

ANALISI DEL DNA

IL GENOMA UMANO

Il genoma di un individuo è l'insieme delle molecole responsabili delle sue caratteristiche genetiche. I genomi sono costituiti da DNA (*Acido Desossiribo Nucleico*), a sua volta formato dal susseguirsi, in un ordine apparentemente casuale, di quattro coppie di lettere (nucleotidi).

Il DNA è presente in pressoché tutte le cellule del nostro corpo e in uno stesso individuo ciascuna cellula, dalla pelle alla saliva, dal sangue al bulbo del capello, contiene lo stesso genoma costituito da 23 coppie di molecole di DNA, dette cromosomi, (*genoma diploide*).

Solo le cellule-uovo nella donna e gli spermatozoi nell'uomo contengono metà corredo cromosomico, ossia 23 cromosomi (*genoma aploide*). Infatti, al momento del concepimento lo spermatozoo, fondendosi con la cellula-uovo, ricompone nello zigote, cellula precursore del nuovo individuo, il patrimonio di 46 cromosomi.

Da ciò risulta evidente come ogni individuo riceva metà del proprio DNA, 23 cromosomi, dalla madre e metà, gli altri 23, dal padre biologico.

La sequenza delle coppie di nucleotidi del DNA, tuttavia, non è un'entità statica bensì è soggetta ad una varietà di cambiamenti ereditabili (*mutazioni*). In una popolazione alcuni cambiamenti possono affermarsi nel tempo fino a portare alla sostituzione completa di una determinata sequenza ancestrale (*evoluzione biologica*), oppure al mantenimento contemporaneo di più sequenze varianti (*polimorfismo genetico*), responsabili anche della variabilità fenotipica degli individui della stessa specie.

In generale la variabilità media della sequenza del DNA umano tra diversi individui è bassa, circa 0,8 nucleotidi ogni 1000. Tuttavia, considerando che il nostro genoma diploide è costituito da circa $6,4 \times 10^9$ coppie di nucleotidi, la variabilità attesa in ogni individuo risulta essere a carico di circa 50 milioni di basi. Questo valore è sufficiente per predire che nella popolazione umana possono esistere fino a 4^{50} milioni di sequenze genomiche diverse.

È quindi facilmente prevedibile che, a parte i gemelli monozioti, non esistano nella popolazione umana due persone con genomi completamente identici. Essendo il tasso di mutazione relativamente

basso, la variazione delle sequenze si verifica raramente in seguito a nuove mutazioni e quindi in un individuo la maggioranza delle differenze è di origine ereditaria. Dal momento che ognuno di noi ha 2 copie di ogni cromosoma, una ereditata dal padre e l'altra dalla madre, ha anche due copie (*alleli*) di ogni particolare sequenza, sia essa un gene che codifica per una data proteina, una sequenza regolativa o una delle tante sequenze ancora prive di una funzione certa.

Tutte queste caratteristiche fanno dei genomi gli strumenti ideali per distinguere tra individui diversi della specie umana e per investigare le possibili relazioni di parentela. Le sequenze di DNA più indagate a questo scopo sono i cosiddetti STR (*Short Tandem Repeats*). Queste sono sequenze tra 2 e 7 paia di nucleotidi che si ripetono una dietro l'altra per un numero di volte variabile tra gli individui.

I diversi alleli si designano secondo il numero di ripetizioni di cui sono composti.

L'analisi del DNA si basa normalmente sull'analisi di un certo numero di sequenze STR degli individui partecipanti alla prova seguita, nel caso di uno studio di

relazioni di parentela, dal confronto dei risultati ottenuti relativi ai soggetti partecipanti.

L'analisi si porta a termine mediante la combinazione delle tecniche di PCR fluorescente ed elettroforesi capillare in un sequenziatore di DNA. Il risultato si ottiene in forma di grafica dove si mostrano gli alleli corrispondenti ad ognuna delle sequenze analizzate. All'analisi fa seguito uno studio statistico che ne rafforza la validità.

CAMPIONI BIOLOGICI

La prova di DNA può realizzarsi a partire da qualsiasi campione biologico che contenga cellule. Così, sono validi campioni di sangue di diversa provenienza, tamponi buccali, peli, cellule seminifere, etc; tutti hanno la stessa affidabilità perché tutti contengono lo stesso materiale genetico.

ANALISI DI PATERNITÀ

La Prova del DNA per l'attribuzione di Paternità biologica si realizza a partire da campioni biologici del padre presunto, del figlio o figlia e della madre (quest'ultima non indispensabile). Dai campioni si isola il DNA di ogni persona e mediante la tecnica della PCR si amplificano 16 sequenze STR. Il risultato, analizzato mediante un sequenziatore capillare, è caratteristico di ogni persona e costituisce la sua *impronta genetica*. Tuttavia, le combinazioni alleliche presenti in ciascun individuo derivano dalle diverse combinazioni dei singoli cromosomi materni e paterni rispettivamente nella cellula uovo e nello spermatozoo.

Affinché il supposto padre possa essere identificato come "padre biologico" del figlio/a investigato, è necessario che un allele di ognuna delle 16 coppie analizzate coincida con un allele della stessa coppia analizzata nel DNA

del figlio/a, il quale deve avere evidentemente ereditato per ciascuna delle 16 sequenze STR, una copia all'elica dalla madre e una copia dal padre.

Alla fine il risultato si appoggia su uno studio statistico per ottenere il grado di certezza della prova. Infatti, ciascun allele di una determinata sequenza STR ha una certa frequenza nella popolazione e quindi nel calcolo di paternità bisogna tener conto di quanto sia maggiormente probabile che tutti gli alleli in comune tra figlio/a e padre presunto siano stati passati da quest'ultimo rispetto ad un individuo a caso preso nella popolazione.

Nel caso di compatibilità di tutti i marcatori, il calcolo statistico definisce la probabilità di paternità (la probabilità che l'individuo che si studia sia il padre biologico) e l'indice di Paternità (che esprime quante volte è più probabile che il supposto padre sia il padre biologico di fronte al fatto che lo sia un individuo qualsiasi della stessa popolazione).

La Probabilità di Paternità è espressa numericamente. Inoltre, per aiutare la comprensione del risultato, assieme al valore numerico della probabilità, s'incluse una frase che spiega il grado di certezza del risultato. Così, una probabilità di paternità superiore al 99,8% (valore accettato dalla giurisprudenza italiana) è associata con l'espressione di "paternità praticamente provata".

La probabilità di paternità che viene usualmente fornita supera (talvolta di molto) valori del 99,99%, rendendo praticamente certo il risultato di un test.

Al contrario della paternità, che ha comunque sempre un valore probabilistico, la non paternità del supposto padre può essere stabilita con una certezza del 100%. Per negare una paternità biologica almeno 3 alleli, delle 16 sequenze analizzate, non devono coincidere

tra il supposto padre e il/la figlio/a.

Infatti, l'incompatibilità tra un tratto del DNA del figlio e il corrispondente del presunto padre potrebbe derivare da un fenomeno di mutazione genetica, evento assai raro che è stato calcolato potersi verificare mediamente per i sistemi attualmente in uso, con la probabilità di 1 su 1000.

La possibilità che si verifichino due mutazioni nel DNA di una stessa coppia presunto padre-figlio è data dunque da $1/1.000 \times 1/1.000 = 1/1.000.000$. La probabilità che tre incompatibilità genetiche siano dovute a tre diverse mutazioni sarà quindi pari a $1/1.000.000.000$, evento estremamente improbabile.

Pertanto, il rilievo di 3 o più incompatibilità rende certa l'esclusione di paternità.

ANALISI DI MATERNITÀ

In caso di migrazioni o di fecondazioni medicalmente assistite può essere richiesto un test del DNA per comprovare la maternità. Per l'analisi di maternità valgono gli stessi principi già espressi per l'analisi di paternità. Ovviamente, in questo caso il campione non indispensabile è quello paterno.

STUDIO DEI GEMELLI

L'obiettivo di questa analisi è di determinare se due gemelli sono gemelli monozigoti o gemelli dizigoti. I gemelli monozigoti (gemelli veri) derivano dallo stesso ovulo, fecondato da un unico spermatozoo; hanno lo stesso sesso e condividono le stesse sequenze di DNA, per cui il loro profilo genetico è identico. Al contrario, i gemelli eterozigoti derivano da due ovuli fecondati da due spermatozoi distinti; non è necessario che siano dello stesso sesso e condividono solo una frazione delle sequenze di

DNA, allo stesso modo di ciò che accade tra due fratelli non gemelli; il loro profilo genetico non è quindi identico.

Lo studio dei gemelli (o prova di zigosità) si basa sull'analisi del materiale genetico di ognuno dei gemelli, attraverso la tecnica e i principi già esposti, a cui segue la comparazione dei risultati ottenuti. Se i gemelli condividono tutte le 16 coppie di alleli analizzate, si applica il calcolo statistico per determinare con quale probabilità essi sono monozigoti; se ne condividono solo alcuni alleli (mediamente il 50%) sono sicuramente dizigoti.

CASI PARTICOLARI

Nella maggioranza delle situazioni il test di paternità viene effettuato su tre soggetti: madre, figlio e presunto padre.

È tuttavia possibile eseguire positivamente accertamenti anche in assenza della madre, solo su padre e figlio; tecnicamente si procede nello stesso modo ma i risultati, pur essendo validi, raggiungono valori percentuali meno elevati. Analogamente è possibile eseguire test di maternità per determinare unicamente l'esistenza di rapporto di discendenza diretta tra la madre ed il bambino, in assenza del padre.

In altre situazioni è possibile che il presunto padre sia deceduto o, semplicemente, non disponibile. In questo caso le possibili strategie operative andranno valutate caso per caso, impiegando o i campioni biologici derivati dal numero maggiore possibile dei parenti certi disponibili o sottoponendo a test genetico materiale biologico prelevato allo scomparso, quando questi era ancora in vita (biopsie) o, come ultima soluzione, procedendo all'esumazione dei resti dello scomparso.

Si tratta in ogni caso di test complessi la cui fattibilità andrà valutata con estrema cautela.

TEST DI PATERNITÀ IN GRAVIDANZA

Tecnicamente il test genetico per l'accertamento della paternità in gravidanza non è dissimile da qualsiasi accertamento genetico-clinico di diagnosi prenatale, volto quindi al rilievo nel figlio di alterazioni genetiche potenzialmente causa di malattie attraverso il prelievo di villi coriali o di liquido amniotico.

È bene ricordare, tuttavia, che la non paternità non è motivo sufficiente all'interruzione della gravidanza secondo i termini concessi

dalla Legge 22 maggio 1978 n. 194.

VALUTAZIONE DEL CASO E COUNSELING

Qualora richiesto prima dell'esecuzione dei prelievi, è possibile un incontro durante il quale viene fornita spiegazione dettagliata dei principi di esecuzione del test e dei risultati ottenuti, oltre alla spiegazione di tutte le questioni mediche ed eventualmente giuridiche connesse con il test.

Prof.ssa Raffaella Meneveri
Università Milano Bicocca

CARIOTIPO

L'analisi citogenetica del cariotipo permette di studiare il patrimonio genetico di un individuo e di mettere in evidenza eventuali anomalie numeriche (monosomie, trisomie ecc..) o strutturali (delezioni, inversioni, inserzioni, traslocazioni ecc..) che possono essere alla base di specifici processi patologici. La tecnica consiste nel coltivare le cellule dell'individuo (es.: cellule derivate da un prelievo di sangue) e di bloccarle a livello di *metafase*, fase in cui durante la replicazione cellulare il materiale genetico si trova organizzato in cromosomi. I cromosomi vengono quindi colorati con sostanze specifiche che danno luogo al tipico bandeggio; dopodiché vengono fotografati ed analizzati. Il referto finale, oltre a comprendere l'anagrafica del soggetto, il tipo di campione biologico da cui sono state ricavate le cellule, il tipo di colorazione (Q, F, G ecc..), il numero della metafasi analizzate ed il numero di colture cellulari effettuate, deve riportare la descrizione dell'assetto cromosomico, che viene formulato secondo le indicazioni stabilite da ISCN (International Standing Committee human cytogenetic Nomenclature):

- numero dei cromosomi
- indicazione dei cromosomi sessuali
- eventuali anomalie, prima quelle a carico dei cromosomi sessuali poi quelle degli autosomi, utilizzando abbreviazioni standardizzate, es:

del = delezione

ins = inserzione

inv = inversione

t = traslocazione

+/- = prima del numero del cromosoma indicano l'acquisizione o la perdita di quel cromosoma

Esempi di cariotipo:

46, XX Cariotipo normale femminile

46, XY Cariotipo normale maschile

47, XXY Cariotipo associato alla sindrome di Klinefelter

46,XY, del (5p) Cariotipo maschile che presenta una delezione sul braccio corto del cromosoma 5

47,XX, + 21 Cariotipo femminile con un cromosoma 21 in soprannumero (Sindrome di Down)

46, XY, t (1;3) Cariotipo maschile che presenta una traslocazione tra cromosoma 1 e 3
Normalmente vengono indicate anche le zone di rottura e di attacco

46, XY, t (1;3) (p32; q12) Cariotipo maschile che presenta una traslocazione tra cromosoma 1 e 3, a livello della banda 32 del braccio corto del cromosoma 1 e a livello della banda 12 del braccio lungo del cromosoma 3.

Il materiale genetico, esempio di una traslocazione, può essere identificato mediante la tecnica FISH (Fluorescent In Situ Hybridization).

I FARMACI INTRAVITREALI PER LA MACULOPATIA ESSUDATIVA

Degenerazione Maculare Senile (DMS), miopia, diabete, trombosi venose retiniche, infiammazioni intraoculari hanno in comune la possibilità di determinare una maculopatia essudativa, con conseguente danno ai fotorecettori e forte calo visivo, fino alla perdita della visione centrale, la cosiddetta cecità legale.

La rilevanza sociale di questa patologia è palese se si considera che la sola DMS essudativa registra in Italia circa 14.000 nuovi casi all'anno. La rilevanza economica non è da sottovalutare, considerati i costi diretti e indiretti di questa malattia, che negli stadi finali può comportare perdita della produttività e della indipendenza, depressione, nell'anziano fratture ossee e precoce ricovero in lungodegenza.

È naturale quindi che la medicina negli ultimi anni si sia molto applicata nello sviluppare nuove cure: dai primi laser termici, utili solo in caso di lesione più periferica (extrafoveale), alla terapia fotodinamica con verteporfina, utilizzabile anche nei frequenti casi di coinvolgimento foveale.

Purtroppo però i risultati di questi trattamenti, pur lusinghieri nel caso della fotodinamica, erano ancora lontani dall'essere soddisfacenti, visto il gran numero di recidive; la ricerca si è orientata quindi su farmaci che agiscono alla radice della neovascolarizzazione, dell'edema e della infiammazione. Dopo una prima esperienza con l'uso di steroidi intravitreali, ci si è rivolti a terapie antiangiogenetiche derivate dagli antitumorali, in spe-

cie agli inibitori del VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor).

Una serie di fattori di rischio (età, miopia, diabete, occlusioni vascolari, malattie infiammatorie) può portare infatti ad uno squilibrio tra fattori inibitori e fattori stimolatori della crescita di cellule endoteliali. Tra i fattori stimolatori il VEGF è il più importante promotore dell'angiogenesi e dell'edema: induce le cellule endoteliali a lisare la membrana basale, a migrare ed a riprodursi. Vi è poi l'intervento della componente infiammatoria, con il richiamo di macrofagi, che stimolano a loro volta la secrezione di VEGF da parte dell'epitelio pigmentato retinico.

VEGF

Il VEGF ha quindi un ruolo di primo piano nella angiogenesi e nella permeabilità vascolare, oltre ad avere una funzione fisiologica in molti aspetti della vita animale: è essenziale per lo sviluppo embrionale, ha un ruolo nel ciclo riproduttivo femminile e nella riparazione delle ferite, favorisce il recupero dopo ischemia miocardica promuovendo lo sviluppo di nuovi vasi, è espresso anche nei tessuti cerebrali, renali e gastrointestinali.

Per quanto riguarda i tessuti oculari, quantità fisiologiche di VEGF sono indispensabili nell'occhio sano per mantenere il flusso ematico, ma alte quantità si ritrovano nella neovascolarizzazione patologica secondaria a DMS o miopia, nella retinopatia diabetica, nell'occlusione venosa retinica, nella retinopatia del prematuro,

nella neovascolarizzazione iridea o corneale.

In sintesi la retina danneggiata esprime, con la mediazione del VEGF, due importanti manifestazioni patologiche:

A) Neovascolarizzazione (nella maculopatia senile, miopica o di altra natura):

- 1) rilascio di VEGF ed altri fattori angiogenici
- 2) legame del fattore di crescita ai recettori delle cellule endoteliali
- 3) attivazione delle cellule endoteliali, proliferazione, migrazione e formazione di neovasi.

B) Edema (in: diabete, trombosi, infiammazioni ed altro)

- 1) rilascio di VEGF
- 2) aumento della permeabilità vascolare indotto da VEGF (50.000 volte più potente che nel rilascio di istamina)
- 3) alterazioni delle giunzioni strette
- 4) fenestrazione endoteliale mediata da leucociti.

FARMACI INTRAVITREALI

L'inibizione della componente infiammatoria, edematosa e neovascolare delle maculopatie è stata dapprima sperimentata con l'utilizzo intravitreale degli steroidi e poi con farmaci più specifici come gli inibitori del VEGF.

Tra i farmaci più utilizzati ci sono: il Triamcinolone Acetonide (es.: Kenacort), il Bevacizumab (Avastin), il Pegaptanib (Macugen) ed il Ranibizumab (Lucentis).

Triamcinolone Acetonide (Kenacort):

Ha buone capacità antiangiogenetiche e antifibroblastiche, con

meccanismo d'azione diretto sulle cellule endoteliali ed indiretto sull'inibizione della migrazione dei macrofagi, dei mastociti ed altre cellule infiammatorie che producono fattori angiogenici; interrompendo la cascata dell'acido arachidonico riduce la presenza di prostaglandine, responsabili della rottura della barriera ematoretinica interna e quindi dell'edema retinico. È stato ampiamente utilizzato come farmaco "off label" nell'edema maculare (diabetico, infiammatorio o di altra natura) e come trattamento complementare alla terapia fotodinamica nella neovascolarizzazione sottoretinica, ma i risultati dei vari studi scientifici condotti a riguardo sono contrastanti e le gravi complicanze che possono raramente manifestarsi associate alla iniezione intravitreale di questo farmaco (endoftealmite settica, glaucoma, cataratta) hanno indotto la casa produttrice del farmaco a segnalare nel foglio illustrativo la controindicazione per l'uso intraoculare; da allora l'utilizzo del Triamcinolone è pressoché cessato.

Pegaptanib (Macugen):

Peg/apta/nib: un aptamero pegilato che inibisce il VEGF. Un aptamero è un piccolo frammento di RNA sintetico con struttura altamente specifica per legarsi ad un'altra molecola, in questo caso al VEGF₁₆₅, l'isoforma di VEGF più implicata nella neovascolarizzazione sottoretinica; per aumentarne l'emivita l'aptamero è stato legato a un gruppo di polietilenglicole (peg). È fornito in siringa sterile monouso con ago da 27 gauge; la concentrazione del farmaco è di 0.3 mg/0.1 ml; l'emivita nel vitreo è di circa 15 giorni, pertanto la somministrazione va ripetuta ogni 5-6 settimane (negli studi

iniziali ogni 6 settimane per 1-2 anni, nella odierna pratica clinica fino alla stabilizzazione della patologia). Lo studio clinico principale che ha portato all'approvazione dell'utilizzo di Macugen è lo studio VISION (VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization); esso comprende due studi randomizzati, in doppio cieco, di confronto verso l'iniezione fittizia, in cui l'"end point" primario consisteva nel valutare la percentuale di pazienti con perdita di più di 15 lettere di acuità visiva rispetto al basale alla settimana 54: la percentuale di chi perdeva meno di 15 lettere di acuità era del 70% nel gruppo Macugen, del 55% nel gruppo placebo; dopo un anno i pazienti sono stati nuovamente randomizzati a continuare o sospendere il trattamento: chi ha proseguito ha avuto una minor perdita della visione (15.8% vs. 26.5%).

Bevacizumab (Avastin)

È un anticorpo monoclonale murino umanizzato anti VEGF, con elevata attività antiangiogenica ed antiedemigena, nato in terapia oncologica per contrastare lo sviluppo di neovascolarizzazioni patologiche nel carcinoma metastatizzato del colon-retto; gli effetti collaterali sono riferiti pressoché esclusivamente all'utilizzo sistemico: ipertensione arteriosa, proteinuria, tromboembolia arteriosa, ritardo della cicatrizzazione delle ferite, eventi emorragici, perforazioni gastrointestinali. L'utilizzo intraoculare prevede dosi bassissime e una distribuzione sistemica quasi insignificante. Inoltre la salute generale del paziente oculistico è migliore rispetto a quella del paziente trattato per patologia neoplastica, pertanto il rischio di queste complicanze nell'uso intraoculare è assolutamente basso.

Nelle esperienze cliniche finora riportate in letteratura l'Avastin si è dimostrato sicuro e molto efficace sulla neovascolarizzazione e sull'edema, ma l'utilizzo rimane fuori indicazione per l'assenza di studi clinici scientificamente rilevanti (manca un'ampia casistica con randomizzazione, placebo e "doppio cieco"). Nonostante ciò, probabilmente sulla base di motivazioni economiche, l'AIFA, Agenzia Italiana del Farmaco, ha recentemente inserito l'Avastin nell'elenco dei medicinali erogabili dal Sistema Sanitario Nazionale.

Ranibizumab (Lucentis):

È un frammento anticorpale di piccole dimensioni (48kD il peso molecolare) derivato dal Bevacizumab; a differenza del Pegaptanib blocca tutte le forme di VEGF. È stato sviluppato perché inizialmente si pensava che il Bevacizumab per le sue dimensioni non potesse diffondere nella retina. In effetti il Ranibizumab ha una elevata biodisponibilità (60%) e si ritrova nella retina nell'arco di 6-24 ore, con una emivita di una settimana circa. Numerosi studi scientifici hanno dimostrato la sicurezza e l'efficacia di Lucentis:

- MARINA (Minimally classic/occult trial of the Anti-veg antibody Ranibizumab In the treatment of Neovascular Amd): 720 pazienti con AMD (Age-related Macular Degeneration, Degenerazione Maculare Senile) e CNV sottoposti ad una iniezione intraoculare di Lucentis o placebo al mese. Dopo un anno il 95% dei pazienti del gruppo Lucentis aveva un visus stabile o migliorato rispetto al 62% del gruppo che aveva eseguito la terapia fotodinamica. Il trattamento era in grado inoltre di aumentare l'acuità visiva iniziale

nel 25-34% dei pazienti; questo dato, riscontrabile solo negli studi riguardanti il Lucentis, rende questo farmaco il miglior trattamento disponibile allo stato attuale per la DMS.

- ANCHOR (**AN**ti-VEGF **Anti**body for the Treatment of **P**re-dominantly **C**lassic **CHOR**oidal **N**eovascularization in AMD): è ovviamente randomizzato ed in doppio cieco, comprende 423 pazienti con degenerazione maculare senile e neovascolarizzazione prevalentemente classica paragonati a pazienti trattati con fotodinamica (PDT). I risultati sono simili a quelli del gruppo MARINA: 95% dei pazienti trattati con Lucentis migliorano o rimangono stabili, rispetto al 64% di quelli sottoposti a PDT; inoltre il visus migliorava per più di 15 lettere nel 40% del gruppo Lucentis e solo del 5,6% degli occhi trattati con PDT.
- PIER (**P**hase **I**IIb **M**ulticenter, **R**andomized, **D**ouble-**M**asked, **S**ham **I**njection-**C**ontrolled **S**tudy of the **E**fficacy and **S**afety of **R**anibizumab in Subjects with **S**ubfoveal **C**horoidal **N**eovascularization with or without **C**lassic **C**NV **S**econdary to **A**ge **R**elated **M**acular **D**egeneration): 184 pazienti randomizzati all'iniezione mensile di Lucentis per tre mesi e poi ogni tre mesi o al placebo con iniezione fittizia. Anche in questo studio il gruppo Lucentis 0.5 mg dopo un anno è rimasto stabile (perdita media di 1.6 lettere contro 16.3 del gruppo di controllo), con un miglior risultato per il protocollo di somministrazione mensile.
- FOCUS (**R**hu**F**ab **V**2 **O**cular **T**reatment **C**ombining the **U**se

of Visudyne to evaluate **S**afety): 162 pazienti per valutare l'associazione di Lucentis e PDT; ad un anno il 90.5% dei pazienti trattati con la terapia combinata era almeno stabile, rispetto al 68% del gruppo con sola PDT. Il 23,8% del primo gruppo guadagnava inoltre fino a 3/10 rispetto al 5.4% del gruppo trattato solo con PDT.

- SAILOR: 5.000 pazienti per valutare la sicurezza; i risultati sono attesi per la fine del 2007. Nel frattempo si è segnalata, nel gruppo a maggior dosaggio, una percentuale di ictus cerebrali superiore al gruppo di controllo, anche se complessivamente il rischio di malattie tromboemboliche arteriose resta inferiore al 4%, non diversamente dal gruppo di controllo. Va ricordato infatti che il paziente con maculopatia senile è ovviamente più predisposto a malattie circolatorie. Si raccomanda quindi una accurata selezione del paziente e del dosaggio del farmaco in base all'anamnesi.
- Numerosi altri studi sono in via di conclusione sul protocollo ideale di somministrazione e sull'eventuale vantaggio costituito da una terapia combinata PDT-Lucentis (Studio Excite, Sustain, Mont Blanc, Summit, Denaly, Protect). Stanno infine per essere rivelati i risultati dello studio PRONTO, in cui un protocollo di somministrazione a regime variabile secondo i risultati degli esami strumentali (OCT che valuta lo spessore retinico e la presenza di fluido) sembrerebbe portare a risultati di poco inferiori a quelli della somministrazione mensile, con un numero di iniezioni pressoché dimezzato. A due anni i pazienti non

peggiorati erano il 78% e il 43% migliorava di 3/10.

TECNICA DI INIEZIONE INTRAVITREALE

L'iniezione intraoculare deve avvenire in ambiente sterile, cioè solo e solamente in una sala operatoria, per evitare la complicità più temibile: l'endofthalmitis settica; i rari casi di endofthalmitis descritti all'inizio di queste terapie erano infatti più frequenti con l'utilizzo ambulatoriale.

Il seguente protocollo è quello utilizzato nella sala operatoria del CAM di Monza:

Premedicazione con antibiotico locale nei giorni precedenti l'iniezione; istillazione di collirio anestetico, midriatico e iodopovidone; ingresso del paziente in sala operatoria con indumenti e calzature monouso; il chirurgo con indumenti e guanti sterili prepara il farmaco, disinfetta la cute perioculare del paziente, applica un telo normalmente utilizzato per la chirurgia della cataratta ed un blefarostato sterile; vengono nuovamente istillati anestetico e iodopovidone nel sacco congiuntivale, marcata la distanza di 3.5 mm dal limbus sclerocorneale con un compasso sterile o con una siringa da insulina senza ago; si procede quindi alla iniezione intraoculare, alla ulteriore disinfezione con iodopovidone, alla medicazione antibiotica locale e al bendaggio; al paziente viene ovviamente prescritta una terapia con collirio antibiotico (solitamente un chinolonico) per una settimana.

Il controllo deve avvenire il giorno successivo, verificando anche la pressione intraoculare, che potrebbe teoricamente subire un rialzo, anche se il volume di farmaco iniettato (0.050.1 ml) è

generalmente insufficiente a determinare un significativo ipertono.

CONCLUSIONI

Studi scientifici hanno dimostrato l'efficacia e la sicurezza dei farmaci antiangiogenici intravitreali, che oggi offrono una possibilità terapeutica ad una patologia considerata fino a poco tempo fa

IL TRATTAMENTO DELLE PATOLOGIE ORTOPEDICHE CON ONDE D'URTO EXTRACORPOREE FOCALIZZATE

Numerosi studi hanno da tempo evidenziato l'utilità delle onde d'urto extracorporee nel trattamento di patologie ortopediche che coinvolgano i tessuti molli periarticolari (borsiti, tendiniti, tendinosi, calcificazioni periarticolari) e il tessuto osseo (pseudoartrosi, ritardi di consolidazione, necrosi). In letteratura, esistono diversi protocolli adottati in funzione della sede trattata e sull'eventuale ripetizione del trattamento stesso in relazione ai risultati raggiunti.

La nostra esperienza riguarda i trattamenti effettuati con un generatore di onde d'urto di tipo elettromagnetico (Epos Ultra – Dornier Med Tech) che permette di utilizzare energie comprese tra 0,06 e 0,54 mJ / mm² e che è dotato di ecografo integrato. Tale apparecchiatura consente di effettuare una terapia focalizzata e mirata in continuo della patologia che si vuole aggredire.

Per quanto riguarda i trattamenti dei tessuti molli, in particolare le tendinopatie inserzionali, sottoponiamo i pazienti a un ciclo

pressoché incurabile, migliorandone decisamente la prognosi. Punto dolente è ancora purtroppo il prezzo di questi farmaci che, pur approvati nel nostro ordinamento sanitario, non vengono ovunque concessi, proprio per l'alto costo.

Dr. Pietro Airaghi

Specialista CAM

di E.S.W.T. di tre sedute a cadenza settimanale.

Il protocollo utilizzato varia a seconda del distretto anatomico trattato e il puntamento effettuato con l'ausilio dell'ecografo con sonda lineare permette una corretta centratura sulla zona da trattare.

A distanza di 4 settimane dalla fine del primo ciclo di trattamento i pazienti vengono rivalutati dallo specialista curante e a giudizio di quest'ultimo eventualmente indirizzati verso protocolli di trattamento riabilitativo.

Dopo un ciclo di onde d'urto extracorporee focalizzate circa il 70% dei pazienti presentano un miglioramento della situazione clinica, sia per quanto riguarda la componente soggettiva, sia per quel che riguarda il punteggio oggettivo ottenuto con le opportune scale di valutazione.

In particolare, abbiamo riscontrato una significativa riduzione della V.A.S. ed un importante incremento del punteggio della scala di Constant per quanto attiene alla

tendinopatia della cuffia dei rotatori. I risultati ottenuti per la tendinopatia calcifica della cuffia dei rotatori evidenziano pure come un trattamento ad onde d'urto extracorporee di tre sedute settimanali è sufficiente per ridurre significativamente il dolore riferito dal paziente e migliorarne l'articolazione su tutti i piani (flessione, abduzione e rotazioni).

Anche le epicondiliti e le tendinopatie del tendine rotuleo e achilleano mostrano di rispondere in maniera analoga al trattamento con onde d'urto. In particolare, assistiamo ad una riduzione della flogosi locale con una riduzione dell'edema e del dolore.

Un caso a parte riveste il trattamento del tessuto osseo, in particolare delle fratture, dove è necessario innalzare i livelli di energia a dosi tali da poter avere un effetto di stimolo sul callo osseo; il trattamento risulta più doloroso per il paziente di quanto non sia quello per il tessuto tendineo e spesso è necessario utilizzare l'anestesia mentre, per il corretto posizionamento del litotritore sul sito di trattamento, non è sufficiente l'ecografia, ma è necessario utilizzare anche l'amplificatore di brillantezza.

Il trattamento con onde d'urto rappresenta nelle mani dell'ortopedico uno strumento che, se usato in maniera corretta, consente di ridurre in maniera significativa la sintomatologia del paziente, l'impotenza funzionale dell'articolazione interessata e la disabilità e può consentire, in alcuni casi, di ritardare o scongiurare la necessità di un intervento chirurgico.

Dr. Antonello Caserta

Prof. Feliciano Di Domenico

Specialisti CAM

LE ONDE D'URTO NELLA PATOLOGIA DELL'APPARATO LOCOMOTORE

giovedì 21 febbraio 2008

ore 20:30

Polidiagnostico CAM • viale Brianza, 21 • Monza

Moderatore: **Prof. F. Di Domenico**

- **Medicina dello Sport e onde d'urto**
Dr. E. Giani
- **Principi fisici e applicazioni cliniche**
Dr. A. Caserta
- **Le tendinopatie inserzionali e le onde d'urto**
Dr. D. Tornese
- **Trattamento ad alta energia**
Dr. A. Caserta
- **Dibattito**

Ingresso libero. Per partecipare è necessario confermare la propria presenza alla Segreteria Organizzativa:
Sig.ra Cristina Grisanti tel. 039 2397.267 - fax 039 2397319 - e-mail: cristinagrisanti@cam-monza.com



Centro Analisi Monza S.p.A.

MONZA:

Laboratorio analisi mediche • via Missori, 9 • tel. 039 2397350
Polidiagnostico • viale Brianza 21, ang. via Bellini • tel. 039 2397.1
Sezione di ecologia • via Missori, 12 • tel. 039 2397247

altre sedi:

BRESSO: via XXV Aprile, 16 • tel. 026104946

BRUGHERIO: via Lombardia, 277 • tel. 039878183

BURAGO MOLGORA: p.za Matteotti, 18 • tel. 039878183

CAMBIAGO: via Dante, 20 • tel. 0295349294

CARUGATE: via C. Battisti, 32/a • tel. 0292157477

CERNUSCO S/NAVIGLIO: via Verdi, 36 • tel. 0292113069

CESANO MADERNO: via Garibaldi, 10 • tel. 0362540550

DESIO: via A. Grandi, 8 • tel. 0362623156

LISSONE: via San Carlo, 2/b • tel. 0392458166

MILANO: via Mecenate, 8 • tel. 025061873

S. MAURIZIO AL LAMBRO: via C. Battisti, 38/40 • tel. 0225410718

SEREGNO: p.za Risorgimento, 21 • tel. 0362234251

VILLASANTA: p.za Battista Erba, 12 • tel. 039302366

www.cam-monza.com