

Quaderni

della SIF

Periodico della Società Italiana di Farmacologia - fondata nel 1939 - ANNO VI n. 22 - Giugno 2010

Riconosciuto con D.M. del MURST del 02/01/1996 - Iscritta Prefettura di Milano n. 467 pag. 722 vol. 2°

Giugno

Flavia Franconi

Purtroppo alcuni giorni fa è deceduto il Prof. Tonini, membro del Consiglio Direttivo della Società Italiana di Farmacologia, ed in questo numero lo ricorda il Presidente della SIF non solo come farmacologo, ma anche come uomo e nel mio ricordo e nel ricordo del comitato di redazione la forza, e l'acutezza, l'onesta che Lui ci ha insegnato saranno un esempio da seguire.

Tornando alla vita di tutti i giorni e quindi al giornale dobbiamo notare che Il Prof. Pepeu ha compiuto un lavoro magistrale scrivendo il secondo capitolo della storia della farmacologia italiana che va dal dopo guerra al 1968 (il primo lo potete trovare a pag 16 del nu-

mero 18 del giugno 2009, se avete smarrito il vostro cartaceo ci potete accedere cliccando http://www.sifweb.org/quaderni/quaderni_main.php. L'articolo racconta in maniera egregia e viva un periodo entusiasmante della farmacologia italiana. Infatti, è proprio in quel ventennio che si è assistito alla sua internazionalizzazione ed alla nascita di molecole che hanno rivoluzionato la terapia. Si prosegue con un articolo del Dr. Giorgio Foresti, Presidente di Assogenerici nonché managing director di Ratiopharm, e che affronta un hot topic come quello dei biosimilari. Subito dopo si affronta la responsabilità sociale di impresa, questa volta la parola è stata data

alla Merck Sharpe & Dohme ed esattamente ai dottori Freddi, Nicastro e Rutigliano che evidenziano le iniziative intraprese ed i progetti futuri in questo specifico settore.

Poi i corticosteroidi, farmaci quasi antichi, ma tanto attuali che sono stati affrontati a tutto campo. Giuseppe Nocentini e Emira Ayroldi illustrano le luci e le ombre di questa grande classe di farmaci che viene ancora ampiamente utilizzata nonostante l'età. Dai corticosteroidi agli studi osservazionali affrontanti in maniera lodevole da Gian Piero Mazzaglia, uno dei maggiori esperti italiani se non europei in questo specifico settore. Nell'articolo vengono illustrate in maniera chiara le criticità e le potenzialità di questo tipo di studio. Infine, il Prof. Filippo Drago illustra l'attività ed i progetti del consorzio Unifarm. ■

Marcello

Accingendomi a scrivere in questa occasione avrei voluto farlo al di fuori di ogni schema, di ogni ufficio. Sì perché scrivere di Marcello Tonini per me è anche un fatto personale, un momento di quella amicizia vera e sincera come poteva nascere tra me e Marcello: una persona capace di rapporti profondi, capace di ragionare fuori da interessi parziali come è ormai difficile trovarne.

Scrivo invece come Presidente della SIF per ricordare brevemente che un nostro Consigliere ci ha da poco lasciato.

Marcello Tonini era stato eletto

con grande consenso nel Consiglio Direttivo della SIF in occasione delle votazioni per il rinnovo del Consiglio Direttivo al Congresso di Rimini.

Farmacologo esperto, una vera autorità nel campo della Farmacologia del Sistema Gastroenterico. Non era possibile concepire un meeting (anche a livello internazionale) che riguardasse, ad esempio, il controllo della motilità intestinale dove Marcello non fosse presente. Presente con la sua capacità ideativa, con la sua autorevolezza scientifica. Collega apprezzato anche da ricercatori

di altre discipline cliniche, la Gastroenterologia per prima. Collega capace di stabilire rapporti umani profondi, in modo selettivo sapeva intuire dove e con chi condividere la sua visione delle cose. Senza troppo apparire, per certi versi un po' schivo, sentiamo oggi il peso la sua assenza, la mancanza di una persona vera, seria, trasparente, coraggiosa.

Non so cosa altro dire in una breve nota se non rinnovare il dolore mio personale, del Consiglio Direttivo e dei colleghi tutti per aver perso Marcello.

Carlo Riccardi
Presidente Società Italiana
di Farmacologia

Farmaci biosimilari

Giorgio Foresti

Managing Director Ratiopharm Italia srl

Presidente Assogenerici

Premessa

Il farmaco biosimilare non è il “generico” del farmaco biotecnologico, poiché la complessità di formulazione e produzione di questi farmaci, ma soprattutto l'impiego di sistemi cellulari per la loro produzione, non consen-

cipi attivi biologici sono la loro caratterizzazione e controllo di qualità che richiedono non solo una serie di esami fisico-chimico-biologici, ma anche indicazioni sul processo di produzione. Dal punto di vista normativo, per la loro approvazione è richiesta una procedura di registrazione che

commercio oltre 200 medicinali prodotti con tecniche di ingegneria genetica, per un fatturato mondiale equivalente di circa 55 miliardi di dollari. I prodotti biotecnologici sono tra i farmaci più dispendiosi (spesa media/paziente intorno ai 10-20 mila euro), poiché sul costo finale incidono

Caratteristiche dei farmaci biosimilari

- prodotti biotecnologici ad alta tecnologia commercializzati solo dopo la scadenza del brevetto del farmaco di riferimento
- prodotti che richiedono un know-how approfondito
- prodotti che richiedono elevati investimenti in termini di tempo e di risorse economiche
- prodotti che richiedono studi clinici registrativi di fase I e III
- prodotti che possono essere autorizzati solo con procedura centralizzata EMEA
- prodotti con efficacia, sicurezza e qualità dimostrate alla pari di un qualsiasi farmaco biologico e brevetto

tono la “riproduzione” di una molecola identica. Anche i tempi di ricerca e sviluppo delle due classi di farmaci differiscono notevolmente. Peculiarità dei prin-

tiene conto del dossier del medicinale di riferimento, ma che include anche dati relativi a studi preclinici e clinici, capaci di dimostrare che il medicinale che si intende registrare possiede un profilo comparabile a quello del farmaco di riferimento per quanto riguarda qualità, sicurezza ed efficacia.

Il biosimilare è quindi un farmaco biotecnologico non coperto da brevetto la cui commercializzazione può avvenire solamente alla scadenza della copertura brevettuale (solitamente della durata di 20 anni) del prodotto di riferimento. I primi farmaci “biologici” sono entrati nel mercato circa 20 anni fa e, pertanto, nei prossimi anni si assisterà alla introduzione in commercio di un sempre crescente numero di questi “biologici non brevettabili”, che ovviamente renderanno possibile, a parità di efficacia terapeutica, un notevole risparmio alle casse dello stato.

Nel 2006 erano presenti in

il passaggio attraverso le linee di ricerca, gli studi clinici di verifica e i costi di produzione.

La scadenza del brevetto di molti prodotti biotecnologici offre nuove possibilità di sviluppo di prodotti biosimilari, a costo inferiore. Ciò permetterà di ridurre le spese del Sistema Sanitario Nazionale e potrebbe contribuire sia a rendere queste terapie innovative accessibili a un numero maggiore di pazienti, sia a liberare risorse in modo da permettere l'impiego più esteso e generalizzato dei farmaci biotecnologici.

I farmaci biosimilari: quale ruolo in uno scenario farmaceutico che cambia?

I farmaci biotecnologici si apprestano a superare, in termini di nuove registrazioni, i farmaci classici di sintesi chimica. Contemporaneamente, saranno sempre più numerosi i farmaci biologici di prima generazione a perdere la copertura brevettuale

Giugno (F. Franconi)	21
Marcello (C. Riccardi)	21
Farmaci biosimilari (G. Foresti)	22
La ricerca farmacologica italiana dal 1946 al 1968 (G. Pepeu)	26
La responsabilità d'impresa: imperativo morale od opportunità strategica? (G. Freddi, B. Nicastro, C. Rutigliano)	33
I glucocorticoidi nel 2010 (G. Nocentini, E. Ayroldi)	35
Gli studi osservazionali nella ricerca sui farmaci: prospettive e basi metodologiche (G. Mazzaglia)	42
Il futuro della ricerca in farmacologia clinica. L'esperienza del centro di ricerche del Consorzio Universitario Unifarm (F. Drago)	46

e, di conseguenza, sarà registrato un numero sempre maggiore di farmaci biosimilari.

Alla luce di ciò, considerando anche il fatto che l'aspettativa di vita media della popolazione mondiale si allunga e che i farmaci biologici possono rappresentare un'opzione di cura importante per malattie sino ad ora prive di trattamento, è facilmente ipotizzabile che si renderà sempre più necessaria un'attenta valutazione farmaco-economica.

I farmaci biologici, infatti, hanno un costo più elevato, rispetto ai farmaci di sintesi chimica. In questo contesto, quindi, i farmaci biosimilari potranno costituire una reale opportunità.

I biosimilari secondo l'EMA

L'EMA definisce il biosimilare come "A biosimilar product is a second or subsequent version of a biological medicine product already authorized in the EU which is systematically designed to have the same quality, efficacy, and safety characteristics as the original product (also known as the 'reference medicinal product')."

Sempre in documenti dell'EMA si dichiara... "possiamo essere certi che se un farmaco attraversa tutti i passaggi previsti dalla normativa e assicura tutti i requisiti di qualità, sicurezza ed

Il processo registrativo dei farmaci biosimilari

Dal 2001 al 2006: un lungo percorso legale e regolatorio

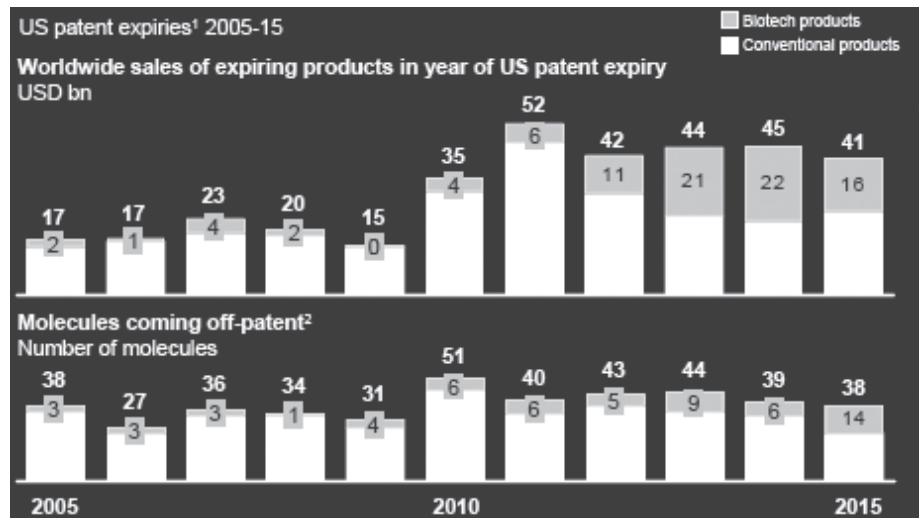
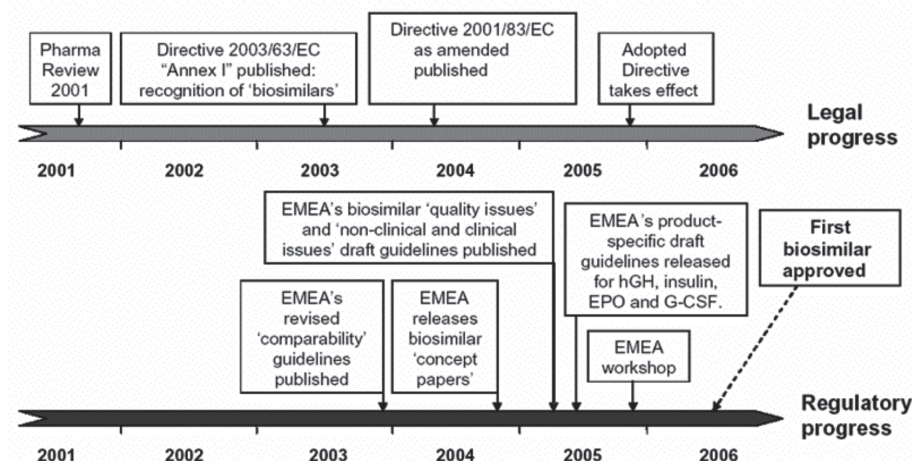


Figura 1 - La scadenza brevettuale dei farmaci biologici e dei farmaci classici nel decennio 2005-2010

efficacia arrivando ad ottenere una approvazione attraverso una decisione della Commissione UE (ndr. EMA), questo significa che questo prodotto è altrettanto sicuro ed efficace come tutti gli altri farmaci autorizzati dalla Commissione sul territorio dell'Unione." (N. Rossignol – EU Commission DG Enterprise & Industry 6th EGA symposium on biosimilar medicines 2008)

Certamente i biologici non brevettati sono scomodi e fanno molta paura alle aziende Big Pharma che temono giustamente una forte erosione alle loro quote di mercato, per cui stanno nascendo grandi resistenze e si stanno mobilitando ingenti capitali investiti nel mercato per erigere barriere protettive screditandone

artatamente, attraverso un uso sistematico delle società scientifiche, il loro valore in termini di qualità e sicurezza come evidenziato anche dalla figura 3.

Questa strategia sarà come sempre di breve periodo e provocherà solamente un dispendio di risorse ed energia mirato unicamente alla distruzione dell'opportunità intrinseca ai farmaci biosimilari, senza in nessun modo arricchire di contenuti e di sostenibilità il sistema farmaco.

Per la dimostrazione dell'efficacia, della sicurezza e della qualità dei biosimilari, l'EMA ha creato un sistema di linee guida vincolanti, a struttura gerarchica

La normativa europea relativa ai medicinali biosimilari ricalca la disciplina generale dei medicinali per quanto attiene alla dimostrazione di qualità, efficacia e sicurezza ai fini dell'autorizzazione all'immissione in commercio (AIC).

L'AIC è rilasciata sulla base della valutazione di un dossier tecnico, organizzato in cinque moduli, che comprende i dati relativi all'analisi della qualità del prodotto, ai risultati delle prove precliniche e delle sperimentazioni cliniche, oltre alle informazioni amministrative.

La linea guida di base defini-



Biosimilar EC Approvals

INN	Name	Company	Reference	CHMP opinion	EC Approval
Somatropin	Omnitrope	Sandoz	Genetropin (Pfizer)	Jan 2006	April 2006
Somatropin	Valtropin	Biopartners	Humatrope (Lilly)	Feb 2006	April 2006
Epoetin alfa	Binocrit	Sandoz	Eprex/Erypro (JnJ/Amgen)	June 2007	August 2007
Epoetin alfa	Epoetin alfa Hexal	Sandoz (Hexal)	Eprex/Erypro	June 2007	August 2007
Epoetin alfa	Abseamed	Medice	Eprex/Erypro	June 2007	August 2007
Epoetin zeta	Retacrit	Hospira	Eprex/Erypro	Oct 2007	Dec 2007
Epoetin zeta	Silapo	Stada	Eprex/Erypro	Oct 2007	Dec 2007
Filgrastim	TevaGrastim	Teva	Neupogen (Amgen)	Feb 2008	Sept 2008
Filgrastim	Ratiograstim	Ratiopharm	Neupogen	Feb 2008	Sept 2008
Filgrastim	Filgrastim ratiopharm	Ratiopharm	Neupogen	Feb 2008	Sept 2008
Filgrastim	Biograstim	CT Arzneimittel	Neupogen	Feb 2008	Sept 2008
Filgrastim	Filgrastim Hexal	Hexal	Neupogen	Nov 2008	Feb 2009
Filgrastim	Zarzio	Sandoz	Neupogen	Nov 2008	Feb 2009

Figura 2 - Biosimilari registrati

sce il concetto di biosimilare e stabilisce i requisiti generali per l'autorizzazione. Le condizioni vincolanti per la dimostrazione della qualità dei biosimilari sono definite in una seconda linea guida. Essa comprende criteri vincolanti relativi alla produzione dei biosimilari e ai metodi analitici impiegati per dimostrare le carat-

teristiche chimico-fisiche, l'attività biologica, il grado di purezza e le eventuali impurità. La terza linea guida EMA riguarda i necessari studi preclinici e clinici.

Gli studi preclinici prevedono, tra l'altro, studi sull'interazione del farmaco al proprio target, studi in modelli sperimentali animali, studi sugli effetti far-

macodinamici e studi tossicologici. Negli studi clinici devono essere dimostrati la distribuzione e il catabolismo del principio attivo nel sangue e in diversi tessuti, sempre in confronto con il prodotto di riferimento. Inoltre, deve essere dimostrato il rapporto tra dose e attività. Infine, oltre agli studi di fase I, devono essere condotti studi di fase III.

Questi vengono generalmente condotti come studi randomizzati, controllati con il prodotto di riferimento e necessitano di un gran numero di pazienti. A seconda dell'indicazione, il numero di pazienti può comportare anche diverse centinaia o migliaia di soggetti.

L'assenza di studi di fase II per l'approvazione è dovuta al fatto che questo tipo di studi mira ad individuare la dose di un nuovo farmaco, mentre in questo caso la dose deve essere identica a quella del farmaco originatore. Oltre alle linee guida generali, esistono linee guida specifiche per singoli prodotti. Finora sono state create linee guida per G-

Denigration of Biosimilar Products Highlighted by the Mutualité Française

'In the context of its sector inquiry, the French Mutuality asks the European Commission to mention the denigration campaigns put in place by originator companies with the aim of maintaining an aura of suspicion around biosimilars. Indeed originator companies spread alarmist and often worrisome news regarding the difficulty of reproducing biotechnology derived products'.

(Public submission sector inquiry-EMA internal translation)

Figura 3 - Parte della richiesta alla European Commission da parte della French Mutuality

CSF ricombinante (filgrastim), eritropoietina ricombinante, insulina ricombinante e ormone della crescita umano ricombinante (hGH). Da quanto detto, risulta chiaro che un farmaco biosimilare approvato è un farmaco ben studiato da un punto di vista di qualità, preclinico e clinico e che non presenta sostanziali differenze con il farmaco originatore.

Nonostante l'iter registrativo dei farmaci biosimilari sia assolutamente complesso, esiste una percezione a volte distorta da parte della comunità medica e scientifica.

Da un punto di vista farmacologico, le procedure regolatorie imposte da EMA appaiono sufficienti a garantire la salute dei pazienti e permettere agli stessi di avere diritto al miglior trattamento possibile (obiettivo principale dell'EMA).

Sviluppo e produzione

Lo sviluppo e la produzione dei farmaci biosimilari sono notevolmente dispendiosi, in termini di tempo e denaro, e richiedono conoscenze specifiche di alta tecnologia. I costi totali di sviluppo degli agenti biosimilari possono ammontare fino a 100 milioni di Euro. La durata di tutta la procedura è compresa tra i sei e i nove anni.

Immunogenicità

Mentre i farmaci di sintesi chimica sono raramente immunogenici, i prodotti biologici possono essere riconosciuti come non-self dall'organismo del paziente e quindi essere neutralizzati nel loro effetto. L'immunogenicità può essere clinicamente insignificante, ma può anche portare a conseguenze gravissime (come l'anemia aplastica per l'eritropoietina), e le caratteristiche del prodotto che influenzano questa proprietà sono per lo più mal comprese. L'immunogenicità è

una proprietà di tutti i prodotti biologici e può interessare anche solo singoli lotti di farmaco; è importante osservare che questo problema non è ristretto ai biosimilari, ma si è già manifestato con i prodotti originatori già in commercio.

I farmaci biotecnologici sono molecole biologiche e la loro produzione richiede l'utilizzo di sistemi cellulari, procarioti o eucarioti.

Il principio fondamentale sul quale si basa la loro produzione è quello dell'universalità del codice genetico: questi farmaci sono di natura proteica e la sequenza di DNA che li codifica può essere tradotta nella stessa sequenza di aminoacidi – cioè nella medesima proteina – in qualsiasi cellula, indipendentemente dall'organismo di origine. Pertanto il DNA umano di interesse viene introdotto in cellule facilmente coltivabili (per esempio cellule batteriche, di lievito o di mammifero), le cosiddette cellule "ricombinanti", che si moltiplicano e producono la proteina umana desiderata, che viene successivamente isolata e purificata.

La produzione di cellule ricombinanti avviene secondo uno schema preciso. Innanzitutto, il gene della proteina desiderata, isolato dal DNA umano, viene introdotto – mediante tecniche diverse – nelle cellule in cui avverrà il processo di sintesi. Le cellule modificate geneticamente sono rese identificabili mediante l'utilizzo di "marcatori", che ne permettono l'isolamento e la crescita selettiva.

In tal modo si ottengono colture cellulari pure, geneticamente identiche, nelle quali ogni singola cellula produce la proteina desiderata. La quantità di proteina prodotta nelle diverse colture cellulari pure viene misurata e confrontata e dalla coltura cellulare con la resa ottimale viene creata la cosiddetta "banca cellulare master" che può essere congelata e conservata. A partire

dalla banca cellulare master vengono prodotte "banche cellulari working" dalle quali possono essere prelevate e nuovamente coltivate le cellule di interesse, utilizzabili per la produzione su larga scala in bioreattori (fermentazione). Il prodotto finale del processo di fermentazione è la proteina desiderata.

La scelta delle cellule più adatte per la produzione è di importanza fondamentale, non solo per la quantità di proteina che esse sono in grado di produrre, ma anche per le modificazioni post-traduzionali che sono in grado di effettuare sulla proteina stessa.

Le proteine, infatti, dopo essere state sintetizzate ("tradotte"), vanno incontro a diverse modificazioni biochimiche ("post-traduzionali") tra le quali la glicosilazione, che comporta l'aggiunta alla proteina di residui di zuccheri.

La glicosilazione, in particolare, è una modificazione post-traduzionale che modifica le proprietà fisico-chimiche della proteina, rendendola più solubile, aumentandone la vita media e modificandone il profilo immunogenico. Le diverse specie hanno differenti capacità di glicosilare le proteine che producono e, quindi, la scelta delle cellule in cui viene introdotto il DNA di interesse è fondamentale perché può modificare la struttura della proteina matura e, quindi, l'efficacia del biofarmaco che si vuole ottenere.

Dopo che le cellule sono state cresciute, la proteina viene isolata dal brodo di coltura mediante centrifugazione e filtrazione e purificata tramite cromatografia.

La purificazione avviene in tre fasi: purificazione primaria, purificazione avanzata e purificazione finale. Il risultato della procedura di purificazione è un farmaco stabile, conservabile, privo di impurità residue. Nella fase successiva viene prodotta la forma galenica del farmaco finito. ■

La ricerca farmacologica italiana dal 1946 al 1968

Giancarlo Pepeu

Dipartimento di Farmacologia Preclinica e Clinica, Università di Firenze

L'interesse suscitato dal mio articolo su "La Ricerca Farmacologica Italiana negli anni 1930–1940" (Pepeu, 2009) e le affettuose sollecitazioni del Prof. Carlo Riccardi e della Prof.ssa Flavia Franconi mi hanno spinto a scrivere un secondo articolo dedicato allo sviluppo della farmacologia italiana dal 1946, anno del primo Congresso della SIF dopo la fine della Seconda Guerra Mondiale, tenuto a Firenze, al 1968, anno del 1st Joint Meeting of the Italian and British Pharmacological Societies anch'esso tenuto a Firenze. Il Joint Meeting obbligò ad usare la lingua inglese e impose la selezione delle comunicazioni da parte di un comitato di referees delle due Società. Per l'ancora "provinciale" SIF si trattò di una vera rivoluzione "culturale".

Presentare la ricerca farmacologica italiana degli anni dal 1946 al 1968 è più difficile che descrivere quella dal 1930–40 per diverse ragioni. Il periodo di tempo è più lungo e copre anni che hanno visto la comparsa di uno straordinario numero di nuovi farmaci. Per citare alcuni esempi, negli anni 40 sono stati introdotti penicillina, streptomina e cortisone, negli anni 50 clorpromazina, imipramina, isoniazide e i contraccettivi orali, negli anni 60 propranololo, cimetidina e benzodiazepine. Inoltre, iniziò l'espansione dell'università italiana con un aumento del numero di posti e dei fondi, ciò che permise a molti giovani di restare nell'Università e portò ad una forte crescita nel numero di pubblicazioni. Sono stato diretto testimone di buona par-

te di quel periodo poiché entrai come studente interno nell'Istituto di Farmacologia di Firenze nel 1952 e diventai professore straordinario a Cagliari nel 1968. Pertanto questo articolo è basato su ricerche bibliografiche, ma anche su ricordi personali e ha, inevitabilmente, un taglio soggettivo. Per documentarmi, ho consultato l'Archivio Italiano di Scienze Farmacologiche (Arch Ital Sci Farmacol), le principali riviste internazionali di farmacologia, PubMed, che riporta i lavori a partire dal 1950, sia pure senza abstracts nei primi anni e la Biblioteca del Dipartimento di Farmacologia di Firenze. Come nell'articolo precedente, per ragioni di spazio e per il carattere di Quaderni, ho limitato le citazioni a quelle dei lavori che, secondo me, meglio rappresentano lo sviluppo della ricerca farmacologica italiana nei primi 20 anni dopo la guerra e i suoi principali protagonisti. Mi scuso per le inevitabili omissioni, dovute a ragioni di spazio.

L'attività di ricerca nei piccoli Istituti Universitari di Farmacologia di quei tempi ricominciò immediatamente dopo la fine della guerra, anche perché le attrezzature necessarie erano semplici, spesso di fabbricazione artigianale e i costi limitati. Ciò è documentato dai convegni della SIF e dai lavori pubblicati sull'Arch Ital Sci Farmacol e sugli Archives Internationelles de Pharmacodynamie. L'Archivio Italiano riprese le pubblicazioni come II Serie, nel febbraio 1948, sotto la direzione di Mario Aiazzi Mancini (1897–1980). Nel Vol. I sono pubblicati i

"Resoconti" del II Convegno della SIF, tenutosi a Roma nell'Aprile 1942 e dei Convegni tenutisi negli anni 1946, 1947 e 1948.

Nell'Ottobre del 1946 i farmacologi italiani si riunirono a Firenze per il III Convegno della Società. Fra le 30 comunicazioni presentate, di cui non è stato pubblicato il testo, ne spiccano 2 di Vittorio Erspamer (1909–1999), "Sulle sostanze enteraminosimili negli invertebrati (Ascidie e Molluschi)" e su "Un nuovo derivato biogeno della colina: la murexina", che dimostrano la continuità della sua ricerca sulle sostanze estratte dai tessuti animali. Vi è inoltre una comunicazione di Giuseppe Moruzzi (1910–1986) sul "Meccanismo di azione degli ipnotici negli uccelli e il "sonno" del piccione decerebrato" in quella linea di ricerca che lo porterà pochi anni dopo alla scoperta del sistema "reticolare" (Moruzzi and Magoun, 1949). La penicillina, il cui uso si era diffuso dopo la fine della guerra, fu oggetto di un paio di comunicazioni. Il IV Convegno della SIF ebbe luogo a Roma un anno dopo nell'Ottobre del 1947 e sulle 32 comunicazioni 4 erano di Erspamer, una di esse è dedicata all'octopamina, allora appena scoperta. Il V Convegno si tenne a Padova nell'Ottobre del 1948. Fra gli autori delle 32 comunicazioni, i cui riassunti furono pubblicati su Arch Ital Sci Farmacol II Serie, vol 1, 1948, compaiono alcuni nomi che avranno un ruolo rilevante nei futuri sviluppi scientifici e accademici della farmacologia italiana: Daniele Bovet descrisse le "Relazioni quantita-

tive nell'antagonismo fra acetilcolina ed un curaro di sintesi", Leonardo Donatelli presentò tre comunicazioni fra le quali risalta quella sulla azione neurotossica della streptomina, di cui stavano emergendo in quegli anni sia la decisiva importanza per la cura della tubercolosi che l'ototossicità, Alberto Giotti e Franca Buffoni affrontarono il problema, allora controverso, della titolazione dei farmaci digitali mettendo a confronto i risultati ottenuti con un metodo colorimetrico e con due metodi biologici sulla rana e sugli atri isolati di cavia.

Nei volumi dell'Archivio degli anni 1949 e 1950 compaiono nuovi concetti farmacologici, nuovi farmaci e lavori di autori stranieri. Ad esempio, nel V° Convegno della SIF, Renato Santi (1948) presentò una relazione sulla clearance renale con lo scopo di diffondere le allora nuove conoscenze su filtrazione glomerulare, riassorbimento e secrezione tubulare dei farmaci, conoscenze che oggi fanno parte del bagaglio culturale di ogni studente. Aiazzi Mancini (1948) presentò le sue ricerche sulla Farmocaina, un anestetico locale di superficie sintetizzato dalla Farmitalia e Donatelli, riferì i suoi studi sugli antistaminici che saranno poi raccolti in una bella ed esauriente monografia intitolata "Gli antistaminici di sintesi", scritta purtroppo in italiano (Donatelli, Serafini, 1952). Può essere utile ricordare che il primo antistaminico (Antergan) fu messo in commercio dalla Rhone Poulenc nel 1942 e che per la prima volta un gruppo di farmaci fu definito in base al loro principale meccanismo di azione.

Cadute le limitazioni politiche che nel decennio precedente avevano ostacolato i rapporti con l'estero, l'Archivio Italiano fece un tentativo di diventare una rivista internazionale con la pubblicazione di alcune rassegne di autori stranieri. Domagk (1949),

premio Nobel nel 1939 per la scoperta dei sulfamidici, scrisse un articolo sulla chemioterapia della tubercolosi, Jacobsen (1950) sulla farmacologia dell'Antabuse il cui uso nel trattamento dell'alcolismo era appena iniziato, e Knoppers (1950) sulla terapia delle aritmie cardiache con chinidina. Questi tre lavori danno una chiara idea degli interessi e dei livelli della farmacologia internazionale in quegli anni. Anche negli anni successivi l'Archivio pubblicò lavori di autori stranieri ma ciò non bastò a trasformarlo in una rivista internazionale.

L'inserimento della farmacologia italiana nella farmacologia internazionale iniziò verso la metà degli anni '50 quando i primi giovani ricercatori italiani andarono a lavorare in laboratori stranieri grazie alle borse di studio Fulbright, del British Council, del CNR o pagati dalle università americane. Di essi alcuni rimasero per sempre negli Stati Uniti, altri ritornarono portando in Italia nuovi temi di ricerca e metodi, ma soprattutto un po' dello stile e dello spirito dei laboratori stranieri. Ciò incise poco nei meccanismi di gestione dell'Università Italiana, ma cambiò gradualmente i rapporti nei laboratori, migliorò la qualità della ricerca e creò una rete di rapporti internazionali. Fra i primi che andarono in America vi fu Alberto Giotti (1922–2004) che nel 1951 frequentò Columbia University dove collaborò ad una ricerca (Giotti, Maynert, 1951) sui meccanismi dell'eliminazione renale del barbital (Veronal). Giotti riportò in Italia un modo di insegnare più incisivo e documentato e il primo spettrofluorimetro dell'Istituto di Farmacologia di Firenze, ma non trapiantò le complesse tecniche per lo studio dell'eliminazione dei farmaci che allora era condotto solo sui cani. Erminio Costa (1924–2009) lasciò l'Italia nel 1954, dopo aver lavorato per alcuni anni nell'Istituto di

Farmacologia di Cagliari su argomenti i più diversi, come era abitudine allora e quasi un obbligo. Si riteneva che più argomenti un docente e ricercatore avesse affrontato più vasta fosse la sua cultura e capacità di insegnamento, dimenticando che ciò, purtroppo, andava a scapito della profondità della conoscenza. Costa non tornò in Italia, ma la sua influenza sulla ricerca farmacologica italiana fu rilevante in quanto per decenni ospitò e addestrò nel suo laboratorio decine di giovani farmacologi italiani, molti dei quali tornarono in Italia. Luciano Angelucci andò da J. H. Gaddum a Edinburgo nel 1955-56 e dimostrò, per primo (Angelucci, 1956), con l'impiego di dosaggi biologici, la liberazione dal midollo spinale di rana di acetilcolina e 5-idrossitriptamina, la cui presenza nel SNC era stata appena scoperta. Purtroppo, tornato in Italia non poté proseguire quella linea di ricerca, allora nuovissima. Io andai a Yale nel 1958 e iniziai a occuparmi del ruolo dell'acetilcolina cerebrale (Giarman, Pepeu, 1962). Al ritorno in Italia ebbi la possibilità di continuare quel tema di ricerca che diventò la mia principale linea di lavoro per tutta la vita. All'inizio degli anni 60 Franca Buffoni andò a Oxford da O. Blascko con il quale isolò e purificò l'istaminasi (Buffoni, 1966), Pierfrancesco Mannaioni andò a Yale (Mannaioni *et al*, 1968), Paolo Preziosi andò a Gand nello Heymans Institute dove si occupò della farmacologia della midollare surrenale (De Schaepdryver, Preziosi, 1959), Gianluigi Gessa andò allo NIH da Bernard Brodie (Gessa *et al*, 1962), Antonio Crema a Oxford da Edith Bulbring (Bulbring, Crema, 1958), Paolo Mantegazza a Londra da Eleanor Zaimis (Mantegazza *et al*, 1968). L'aver trascorso un soggiorno all'estero diventò un requisito per coloro che intendevano fare carriera accademica o trovare un posto dirigenziale nel-

l'industria farmaceutica. Si creò in questo modo una rete di rapporti internazionali che rese più facile per i giovani della generazione successiva essere accolti nei laboratori stranieri e modernizzò la ricerca in Italia.

Un contributo importante allo sviluppo della farmacologia italiana fu dato dalla presenza in Italia di due importanti ricercatori stranieri, Daniele Bovet (1907–1992) e Ernst Boris Chain (1906–1979), invitati all'Istituto Superiore di Sanità (ISS) dal prof. Domenico Marotta (1886–1974), che ne era allora il direttore, con lo scopo di portare aria nuova nell'ambiente italiano. Bovet rimase all'ISS dal 1947 al 1964, anni durante i quali proseguì le sue ricerche sugli antistaminici (Neoantergan), sui curari (succinilcolina), e sui farmaci del sistema vegetativo (Bovet, Bovet Nitti, 1949) che gli meritavano il premio Nobel per la medicina nel 1957. Lasciato l'ISS, disgustato dalle oscure e immotivate vicende giudiziarie che avevano travolto Marotta, diventò professore di Farmacologia a Sassari e tornò a Roma nel 1969 come Direttore dell'Istituto di Psicobiologia e Psichiatria del CNR. Verso la fine degli anni '50, Bovet spostò il suo interesse scientifico verso la psicofarmacologia ed il comportamento. Fu fra i primi a dimostrare differenze nell'apprendimento e nella risposta ai farmaci fra topi di ceppo diverso (Bovet *et al*, 1966) e pubblicò su *Science* un lavoro sulle basi genetiche dell'apprendimento e della memoria, un campo allora del tutto nuovo e oggetto di polemiche (Bovet *et al*, 1969).

All'ISS, intorno a Bovet e alla moglie Filomena Bovet Nitti, si formò un gruppo di ricercatori che contribuirono in maniera rilevante allo sviluppo della farmacologia italiana. Di essi ne ricordo alcuni con i quali ebbi rapporti di amicizia. Vincenzo Longo si dedicò allo studio degli effetti dei far-

maci sul tracciato elettroencefalografico nel coniglio (Longo 1966). L'elettroencefalografia era ancora una tecnica nuova e queste ricerche rappresentavano il versante farmacologico di quelle sull'elettroencefalografia della veglia e del sonno e delle malattie neuropsichiatriche condotte dai fisiologi e neurologi. Giorgio Bignami si dedicò allo studio dei farmaci sui comportamenti di evitamento (Bignami, 1964), contribuendo allo sviluppo dei metodi per lo studio dell'evitamento passivo e attivo nei roditori e alla conoscenza delle loro basi biologiche (Anisman, Bignami, 1978). Amilcare Carpi de Resmini fu un pioniere nelle ricerche sulla farmacologia della circolazione cerebrale, utilizzando nel cane complesse incannulazioni dei vasi cerebrali e artigianali strumenti di misurazione. Cito un suo studio sull'ergotamina nel quale veniva dimostrata la sua azione vasocostrittiva sui vasi cerebrali che veniva proposta come meccanismo dell'attività terapeutica nell'emicrania (Carpi, Virno, 1957). La preminenza acquisita nello studio della circolazione cerebrale gli fu riconosciuta con l'affidamento di coordinare il volume "Pharmacology of the cerebral circulation della International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics" nel quale fu autore o coautore di 6 capitoli (Carpi, 1972). Ma numerosi altri ricercatori, che mi scuso di tralasciare in questa breve rassegna, contribuirono a fare di quel periodo una delle stagioni più gloriose dell'ISS. Nello stesso periodo, Ernst Boris Chain (1906–1979), che aveva ottenuto il premio Nobel con Fleming e Floris nel 1945 per la scoperta della penicillina, diresse il Centro Internazionale di Chimica Microbiologica dell'ISS. La sua attività scientifica si rivolse a problemi di microbiologia e biochimica miranti allo sviluppo di nuovi antibiotici. Chain lasciò l'ISS nel 1963 e diventò profes-

sore di biochimica allo Imperial College a Londra.

Tutte le ricerche condotte all'ISS erano pubblicate su riviste internazionali e, preliminarmente, sui "Rendiconti dell'Istituto Superiore di Sanità". Dopo la guerra, i farmacologi italiani ricominciarono subito a pubblicare su *Arch Int Pharmacodyn* mantenendo per qualche anno l'abitudine di scrivere, inutilmente, in italiano. Presto però si rivolsero anche ad altri giornali fra i quali il *British Journal Pharmacology and Chemotherapy* nato nel 1947. Il primo lavoro fatto in Italia vi fu pubblicato nel 1951. Esso proveniva dai laboratori della Carlo Erba e descriveva "An improved apparatus for the study of the motility of isolated organs" (Bianchi *et al*, 1951) seguito da altri due lavori nel 1953, di cui il secondo di Ceriotti *et al* (1953) riguardava il metabolismo di un derivato dell'isoniazide. Dalla Carlo Erba uscì anche il primo lavoro italiano pubblicato, dopo la fine della guerra, su *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* su un nuovo ipnotico (Meli e Franceschini, 1953).

Carlo Erba, Farmitalia e Lepetit erano in quegli anni le principali industrie farmaceutiche italiane. Di dimensioni medie, con un buon mercato interno ed estero, esse avevano attivi laboratori di ricerca e rappresentavano uno degli aspetti più promettenti della ricerca farmacologica italiana. Non è questa la sede per analizzare le ragioni, in gran parte politiche, che portarono prima alla fusione di Carlo Erba con Farmitalia, poi alla cessione a multinazionali straniere e infine alla loro scomparsa, invece di creare un polo farmaceutico italiano, analogamente a quanto avveniva in quegli anni in Francia. La collaborazione di Erspamer con Farmitalia fu negli anni '50 e '60 un raro modello di interazione fra Università e Industria e produsse

importanti risultati fra i quali la dimostrazione che l'enteramina delle cellule enterocromaffini era la 5-idrossitriptamina (Erspamer e Asero, 1952). Negli anni 1963–64 ebbi l'opportunità di frequentare saltuariamente i laboratori della Farmitalia a Milano nell'ambito di una collaborazione con Paolo Mantegazzini. Studiavamo le correlazioni fra i livelli cerebrali di acetilcolina e le variazioni del tracciato elettroencefalografico (Pepeu, Mantegazzini, 1964) e ne dimostrammo la diminuzione durante attivazione elettrocorticale e l'aumento durante la sincronizzazione. Farmitalia dava spazio alla ricerca di base, accanto a ricerche di carattere industriale e la presenza di Erspamer, che in quel periodo aveva scoperto l'eledoisina e la fisalemina, i primi della lunga serie di peptidi da lui identificati (Erspamer *et al.*, 1966), aveva creato nei laboratori una stimolante atmosfera culturale. Nel 1968 i laboratori della Farmitalia brevettarono la doxorubicina, allora chiamata adriamicina, uno dei più importanti chemioterapici antitumorali (Arcamone F. *et al.*, US Patent 3,590,028), tuttora in uso. Delle molte industrie farmaceutiche allora operanti in Italia, mi limito a ricordare quelle i cui ricercatori pubblicavano su riviste internazionali di farmacologia: la Lepetit (Maffii, Soncin, 1958), la Recordati (Bianchi, 1956), l'Angelini da cui uscì il trazodone (Silvestrini *et al.*, 1968), l'unico psicofarmaco italiano prescritto in tutto il mondo, la Vister (Ercoli *et al.*, 1960). I laboratori di Recordati e di Angelini sono ancora attivi.

Un'importante spinta allo sviluppo della farmacologia italiana e al suo inserimento internazionale venne da Emilio Trabucchi (1905–1984), direttore dell'Istituto di Farmacologia dell'Università di Milano, grazie alla sua capacità di inserirsi in alcune organizzazioni internazionali che si andavano costituendo verso la fine degli

anni '50, facilitato anche dall'ambiente industriale ed economico di Milano. Nel 1957 egli organizzò a Milano un "Symposium on Psychotropic Drugs" durante il quale furono poste le basi per la nascita del CINP (Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum) il cui primo congresso fu tenuto a Roma nel 1958 (Ban, Hippus 1994). Ugualmente importante fu l'impegno di Trabucchi e dei suoi allievi nella nascita dello IUPHAR. Nel Second International Pharmacological Meeting, tenuto a Praga nel 1963, Trabucchi ed i suoi allievi Rodolfo Paoletti e Nicola Canal furono gli editors del volume "Biochemical and neurophysiological correlation of centrally acting drugs". Questi contatti internazionali aiutarono i giovani farmacologi milanesi a portare la loro ricerca scientifica a livelli internazionali. I progressi sono documentati dall'aumento del numero di pubblicazioni su riviste internazionali dalle quali emergono diverse linee di ricerca. Paoletti e Garattini si dedicarono allo studio del metabolismo del colesterolo e dei lipidi e dei farmaci che lo modificano (Garattini *et al.*, 1958; Garattini, Paoletti, 1963), argomento che diverrà il principale interesse di Paoletti. Paolo Mantegazza si dedicò alla farmacologia del sistema nervoso vegetativo (Mantegazza, Naimzada, 1967). Luciano Martini si orientò verso l'endocrinologia (Martini, Morpurgo, 1955) e negli anni '70 lasciò la farmacologia per diventare professore di endocrinologia all'Università di Milano. Silvio Garattini iniziò la sua carriera scientifica occupandosi di chemioterapia, di metabolismo dei lipidi e di neurofarmacologia (Garattini, Valzelli, 1955). Nel 1961, grazie ad un lascito di Mario Negri, gioielliere e filantropo milanese, fondò l'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri che negli anni successivi sarebbe diventato uno dei principali

centri della ricerca farmacologica in Italia. La produzione scientifica dell'Istituto fu abbondante e articolata fin dall'inizio. Mi limito a ricordare che nel 1965 l'Istituto Mario Negri ospitò il "Second Symposium on Catecholamines" nel quale l'unica relazione italiana fu tenuta da Garattini e Bizzi. In essa erano descritte ricerche sulla mobilitazione degli acidi grassi da parte di diversi farmaci adrenergici e non. Purtroppo, incomprensioni e rivalità con il mondo accademico fecero sì che per molti anni l'Istituto Mario Negri non partecipasse alla vita e ai congressi della SIF cui avrebbe potuto portare nuovo impulso.

Verso la fine degli anni '60 nelle pubblicazioni dell'Istituto di Farmacologia di Milano compaiono i nomi dei ricercatori che si affermeranno negli anni '70 e successivi. Fra di essi quelli di Ferruccio Berti, Remo Fumagalli, Marcella Motta, Francesco Clementi, Franco Frascini.

L'aumento del numero di pubblicazioni dei farmacologi italiani su riviste internazionali portò ad una graduale decadenza dell'Archivio sul quale i lavori continuavano ad essere scritti in italiano e a non essere sottoposti al controllo di referees. L'Archivio rimase la rivista dove era possibile pubblicare rapidamente, in vista dei concorsi universitari e dove venivano pubblicate le relazioni presentate ai congressi nazionali della SIF. Negli anni dopo la guerra era continuata la tradizione che i docenti che aspiravano alla cattedra venissero invitati a tenere una relazione al congresso della SIF nella quale esponevano le loro ricerche. Era una forma di investitura che permetteva di farsi conoscere da tutti i soci. Accanto alla relazione di un giovane ce ne era sempre una tenuta da un professore ordinario nella quale egli avrebbe dovuto documentare il suo impegno scientifico e aggiornare i soci su argomenti

di attualità. Leggere oggi queste relazioni, che spesso hanno il carattere di monografie, permette di apprezzare l'evoluzione della SIF con l'emergere di giovani di valore internazionale e di rendersi conto del livello, nel bene e nel male, dalla farmacologia italiana in quegli anni. Le due relazioni presentate al VII Congresso della SIF tenuto a Rapallo nel 1952 documentano l'allargarsi degli interessi dei Soci. La relazione di Benigno (1952), basata su una bibliografia di 406 voci, fu dedicata all'"Impiego degli isotopi in microbiologia e in chemioterapia". La seconda relazione di Borasi *et al* (1952) trattò la "Farmacologia sperimentale del cortisone". Essa si basava su 600 voci bibliografiche e includeva anche ricerche sperimentali dei relatori condotte nei laboratori della Farmitalia e della Clinica Medica di Milano. All'VIII Congresso tenuto a Roma nel 1954 furono tenute tre relazioni. Pietro Niccolini, ordinario a Pisa, illustrò lo "Stimolo olfattorio e la sua recezione", argomento di carattere più fisiologico e clinico che farmacologico al quale il relatore ha dedicato buona parte della sua attività di ricercatore, ma i cui risultati non hanno avuto diffusione. La seconda relazione fu di Pietro Mascherpa, ordinario a Pavia, "Su aspetti di farmacologia tessutale e cellulare". Della tecnica della "pressione frazionata" per studiare la distribuzione cellulare dei farmaci, di cui fu l'inventore e unico utilizzatore, ho già scritto nell'articolo precedente. Mario Filomeni, assistente a Roma, tenne la terza relazione, basata solo su ricerche bibliografiche, sul "Problema degli analettici respiratori", la cui utilità terapeutica cominciava ad essere messa in dubbio. Queste tre relazioni erano tipiche di un mondo provinciale, superato dalla ricerca internazionale e anche da quella che veniva fatta in alcuni Istituti italiani. La relazione tenuta da Giotti al IX

Congresso a Salsomaggiore nel 1956 su "Le basi fisiologiche della farmacologia sperimentale della diastole miocardica" rappresentò la transizione fra vecchio e nuovo. Scritta, purtroppo, in italiano, di 207 pagine con una bibliografia di 667 voci, era basata in larga parte sull'analisi critica delle ricerche personali, condotte in collaborazione con Franca Buffoni e Lorenzo Beani. Includeva anche i risultati di registrazioni intracellulari dalle fibre di Purkinje, tecnica introdotta da pochi anni in alcuni laboratori europei e americani e impiegata per la prima volta in Italia. Se la relazione fosse stata di una cinquantina di pagine scritte in inglese non avrebbe sfigurato su *Pharmacological Review*.

Non è possibile ricordare tutte le relazioni fatte nei Congressi della SIF di quelli anni, ne citerò solo altre due. La più imponente, tenuta da Paolo Preziosi, professore incaricato a Sassari, al XII Congresso a Pisa nel 1963, su la "Farmacologia della corteccia surrenale" di 435 pagine e 1515 voci bibliografiche. Più che una relazione, si trattava di un vero e proprio trattato che copriva ogni aspetto, allora noto, della fisiologia e farmacologia della surrenale e presentava anche le ricerche sull'argomento condotte dall'autore, a partire dal periodo da lui trascorso allo Heymans Institute a Gand. La relazione tenuta da Antonio Crema, assistente a Pavia, al XIII congresso della SIF, Palermo 1965, sulla "Farmacologia della via biliare extraepatica" di 27 pagine e 132 voci bibliografiche è forse quella più elegante. In essa sono presentate e discusse in maniera chiara e incisiva le ricerche dell'autore condotte in vivo, anche con la tecnica della circolazione extracorporea, e in vitro. Buona parte dei lavori dell'autore discussi nella relazione erano stati pubblicati su riviste internazionali e in essi appaiono i nomi di Gianmartino Benzi,

Franco Antonio Bertè e Gianmarco Frigo che diventeranno a loro volta professori ordinari in anni successivi.

Scorrendo i titoli delle relazioni tenute ai Congressi della SIF si nota l'assenza di argomenti di chemioterapia. Ciò dipendeva dal fatto che le relazioni di chemioterapia erano tenute ai congressi della Società Italiana di Chemioterapia fondata nel 1953 da Trabucchi, Bovet, Chain e altri. Essa fu la prima società nel mondo dedicata a questa disciplina. Malgrado ciò, le comunicazioni su argomenti di chemioterapia presentate ai congressi della SIF e i lavori di chemioterapia sull'Archivio Italiano furono sempre numerosi. Nell'Istituto di Farmacologia di Padova fu istituito un Centro di Studio per la Chemioterapia del CNR diretto da Egidio Meneghetti (1892-1961) nel quale i suoi allievi Pietro Benigno, Tito Berti, Lorenzo Cima studiarono il meccanismo di azione degli antibatterici, vedi per esempio Benigno, Berti (1953) e Berti, Trocca, (1964).

Nella seconda parte degli anni '60, sotto la spinta della competizione internazionale, i giovani cominciarono a polarizzare il loro interesse e a dedicarsi ad argomenti specifici evitando la dispersione su tanti argomenti che aveva caratterizzato i decenni precedenti. Esempi sono Gianluigi Gessa che si dedicò allo studio dei sistemi adrenergico e dopaminergico. Dei suoi molti lavori, pubblicati spesso su riviste italiane, né citerò uno sugli effetti del gammabutirrato sulla dopamina cerebrale (Gessa *et al*, 1968) nel quale compare anche il nome di Pierfrancesco Spano. Massimo Di Rosa e Ludovico Sorrentino si dedicarono allo studio dei meccanismi dell'infiammazione (Di Rosa, Sorrentino, 1968), studi che proseguirono con successo, soprattutto Di Rosa, nei decenni successivi. Beani si spostò dalla

cardiofarmacologia alla neurofarmacologia (Beani *et al*, 1964) con particolare riguardo al sistema colinergico, in competizione e collaborazione con l'autore di questo scritto. Mannaioni proseguì le ricerche sull'istamina cardiaca, iniziate con Giotti e Lucilla Zilletti (Giotti *et al*, 1966).

I volumi dell'Archivio uscivano con un ritardo di più di un anno rispetto alla data riportata sulla copertina e la rivista si estinse con il fascicolo Luglio-Ottobre 1965 finito di stampare il 15 Giugno 1967, come è scritto sul retro. Accanto a lavori di buon livello, l'Archivio Italiano ha spesso pubblicato lavori molto modesti che è bene dimenticare. Del resto, scagli la prima pietra chi fra i farmacologi della mia generazione non ha lavori da nascondere. Nel 1969 l'Archivio Italiano di Scienze Farmacologiche fu sostituito da Pharmacological Research Communications, poi diventato Pharmacological Research.

Nello stesso 1967 nel quale moriva l'Archivio, nasceva lo European Journal Pharmacology (Eur J Pharmacol). Fra gli editors vi era Garattini e Paoletti era membro dell'Editorial Board. I farmacologi italiani si affrettarono a pubblicarvi i loro lavori e negli indici degli anni 1967 e '68 troviamo i nomi di Crema con i suoi collaboratori, Garattini con diversi ricercatori del Mario Negri, Pepeu e Alessandro Bartolini, Di Rosa e Sorrentino, Mannaioni con Ledda e altri fiorentini.

Nel 1967 fu anche fondata la Società Italiana di Tossicologia che raccolse i ricercatori universitari e dell'industria, appartenenti a diverse discipline, che si occupavano di problemi di tossicologia di carattere sperimentale, clinico, medico legale, nel campo della medicina del lavoro. La farmacologia italiana ha sempre avuto un forte interesse per la tossicologia. Per fare un esempio, fra le comunicazioni tenute al VII Congres-

so della SIF tenuto a Rapallo nel 1952, 6 erano dedicate alla tossicità dell'isoniazide (Mantegazzini, Zanchi, 1952) e di altri antibiotici (Crema, 1952). Ricordo anche i periodici rendiconti della Clinica Tossicologica dell'Università di Firenze (oggi SOD di Tossicologia Medica dell'Azienda Ospedaliero Universitaria di Careggi) (Beani *et al*, 1960).

Come già detto, dall'11 al 13 Settembre 1968 si tenne a Firenze il 1st Joint Meeting of the Italian and British Pharmacological Societies e le 21 comunicazioni orali, i posters non erano ancora stati introdotti, tenute dai soci della SIF sono la vetrina della farmacologia italiana in quell'anno. Presidente della SIF in quel periodo era Emilio Beccari, uno dei più brillanti, spregiudicati e colti professori ordinari della vecchia generazione, allora direttore dell'Istituto di Farmacologia di Torino. Il meeting fu organizzato da Giotti e come suo "aiuto" partecipai all'organizzazione. Non vi è dubbio che un invito a Firenze fosse molto attraente per i soci inglesi, ma il fatto che la rigida e critica, allora più di adesso, British Pharmacological Society (BPS) lo accettasse dimostra che i farmacologi italiani e la SIF erano ormai pienamente inseriti nella farmacologia internazionale. Il meeting fu ovviamente tenuto in inglese, cosa che provocò qualche malumore fra gli anziani, e le 21 comunicazioni furono scelte da un comitato italiano e approvate, come previsto dal regolamento della BPS, dal Secretary for the Meetings che in quell'anno era John Vane (1927–2004), futuro premio Nobel. La scelta e l'approvazione non fu indolore perché tutti gli Istituti avrebbero voluto essere presenti al Meeting, i concorsi in atto suggerivano diplomazia, e la qualità di un certo numero comunicazioni non era adeguata. Inoltre diverse comunicazioni non rispettavano le istru-

zioni editoriali del British Journal of Pharmacology sul quale furono pubblicati i Proceedings del Joint Meeting. Non esistevano allora né fax né e-mail ed ebbi il compito di portare a Londra le comunicazioni italiane e presentarle a Vane che non risparmiò la sua ironia nei riguardi di alcune di esse. Le citazioni in estenso e i riassunti delle comunicazioni qui menzionate si trovano nei Proceedings (Br J Pharmac, 34, 659P – 700P, 1968). Al Joint Meeting parteciparono l'Istituto Mario Negri con le comunicazioni di Giacalone e Kostowski sulla 5HT cerebrale e di Marcucci e Mussini, sull'attività anticonvulsiva del diazepam. L'industria farmaceutica fu rappresentata da Farmitalia con un nuovo derivato dell'ergolina (Arcari *et al*, 1968), da Rotta, con un nuovo farmaco antisecretivo (gli inibitori dei recettori H2 non erano ancora in commercio) (Rovati, 1968), da Recordati con un nuovo coleretico (Setnikar, 1968), da Lepetit (Baldoli *et al*, 1968) con due nuovi ceppi di ratti spontaneamente ipertesi, una novità in quegli anni. Fra le comunicazioni provenienti da istituti universitari ne ricorderò alcune più significative. Santi assieme a Bruni e altri ricercatori della farmacologia padovana (Bortignon *et al*, 1968) presentarono le loro ultime ricerche sull'inibizione delle fosforilazioni ossidative da parte dell'atractiloside, glicoside proveniente dall'*Atractylis gummifera* che inibisce il trasporto di ADP e ATP attraverso la membrana mitocondriale. Santi fu probabilmente il primo a studiare questo glicoside (Santi, 1958). Franca Buffoni propose il meccanismo della reazione enzimatica dell'istaminasi, De Schaepdryver presentò esperimenti fatti con Preziosi e Scapagnini sui rapporti fra livelli cerebrali di monoamine e attivazione corticosurrenalica e nello stesso campo fu presentata una comunicazione di Rubin con

Egidio Miele, allora appena tornato dalla New York University, sulla secrezione di catecolamine dalle ghiandole surrenali perflu-se. Alberto Oliverio descrisse le azioni di nicotina, arecolina ed eserina su differenti ceppi di topi, sviluppando il tema di ricerca di Bovet, di cui era allora assistente. Mannaioni presentò le ricerche sugli effetti di noradrenalina, adrenalina e isoprenalina sul potenziale di membrana delle fibre di Purkinje, fatte con Giotti e Ledda. Io presentai un lavoro fatto con Alessandro e Lia Bartolini nel quale misuravamo i livelli di GABA nella corteccia cerebrale di gatti con sezioni medio pontine e collicolari. Il dosaggio del GABA era ancora fatto con cromatografia su carta. Nella comunicazione successiva alla mia, Mitchell *et al.* erano ricorsi al GABA triziato per studiarne la liberazione da fettine corticali, ammettendo la difficoltà di dosare il GABA in vivo.

Concludo questa sintesi di 22 anni di vita scientifica della farmacologia italiana ricordando il festoso ricevimento di chiusura del Joint Meeting a Forte Belvedere che sovrasta Firenze. Il suono delle chitarre e le fiaccole accolsero gli ospiti in quel clima di ottimismo sul futuro della ricerca e dell'Università che ci caratterizzava allora, anche se si profilavano le nubi e le proteste del 1968 e nella ricerca vi erano ancora molte zone grigie sulle quali ho preferito sorvolare.

In 20 anni due nuove generazioni di farmacologi si erano formate dando vita ad una comunità scientifica vivace, competitiva con molti ricercatori a livello internazionale che negli anni successivi avrebbero a loro volta preparato molti brillanti allievi e sprovvinzializzato ed elevato in tutte le sedi la qualità della ricerca farmacologica. La farmacologia italiana si era inserita nel grande fiume della conoscenza farmacologica internazionale, contribuendo con

artigianale dignità al suo sviluppo, raggiungendo in alcuni casi risultati fondamentali nella ricerca di base e di nuovi farmaci, fornendo un importante contributo culturale, didattico e applicativo alle scienze biomediche del paese.

BIBLIOGRAFIA

1. Aiazzi Mancini M, Buffoni F. Un nuovo anestetico locale: la Farmocaina. Arch Ital Sci Farmacol. II, 1: 13-24, 1948.
2. Angelucci L. Experiments with perfused frog's spinal cord. Br J Pharmacol Chemother 11: 161-170, 1956.
3. Anisman H, Bignami G. Psychopharmacology of aversively motivated behavior. Plenum Press, New York, 1978 pp 564.
4. Ban TA, Hippus H. (eds) Towards CINP. JM Production, Brentwood, Tennessee, 1994, pp.54.
5. Beani L, Pepeu G, Mannaioni P.F. Bericht über die Tätigkeit der toxicologischen Klinik der Universität Florenz während del Jahre 1956-1958. Arch Toxicol. 18: 300-315, 1960.
6. Beani L, Bianchi C, Ledda F. The effect of tubocurarine on acetylcholine release from motor nerve terminals. J Physiol. 174: 172-83, 1964.
7. Benigno P. Impiego degli isotopi in microbiologia e in chemioterapia Arch Ital Sci Farmacol. 2: 5-40, 1952.
8. Benigno P, Berti T. Influence of terramycin on the developmental characteristics of Escherichia coli. Arch Int Pharmacodyn Ther. 93: 466-76, 1953.
9. Berti T, Trocchia M. Effect of an anionic surface-active agent (lauryl sulphate) on the synthesis of the cell wall mucopeptide of Staph.
10. Bianchi C. Anticonvulsant action of some anti-epileptic drugs in mice pretreated with Rauwolfia alkaloids. Br J Pharmacol Chemother. 11: 141-6, 1956.
11. Bianchi C, Ceriotti G, Ortelli M. An improved apparatus for the study of the motility of isolated organs. Br J Pharmacol Chemother. 6: 182-4, 1951.
12. Bignami G. Effects of benactazine and adiphene on instrumental avoidance conditioning in a shuttle-box. Psychopharmacologia 5: 264-279, 1964.
13. Borasi M, Cavallero C, Sala G. Farmacologia sperimentale del cortisone. Arch It Sci Farmacol. III, 2: 41-113, 1952.

15. Bovet D, Bovet-Nitti, F. Medicaments du système nerveux végétatif. Karger, Bale, 1949 pp 849.
16. Bovet D, Bovet-Nitti F, Oliviero A. Effects of nicotine on avoidance conditioning of inbred strains of mice. Psychopharmacologia. 10: 1-5, 1966.
17. Bovet D, Bovet-Nitti F, Oliviero A. Genetic aspects of learning and memory in mice. Science. 163: 139-49, 1969.
18. Bulbring E, Crema A. Observations concerning the action of 5-hydroxytryptamine on the peristaltic reflex. Br J Pharmacol Chemother.13: 444-57, 1958.
19. Buffoni F. Histaminase and related amine oxidases. Pharmacol Rev. 18: 1163-99, 1966.
20. Carpi A. (ed) Pharmacology of the cerebral circulation. Int Encyclopedia Pharmacol & Therap. Section 33, vol 1 Pergamon Press, Oxford, 1972 pp 370.
21. Carpi A, Virno M. The action of ergotamine on intracranial venous pressure and on cerebral venous outflow of the dog. Br J Pharmacol Chemother. 12: 232-9, 1957.
22. Ceriotti G, De Franceschi A, De Carneiri I, Zamboni V. A comparative study on the metabolism of isonicotinic acid hydrazide and of isonicotinolyldiazonmethanesulphonic acid in the rat. Br J Pharmacol Chemother. 8: 356-65, 1953.
23. Crema A. Quantitative estimation of the toxicity of streptomycin and of dihydrostreptomycin for the vestibular apparatus. Arch Int Pharmacodyn Ther. 95: 49-63, 1953.
24. Crema A. Farmacologia della via biliare extraepatica. Arch Ital Sci Farmacol. III, 15: 5-27, 1965.
25. De Schaepdryver AF, Preziosi P. Iproniazid and pharmacological effects on the adrenal cortex and medulla. Arch Int Pharmacodyn Ther. 119: 506-10, 1959.
26. Di Rosa M, Sorrentino L. The mechanism of the inflammatory effect of carrageenin. Eur J Pharmacol. 4: 340-2, 1968.
27. Domagk G. Weitere experimentelle Untersuchungen zur Chemotherapie der Tuberkulose Arch Ital Sci Farmacol. II, 2: 57-65.
28. Donatelli L, Serafini U. Gli antistaminici di sintesi - Farmacologia e terapia. ESI Napoli 1952 pp. 300.
29. Ercoli A, Bruni G, Falconi G, Gardi R, Meli A. Biological activities of some steroid ethers: methyltestosterone enol ethers. Endocrinology. 67: 521-5, 1960.
30. Erspamer V, Asero B. Identification of enteramine, the specific hormone

- of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature*. 169, 800-801, 1952.
31. Erspamer V, Roseghini M, Edean R, Anastasi A. Biogenic amines and active polypeptides in the skin of Australian amphibians. *Nature*. 212: 204, 1966.
 32. Filomeni M. Il problema degli analetici respiratori. *Arch Ital Sci Farmacol*. III 4: 219-252, 1954.
 33. Garattini S, Paoletti P, Paoletti R. The effect of diphenylethylacetic acid on cholesterol and fatty acid biosynthesis. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 117: 114-22, 1958.
 34. Garattini S, Paoletti R. Drugs in lipid metabolism. *Ann Rev Pharmacol*. 3: 91-108, 1963.
 35. Garattini S, Valzelli L. Researches on the mechanism of reserpine sedative action. *Science*. 128: 1278-9, 1958.
 36. Gessa GL, Costa E, Kuntzman R, Brodie BB. Evidence that the loss of brain catecholamine stores due to blockade of storage does not cause sedation. *Life Sci*. 1: 441-52, 1962.
 37. Gessa GL, Crabai F, Vargiu L, Spano PF. Selective increase of brain dopamine induced by gamma-hydroxybutyrate: study of the mechanism of action. *J Neurochem*. 15: 377-81, 1968.
 38. Giarman NJ, Pepeu G. Drug-induced changes in brain acetylcholine. *Brit J Pharmacol* 19: 226-34, 1962.
 39. Giotti A. Le basi fisiologiche della farmacologia sperimentale. *Arch Ital Sci Farmacol* III, 4: 87-207, 1956.
 40. Giotti A, Maynert EW. The renal clearance of barbital and the mechanism of its reabsorption. *J Pharmacol Exp Ther*. 101: 296-309, 1951.
 41. Giotti A, Guidotti A, Mannaioni PF, Zilletti L. The influences of adreno-
 - tropic drugs and noradrenaline on the histamine release in cardiac anaphylaxis in vitro. *J Physiol*. 184: 924-41, 1966.
 42. Jacobsen E. Pharmacologie de l'Antabus. *Arch Ital Sci Farmacol* II, 3: 3-21, 1950.
 43. Knoppers AT. La therapie des aritmie du coeur avec la quinidine. *Arch Ital Sci Farmacol* II, 3: 170-197, 1950.
 44. Longo VG. Behavioral and electroencephalographic effects of atropine and related compounds. *Pharmacol Rev*. 18: 965-96, 1966.
 45. Maffii G, Soncin E. Pharmacological activity of 5phenyl-1:3:4-thiadiazole (L 1538), 2-amino-5-phenyl-1:3:4-thiadiazole (L 1460) and 2-amino-5-(2'-thienyl)-1:3:4-thiadiazole (L 1458). *Br J Pharmacol Chemother*. 13: 357-63, 1958.
 46. Mannaioni PF, Fischer GA, Giarman NJ. Release of endogenous serotonin and histamine from murine mastocytoma cells by various exogenous amines. *Eur J Pharmacol*. 4: 427-34, 1968.
 47. Mantegazza P, Tyler Ch, Zaimis E. The peripheral action of hexamethonium and pentolinium. *Brit J Pharmacol* 13: 480-484, 1958.
 48. Mantegazza P, Naimzada KM. Observations on an isolated preparation of guinea-pig urinary bladder stimulated through the hypogastric nerves. *Eur J Pharmacol*. 1: 396-401, 1967
 49. Martini L, Morpurgo C. Neurohumoral control of the release of adrenocorticotrophic hormone. *Nature* 175: 1127-8, 1955.
 50. Mascherpa P. Aspetti della farmacologia tessutale e cellulare. *Arch Ital Sci Farmacol* III. 4: 173-218, 1954.
 51. Meli A, Franceschini J. Pharmacological studies on a new hypnotic drug 3-cyclopropyl-butin-(3)-ol(2). *Naunyn Schmiedebergs Arch exp Pathol Pharmacol*. 218: 427-31, 1953.
 52. Moruzzi G, Magoun HH. Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *EEG Clin Neurophysiol*. 1: 455-473, 1949.
 53. Niccolini P. Lo stimolo olfattorio e la sua recezione. *Arch Ital Sci Farmacol* III, 4: 109-172, 1954.
 54. Pepeu G. La Ricerca Farmacologica Italiana negli anni 1930-1940. *Quaderni della SIF*. IV: 16-22, 2009.
 55. Pepeu G, Mantegazzini P. Midbrain hemisection: effect on cortical acetylcholine. *Science* 145: 1069-1070, 1964.
 56. Preziosi P. Farmacologia della corteccia surrenale. *Arch Ital Sci Farmacol*. III, 13: 275-443, 1963.
 57. Santi R. Depurazione renale del sangue (Clearance) e azione farmacologica. *Arch Ital Sci Farmacol*. II, 1, 254-290, 1948.
 58. Santi R. Potassium atractylate, a new inhibitor of the tricarboxylic acid cycle. *Nature* 182, 257-260, 1958.
 59. Second Symposium on Catecholamines. *Pharmacol Rev*. 18, 3-803, 1966.
 60. Silvestrini B, Cioli V, Burberi S, Catanese B. Pharmacological properties of AF1161, a new psychotropic drug" *Int. J. Neuropharmacol*. 7, 587-599, 1968.
 61. Trabucchi E, Paoletti R, Canal N. (eds) *Biochemical and neurophysiological correlation of centrally acting drugs. Proc. Second Int Pharmacol Meeting Prague 1963 Vol. 2 Pergamon Press Oxford, 1964 pp 288.* ■

La responsabilità d'impresa: imperativo morale od opportunità strategica?

Goffredo Freddi*, **Benedetta Nicastro****, **Claudia Rutigliano*****

* *Direttore Market Access, Public Affairs & Communications, MSD Italia*

** *Public Affairs & Communications Manager, MSD Italia*

*** *Stakeholders Relation Manager, MSD Italia*

La globalizzazione, il progressivo emergere di forme di partnership pubblico-privato, il peso acquisito dal terzo settore, hanno

complessivamente accresciuto, nell'ultimo decennio, l'aspettativa nei confronti delle aziende, soprattutto le multinazionali, af-

finché generino "valore sociale".

"Ciò che è bene per la società – affermò qualche anno fa Kofi Annan – è bene per l'impresa". La

consapevolezza di questa correlazione ha spinto molte aziende ad intraprendere iniziative a carattere filantropico, assistenziale, caritatevole secondo un principio di autoreferenzialità, partendo cioè dalla presunzione che l'impresa sapesse e potesse fare da sola tutto ciò che è il bene della società.

Questa interpretazione della Responsabilità Sociale di Impresa (RSI) nasconde, a volte, un'attitudine difensiva: in altri termini, è quasi un modo per assicurarsi un "diritto ad operare", per migliorare la propria reputazione o semplicemente una risposta ad un imperativo morale a far del bene.

Questa visione della RSI ha fatto poi nascere tutto un mercato correlato: organizzazioni che fanno ranking aziendali, classifiche dei "buoni" e dei "cattivi" in funzione della numerosità/qualità delle attività di RSI, con metodologie talora discutibili ma, certamente, con una buona capacità di attrarre interesse da parte dei media.

Esiste, però, una visione più illuminata della RSI, intesa come un'opportunità strategica, un modo per meglio capitalizzare e, contestualmente, potenziare le sinergie derivanti dalla sempre maggiore integrazione con l'ambiente nel quale l'impresa si trova ad operare.

Qualche anno fa, Michael Porter e Mike Kramer scrivevano su Harvard Business Review che "quando un'impresa di successo sfrutta le sue risorse, le sue conoscenze ed il talento dei suoi manager per metterli al servizio di problemi che comprende e nei quali ha un interesse, può avere un impatto maggiore per il bene sociale di qualsiasi altra istituzione o organizzazione filantropica".

Questa affermazione ha un valore profondo: quando un'azienda seleziona alcuni temi sociali che hanno una connessione con i propri interessi, sarà meglio equipaggiata a risolverli; promuoverà quelle iniziative in cui può dare un contributo in grado di fare la

differenza, identificherà quei temi che possono rappresentare un'opportunità di creare valori condivisi: un beneficio per la società e, al contempo, un beneficio per l'azienda stessa.

La cittadinanza d'impresa, infatti, non può prescindere dal contributo che l'azienda dà alla società attraverso le proprie attività commerciali.

Per MSD, l'attività principale è certamente scoprire e sviluppare farmaci e vaccini innovativi che facciano la differenza per la vita di milioni di persone.

Ma il suo impegno nei confronti della responsabilità d'impresa si estende anche al modo con il quale questa attività è portata a compimento: garantendo il rispetto di elevati standard di eticità ed integrità morale; promuovendo l'accesso ai farmaci efficaci ed innovativi alle popolazioni svantaggiate in tutto il mondo; favorendo il progresso della scienza medica attraverso borse di studio ed il finanziamento di programmi di ricerca; cercando di avere un impatto positivo e sostenibile sulle comunità e le società nelle quali vive ed opera, anche in termini di sicurezza e protezione ambientale; e, non ultimo, tenendo in considerazione i bisogni dei propri dipendenti, in misura equa ed imparziale.

Scoprire e sviluppare farmaci e vaccini innovativi è, quindi, l'anima di ciò che siamo come azienda. Ma crediamo, anche, che sia importante far arrivare quei farmaci e quei vaccini direttamente alle persone che ne hanno maggior bisogno. Per questo lavoriamo in stretta collaborazione con i governi di vari Paesi, affinché un maggior numero di persone possa aver accesso a beni e servizi sanitari di qualità. Recentemente abbiamo ampliato i parametri di inclusione per il nostro Patient Assistance Program perché un più ampio spettro di pazienti benefici di un programma che va avanti da oltre 50 anni.

Siamo consapevoli che la mag-

gior parte delle persone, nel mondo, ancora non abbia il giusto accesso a farmaci, vaccini e sistemi sanitari di qualità.

Per far sì che si possa vincere questa sfida, abbiamo implementato una politica dei prezzi differenziata per i nostri farmaci anti-retrovirali e per un certo numero di vaccini in grado di favorire un accesso più ampio a queste terapie essenziali.

Abbiamo creato programmi di partnership nei Paesi in via di sviluppo, nei mercati emergenti ed anche nei Paesi industrializzati proprio per aumentare la capacità del sistema salute e migliorare l'accesso alle terapie per chiunque ne abbia bisogno, indipendentemente dal luogo nel quale vive.

È importante riuscire a rimanere fedeli ai propri valori di fondo, uno dei quali è continuare ad operare apertamente ed eticamente. Seguendo questa filosofia abbiamo fatto significativi passi avanti per migliorare la trasparenza, impegnandoci a rendere pubblici tutti i nostri contributi a terzi, siano essi medici o associazioni di pazienti.

Vogliamo, inoltre, continuare a fare la nostra parte per affrontare la sfida rappresentata dal cambiamento climatico: stiamo migliorando le efficienze energetiche per tutte le nostre attività. A partire dal 2004, abbiamo ridotto la domanda di energia nei laboratori, nei siti produttivi e negli uffici del 28%, superando l'obiettivo che ci eravamo imposti del 25%. Abbiamo fatto sostanziali progressi anche nella riduzione delle emissioni di gas serra.

Nel gennaio dello scorso anno, il nostro Gruppo ha aderito a Global Compact delle Nazioni Unite, l'iniziativa più grande e maggiormente apprezzata di cittadinanza d'impresa.

La firma di tale accordo sottolinea il nostro impegno ai 10 principi di Compact, universalmente accettati nelle aree del rispetto dei diritti umani, del lavoro, del-

l'ambiente, dell'anticorruzione ed esprime la nostra volontà di sostenere e di farci portatori di tali principi all'interno dell'azienda stessa e delle sue controllate.

“Committed to making a difference”, impegnati a fare la differenza, è lo slogan che ci guida nelle nostre attività di RSI: perché nei progetti selezionati nei quali cre-

diamo e nei quali ci impegniamo con risorse ed energie, crediamo di poter lasciare effettivamente un segno. ■

I glucocorticoidi nel 2010

Giuseppe Nocentini e Emira Ayroldi

*Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Sezione di Farmacologia
Università degli Studi di Perugia*

I glucocorticoidi (GCs) tra fisiologia e clinica: un rapporto dialettico

I glucocorticoidi giocano un ruolo importante nella terapia antinfiammatoria e immunosoppressiva. In particolare, i GCs sono ampiamente utilizzati per trattare le reazioni allergiche, le malattie infiammatorie e autoimmunitarie, quali ad esempio asma, dermatite, malattie infiammatorie intestinali, artrite reumatoide e sclerosi multipla. Inoltre, sono utilizzati nella prevenzione del rigetto dei trapianti e nel trattamento di neoplasie ematologiche. Le principali indicazioni terapeutiche dei GCs in malattie extrasurrenali sono riassunte nella Tabella 1.

I GCs esplicano un'importante azione sul sistema immunitario (fisiologica e farmacologica), modulando in modo significativo l'attività di tutte le cellule che partecipano alla risposta immune (naturale e adattativa). L'attività immunosoppressiva si sovrappone a quella antinfiammatoria: entrambe richiedono l'attivazione del recettore dei GCs (GR) e condividono meccanismi molecolari che coinvolgono l'inibizione della attività leucocitaria. D'altra parte, i GCs agiscono anche sulle strutture parenchimali e connettivali proteggendole dagli effetti nocivi della risposta infiammatoria, sempre attraverso l'attivazione del GR.

Nella valutazione degli effetti farmacologici dei GCs, è importante sottolineare che i GCs endogeni svolgono un ruolo fondamentale nello sviluppo e nella maturazione del sistema immunitario e di altri organi, come ampiamente dimostrato dai modelli animali geneticamente modificati e dagli studi sui polimorfismi del recettore dei GCs. Ambedue questi modelli hanno dimostrato a pieno la complessità della azione dei GCs su diversi organi e sistemi, al punto che polimorfismi del GR hanno ricadute su patologie psichiatriche, quali, ad esempio, la depressione [1].

La molteplicità d'azione dei GCs ha un pesante rovescio della medaglia in termini di effetti dannosi al sistema nervoso centrale. Gli

effetti avversi dei GCs (riportati in dettaglio in Tabella 2) sono in parte correlati ai loro effetti sul sistema immunitario (come, ad esempio, un ritardo nel processo di riparazione delle ferite e una aumentata suscettibilità alle infezioni), ad effetti sul metabolismo (come, ad esempio, diabete e obesità) e all'aumento del catabolismo proteico (con effetti sul sistema osteoarticolare, muscolare e cutaneo).

Meccanismo d'azione dei GCs

La maggior parte degli effetti mediati dai GCs, a concentrazioni fisiologiche e farmacologiche, dipendono dalla loro interazione con il GR. L'isoforma del GR maggiormente studiata e più espressa

Patologie	Esempi
Reazioni allergiche	Asma, rinite allergica, orticaria, eczemi, reazioni atopiche locali, punture di insetto, reazioni da farmaci, malattia da siero, edema angioneurotico, shock
Disturbi collageneo-vascolari	Lupus eritematoso sistemico (LES), artrite reumatoide, Sindrome di Sjögren, polimiosite, polimialgia reumatica, sindromi miste del tessuto connettivo, arterite gigante-cellulare, arterite temporale
Malattie cutanee	Dermatite atopica, dermatosi, angioedema, psoriasi, lichen simplex cronico, micosi fungoide, pemfigo
Malattie gastrointestinali	Malattia infiammatoria intestinale, morbo celiaco
Malattie epatiche	Epatite cronica su base autoimmune attiva, epatite virale colestatica
Malattie oculari	Congiuntivite allergica, uveite acuta, coroidite, neurite ottica
Malattie della tiroide	Esoftalmo maligno, tiroidite subacuta
Malattie renali	Sindrome nefrosica
Malattie del sistema nervoso centrale	Edema cerebrale, ictus, lesioni del midollo spinale, sclerosi multipla
Malattie ematologiche	Anemia emolitica autoimmune o acquisita, trombocitopenia, porpora allergica acuta, porpora idiopatica trombocitopenica, leucemia acuta linfoblastica, mieloma multiplo, linfomi Hodgkin e non-Hodgkin
Infezioni	Setticemia da batteri gram-negativi con eccessiva risposta infiammatoria, meningiti da <i>Hemophilus influenzae</i> , meningo-encefaliti virali, polmonite da <i>Pneumocystis carinii</i> , mononucleosi infettiva
Trapianti d'organo	
Altre malattie	Lombalgia, edema polmonare, sarcoidiosi, ipercalcemia, mal di montagna

Tabella 1 - Indicazioni terapeutiche extrasurrenali dei GC

Endocrine	Soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, irsutismo, impotenza, irregolarità mestruali, ritardo o arresto della crescita nei bambini
Cardiovascolari	Iperensione, tromboflebite
Metaboliche	Iperglicemia, diabete, insulinoresistenza; catabolismo proteico, obesità addominale, faccia a luna piena, gobba di bufalo; ritenzione di sodio ed acqua, alcalosi metabolica, ipokaliemia, ipocalcemia, calciuria
Dermatologiche	Ecchimosi e petecchie, rossore del viso, strie, acne, assottigliamento della cute
Gastrointestinali	Ulcera peptica, emorragia gastrica
Immunitarie	<i>Herpes zooster</i> e <i>simplex</i> , aumentata sensibilità alle infezioni, ritardata guarigione delle ferite
Neuropsichiche	Cefalea, iperattività psicomotoria, euforia, insonnia, alterazioni dell'umore con precipitazione di una sindrome maniaco-depressiva o di una psicosi
Oftalmiche	Cataratta posteriore, aumento della pressione endoculare, glaucoma, cheratiti
Osteomuscolari	Osteoporosi, predisposizione a fratture vertebrali da compressione, necrosi asettica della testa del femore e dell'omero, predisposizione alla rottura tendinea, miopatia, ridotta massa muscolare e dimagrimento progressivo degli arti

Tabella 2 - Principali reazioni avverse dei glucocorticoidi

(GR α) presenta diverse regioni, funzionalmente specifiche, attraverso le quali il GR omodimerizza, si lega al DNA o interagisce con l'ormone. Nonostante si conosca un solo gene responsabile per la sintesi del GR, recenti studi hanno chiaramente dimostrato la presenza di diverse forme isomeriche del recettore dovute a modificazioni trascrizionali e post-trascrizionali.

Il gene GR produce, infatti, diversi splicing, dei quali due sono maggiormente espressi: il GR α e il GR β (Figura 1a e b). Quest'ultimo deriva dallo splicing alternativo dell'esone 9 che comporta da una parte la perdita della capacità di legare il GC e dall'altra un'azione inibente il GR α attivato [2]. Un'acquisizione relativamente recente è che sull'esone 1 e 2 sono presenti un gran numero di ATG che permettono l'inizio della traduzione della proteina [3] e che conferiscono al gene la potenzialità di sintetizzare diverse forme isomeriche del GR (GR α A, GR α B1, GR α B2, ecc.). Le diverse isoforme presenti nelle cellule sono illustrate in Figura 1c.

Come è logico attendersi, questi recettori hanno diversa affinità per i GCs e sono differenzialmente espressi nei diversi tessuti e nelle diverse cellule, condizionando così la risposta biologica [4]. Inoltre, ciascuna di queste isoforme può andare incontro ad un diverso grado di fosforilazione, ubiquitinazione e sumolazione (Figura 1d),

che modificano ulteriormente le proprietà funzionali dei GR [5, 6]. In definitiva, meccanismi trascrizionali, traduzionali e post-traduzionali producono diversi GR nei diversi tessuti e ciò può spiegare, almeno in parte, le molteplici azioni fisiologiche dei GCs ed anche come mai la risposta ai differenti i GCs possa essere diversa.

I GR modulano la trascrizione genica (effetti genomici)

La maggior parte dei recettori GR α (fa eccezione, ad esempio, la isoforma GR α D) è localizzata nel citoplasma complessata a proteine diverse e non tutte note (heat shock proteins, immunofilline, protein chinasi e fosfolipasi) a formare il complesso del recettore. Quando il GC si lega al GR, si ha un cambiamento conformazionale del GR che si dissocia dal recettosoma, migra nel nucleo, dimerizza e si lega a specifiche sequenze del DNA chiamate GRE (Glucocorticoid Responsive Elements), presenti nei promotori dei geni target dei GCs. In questo modo i GCs inducono l'espressione di centinaia di geni [7-10]. È interessante notare che la regolazione positiva della sintesi proteica è più o meno intensa in funzione del tipo di isoforma che lega i GRE. Il GR α C3, per esempio, ha un'attività regolatoria a livello trascrizionale 2 volte superiore a quella di GR α A. Il GR β compete con il GR α attivato per il legame

con i GRE, ma non essendo capace di attivarlo, impedisce al GR α attivato/dimerizzato di svolgere la propria azione. Inoltre, l'attività del GR α livello del GRE può essere modulata positivamente e negativamente da altri fattori. Peroxisome proliferator activated receptor- α (PPAR- α), per esempio, sinergizza con il GR, mentre l'istone deacetilasi-2 (HDAC2) ne inibisce l'attività trascrizionale [11, 12].

I GCs possono regolare negativamente la trascrizione genica. La presenza di GRE negativi (nGRE) è stata a lungo supposta, ma mai

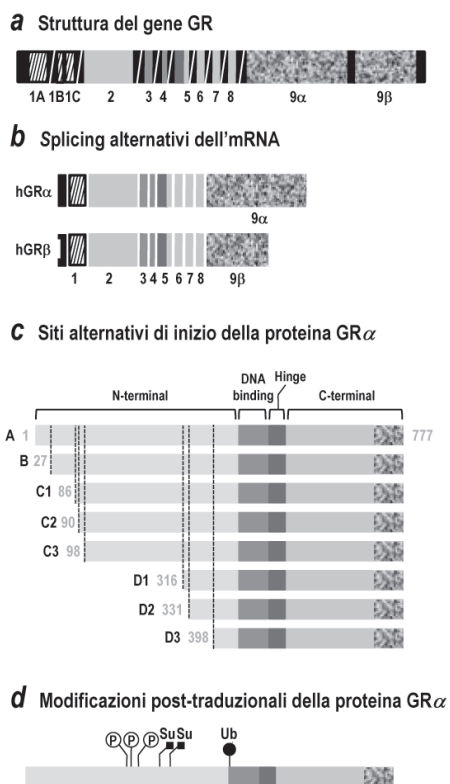


Figura 1 - Struttura del gene umano che codifica per il recettore dei GCs. Gli esoni sono numerati da 1 a 9 (a) e i diversi pattern corrispondono alla funzione della sequenza amminoacidica da loro codificata, come illustrato nel pannello (c). Gli introni sono in nero. Il diverso assemblamento degli esoni dà luogo a diversi splicing. I due più espressi (GR α e GR β) sono illustrati nel pannello (b). La traduzione dell'esone 2 per il GR α e GR β può iniziare da ATG diversi, come illustrato nel pannello (c) per GR α . Nel pannello (d) sono mostrati i siti sui quali il GR può essere fosforilato (P), sumolato (Su) e ubiquitinato (Ub).

dimostrata. Oggi si ritiene che un meccanismo più plausibile di inibizione della trascrizione genica sia la eterodimerizzazione del GR attivato con altri fattori di trascrizione che regolano positivamente la trascrizione, che sono così inibiti proprio dal legame con il GR. Questo meccanismo è stato dimostrato per numerosi fattori trascrizionali come NF- κ B, AP-1, IRF-3, STAT, CREB, NF-AT, T-Bet e GATA-3 [13]. Alcuni di essi giocano un ruolo fondamentale nella regolazione dell'espressione di mediatori della risposta infiammatoria e immune. Un altro meccanismo di inibizione della trascrizione, comporta il reclutamento di co-repressori invece di co-attivatori. Ad esempio, quando HDAC2 è reclutato dal GR al sito di legame con il GRE, ne inibisce l'attività trascrizionale. Infine, l'inibizione della trascrizione mediata dai GCs è anche secondaria all'over-espressione, GRE-dipendente, di inibitori di fattori di trascrizione pro-infiammatori. Ad esempio, i GCs aumentano l'espressione di I- κ B e di GILZ (Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper), quest'ultimo clonato più di 10 anni fa nel nostro laboratorio, che legano e inibiscono NF- κ B [14-16].

In definitiva, la regolazione trascrizionale positiva e negativa mediata dai GCs (effetti genomici) dipende anche dall'espressione da parte della cellula di fattori di trascrizione e ciò determina effetti diversi nelle diverse cellule.

Gli effetti dei GCs sulle diverse cellule sono differenti: possibile correlazione con la variabilità individuale della risposta clinica dei pazienti

L'osservazione che i GCs danno effetti diversi in tessuti diversi non è solo clinica. Negli ultimi 10 anni sono stati effettuati studi in vitro di microarray su diverse cellule trattate con GCs per scoprire

se i geni modulati dai GCs fossero gli stessi nei diversi tessuti [7-9]. In uno studio di meta-analisi, che analizzava i geni responsabili dell'apoptosi indotta dai GCs nelle cellule T, a diverso grado di maturazione, normali e neoplastiche, è stato sottolineato che solo pochi geni compaiono in tre o più studi [17]. Ciò porta alla conclusione che i diversi meccanismi descritti nei paragrafi precedenti operano al fine di diversificare la risposta genica nelle diverse cellule. Tra i geni invariabilmente modulati dai GCs si annovera GILZ, che può essere considerato un marker universale di risposta ai GCs [18].

La diversa risposta ai GCs (apoptosi, differenziazione, inibizione della proliferazione, ad esempio) non dipende solo dalla modulazione di geni diversi ma anche dallo stato funzionale della cellula. Per esempio, i GCs regolano l'apoptosi, inducendola o inibendola, e questo è possibile perché l'induzione dell'espressione dei geni pro-apoptotici induce apoptosi solo in specifiche popolazioni cellulari, in rapporto allo stato funzionale/differenziativo. A questo proposito, il nostro gruppo ha dimostrato che nei timociti che vanno incontro ad apoptosi in seguito al trattamento con GCs, non c'è solo l'induzione di geni pro-apoptotici o la down-regolazione di fattori anti-apoptotici, come ci si potrebbe attendere, ma anche la up-regolazione di un gran numero di geni anti-apoptotici (quali, ad esempio, il recettore per la interleuchina (IL)-7 o CTLA-4 [7], che, in questo caso specifico, non è sufficiente per dare una risposta protettiva, ma che in altri contesti biologici potrebbe darla). È nostra opinione, infatti, che un simile ragionamento possa essere applicato non solo a tessuti differenti, ma anche a sottopopolazioni cellulari differenti (come quelle linfocitarie e macrofagiche), nelle quali, infat-

ti, i GCs inducono effetti diversi quali apoptosi, proliferazione o differenziazione. Polimorfismi del GR, diversa localizzazione delle isoforme nelle cellule e nei tessuti e variabilità della risposta ai GCs in funzione di eventuali costimoli ambientali, sono certamente alla base della differente risposta clinica individuale allo stesso farmaco.

Gli effetti non-genomici dei GCs

Qualche anno fa, un medico di Medicina Generale ci riferiva con ammirazione degli effetti miracolosi dei GCs somministrati per via endovenosa su un suo paziente in shock. In questi casi quello che colpisce è, innanzitutto, la velocità con cui il paziente risponde. Anche l'effetto della somministrazione topica dei GCs durante un attacco d'asma si manifesta rapidamente. Per quanto alcuni degli effetti genomici dei GCs possano iniziare dopo 10 minuti dal contatto del GC con la cellula, gli effetti sopra descritti sono difficilmente attribuibili alla modulazione della trascrizione genica. Infatti, una serie di effetti non-genomici, più veloci, sono responsabili della risposta clinica quasi immediata. L'attivazione di secondi messaggeri, l'innescò di numerose cascate di trasduzione del segnale, come ad esempio, l'attivazione della fosfolipasi, la modulazione del cAMP e dei pathways delle proteine chinasi e la mobilitazione del Ca⁺⁺ sono stati di volta in volta chiamati in causa per spiegare gli effetti rapidi dei GCs [19-21]. Si suppone che gli effetti non-genomici dipendano dall'attivazione del GR e del recettosoma, ma anche dalla modulazione di recettori transmembrana non specifici per i GCs (come, ad esempio, il GABA_A) e, ad alte dosi, dalla modificazione della fluidità della membrana cellulare [21]. Molti ricercatori hanno insistentemente proposto

che gli effetti non-genomici dei GCs siano anche determinati da un recettore di membrana specifico per i GCs [20]. Tale recettore non è stato finora clonato e noi, d'altra parte, pensiamo che i meccanismi sopra esposti spieghino a sufficienza gli effetti non-genomici dei GCs.

Gli effetti non-genomici non sono solo responsabili degli effetti farmacologici dei GCs a manifestazione rapida. Essi, infatti, sinergizzano con gli effetti genomici nell'ottenere gli effetti finali dei GCs. Ad esempio, il nostro gruppo ha dimostrato che i GCs inducono apoptosi dei timociti attraverso meccanismi non-genomici che coinvolgono il pathway dalla ceramide e che la stessa via di trasduzione è modulata anche da meccanismi genomici [7, 19, 22].

Effetti dei GCs sulla risposta infiammatoria/immunitaria

Attraverso i meccanismi molecolari sopra descritti, i GCs giocano un ruolo fondamentale nella regolazione fisiologica dello sviluppo della risposta immunitaria e nella soppressione della risposta infiammatoria. Gli effetti antinfiammatori e immunosoppressivi dei GCs sono inestricabilmente connessi, condividendo molti meccanismi e pathways. La trans-repressione dei geni dell'infiammazione è il meccanismo generalmente accettato alla base della loro risposta antinfiammatoria. I GCs inibiscono, per esempio, fattori vasoattivi e chemiotattici, enzimi lipolitici, proteolitici, proinfiammatori come ciclo-ossigenasi (COX)-2 e nitric oxide synthase type 2 (NOS2) e diminuiscono l'extravasazione leucocitaria e la fibrosi. Inoltre, i GCs proteggono dall'apoptosi anche il tessuto in cui l'infiammazione si sviluppa con un'azione anti-apoptotica diretta e con una indirettamente mediata dall'inibizione dei mediatori dell'in-

fiammazione, capaci essi stessi di indurre apoptosi. Questo meccanismo è di fondamentale importanza quando coinvolge i neuroni [23].

In maniera simile, i GCs inibiscono la produzione di mediatori importanti per la generazione di una risposta immune regolando citochine, recettori per citochine, apoptosi e proliferazione in una complessa rete di segnali che coinvolge tutte le cellule della risposta immune [24].

GCs ed extravasazione leucocitaria

I GCs modulano negativamente l'infiammazione acuta e cronica alterando il reclutamento, l'attivazione, la differenziazione e l'apoptosi delle cellule del sistema immunitario innato ed adattativo. I primi stadi dell'infiammazione sono caratterizzati dalla migrazione nel focolaio infiammatorio di neutrofili prima, e di monociti dopo, che differenziano in macrofagi. Nella fase che precede il reclutamento linfo-monocitario, l'interazione tra le cellule endoteliali e quelle leucocitarie promuove l'up-regolazione di molecole di adesione (P-selettina, E-selettina, ICAM-1 e VCAM-1)[25].

I GCs riducono la migrazione dei leucociti nel focolaio di infiammazione attraverso un meccanismo indiretto e uno diretto. Il primo riguarda l'apoptosi dei leucociti e l'inibizione della produzione di citochine, riducendo così l'up-regolazione delle molecole di adesione endoteliali. Il secondo meccanismo riguarda invece la riduzione dell'espressione di molecole di adesione, come alcune selettine ed ICAM-1 [26-28]. Inoltre, gli eventi non-genomici indotti dai GCs inibiscono i pathways coinvolti nella trascrizione di adesine e nella riorganizzazione del citoscheletro, componenti essenziali per l'adesione e la mobilità cellulare [29].

GCs e macrofagi

I macrofagi sono la componente chiave nelle prime fasi e nella progressione dell'infiammazione, ma oggi è noto che partecipano anche nelle fasi risolutive grazie alla loro plasticità funzionale. Inoltre presentano l'antigene alle cellule T e possono essere polarizzati, in base agli stimoli ambientali a cui sono sottoposti, in M1 e M2. I macrofagi M1 (indotti da IFN- γ , LPS, TNF, GM-CSF) producono citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , TNF- α , IL-6) e inducono risposte polarizzate Th1, mentre i macrofagi M2 sono dotati di funzioni immuno-regolatorie, promuovono rimodellamento e riparazione cellulare e inducono prevalentemente risposte polarizzate Th2.

I GCs interferiscono con la funzione macrofagica attraverso molti meccanismi. Diminuiscono, per esempio, la loro capacità di presentare l'antigene e l'azione facilitante che ha l'IFN- γ sulla loro capacità di processare l'antigene [30]. Il trattamento dei macrofagi con GCs induce una sottopopolazione macrofagica M2 e down-regola le citochine pro-infiammatorie come il TNF- α [31, 32], che gioca un ruolo chiave nella patogenesi di malattie autoimmunitarie e infiammatorie. Inoltre i GCs down-regolano nei macrofagi l'espressione di molecole costimolatorie e dell'HLA (human lymphocyte antigen), il rilascio di citochine (IL-1, IL-6, IL12p70) e chemochine come Rantes e macrophage-inflammatory-protein (MIP)-1 α [33]. I GCs inducono anche apoptosi dei monociti umani di sangue periferico attraverso l'up-regolazione del recettore apoptotico Fas e del suo ligando- Fas-L [34].

GCs e linfociti

L'azione immunosoppressiva dei GCs, che si osserva in seguito al trattamento delle malattie

autoimmunitarie e nella infiammazione cronica, dipende soprattutto dalla modulazione della risposta immunitaria adattativa con particolare riferimento all'attivazione dei linfociti T. I GCs hanno un'azione pro-apoptotica sui timociti doppio positivi CD4⁺CD8⁺ [7, 35], controllando in questa maniera la selezione timica, come suggerito dai modelli dei topi difettivi per l'espressione/funzione del GR [36]. Inoltre, i GCs modulano la differenziazione dei linfociti T maturi controllando l'espressione di citochine e dei loro recettori. I GCs, ad esempio, down-regolano l'IL-2, cruciale per l'attivazione ed espansione dei linfociti T [37], inibiscono la produzione di IFN- γ inibendo lo sviluppo di una risposta Th-1, mentre up-regolano la produzione di IL-4 favorendo una risposta Th-2. Anche molti recettori come IL-7R e Notch1 e alcuni fattori di trascrizione come GILZ e Runx1, sono regolati dai GCs e sono al contempo cruciali nella differenziazione delle cellule T [7, 15, 38-40].

Le cellule T regolatorie (Treg) sono una sottopopolazione di linfociti T CD4⁺CD25⁺ o CD8⁺CD25⁺ capaci di inibire l'eccessivo sviluppo di una risposta immunitaria e di prevenire risposte immunitarie inappropriate contro antigeni self o antigeni non-self innocui [41, 42]. Le Treg giocano un ruolo chiave nel mantenere la tolleranza periferica, controllando quella piccola parte di cellule T circolanti autoreattive che evadono dalla selezione timica. Studi recenti dimostrano che i GCs favoriscono l'espansione di sottopopolazioni di T regolatorie a fenotipo CD8⁺CD28⁻ e FoxP3⁺CD4⁺CD25⁺ [43] e promuovono la sintesi di citochine antinfiammatorie come l'IL-10 [44]. Infine, le Treg dimostrano una sensibilità diversa nei confronti dell'apoptosi indotta dai GCs rispetto ai linfociti effettori CD4⁺CD25⁻ [45].

GCs e cellule dendritiche

Le cellule dendritiche (DC) rappresentano il principale sistema di connessione tra l'immunità innata e quella adattativa. Grazie alla loro plasticità funzionale, sono in grado di stimolare le cellule T potentemente o debolmente a seconda del loro grado di maturazione. È dimostrato che mentre le DC mature promuovono l'attivazione dei linfociti T naïve, quelle immature sono tollerogeniche, inducendo anergia ed apoptosi delle cellule T [46, 47]. Numerosi modelli sperimentali in vitro suggeriscono effetti diversi dei GCs sulle DC. I GCs, infatti, attraverso l'induzione della sintesi di IL-10 o l'inibizione della sintesi di IL-12 hanno effetti tollerogenici sulle DC di derivazione midollare (BMDC), su linee cellulari murine e sulle cellule dendritiche umane derivanti dai monociti. Le DC trattate in vitro con GCs rimangono ad uno stadio di differenziazione immaturo, conservando il fenotipo tollerogenico anche se co-trattate con LPS [48, 49]. Le DC umane di tipo mieloidi, trattate con desametasone (DEX) e LPS, producono IL-10, linfocina importante per la maturazione delle Treg [50]. Infatti, il tipo di cellule T che si sviluppa in seguito al contatto con le DC (Treg o T effettrici) è importante per il segnale di tollerogenicità che proviene dalle DC stesse.

La resistenza ai GCs è un fenomeno di rilevanza clinica per il quale non esiste ancora un trattamento efficace

La resistenza ai GCs è l'ostacolo maggiore al trattamento di una serie di patologie croniche eulastiche o neoplastiche, come, per esempio, la broncopneumopatia cronica ostruttiva, l'artrite reumatoide o molte neoplasie ematologiche. Pochi pazienti sono resistenti già nelle prime fasi

della terapia con GCs; si parla, in questo caso, di una resistenza primaria da ascrivere a mutazioni geneticamente determinate del GR. La maggior parte dei pazienti resistenti alla terapia con GCs, sviluppa resistenza dopo una fase di risposta clinica ottimale. Per questa resistenza secondaria sono stati chiamati in causa diversi meccanismi molecolari, differenti anche a seconda del tipo di patologia. La molteplicità dei meccanismi di resistenza acquisita, ad oggi non tutti noti, riflette la complessità e la diversità degli effetti farmacologici dei GCs. Sebbene mutazioni somatiche del GR siano responsabili della resistenza in vitro, queste non sono state individuate nei pazienti. Uno dei meccanismi più accreditati per spiegare la resistenza alla terapia con GCs è quello che coinvolge uno squilibrio delle forme isomeriche del GR nei siti di infiammazione, con il prevalere del GR β e γ ad attività antagonista (sia per l'ormone che per il GRE) sul GR α ad attività agonista [12]. Altri meccanismi di resistenza secondaria dipendono dall'induzione di citochine nelle aree di flogosi. Per esempio, IL-2 e IL-4 sono overespressi negli epiteli delle vie aeree dei pazienti asmatici. Queste citochine riducono nei linfociti T la traslocazione nucleare del GR attivato probabilmente attraverso l'attivazione di P38 MAP chinasi, che fosforila e inibisce il GR [51]. Inoltre, queste citochine sono responsabili dell'aumentata espressione del fattore di trascrizione AP-1 che, complessandosi al GR attivato, ne inibisce il legame al DNA. Il reclutamento di HDAC2 nella zona promotrice dei geni dell'infiammazione è uno dei meccanismi attraverso i quali i GCs inibiscono l'espressione di tali geni. L'osservazione che l'attività di HDAC2 è ridotta in patologie croniche che rispondono poco ai GCs, suggerisce un altro meccanismo di resistenza [12]. Mec-

canismi molecolari simili sono alla base della mancata risposta apoptotica delle neoplasie ematologiche trattate con GCs [17]. È stato recentemente riportato che nella leucemia linfoblastica acuta (ALL), per esempio, una proteina codificata dal gene BTG1, sia responsabile della resistenza ai GCs. L'ipoespressione di BTG1 causa, infatti, una diminuita espressione del GR e della trascrizione mediata dal GR [52]. Inoltre, nella leucemia linfoblastica acuta a cellule T (T-ALL) che costituisce il 15% delle forme pediatriche e il 25% delle forme adulte di tutti i casi di ALL, l'inibizione del fattore di trascrizione Notch1 ripristina la sensibilità ai GCs delle forme resistenti, con riespressione del GR e riattivazione dei pathways apoptotici [53].

Quelli descritti sono solo alcuni esempi dei numerosi meccanismi molecolari responsabili della resistenza ai GCs. La conoscenza di tali meccanismi è di fondamentale importanza per attuare strategie farmacologiche atte a contrastarla.

Differenze tra i vari GCs sintetici

Riteniamo, infine che valga la pena accennare ad un tema che avrà notevoli sviluppi nel prossimo futuro e che riguarda la specificità dei diversi GCs che attivano il GR. Pensiamo infatti che gli studi in corso su vecchie e nuove molecole permetteranno un utilizzo clinico differenziato su base razionale, migliorando così l'efficacia dei GCs e diminuendone gli effetti avversi.

Negli ultimi anni, sono stati commercializzati GCs di nuova generazione come il fluticasone, la budesonide e il mometasone che vengono utilizzati prevalentemente nel trattamento topico dell'asma, delle malattie infiammatorie intestinali e dell'infiammazione cutanee [54, 55]. I GCs di

nuova generazione hanno effetti clinici diversi rispetto a quelli di vecchia generazione (DEX e metilprednisolone, ad esempio) innanzitutto per differenti proprietà farmacocinetiche. Infatti l'emivita e l'effetto di primo passaggio dei GCs di nuova generazione, permette a questi farmaci un'alta efficacia locale e scarsi effetti sistemici con un'ottima risposta clinica associata a scarsissimi effetti avversi anche nei pazienti più a rischio, come i bambini affetti da asma o rinite allergica.

D'altra parte, alcuni dati di laboratorio suggeriscono che gli effetti clinici osservati non dipendono solo dalle diverse proprietà farmacocinetiche, ma anche da caratteristiche farmacodinamiche differenti. Ad esempio, recentemente sono stati testati in vitro molti GCs, inclusi il DEX, il metilprednisolone e la budesonide e si è osservato che la concentrazione a cui avviene la transattivazione genica (misurata tramite l'up-regolazione dell'espressione di GILZ) non correla con quella a cui avviene la transrepressione genica (misurata tramite l'inibizione della espressione di IL-2) [56]. Anche nel nostro laboratorio è stato osservato che i dosaggi a cui vengono utilizzati in clinica i diversi GCs non correlano con le rispettive concentrazioni efficaci per l'induzione dell'apoptosi dei timociti in vitro [57]. Questi studi suggeriscono che gli effetti dei GCs, sia voluti che avversi, dipendono sia dalle proprietà farmacocinetiche che farmacodinamiche specifiche di ciascun farmaco.

A nostro avviso, la diversa efficacia dei GCs è dovuta ad una diversa affinità per le numerose isoforme dei GR espresse diversamente nelle cellule e di cui abbiamo parlato nei paragrafi precedenti. Inoltre, c'è da considerare la "cross-specificità" dei GCs, cioè la possibilità che un ligando possa legarsi a più di un recettore della famiglia dei

recettori nucleari. Per esempio, l'antagonista RU486 è efficace in egual misura sul recettore del progesterone e su quello dei GCs e il recettore xenobiotico orfano PXR (pregnane X receptor) lega sia il DEX che il RU486 [58].

La sfida più importante nella ricerca del GC "perfetto" è quella di individuare una molecola capace di dissociare gli effetti voluti da quelli avversi. È opinione comune che la transrepressione genica sia prevalentemente responsabile degli effetti antinfiammatori dei GCs mentre la transattivazione degli effetti avversi. Una separazione completa di tali processi così intimamente interconnessi è oggi ancora non attuabile, ma la migliore conoscenza dei meccanismi molecolari del GR ha portato all'identificazione e lo sviluppo di selective GR agonists (SEGRAs), ligandi che sarebbero capaci di dissociare l'attività antiinfiammatoria dagli effetti avversi [59]. Mentre si aspetta che la sperimentazione clinica di tali composti dia una risposta sulla loro efficacia, la ricerca di base sui GCs continua.

BIBLIOGRAFIA

1. Hunsberger JG, Austin DR, Chen G, Manji HK. Cellular mechanisms underlying affective resiliency: the role of glucocorticoid receptor- and mitochondrially-mediated plasticity. *Brain Res* 2009; 1293: 76-84.
2. Lu NZ, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends Cell Biol* 2006; 16: 301-7.
3. Lu NZ, Cidlowski JA. Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol Cell* 2005; 18: 331-42.
4. Manning P, Gibson PG, Lasserson TJ. Ciclesonide versus other inhaled steroids for chronic asthma in children and adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2008: CD007031.
5. Duma D, Jewell CM, Cidlowski JA. Multiple glucocorticoid receptor iso-

- forms and mechanisms of post-translational modification. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006; 102: 11-21.
6. Gross KL, Lu NZ, Cidlowski JA. Molecular mechanisms regulating glucocorticoid sensitivity and resistance. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 300: 7-16.
 7. Bianchini R, Nocentini G, Krausz LT, Fettucciari K, Coaccioli S, Ronchetti S, *et al.* Modulation of pro- and antiapoptotic molecules in double-positive (CD4+CD8+) thymocytes following dexamethasone treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319: 887-97.
 8. Chauhan D, Auclair D, Robinson EK, Hideshima T, Li G, Podar K, *et al.* Identification of genes regulated by dexamethasone in multiple myeloma cells using oligonucleotide arrays. *Oncogene* 2002; 21: 1346-58.
 9. Schmidt S, Rainer J, Riml S, Ploner C, Jesacher S, Achmuller C, *et al.* Identification of glucocorticoid-response genes in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2006; 107: 2061-9.
 10. Beato M. Transcriptional control by nuclear receptors. *FASEB J* 1991; 5: 2044-51.
 11. Cuzzocrea S, Bruscoli S, Mazzon E, Crisafulli C, Donato V, Di Paola R, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha contributes to the anti-inflammatory activity of glucocorticoids. *Mol Pharmacol* 2008; 73: 323-37.
 12. Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet* 2009; 373: 1905-17.
 13. De Bosscher K, Haegeman G. Mini-review: latest perspectives on anti-inflammatory actions of glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 2009; 23: 281-91.
 14. Neumann M, Naumann M. Beyond I κ Bs: alternative regulation of NF- κ B activity. *FASEB J* 2007; 21: 2642-54.
 15. D'Adamio F, Zollo O, Moraca R, Ayroldi E, Bruscoli S, Bartoli A, *et al.* A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity* 1997; 7: 803-12.
 16. Ayroldi E, Migliorati G, Bruscoli S, Marchetti C, Zollo O, Cannarile L, *et al.* Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB. *Blood* 2001; 98: 743-53.
 17. Schmidt S, Rainer J, Ploner C, Presul E, Riml S, Kofler R. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ* 2004; 11 Suppl 1: S45-55.
 18. Ayroldi E, Riccardi C. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *FASEB J* 2009; 23: 3649-58.
 19. Cifone MG, Migliorati G, Parroni R, Marchetti C, Millimaggi D, Santoni A, *et al.* Dexamethasone-induced thymocyte apoptosis: apoptotic signal involves the sequential activation of phosphoinositide-specific phospholipase C, acidic sphingomyelinase, and caspases. *Blood* 1999; 93: 2282-96.
 20. Losel R, Wehling M. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 46-56.
 21. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 2005; 353: 1711-23.
 22. Marchetti MC, Di Marco B, Cifone G, Migliorati G, Riccardi C. Dexamethasone-induced apoptosis of thymocytes: role of glucocorticoid receptor-associated Src kinase and caspase-8 activation. *Blood* 2003; 101: 585-93.
 23. Clark AR. Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 275: 79-97.
 24. Rook GA. Glucocorticoids and immune function. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 1999; 13: 567-81.
 25. Mackay CR. Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. *Nat Immunol* 2008; 9: 988-98.
 26. Patel NA, Patel JA, Stins MF, Kim KS, Chang SL. Dexamethasone affects cytokine-mediated adhesion of HL-60 human promyelocytic leukemia cells to cultured dermal microvascular endothelial cells. *Clin Immunol* 2001; 99: 387-94.
 27. Simoncini T, Maffei S, Basta G, Barsacchi G, Genazzani AR, Liao JK, *et al.* Estrogens and glucocorticoids inhibit endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by different transcriptional mechanisms. *Circ Res* 2000; 87: 19-25.
 28. Wehling-Henricks M, Lee JJ, Tidball JG. Prednisolone decreases cellular adhesion molecules required for inflammatory cell infiltration in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Neuromuscul Disord* 2004; 14: 483-90.
 29. Pitzalis C, Pipitone N, Perretti M. Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966: 108-18.
 30. Hu X, Li WP, Meng C, Ivashkiv LB. Inhibition of IFN-gamma signaling by glucocorticoids. *J Immunol* 2003; 170: 4833-9.
 31. Steer JH, Vuong Q, Joyce DA. Suppression of human monocyte tumour necrosis factor-alpha release by glucocorticoid therapy: relationship to systemic monocytopenia and cortisol suppression. *Br J Clin Pharmacol* 1997; 43: 383-9.
 32. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 2008; 13: 453-61.
 33. Schmidt M, Pauels HG, Lugerling N, Lugerling A, Domschke W, Kucharzik T. Glucocorticoids induce apoptosis in human monocytes: potential role of IL-1 beta. *J Immunol* 1999; 163: 3484-90.
 34. Schmidt M, Lugerling N, Lugerling A, Pauels HG, Schulze-Osthoff K, Domschke W, *et al.* Role of the CD95/CD95 ligand system in glucocorticoid-induced monocyte apoptosis. *J Immunol* 2001; 166: 1344-51.
 35. Almeida OF, Conde GL, Crochemore C, Demeneix BA, Fischer D, Hassan AH, *et al.* Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. *FASEB J* 2000; 14: 779-90.
 36. Jondal M, Pazirandeh A, Okret S. Different roles for glucocorticoids in thymocyte homeostasis? *Trends Immunol* 2004; 25: 595-600.
 37. Bamberger CM, Else T, Bamberger AM, Beil FU, Schulte HM. Regulation of the human interleukin-2 gene by the alpha and beta isoforms of the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 136: 23-8.
 38. Lee HC, Shibata H, Ogawa S, Maki K, Ikuta K. Transcriptional regulation of the mouse IL-7 receptor alpha promoter by glucocorticoid receptor. *J Immunol* 2005; 174: 7800-6.
 39. Cannarile L, Cuzzocrea S, Santucci L, Agostini M, Mazzon E, Esposito E, *et al.* Glucocorticoid-induced leucine zipper is protective in Th1-mediated models of colitis. *Gastroenterology* 2009; 136: 530-41.
 40. Taniuchi I, Osato M, Egawa T, Sunshine MJ, Bae SC, Komori T, *et al.* Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte develop-

ment. Cell 2002; 111: 621-33.

41. Askenasy N, Kaminitz A, Yarkoni S. Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmun Rev* 2008; 7: 370-5.
42. Gerli R, Nocentini G, Alunno A, Bocci EB, Bianchini R, Bistoni O, *et al.* Identification of regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2009; 8: 426-30.
43. Chen X, Oppenheim JJ, Winkler-Pickett RT, Ortaldo JR, Howard OM. Glucocorticoid amplifies IL-2-dependent expansion of functional FoxP3(+)CD4(+)CD25(+) T regulatory cells in vivo and enhances their capacity to suppress EAE. *Eur J Immunol* 2006; 36: 2139-49.
44. Xystrakis E, Kusumakar S, Boswell S, Peek E, Urry Z, Richards DF, *et al.* Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *J Clin Invest* 2006; 116: 146-55.
45. Chen X, Murakami T, Oppenheim JJ, Howard OM. Differential response of murine CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells to dexamethasone-induced cell death. *Eur J Immunol* 2004; 34: 859-69.
46. Adler HS, Steinbrink K. Tolerogenic dendritic cells in health and disease: friend and foe! *Eur J Dermatol* 2007; 17: 476-91.
47. Puccetti P, Grohmann U. IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 817-23.
48. Roelen DL, van den Boogaardt DE, van Miert PP, Koekkoek K, Offringa R, Claas FH. Differentially modulated dendritic cells induce regulatory T cells with different characteristics. *Transpl Immunol* 2008; 19: 220-8.
49. Xia CQ, Peng R, Beato F, Clare-Salzler MJ. Dexamethasone induces IL-10-producing monocyte-derived dendritic cells with durable immaturity. *Scand J Immunol* 2005; 62: 45-54.
50. Bosma BM, Metselaar HJ, Nagtzaam NM, de Haan R, Mancham S, van der Laan LJ, *et al.* Dexamethasone transforms lipopolysaccharide-stimulated human blood myeloid dendritic cells into myeloid dendritic cells that prime interleukin-10 production in T cells. *Immunology* 2008; 125: 91-100.
51. Irusen E, Matthews JG, Takahashi A, Barnes PJ, Chung KF, Adcock IM. p38 Mitogen-activated protein kinase-induced glucocorticoid receptor phosphorylation reduces its activity: role in steroid-insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 649-57.
52. van Galen JC, Kuiper RP, van Emst L, Levers M, Tijchon E, Scheijen B, *et al.* BTG1 regulates glucocorticoid receptor autoinduction in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*.
53. Real PJ, Ferrando AA. NOTCH inhibition and glucocorticoid therapy in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2009; 23: 1374-7.
54. Adams N, Lasserson TJ, Cates CJ, Jones PW. Fluticasone versus beclomethasone or budesonide for chronic asthma in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; CD002310.
55. Angelucci E, Malesci A, Danese S. Budesonide: teaching an old dog new tricks for inflammatory bowel disease treatment. *Curr Med Chem* 2008; 15: 2527-35.
56. Smit P, Russcher H, de Jong FH, Brinkmann AO, Lamberts SW, Koper JW. Differential regulation of synthetic glucocorticoids on gene expression levels of glucocorticoid-induced leucine zipper and interleukin-2. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 2994-3000.
57. Bruscoli S, Di Virgilio R, Donato V, Velardi E, Baldoni M, Marchetti C, *et al.* Genomic and non-genomic effects of different glucocorticoids on mouse thymocyte apoptosis. *Eur J Pharmacol* 2006; 529: 63-70.
58. Yudit MR, Cidlawski JA. The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 1719-26.
59. Schacke H, Berger M, Rehwinkel H, Asadullah K. Selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRAs): novel ligands with an improved therapeutic index. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 275: 109-17.

Gli studi osservazionali nella ricerca sui farmaci: prospettive e basi metodologiche

Giampiero Mazzaglia

Health Search, Società Italiana di Medicina Generale

1. PROSPETTIVE

1.1. Background

È ormai ampiamente riconosciuto che, al momento dell'autorizzazione, l'informazione sul profilo di sicurezza dei farmaci è relativamente limitata. Infatti,

sebbene gli studi clinici randomizzati e controllati (RCT), per la loro capacità di bilanciare fattori di confondimento misurabili e non, rappresentino il massimo livello di evidenza di un'associazione tra un fattore di esposizione (sia esso un trattamento farmacologico od un fattore di rischio)

ed un evento, esistono numerosi fattori che ne riducono fortemente la validità esterna, tra i quali il limitato numero di pazienti arruolati, la breve durata del follow-up e l'esclusione di determinate categorie di pazienti (es. anziani, bambini, donne in gravidanza, pazienti ad alto rischio ed in tratta-

mento con altre terapie farmacologiche) (Van Spall et al. 2007).

Pertanto, sebbene un prodotto medicinale venga autorizzato sulla base di un profilo di rischio-beneficio positivo per la popolazione target, non è possibile stabilire con precisione tutti i potenziali rischi, né i sottogruppi con specifiche caratteristiche cliniche che potrebbero trarre minore beneficio o maggiore rischio dal trattamento.

Negli ultimi decenni, sono stati identificati molti eventi avversi attraverso il sistema di segnalazione spontanea delle reazioni avverse.

Tuttavia, l'identificazione di un segnale non permette necessariamente una conferma eziologica dell'associazione tra l'esposizione al farmaco e l'evento avverso, facendo crescere da parte delle autorità sanitarie la necessità di rafforzare l'attività di vigilanza sul profilo di sicurezza dei farmaci quando questi vengono utilizzati nel cosiddetto "mondo reale".

Recentemente, la Comunità Europea ha introdotto una legislazione che obbliga tutte le aziende farmaceutiche ad attivare un sistema di monitoraggio post-marketing della sicurezza dei farmaci (Risk Management Plan [RMP]).

L'RMP viene definito nelle linee guida sviluppate dall'Agenzia Europea del Farmaco (EMA) (<http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/euleg/9626805en.pdf>) come un "set di attività di farmacovigilanza volte ad identificare, caratterizzare, prevenire o minimizzare i rischi associati ad un farmaco, nonché a verificare l'efficacia degli interventi di minimizzazione del rischio".

Contestualmente, la stessa EMA ha promosso nel 2006 l'European Network of Centres for Pharmacoepidemiology and Pharmacovigilance (ENCePP) che ha come obiettivo il rafforzamento delle attività di monito-

raggio post-marketing dei medicinali attraverso la costruzione di una rete di centri indipendenti di farmaco-epidemiologia in grado di condurre, grazie alla crescente disponibilità di informazioni cliniche raccolte su archivi informatici ad uso gestionale o amministrativo, sia studi di sicurezza, che studi di efficacia.

Nell'ambito della ricerca sui farmaci, gli studi osservazionali sono i più appropriati per una conferma eziologica sul profilo di sicurezza e per identificare reazioni avverse da farmaci (ADR) rare o ritardate (Strom, 2000).

Questi studi sono inoltre estremamente utili nell'ambito delle attività di RMP per valutare l'efficacia degli interventi regolatori e degli interventi di minimizzazione del rischio attuati dalle stesse aziende farmaceutiche (i.e. aderenza al trattamento, appropriatezza prescrittiva, riduzione degli eventi avversi).

Recenti studi (Concato et al. 2000) hanno anche sottolineato un crescente interesse ad una metodologia di tipo osservazionale per la valutazione dell'efficacia e dell'efficienza di interventi farmacologici o non farmacologici sulla salute della popolazione. Diverse ragioni fanno ritenere estremamente utile condurre studi di efficacia attraverso un approccio di tipo osservazionale:

- la scarsa validità esterna dei RCT che tendono ad escludere pazienti ai quali verranno prescritti successivamente gli stessi farmaci sperimentali;
- l'estrema variabilità prescrittiva (i.e. aderenza al trattamento cronico, interazioni farmacologiche), tipica dei setting non sperimentali, che potrebbe influenzare l'efficacia di un farmaco dimostrata nei RCT.

1.2. Razionale

A partire da queste considera-

zioni, appare sempre più evidente il ruolo strategico di questi studi per la valutazione del profilo di rischio-beneficio dei farmaci post-marketing da parte delle autorità sanitarie. D'altra parte, si pone con maggiore forza il problema di definire degli standard internazionali di etica e di qualità necessari alla progettazione, alla conduzione, alla presentazione degli studi osservazionali, sulla stessa linea seguita per gli studi clinici dalle Good Clinical Practice.

Nel corso del 2009 l'ENCePP ha avviato un gruppo di lavoro che ha come obiettivo la definizione di standard metodologici comuni per la conduzione degli studi osservazionali nel campo della ricerca sui farmaci.

Il gruppo di lavoro, a partire da una revisione di tutte le linee guida disponibili, ha identificato circa 11 linee guida di alto valore metodologico che si riferiscono ad aspetti specificamente farmacoeconomici, tra le quali spiccano le Guidelines for Good Pharmacoepidemiology Practices (GPP) prodotte dall'ISPE (International Society of Pharmacoepidemiology) nel 2008 e le linee guida STROBE (Vandenbroucke, 2009) promossa da un gruppo di epidemiologi, statistici, ricercatori ed editori di riviste scientifiche coinvolti nella conduzione e disseminazione degli studi osservazionali.

Gli obiettivi sono comuni a tutte le linee guida, ovvero:

- assistere i ricercatori ai principi di una rigorosa ricerca osservazionale, compresi gli studi necessari per le attività di RMP;
- incoraggiare un'adeguata raccolta delle informazioni, analisi ed attività di reporting;
- fornire uno strumento necessario a condurre e valutare la qualità di uno studio osservazionale.

In generale, i principi conte-

nuti in queste raccomandazioni si possono applicare sia agli studi osservazionali di tipo eziologico (es. caso-controllo, coorte), come pure agli studi descrittivi ed agli studi prognostici. Nell'ambito del presente articolo, per ragioni di spazio, verranno descritti con maggior dettaglio gli aspetti relativi allo sviluppo di un protocollo, in particolare gli obiettivi, il razionale e gli elementi principali di metodologia. Per una lettura più accurata si rimanda alle linee guida STROBE sopracitate.

2. SVILUPPO DI UN PROTOCOLLO

2.1. Obiettivi e Razionale

Un protocollo rappresenta la base essenziale di qualunque progetto di ricerca e deve includere diversi elementi tra i quali spiccano:

- una chiara descrizione degli obiettivi della ricerca;
- un'adeguata revisione della letteratura per evidenziare le aree di incertezza ed il razionale dalla ricerca;
- una descrizione dettagliata della metodologia utilizzata.

Gli obiettivi servono a descrivere dettagliatamente le informazioni che si vogliono ottenere dalla ricerca. Obiettivi ben dettagliati specificano sia la popolazione target, che l'esposizione e gli eventi.

Teoricamente, il protocollo dovrebbe distinguere tra gli obiettivi a-priori e gli obiettivi potenziali generati da un'analisi dei dati. Il background ed il razionale dello studio forniscono importanti informazioni sui temi trattati nella ricerca e su quali punti specifici esistono le aree di incertezza che verranno coperte dalla ricerca. La revisione della letteratura può focalizzarsi sia sugli studi pre-clinici che sugli studi clinici e sulle revisioni si-

stematiche.

Un esempio di razionale viene fornito da uno studio volto a verificare l'associazione tra uso di corticosteroidi e rischio di fibrillazione atriale (AF) (van der Hooft et al. 2006) Nella loro introduzione, gli autori citano diversi casi clinici che riportano un segnale di potenziale associazione tra corticosteroidi ed AF ed alcuni studi di fisiopatologia che teorizzano un effetto aritmogenetico dei corticosteroidi attraverso un'influenza sui canali di potassio a livello della membrana cellulare. Tuttavia, ribadiscono la mancanza di studi clinici a supporto di tale ipotesi.

2.2. Metodologia della ricerca

La descrizione dettagliata della metodologia della ricerca occupa in genere una parte sostanziale del protocollo ed in genere rappresenta, assieme agli aspetti relativi alla fattibilità dello studio, l'elemento principale sul quale viene valutata la qualità dello studio.

2.2.1. Disegno dello studio

Il disegno dello studio e le ragioni per le quali viene scelto un particolare disegno sono un elemento chiave per comprendere la struttura della ricerca (Rothman et al. 1998).

Per esempio, in uno studio di coorte la popolazione viene stratificata in base all'esposizione e seguita per un determinato periodo di tempo fino all'insorgenza dell'evento oppure alla fine del follow-up, mentre in uno studio caso-controllo viene studiata l'esposizione ai farmaci precedenti all'insorgenza dell'evento nei casi (e nei controlli appaiati).

Un disegno alternativo rispetto a quelli sopracitati necessita ulteriori motivazioni e spiegazioni. Ad esempio, il disegno case-crossover è estremamente efficace per studiare un'associazione tra un'esposizione breve (es. derivati

imidazolici+warfarin) ed un aumento transitorio del rischio di evento (es. emorragia intracranica).

2.2.2. Popolazione in studio e fonti di informazione

Per una valutazione adeguata della qualità dello studio è importante chiarire dove e quando lo studio è stato condotto.

Infatti, sia il consumo che la tipologia di farmaci è influenzato sia da criteri temporali che geografici; pertanto, un'adeguata conoscenza di questi aspetti aiuta ad interpretare meglio i risultati.

Per ciò che riguarda la popolazione, è necessario definire sia i siti di arruolamento (es. ospedali, residenze per anziani, ambulatori di cure primarie) che le caratteristiche della popolazione in studio.

Infatti, i ricercatori tendono a selezionare la popolazione in studio in base a determinati criteri demografici e clinici, come ad esempio l'età, il sesso o la presenza di determinate patologie.

Pertanto, la descrizione dei criteri di eleggibilità e delle fonti di informazione utilizzate (es. registri, database elettronici, questionari ed interviste telefoniche su campioni casuali) è necessaria per chiarire gli aspetti di rappresentatività del campione, rispetto alla popolazione di riferimento.

2.2.3. Bias (distorsione)

Il bias è una sistematica deviazione dei risultati dello studio dal risultato reale, che in genere viene introdotta per errori nel disegno dello studio e che non può essere controllata dalle classiche tecniche della statistica.

Negli studi osservazionali, in particolare caso-controllo e coorte, l'elemento più rilevante che potrebbe invalidare i risultati è rappresentato dal bias di selezione.

Questo bias viene definito come

un errore dovuto a differenze sistematiche delle caratteristiche di coloro che partecipano ad uno studio e coloro che non partecipano, oppure, all'interno del campione, di coloro i quali risultano esposti ad un intervento di cui si vuole valutare l'efficacia o la sicurezza e coloro i quali non risultano esposti.

Nell'ambito degli studi di coorte, un'adeguata descrizione delle modalità con cui vengono confrontati i pazienti esposti e non esposti, nonché di tutte le tecniche attuate per assicurare un adeguato confronto tra pazienti esposti e non esposti, aiuta a chiarire l'attendibilità dei risultati (Johnson, 1990) In questo contesto, il propensity score è la misura della probabilità che un soggetto venga trattato farmacologicamente sulla base delle sue caratteristiche cliniche.

Esso può essere utilizzato sia come fattore di confondimento che come variabile di appaiamento per "bilanciare" la distribuzione delle covariate nel gruppo dei soggetti esposti rispetto ai non esposti (D'Agostino, 2007)

Negli studi caso-controllo la scelta dei controlli risulta determinante per chiarire la validità dello studio.

A tal proposito, la disponibilità di archivi elettronici longitudinali ha permesso di applicare un approccio misto (caso-controllo "nested") che permette la selezione di una popolazione omogenea di potenziali casi e dei rispettivi controlli, all'interno di una coorte che viene seguita fino all'insorgenza dell'evento sotto osservazione.

Tuttavia, anche negli studi caso-controllo "nested" le modalità di matching tra casi e controlli sono necessarie per aumentare la similarità nella distribuzione delle variabili nei due gruppi, in particolare la distribuzione di potenziali fattori di confondimento.

Poiché il matching può essere

effettuato in vari modi, è comunque essenziale descrivere il razionale per la scelta delle variabili di matching (es. età, sesso, distretto sanitario) ed i dettagli dei metodi utilizzati.

2.2.4. Variabili

Tutte le variabili che vengono incluse nell'analisi, incluse l'esposizione, gli eventi, i potenziali fattori di confondimento ed i modificatori di effetto, devono essere specificate ed effettuate con cura. Ad esempio, in uno studio di coorte, condotto per valutare l'associazione tra aderenza alla terapia antipertensiva ed incidenza di eventi cardiovascolari (Mazzaglia et al, 2009), sono state specificate tutte le modalità di selezione dei potenziali fattori di rischio cardiovascolare, tra i quali la pressione arteriosa (calcolata come media tra le ultime due misurazioni effettuate nei 12 mesi precedenti alla data di ingresso nello studio), l'obesità (BMI >30 kg/m² [ultimo valore nei 12 mesi precedenti alla data di ingresso nello studio] o diagnosi codificata [ICD-9-CM 278.0]), la presenza di diabete mellito (diagnosi codificata [ICD-9-CM 250.x] ed almeno una prescrizione di antidiabetico).

L'approccio con il quale esposizione, fattori di confondimento ed eventi vengono misurati, può infatti influenzare l'affidabilità e la validità dei risultati. Gli eventi necessitano una dettagliata spiegazione dei criteri diagnostici utilizzati e della validità di tali criteri.

Per esempio la definizione "infarto del miocardio" non chiarisce i criteri di selezione utilizzati. Una descrizione efficace dovrebbe essere "ospedalizzazione per infarto del miocardio con diagnosi primaria codificata in base all'ICD-9-CM 410".

Negli studi condotti su banche dati elettroniche questo aspetto assume un'importanza fondamentale ed è necessaria una de-

scrizione dettagliata sugli strumenti utilizzati per validare gli eventi e/o una revisione degli studi di validazione effettuati. In generale, la validità delle informazioni contenute in banche dati elettroniche può essere verificata attraverso due indicatori:

- la completezza (cioè sensibilità), ovvero la probabilità di identificare, sulla base di determinati criteri (ad esempio diagnosi codificata, test di laboratorio, algoritmi complessi), tutti i pazienti presenti nel sito di arruolamento realmente affetti da una determinata patologia;
- l'accuratezza (cioè valore predittivo positivo [PPV]), ovvero la probabilità che un paziente con una determinata diagnosi codificata sia realmente affetto dalla patologia corrispondente.

In particolare, la conoscenza del PPV aiuta ad interpretare meglio i risultati, in quanto un basso PPV generalmente diluisce i risultati di un'associazione reale tra esposizione ed evento.

2.2.5. Calcolo della dimensione del campione

Il calcolo della dimensione del campione è, come peraltro nei RCT, un altro elemento che bisognerebbe specificare negli studi osservazionali.

In genere, specialmente negli studi su grandi archivi elettronici è possibile stimare in partenza il numero di pazienti potenzialmente selezionabili e definire quale differenza di rischio si vuole rilevare tra soggetti esposti e non esposti ad un determinato farmaco, fatto salvo un potere dello studio generalmente variabile dall'80% al 90% ed una significatività pari al 5%.

Ad esempio, volendo stimare l'associazione tra bifosfonati orali (BF) ed osteonecrosi della mandibola (ONM), ci si può aspettare da una popolazione target di cir-

ca 5,9 milioni di soggetti ultra 55enni, circa 178.000 pazienti dimessi con una diagnosi di frattura osteoporotica.

Assumendo che $\frac{1}{4}$ dei pazienti verranno trattati con BF durante i circa 3 anni di follow-up, la coorte genererà circa 489.500 anni-persona; di cui 122.373 in trattamento con BF e 367.125 in soggetti non trattati. Assumendo un'incidenza di ONM di un caso su 10.000 soggetti trattati, il campione disponibile dovrebbe essere sufficiente per stimare un rapporto di tassi (i.e. rapporto tra incidenze tra soggetti trattati e non trattati) di 3.2 o maggiore, accettando una significatività del 5% ed un potere dell'80%.

3. CONCLUSIONI

Il crescente interesse degli studi osservazionali per la valutazione del profilo di rischio-beneficio dei farmaci ha accresciuto l'esigenza di definire degli standard di etica e qualità, dimostrato peraltro dalla pubblicazione di sempre più numerose linee guida sull'argomento.

È auspicabile che l'uso di standard di qualità certificati dovrebbe portare sia ad un aumento costante della qualità degli studi osservazionali, sia ad un aumento del valore strategico di questi studi nei processi decisionali da parte delle autorità sanitarie.

È pertanto interesse comune di tutti i ricercatori che si occupano di valutazione dei farmaci svolgere nel rispetto di tali standard le proprie ricerche.

BIBLIOGRAFIA

1. Concato J, Shah N, Horwitz RI. Randomized, controlled trials, observational studies, and the hierarchy of research designs. *N Engl J Med.* 2000; 342:1887-92
2. D'Agostino RB Jr. Overview of missing data techniques. *Methods Mol Biol.* 2007;404:339-52.
3. ISPE Guidelines for good pharmacoepidemiology practices (GPP) *Pharmacoepidemiology and drug safety* 2008; 17: 200-8
4. Johnson ES. Bias on withdrawing lost subjects from the analysis at the time of loss, in cohort mortality studies, and in follow-up methods. *J Occup Med.* 1990; 32: 250-4.
5. Linee Guida EMA www.ema.europa.eu/pdfs/human/euleg/9626805en.pdf
6. Mazzaglia G, Ambrosioni E, Alacqua M, Filippi A, Sessa E, Immordino V, Borghi C, Brignoli O, Caputi AP, Cricelli C, Mantovani LG. Adherence to antihypertensive medications and cardiovascular morbidity among newly diagnosed hypertensive patients. *Circulation.* 2009; 120: 1598-605
7. Rothman KJ, et al. *Modern Epidemiology.* 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Raven; 1998:74-5.
8. Strom BL (2000). *Pharmacoepidemiology.* 3rd ed. Chichester, England: JohnWiley & Sons Ltd
9. van der Hooft CS, Heeringa J, Brusselle GG, Hofman A, Witteman JC, Kingma JH, Sturkenboom MC, Stricker BH. Corticosteroids and the risk of atrial fibrillation. *Arch Intern Med.* 2006; 166: 1016-20.
10. Van Spall HG, Toren A, Kiss A, Fowler RA. Eligibility criteria of randomized controlled trials published in high-impact general medical journals: a systematic sampling review. *JAMA.* 2007 ;297: 1233-40
11. Vandembroucke JP, von Elm E, Altman DG, Gøtzsche PC, Mulrow CD, Pocock SJ, Poole C, Schlesselman JJ, Egger M; STROBE initiative. Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE): explanation and elaboration. *Ann Intern Med.* 2007; 147: W163-94.

Il futuro della ricerca in farmacologia clinica. L'esperienza del centro di ricerche del Consorzio Universitario Unifarm

Filippo Drago

Dipartimento di Farmacologia Sperimentale e Clinica - Università di Catania

Presiedo Unifarm fin dalla sua istituzione avvenuta il 24 Luglio del 2002 (primo Centro di questo tipo realizzato in Italia), a coronamento di un progetto che intendeva realizzare nel Sud d'Ita-

lia un Centro di eccellenza per la ricerca di Farmacologia Clinica.

Unifarm è un Consorzio costituito tra l'Università di Catania e dodici tra le principali aziende farmaceutiche operanti in Italia.

È rappresentato da un Consiglio d'Amministrazione e supportato da un Comitato Scientifico, il cui Presidente è il Rettore dell'Università di Catania. Il primo importante obiettivo raggiunto

dal Consorzio è stato la realizzazione di un Centro di Ricerche, che è stato inaugurato il 21 Luglio 2003 e che si è arricchito nel tempo con le apparecchiature più sofisticate per la ricerca analitica applicata alla farmacocinetica, tra cui HPLC con rivelatori UV/VIS diode array e coul array, un HPLC massa, e ICP/AES. Lo scopo iniziale del Consorzio era quello di realizzare un polo di ricerca finalizzato al coordinamento e alla conduzione di studi di Fase I e II per lo sviluppo di nuovi farmaci. Successivamente, gli interessi di Unifarm si sono ampliati, ed un secondo importante obiettivo raggiunto dal Consorzio è stato quello di ottenere nel 2008 la registrazione presso l'AIFA come CRO dedicata non solo "alla promozione, al coordinamento ed alla esecuzione" di studi di Farmacologia Clinica, ma anche "alla esecuzione di prove di equivalenza farmaceutica in vitro; all'attività come Organizzazione di Ricerca a Contratto con esecuzione del project management, monitoraggio, attività di quality assurance e reporting per studi di fase I, II, III e IV; ad audit in GCP/GLP presso i centri (documentazione di studio, di sistema, etc.); ad attività autorizzative (selezione ed autorizzazione dei centri sperimentali; aggiornamento dati dell'Osservatorio sulle Sperimentazioni Cliniche; coordinamento rapporti con i Comitati Etici e autorità competenti in corso di sperimentazione, etc.); alla ricerca e sviluppo di nuovi farmaci, nuove applicazioni farmacologiche, nuove formulazioni farmaceutiche, redazione di expertise farmaco-tossicologiche; consulenza regolatoria; servizio di farmacovigilanza; Health Technology Assessment (HTA); preparazione e revisione di Procedure Operative Standard. Il Consorzio, inoltre, promuove e organizza attività di formazione professionale, teorica

e pratica, nell'ambito delle tematiche attinenti le sperimentazioni cliniche".

Nel corso della sua attività di ricerca (documentata da importanti pubblicazioni scientifiche su riviste internazionali), il Centro di Ricerche del Consorzio Unifarm ha eseguito studi clinici e/o bioanalitici su numerose molecole, tra cui carbonato di litio, triazolam (ispezionato dall'AIFA), prulifloxacin, simvastatina, tiocolchicoside, fexofenadina, acetilcarnitina, desametasone, risperidone, escitalopram. È titolare di alcuni brevetti di nuove entità chimiche e/o d'uso per farmaci già noti. Ha contribuito alla creazione del PIN ("Phase I Italian Network"), insieme con i Centri di Cagliari (Sardegna Ricerche Fase 1), Chieti (Clinical Research Center CRC), Pisa (Centro Ricerche) e Verona (Centro Ricerche Cliniche Verona), che in collaborazione con l'AIFA ha rappresentato i Centri italiani dedicati alla ricerca di Fase I al Congresso DIA (Drug Information Association) di San Diego del 2009. Questo Network rappresenta, a mio avviso, un importante esperimento di collegamento tra Centri di elevata professionalità che in futuro potrà contribuire alla crescita ed allo sviluppo delle ricerche di Fase I in Italia. Il Consorzio Unifarm si è proposto di coordinare il PIN, con l'invio periodico di un bollettino che riporta le novità in ambito regolatorio circa ricerche di biodisponibilità e di Fase I/II a livello internazionale.

Purtroppo, ancora oggi l'Italia è molto indietro rispetto ai maggiori Paesi europei circa le ricerche di Fase I. Già diversi anni fa, è stata introdotta una nuova normativa che facilita il percorso amministrativo delle autorizzazioni da parte dell'Istituto Superiore di Sanità per l'accesso alla Fase I e che rende, quindi, più appetibile alle Aziende Farmaceutiche

la conduzione di studi di questo genere. Bisogna considerare che ancora oggi, gli studi di Fase I/II rappresentano meno del 6% del totale delle ricerche cliniche con i farmaci di tipo pre-registrativo. La questione è ancora più rilevante se si pensa che queste ricerche sono le più importanti dal punto di vista strategico per lo sviluppo di un nuovo farmaco: ciò vuol dire che l'impegno finanziario globale delle Aziende Farmaceutiche in Italia è stato finora limitato principalmente alla conduzione di studi multicentrici della fase finale dello sviluppo di un farmaco (la Fase IV), facendo mancare al nostro Paese il ruolo di protagonista nello scacchiere degli investimenti di queste Aziende per le nuove entità chimiche sviluppate in clinica.

Per queste ragioni, è necessario che un Centro di Farmacologia Clinica come quello del Consorzio Unifarm debba sapere espandere la propria expertise rinnovando le aree di interesse. Una nuova prospettiva, in questo senso, è quella della ricerca nel campo degli integratori alimentari e dei principi attivi di alimenti che vantano azione terapeutica. L'Unifarm ha già eseguito un importante studio in questo campo, dimostrando che l'aggiunta di inulina può aumentare la concentrazione plasmatica di isoflavoni della soia, probabilmente per effetto di una facilitazione del loro assorbimento intestinale (Piazza et al, 2007). Altre ricerche sono in corso per la valutazione dell'effettiva biodisponibilità di principi attivi presenti in alimenti che vantano effetti terapeutici.

BIBLIOGRAFIA

Piazza C, Privitera MG, Melilli B, Incognito T, Marano MR, Leggio GM, Roxas MA, Drago F. Influence of inulin on plasma isoflavone concentrations in healthy postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 2007;86: 775-80



**SOCIETÀ ITALIANA
DI FARMACOLOGIA**

35° CONGRESSO NAZIONALE DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI FARMACOLOGIA

Bologna, 14-17 settembre 2011

Per informazioni:

Società Italiana di Farmacologia

Segreteria Organizzativa

Viale Abruzzi, 32 - 20131 Milano Tel. 02.29520311 - Fax 02.29520179

Sito web: <http://www.sifweb.org>

E-mail: sif.informazione@segr.it - sif.farmacologia@comm2000.it

**SOCIETÀ ITALIANA
DI FARMACOLOGIA**

Viale Abruzzi, 32 - 20131 Milano

e-mail: franconi@uniss.it

e-mail: sifcese@comm2000.it

Web site: www.sifweb.org

CONSIGLIO DIRETTIVO

Presidente:

Carlo Riccardi

Presidente-eletto:

Pier Luigi Canonico

Segretario:

Liberato Berrino

Past President:

Achille Patrizio Caputi

Consiglieri:

Paola Castellani, Elisabetta Cerbai,

Alessandra Concas, Patrizia Hrelia,

Pierluigi Navarra, Marcello Tonini

Quaderni della SIF

Comitato di Redazione:

Giovanni Biggio, Sandra

Brunelleschi, Pierluigi Canonico,

Ida Ceserani, Diana Conte

Camerino, Carlo Riccardi,

Francesco Rossi

Direttore Responsabile:

Flavia Franconi

Pubblicazione iscritta nel

Registro Stampa

Tribunale di Milano in data

11 marzo 2005 - N° 528

La rivista è pubblicata con grant educazionale di:

ratiopharm