, steroidogenic acute regulatory protein (StAR).

Introduzione

Per incidentaloma surrenalico si intende una massa, riscontrata casualmente durante un'esplorazione chirurgica o attraverso l'esecuzione di metodiche di diagnostica per immagini come la tomografia computerizzata (TC), la risonanza magnetica nucleare (RMN) e l'ultrasonografia, effettuate per motivi differenti da quelli di un sospetto di una patologia surrenalica. Dalle ultime due decadi, gli incidentalomi surrenalici rappresentano un problema clinico frequente. Poiché un numero sempre maggiore di persone viene sottoposto ad esami strumentali non invasivi, la diagnosi di queste forme è destinata ad aumentare [1]. Per questo motivo, Griffing ha denominato, in modo provocatorio, questa situazione A-I-D-S: *adrenal incidentaloma discovered serendipitously* paragonabile ad una nuova forma epidemica endocrina [2]. La prevalenza degli incidentalomi riscontrati con la TC dell'addome varia nelle differenti casistiche dall'1% al 5% dei soggetti esaminati, mentre è di circa il 10% nei reperti autoptici [3]. Nella maggior parte dei casi, gli incidentalomi surrenalici sono rappresentati da adenomi benigni clinicamente non ipersecernenti (70-90%) (Tab.1), sebbene una alterazione dell'attività steroidogenetica sia stata riscontrata in studi condotti sia *in vivo* che *in vitro* [4]. Statisticamente non è riportata differenza di sesso, anche se nella nostra casistica le donne sono in numero maggiore. La frequenza degli incidentalomi surrenalici aumenta con l'età, osservandosi infatti un picco di incidenza compreso tra la quinta e la sesta decade di vita. La lesione interessa quasi sempre una ghiandola surrenalica, mentre nell'11-16% dei casi è bilaterale.

Spesso questi "tumori clinicamente silenti", nascondono una forma frusta di iperfunzione surrenalica che impone il disegno di un corretto *iter* diagnostico ed

Tabella 1. - Incidentaloma surrenalico: prevalenza di diverse forme patologiche

Forme patologiche	%
Adenomi surrenalici non ipersecernenti	67,0
Tumori ipersecernenti	
Feocromocitomi	3,8
Aldosteronomi	1,4
Adenomi cortisolo-secernenti	8,4
Tumori maligni	4,0
Altre masse surrenaliche	
Cisti	1,5
Mielolipomi	2,7
Metastasi	
Pazienti non oncologici	1,6
Altro	9,6

un opportuno approccio terapeutico alla problematica [5]. Una massa surrenalica può essere di origine neoplastica maligna (adenoma, carcinoma, feocromocitoma, metastasi di un carcinoma primitivo) o benigna (lipoma, mielolipoma, emangioma, linfangioma, ganglioneuroma); iperplastica, legata ad un deficit enzimatico della steroidogenesi, determinando una iperplasia surrenalica bilaterale; cistica; calcifica, caratteristica di un tumore surrenalico maligno, di un feocromocitoma o anche di lesioni infettivo-infiltrative come la tubercolosi, l'istoplasmosi, l'emocromatosi, la sarcoidosi, ecc.; vasculopatica, sostenuta da una emorragia surrenale, conseguenza di una terapia anticoagulante, da una sepsi, da un trauma, da una ustione, da un intervento chirurgico o da una gravidanza complicata (Tab. 2). La diagnosi di queste formazioni oltre che della TC e della RMN, si avvale anche della scintigrafia con iodocolesterolo per la diagnosi differenziale tra adenoma e carcinoma e della scintigrafia con metaiodobenzilguanidina (MIBG) per la diagnosi di feocromocitoma. Le indagini di laboratorio sono basate sui dosaggi plasmatici ed urinari dei corticosteroidi e delle catecolamine, sulla determinazione degli elettroliti sierici e della attività reninica plasmatica, sui test di soppressione con basse dosi di desametazone e di stimolo con *corticotropin releasing hormone* (CRH). Una discreta percentuale di pazienti presenta vari gradi di anomalie dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, per esempio valori di cortisolo libero urinario (CLU) ai limiti alti del *range* di normalità o lievemente elevati, assenza del ritmo circadiano del cortisolo, ridotta soppressione alla somministrazione di desametazone a basse dosi, bassi valori di ACTH basali, mancata risposta allo stimolo con CRH [6]. Un'altra caratteristica peculiare nei pazienti con incidentaloma surrenalico è l'alta prevalenza (dal 17% al 71%) di una esagerata risposta del 17⁄ OH progesterone dopo stimolo con ACTH [3]. Spesso i pazienti affetti da deficit di 21 idrossilasi, sono portatori di una massa surrenalica documentabile con una TC dell'addome: masse di dimensioni superiori ai 5 mm di diametro sono state riscontrate in 18 su 22 soggetti omozigoti ed in 9 su 20 soggetti portatori del deficit in condizioni di eterozigosi. Da questa osservazione è stato proposto di effettuare un test all'ACTH in tutti i pazienti portatori di incidentaloma surrenalico, allo scopo di diagnosticare un deficit surrenalico congenito. Ma nella maggior parte dei casi, dopo l'intervento di surrenalectomia l'iperrisposta del 17⁄ OH progesterone dopo test all'ACTH, presente nei tumori non ipersecernenti e nelle sindromi pre-Cushing si normalizza. Per tale motivo, questo particolare *pattern* ormonale non rappresenta un *marker* di disordine enzimatico congenito che evolve con la formazione di noduli surrenalici (come si verifica nel deficit congenito della 21 idrossilasi), ma costituisce il segnale di una alterazione della steroidogenesi intratumorale.

Particolarmente significative, sulla scorta dell'esperienza accumulata su una casistica sempre più crescente dal 1980 ad oggi, sembrano essere le dimensioni dell'incidentaloma e l'aumento dei valori plasmatici di deidroepiandrosterone solfato (DHEAS). Il diametro della lesione è un importante parametro di malignità; il rischio aumenta con l'aumentare delle dimensioni, anche se meno frequentemente sono stati riscontrati carcinomi di 2,5 cm.

Le masse di grandi dimensioni sono più frequentemente maligne; infatti la prevalenza del carcinoma silente è inferiore ad 1/250 000, mentre quella degli adenomi con dimensioni superiori ai 6 cm è di circa 1/4000. Il volume dei tumori surrenalici, specialmente se inferiore ai 6 cm è frequentemente sottostimato dalla TC: 32% delle lesioni maggiori di 6 cm, 47% di quelle inferiori ai 6 cm. Le dimensioni "soglia" per porre sospetto di malignità variano nelle diverse casistiche, dai 3 ai 6 cm. Un limite ritenuto considerevolmente ragionevole da noi e da altri autori è quello di 4 cm [7].

Tabella 2. - Incidentaloma surrenalico: classificazione

Corteccia surrenalica
Adenoma, iperplasia nodulare, carcinoma

Midollare del surrene
Feocromocitoma, ganglioneuroma, neuroblastoma

Metastasi al surrene o linfoma primitivo

Altre masse
Lipoma, mielolipoma, neurofibroma, schwannoma maligno, emangioma, leiomioma, leiomiosarcoma, angiosarcoma, teratoma, cisti, echinococcosi, criptococcosi, amiloidosi, ematoma, granuloma

Masse pseudo-surrenaliche
Possono originare dal rene, pancreas, milza, stomaco, fegato, linfonodi, vasi sanguigni

Riconoscendo al diametro del tumore un valore altamente predittivo di malignità, è comunque importante analizzare le caratteristiche radiologiche delle lesioni, poiché infatti molte formazioni del surrene possono presentare dimensioni sovrapponibili, come ad esempio il mielolipoma, massa surrenalica costituita da tessuto adiposo, o le emorragie e le necrosi intratumorali [8]. Purtroppo le caratteristiche radiologiche della TC e della RMN non sono ancora capaci di discriminare una lesione benigna da una maligna [9].

Poiché negli incidentalomi è presente una alterazione della steroidogenesi, si è ipotizzato un coinvolgimento della proteina di regolazione acuta della steroidogenesi (StAR) in queste forme. La StAR è una fosfoproteina ACTH-indotta, identificata per la prima volta in cellule surrenaliche di ratto in sospensione. La sua presenza è stata dimostrata ormai in tutte le cellule dotate di attività steroidogenetica, fatta eccezione per quelle della placenta [10, 11]. Il gene di *StAR* è stato clonato da Sugawara e Strauss nel 1995. Esso è localizzato sul cromosoma 8, ed è costituito da sette esoni e da sei introni [12], che codificano per una proteina dotata di una breve emivita plasmatica (circa 5 m'), localizzata nei mitocondri nella sua forma matura di 30 kDa. Essa viene sottoposta ad una serie di modificazioni post-traduzionali a partire da precursori citosolici del peso molecolare di 37 e 32 kDa rispettivamente [10]. Il ruolo di StAR consiste nel permettere, attraverso meccanismi non ancora completamente chiariti, che coinvolgono altre proteine localizzate sulle membrane mitocondriali, quali la porina, l'adenilato, il recettore periferico delle benzodiazepine (PBr) e le GTP-*binding protein*, il passaggio del colesterolo dal compartimento citoplasmatico sulla membrana mitocondriale interna, dove sono posti gli enzimi deputati alla sintesi degli steroidi [13-15]. Appare chiaro, a questo punto, come la proteina StAR, rappresenti la tappa limitante per l'inizio del meccanismo steroidogenetico [16,17]. A conferma di ciò, è stato dimostrato che mutazioni del tipo delle transizioni o delle transversioni del gene di *StAR*, capaci di introdurre un codone di stop nel *frame* di lettura, producono una proteina tronca, quindi inattiva dal punto di vista funzionale [18,19] che, impedendo l'ingresso del colesterolo nel mitocondrio non permette una adeguata steroidogenesi. Tale condizione patologica, nota come "iperplasia surrenalica lipoidea congenita", è letale e si manifesta precocemente in epoca neonatale. Essa deve essere diagnosticata alla nascita e richiede la somministrazione di terapia ormonale steroidea sostitutiva [10, 15, 20].

Materiali e metodi

Lo studio è stato condotto su 32 incidentalomi surrenalici, comprendenti varianti istologiche e morfologiche diverse. In particolare sono stati studiati in cieco, 17 adenomi corticali, 14 carcinomi e 1 feocromocitoma, asportati da pazienti di età compresa tra 17 e 69 anni (età media 43 ± 2 anni). Sui pezzi anatomici a nostra disposizione, abbiamo effettuato l'estrazione del DNA in doppio, utilizzando la metodica che prevedeva l'utilizzazione del fenolo/cloroformio e il kit "QIAGEN DNA *Extraction tissue*". Il DNA estratto è stato quantizzato mediante lettura spettrofotometrica e successiva analisi qualitativa su gel di agarosio al 2%. L'analisi molecolare del gene *StAR* è stata eseguita con il metodo della *polimerase chain reaction* (PCR). A questo proposito abbiamo costruito sette coppie di primers intronici in corrispondenza della giunzione introne-esone, capaci di individuare ciascun esone del gene. In particolare:

- per l'esone I (oligonucleotide senso: 5' -AGG CTG CAG CTG CGG GAC TCA GAG G - 3'; oligonucleotide anti-senso: 5' -TCG CCT CCT TCC CGC AGC GCT CAC - 3');
- per l'esone II (oligonucleotide senso: 5' - AAC AAG GGT TAT TCC CTT CTG CAG - 3'; oligonucleotide anti-senso: 5' - GAG CCC AGA AGC CTC AGC ACT TAC - 3');
- per l'esone III (oligonucleotide senso: 5' - GTC TCT CCT CGG CTG TGT ATC CAG - 3'; oligonucleotide antisenso : 5' - CAC AGG CTT CTC CCC GAC ACT TAC - 3');
- per l'esone IV (oligonucleotide senso: 5' - TCT GGG GGC TCC TTT CTC TGA CAG - 3'; oligonucleotide anti-senso: 5' - CAC CCG CAC CTG GAC TTT GCT CAC - 3');
- per l'esone V (oligonucleotide senso: 5' - TTC TGG TTC CCC ATG GCC TGG TAG - 3'; oligonucleotide anti-senso : 5' - GTT TGG AGC CTG CTG CCC GTA TTA C - 3');
- per l'esone VI (oligonucleotide senso: 5' - GAC TTG ACT TGC TCC ATT TGC CAG - 3'; oligonucleotide anti-senso: 5' - AGG TCC CCC TCC CAT GCC CTT CAC - 3');
- per l'esone VII (oligonucleotide senso: 5' - AAA TTC TCC TAC CTC CTA CTG CAG - 3'; oligonucleotide anti-senso: 5' - CCA GTG CAG CTG GGC ACA GTT GG - 3').

La messa a punto e l'ottimizzazione della reazione di amplificazione è stata eseguita su DNA estratto dalle cellule del sangue periferico di soggetti donatori. Tutti gli esoni sono stati amplificati ad una temperatura di *annealing* di 60 °C, fatta eccezione per l'esone VI, per cui è stato individuato un appaiamento ottimale dei primers a 58 °C. Per tutti comunque la reazione è stata ripetuta per 35 cicli. La concentrazione del MgCl2 utilizzata è stata di 2,5 mM. Ogni coppia di *primers* è stata impiegata alla concentrazione di 5 pmol/μl.

Successivamente, abbiamo eseguito per ogni campione l'amplificazione di tutti e sette gli esoni del gene *StAR* mediante s*ingle stranded conformation polimorphism*-PCR (SSCP-PCR), utilizzando nella reazione di amplificazione la desossicitosina trifosfato

marcata con il 32P. I prodotti della reazione sono stati analizzati su gel di MDE alla temperatura di 4 °C per una durata di quattro ore. Ogni gel è stato sottoposto a disidratazione su opportuna piastra aspirante *(gel dry)*, alla temperatura di 80 °C per 45 minuti circa. Subito dopo questa procedura il gel veniva esposto in cassetta radiografica alla temperatura di - 80 °C per un tempo minimo di 48 ore. La radioattività dei campioni è stata rivelata tramite autoradiografia. Infine sono stati sottoposti a sequenziamento tutti i campioni che all'SSCP-PCR hanno mostrato la presenza di bande anomale.

Risultati

La Fig. 1 illustra l'amplificazione dei sette esoni del gene *StAR*. La mobilità elettroforetica dei prodotti di amplificazione degli esoni del gene, corrisponde al loro peso molecolare, in particolare: 203 bp per l'esone I, 114 bp per l'esone II, 126 bp per l'esone III, 159 bp per l'esone IV, 185 bp per l'esone V, 94 bp per l'esone VI e 113 bp per l'esone VII. L' elettroforesi mediante SSCP-PCR, ha rivelato delle bande anomale in 6 dei 32 campioni studiati. In particolare, presentavano bande anomale: un campione nell'esone V, tre campioni nell'esone VI e due nell'esone VII. E' necessario segnalare che l'alto contenuto in basi pirimidiniche guanina e citosina (il 60% circa) presenti nella sequenza del DNA amplificato, rende più difficile l'analisi del *pattern* di bande atteso in SSCP. Questo inconveniente potrebbe essere responsabile di una sottostima delle mutazioni presenti. L'analisi di sequenza a cui sono stati sottoposti i 6 campioni sospetti ha dimostrato la presenza di una mutazione *missense* in omozigosi (GAC in GCC) (Fig. 2), solo nel campione con banda anomala nell'esone V. Tale mutazione è responsabile della sostituzione dell'acido aspartico con l'aminoacido alanina in posizione 203 (Asp 203 Ala). Il campione "mutato" corrispondeva istologicamente ad un adenoma corticale del surrene del diametro di 4 cm, asportato chirurgicamente in una paziente di sesso femminile di 55 anni di età.

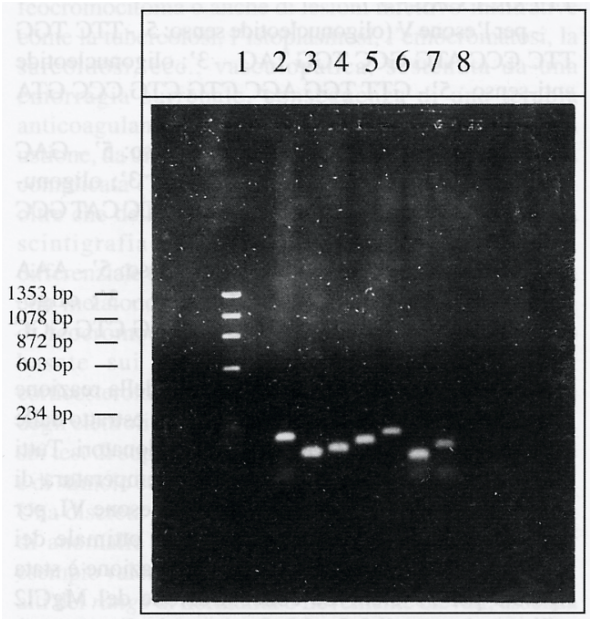


Fig. 1. - Gel di agarosio al 2% che visualizza i prodotti di polimerase chain reaction (PCR) corrispondenti alla amplificazione dei sette esoni del gene *StAR* dopo 3 ore di corsa elettroforetica al voltaggio di 70V. Nella corsia contrassegnata con il numero 1 è visualizzato il marker ♦X 174. Nelle corsie da 2 a 8 sono visibili rispettivamente gli esoni del gene di *StAR*.

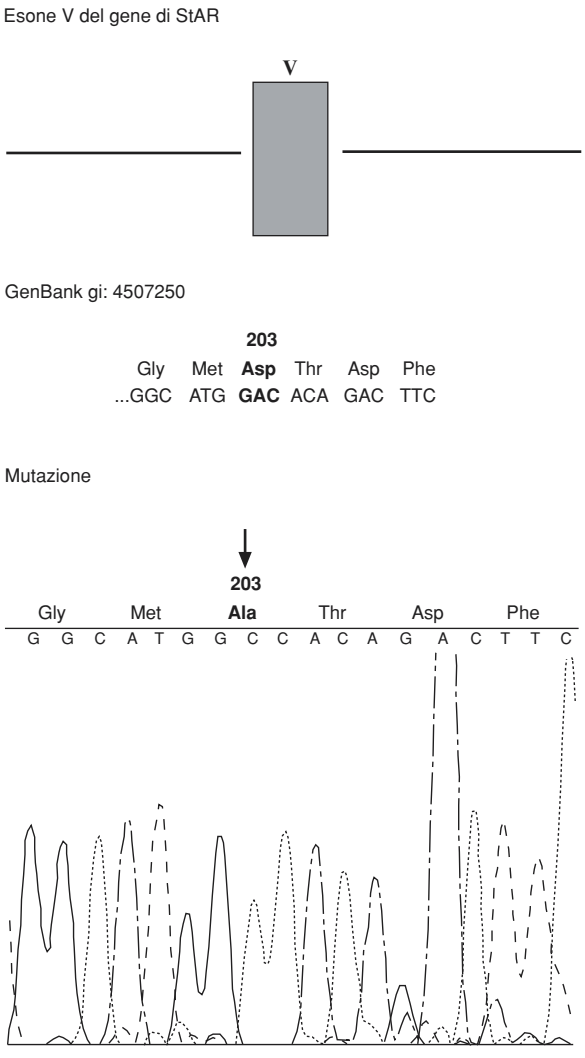


Fig. 2. - Rappresentazione schematica dell'esone 5 del gene di *StAR*. Paragone della sequenza depositata in Gen Bank (gi: 4507250) e di quella recante la mutazione. In particolare l'elettroferogramma mostra la transversione di A con C nell'esone V del campione n. 9. Questa mutazione comporta la sostituzione dell'acido aspartico con l'alanina nel codone 203 (Asp203Ala), come indicato dalla freccia.

Discussione

I meccanismi patogenetici che conducono alla formazione dell'incidentaloma sono tuttora molto poco conosciuti. Statisticamente, non tutti gli incidentalomi hanno una natura neoplastica, anzi considerando la genesi *ab origine*, questa è legata a fenomeni di tipo infiammatorio-iperplastico. Questo dato è suffragato dall'osservazione che numerose masse surrenaliche conservano le loro dimensioni e caratteristiche assolutamente non sospette nel corso del tempo. Solo alcune di esse, successivamente, assumono un atteggiamento morfologico-funzionale di tipo invasivo. Le ipotesi che si propongono di spiegare la trasformazione neoplastica sono numerose. Le più accreditate chiamano in causa oncogeni ed antioncogeni, la cui attivazione e/o disattivazione "patologica" sarebbe responsabile del fenomeno neoplastico. Finora l'attenzione dei ricercatori è stata incentrata principalmente sulla trasduzione del segnale ormonale e sul ruolo di alcuni fattori di crescita, per esempio l'*insulin growth factor* II (IGF-II) [21]. E' stato dimostato un loro coinvolgimento solo nelle fasi avanzate della neoplasia, mentre rimane da chiarire il meccanismo originario che porta alla formazione dell'incidentaloma surrenalico. Il nostro interesse è stato così rivolto ai meccanismi post-recettoriali, successivi alla trasduzione del segnale. Abbiamo identificato nella proteina di regolazione acuta della steroidogenesi un ottimo modello per lo studio dei meccanismi patogenetici precedenti al cancro, cioè al primo momento eziopatogenetico che innesca una sequela di azioni che conducono alla iperplasia cellulare.

I risultati ottenuti in questo studio, che si riferiscono ad un numero relativamente esiguo di campioni, dimostrano per la prima volta che in alcuni incidentalomi surrenalici il gene *StAR* può essere mutato. Quanto questa mutazione possa essere importante nell'induzione di un'alterazione funzionale della steroidogenesi e nella formazione di una massa surrenalica deve essere confermato da studi ulteriori. Studi in corso riguardano l'allestimento di una banca di DNA eterogenea, proveniente da diverse regioni italiane, al fine di individuare o escludere un polimorfismo di popolazione.

Ricevuto il 5 maggio 1999.
Accettato il 29 marzo 2000.

BIBLIOGRAFIA

1. CHIDIAC, R.M. & ARON, D.C. 1997. Incidentalomas. A disease of modern technology. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* **26**: 233- 253.

2. GRIFFING, G. 1994. A-I-D-S: The new endocrine epidemic (Editorial comment). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **79**: 1530-1531.

3. KLOOS, R.T., GROSS, M.D., FRANCIS, I.R., KOROBKIN, M. & SHAPIRO, B. 1995. Incidentally discovered adrenal masses. *Endocr. Rev.* **16**: 460-484.

4. COPELAND, P.M. 1983. The incidentally discovered adrenal mass. *Ann. Inter. Med.* **98**: 940-945.

5. LAVOIE, H. & LACROIX, A. 1995. Partially autonomous cortisol secretion by incidentally discovered adrenal adenomas. *Trends Endocrinol. Metab.* **6**: 191-195.

6. MANTERO, F., MASINI, A.M., OPOCHER, G., GIOVAGNETTI, M. & ARNALDI. 1997. On behalf of the National Italian Study Group on Adrenal Tumors. Adrenal incidentaloma: an overview of hormonal data from the National Italian Study Group. *Horm. Res.* **47**: 284-289.

7. ANGELI, A., OSELLA, G. & TERZOLO, M. 1997. On behalf of the National Italian Study Group on Adrenal Tumors. Adrenal Incidentaloma: an overview of clinical and epidemiological data from the National Italian Study Group. *Horm. Res.* **47**: 279-283.

8. GROSS, M.D. & SHAPIRO, B. 1993. Clinically silent adrenal masses. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **77**: 885- 888.

9. PEPPERCORN, P.D., GROSSMAN, A.B. & REZNEK, R.H. 1998. Imaging of incidentally discovered adrenal masses. *Clin. Endocrinol.* **48**: 379-385.

10. STOCCO, D.M. & CLARK, B.J. 1996. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr. Rev.* **17**(3): 221-244.

11. STOCCO, D.M. & CLARK, B.J. 1997. The role of the steroidogenic acute regulatory protein in steroidogenesis. *Steroids* **62**: 29-39.

12. SUGAWARA, T., LIN, D., HOLT, J.A., KUMUKO, O.M., JAVITT, N.B., W.L., MILLER, W.L. & STRAUSS, J.F.III. 1995. Structure of the human steroidogenic acute regulatory protein (*StAR*) gene: *StAR* stimulates mitochondrial cholesterol 27-hydroxylase activity. *Biochem.* **34**: 12506-12512.

13. THOMSON, M. 1998. Molecular and cellular mechanisms used in the acute phase of stimulated steroidogenesis. *Horm. Metab. Res.* **30**: 16-28.

14. KALLEN, C.B., BILLHEIMER, J.T., SUMMERS, S.A., STAYROOK, S.E., LEWIS, M. & STRAUSS, J.F.III 1998. Steroidogenic acute regulatory protein (*StAR*) is a sterol transfer protein. *J. Biol. Chem.* **273**: 26285-26288.

15. ARAKANE, F., KALLEN, C.B., WATARI, H., FOSTER, J.A., SEPURI, N.B.V., PAIN, D., STAYROOK, S.E., LEWIS, M., GERTON, G.L. & STRAUSS, J.F.III. 1998. The mechanism of action of steroidogenic acute regulatory protein (*StAR*). *J. Biol. Chem.* **273**: 16339-16345.

16. STOCCO, D.M. 1997. A *StAR*: implications in controlling steroidogenesis: *Biol. Reprod.* **56**: 328-336.

17. LIN, D., SUGAWARA, T., STRAUSS, J.F. III, CLARK, B.J., STOCCO, D.M.,SAENGER, P., ROGOL, A. & MILLER, W.L. 1995. Role of steroidogenetic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis: *Science* **265**:1828-

18. BOSE, H.S., SUGAWARA, T., SRAUSS, J.F.III & MILLER, W.L. 1996. The pathophysiology and genetics of congenital lipoid adrenal hyperplasia. *N. Engl. J. Med.* **335**: 1870-1878.

19. FUJIEDA K., TAJIMA T., NAKAE J., SAGESHIMA S., TACHIBANA K., SUWA S., SUGAWARA T., STRAUSS J.F.III. 1997. Spontaneous puberty in 46, XX subjects with congenital lipoid adrenal hyperplasia: *J. Clin. Invest.* **99**(6): 1265-1271.

20. BOSE, H.S., BALDWIN, M.A. & MILLER, W.L. 1998. Incorrect folding of steroidogenic acute regulatory protein (*StAR*) in congenital lipoid adrenal hyperplasia. *Biochem.* **37**: 9768-9775.

21. REINCKE, M. 1998. Mutations in adrenocortical tumors. *Horm. Metab. Res.* **30**: 447-449.

Ann. Ist. Super. Sanità, vol. 36, n. 1 (2000), pp. 117-130

Principi di bioetica e prevenzione da rischi ambientali: possibili interpretazioni

Carlo PETRINI

Laboratorio di Fisica, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - L'articolo analizza alcune caratteristiche e alcuni "dilemmi" della prevenzione da rischi ambientali. Vengono discussi i concetti di incertezza, di rischio accettabile, di percezione del rischio, di accettabilità dei costi, di responsabilità decisionale. Un'analisi critica delle proposte del "principismo" statunitense costituisce la base per sviluppare alcune valutazioni di etica.

Parole chiave: etica biomedica, protezione della salute.

Summary *(Principle of bioetics and prevention from environmental risks: possible interpretations).* - The article analyses some characteristics and some "dilemmas" of prevention from environmental risks. The notions of uncertainty, acceptable risk, risk perception, willingness to pay, responsibility in decisions are discussed. A critical analysis of the proposals of the North-American "principalism" is the basis for developing some ethical evaluations.

Key words: biomedical ethics, health protection.

Definizioni

La prevenzione è definita come l'insieme delle azioni che tendono a promuovere la salute individuale e collettiva e ha come scopo, da una parte, assicurare l'integrità fisica e mentale e sviluppare le capacità vitali di ogni persona e dall'altra, ridurre le minacce che gli ambienti fisici, psicologici e sociali fanno pesare sulle persone.

Il termine italiano "rischio" indica in realtà sia la misura del pericolo (in inglese *hazard*) sia la probabilità del suo verificarsi (in inglese *risk*). Il rischio è dunque multidimensionale: è funzione della natura del pericolo, della probabilità di incorrervi e subirne gli effetti, del grado di esposizione. E' molto frequente la situazione in cui non vi sia una singola conseguenza dell'evento, ma si presentino più possibili conseguenze, ciascuna con una propria probabilità [1].

Riferimenti normativi

Un panorama esaustivo dei riferimenti normativi dovrebbe essere molto ampio. Un'analisi storica completa dovrebbe partire da tempi molto antichi (perlomeno da norme degli antichi egizi).

Verranno qui citati soltanto alcuni documenti interessanti in sé e che introducono concetti utili per l'articolazione dell'esposizione nei paragrafi seguenti.

La Costituzione della Repubblica Italiana all'art. 32 stabilisce che: "La Repubblica tutela la salute come fondamentale diritto dell'individuo e interesse della collettività, e garantisce cure gratuite agli indigenti".

Il principio di precauzione è stato enunciato in forme vincolanti nel 1972 alla conferenza di Stoccolma sull'ambiente umano, ma è stato messo giuridicamente in applicazione solo con la convenzione di Vienna sulla protezione dal buco dell'ozono nel 1985.

Il principio di precauzione integra il diritto europeo con l'art. 130R del Trattato di Maastricht del febbraio 1992, dove è citato senza essere definito. Semplicemente il Trattato chiede alla società di: "intraprendere azioni di prudenza dove vi è una sufficiente evidenza scientifica (ma non necessariamente una prova assoluta) che l'inazione possa portare ad un danno" e dove "le azioni possono essere giustificate con valutazioni ragionevoli di costo/efficacia".

La dichiarazione di Rio (giugno 1992) adotta il principio di precauzione nel punto n. 15, dove stabilisce che: "per proteggere l'ambiente si devono largamente applicare misure di precauzione da parte degli Stati secondo le loro capacità. In caso di rischi di danno gravi o irreversibili, l'assenza di certezze scientifiche non deve servire come pretesto per rimandare a più tardi l'adozione di misure efficaci volte a prevenire la degradazione dell'ambiente".

Particolarmente interessanti sono alcuni pronunciamenti nella legislazione francese. Il principio di precauzione compare nella legislazione della Repubblica

Francese con la legge del 13 luglio 1992 riguardante il controllo degli organismi geneticamente modificati. La legge del 2 febbraio 1995 introduce il principio per l'ambiente, codificando i seguenti punti: precauzione, prevenzione alla sorgente, partecipazione.

Il testo della legge francese del 1995 afferma che il principio di precauzione è il principio "secondo il quale l'assenza di certezze, tenuto conto delle conoscenze scientifiche del momento, non deve ritardare l'adozione di misure efficaci e proporzionate, volte a prevenire un rischio di danni gravi ed irreversibili all'ambiente ad un costo economicamente accettabile". Il testo francese è meno esigente di quello di Rio (la Francia si riferisce a "danni gravi ed irreversibili"; il documento di Rio invece cita "danni gravi o irreversibili") [2, 3]. Un principio così enunciato pone però il problema di come graduare la risposta in modo proporzionato al rischio incerto. Un gruppo di scienziati, in maggioranza fisici, si è fortemente opposto alla politica soggiacente alla legge francese, firmando il cosiddetto "manifesto di Heidelberg", nel quale si afferma: "Non è ragionevole, non è prudente, che delle decisioni politiche importanti siano prese sulla base di presupposti che devono certamente essere esaminati, perfino messi in conto, ma che non sono, allo stato attuale delle nostre conoscenze, che delle ipotesi". Il principio enunciato nella legge ora citata è stato espresso anche dal Commissario di Governo del Consiglio di Stato Francese in una sentenza circa il problema della trasmissione dell'HIV durante le trasfusioni. La sentenza stabilisce che "in situazioni di rischio, un'ipotesi non confermata deve essere provvisoriamente considerata valida, anche se non è formalmente dimostrata". La formulazione di un principio sicuramente importante (quello della prevenzione) in tali termini potrebbe essere pericolosa: per esempio sulla base della sentenza si potrebbe giustificare il ritiro di moltissimi farmaci dal commercio o la sospensione di numerosi atti medici [4].

Le definizioni di prevenzione e di rischio nonché le interpretazioni che emergono dalla legislazione inducono a riflettere su caratteristiche e dilemmi della prevenzione. Nei paragrafi seguenti il riferimento principale è costituito dal rischio ambientale. Nel seguito dell'articolo si troveranno numerosi riferimenti diretti al rischio ambientale, che costituisce il filo conduttore anche quando, per evitare di appesantire l'esposizione con troppe ripetizioni, esso non è citato esplicitamente.

Caratteristiche e dilemmi della prevenzione

La salute è una realtà variabile secondo gli individui, l'ambiente sociale e culturale, i periodi dell'esistenza. Tali concetti si intravedono in parte anche nella definizione di salute che dà la World Health Organization (WHO), secondo la quale "la salute è uno stato di completo benessere fisico, mentale e sociale e non solamente assenza di malattia o infermità". Tale definizione pare peraltro criticabile per almeno tre motivi. Il primo è l'assenza di una citazione esplicita della dimensione etica nella salute. Il secondo è il carattere utopistico: attenendosi a tale definizione, non vi sarebbe al mondo alcun individuo sano! Il carattere irrealizzabile assume poi toni quasi paradossali se si pensa ad un famoso slogan della WHO, ampiamente pubblicizzato nel mondo intero durante gli scorsi anni, che proponeva come obiettivo della WHO stessa "Salute per tutti per l'anno 2000": auspicare per il mondo intero un "completo benessere fisico, mentale e sociale" è un nobile obiettivo, ma la realizzazione è di fatto impossibile. Il terzo motivo è efficacemente descritto da Rodolfo Saracci [5]. L'autore osserva che la definizione di salute enunciata dalla WHO corrisponde più al concetto di felicità che a quello di salute: la felicità è fortemente soggettiva, e non può essere rivendicata come un diritto positivo da assicurare mediante azioni sociali. Inoltre, il carattere illimitato della ricerca della felicità comporterebbe un'illimitata richiesta di servizi sanitari, mentre le risorse disponibili sono inevitabilmente limitate.

La definizione è comunque interessante perché in essa si intravedono alcune delle principali caratteristiche della prevenzione [6, 7].

La prevenzione si indirizza primariamente alle persone in buona salute (almeno apparentemente).

La prevenzione è di natura probabilistica. Esistono argomenti su cosa debba fare una comunità per restare in buona salute, ma ciò può rimanere incerto per il singolo. In realtà è evidente che ci sono fatti e comportamenti dannosi per il singolo, ma i benefici individuali della "prevenzione" nella sua concezione più generale sono spesso deboli, aleatori, rarefatti nel tempo. I benefici collettivi sono invece notevoli. Un esempio può essere chiarificatore: il fatto che 400 persone allaccino quotidianamente la loro cintura di sicurezza per 40 anni statisticamente sarà a vantaggio di 1 sola e non delle 399 restanti. Il beneficio collettivo però è enorme. E' questo un paradosso della prevenzione: una misura applicata a molti va a vantaggio esclusivo di alcuni. La prevenzione apporta dunque un grande beneficio alla comunità, ma offre poco a ciascuno di quelli che la adottano.

L'applicazione di uno strumento di prevenzione è spesso più difficile, lunga e complessa della sua invenzione. Le vaccinazioni sono un esempio evidente. Per esempio, quando si trovasse un vaccino per l'AIDS sarebbe giustificato applicarlo alla popolazione generale tenendo conto della bassa incidenza? Bisognerà vaccinare solo i soggetti a rischio? O sarà forse giusto proporre una vaccinazione volontaria?

Tali caratteristiche portano a scontrarsi con alcuni dilemmi di forte rilevanza etica [8]:

- *Dilemma dell'incertezza*. Esso riguarda due tipi di problemi: a) i risultati delle azioni di prevenzione spesso non sono completamente prevedibili *a priori*; b) le azioni di prevenzione devono essere costruite generalmente sulla base di dati non completamente certi.

- *Dilemma della giustizia*. E' il grave problema dell'equa distribuzione di rischi e benefici.

- *Dilemma dei risultati*. Occorre garantire la sicurezza delle azioni di prevenzione con una preoccupazione permanente di prudenza e di rigore. Le strategie di prevenzione possono avere anche effetti avversi. Una strategia di qualità scadente può avere l'effetto nefasto di creare false sicurezze (falsi negativi) o di creare costi umani e finanziari (falsi positivi).

- *Dilemma dei beneficiari*. L'azione può escludere le popolazioni più sfavorite o più esposte. La prevenzione dovrebbe contribuire alla creazione di una comunità giusta per l'insieme dei suoi membri. Si dovrebbero trovare strategie che impediscano l'instaurarsi di disuguaglianze.

- *Dilemma fatti-valori*. La valutazione del rischio non può essere allo stesso tempo completamente fattuale-scientifica e etico-politica. Si deve trovare un punto di incontro, in modo che le evidenze scientifiche vengano tradotte in provvedimenti operativi validi nel contesto di una società complessa.

- *Dilemma della standardizzazione*. Occorre uniformare le procedure di misurazione e le teorie di valutazione al fine di evitare arbitrarietà e squilibri tra settori di intervento.

- *Dilemma dei partecipanti*. C'è una pluralità di rischi ambientali, che possono essere singolarmente accettabili ma possono non esserlo più se considerati insieme.

- *Dilemma* de minimis. Come fissare una soglia al di sotto della quale considerare un pericolo trascurabile?

- *Dilemma del consenso*. Alcuni rischi sociali possono essere imposti solo se si ottiene un consenso esplicito da parte di chi vi incorre.

Nel seguito dell'articolo verranno esaminati in particolare i primi due tra i dilemmi enunciati.

Il dilemma dell'incertezza

A proposito dell'incertezza alcuni autori propongono una distinzione tra prevenzione e precauzione che può essere non completamente condivisibile, ma suscita riflessioni interessanti. Knight nel 1921 ha insegnato agli economisti a distinguere il rischio caratterizzato da una legge di probabilità oggettiva (fondata sulla realizzazione di avvenimenti aleatori aventi una realtà fisica) e l'incertezza, che non posa su basi scientifiche. Il primo può essere evitato o ridotto con misure di prevenzione, mentre il secondo rende la prevenzione impossibile, e autorizza soltanto la precauzione, senza garanzia circa i risultati.

Savage in *Foundation of statistics* critica tale distinzione. Ogni distribuzione di probabilità, secondo Savage, è soggettiva: il rischio quindi scompare a vantaggio dell'incertezza e la precauzione si identificherebbe quindi con la prevenzione.

L'incertezza non è tuttavia un concetto statico, ma dipende dalle conoscenze scientifiche. Con il progresso delle conoscenze l'incertezza può essere parzialmente assorbita, permettendo così una decisione più adeguata di quella che poteva essere presa precedentemente.

Il principio di precauzione può quindi essere interpretato come un atteggiamento prudente che cerca di evitare di prendere oggi una decisione scientifica che domani potrebbe rivelarsi non adatta.

Si può quindi scindere il problema in due parti, adottando l'approccio di N. Treich, che definisce la precauzione come una gestione dell'attesa di informazioni e la prevenzione come una gestione del rischio.

Le decisioni irreversibili (che riducono l'insieme delle possibili scelte future) sono affette da un costo specifico aggiuntivo in rapporto alle decisioni più flessibili, misurato da quello che si può definire "valore di opzione informativa", prendendo ancora a prestito un'espressione usata in economia. Il costo aggiuntivo dipende proprio dal fatto che si tratta di decisioni irreversibili. Prendendo delle decisioni irreversibili si riduce l'interesse delle informazioni future ed è giustamente ciò che il principio di precauzione vuole evitare.

Se il rischio di irreversibilità futura spinge a misure di precauzione, in realtà anche ogni decisione di prevenzione presente ha allo stesso modo un carattere irreversibile (sotto forma di costi intrapresi e irrecuperabili) che gioca in senso inverso.

Se si considera l'aspetto economico, si potrebbe quindi affermare che la questione fondamentale sollevata dal principio di precauzione è quella di sapere "sotto quali condizioni è ottimale investire nella prevenzione prima di conoscere scientificamente i rischi che si corrono". Ciò conduce ad interrogarsi sulla sensibilità delle decisioni iniziali al flusso di informazioni future, poiché più tale flusso è importante, più è probabile un cambiamento di scenario nel futuro. Gli effetti del principio di precauzione sono dunque due. Ciascuno dei due effetti comporta due componenti che giocano in senso opposto.

Il primo è un effetto di irreversibilità che da una parte favorisce la precauzione ma dall'altra la contrasta.

Il secondo è un effetto di accumulo, che da una parte incita a una maggior prudenza se si considera la degradazione delle condizioni di vita delle generazioni future conseguente alle nostre decisioni e dall'altra parte conduce ad una minore precauzione nella misura in cui le generazioni future avranno conoscenze per trattare i problemi.

Si tratta di una teoria nata tra economisti ed elaborata tra matematici e non sembra applicabile direttamente alla sanità. La salute non è merce. La teoria offre però spunti di riflessione importanti in particolare per il concetto di "valore d'opzione informazionale". Le decisioni possono avere conseguenze irreversibili. L'analisi costi/benefici

è in genere incerta, fondata su previsioni che possono essere infondate. La decisione irreversibile, in questo ambito, rende inutilizzabili tutte le informazioni future che avrebbero potuto mostrare l'inutilità della decisione. Dunque le decisioni irreversibili, come già detto, presentano un costo specifico aggiuntivo. Se si vogliono fare analisi costo/benefici, è importante considerare tale costo aggiuntivo, altrimenti nella valutazione risulterebbero favorite le scelte di azioni irreversibili (è l'effetto irreversibilità, descritto da Claude Henry nel 1974). Il costo della decisione irreversibile rappresenta anche un guadagno per la decisione flessibile, dovuto alla possibilità di utilizzare informazioni future in quanto viene preservato l'insieme delle possibili scelte. Claude Henry lo chiama "valore di opzione". Esso rappresenta il valore condizionale dell'informazione, per cui altri autori preferiscono indicarlo appunto come "valore d'opzione informazionale" [9, 10].

Tutto ciò porta inevitabilmente a scontrarsi con un interrogativo fondamentale. In assenza di certezze sul piano scientifico, quanta (o quanto poca) evidenza è sufficiente a far scattare un'azione cautelativa? Le teorie economiche infatti possono essere utili, ma la salute umana si colloca indubbiamente su un piano diverso. Si può affrontare il problema in diversi modi [11]:

- primo approccio: prestare attenzione anche a risultati parziali, privilegiando la riproducibilità sulla comprensione dei meccanismi biologici. E' l'approccio della International Agency for Research on Cancer nel formulare la valutazione di "probabile cancerogeno" sulla base di studi epidemiologici;

- secondo approccio: confutare il carattere causale di un'associazione finché non se ne sia compreso pienamente il meccanismo biologico. Le azioni preventive in questo caso dovrebbero essere intraprese solo se si è verificato il criterio dell'efficacia;

- terzo approccio: sintesi tra i primi due. Agire con tempestività su fattori di rischio definiti in termini grossolani e contestualmente promuovere ulteriori ricerche.

In questo contesto può essere anche utile ricordare il concetto di *prudent avoidance,* enunciato in Svezia e negli Stati Uniti per quanto riguarda l'esposizione a campi elettromagnetici. La *prudent avoidance* significa: "prendere misure semplici, facilmente raggiungibili, a basso costo per minimizzare l'esposizione, anche in assenza di un rischio dimostrabile". Il problema è che chi ha formulato tale concetto non definisce il significato di "semplice", "facilmente raggiungibile", "basso costo", per cui il principio resta alquanto ambiguo e suscettibile di interpretazioni soggettive.

Qualunque approccio si scelga, non si può in ogni caso ignorare il problema, che emerge chiaramente anche nella definizione di *prudent avoidance,* dell'accettabilità del rischio.

La nozione di rischio accettabile

Una definizione generale di "rischio accettabile" non è possibile, e sarebbe in sé incoerente: l'accettabilità dipende dal contesto. Un "rischio accettabile" in una situazione può essere assolutamente inaccettabile in una situazione diversa. Un "rischio accettabile" per un intervento chirurgico urgente implica pericoli ovviamente ben maggiori rispetto ad un "rischio accettabile" per l'esposizione ad un inquinante.

Se una definizione generale è impossibile, si può invece attribuire un significato convenzionale al "rischio accettabile". La nozione di "rischio accettabile" è conseguente all'assunzione che esista una probabilità piccola, ma diversa da zero, che accada un evento, al di sotto della quale il cittadino è disposto, palesemente o implicitamente, ad accettare un rischio [12].

L'accettabilità dipende in particolare dal beneficio associato: non si accetta o rifiuta un rischio in sé, ma si accetta o rifiuta una situazione o un intervento che determinano un rischio. Il rischio accettabile ha quindi un significato molto diverso in contesti diversi.

In genere l'accettabilità deriva dalle seguenti condizioni:

- la probabilità di un evento è piccola o, nel caso di esposizione ad un agente nocivo, ci si trova sotto una soglia di esposizione definita priva di effetti;

- i benefici superano chiaramente i rischi;

- non c'è una manifesta diseguaglianza nella distribuzione dei rischi e dei benefici, e in particolare non si sacrificano alcuni individui a vantaggio di altri nel nome del "bene comune".

In molti casi si constata come la soglia di accettabilità di rischio sia molto più elevata quando il rischio è determinato da scelte individuali. In altre parole, si ha in genere un'accettazione più facile quando si ha l'impressione di poter esercitare un controllo sulla probabilità e/o sull'entità della perdita. A questo proposito può essere utile nel *risk management* non dimenticare una scala di rischi comuni per avere un parametro di giudizio comparativo.

Si può quindi comprendere come in realtà ciò che è accettabile o non accettabile non è il livello di rischio, ma da un lato, come si è ora detto, il beneficio associato e dall'altro lo stesso processo decisionale che porta alla scelta di un'opzione di gestione del rischio.

Si noti infine che l'esigenza sociale di un rischio nullo è utopistica e fuorviante: il rischio fa parte della vita, e l'agire, che è una necessità imprescindibile, implica in sé un rischio [13].

La percezione del rischio

La percezione del rischio, intesa come impressione o giudizio intuitivo sulla natura e sulla dimensione del rischio da parte dei soggetti coinvolti, è un aspetto che può condizionare fortemente le scelte pratiche che vengono intraprese per fronteggiare il rischio.

Nella popolazione soggetta a rischi è frequente il timore di poter essere vittima di perdite non compensate da adeguati benefici. Tale timore è acuito dal dubbio che il danno subito possa essere originato da scelte disoneste, compiute cercando di mascherare verità note.

A seconda delle situazioni è possibile che i singoli individui attribuiscano maggiore importanza alla probabilità di un evento oppure alla gravità delle sue conseguenze.

E' utile considerare quali fattori possono contribuire a percepire una particolare avversione verso uno specifico rischio e quali possono, al contrario, portare a sminuire la gravità di un rischio [14]. I più frequenti tra tali fattori sembrano:

- esistenza di un beneficio connesso alla situazione rischiosa (il tipo di beneficio può indurre a valutare erroneamente il rischio);
- sensazione di poter esercitare un controllo sulla situazione rischiosa (un rischio volontario in genere è accettato più facilmente);
- grado di comprensione del fenomeno (un rischio poco conosciuto è in genere più temuto);
- frequenza dell'evento (l'esperienza frequente di un rischio può portare a sottostimarlo);
- tipo di conseguenze (spesso si attribuisce minor probabilità ad un evento man mano che aumenta la gravità);
- dimensione e tipo di popolazione coinvolta (la reazione emotiva dipende fortemente dal coinvolgimento personale).

Un ulteriore fattore che ha notevole rilevanza nella percezione del rischio è la presenza di pregiudizi. La mentalità comune tende a semplificare informazioni complesse ed incerte facendo affidamento su regole e tradizioni già acquisite, ed è purtroppo restia a modificare le proprie convinzioni e percezioni: si accettano evidenze consistenti con le percezioni iniziali e si tende a rifiutare quelle contrarie.

La percezione del rischio dipende quindi non solo dal rischio in sé, ma anche dal suo contesto [15, 16].

Il problema dei costi

Aspetti generali

La valutazione dei costi è un processo complesso. Per diversi motivi esso presenta una forte rilevanza etica. Il costo monetario non è semplicemente la spesa da sostenere per un'azione. Tra i costi vanno inclusi i "costi umani", come: sofferenza, attesa di malattia, conseguenze psicologiche, implicazioni familiari [17].

La difficoltà della definizione dei costi in ambito medico-sanitario deriva dunque in particolare dal tentativo di quantificare i costi anche per valori non monetari.

Anche qualora ci si voglia limitare a costi che sembrano direttamente quantificabili in termini economici (e si prescinda quindi non solo da interrogativi sull'etica ma anche da stime su valori umani non materiali) si incontrano comunque difficoltà pratiche, come: prevedere le conseguenze di una decisione, assegnare il costo ad un provvedimento con diverse conseguenze eterogenee tra loro, valutare costi ed effetti lontani nel tempo.

La valutazione economica del danno alla salute umana, nelle sue varie forme, considera in genere anche i costi dovuti non solo a spese in uscita, ma anche a mancate entrate (per esempio: mancati redditi futuri per morti premature o per assenze dal posto di lavoro) [18].

La valutazione dei danni alla salute umana e l'assegnazione di valori monetari alla malattia o al decesso può essere fatta essenzialmente secondo due approcci: il criterio dei rischi/benefici oppure il criterio della disponibilità a pagare o ad accettare un risarcimento (la *willingness to pay*).

Può essere utile sviluppare qualche riflessione in particolare sulla *willingness to pay.* Per quanto riguarda il criterio rischi/benefici le varie metodologie di valutazione presentano aspetti gestionali anche molto complessi, la cui descrizione esula dagli scopi del presente articolo. Nei paragrafi seguenti saranno brevemente espresse alcune valutazioni sull'etica di tali procedimenti.

La willingness to pay

Esistono studi che cercano di attribuire un valore monetario alla vita [19, 20].

Alcuni studi si basano sulla *willingness to pay* per interventi il cui effetto è il probabile differimento della morte. In genere i calcoli assumono come riferimento il differimento della morte di un anno.

I metodi utilizzati si possono ricondurre a tre tipi.

Il primo approccio consiste nello studiare le decisioni passate durante le quali è stata in gioco una variazione della probabilità di decesso per inferire un valore da attribuire alla vita umana. I risultati ottenuti in questo modo sono estremamente disomogenei. Qualcuno ha rilevato che la decisione di non imporre un meccanismo che impedisca l'accesso dei bambini agli armadietti dei medicinali implica che il valore unitario della loro vita sia inferiore a 1000 $. Altre stime dimostrano che un inasprimento delle norme costruttive in seguito al crollo di un piano di uno stabile a causa di un'esplosione di gas implica invece che il valore unitario della vita umana sia superiore a 20 000 000 $.

Il secondo approccio consiste nell'adottare una visione strettamente produttivistica dell'individuo, considerando il valore della vita umana come sola attività produttiva, valutata come attualizzazione della somma dei guadagni futuri (teoria spesso indicata come "capitale

umano"; la nozione di "capitale umano" è molto utilizzata anche nei documenti di diverse direzioni generali dell'Unione Europea). Il procedimento presuppone che il valore di un individuo sia rappresentato esclusivamente da ciò che produce, e che la produzione sia correttamente e unicamente quantificata dai guadagni.

Il terzo approccio consiste nel rilevare i consensi a pagare per una riduzione della probabilità di decesso.

La maggior parte degli studi si basa su valutazioni del terzo tipo, e quindi riferite a ciò che gli individui sono disposti a pagare per ottenere un aumento delle aspettative di vita o una riduzione delle probabilità di morte. Un procedimento di questo tipo è alla base dell'offerta di salari elevati per occupazioni che comportano dei rischi o, al contrario, dell'accettazione di salari più bassi pur di ridurre i rischi associati ad una professione.

La stima dei danni alla salute umana misurati in termini di disponibilità a pagare in genere considera anche i costi indiretti.

In Svezia sono state fatte valutazioni in tal senso in diverse aree di applicazione.

Per esempio, nell'ambito degli interventi per la sicurezza stradale sono stati condotti diversi studi per quantificare la *willingness to pay*. I dati sono abbastanza variabili. Nel complesso si può ritenere che la *willingness to pay* per differire di un anno la morte corrisponda a 1-10 volte la media del prodotto nazionale lordo per persona.

La *willingness to pay* viene spesso applicata anche per stime sui costi per la prevenzione di insorgenza di malattie.

Nell'ambito della radioprotezione il Swedish Radiation Protection Institute propone delle "regole basate sull'esperienza" per classificare un'azione come fortemente urgente, urgente o non richiesta (se non per motivi particolari) in base al costo per prevenire un caso, ed è stata redatta una tabella che associa spese a gradi di urgenza (Tab. 1).

In Svezia è stata anche proposta una formula per il calcolo del costo medio di ogni "caso statistico" eliminato dall'adozione di un determinato provvedimento di protezione sanitaria.

Ciò che qui preme evidenziare è l'approccio molto pragmatico, che solleva diversi interrogativi di etica.

Tabella 1. - Regole per giudicare i costi nella radioprotezione secondo il Swedish Radiation Protection Institute [51]

Costo per prevenire un caso (milioni di dollari)	Azione proposta
1	La misura di protezione è fortemente urgente
1-5	La misura di protezione è urgente, particolarmente se il costo è nella parte inferiore dell'intervallo e il costo totale per la società è moderatamente alto
> 5	Non sono richieste misure di protezione se non per motivi particolari

L'intervento dei decisori: aspetti di etica

Si possono individuare quattro ragioni prioritarie che giustificano l'intervento del potere pubblico:

- la responsabilità di protezione e promozione della salute pubblica;
- la necessità di un'azione collettiva;
- la necessità di un'allocazione ottimale delle risorse;
- la necessità di prevenire comportamenti che potrebbero nuocere agli altri.

Si noti che il consenso sul fatto che lo Stato debba impegnarsi nell'allocazione di risorse alla sanità è largamente condiviso, ma il consenso non è unanime. Esiste anche una scuola di pensiero anarco-individualista per cui ogni tassa sarebbe non una redistribuzione di ricchezze ma un furto. E' una posizione molto difficile da accettare, in quanto porterebbe alla situazione che Søren Kierkegaard descrive efficacemente: "La nave è in mano al cuoco di bordo e ciò che trasmette il megafono del comandante non è più la rotta, ma ciò che mangeremo domani".

Non ci si dovrebbe però occupare solo di come si sceglie, ma anche del perché si sceglie, considerando la vita umana nel suo complesso e i valori fondamentali della vita stessa [21]. Se non ci si impegna in tal senso le scelte rischiano di essere soltanto *rational fools* (sciocchi razionali), per usare un'espressione del premio Nobel per l'economia Amartya Kumar Sen, la cui opera mira primariamente a trasformare l'economia del benessere (*welfare economics*) in un'economia dello star-bene (*well-being economics*).

A questo proposito può essere appropriata una considerazione generale sull'approvazione delle leggi, che è però particolarmente pertinente quando una legge deve recepire un dato scientifico. Un grande teorico dello stato moderno, Hans Kelsen, ha fatto un'osservazione di buon senso, ma molto grave. In una democrazia le leggi, come è noto, provengono primariamente dal Parlamento, che esprime in tal modo la sua "volontà". Kelsen osserva però che "votare per un disegno di legge non implica affatto volere effettivamente il contenuto della legge. In senso psicologico, si può "volere" solo ciò di cui si ha un'idea; è impossibile "volere" qualcosa che si ignora. Ora, è un fatto che sovente, se non sempre, un numero rilevante di coloro che votano per un disegno di legge ha al massimo una conoscenza superficialissima

del suo contenuto". Leonardo da Vinci diceva: "Quelli che s'innamoran di pratica senza scienza son come il nocchiere ch'entra in navillo senza timone o bussola, che mai ha la certezza dove si vada".

Un'ultima considerazione circa l'intervento del potere pubblico riguarda le campagne di educazione, che hanno molta importanza nei programmi di prevenzione [22]. Il principio di autonomia porterebbe a domandarsi se le campagne educative possano cambiare comportamenti, abitudini, convinzioni rispettando l'autonomia individuale. Sicuramente non basta l'informazione: occorre l'educazione, che implica la comprensione del comportamento prima di volerlo modificare. Ovviamente tutte le manipolazioni dell'informazione modificano la percezione da parte delle persone e vanno contro il principio di autonomia.

Le proposte del principismo statunitense

"Principi" della bioetica

In bioetica l'espressione "principio" può essere intesa in due modi diversi: fondamento di una teoria etica oppure norma in base alla quale esprimere un giudizio.

La ricerca di una base minima, ma al tempo stesso solida, su cui impostare la bioetica, si colloca nel quadro di quella suprema istanza regolativa che Kant definiva "principio di universalizzazione". In essa Kant esprime l'imperativo per cui qualsiasi norma può essere valida per ogni singolo individuo o per ogni gruppo, in quanto si ritiene debba valere per qualunque altra persona o gruppo posto in una situazione uguale. Ciò ha un'importanza cruciale nei contesti fortemente pluralisti che caratterizzano l'universo culturale attuale.

I principi nordamericani sono sorti come guida per le azioni ma sono degenerati fino a divenire essi stessi una teoria etica. L'idea originaria era invece di fornire dei criteri generali da utilizzare nelle varie situazioni "bilanciando" i valori in gioco [23, 24].

Chi ha formulato i principi di bioetica ha considerato che tutte le azioni sbagliate devono avere qualcosa in comune. Così pure tutte le azioni buone devono avere qualcosa in comune. Gli autori hanno quindi cercato un riferimento a dei principi, ritenendo di poter giustificare i principi stessi sulla base di teorie etiche anche contrastanti tra loro. Secondo il "principismo" teorie etiche contrapposte che non possono trovare accordi su concetti teorici, hanno invece la possibilità di arrivare ad una sovrapposizione di consenso su alcune regole pratiche da adottare.

Il sistema principalista è nato in riferimento alla sperimentazione sull'uomo, ma è poi stato applicato a tutti gli ambiti delle scienze biomediche, grazie al successo riscosso per la "operativa".

I principi si possono così enunciare:

Principio di autonomia (cioè rispetto delle persone). Ciascuno, secondo tale principio, ha il diritto di scegliere autonomamente se accettare o rifiutare quanto si intende fare su di lui. Si dovrebbero trattare le persone come soggetti autonomi e tutelarle quando la loro autonomia è ridotta. Conseguentemente, secondo questo principio, occorre sempre il consenso. Sullo stesso principio si basano il rifiuto consapevole delle cure, la verità al paziente, il diritto alla riservatezza. Il principio di autonomia mira dunque al superamento del paternalismo. Si noti però che il paternalismo non può essere superato efficacemente da una prospettiva "contrattualista": occorre l'uguaglianza dello scambio. Il tema è molto complesso, ma riguarda in primo luogo il rapporto medico/paziente, e dunque esula dagli scopi di questa trattazione. E' comunque importante ricordare che in genere si ritiene che l'autonomia possa essere limitata quando la scelta autonoma del singolo può minacciare la salute pubblica, o quando implica un costo economico inaccettabile.

Principio di beneficialità. Comprende in realtà due nozioni: a) non maleficità: è *il primum non nocere,* cioè non arrecare danni; b) beneficialità, secondo la quale si deve promuovere il bene, minimizzare i rischi e massimizzare i benefici. Il principio di beneficialità implica quindi la difesa della vita e della salute fisica e psichica nonché il sollievo della sofferenza nel rispetto della dignità umana. Il principio può subire limitazioni quando intervengono obbligazioni sociali di giustizia distributiva.

Principio di giustizia. E' regolato dal *suum cuique tribuere,* cioè dare a ciascuno il suo. E' il principio che esprime le istanze etiche della società in cui i singoli sono inseriti. Secondo tale principio si devono ripartire equamente oneri e benefici.

La Commissione Belmont ritenne i principi sufficienti per fondare l'intero lavoro per cui era stata istituita dal Presidente degli Stati Uniti.

Beauchamp e Childress cercarono di collocare i principi all'interno di due modelli contrapposti (deontologici e utilitaristi/teleologici), mostrando che le posizioni contrapposte possono trovare nei principi un *overlapping consensus*.

I principi, secondo Beauchamp e Childress, andrebbero bilanciati quando sono in conflitto tra loro considerando le singole situazioni: non ci sarebbero cioè criteri oggettivi per valutare le diverse situazioni, ma semplicemente si dovrebbero valutare le conseguenze delle decisioni, escludendo riferimenti a criteri oggettivi.

Per altri autori, ed in particolare per W.D. Ross (in *The foundation of ethics*), ci sono invece dei doveri *prima facie*, cioè vincolanti in tutte le situazioni, e quindi non soggetti a bilanciamento (è la prospettiva tipica del deontologisimo, in contrapposizione al teleologismo che propone un "utilitarismo della regola").

Molti ritengono che i principi di autonomia, beneficenza e giustizia possano da soli guidare anche l'etica delle politiche di prevenzione. In particolare nella prevenzione si invoca la giustizia distributiva. A questo proposito può essere utile un'osservazione terminologica. Il principio bioetico si riferisce ad un concetto generale di giustizia e non propriamente alla giustizia distributiva: quest'ultima è più propriamente un ambito di applicazione e non un principio. Il famoso detto *iustitia est ad alterum* (cioè la giustizia è in primo luogo un fatto di relazione tra individui) ci ricorda infatti che si possono distinguere:

- giustizia commutativa, che è il rapporto tra individuo e individuo, governato dall'espressione *neminem laedere* e che in ambito sanitario riguarda in particolare la relazione medico-paziente;
- giustizia distributiva, che è il rapporto tra individui e società e che riguarda in particolare l'allocazione di risorse. L'espressione classica dell'*unicuique suum* ricorda una verità importante. Secondo tale espressione essere giusti non significa dare tutto a tutti e nemmeno a ciascuno la medesima cosa. Significa dare a ciascuno il suo.

Può dunque essere insufficiente invocare la giustizia distributiva: occorre darle dei contenuti [25]. A parte le questioni terminologiche, il punto importante riguarda comunque l'uso dei principi come strumenti che da soli, senza un riferimento oggettivo, permettano di operare scelte eque.

Critica al principismo

Nella bioetica si può individuare un'espressione particolare di un fenomeno più ampio che costituisce un fulcro di interesse nel panorama del pensiero contemporaneo: la tendenza a trattare i problemi etici da un punto di vista specificamente razionale, dopo che per vari motivi la ragione era stata espropriata in quest'ultimo secolo della sua funzione valutativa nell'ambito filosofico.

I principi non sono negoziabili, e non ammettono eccezioni. Il fatto che il principio sia una demarcazione tra cosa può essere oggetto di negoziazione e cosa non può esserlo, ricopre un'importanza decisiva in quanto inserita in contesti culturali fortemente pluralisti. Si riconosce quindi una superiorità delle procedure rispetto ai contenuti. Il fatto di riconoscere o meno un principio etico assoluto è fondamentale per il metodo di lavoro. Questo emerge chiaramente nei comitati etici, dove spesso il consenso è di tipo "strategico", per cui il comitato diviene un organo di "combinazione del consenso sociale". Utilizzando il lessico etico-giuridico di Dworkin si può individuare un'efficace formulazione del principio etico assoluto nel "diritto di ognuno all'uguale rispetto e considerazione".

Un esempio può mostrare come i principi, fuori da una teoria etica, possono entrare in conflitto. Si pensi ad esempio al segreto professionale circa l'infezione da HIV di una coppia.

Il medico che decide di non rivelare al partner l'infezione del suo compagno/a interpreta in un certo modo i principi: l'autonomia viene considerata come rispetto assoluto della privacy; la beneficialità viene considerata valutando che se il paziente constata che il suo medico non rispetta la privacy, non si rivolgerà più a lui, impedendo quindi al medico stesso di continuare a fare il bene del paziente; il principio di giustizia viene interpretato considerando che rivelare il segreto comporterebbe discriminazioni.

Il medico che decide invece di rivelare la situazione al partner interpreta in altro modo i principi: per quanto riguarda l'autonomia questo medico considera che non può essere schiavo di tutto ciò che il paziente chiede (l'autonomia infatti non è solo quella del paziente, ma anche, e doverosamente, quella del medico); per quanto riguarda la beneficialità, il medico in questo caso considera che è necessario salvare il coniuge dall'infezione (se non lo si informa del pericolo, forse lo si condanna a morte); infine, a proposito della giustizia, il medico ritiene che non sia lecito non dare informazioni conosciute ad una persona se ciò può comportare un rischio per la vita.

I principi, senza una base etica, possono essere interpretati in modo diverso e portare a conclusioni assolutamente opposte. I principi non sembrano quindi sufficienti per formulare un adeguato giudizio.

In altre parole: senza una teoria unificata, senza un'antropologia ed un'ontologia che li giustifichi, i principi hanno una logica fine a se stessa ed entrano facilmente in conflitto.

Si può quindi concordare con coloro che criticano i principi. La critica si può muovere su livelli differenti.

Una prima possibilità è rifiutare globalmente il sistema dei principi, ritenendoli un'imposizione che soffoca la libertà e le virtù dei singoli soggetti morali.

Una seconda possibilità consiste nel sostituire i vecchi principi con formulazioni più moderne, mantenendo però il sistema. Per esempio si propone di esplicitare i concetti di qualità della vita, di responsabilità delle proprie decisioni, ecc.

Una terza proposta viene da coloro che non mettono in discussione completamente il sistema, bensì propongono di mantenere un riferimento ai principi, rielaborandone però completamente lo statuto. Tale prospettiva pare particolarmente interessante. Sono infatti possibili altre formulazioni dei principi, più attente ai valori etici.

L'autonomia, come abbiamo visto, presenta il paradosso di essere nulla se non è reciproca. Sembra quindi preferibile parlare di responsabilità.

La beneficialità è ambigua: cos'è il bene? Sembra quindi preferibile parlare di rispetto dell'uomo, di cura della persona, di tutela e valorizzazione della salute, di principio terapeutico.

Anche la "giustizia" come categoria generale può essere ambigua. Sembra quindi preferibile parlare di socialità.

Si pone poi il problema del "bilanciamento" tra valori in gioco. Sicuramente nel gestire le situazioni concrete i vari elementi possono essere bilanciati in modi soggettivamente diversi. L'idea del bilanciamento è insoddisfacente se nasconde un relativismo. Pare invece legittima se essa non disconosce un riferimento oggettivo.

Il "bilanciamento" in bioetica è stato proposto anche da alcuni filosofi contemporanei che si riconoscono nel cosiddetto "pensiero debole", che diverse volte si è espresso sui temi dell'etica biomedica. Non ci si riferisce qui tanto alla divulgazione, che è superficiale per sua natura, quanto ad alcuni specialisti che amano sostituire l'ontologia con la semantica, la compattezza della verità con il gioco labirintico, i concetti con le metafore, la profondità con la superficie, la determinazione con l'indeterminazione, la metafisica con l'ironia. Per tale ragione più che un "pensiero debole" esso pare un "pensiero molle". Alcuni cosiddetti "manifesti" di bioetica diffusi recentemente sembrano avere tale impostazione.

Chiaramente i principi di autonomia e beneficialità hanno particolare rilevanza, come già detto, in terapia e nel rapporto medico-paziente. Nelle scelte di prevenzione invece è la giustizia ad avere un ruolo fondamentale. Un aspetto molto importante in tale ambito è quello dell'allocazione delle risorse [26]. In genere in bioetica si parla di: macroallocazione che indica le politiche sanitarie, le scelte su quanto investire in sanità e quanto investire in altri settori; e di microallocazione che fa riferimento al problema di chi deve ottenere le risorse e quali siano i trattamenti prioritari.

Questi due termini sono abbastanza usuali. Esiste anche un'espressione meno diffusa per indicare le scelte di investimento tra diverse specialità mediche o tra diverse patologie da combattere o tra diversi approcci terapeutici di una medesima patologia. Si parla in questo senso di mesoallocazione, che ha particolare rilevanza nel contesto della prevenzione, in quanto fa riferimento al problema del rapporto tra i benefici del singolo e della collettività.

Rapporti tra benefici del singolo e della collettività

Il problema del rapporto tra rischi e benefici del singolo ed interesse della collettività è presente in molte situazioni diverse [27]. Alcuni esempi possono essere significativi della varietà degli ambiti in cui ci si trova a dover dare delle risposte a tale problema. Per esempio nel settore produttivo i lavoratori possono essere esposti a rischi per produrre beni o servizi di cui beneficiano altre persone.

Nel campo della ricerca medica si propongono sperimentazioni che possono apportare un beneficio per la collettività, ma che costituiscono un rischio per i soggetti che la subiscono. Ogni società deve inoltre fare delle scelte di priorità, in quanto inevitabilmente l'utilizzo di risorse in un settore sottrae fondi ad altri settori.

La storia ci ricorda come nel tempo sia stata diffusa la pratica di isolare individui affetti da malattie contagiose per salvaguardare la collettività. Esistono anche oggi situazioni in cui si ritiene necessario imporre restrizioni alla libertà individuale per la salvaguardia della collettività.

Nelle scelte per l'allocazione delle risorse si devono fronteggiare delle urgenze: diversi paesi africani hanno scelto di non destinare fondi all'assistenza di malati colpiti da AIDS al fine di allocare le risorse disponibili, generalmente molto limitate, nella prevenzione.

La nozione di ciò che è distributivamente giusto in bioetica varia nelle situazioni diverse in base al contesto [28, 29]. Questo è innegabile, malgrado i numerosi richiami all'esigenza di riferimenti oggettivi già espressi più volte nelle pagine precedenti.

La variabilità delle valutazioni in contesti diversi implica che siano sempre presenti ampie zone di discrezionalità dei giudizi: può essere relativamente facile raggiungere un consenso su ciò che è ingiusto ma spesso è molto difficile definire ciò che è oggettivamente giusto. Questo purtroppo è vero, e può indurre ulteriormente a pensare che un principio di giustizia astratto, senza un riferimento a fondamenti di etica oggettivi, può essere non solo inutile ma di intralcio.

Il problema della giustizia distributiva è dunque estremamente complesso. Richiamiamo qui soltanto due ordini di considerazioni.

In primo luogo è necessario distinguere il problema delle risorse dal problema delle priorità. La questione delle "risorse limitate" è un argomento che spesso ha un ruolo centrale nelle valutazioni di economia sanitaria. Essendo i mezzi "limitati" bisognerebbe dedicarsi con più attenzione ai settori più pericolosi ed importanti. Ciò è indubbiamente vero, e sarebbe grave sprecare fondi per tutelare diritti "deboli" (per esempio: la proprietà) quando non sono assicurati diritti "forti" (come la salute, la sopravvivenza, ed i diritti fondamentali della dignità umana) [30, 31]. Tuttavia non bisognerebbe considerare la limitazione delle risorse come se si trattasse di una materia prima estratta da un giacimento in esaurimento. Le "risorse" sono fatte anche di convenzioni, di scambi tra popoli, di comunicazione tra settori. Per quanto riguarda le priorità se non si determinano conflitti con altri beni sociali fondamentali, la salute dovrebbe essere considerata come un valore fondamentale per il conseguimento di altri valori [32, 33].

In secondo luogo la questione dovrebbe essere affrontata in termini sociali, ma con un criterio personalistico: il bene sociale è bene di tutti, in quanto bene di ciascuno e si ottiene salvaguardando il bene dei singoli. Il bene sociale non può entrare in concorrenza con il bene individuale e dovrebbe quindi accettare anche delle perdite economiche. In ogni caso si dovrebbe mantenere come criterio fondamentale la persona individuale. Questo è un concetto molto importante: il bene comune credo si ottenga tutelando, garantendo e valorizzando il bene dei singoli [34].

Il rapporto tra benefici del singolo e della collettività richiede evidentemente un efficace intervento da parte di chi ha potere decisionale ed esecutivo.

L'etica falsificazionista e l'errore

Alcuni autori sostengono che si può affrontare il problema in modo falsificazionista, nel senso popperiano del termine [35]. Si potrebbe cioè immaginare che le politiche pubbliche possano essere testate contro falsificatori potenziali, cioè non immaginando tutti i casi in cui potrebbero avere successo, ma invece immaginando quei singoli episodi in cui andrebbero molto probabilmente incontro a insuccesso. In questa prospettiva una politica pubblica fallirebbe se andasse contro l'evidenza empirica, oppure se fosse basata su imperativi logicamente contraddittori o anche per ragioni etiche: in altre parole dovremmo mettere le ipotesi di politica pubblica alla prova delle teorie morali per accertarne la compatibilità. Questo approccio ha suscitato interesse: il nostro metodo scientifico risente molto di un'impostazione popperiana.

Le scelte eticamente sbagliate sicuramente nella pratica si rivelano inadeguate ed insostenibili. Non pare tuttavia accettabile fare semplicemente verifiche a posteriori, quando possono essersi ormai verificati danni irreversibili. In altre parole: l'approccio falsificazionista può essere pericoloso quando il terreno di lavoro è la prevenzione.

Un regista affermato ripeteva volentieri che "la vita è un teatro". Forse aveva ragione. Ma non sono ammesse le prove.

In questo senso bisogna ricordare che la bontà delle decisioni dipende anche dalle condizioni in cui ci si trova ad operare. Occorre quindi garantire che, prima di scegliere un indirizzo operativo, si abbia cura di ottenere l'intero patrimonio di dati informativi (sapere), di avere a disposizione strumenti adeguati (potere) e di chiarire esplicitamente le finalità (volere). Se manca una delle tre condizioni, qualunque scelta risulta eticamente criticabile, perché incompleta nelle sue fondamenta [36].

L'etica falsificazionista porta ad una considerazione finale. Come si deve valutare la possibilità di errore nelle scelte di politiche protezionistiche? Quando si devono prendere decisioni in situazioni di incertezza è infatti possibile commettere errori. Purtroppo gli errori possono essere gravi e addirittura costare vite umane. L'errore apre quindi profondi interrogativi morali e si deve mettere in atto ogni sforzo per evitarlo. L'errore che ha conseguenze sulla salute umana è uno degli eventi più terribili che possano accadere. L'errore in buona fede, sul piano esclusivamente dell'etica, è però ammissibile. Non è invece tollerabile il caso in cui all'errore si unisce il falso, né quello in cui le procedure decisionali non sono trasparenti, coerenti, esplicite. Tutti concordano che il primo requisito dell'eticità è la scientificità. Una cattiva scienza è una cattiva etica. Il problema è che non sempre una buona scienza è una buona etica.

Si deve quindi mirare alla coerenza tra livello tecnico-scientifico, livello giuridico-organizzativo e livello comportamentale. Se uno dei livelli ha un difetto, l'intero sistema vacilla.

Considerazioni finali

Alcuni capisaldi

Nel concreto molti problemi nella gestione della prevenzione sono di fatto riconducibili ad un problema di valutazione costi/benefici. Il principio tradizionale dei costi/benefici dovrebbe essere visto alla luce di alcune delle caratteristiche descritte nelle pagine precedenti e che possono essere così sintetizzate:

- durata e gravità degli effetti. Le previsioni possono essere molto difficili;
- rischio d'irreversibilità potenziale (per esempio: se una costa venisse sommersa dall'aumento del livello del mare, non sarebbe possibile ritornare all'integrità del territorio precedente);
- mancanza di certezze scientifiche sulle possibili conseguenze delle nostre decisioni attuali (per esempio: tutti concordano che i gas che provocano effetto serra sono aumentati alla fine del secolo. Ci sono però discordanze sui modelli e sulle previsioni).

Le risposte possibili possono essere schematizzate nel modo seguente [37].

L'approccio utilitaristico in genere propone di mantenere le dosi di esposizione ad agenti inquinanti il più basso che sia ragionevolmente raggiungibile (principio ALARA, cioè *as low as reasonably achievable*). E' la proposta che mira alla maggior riduzione dell'esposizione collettiva possibile con la somma di denaro che si ritiene disponibile. L'approccio etico è dunque quello di raggiungere la massima riduzione del rischio collettivo possibile. La riduzione della dose collettiva è, a mio giudizio, un obiettivo da perseguire, ma la valutazione basata principalmente su criteri economici pare eticamente inadeguata.

L'egualitarismo propone di rispettare i limiti di dose come primo obiettivo, per poi mantenere le dosi il più basso che sia ragionevolmente possibile. L'efficacia dei diversi possibili costi ed investimenti viene quindi considerata solo dopo che le dosi individuali sono mantenute al di sotto del valore limite stabilito. Seguendo questo criterio, la priorità della riduzione delle dosi individuali può comportare un incremento della dose collettiva globale. In questo caso l'argomento etico prioritario è quello dell'equità, per cui sarebbe inaccettabile sottoporre alcuni individui ad un forte rischio anche se il rischio collettivo diminuirebbe. L'equità è un criterio etico condivisibile, ma dovrebbe essere integrata in una visione più particolare, in cui si considerano i vari casi nel proprio contesto, mirando al comune attraverso il bene dei singoli.

Le impostazioni più vicine alla sociobiologia spesso propongono di utilizzare in ogni caso le migliori tecnologie disponibili (BAT: *best available technology*) per ridurre il rischio. Se i fondi sono limitati, ciò può significare che alcuni individui beneficino di un più elevato grado di protezione rispetto ad altri. Il motivo etico alla base di tale approccio è dare alta priorità alla protezione, ma, a mio giudizio, la possibilità che la dose individuale possa restare per alcuni individui superiore ai limiti non sembra accettabile: il lodevole sforzo nell'elevare il livello tecnologico delle pratiche e degli interventi pare eticamente inaccettabile se penalizza alcuni individui oppure alcune categorie di individui.

Esistono poi le tesi più radicali, come quella del *de minimis*, secondo cui la protezione deve essere aumentata fino a dove è tecnicamente possibile, indipendentemente dai costi. E' per esempio la posizione di chi propone un interramento generalizzato degli elettrodotti al fine di diminuire l'esposizione continua della popolazione a campi elettrici e magnetici. Questo appare un criterio semplicistico, che non considera le fortissime implicazioni economiche di ogni processo tecnologico estremo.

Sotto il profilo etico sembrerebbe positiva una soluzione che recepisse alcuni spunti positivi presenti in teorie diverse [38], in modo che la persona sia considerata il valore fondamentale [39, 40]. Nei paragrafi seguenti si cercherà di suggerire alcuni criteri in tal senso. In particolare si cercherà di argomentare la necessità di considerare la centralità della singola persona, in modo che il benessere collettivo sia ottenuto tutelando e promuovendo il benessere dei singoli individui, secondo i bisogni di ciascuno.

Ruolo delle dottrine economiche

La valutazione costi/benefici richiama categorie prettamente economiche. Il richiamo alle categorie proprie dell'economia nei problemi sanitari può indurre confusione per almeno tre motivi. In primo luogo si può presentare il rischio di confondere fini e mezzi. In secondo luogo si può generare il sospetto (o il convincimento) che le scelte che riguardano la salute (comprendendo con tale termine la vita, la morte, il dolore, la sofferenza, il benessere) debbano essere guidate prevalentemente da criteri di ordine economico. Si noti: è innegabile che la salute "ha un prezzo", che richiede delle spese; occorre però che la valutazione dei costi sia inserita in una corretta dottrina economica. In terzo luogo l'attenzione ai costi e all'efficienza può contrastare con l'adeguatezza del livello degli interventi.

Nell'ottica costi/benefici, il valore di riferimento del costo e del beneficio dovrebbe essere, come spesso si sente affermare, omologo.

Se da una parte della bilancia si pone il valore economico e dall'altra la salvezza della vita, qualunque rischio economico potrebbe essere giustificato ed obbligatorio [41].

Sembra quindi preferibile lavorare in un'ottica di valutazione "rischi/benefici" piuttosto che di "costi/benefici" [42].

Passaggio dai criteri di giudizio alle scelte operative

La visione utilitarista viene assunta in particolare come riferimento operativo per le decisioni in molti settori di intervento. In altre parole: l'utilitarismo spesso è non solo un criterio di giudizio, ma diventa di fatto un criterio operativo. Questo passaggio sembra discutibile.

Non si può infatti escludere che l'approccio utilitaristico nei problemi di economia sanitaria possa generare discriminazioni e quindi, paradossalmente, contrasti con il principio dell'uguale considerazione degli interessi proposto dallo stesso utilitarismo. Per esempio è noto come la speranza di vita vari in funzione del reddito personale. I dati mostrano chiaramente che per fasce di reddito basso c'è una proporzionalità tra reddito e speranza di vita, per cui la speranza di vita aumenta fortemente con il crescere del reddito. Oltre una certa soglia di reddito la speranza di vita è invece abbastanza costante, ed aumenta solo debolmente con il crescere del reddito [43]. Ciò significa che le valutazioni circa la *willingness to pay* basate su quanto produce una persona potrebbero portare ad affermare che la spesa considerata accettabile per un intervento di prevenzione che statisticamente allunga di un anno la vita di una persona abbiente sia maggiore di quella considerata accettabile nei confronti di una persona di ceto inferiore. Questo è inaccettabile.

La monetizzazione che riduce la vita ad un bene materiale è fortemente criticabile. E' sinonimo di schiavitù e tirannia. Il male e il dolore non sono quantificabili e non sono neppure confrontabili tra individui diversi. Inoltre l'uomo non agisce solo in vista del piacere o dell'evitare il dolore, ma anche coerentemente con una verità cercata e scoperta.

Il compenso per un rischio futuro o per un danno subito è un concetto diverso, dai molti volti. Esso è utile ed accettato in diverso modo in varie civiltà: si pensi per esempio alle assicurazioni (pattuizioni), ai risarcimenti per eventi sia colposi che dolosi o al confronto tra strategie sanitarie.

Si noti tuttavia che l'analisi costi/benefici in realtà non si identifica completamente con l'utilitarismo, anche se entrambi derivano dall'economia. Conseguentemente non tutte le critiche mosse all'utilitarismo si possono muovere anche all'analisi costi/benefici. L'analisi costi/benefici è meno pretenziosa dell'utilitarismo, in quanto in genere non opera confronti interpersonali; inoltre essa non consiste in una decisione quanto in una procedura che porta ad una decisione.

La tendenza a far prevalere criteri economici caratterizza anche molte scelte di importanti organismi internazionali e sovranazionali, come la World Health Organization [44], l'International Commission on Radiation Protection (ICRP) [45-47], l'International Atomic Energy Agency (IAEA) [48], il Bureau International du Travail (BIT) [49].

L'incertezza scientifica

Nel caso di incertezza dei dati scientifici ritengo auspicabile l'adozione di politiche cautelative, secondo le quali si dovrebbero adottare politiche di protezione anche in assenza di dati certi e definitivi. Il problema è però fino a dove si debba spingere la protezione se non si è in grado di stabilire soglie, relazioni dose/risposta o qualunque correlazione precisa. Per rispondere a questo problema, piuttosto che pensare in termini di costi/benefici (criterio che, beninteso, non può essere ignorato o rifiutato *a priori*), sembra preferibile ragionare non solo in termini di rischi/benefici, ma anche facendo riferimento ad un criterio estremamente importante e che non viene invocato molto spesso: il criterio delle priorità [50]. Ciò permetterebbe in molte circostanze di individuare la possibilità più equilibrata.

Responsabilità sociali

Purtroppo in alcune situazioni, anche negli stati con democrazie più moderne ed avanzate, sembra di assistere ad un "trasferimento" delle responsabilità e dei danni, in modo da evitare rischi e godere soltanto dei benefici. Per esempio, è possibile che per utilizzare prodotti la cui lavorazione comporta rischi sanitari per i lavoratori si preferisca importare da altre nazioni i prodotti, riversando da un lato le responsabilità sugli amministratori di quelle nazioni (che non adottano adeguati provvedimenti per la tutela dei lavoratori) e dall'altro i danni sugli operai impiegati nella produzione. Chi rovistasse con un certo accanimento tra le leggi, si accorgerebbe che ciò non è molto raro e non è questione di altri tempi. Un esempio può essere chiarificatore in proposito. Un pretore della Toscana ha emesso una sentenza sorprendente. E' stato realizzato un elettrodotto che avrebbe dovuto alleggerire il carico su altri percorsi come "linea alternativa". Il pretore ha vietato l'uso dell'elettrodotto se non in casi di guasto sulle altre linee, in modo da "proteggere" la popolazione residente nelle vicinanze. Il risultato è che la corrente passa altrove e che altri sono esposti. Indipendentemente dal fatto che risiedere vicino ad un elettrodotto determini realmente un rischio aggiuntivo oppure no, è forse questa giustizia? Sembrerebbe che anche i pretori cadano nella sindrome NIMBY *(not in my backyard)*.

Indicazioni operative

I provvedimenti di protezione e prevenzione dovrebbero soddisfare alcuni requisiti minimi. In conclusione pare utile richiamarne alcuni tra quelli enunciati nei paragrafi precedenti:

- capacità di vigilanza sanitaria e scientifica;
- messa in opera di una valutazione sanitaria sistematica dei rischi;
- programmazione delle azioni necessarie per definire gli obiettivi, mobilitare le risorse, creare le condizioni di fattibilità;
- ricerca costante della riduzione del danno alla salute umana;
- distribuzione dei rischi in modo equo;
- stanziamento di adeguati fondi destinati alla prevenzione ed alla protezione;
- presenza di una funzione di mediazione sanitaria affinché i problemi siano oggetto di dibattito pubblico, i cittadini hanno bisogno di interlocutori qualificati cui possano rivolgersi;
- ricerca del bene comune promuovendo il bene di ciascuno, tutelando e valorizzando il singolo.

Ricevuto il 26 giugno 1999.
Accettato il 15 dicembre 1999.

BIBLIOGRAFIA

1. CAIRO, M.T. 1994. La prevenzione. In: *Persona e salute*. La Scuola, Brescia. p. 142-157.

2. BRIARD, F.H. 1997. Le respect de la vie dans la jurisprudence administrative. In: *Le respect de la vie en droit francais*. J.B. D'Onorio (Ed.). Téqui, Paris. p. 69-91.

3. MALAURIE, P. 1997. Le respect de la vie en droit civil. In: *Le respect de la vie en droit francais*. J.B. D'Onorio (Ed.). Téqui, Paris. p. 93-110.

4. DAB, W. 1997. Enjeux économiques: principe de précaution, risque acceptable et droit à l'information. In: *Science et décision en santé environnementale. Les enjeux de l'évaluation et de la gestion des risques*. Metz, 9-11 Décembre 1996. Société Française de Santé Publique, Vandoeuvre-lés-Nancy. p. 64-76.

5. SARACCI, R. 1997. The World Health Organisation needs to reconsider its definition of health. *Br. Med. J.* **314** (7091): 1409-1410.

6. CARRASCO DE PAULA, I. 1986. Il concetto di salute e la sua dimensione etica. In: *Etica e allocazione delle risorse in sanità*. E. Sgreccia & A.G. Spagnolo (Eds). Vita e pensiero, Milano. p. 81-89.

7. TOMATIS, L. 1995. Ethical aspects of prevention. *Scand. J. Work Environ. Health* **21**(4): 245-251.

8. PETRINI, C. 1999. L'incertezza nella valutazione rischi/benefici e nella prevenzione: aspetti di etica. *Biologi italiani* **29**(6): 16-21.

9. BONTEMS, P. & ROTILLON, G. 1998. Le principe de precaution. In: *Economie de l' environnement*. Editions de la Découverte, Paris. p. 106-112.

10. SAHL, J. & DOLAN, M. 1996. An evaluation of precaution-based approaches as EMF policy tools in community environments. *Environ. Health Persp.* **104**(9): 908-911.

11. COMBA, P. 1997. La problematica etica del rapporto salute-ambiente. *Ann. Ist. Super. Sanità* **33**(2): 279-284.

12. LEISS, W. & CHOCIOLKO, C. 1994. Acceptable risk. In: *Risk and responsibility.* McGill, Queen's University Press, Québec. p. 32-34.

13. LEISS, W. & CHOCIOLKO, C. 1994. The trouble with risk. In: *Risk and responsibility.* McGill, Queen's University Press, Québec. p. 3-29.

14. GUILLEMEOLES, J.P. 1994. Les yeux fermés. *Homo* **33**: 39-44.

15. STITOU, R. 1994. Le risque comme réplique de l'inconnu. *Homo* **33**: 31-37.

16. LEISS, W. & CHOCIOLKO, C. 1994. Risk perception. In: *Risk and responsibility.* McGill, Queen's University Press, Québec. p. 30-32.

17. LEONE, S. 1994. Costi/benefici. In: *Dizionario di bioetica.* S. Leone & S. Privitera (Eds). Centro Editoriale Dehoniano, Istituto Siciliano di Bioetica, Palermo. p. 208-212.

18. DRULHE, M. 1997. Comment misurer la santé? *Esprit* **229**: 56-62.

19. CHANEL, O. 1997. Enjeux économiques: l'analyse cout-bénéfice en matière de santé environnementale. In: *Science et décision en santé environnementale. Les enjeux de l' évaluation et de la gestion des risques*. Metz, 9-11 Décembre 1996. Société Française de Santé Publique, Vandoeuvre-lès-Nancy. p. 52-63.

20. LO CASCIO, M. & VIRDIS, R. 1991. La valutazione economica del danno all'ambiente. In: *Lo studio di impatto ambientale: elementi per un manuale*. M. Pazienti (Ed.). Franco Angeli, Milano. p. 409-424.

21. SHRADER-FRECHETTE, K. 1991. L'etica nella politica ambientale: azioni pubbliche e riforme populiste. In: *L' etica nelle politiche ambientali*. C. Poli & P. Timmermann (Eds). Gregoriana Libreria Editrice, Fondazione Lanza, Padova. p. 179-196.

22. MARINELLI, M. 1994. Educazione sanitaria. In: *Dizionario di bioetica*. S. Leone & S. Privitera (Eds). Centro Editoriale Dehoniano, Istituto Siciliano di Bioetica, Palermo. p. 322-324.

23. BEAUCHAMP, T.L. & CHILDRESS, J.F. 1978. *Principles of biomedical ethics.* Oxford University Press, New York. 546 p. (4. ed., 1994).

24. VIAFORA, C. 1994. Principi della bioetica. In: *Dizionario di bioetica*. S. Leone & S. Privitera (Eds). Centro Editoriale Dehoniano, Istituto Siciliano di Bioetica, Palermo. p. 739-744.

25. POSSENTI, V. 1996. Principio di giustizia e sistemi filosofici. In: *Etica e allocazione delle risorse in sanità*. E. Sgreccia & A.G. Spagnolo (Eds). Vita e Pensiero, Milano. p. 37-49.

26. BOMPIANI, A. 1996. L'economia sanitaria: criteri nell'allocazione delle risorse e problemi etici. In: *Etica e allocazione delle risorse in sanità*. E. Sgreccia & A.G. Spagnolo (Eds). Vita e Pensiero, Milano. p. 155-170.

27. MAFFETTONE, S. 1994. Etica pubblica. In: *Dizionario di bioetica*. S. Leone & S. Privitera (Eds). Centro Editoriale Dehoniano, Istituto Siciliano di Bioetica, Palermo. p. 356-361.

28. WITSCHEN, D. 1994. Giustizia. In: *Dizionario di bioetica*. S. Leone & S. Privitera (Eds). Centro Editoriale Dehoniano, Istituto Siciliano di Bioetica, Palermo. p. 434-439.

29. BONDOLFI, A. 1997. Il principio di giustizia in medicina. *Riv. Teologia Morale* **13**(1): 63-76.

30. BELARDINELLI, S. 1996. Il diritto alla tutela della salute come diritto fondamentale. In: *Etica e allocazione delle risorse in sanità*. E. Sgreccia & A.G. Spagnolo (Eds). Vita e Pensiero, Milano. p. 171-175.

31. SUSSER, M. 1993. Health as a human right: an epidemiologist's perspective on the public health. *Am. J. Public Health* **83**(3): 418-426.

32. LANGIANO, T. 1996. La programmazione e la distribuzione delle risorse sanitarie: aspetti relativi all'equità. In: *Etica e allocazione delle risorse in sanità*. E. Sgreccia & A.G. Spagnolo (Eds). Vita e Pensiero, Milano. p. 177-182.

33. PALAGI, P. 1997. Le risorse in campo sanitario. *Riv. Teologia Morale* **13**(1): 103-116.

34. PELT, J.M. 1989. Conflits et solidarités dans la nature et la societé. *Revue d' Éthique et Théologie Morale* **169**(Suppl.): 15-27.

35. MAFFETTONE, S. 1991. L'etica nelle politiche ambientali. In: *L' etica nelle politiche ambientali*. C. Poli & P. Timmeramnn (Eds). Gregoriana Libreria Editrice, Fondazione Lanza, Padova. p. 163-177.

36. BARTOLOMMEI, S. 1991. Le decisioni politiche in materia ambientale. In *L' etica nelle politiche ambientali*. C. Poli & P. Timmermann (Eds). Gregoriana Libreria Editrice, Fondazione Lanza, Padova. p. 237-244.

37. BENGTSSON, G. & MOBERG, L. 1993. What is a reasonable cost for prevention against radiation and other risks? *Health Phys.* **64**(6): 661-666.

38. ALLEMAND, H. 1991. Ethique et prévention. *Revue d' Éthique et Théologie Morale* **178**(Suppl.): 41-49.

39. PETRINI, C. 2000. Personne et prévention. *Les Cahiers Albert Le Grand* (in stampa).

40. SGRECCIA, E. 1994. Giustificazione epistemologica, fondazione del giudizio bioetico e metodologia della ricerca in bioetica. In: *Manuale di bioetica*. Vol. 1. Vita e Pensiero, Milano. p. 65-101.

41. FAILLA, L. 1989. Radiazioni ionizzanti: rischi/benefici o costi/benefici? *Medicina e Morale* **39**(3): 505-513.

42. PETRINI, C. 1999. Il criterio costi-benefici ed il concetto di qualità della vita nell'etica della radioprotezione. *Difesa Sociale* **78**(4): 9-37.

43. AIACH, P. 1997. La santé et ses inegalités. *Esprit* **229**: 63-71.

44. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1991. *Les buts de la santé pour tous. La politique de santé de l'Europe*. Organisation Mondiale de la Santé, Bureau Régional de l'Europe, Copenhague. 58 p.

45. INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION. 1977. Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 26. *Ann. ICRP* **1**(3): 1-53.

46. INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION. 1991. Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 60. *Ann. ICRP* **21**(1-3): 1-201.

47. PONTIFICIAE ACADEMIAE SCIENTIARUM. 1986. *Biological implications of optimization in radiation protection*. Libreria Editrice Vaticana, Roma. 32 p.

48. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. 1996. *Safety fundamentals. Radiation protection*. IARC, Vienna. 15 p.

49. BUREAU INTERNATIONAL DU TRAVAIL. 1989. Consensus sur la necessité du progrés social. *Travail* **25**: 12.

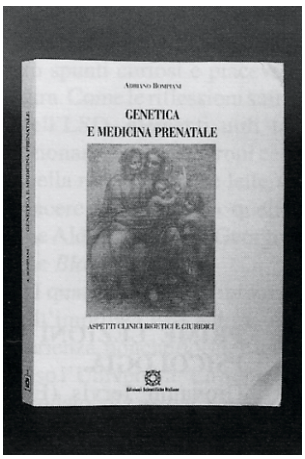
50. SGRECCIA, E. 1994. Bioetica e tecnologia. In: *Manuale di bioetica*. Vol. 1. Vita e Pensiero, Milano. p. 683-698.

51. BENGISSON, G. & MOBERG, L. 1999. What is reasonable cost for prevention against radiation and other risks? *Health Phys.* **64**(6): 661-666.

Ann. Ist. Super. Sanità, vol. 36, n. 1 (2000), pp. 131-133

recensioni, commenti e segnalazioni

A cura di
Federica Napolitani Cheyne



GENETICA E MEDICINA PRENATALE. ASPETTI CLINICI BIOETICI E GIURIDICI.
Adriano Bompiani.
Napoli: Edizioni Scientifiche Italiane, 1999.
ISBN 88-8114-806-4.
Lit 46 000.

Questa monografia affronta con rigore scientifico molti aspetti della medicina prenatale, rivolgendo particolare attenzione da una parte agli strumenti tecnico-diagnostici resi disponibili dai progressi della genetica e dall'altra a "spiegare al lettore quali sono i problemi bioetici e giuridici che si incontrano".

Il libro è pertanto suddiviso in tre parti: la prima inizia con un ampio settore dedicato agli elementi di base della biologia della cellula e del gene ed include l'assetto cromosomico normale, concetti generali su mitosi e meiosi, la descrizione delle anomalie cromosomiche numeriche (poliploidie, aneuploide, ecc.) e strutturali (deezioni terminali ed interstiziali, duplicazioni, inversione, ecc.) ed una analisi dei vari modelli di ereditarietà. Alla "consulenza genetica" viene dedicata molta attenzione: dalla definizione in senso lato alla consulenza riferita alla riproduzione umana, distinta in: a) consulenza preconcezionale; b) consulenza genetica in gravidanza; c) diagnosi genetica "preimplantatoria" e relativo *counselling* prima dell'eventuale "trasferimento *in utero* dell' embrione prodotto *in vitro*". Altri aspetti della consulenza genetica che vengono presi in considerazione riguardano: chi può effettuare la consulenza genetica (quali figure professionali), quali sono gli obiettivi che si pone, quali sono gli strumenti utilizzati per effettuarla, carattere "direttivo" o "non direttivo" dell'intero processo; inoltre, vengono discussi il "rischio di ricorrenza del disordine genetico", definito come un concetto di probabilità espresso da un numero compreso tra 0 (impossibilità) e 1 (certezza), e la percezione del rischio genetico che è molto diversa (a parità di informazione) fra un soggetto e l'altro e dipende da numerosi fattori, fra i quali ad es. le condizioni socio-economiche, il livello di acculturazione e la reattività emotiva. Vengono quindi trattati nel corso dei vari capitoli: a) il *counselling*, gli screening e i test genetici in corso di gravidanza; b) la diagnosi genetica "preimplantatoria"; c) la terapia genica fetale. Viene sottolineato il concetto che, mentre la diagnostica è rapidamente progredita, altrettanto non si possa dire della terapia dei difetti genetici e metabolici: e questo, secondo l'Autore, deve comportare valutazioni non solo di natura medica ma anche etiche.

La seconda parte raccoglie l'esperienza ventennale ed i risultati conseguiti dall'attività di diagnostica prenatale presso un ospedale di ispirazione cattolica come il Policlinico A. Gemelli di Roma (Facoltà di Medicina dell'Università Cattolica del Sacro Cuore).

Nella terza parte, si analizzano gli aspetti sociali, organizzativi e "politici" del rapporto che si è istituito fra medicina prenatale, diagnosi prenatale e preimplantatoria, diritto ed etica. Questa parte contiene una esauriente rassegna dei dati sulla incidenza delle malformazioni congenite ed aborti spontanei in Italia ed una disamina della situazione organizzativa e normativa della diagnosi prenatale nei diversi paesi europei, Italia compresa. Vengono esaminati i documenti di commissioni nazionali ed internazionali sui test genetici e la diagnosi prenatale. Il libro si chiude con un glossario per facilitare la comprensione del testo a chi non proviene da una cultura biomedica.

Domenica Taruscio
Istituto Superiore di Sanità, Roma

DIZIONARIO BIOGRAFICO DEGLI SCIENZIATI E DEI TECNICI.
Giorgio Dragoni, Silvio Bergia e Giovanni Gottardi (Eds).
Bologna: Zanichelli, 1999. 1599 p.
ISBN 88-08-08852-9. Lit 98 000.

Dall'architetto H.A.H. Aalto al matematico A. Zygmund: il testo è un'opera con lo scopo dichiarato di fornire biografie personali e scientifiche di scienziati e tecnici di tutti i paesi, di tutti i tempi e di tutte le discipline. Queste ultime spaziano effettivamente dalla matematica alle scienze della natura

recensioni, commenti e segnalazioni

(astronomia, fisica, chimica, scienze naturali e biologiche), dalla medicina alla psicologia e all'antropologia. Sono state inoltre incluse le scienze sociali ed economiche e l'architettura. Particolare attenzione è stata dedicata ai "tecnici" e tecnologi (dai costruttori di strumenti scientifici agli inventori, agli ingegneri e agli informatici). Si è utilmente tentato di includere anche quei personaggi che hanno promosso in generale lo sviluppo scientifico, in qualità di mecenati o di organizzatori scientifici (fondatori di strutture di ricerca, riviste scientifiche, scuole disciplinari, ecc.). Sono poi menzionati gli esploratori geografici, quelli che in alcuni casi hanno permesso la trasmissione e l'acquisizione di nuove scoperte, nonché gli artisti (Leonardo ne è forse l'esponente più illustre). E' dunque evidente la commistione tra biografie di artisti e scienziati. L'opera include anche filosofi, la cui attività era in passato imprescindibile dalla matematica e dalle scienze della natura e che in epoche più recenti si dimostrano sempre più interessati e attenti al mondo scientifico. In effetti la vastità degli intenti e al contempo la necessità di contenere le dimensioni dell'opera entro limiti editorialmente accettabili ha comportato una trattazione essenziale dei diversi protagonisti, a volte fin troppo esigua (esemplare può essere in questo senso il caso di Luigi Cavalli-Sforza).

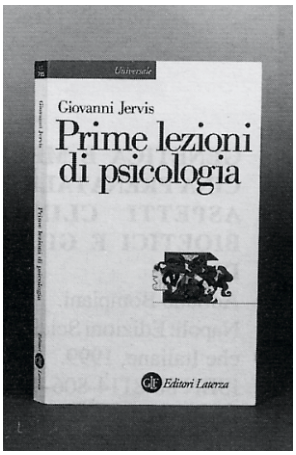
Sembra dovuta agli stessi motivi di spazio l'esclusione, che per alcuni versi non può mancare di sorprenderci, di personaggi quali Francesco Pocchiari o Domenico Marotta (sebbene elementi biografici di quest'ultimo vengano estesamente ripresi all'interno dell'ampia voce dedicata a Daniel Bovet), nonostante il fatto che l'opera si autoaccusi di una certa tendenza eurocentrica (e di un palese italocentrismo, forse inevitabile in un lavoro rivolto primariamente ad un pubblico italiano). In compenso sono stati dedicati spazio e attenzione a studiosi viventi, anche giovani, distintisi nel proprio campo di ricerca, come il noto biofisico romano Giorgio Parisi.

Tra le voci elencate nel *Dizionario* che direttamente riguardano l'Istituto Superiore di Sanità, menzioniamo quella sul fisico Mario Ageno e quella sul premio Nobel per la medicina Ernst Boris Chain; anche se sono da segnalare alcune imprecisioni: M. Ageno non è mai diventato direttore dell'Istituto e il centro internazionale di ricerche sugli antibiotici fondato da Chain si prefiggeva essenzialmente di sintetizzare molecole dalle proprietà analoghe a quelle della penicillina. Non è dunque esatto scrivere che "il centro riuscì infine (1958) a isolare la molecola costituente il principio attivo della penicillina".

I molti rimandi interni sembrano intenzionali, appropriatamente organizzati in modo di permettere al lettore di formarsi un quadro del contesto in cui si è sviluppata una determinata scoperta e delle radici e ramificazioni che la riguardano. L'intenzione è intelligente e facilita una lettura "ipertestuale" dell'opera.

Il linguaggio adottato è spesso tecnico, rivolto a fruitori non del tutto estranei alla materia trattata. La scelta sembra adeguata per un'opera che vuole approfondire temi scientifici e tecnologici e che tenta di seguirne le fila fino ai nostri giorni. Utile per chi vuole ripercorrere velocemente i punti salienti dell'attività professionale dei maggiori esponenti di ciascun campo tecnico o scientifico. Per eventuali approfondimenti ci si potrà avvalere di alcuni dei titoli suggeriti nella estesa bibliografia, suddivisa in comode categorie, con una parte cospicua dedicata a siti Internet di interesse per la storia della scienza e la biografia di scienziati e inventori.

Enrico Alleva e Sara Capogrossi Colognesi
Istituto Superiore di Sanità, Roma



PRIME LEZIONI DI PSICOLOGIA.
Giovanni Jervis (Ed.).
Roma: Laterza, 1999.
ISBN 88-420-5858-0.
Lit 15 000.

Prime lezioni di psicologia esce tra i primi volumi della serie "Prime lezioni" della Laterza (sono in preparazione *Storia greca, Diritto, Stilistica, Urbanistica, Filosofia* e certamente saranno molto saporite le *Prime lezioni di antropologia* di Francesco Remotti). Nel recente dibattito che ha seguito la presentazione, presso la casa editrice stessa, Giuseppe Laterza spiega che l'intento di questa collana è certamente didattico: ovvero "di far lezione" (come i titoli promettono), ma in modo leggiadro e sintetico (il libro di Jervis, note incluse, ha il formato piacevole di un tascabile). Trasuda nel testo un talento poco conosciuto ai consueti lettori dei molti libri di Jervis, dal suo ultranoto *Manuale critico di psichiatria*, Feltrinelli 1975, ai riusciti *Fondamenti di psicologia dinamica: un'introduzione allo studio della vita quotidiana*, Feltrinelli 1993, *La psicoanalisi come esercizio critico*, Garzanti 1989 e *Presenza e identità*, Garzanti 1984. Quello di un autore che è uno psichiatra, ma anche un naturalista accorto e sistematico nell'osservazione di quanto lo circonda, una capacità che lui stesso attribuisce (senza averlo mai scritto) a quel bisnonno professore di geologia alla Regia Università, acceso di impegno anti-darwiniano, che fu fondatore del Museo Industriale di Torino.

E' forse per questo che Darwin e il darwinismo riempiono le pagine di questo libro, un testo che essenzialmente vuol fare il punto, anche per il lettore comune, di dove è arrivata la psicologia contemporanea. Jervis qui scrive (pag. 102) "Gli

studi darwiniani ci fanno riflettere sulla lunga storia che ci concerne." E di lì parte un'interessante analisi sulle analogie e differenze tra noi, uomini alle soglie del 2000, (e tra chi descrive gli stati psicopatologici che affliggono l'umanità) e l'uomo di Neandertal, quello di Cro-Magnon, i primi villaggi del Neolitico africano e quell'età del bronzo di cui restano i primi documenti scritti. Spunti darwiniani così copiosi da sembrare eccessivi, almeno a quanto nota nel corso della presentazione romana il filosofo Nino Dazzi, preside di Psicologia a Roma.

Le lezioni proposte nel libro sono quattro: "Cos'è la psicologia", "La nascita della psicologia moderna", "Fare molto con poco" e "La fabbrica dei talenti". Non mancano nel testo spunti curiosi e piacevoli che ne rendono scorrevole la lettura. Come le riflessioni sull'analisi degli effetti della cocaina e dell'LSD, elementi utili tanto a capire i meccanismi di funzionamento dei neuroni cerebrali umani, quanto a ritornare a quella ricerca - anche letteraria - della "ricetta chimica" per il piacere autostimolato: quello di cui ci hanno parlato scrittori come Aldous Huxley o George Orwell e pellicole futurologiche come *Blade runner*.

I quattro saggi del libro risentono fortemente - e utilmente - dell'impronta dell'autore, medico e psicoterapeuta di larga esperienza, nonché docente universitario di psicologia dinamica presso l'Università "La Sapienza" di Roma, ma didatta tardivo, approdato alla cattedra in età avanzata rispetto alla media dei docenti. Lo stile di scrittura di Jervis risente di questa "doppia corsia", quella del discorso terapeutico intimo, ricco di estemporanee esemplificazioni, e quella delle lezioni cattedratiche in aula. Un misto che ne addolcisce la prosa, senza far perdere molto alla serietà dello scritto.

E' dunque una psicologia scientifica, quasi orgogliosa di esserlo, che Jervis propone ai lettori, forse imbolsiti da letture limitate: filosofiche, sociologiche, di quella psicologia del senso comune che è argomento attuale e dibattuto e che è stato spunto importante nel corso della succitata presentazione del volume. Ne risulta una sorta di sintetica rifondazione di fine millennio di una psicologia la cui storia si basa anche su principi darwiniani, e certamente sulla medicina praticata. Con spunti originali e interessanti che vanno dalla critica (molti la troveranno eccessiva) alle teorie mentalistiche dell'ultimo decennio, alla bio-robotica di Valentino Braitenberg, alle tecniche di pacificazione negli scimpanzé di Franz De Waal, alla neurofisiologia saggia di Lamberto Maffei, alle recenti sintesi storiche sulla psicologia e psicoanalisi di Luciano Mecacci.

Un commento a parte meritano infine le note del libro. Che sono molte, scelte con accuratezza e senza preconcetti culturali né tantomeno ideologici. Note che resteranno certamente un utile complemento, sorta di futura piccola biblioteca, per chi - lette queste *Prime lezioni* - vorrà approfondire le proprie conoscenze di base e addentrarsi nel labirinto composito delle offerte editoriali in tema di psicologia, evoluzione del cervello o analisi delle emozioni o degli stati mentali.

Il prestigioso inserto culturale del *Sole 24 Ore* ha recentemente pubblicato una recensione di questo libro, a firma del noto storico della scienza Gilberto Corbellini. Quest'ultimo, probabilmente spingendosi anche oltre gli intenti dello stesso autore, attacca violentemente quella "psicoanalisi europea" responsabile di aver innalzato "assurdi e pregiudiziali steccati filosofici nei confronti di qualsiasi modello biologico della malattia mentale, nonché dei trattamenti farmacologici finalmente efficaci e relativamente sicuri che dagli anni Cinquanta diventano disponibili". Molti sono gli psicologi (tra i quali il filosofo Nino Dazzi e lo stesso medico Jervis) che oggi in Italia percepiscono una crisi della propria materia di studio e insegnamento e tentano un dialogo con discipline diverse, non ultima la biologia. Non tutti però concluderebbero un articolo con la presentazione di un ricercatore quale il noto neurobiologo molecolare newyorkese Eric Kandel, convinto che la psicoterapia, come procedimento di apprendimento, sia in grado di modulare l'espressione genica e produrre cambiamenti strutturali delle interconnessioni neurali. "L'incremento della risoluzione del *brain-imaging* dovrebbe di fatto consentire una valutazione quantitativa dell'esito della psicoterapia" sostiene il neurobiologo statunitense, attaccato anche in patria per queste posizioni all'avanguardia. Non stupisce quindi che in Italia l'articolo di Corbellini abbia suscitato accese reazioni e alimentato le controversie sul tema psicoanalisi.

La lettura di questo agile volumetto sarà utile spunto di riflessione per studiosi, operatori del SSN (soprattutto psicologi clinici, psicanalisti e psicoterapeuti); anche se essenzialmente appare un libro di consultazione personale, potrebbe essere testo da raccomandare per l'acquisto di una biblioteca specialistica, a connotazione clinica.

Enrico Alleva e Sara Capogrossi Colognesi
Istituto Superiore di Sanità, Roma

Ann. Ist. Super. Sanità, vol. 36, n. 1 (2000), pp. 135-137

pubblicazioni dell'OMS

A cura di
Anna Maria Rossi

Young people and substance use: a manual. Create, use and evaluate educational materials and activities.
Geneva: World Health Organization, M. Monteiro (Ed.), 1999, 161 p. WHO/HSC/SAB/99.3
In inglese e portoghese.
Sw.fr. 30./US $ 27.00
N. ordine 1930151

Il manuale raccoglie idee, materiali ed esperienze di attività svolte ad ampio raggio, utili per il coinvolgimento dei giovani nello sviluppo di programmi educativi aventi come obiettivo la prevenzione o la riduzione dell'uso delle sostanze d'abuso. Riccamente illustrato, il manuale risponde all'esigenza di disporre di una guida semplice, diretta e di facile utilizzo, che gli operatori sanitari possono utilizzare per produrre strumenti educativi, senza dover ricorrere ad una formazione più estesa e complicata. Sebbene gli esempi forniti e le raccomandazioni possano essere applicati ad un'ampia gamma di destinatari - riferendosi ad alcol, tabacco e sostanze psicoattive - una particolare attenzione è rivolta ai bisogni dei ragazzi di strada ed al problema diffuso dell'inalazione di solventi.

Dall'esperienza di studi sul campo in sette paesi, il manuale intende dimostrare che, pur con esigui finanziamenti e scarse apparecchiature, possono essere raggiunti grossi risultati. Il punto centrale che si vuol mettere in evidenza è che i messaggi informativi sulla salute non sono da soli sufficienti a far modificare atteggiamenti e comportamenti, e che i migliori risultati si ottengono quando i giovani stessi partecipano direttamente alla progettazione, utilizzazione, diffusione e valutazione del materiale educativo.

Il volume è suddiviso in dieci capitoli. Il primo introduce ai principi dell' "approccio qualificato" all'educazione sanitaria e ne delinea gli obiettivi. Lo sviluppo dei materiali educativi è presentato in maniera graduale, procedendo dalla definizione del "gruppo di riferimento" e dalla valutazione dei suoi bisogni attraverso la definizione di un gruppo di lavoro che si occupi della produzione, fino ad arrivare alle fasi di valutazione, miglioramento e diffusione del prodotto.

Il secondo capitolo descrive il processo creativo messo in atto dal gruppo di lavoro, consistente in una serie di domande, a risposta multipla, con l'intento di stimolare il pensiero e la fantasia. Per facilitare il lavoro di gruppo e creare un'atmosfera rilassata, è prevista una serie di esercizi e giochi, mentre sono forniti consigli per aiutare i giovani che vivono situazioni problematiche e possono avere difficoltà ad inserirsi nei processi di lavoro. I successivi capitoli forniscono indicazioni sulle procedure di base per iniziare un lavoro creativo e per progettare materiali ed attività di educazione sanitaria.

Su questo che potremmo definire uno sfondo generale, l'intento principale del manuale è quello di fornire consigli semplici e pratici su come sviluppare ed utilizzare una grande quantità di materiali, dai semplici opuscoli ai poster, attraverso giochi, "role play" e modificazioni a sfondo umoristico di annunci pubblicitari su fumo o alcol, teatro all'aperto, fumetti, cartoni animati e programmi radio o TV. Ogni tipo di materiale è presentato sulla base di un formato comune, che specifica: gruppo di riferimento, vantaggi e svantaggi del materiale, apparecchiature e altre risorse necessarie, istruzioni dettagliate per lo sviluppo, produzione e utilizzo. Nella parte finale sono fornite indicazioni relative alla verifica dei materiali e delle attività, alla sorveglianza, valutazione, diffusione e mobilizzazione delle risorse.

Health effects of interactions between tobacco use and exposure to other agents.
Geneva: World Health Organization, 1999, xx, 149 p. (*Environmental Health Criteria*; 211) ISBN 92 4 157211 6
In inglese; riassunti in francese e spagnolo.
Sw.fr. 36./US $ 32.40
N. ordine 1160211

Valuta i risultati di quasi 600 studi scientifici volti a determinare se i rischi per la salute derivanti dall'uso del tabacco possano aumentare in associazione all'esposizione a numerosi agenti chimici, biologici e fisici, comunemente presenti nei luoghi di lavoro. La rassegna prende in considerazione l'esposizione sia in condizioni ambientali generali sia in ambiente domestico, di particolare importanza nei paesi di recente industrializzazione. Sebbene siano considerate tutte le forme d'uso di tabacco, particolare attenzione è rivolta ai rischi derivanti dall'esposizione al fumo di sigaretta.

Il volume è diviso in quattro capitoli. Nel primo sono riassunte le attuali conoscenze sui rischi per la salute derivanti dall'uso del tabacco, a cui fanno seguito una breve rassegna sulla storia del tabacco e una dettagliata descrizione della chimica del tabacco lavorato e dei suoi numerosi composti tossici. Il capitolo contiene anche una rassegna di tutti gli effetti nocivi documentati, sia acuti che cronici, incluse la malattia polmonare cronica ostruttiva, la bronchite cronica, l'enfisema, la fibrosi polmonare, molte forme di tumori, e gli effetti sul sistema cardiovascolare.

Il secondo capitolo, che è anche il più esteso, valuta gli effetti documentati sulla salute causati dall'interazione tra fumo di tabacco e: asbesto, fibre non a base di asbesto, sette

sostanze chimiche inorganiche, cinque agenti chimici (compreso l'etanolo), quattro agenti fisici, e sette agenti biologici (inclusi due agenti infettivi assai diffusi). Altri argomenti presi in considerazione sono i seguenti: definizione del concetto di interazione e di come esso può essere valutato; gli effetti vettoriali (contaminazione delle sigarette da parte di agenti tossici nei luoghi di lavoro); rassegna di dati relativi alle possibili alterazioni da fumo di tabacco sul metabolismo di preparati farmacologici terapeutici e di altre sostanze chimiche.

Il terzo capitolo prende in considerazione gli effetti nocivi dovuti alla co-esposizione al fumo di tabacco e ad altri agenti per stabilire se essi generino effetti separati o possano invece esservi possibili interazioni. Questa valutazione si basa su studi condotti su: attività legate all'estrazione del carbone, minerali fibrosi, metalli, pesticidi, esposizione in industrie della gomma e del petrolio. Il rapporto fornisce prove documentate degli effetti nocivi sulla salute, inclusa l'insorgenza di tumori, provocati dal sinergismo tra fumo di tabacco ed esposizione ad asbesto, etanolo, silice e radiazioni. Sono anche fornite prove evidenti dei rischi sulla salute provocati dal fumo di tabacco in combinazione con attività legate all'estrazione del carbone, all'impiego di pesticidi e alle industrie della gomma e del petrolio. Inoltre, il fumo di tabacco può aumentare il rischio di bissinosi, provocata da esposizione alle polveri di cotone, e cancro nasale provocato dall'esposizione alle polveri del legno.

Sulla base di queste valutazioni, il capitolo finale del rapporto raccomanda di eliminare, con tutti i possibili mezzi, l'uso del tabacco, in particolare del fumo. Per evitare qualsiasi interazione con esposizioni occupazionali e per eliminare qualsiasi rischio derivante dall'esposizione ambientale al fumo di tabacco, il rapporto suggerisce, quale unico rimedio, l'assoluta proibizione del fumo nei luoghi di lavoro. Inoltre, poiché il fumo può provocare reazioni alterate o nocive a farmaci o ad altri trattamenti, un appropriato dosaggio del tabacco ed una sorveglianza clinica del paziente dovrebbero essere presi in considerazione dagli stessi medici curanti.

Guidelines for controlling and monitoring the tobacco epidemic.
Geneva: World Health Organization, 1998, x, 190 p. ISBN 92 4 154508 9
In inglese; francese in preparazione.
Sw.fr. 65./US $ 58.50
N. ordine 1150468

E' una guida pratica ed esperta per lo sviluppo di piani di azione nazionali per la riduzione dell'uso del tabacco e per la conseguente diminuzione delle molte patologie di cui esso è causa. Rivolto agli operatori della sanità pubblica coinvolti nella lotta al fumo, il volume utilizza l'esperienza di alcuni paesi e attraverso numerosi esempi pratici illustra le specifiche opzioni e strategie che si sono rivelate più efficaci. Le linee di azione consigliate prendono in considerazione gli inevitabili ostacoli che la lotta al tabacco è destinata ad incontrare: scarsità di fondi, necessità di ricevere supporto da altri settori, inevitabile opposizione da parte di chi ha forti interessi economici sul tabacco. Considerando tutte queste problematiche, il volume si sofferma principalmente sulla raccolta di dati, a livello nazionale, sull'uso del tabacco e sui suoi effetti sulla salute quale chiave per sviluppare politiche convincenti ed efficaci.

Il volume è suddiviso in due parti e organizzato in nove capitoli. La prima parte è dedicata alle azioni volte a controllare l'uso del tabacco; dopo aver esaminato e discusso la necessità di questo controllo, essa esamina con particolare attenzione l'adozione di misure per ridurre l'accettabilità sociale dell'uso del tabacco. Sono quindi presentati suggerimenti per lo sviluppo di piani nazionali d'azione; in particolare, sono illustrati gli elementi di un esauriente programma di controllo e sono descritte attività specifiche - dalle giornate dedicate alla lotta contro il fumo all'uso dei mezzi di informazione per diffondere provvedimenti legislativi e fiscali - volte a realizzare un mix ottimale di azioni, importanti dal punto di vista culturale e basate sull'efficacia dei costi. E' quindi preso in esame lo sviluppo dei piani nazionali d'azione: sono presentati principi e strategie per mettere in pratica il lavoro di programmazione, soprattutto nei casi in cui vi è una forte opposizione da parte di chi ha interessi economici sul tabacco.

La seconda parte offre una guida pratica per le procedure di raccolta dei dati e relativa analisi, che sono parte essenziale di qualsiasi programma completo e a lungo termine per il controllo dell'uso del tabacco. Un particolare risalto è dato alla raccolta e all'uso di quelle informazioni che sono facilmente ottenibili e allo stesso tempo rilevanti per la realizzazione di politiche nazionali. Sottolineando i molti vantaggi che possono scaturire da un confronto con dati a livello internazionale, questa parte del volume intende anche promuovere l'uso di misurazioni e linee d'azione standardizzate per la valutazione e la sorveglianza dell'uso e consumo di tabacco e dei suoi effetti sulla salute.

Programming for adolescent health and development. Report of a WHO/UNFPA/UNICEF study group on programming for adolescent health.
Geneva: World Health Organization, 1999, vi, 260 p. (*Technical Report Series*; 886) ISBN 92 4 120886 4
In inglese; francese e spagnolo in preparazione.
Sw.fr. 56./US $ 50.40
N. ordine 1100886

E' presentata una rassegna sugli interventi attualmente operativi per il miglioramento della salute e dello sviluppo degli adolescenti. Riflettendo il consenso raggiunto da un vasto gruppo di esperti, il rapporto intende elaborare una serie di strategie e principi che possono essere di supporto all'ideazione di programmi nazionali per la salvaguardia della salute degli adolescenti, con particolare riguardo ai paesi in via di sviluppo. Sulla base di queste premesse, sono descritti numerose esperienze e risultati di recenti ricerche al fine di stabilire quali interventi siano più efficaci per le esigenze di salute e di

sviluppo degli adolescenti. In tutto il rapporto è prestata particolare attenzione all'uso di approcci participativi, all'importanza di individuare i fattori che, nell'ambito sociale, possono proteggere gli adolescenti dai rischi o, al contrario, esporli ad essi, ed infine allo sviluppo di positive capacità sociali e alla prevenzione, in generale, dei problemi.

Il rapporto è suddiviso in dieci capitoli. Il primo descrive gli obiettivi della programmazione di interventi per la salute e lo sviluppo degli adolescenti nell'ambito dei problemi sanitari riscontrabili in questa fascia d'età. Questi ultimi hanno soprattutto origine dai comportamenti a rischio, quale un'attività sessuale non protetta e l'abuso di sostanze, tabacco incluso; loro conseguenza sono le malattie sessualmente trasmesse, le gravidanze indesiderate e le lesioni intenzionali e accidentali. Altri problemi sanitari riguardano: anemia, scarsa alimentazione, alta incidenza di tubercolosi, malaria, schistosomiasi, elminti intestinali nei paesi in via di sviluppo. Nel secondo capitolo sono elaborate nozioni guida, dalle quali risulta evidente che molti problemi sanitari hanno cause comuni, e sono presentate alcune premesse alla base del lavoro di programmazione: il riconoscimento dell'adolescenza quale periodo di opportunità così come di alta esposizione a rischi, e degli adolescenti come soggetti con diverso grado di vulnerabilità.

I capitoli centrali valutano cinque gruppi di interventi, considerati fondamentali per la salute e lo sviluppo degli adolescenti: creare un ambiente sicuro e di supporto, fornire informazioni, formare specifiche abilità, offrire servizi di *counselling* e rendere i servizi sanitari accessibili e attraenti. Sono descritti e illustrati specifici interventi attraverso esempi di paesi in via di sviluppo, con l'indicazione del loro effettivo successo. Un punto chiave è rappresentato dalla necessità di compiere interventi in diversi ambienti, quali la famiglia, la scuola, i centri sanitari, il luogo di lavoro, la strada, le comunità e le strutture residenziali; sono considerati i vantaggi e gli svantaggi relativi ad ogni ambiente e sono forniti suggerimenti su come selezionare gli ambienti più adatti ad ogni specifico intervento.

Gli ultimi capitoli descrivono come ottenere un coinvolgimento politico, come valutare sistematicamente le priorità programmatiche, come rafforzare o anche solo replicare programmi di comprovata riuscita ed, infine, sottolineano l'importanza del controllo e della valutazione. Il volume si conclude con l'indicazione di suggerimenti pratici, tra i quali raccomandazioni per un'azione concertata a livello nazionale e internazionale.

WHO expert committee on drug dependence. Thirtieth report.
Geneva: World Health Organization, 1998, vi, 50 p.
(*Technical Report Series*; 873) ISBN 92 4 120873 2
In inglese; francese e spagnolo in preparazione.
Sw.fr. 14./US $ 12.60
N. ordine 11008873

Rassegna critica degli attuali trattamenti per la cura dei disturbi causati dall'abuso di alcol, tabacco, oppiacei ed altre sostanze psicoattive. Il rapporto fa riferimento a importanti e recenti ricerche relative alla valutazione dell'efficacia di un'ampia gamma di trattamenti, inclusi quelli basati su alcuni nuovi preparati farmacologici, per i quali è stata dimostrata una solida base scientifica, Sono anche valutati criticamente i risultati di studi relativi ai trattamenti convenzionali. Attraverso una rassegna sullo stato dell'arte dei trattamenti relativi alla dipendenza da sostanze stupefacenti, il rapporto intende fornire un supporto ai responsabili dei piani d'azione nazionali affinché selezionino solo gli interventi di dimostrata efficacia ed impatto.

La prima parte, che è anche la più estesa, analizza gli obiettivi dei trattamenti e fornisce un ampio panorama delle strategie di intervento. Di particolare valore pratico è una rassegna di risultati scaturiti da alcune valutazioni sull'efficacia, anche dal punto di vista dei costi, di specifici trattamenti. Essi riguardano: l'uso di sostanze sostitutive della nicotina, il trattamento al metadone quale sostitutivo di sostanze oppiacee, gli interventi psicosociali, e l'utilizzo di strutture residenziali e di comunità terapeutiche di recupero. Il rapporto affronta anche le controverse questioni riguardanti la continuazione della somministrazione di eroina e di altre forme di oppiacei per la cura dei consumatori di tale sostanze.

Nelle parti successive sono presi in esame gli elementi necessari per realizzare un efficace sistema nazionale per la riduzione dei danni alla salute causati dall'uso di sostanze psicoattive. Gli argomenti considerati comprendono: la struttura dei servizi, la valutazione della necessità dei trattamenti, i fattori che influenzano l'accesso al trattamento e alla riabilitazione, e le particolari situazioni relative al trattamento e alla riabilitazione nelle carceri.