



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE

INDIRIZZO: SCIENZE CLINICHE VETERINARIE

CICLO XXI

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**ANESTESIA IN CORSO DI TOMOGRAFIA AD EMISSIONE DI
POSITRONI (PET) IN PRIMATI NON UMANI COME MODELLO
SPERIMENTALE DELLA MALATTIA DI PARKINSON**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Massimo Morgante

Supervisore: Ch.mo Prof. Roberto Busetto

Dottorando: Paola Guarnieri

RIASSUNTO

Restano ancora molti problemi da risolvere nella comprensione della patogenesi della malattia di Parkinson, per consentirne un approccio terapeutico adeguato ed il più possibile soddisfacente. A questo scopo, le ricerche che si avvalgono dei primati non umani come modello sperimentale della malattia di Parkinson sono attualmente ritenute cruciali per lo sviluppo di nuove terapie.

Questo studio, che fa parte di una più ampia ricerca sull'efficacia del trapianto di cellule staminali in primati non umani dopo l'induzione della malattia di Parkinson, si propone di valutare le possibili differenze nella risposta anestesiológica utilizzando il medesimo protocollo in uno stesso gruppo di primati non umani prima da sani, dopo induzione della malattia di Parkinson ed infine in seguito a xenotrapianto neuronale.

Compito fondamentale del medico veterinario che si occupa della sperimentazione animale è infatti quello di evitare all'animale quanto più possibile ogni situazione di sofferenza, dolore, stress e distress; indispensabile, a questo scopo, è lo studio di un protocollo anestesiológico che consenta l'esecuzione delle procedure diagnostiche e chirurgiche previste dalla sperimentazione nel contesto del rispetto quanto maggiore possibile del benessere animale.

I primati non umani utilizzati in questo studio vengono sottoposti all'associazione anestesiológica di ketamina e xylazina per permettere l'esecuzione della metodica diagnostica, la tomografia ad emissione di positroni (PET), necessaria per valutarne l'evoluzione dei cambiamenti neurodegenerativi cerebrali: da sani, dopo intossicazione con MPTP e, infine, dopo lo xenotrapianto neuronale.

Durante l'esecuzione di tutta la procedura diagnostica, per mantenere un livello di sedazione ottimale e garantire un controllo quanto più possibile attento ad eventuali alterazioni degli apparati cardiovascolare e respiratorio dei singoli soggetti, sono stati monitorati accuratamente i relativi parametri.

Nel complesso, il protocollo utilizzato nella nostra sperimentazione ha soddisfatto sia le esigenze di garanzia per un piano anestesiológico costante ed

adeguato nello svolgimento della procedura diagnostica, sia quelle relative alle necessità di tutela del benessere degli animali, evidenziando alcune importanti variazioni nelle risposte anestesiolgiche dei soggetti sottoposti alle diverse fasi della sperimentazione.

Durante lo svolgimento del nostro studio abbiamo potuto osservare che, similmente a quanto accade nel paziente umano con malattia di Parkinson, dopo l'intossicazione alcuni soggetti hanno sviluppato una forma clinica ipercinetica, dominata in prevalenza dal tremore; in questi soggetti il protocollo anestesiolgico utilizzato, nonostante la somministrazione di dosi suppletive, non è stato in grado di controllare questi movimenti involontari.

Tutti i soggetti dopo intossicazione hanno presentato un aumento della frequenza cardiaca e una diminuzione sia della pressione arteriosa sistolica che diastolica; la diminuzione della pressione arteriosa negli animali intossicati sottolinea l'importanza nel dover fornire un sostegno alla funzione circolatoria mediante l'utilizzo di fluidoterapia durante l'intero svolgimento del protocollo anestesiolgico.

I dati raccolti nel corso del nostro studio evidenziano con certezza che i soggetti dopo intossicazione riducono significativamente la loro frequenza respiratoria e, così come riportato in bibliografia a riguardo dei pazienti umani con malattia di Parkinson, necessitano di particolari attenzioni per quanto concerne la funzionalità respiratoria.

Per quanto statisticamente poco significativi, poiché riferiti a tre primati che al momento della stesura del presente lavoro erano stati sottoposti a xenotrapianto neuronale, i dati ottenuti dopo il trattamento chirurgico sono risultati dimostrarsi comunque interessanti, in particolar modo nell'evidenziare un significativo recupero della funzionalità motoria e, probabilmente, anche del controllo della capacità respiratoria compensatoria dei soggetti.

ABSTRACT

There are still many problems to solve in understanding the pathogenesis of Parkinson's disease, in the attempt to achieve a therapeutic approach that could be adequate and satisfactory as much as possible. To this end, researches making use of nonhuman primates as experimental models of Parkinson's disease are now considered crucial towards the development of new therapies. The focus of this study, which is part of a broader research on the effectiveness of stem cell transplantation in nonhuman primates after the induction of Parkinson's disease, is to evaluate the possible differences in response to anesthesia, using the same protocol inside the same group of non-human primates, from healthy, after induction of Parkinson's disease and, finally, after neural xenotransplantation.

A fundamental task of the veterinarian in charge of the animal experimentation is in fact to prevent the animal as much as possible any situation of suffering, pain, stress and distress; for this purpose, it's indispensable the study of an anesthesia protocol that allows the implementation of diagnostic and surgical procedures, provided for an experimentation context of the greatest possible respect for the animal welfare. The nonhuman primates that were used in this study were submitted to the association of ketamine and xylazine anesthesia, to permit a proper execution of the diagnostic method (positron emission tomography -PET) in evaluating the development of the neurodegenerative changes in brain: from healthy, after intoxication with MPTP and, finally, after neural xenotransplantation. During the execution of the entire diagnostic procedure, to maintain an optimal level of sedation, we supervised as closely as possible any changes in the cardiovascular and respiratory systems of any individual subjects, which related parameters were carefully monitored. Overall, the protocol used in our experiment satisfied both demands: first, a plan to guarantee a continuous and adequate anesthesia in performing the diagnostic process, furthermore the need to protect the animal's welfare, highlighting some important changes in anesthetic responses of the subjects undergoing the various stages of testing. In the course of our study we observed that, similarly to what happens in the human patients with Parkinson's disease, after poisoning with MPTP some animals developed a clinical hyperkinetic form, dominated mainly by the tremor; in these subjects, the anesthesia protocol we used, despite the administration of some supplementary doses, has not been able to control these involuntary movements.

After poisoning, all subjects have been reports about an increased heart rate and a decreasing level in both systolic and diastolic blood pressure; the decreased blood pressure in the intoxicated animals stresses the importance on the need to support the circulatory function, using fluids during the whole anesthesia protocol. The data collected during our study show with certainty that the subjects after the intoxication significantly reduced their breathing rate and, as reported in the literature about human patients with Parkinson's disease, they require special attention in relation to their respiratory function. Although statistically insignificant, as the only three animals reported be subjected to neural xenotransplantation at the time of writing this work, the animals' data obtained after the surgery

still proved to be very interesting, particularly in highlighting a significant recovery of the motor function and probably also above the compensatory respiratory control and capacity of these subject.

SEZ.1-INTRODUZIONE	8
CAP.1-MALATTIA DI PARKINSON	12
<i>CAP. 1.2- EZIOLOGIA DELLA MALATTIA DI PARKINSON</i>	14
<i>CAP. 1.3- PATOGENESI DELLA MALATTIA DI PARKINSON</i>	17
<i>CAP. 1.4- SINTOMATOLOGIA DELLA MALATTIA DI PARKINSON</i>	22
<i>CAP. 1.5- DIAGNOSI DELLA MALATTIA DI PARKINSON</i>	25
<i>CAP. 1.6- TRATTAMENTO DELLA MALATTIA DI PARKINSON</i>	32
CAP. 2 RUOLO DEI MODELLI SPERIMENTALI NELLO STUDIO DELLA MALATTIA DI PARKINSON E DEI PARKINSONISMI	45
CAP.3 PRIMATI NON UMANI COME MODELLI DI PATOLOGIA DI PARKINSON	49
CAP.4 CONSIDERAZIONI ANESTESIOLOGICHE	67
<i>4.a TECNICHE E SOMMINISTRAZIONI ANESTESIOLOGICHE</i>	68
<i>4.b PREMEDICAZIONE</i>	68
<i>4.c KETAMINA CLORIDRATO</i>	69
<i>4.d XILAZINA</i>	73
<i>4.e COMBINAZIONI DI ANESTETICI DISSOCIATIVI</i>	77
<i>4.f MONITORAGGIO ANESTESIOLOGICO E PROFONDITA' DELL'ANESTESIA</i>	77
<i>4.h ANESTESIA PER METODICHE DIAGNOSTICHE COMPLESSE</i>	79
<i>4.i TRATTAMENTI POST ANESTESIA</i>	79
CAP. 5 CONSIDERAZIONI ANESTESIOLOGICHE IN PAZIENTI CON MALATTIA DI PARKINSON	80
SEZ.2 OBIETTIVI	86
SEZ.3-MATERIALI E METODI	88
3.a MODELLO SPERIMENTALE	88
3.b TOMOGRAFIA AD EMISSIONE DI POSITRONI	94
3.c PROTOCOLLO ANESTESIOLOGICO	96
SEZ.4- RISULTATI E DISCUSSIONE	101
4.a GESTIONE PROTOCOLLO ANESTESIOLOGICO	101
4.b APPARATO CARDIOVASCOLARE	106
4.c APPARATO RESPIRATORIO	126
4.d VALUTAZIONE DEI SOGGETTI DEL GRUPPO 3	143
SEZ.5- CONCLUSIONI	153

SEZ.1-INTRODUZIONE

La malattia di Parkinson è una patologia cronica gravemente invalidante che colpisce il 2% della popolazione umana ultraottantenne. Attualmente, la terapia farmacologica della malattia porta ad un miglioramento solo parziale della sintomatologia ed è spesso associata ad effetti collaterali legati all'uso di queste molecole. Infatti, nel caso della terapia con L-Dopa, l'impiego del farmaco è spesso associato ad effetti collaterali quali discinesia, effetti *on-off* nonché allucinazioni nei pazienti trattati (Nicholson G. *et al.*, 2002).

Restano ancora molti problemi da risolvere nella comprensione della patogenesi della malattia di Parkinson, per consentirne un approccio terapeutico adeguato ed il più possibile soddisfacente. A questo scopo, le ricerche che si avvalgono dei primati non umani come modello sperimentale della malattia di Parkinson sono tuttora ritenute cruciali per lo sviluppo di nuove terapie. In particolare, esse attualmente si focalizzano sull'utilizzo di molecole farmacologiche innovative, sull'impiego di vettori o di cellule staminali e sul trapianto di neuroni.

Il trapianto di tessuti fetali neuronali allogenic in pazienti umani affetti da malattia di Parkinson, ad esempio, ha dimostrato come molti dei neuroni fetali allotrapiantati si integravano nel parenchima neuronale dell'encefalo del ricevente, differenziandosi in seguito in neuroni maturi e sostituendo completamente i neuroni perduti (Lindvall O. *et al.*, 1990; Bjorklund A. *et al.*, 2003). Tuttavia, sia la scarsa disponibilità di tessuti umani sia le problematiche etiche connesse all'uso di feti umani nell'allottrapianto di neuroni fetali umani (Edge AS. *et al.*, 1998) hanno condotto la ricerca biomedica a proseguire per altre vie, quali ad esempio il possibile utilizzo di tessuti di origine animale, come valida alternativa alla donazione umana.

Sulla scia di questi filoni di ricerca, l'attuale sperimentazione sulla malattia di Parkinson che coinvolge l'Università degli Studi di Padova, autorizzata dal Ministero della Sanità, utilizza come modello sperimentale il primate non umano e ha come obiettivo quello di ottenere maggiori conoscenze sui processi riguardanti la patogenesi della malattia e sulla funzionalità dello xenotrapianto di cellule fetali neuronali suine.

INTRODUZIONE

Fino a pochi anni fa sembrava quasi impensabile poter superare le barriere che nei millenni si sono sviluppate tra individui di specie diverse; oggi però l'acquisizione di nuove conoscenze sui meccanismi coinvolti nel rigetto d'organo e soprattutto l'introduzione di tecniche di ingegneria genetica hanno aperto nuove speranze per una prossima applicazione dello xenotrapianto sull'uomo (CNBB, 2002). Infatti, sebbene l'encefalo sia considerato un organo particolarmente isolato dal punto di vista immunologico, lo xenotrapianto di neuroni va comunque incontro a rigetto, potenzialmente imputabile all'attivazione delle cellule T del ricevente (Melchior B. *et al.*, 2002).

Di conseguenza, numerose ricerche hanno dimostrato che, per ottenere una durata stabile di xenotrapianti neuronali, risultano necessari o un trattamento immunosoppressivo ad alte dosi o la manipolazione genetica dei tessuti animali da trapiantare (Pedersen EB. *et al.*, 1997; Fink JS. *et al.*, 2000).

Quando si parla di xenotrapianti, però, oltre alla ricerca di un adeguato protocollo operativo, di una specie donatrice e di un'efficace immunosoppressione o manipolazione genetica, non si possono trascurare gli aspetti di carattere etico e di biosicurezza (CNBB, 2002).

L'utilità dei primati non umani come modelli sperimentali per lo sviluppo di nuovi fattori terapeutici per la malattia di Parkinson è direttamente correlata alla loro capacità di rappresentare accuratamente le caratteristiche della malattia stessa; infatti, gli elementi distintivi dei primati sono strettamente analoghi a quelli umani, per similitudini filogenetiche e comportamentali, in particolar modo relativamente alla struttura tissutale, al sistema immunitario, alla fisiologia e al metabolismo.

L'interesse invece della ricerca medica verso la specie suina come donatrice è dettato soprattutto dal fatto che essa:

- ha fisiologia ed anatomia simile a quella umana;
- presenta un alto tasso di fertilità ed è facilmente allevabile;
- essendo già ampiamente utilizzata a scopo alimentare, il suo utilizzo riduce le obiezioni etiche di gran parte della popolazione (CNBB, 2002).

L'utilizzo del maiale come donatore pone però alcune difficoltà, causate dai possibili rischi di zoonosi (PERV- retrovirus endogeno del suino) e dalla sua relativamente scarsa affinità immunologica con l'uomo (Corbellini G., 2001). Un grosso passo avanti nella limitazione del rigetto, in particolare di quello acuto, è

INTRODUZIONE

stato ottenuto producendo ed utilizzando animali geneticamente modificati, impiegati anche nella presente sperimentazione (Buhler L. *et al.*, 1999).

Un altro aspetto da considerare durante la sperimentazione è quello della gestione degli animali utilizzati. E' infatti doveroso ricordare che tutta la ricerca che richiede l'impiego di animali deve sottostare al Decreto Legislativo 116 del 27 gennaio 1992, attuazione della direttiva CEE 609 del 1986. Il suddetto decreto definisce e disciplina la protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici.

Di particolare importanza per la sperimentazione sulla malattia di Parkinson svolta dall'Università di Padova risultano: l'articolo 3, sulle motivazioni di utilizzo degli animali e sulle specie utilizzabili, gli articoli 4 e 17, sulla programmazione, progettazione e disegno degli esperimenti, nonché sul personale autorizzato, e gli articoli 6 e 9, sull'utilizzo di anestetici, analgesici e sull'eutanasia.

Uno degli aspetti più importanti dal punto di vista del medico veterinario coinvolto nella sperimentazione è proprio quello riguardante la limitazione dello stress e del dolore negli esemplari utilizzati nell'esperimento, anche mediante l'ausilio farmacologico (Busetto R. *et al.*, 2001).

E' infatti risaputo che le reazioni da stress comportano notevoli alterazioni neuroendocrine nel paziente animale, da cui possono facilmente derivare ipermetabolismo, tachicardia, ipertensione, ipoventilazione, inibizione della funzionalità gastrointestinale e, non da ultimo, una riduzione delle risposte immunitarie (Varassi G. *et al.*, 1999).

Il trattamento del dolore e dello stress, oltre all'aspetto prettamente etico, assume un'importanza fondamentale in quanto è in grado di migliorare notevolmente l'outcome del paziente, riducendo significativamente mortalità e morbilità (Varassi G. *et al.*, 1999).

Compito fondamentale del medico veterinario che si occupa della sperimentazione animale è pertanto quello di evitare all'animale quanto più possibile ogni situazione di sofferenza, dolore, stress e distress.

Indispensabile, a questo scopo, è lo studio di un protocollo anestesilogico che consenta l'esecuzione delle procedure diagnostiche e chirurgiche previste dalla sperimentazione nel contesto del rispetto quanto maggiore possibile del benessere animale (Busetto *et al.*, 2001).

INTRODUZIONE

Nel nostro studio, gli esemplari di scimmie della specie *Macaca Fascicularis*, modelli sperimentali per la malattia di Parkinson, vengono sottoposti a tomografia ad emissione di positroni (PET), necessaria per valutarne l'evoluzione dei cambiamenti neurodegenerativi cerebrali: da sani, dopo intossicazione con MPTP e, infine, dopo lo xenotrapianto neuronale.

Per permettere l'esecuzione di tale indagine diagnostica gli animali vengono mantenuti in anestesia generale, sfruttando sempre il medesimo protocollo anestesiologicalo, al fine di ottenere dei dati standardizzabili e comparabili tra di loro.

Abbiamo quindi cercato di valutare le possibili differenze nella risposta anestesiologicala di questo gruppo di primati non umani inizialmente da sani, in seguito all'intossicazione con MPTP e, infine, dopo xenotrapianto neuronale (effettuato in tre soggetti al momento dell'elaborazione del presente lavoro).

CAP.1-MALATTIA DI PARKINSON

Il morbo di Parkinson, detto anche paralisi agitante, fu descritto per la prima volta nel 1817 dal medico inglese James Parkinson (1755-1824) nel suo trattato *An Essay on the Shaking Palsy* (London: Sherwood, Neely and Jones, 1817).

Nel 1879 Charcot notò ulteriori aspetti correlati alla malattia, tra cui disfunzioni del sistema nervoso autonomo.

Nel 1893 fu scoperta l'associazione tra la sostanza nigra e la malattia di Parkinson, ma solo nella seconda metà del ventesimo secolo vennero comprese le caratteristiche neuropatologiche e neurochimiche peculiari della malattia e quindi sviluppate mirate strategie terapeutiche (Nicholson G. *et al.*, 2002); l'alterazione biochimica che ne causa i sintomi è stata identificata solo negli anni sessanta del secolo scorso.

La malattia di Parkinson è la più comune malattia del sistema extrapiramidale ed è percentualmente la seconda tra i disordini neurodegenerativi progressivi (dopo la malattia di Alzheimer). Negli Stati Uniti approssimativamente un milione di persone sono affette da malattia di Parkinson e circa 3/4 milioni di casi non sono diagnosticati (Korell M. e Tanner CM., 2005; Emborg M., 2007).

La malattia di Parkinson è diffusa in tutto il mondo, colpisce tutti i gruppi etnici, con una veramente piccola preponderanza nel sesso maschile.

L'incidenza più bassa si segnala tra la popolazione Asiatica e quella dei neri Africani, mentre quella più alta si registra tra le popolazioni dei bianchi; essa in prevalenza aumenta esponenzialmente tra i 65 e i 90 anni, cosicché circa lo 0,3% della popolazione totale e il 3% degli over 65 ne sono colpiti.

Poiché la malattia è stata descritta formalmente per la prima volta durante la rivoluzione industriale, questo ha suggerito che tossine esogene possano avere un ruolo significativo, ma descrizioni di condizioni patologiche che assomigliano a quelle della malattia di Parkinson sono state trovate in letteratura datate migliaia di anni prima di Cristo (Nicholson G. *et al.*, 2002).

Il tratto patologico caratteristico della malattia è la perdita di neuroni dopaminergici nella pars compacta della sub stantia nigra (SNpc), nel

mesencefalo dorsale e in altri nuclei pigmentati del tronco encefalico (come il Locus Coeruleus) e la presenza di inclusioni intracitoplasmatiche chiamate corpi di Lewy, che consistono in accumuli di alfa sinucleina e ubiquitina (Emborg M., 2007).

E' stato dimostrato che negli esseri umani i nuclei della base o corpo striato (caudato e lenticolare) e la substantia nigra contengono concentrazioni elevate di dopamina. Nella malattia di Parkinson, invece, dopamina, noradrenalina e 5-idrossitriptamina sono scarsamente rinvenibili in tali strutture.

La substantia nigra, infatti, convoglia informazioni al nucleo caudato e al putamen (porzione laterale del nucleo lenticolare) mediante fibre che contengono concentrazioni elevatissime di dopamina, per cui si suppone che la malattia di Parkinson insorge per lesioni a carico del tratto nigro-striato le quali portano ad una deplezione secondaria di dopamina nei nuclei della base (Aguggini A. *et al.*, 1992).

La dopamina (o dopamina) è una ammina biogena sintetizzata naturalmente dal corpo umano. All'interno del cervello la dopamina funziona da neurotrasmettitore, tramite l'attivazione di recettori specifici D1, D2 e D3 subrecettori. La dopamina è anche un neormone rilasciato dall'ipotalamo; la sua principale funzione come ormone è quella di inibire il rilascio di prolattina da parte del lobo anteriore dell'ipofisi.

La dopamina agisce sul sistema nervoso simpatico causando l'accelerazione del battito cardiaco e l'innalzamento della pressione sanguigna.

La biosintesi della dopamina avviene, a livello centrale, a partire da L-tirosina che viene idrossilata a L-dopa. La successiva decarbossilazione porta alla dopamina. Successivi passaggi biosintetici portano prima alla noradrenalina e poi all'adrenalina. La dopamina viene rilasciata a livello centrale dalla substantia nigra e la sua azione è mirata a modulare l'attività inibitoria dei neuroni GABAergici. Dopo aver interagito con i suoi recettori, viene metabolizzata da due enzimi diversi:

- dalle MAO B (Mono-Amino-Ossidasi) ad acido 3,4-diidrossi-fenilacetico;

- dalle COMT (Catecol-O-Metil-Transferasi) ad 3-metossi-tiramina (Auggini A. *et al.*, 1992).

Le alterazioni che sono alla base della malattia di Parkinson producono, oltre ad una diminuzione dell'innervazione dopaminergica, anche un'aumentata stimolazione colinergica. Lo squilibrio tra i sistemi neurotrasmettitoriali sembra dunque essere alla base della malattia, anche se il ruolo della dopamina è chiaramente centrale (Auggini A *et al.*, 1992; Nicholson G. *et al.*, 2002).

CAP. 1.2- EZIOLOGIA DELLA MALATTIA DI PARKINSON

I motivi per cui si verifica un improvviso blocco nella produzione di dopamina da parte delle cellule dei gangli posti alla base del cervello sono ancora sconosciuti, anche se sono state avanzate varie ipotesi, tra le quali prevalgono quelle di origine genetica o tossica (Nicholson G. *et al.*, 2002).

Sebbene, quindi, l'eziologia della malattia di Parkinson sia ancora sconosciuta è oramai accettata l'ipotesi di un'origine multifattoriale, nella quale interagiscono componenti ambientali e genetici.

Sono stati proposti, nel corso degli anni, diversi fattori eziologici: ereditarietà, lesioni cerebrali, infezioni, neurotossine endogene, fattori ambientali e alterate espressioni geniche (Emborg EM., 2007).

Il parkinsonismo farmaco-indotto deriva dal blocco dei recettori della dopamina, dovuto all'utilizzo di farmaci quali fenotiazine, butirrofenoli e metoclopramide.

I ricercatori hanno identificato vari fattori di rischio, tra i quali l'esposizione ai pesticidi (sostanze tossiche), il trauma cranico, l'arteriosclerosi e l'invecchiamento (Allam MF. *et al.*, 2005; Emborg M., 2007).

Mutazioni genetiche avvengono in rari casi familiari di malattia di Parkinson, ma la maggior parte dei casi della malattia sono sporadici nella popolazione (Hardy J. *et al.*, 2006).

L'età costituisce il fattore di rischio più consistente ed è stato stimato un potenziale di accumulo durante il tempo di vita di 1 su 40 per lo sviluppo della malattia di Parkinson, che colpisce approssimativamente il 3% della

MALATTIA DI PARKINSON

popolazione al di sopra dei 65 anni di età, con una leggera prevalenza del sesso maschile (Nicholson G. *et al.*, 2002).

La perdita di cellule pigmentate nella sostanza nigra, infatti, è il ritrovamento più consistente nella malattia di Parkinson e normalmente la quantità di cellule della sostanza nigra diminuisce da 425.000 a 200.000 ad 80 anni (Nicholson G. *et al.*, 2002): viene meno così la protezione delle cellule contenenti dopamina ed il cervello delle persone anziane è, inevitabilmente, più predisposto alla malattia di Parkinson.

In ogni caso la malattia di Parkinson è un disturbo caratterizzato dalla progressiva degenerazione e dalla morte dei neuroni produttori di dopamina, cosicché quando questi neuroni scendono sotto la soglia del 30%, compaiono i primi sintomi tipici della malattia.

Clinicamente il morbo di Parkinson può essere confuso con i molti parkinsonismi, rispetto ai quali però manca di una causa identificabile.

Il fatto che la malattia di Parkinson, pur presentando sintomi piuttosto specifici, sia stata descritta per la prima volta solo nel 1800 costituisce un indizio a favore dell'ipotesi tossica, che ne fa risalire la causa ad una sostanza chimica prodotta dall'inquinamento ambientale, ipotesi questa mai del tutto confermata ma tuttora presa in considerazione dalla ricerca scientifica. L'ipotesi tossica è stata ulteriormente avvalorata dalla scoperta di una particolare tossina (MPTP), che è causa di una patologia irreversibile simile al Parkinson.

La tossicità di MPTP è dovuta all'inibizione del complesso 1 della catena di trasporto mitocondriale di elettroni, che conduce ad una mancanza di ATP ed alla morte delle cellule.

Questa scoperta ha aperto la via alla ricerca di cause tossiche per spiegare la genesi della malattia (il rischio sembra più elevato in ambiente rurale, forse in relazione all'uso di pesticidi). La possibile genesi derivante da causa tossica è emersa anche alla fine degli anni settanta, quando fu riscontrato che numerosi pazienti in gioventù avevano fatto uso di sostanze stupefacenti contenenti MPTP.

MALATTIA DI PARKINSON

A livello epidemiologico circostanze interessanti riguardano il fatto che il Parkinson affligge solo i non fumatori, il che ha lasciato supporre che la nicotina possa assolvere a una funzione protettiva. Questo effetto è stato attribuito all'inibizione della monoammina ossidasi di tipo B dai prodotti della combustione del tabacco.

Quanto all'ipotesi ereditaria, essa non pare confermata da studi su gemelli identici: la diagnosi di Parkinson in uno dei due non aumenta la probabilità che l'altro fratello possa contrarre la malattia, quantomeno in forma conclamata. Tuttavia, studi più recenti, effettuati per mezzo della tomografia ad emissione di positroni, sembrano attribuire all'ipotesi genetica un'importanza maggiore.

Certamente esiste una componente ereditaria nella predisposizione a sviluppare la malattia, ma solo il 10% circa dei malati ha un familiare affetto. La componente genetica sembra essere più importante nei casi ad esordio precoce.

La maggior parte delle prove disponibili supportano un'ereditabilità autosomica dominante della malattia, ma molti pazienti non dimostrano questa modalità di trasmissione ereditaria; questo può riflettere il fatto che i geni-causa abbiano una bassa penetranza, oppure che la malattia abbia origine multifattoriale.

Ad oggi, l'identificazione dei geni coinvolti nel sistema dopaminergico si è dimostrata piuttosto deludente: la scoperta di due distinte mutazioni nel gene alfa-sinucleina (SNCA), localizzate nel cromosoma 4q, sembrano essere il principale fattore scatenante la malattia.

Un'altra ipotesi attribuisce un ruolo patogenetico a prodotti del catabolismo endogeno che, producendo radicali liberi, danneggerebbero le cellule della sostanza nigra (Nicholson G. *et al.*, 2002).

Un'ulteriore ipotesi imputa alla microglia (sistema immunitario cerebrale) un ruolo importante, dato che la *substantia nigra* dei pazienti contiene microglia molto attiva (forse a causa di un aumento di citochine), stimolando la produzione di radicali liberi e i correlati danni ossidativi nei neuroni.

MALATTIA DI PARKINSON

Prove relative alle abitudini dietetiche tra i pazienti affetti dalla malattia di Parkinson sono state inconcludenti, sebbene uno studio abbia evidenziato un basso livello di vitamina E nei pazienti affetti dalla malattia rispetto ai soggetti di controllo.

In conclusione, la maggior parte dei casi di sviluppo della malattia di Parkinson derivano probabilmente da una combinazione sia di fattori genetici che ambientali, e questa interazione può variare in modo soggettivo e peculiare negli individui.

Mutazioni genetiche possono predisporre i pazienti allo sviluppo della malattia di Parkinson se combinate con altre mutazioni genetiche o con fattori ambientali negativi (Nicholson G. *et al.*, 2002).

CAP. 1.3- PATOGENESI DELLA MALATTIA DI PARKINSON

La malattia di Parkinson è caratterizzata da una morte progressiva di popolazioni di neuroni selezionati, ma eterogenei, che includono i neuroni dopaminergici della parte compatta della substantia nigra.

La substantia nigra mostra inoltre marcata sostituzione delle cellule (<100000) con deposito di gliosi.

Nella substantia nigra dei pazienti con malattia di Parkinson, infatti, sono stati rinvenuti gliosi astrocistica, neuromelamina extracellulare, macrofagi neuromelamin-trasportatori e corpi pallidi (Robinson CA. e Rajput AH., 2005).

Si riscontra un 30-40% di decremento nell'attività del complesso 1 nelle parti di substantia nigra compatta che può contribuire alla perdita di energia e predisporre la parte compatta agli insulti tossici, aumentando la suscettibilità di morte cellulare; diminuisce inoltre anche la tirosin beta-idrossilasi che determina il grado di sintesi della dopamina, le rimanenti cellule contengono i corpi di Lewy eosinofilici particolarmente caratteristici.

Tuttavia, la modalità di perdita delle cellule della substantia nigra nella malattia di Parkinson differisce da quella dovuta al normale invecchiamento.

MALATTIA DI PARKINSON

Nella malattia di Parkinson la perdita di cellule si origina in predominanza dalla porzione ventrolaterale della substantia nigra, ma questa regione è relativamente risparmiata nei soggetti normali.

Inoltre, se l'invecchiamento fisiologico costituisce il principale meccanismo che induce il declino funzionale nel tempo, questo non spiega in modo adeguato l'enorme variabilità interindividuale nel tasso di progressione clinica della malattia (Nicholson G. *et al.*, 2002).

Il preciso meccanismo responsabile della morte delle cellule è ancora largamente sconosciuto e può essere innescato da: disfunzione mitocondriale, stress ossidativo, azioni di excitotossine con conseguente eccessiva formazione di ossido nitrico, deficienza di supporto neurotrofico o meccanismi immunitari.

Sebbene ancora controverso, il percorso finale comune sembra essere l'induzione di apoptosi nei neuroni dopaminergici nigrali.

La disfunzione mitocondriale e il metabolismo ossidativo sono infatti i componenti maggiori di molte teorie contemporanee sulla malattia di Parkinson. Lo stress ossidativo può essere causato da un aumento nel numero di microelementi reattivi inclusi ioni di idrogeno, superossidi, radicali perossili, acido nitrico e radicali idrossili; questi reagiscono con le proteine, i lipidi e gli acidi nucleici, alterandone le strutture e le relative funzioni e provocando danni cellulari.

Tra gli altri fattori implicati nella patogenesi della malattia, la persistente attivazione dei recettori del glutaminergico N-metil-D-aspartato (NMDA) conduce ad un aumento delle concentrazioni intracellulari di calcio, inducendo l'attivazione di proteasi, endonucleasi, fosfolipasi e ossido nitrico sintetasi, che a turno generano radicali liberi reattivi di ossido nitrico, rilascio di ferro da ferritina e la perossidazione dei lipidi.

Fattori neurotrofici sono importanti nella funzione neuronale e in adeguate concentrazioni causano la morte apoptotica di cellule.

Sia il fattore neurotrofico gliale derivato (GDNF) che il fattore neurotrofico cerebro-derivato (BDNF) sono potenti protettori e agenti rigenerativi: studi condotti sugli animali hanno suggerito che questi fattori neurotrofici possano

MALATTIA DI PARKINSON

mancare nella malattia di Parkinson, portando ad una degenerazione delle cellule dopaminergiche.

Per finire, anche fattori immunitari possono contribuire alla perdita di cellule neuronali (Nicholson G. *et al.*, 2002).

Aumentate concentrazioni di citochine sono state trovate nella substantia nigra al progredire della malattia, ma non è chiaro se il loro ruolo sia primario o secondario.

Anatomicamente, la malattia di Parkinson è caratterizzata da una perdita di neuroni dopaminergici nella substantia nigra dei gangli basali.

I gangli basali si rapportano alle aree basali del cervello anteriore e del cervello medio conosciute per essere coinvolte nel controllo del movimento; esse includono lo striatum, che comprende principalmente il nucleo caudato e il nucleo lenticolare (in cui si distingue una porzione più scura laterale detta putamen ed una più chiara mediale, il lobo pallido), il nucleo subtalamico e il principale componente pigmentato della substantia nigra, conosciuto come "pars compacta" (Aguggini A. *et al.*, 1992).

Clinicamente il circuito motorio principale trae origine nella corteccia sensoriomotoria e finisce nell'area motrice supplementare. La parte centrale del circuito si divide in due percorsi, che si dipanano dallo striato al talamo.

Esiste un percorso diretto con un solo passaggio attraverso la parte interna del lobo pallido e un percorso indiretto suddiviso in tre tappe attraverso il lobo pallido esterno, il nucleo subtalamico e il lobo pallido interno. Quindi il lobo pallido interno è comune ad entrambi i percorsi.

Il percorso nigro-striatale si proietta dalla parte compatta della substantia nigra fino allo striatum, dove genera due tipi di sinapsi sulle proiezioni neuronali (Figura 1).

MALATTIA DI PARKINSON

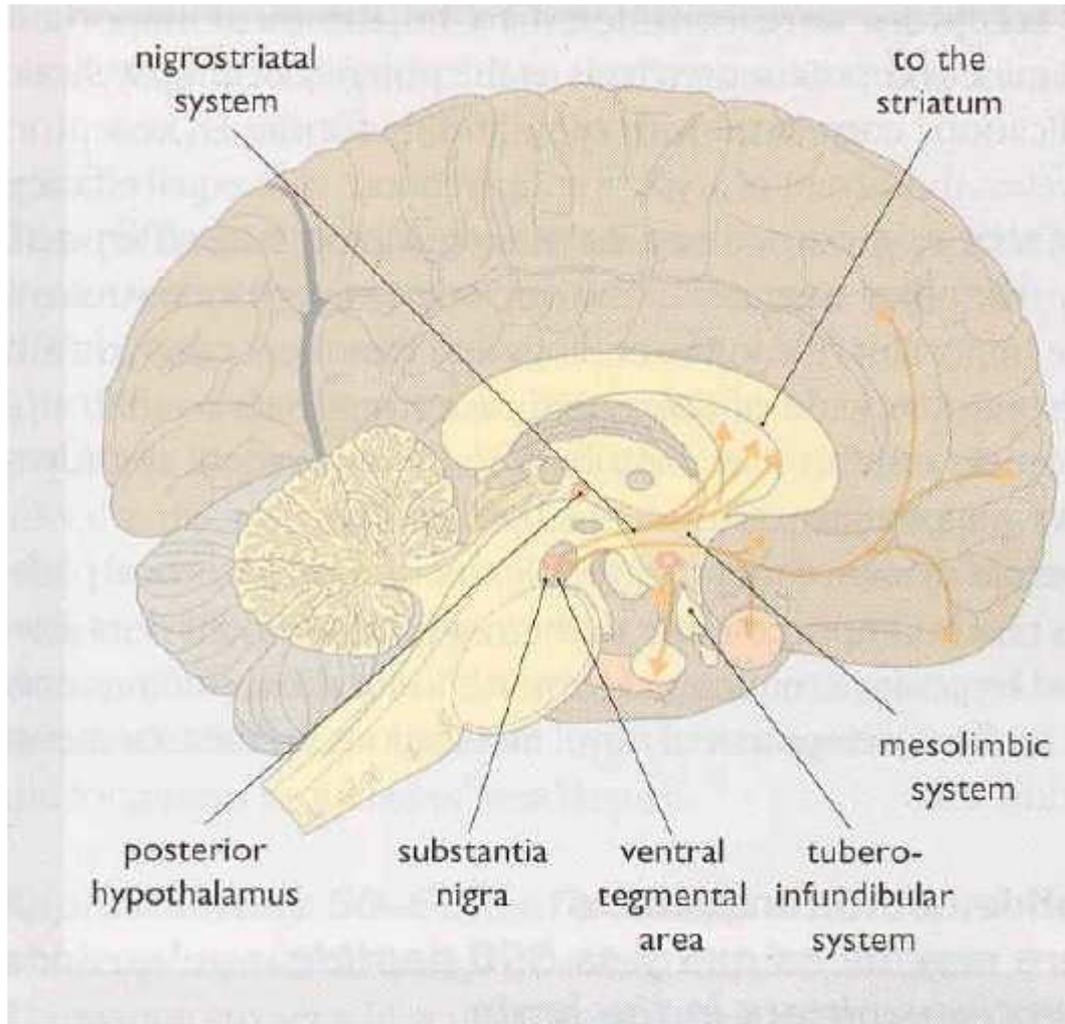


Fig.1 Vie dopaminergiche centrali (Brunetti L., 2006)

Una sostanza nigra normale è tonicamente attiva, favorendo l'attività nel percorso diretto. La facilitazione della via diretta è necessaria affinché la corteccia motoria supplementare diventi attiva prima e durante i movimenti (Nicholson G. *et al.*, 2002).

I neuroni del percorso diretto sono facilitati tramite recettori dopaminergici di tipo I (D1) sulle diramazioni dendritiche e i neuroni del percorso indiretto sono inibitori attraverso recettori D2.

I neuroni internucleari colinergici sono eccitatori sui neuroni cognitivi e sono inibiti dalla dopamina.

MALATTIA DI PARKINSON

Nella malattia di Parkinson l'acetilcolina si trova in quantità normali nello striatum; tuttavia la deficienza di dopamina produce un disequilibrio nel rapporto tra dopamina /acetilcolina, aggravando in questo modo i sintomi della malattia.

Un decremento nella produzione di dopamina si traduce in una facilitazione del percorso indiretto a causa di una mancanza di una stimolazione di D1 del percorso diretto e di una inibizione dei D2 del percorso indiretto.

Questo stato di deficienza di dopamina è associato ad un aumento nell'attività dei nuclei inibitori nei gangli basali (utilizzanti l'acido gamma ammino butirrico GABA come neurotrasmettitore), portando ad un eccesso di inibizione e avendo come effetto un blocco repentino dei nuclei talamici e dei nuclei del tronco encefalico, che ricevono i flussi in arrivo dai gangli basali.

Un'eccessiva inibizione talamica produce una soppressione del sistema motorio corticale con conseguente acinesia, rigidità e tremore, mentre l'inibizione dell'area locomotoria del tronco encefalico può contribuire ad anomalie di postura ed andatura (Nicholson G *et al.*, 2002).

Una diminuzione, quindi, nell'ordine dell'80% o più della dopamina (DA 1) nello striatum, la principale area del cervello di proiezioni di neuroni dopaminergici, è responsabile del manifestarsi della sindrome motoria.

Questa riduzione è associata alla perdita del 50% o più di cellule dopaminergiche, principalmente nel SNpc.

Il sistema nigrostriatale compensa piccole perdite, probabilmente attraverso la supersensibilità di recettori dopaminergici, aumentando la produzione di dopamina delle restanti cellule, o tramite altri adattamenti plastici (Przedborski S. *et al.*, 2003).

Altre aree del cervello che possono mostrare gradi variabili di coinvolgimento durante la patologia, includono le seguenti (Robinson CA. e Rajput AH., 2005):

- il locus coeruleus, la principale fonte di innervazione noradrenergica nel sistema nervoso centrale;
- il nucleo basale di Meynert, la principale fonte di innervazione colinergica delle maggiori aree frontali del cervello;
- il nucleo motorio dorsale del vago;
- il nucleo Edinger-Westphal;

MALATTIA DI PARKINSON

- il nucleo paranigrale, componente del percorso limbico mesocorticale dopaminergico;
- la colonna cellulare intermediolaterale della corda spinale;
- i nuclei raphe serotoninergici;
- il nucleo peduncolo-pontino;
- la formazione reticolare del ponte del mesencefalo;
- l'ipotalamo;
- i gangli simpatici periferici.

Occasionalmente sono anche stati ritrovati i corpi di Lewy nella neocorteccia di pazienti con malattia di Parkinson idiopatica non associati con la comparsa di demenza (Jellinger KA., 1991); sulla base di tali ritrovamenti Braak H. e Braak E. (2000) proposero che la malattia di Parkinson fosse una patologia degenerativa multisistemica ampiamente diffusa che colpisce il sistema nervoso centrale, periferico ed enterico.

Questo gruppo di ricercatori ha suggerito inoltre che i segni non motori possano precedere quelli del parkinsonismo motorio e che l'espressione individuale variabile della malattia di Parkinson possa essere correlata proprio all'estensione e progressione del coinvolgimento neurologico della malattia stessa (Wolthers EC. e Braak H., 2006; Emborg M., 2007).

CAP. 1.4- SINTOMATOLOGIA DELLA MALATTIA DI PARKINSON

I sintomi della malattia di Parkinson derivano dalla perdita selettiva dei neuroni dopaminergici del mesencefalo e delle loro sinapsi, che rilasciano dopamina all'interno delle regioni cerebrali del caudato e del putamen.

Meccanismi fisiologici compensatori nel cervello possono rallentare lo sviluppo dei sintomi fino a quando viene perso approssimativamente il 60-80% dei neuroni dopaminergici (Ole Isacson e Xandra O. Breakfield, 1997).

I quattro sintomi principali di malattia di Parkinson sono: tremori a riposo, rigidità, bradiscinesia-acinesia e instabilità posturale.

MALATTIA DI PARKINSON

Nel momento in cui questi sintomi diventano più pronunciati i pazienti possono avere difficoltà nel camminare, nel parlare o nel completare altri semplici compiti.

I sintomi non motori includono problemi urinari, costipazioni, problemi alla pelle, difficoltà nel dormire, ipotensione ortostatica, depressione e altri cambiamenti emozionali (Emborg EM., 2007).

La variabilità individuale nel presentarsi dei sintomi, nella loro intensità e nella progressione della malattia è tipica della malattia di Parkinson; nella maggior parte dei casi si ha un'evoluzione lenta ed inarrestabile della patologia (Emborg M., 2007).

In base alla prevalenza di alcuni sintomi e segni piuttosto che di altri si possono distinguere due forme di evoluzione: la forma ipercinetica, dominata dal tremore, con età di esordio più precoce, evoluzione meno invalidante e più lenta, o la forma acinetico-ipertonica, dominata quest'ultima da rigidità ed acinesia, più rapidamente invalidante (Nicholson G. *et al.*, 2002).

Si osserva uno stretto legame di proporzionalità tra la perdita di cellule dopaminergiche e la sintomatologia clinica, anche se esiste una fase di malattia preclinica, in cui la perdita neuronale non è ancora tale da determinare sintomatologia in condizioni basali.

Nella maggior parte dei casi il sintomo d'esordio è il tremore, ma in una percentuale non indifferente l'esordio è caratterizzato da impaccio motorio, senso di rigidità o disturbi molto poco specifici. In genere, all'esordio la sintomatologia è unilaterale e può restare tale anche per anni.

Il tremore si manifesta tipicamente "a riposo", con bassa frequenza, scompare durante i movimenti volontari e in genere peggiora nelle situazioni di stress emozionale, mentre è assente nella fase del sonno. Nel corso degli stadi iniziali è localizzato soprattutto nei settori distali degli arti (è descritto spesso come "contare monete"), con frequenza minore agli arti inferiori, e può essere presente sul volto (in particolare sulla mandibola).

La rigidità è un segnale caratteristico e duraturo e a volte viene a costituire per lungo tempo il solo sintomo di malattia: si palesa un'aumentata resistenza al movimento passivo, con caratteristiche di "plasticità". La patologia colpisce tutti i distretti muscolari, anche se in genere esordisce a livello dei muscoli assiali e col passare del tempo diventa prevalente nei muscoli flessori ed adduttori, determinando il caratteristico atteggiamento "camptocormico", con capo flesso sul tronco, avambracci semiflessi ed intraruotati, cosce addotte e in leggera flessione sul tronco. Per eseguire movimenti il paziente necessita di molta concentrazione, e tipicamente la gestualità e la mimica sono molto scarse, l'espressione impassibile. La deambulazione è caratteristicamente a piccoli passi, strisciati, con avvio molto problematico e spesso si apprezza il fenomeno della "festinazione", cioè una progressiva accelerazione della camminata sino a cadere. Il linguaggio diviene monotono, poco espressivo.

Anche la scrittura, in un certo senso, evolve allo stesso modo (micrografia parkinsoniana) con grafia che tende a rimpicciolirsi.

Il paziente, solitamente, può evolvere da uno stato motorio caratterizzato da un'abilità appena sufficiente del movimento (detta "stato ON") ad uno dominato da bradiscinesia o acinesia, detto stato OFF. Lo stato OFF non si riflette in un ritorno di Parkinsonismo non trattato ma probabilmente in un peggioramento delle condizioni motorie.

La discinesia del periodo "OFF" tende ad essere fissa e distonica, mentre la discinesia di tipo "ON" è solita essere relativa a livelli di picco della L-Dopa e i movimenti sono quindi molto mobili e coreiformi.

Oltre alla triade di base molti altri sintomi si possono associare, a completare un quadro molto variabile da paziente a paziente:

- alterazioni posturali (correlate alla rigidità, ma comprendenti anche perdita del controllo posturale ed il verificarsi di frequenti cadute);
- disturbi soggettivi delle sensibilità;
- ridotta velocità dei movimenti oculari;
- scialorrea;

MALATTIA DI PARKINSON

- disfunzioni vegetative;
- disturbi del sonno;
- turbe dell'affettività, molto frequenti nei pazienti con malattia di Parkinson.

Un' alterazione delle capacità cognitive è presente invece in circa un quinto dei pazienti, con caratteristiche che differenziano peculiarmente la demenza dei parkinsoniani, legata ad un maggiore interessamento dei lobi frontali (compromissione visiva spaziale, alterazioni della fluenza verbale, etc).

Sebbene il deterioramento intellettuale non rappresenti un elemento tipico del quadro clinico delle fasi precoci della malattia, la demenza appare essere uno degli esiti più frequentemente riscontrabili nelle fasi tardive.

Una possibile classificazione della stadiazione (in inglese: *staging*) della malattia di Parkinson nel corso del tempo è fornita da una tabella di Hoehn MM. e Yahr MD. (1967), la quale suddivide la progressione della sintomatologia clinica in 5 stadi, in cui il primo stadio è quello più lieve ed il quinto è quello più invalidante; è una classificazione non precisissima, ma che ben si correla con la pratica clinica (Goetz CG. *et al.* 2004).

CAP. 1.5- DIAGNOSI DELLA MALATTIA DI PARKINSON

Non esiste ancora un metodo diagnostico presintomatico per la malattia di Parkinson. Infatti molti dei segni clinici proposti come indicativi di pre-parkinsonismo non sono specifici della patologia (Emborg EM., 2007).

L'esame clinico deve includere necessariamente una valutazione della postura e dell'andatura; questo perché i riflessi posturali sono tipicamente anormali nella malattia di Parkinson. Circa l'80% dei pazienti affetti da malattia di Parkinson sperimentano ipocinesia nell'andatura a qualche stadio della malattia.

MALATTIA DI PARKINSON

La mancanza di oscillazione delle braccia dallo stesso lato e del tremore è molto caratteristica. Col progredire della malattia, il tremore nell'andatura può diventare il problema principale.

I pazienti spesso hanno difficoltà nel girarsi e lo fanno procedendo con piccoli passi su un unico punto.

L'esame dei movimenti oculari è molto utile nel differenziare la malattia idiopatica dalle altre condizioni parkinsoniane.

I pazienti con la malattia possono mostrare un rallentamento dell'inizio delle saccadi (movimenti oculari) volontarie e uno scuotimento nella ricerca dei movimenti. Tuttavia, un marcato incremento della difficoltà delle saccadi volontarie o la restrizione ed il rallentamento dei movimenti oculari verticali, con conseguente limitazione della visione superiore e inferiore volontari, suggerisce una causa alternativa per il parkinsonismo, quale la degenerazione corticobasale o PSP.

I pazienti affetti da malattia di Parkinson possono soffrire di ipotensione ortostatica, di disfunzioni urinarie e disordini del sonno (Nicholson G. *et al.*, 2002).

Le difficoltà nel formulare la diagnosi della malattia aumentano poiché gli aspetti clinici possono essere lievi all'inizio ed essere diagnosticati in alternativa come artrite o depressione durante il decorso progressivo della sindrome.

Inoltre, gli aspetti clinici classici non sono esclusivi alla malattia di Parkinson ma si possono notare anche in altre sindromi "parkinsoniane" (Nicholson G. *et al.*, 2002).

La somiglianza clinica della malattia con altre forme di Parkinsonismo rende anche ragione del fatto che vi sia una percentuale di errore diagnostico del 20-25%.

Ci sono alcune condizioni patologiche da porre in diagnosi differenziale con la malattia di Parkinson quali: la degenerazione senile del sistema nervoso, il tremore essenziale, l'Atrofia Multisistemica, la Paralisi sopranucleare progressiva, la degenerazione cortico basale, il parkinsonismo vascolare ed il parkinsonismo indotto da farmaci (Nicholson G. *et al.*, 2002)

Il processo primario che produce il fenotipo parkinsoniano è la depigmentazione della pars compacta nella sostanza nigra e la perdita di neuroni dopaminergici, che finiscono nei gangli basali (Nicholson G. *et al.*, 2002).

All'osservazione al microscopio, i neuroni dopaminergici della sostanza nigra durante malattia di Parkinson, sofferenti, mostrano al loro interno corpuscoli sferici denominati corpi di Lewy, composti prevalentemente da alfasinucleina, che sono considerati una caratteristica specifica della malattia di Parkinson così da far includere questa malattia nel più ampio gruppo delle sinucleinopatie.

Queste patologie si differenziano a seconda delle zone interessate dai corpi di Lewy e possono variare da un esteso interessamento della corteccia (demenza), un interessamento specifico di sostanza nigra e locus coeruleus (malattia di Parkinson) o dei sistemi nervosi che innervano i visceri (atrofia multisistemica con compromissione del sistema nervoso autonomo) (Nicholson G. *et al.*, 2002; Emborg EM., 2007).

Le immagini di risonanza magnetica del cervello generalmente risultano essere normali nella malattia di Parkinson ma possono essere utili nell'evidenziare concomitanti malattie cerebro vascolari o il propagarsi di atrofia del tronco encefalico negli altri disordini neurodegenerativi (Nicholson G. *et al.*, 2002).

La disfunzione del sistema nervoso autonomo è comune nei disordini parkinsoniani e spesso si presenta prima e più seriamente nelle sindromi "parkinson plus".

L'elettromiografia dello sfintere, che riflette la degenerazione del nucleo di Onuf, è stata dimostrata essere un test utile per distinguere la malattia di Parkinson dall'atrofia multipla del sistema o PSP.

All'esecuzione dell'autopsia, la diagnosi finale della malattia di Parkinson fu sbagliata in più del 20% dei casi; tuttavia uno studio più recente riporta che l'8% dei pazienti non trattati, che erano stati diagnosticati in precedenza con malattia di Parkinson, ebbero una diagnosi diversa dopo un follow-up di 7 anni (Nicholson G. *et al.*, 2002).

Gli aspetti che sono particolarmente caratteristici della malattia di Parkinson idiopatica sono l'asimmetria dei sintomi (specialmente il tremore) e una buona

MALATTIA DI PARKINSON

risposta alla L-DOPA: più del 90% dei pazienti hanno una buona risposta alla L-DOPA all'inizio della malattia.

La L-DOPA è solitamente così efficace nel migliorare i sintomi della malattia di Parkinson che una scarsa risposta rimanda alla considerazione di diagnosi alternative.

La L-DOPA è il trattamento più efficace per la malattia di Parkinson tale che i pazienti possono avere una disabilità molto piccola per i primi anni di trattamento della malattia, e anche le ricadute sono relativamente poco frequenti durante questa fase.

Tuttavia, con il progredire della malattia di Parkinson, altri aspetti compaiono e i pazienti possono soffrire di fluttuazioni nell'abilità motoria, ritardo cognitivo e depressione.

Gli aspetti clinici finali possono manifestarsi in una progressione del processo neurodegenerativo non manifesto oltre il percorso nigrostriatale e colpire altri nuclei dei gangli del tronco encefalico, talamici o basali, o come complicazioni di trattamenti farmacologici, o entrambi.

Fluttuazioni motorie nelle loro forme più semplici sono generalmente correlate al tempo e alla modalità di somministrazioni dei farmaci (Nicholson G. *et al.*, 2002).

Un metodo presintomatico di diagnosi della malattia di Parkinson non esiste ancora, in quanto, come già accennato, molti dei segni proposti come indicativi di pre-Parkinsonismo non sono specifici della malattia.

Generalmente gli esami diagnostici attuali includono la conoscenza del background genetico, della funzione del sistema nervoso autonomo e dell'olfatto (Montgomery EB. *et al.*, 2000; Wolthers EC. e Braak H., 2006) sia con che senza immagini dal vivo del sistema dopaminergico (il solo uso di quest'ultimo quale strumento diagnostico o prognostico è diventato controverso) (Ravina B. *et al.*, 2005).

L'analisi dei cambiamenti nei segnali di specifiche espressioni geniche può anche rivelare possibili biomarkers della malattia di Parkinson (Emborg EM., 2007).

MALATTIA DI PARKINSON

La diagnosi strumentale della malattia si avvale soprattutto di metodi di studio radiologici e di medicina nucleare.

L'imaging a risonanza magnetica (MRI) o tomografia a risonanza magnetica (RMT) o semplicemente RM costituisce una tecnica di generazione di immagini, usata prevalentemente a scopi diagnostici in campo medico e basata sul principio fisico della risonanza magnetica nucleare.

L'RM generalmente non è considerata essere potenzialmente dannosa nei confronti del paziente, e questi non è sottoposto a radiazioni ionizzanti come nel caso delle tecniche facenti uso di raggi X o di isotopi radioattivi (Cittadini G., 2002).

Le informazioni date dalle immagini di risonanza magnetica sono essenzialmente di natura diversa rispetto a quelle degli altri metodi di imaging: è possibile, infatti, la discriminazione tra tessuti sulla base della loro composizione biochimica, inoltre si hanno immagini delle sezioni corporee su tre piani diversi (assiale, coronale, sagittale), anche se questo non le conferisce la tridimensionalità.

Vi sono numerose applicazioni dell'imaging a risonanza magnetica, ad esempio l'imaging a risonanza magnetica in diffusione e la risonanza magnetica funzionale.

Gli svantaggi dell'utilizzo di questa tecnica sono costituiti principalmente dai costi e dai tempi necessari all'acquisizione delle immagini (Cittadini G., 2002).

Il paziente nel corso dell'esecuzione della risonanza magnetica non deve assolutamente indossare oggetti di materiale metallico potenzialmente ferromagnetico, quali orologi, bracciali, catenine; particolare attenzione deve essere posta nell'accertarsi che il paziente non abbia subito in passato incidenti in seguito ai quali schegge metalliche possano essere rimaste alloggiare nei tessuti, od essere stato sottoposto ad operazioni chirurgiche che abbiano previsto l'impianto di materiali simili ai metalli. Oggetti di materiale ferromagnetico immersi in un campo magnetico intenso subiscono infatti forze rilevanti, che possono provocarne lo spostamento con conseguente danno ai tessuti, ad esempio nel caso di schegge che si trovassero vicino a vasi sanguigni; anche in assenza di tale rischio la presenza di materiale

ferromagnetico, alterando il campo elettromagnetico cui sono sottoposti i tessuti, può causare un anomalo riscaldamento dei tessuti circostanti, con un conseguente possibile danno.

La presenza di protesi, clip vascolari, stent, stimolatori cardiaci o altri apparati medico-chirurgici impedisce l'esecuzione e/o la corretta lettura dell'esame.

Dagli anni '90 vengono utilizzati sempre più spesso materiali RM-compatibili, ma con l'aumentare della potenza degli apparecchi tale problema si ripresenta regolarmente: occorre per tal motivo conoscere, per ogni materiale utilizzato, fino a quanti Tesla è da considerarsi RM-free.

Le immagini di risonanza magnetica hanno normalmente dimensioni dai 256x256 pixels (immagini cardiache) ai 1024x1024 pixels (immagini cerebrali ad alta risoluzione) per una profondità di 16 bit/pixel. Questo comporta una risoluzione spaziale intrinseca piuttosto bassa (particolari di 1 mm sono praticamente al limite della visibilità), ma l'importanza di questo esame risiede nel fatto di poter discriminare, ad esempio, tra un tessuto del fegato ed uno della milza (che osservati ai raggi X presentano la stessa trasparenza), oppure i tessuti sani da quelli lesionati.

I tempi di scansione sono molto più lunghi rispetto alle altre tecniche radiologiche (un esame completo di risonanza magnetica dura dai 30 minuti ad 1 ora), e la risoluzione temporale è generalmente piuttosto bassa (qualche immagine al secondo per le risoluzioni spaziali inferiori).

Una caratteristica fondamentale della risonanza è la possibilità di variare la tipologia di contrasto dell'immagine semplicemente modificando la sequenza eccitatoria che la macchina esegue. Ad esempio, è possibile evidenziare o sopprimere il segnale dovuto al sangue, oppure ottenere informazioni di carattere funzionale anziché di carattere unicamente morfologico (Haake EM. *et al.*,1999).

Le indagini di risonanza magnetica sono maggiormente indicate rispetto alla TC quando non vi è necessità di avere un'altissima risoluzione spaziale, in quanto la risonanza non comporta l'assorbimento di radiazioni da parte del paziente; inoltre, essa risulta più utile nei casi di lesioni localizzate in tessuti vicini a strutture ossee, che potrebbero non essere rilevabili attraverso i raggi X.

La risonanza magnetica è una tecnica di imaging multiplanare, in quanto si possono acquisire immagini su piani assiali, coronali o sagittali (a differenza della TC che consente l'acquisizione di immagini solo su piani assiali) e multiparametrica, poichè i parametri di riferimento utilizzabili sono sia la densità protonica che i tempi di rilassamento T1 e T2.

Lo studio del sistema nervoso centrale viene fatto preferibilmente mediante la tecnica della risonanza magnetica cerebrale, come nei casi di sclerosi multipla e di ictus.

Un ulteriore utilizzo è lo studio funzionale del cervello, le cui aree attive possono venire evidenziate in base al segnale più evidente, dipendente dal grado di ossigenazione del sangue (Le Bihan D. *et al.*, 1983). Ma l'fRM rappresenta dell'attività cerebrale solo l'ultima fase, essendo una tecnica che rileva il movimento dei protoni.

L'attività nervosa può essere infatti così scomposta:

- attività nervosa: studiata mediante l'elettroencefalogramma, spostamento delle correnti ioniche, attivazione della pompa sodio potassio con consumo di ATP;
- consumo di glucosio per produzione di energia: fase studiabile con la PET ;
- formazione dei flussi cerebrali: studio mediante fRM (Le Bihan D. *et al.*, 1983).

La medicina nucleare permette uno studio accurato della patologia di Parkinson dal punto di vista anatomico e funzionale; essa sfrutta l'uso di traccianti radioattivi iniettati nell'organismo, i quali vanno a depositarsi nei distretti corporei oggetto di studio evidenziandone il metabolismo e quindi, in maniera diretta o indiretta, caratteristiche quali la vitalità o l'attività. Essendo la malattia di Parkinson una patologia a carico del sistema dopaminergico, i traccianti sono diretti verso:

- il trasportatore della dopamina;
- il trasportatore vescicolare delle monoamine di tipo 2;
- l'enzima DOPA decarbossilasi (Brooks DJ., 1997).

La PET (tomografia ad emissione di positroni) gioca un ruolo sempre maggiore nella verifica della risposta alla terapia, specialmente in particolari terapie anti-cancro (Young H. *et al.*, 1999).

La PET viene utilizzata anche nel contesto degli studi pre-clinici sugli animali, dove sono consentite le indagini ripetute sullo stesso soggetto. Queste ricerche si sono dimostrate particolarmente valide nella ricerca sul cancro, dove si registra un aumento della qualità statistica dei dati e una sostanziale riduzione del numero di animali richiesti per ogni singolo studio. Una limitazione alla diffusione della PET è il costo dei ciclotroni per la produzione dei radionuclidi a breve tempo di dimezzamento. Pochi ospedali e Università possono permettersi l'acquisto ed il mantenimento di apparati costosi e la maggior parte dei PET clinici è supportata da fornitori esterni di radiotraccianti, che riforniscono più strutture contemporaneamente. Questo forte vincolo limita l'uso della PET clinica principalmente all'impiego di traccianti contrassegnati con il ^{18}F , che avendo un tempo di dimezzamento di 110 minuti può essere trasportato ad una distanza ragionevole prima di poter essere utilizzato, oppure al ^{82}Rb , che può essere creato anche in acceleratori portatili. Quest'ultimo è usato per lo studio dell'irrorazione del miocardio (Wikipedia, 2009).

Un altro meccanismo di studio dei nuclei della base è quello *metabolico*: alcuni traccianti hanno la proprietà di studiare la captazione regionale di glucosio e di evidenziare quindi le zone vitali o attive dalle zone dove c'è invece sofferenza metabolica, dovuta a perdita anatomica o funzionale delle cellule.

CAP. 1.6- TRATTAMENTO DELLA MALATTIA DI PARKINSON

La terapia della malattia di Parkinson è principalmente di tipo medico, ed il punto centrale della sua azione consiste nel rimpiazzamento di dopamina.

La terapia tradizionale mira a risolvere la sintomatologia di tipo motorio (tremori, rigidità, acinesia) e permette una remissione dei sintomi specialmente a breve termine, mentre però nel tempo essa non permette un controllo soddisfacente, a causa di effetti collaterali importanti e di "wearing off", come nel caso della L-DOPA (Rajput A. e Rajput AH., 2006).

La scoperta che la somministrazione di L-dopa (il precursore chimico della dopamina) riduceva i sintomi della Malattia di Parkinson ha fornito lo strumento

per una delle prime terapie farmacologiche razionali nel trattamento della patologia neurodegenerativa.

Generalmente la L-dopa fornisce solo un miglioramento temporaneo, e dopo alcuni mesi o pochi anni di utilizzo continuo i pazienti subiscono gravi fluttuazioni negli effetti prodotti dal farmaco e dalla quantità del dosaggio, tra cui il fenomeno cosiddetto del "on-off" (Isacson O. e Breakfield XO., 1997).

Alla luce delle ultime scoperte scientifiche, però, i ricercatori e i clinici hanno evidenziato come questa malattia possa essere corretta tanto meglio quanto più precocemente si riesca ad ottenerne la diagnosi e, soprattutto, ad iniziare la terapia.

Partendo dal presupposto che la malattia di Parkinson è una malattia neurodegenerativa di tipo progressivo, il cui esordio clinico avviene in una fase neuropatologicamente avanzata di malattia, e per questo di tipo quasi irreversibile, le nuove tendenze sulla diagnosi e sulla terapia si sono rivolte in direzione della ricerca di farmaci neuroprotettivi che preservino le cellule della sostanza nigra dagli insulti, principalmente ossidativi, a cui vengono sottoposte. Poiché la dopamina non può attraversare la barriera ematoencefalica viene allora somministrato il suo precursore, la levodopa.

L'enzima dopadecarbossilasi converte successivamente la levodopa a dopamina.

Il metabolismo del sistema sanguigno della levodopa a dopamina attiva l'area postrema, potenzialmente causa di nausea e vomito.

Gli inibitori di dopadecarbossilasi, quali carbidopa o benserazide, non attraversano la barriera ematoencefalica; allorché somministrati con levodopa bloccano la sua conversione a dopamina, limitando gli effetti collaterali periferici (Emborg EM., 2007).

Gli agonisti dopaminergici si dividono in ergolinici (bromocriptina, pergolide, lisuride, cabergolina) e non ergolinici (pramipexolo, ropinirolo, apomorfina). Il vantaggio rispetto alla levodopa consiste nella minor frequenza di effetti collaterali e di oscillazione nella risposta. La ragione principale del loro utilizzo in pazienti giovani o che presentino sintomi ancora scarsamente pronunciati

consiste nel posticipare quanto più possibile in questi soggetti il ricorso alla levodopa.

Nel corso della terapia gli agonisti dopaminergici (apomorfina, bromocriptina, pramipexole, ropinirole) possono essere usati soli o in combinazione con levodopa, anche se rischiano di presentare effetti collaterali importanti, quali ipotensione ortostatica e nausea. Il rationale dell'utilizzo dei farmaci anticolinergici risiede nella riduzione dell'attività colinergica che è aumentata di riflesso in questi pazienti, causando tremore e rigidità; i farmaci più utilizzati sono triesfenidile, biperidene, orfenadrina. Il loro impiego si è al momento molto ridotto rispetto al passato, per due motivi principali: la frequenza di effetti collaterali di tipo neurovegetativo e la possibile interferenza farmacologica con la levodopa.

L'amantadina (Mantadan) ha una leggera azione sia anticolinergica che dopaminergica, e viene utilizzata specialmente in politerapia per ridurre il tremore e la bradicinesia.

Non appena i sintomi nel paziente peggiorano gli effetti collaterali farmaco correlati, come la discinesia, aumentano e l'efficacia delle terapie diminuisce, lasciando molti pazienti gravemente disabili (Bezard E. *et al.*, 2001).

Oggi la terapia con levodopa ha reso la durata della vita dei pazienti solo di poco inferiore a quella della popolazione sana, ma essa presenta però molti limiti; uno dei problemi principali è costituito dalla cosiddetta "sindrome da trattamento con levodopa", definizione che identifica l'insieme delle complicazioni e dei fenomeni clinici che insorgono nel paziente dopo alcuni anni di terapia:

- fenomeno del wearing-off (*effetto di fine dose*), molto comune, dove con il passare del tempo la durata dell'effetto terapeutico della stessa dose si riduce;
- fluttuazioni on/off: alternanza a breve distanza di periodi di conservata motilità con momenti di marcata acinesia, tremore scarsamente responsivo alla levodopa, senza una vera correlazione con la somministrazione del farmaco; nella fase "on" si hanno movimenti involontari;

- turbe neuropsichiatriche: disturbi del sonno, allucinazioni notturne, soprattutto nei soggetti in età avanzata; si può arrivare a franchi stati psicotici o di confusione mentale.

Nonostante sia stata sottoposta a critiche e siano stati sperimentati numerosi altri farmaci per il trattamento di questa malattia, la levodopa resta il farmaco essenziale e più utilizzato. Essa va somministrata in associazione con un farmaco inibitore della decarbossilasi, in modo da evitarne gli effetti collaterali a livello sistemico: si associa la levodopa/carbidopa (Sinemet), e la levodopa/benserazide (Madopar). Non vi è attualmente alcun presupposto che possa impedire l'utilizzo della levodopa nella terapia della malattia di Parkinson e, anzi, essa costituisce il farmaco più efficace e quello che permette la maggiore riduzione di mortalità legata alla malattia. La levodopa deve essere assunta indefinitamente.

Anche la neuroprotezione è una terapia che sempre più sta prendendo piede nella concezione delle patologie del SNC e il suo utilizzo nel trattamento della malattia di Parkinson si basa nell'evidenza che questa malattia è successiva alla perdita di almeno il 70% dei neuroni del Sistema Nervoso; le più recenti scoperte a livello molecolare stanno aiutando nella comprensione dei meccanismi patogenetici, nonché nell'elaborazione di presidi terapeutici capaci di agire alla base del problema.

Il farmaco neuroprotettivo più conosciuto e utilizzato è la selegilina (Deprenyl). La selegilina è un inibitore irreversibile della MAO-B ed ha un effetto antiossidante, neurotrofico e antiapoptotico; nella pratica clinica essa permette di posticipare il ricorso alla levodopa, con un buon controllo della sintomatologia (Ebadi M. *et al.*, 2002).

Quello riguardante la neuroprotezione nella malattia di Parkinson è un capitolo ancora tutto da scrivere; diversi farmaci in fase di sperimentazione stanno ottenendo buoni risultati: tra questi la rasagilina, un farmaco inibitore della MAO-B, ha ottenuto risultati sorprendenti in fase II di sperimentazione. Altre categorie di farmaci sui quali la ricerca sta progredendo considerevolmente sono: farmaci favorenti la funzione mitocondriale, antagonisti degli aminoacidi eccitatori, antibiotici, antinfiammatori, fattori neurotrofici.

MALATTIA DI PARKINSON

Un fondamentale passo avanti nella terapia della malattia di Parkinson è stato l'avvento del trattamento chirurgico.

Le procedure chirurgiche comprendono:

- stimolazione profonda del cervello;
- rimozione delle lesioni;
- trapianto di cellule (Emborg EM., 2007).

Anche in campo neurochirurgico, infatti, la terapia sta evolvendo verso forme sempre più efficaci; attualmente la tecnica più utilizzata è la chirurgia stereotassica, che permette di trattare punti situati in profondità nel parenchima cerebrale con precisione millimetrica tramite l'utilizzo di dispositivi radiologici. La scoperta che alcuni nuclei responsabili della patologia, come il globo pallido e il nucleo subtalamico, potevano essere un bersaglio aggredibile nella malattia di Parkinson ha permesso di elaborare una tecnica, detta Deep Brain Stimulation (DBS), che porta ad una buona remissione clinica e ad una significativa riduzione nella dipendenza da levodopa (Lopiano L. *et al.*, 2003).

Le persone potenzialmente candidate a questo tipo di intervento sono i soggetti anziani con malattia in stadio già avanzato, che presentano effetti collaterali derivanti da uso di levodopa abbastanza importanti.

La stimolazione profonda del cervello ha il vantaggio di essere reversibile e regolabile.

Nella malattia, infatti, la riduzione della dopamina nello striatum conduce ad una serie di cambiamenti nel circuito gangliare basale. Vi è iperattività nel nucleo subtalamico, correlata ad un aumento dello stimolo eccitatorio al segmento interno del globo pallido e ad un eccesso inibitorio in uscita alle proiezioni motorie talamocorticali; questo comporta una diminuzione dello stimolo motorio corticale, che si manifesta come bradicinesia.

La stimolazione continua per mezzo di alte frequenze nella profondità del cervello è simile negli effetti alla rimozione della lesione, e proprio la stimolazione del nucleo subtalamico appare essere il più promettente intervento chirurgico nella terapia della malattia.

Molti studi hanno infatti dimostrato che grazie a questo tipo di chirurgia non vi è progressione nella rigidità, nel tremore e nella bradicinesia.

E' praticabile anche la stimolazione bilaterale, con ulteriori progressi nello studio della malattia.

L'asportazione del talamo unilaterale, o stimolazione talamica, consente un trattamento proficuo per i tremori controlaterali nel 75-85% dei pazienti.

La procedura è relativamente sicura se praticata unilateralmente.

Lesioni bilaterali possono produrre disartria e disfagia tanto quanto problemi cognitivi.

La pallidotomia comporta lesioni al globo pallido interno ed è utile nel ridurre la discinesia controlaterale e i sintomi "OFF" controlaterali.

Infine, il trapianto di tessuto fetale mesencefalico nello striatum di pazienti con la malattia sembra averne migliorato i sintomi. Gli innesti fetali hanno consentito ai pazienti di sopravvivere per molti anni e di aver formato connessioni sinaptiche intracerebrali. La tecnica è però ancora a livello sperimentale, e problemi di tipo etico e pratico ne limitano l'utilizzo.

Il trapianto di tessuti fetali neuronali allogenici è stato utilizzato quale nuovo approccio dei disordini focali che colpiscono il sistema nervoso centrale, quali appunto il morbo di Parkinson (Lindvall O. *et al.*, 1990; Bjorklund A. *et al.*, 2003). Molti dei neuroni fetali allotrapiantati infatti si integrano nel parenchima neuronale dell'encefalo del ricevente, differenziandosi in neuroni maturi e sostituendo totalmente i neuroni perduti. Tuttavia, data la scarsa disponibilità di tessuti umani e le problematiche etiche connesse all'uso di feti umani quali fonte di tessuto nervoso, l'allogtrapianto di neuroni fetali umani non viene considerato una reale opzione terapeutica futura per la malattia di Parkinson (Edge AS. *et al.*, 1998).

La scoperta che cellule staminali embrionali stimulate in vitro con il prodotto del gene Nurr1 si differenziavano in cellule dopaminergiche e che queste, se introdotte per via stereotassica nel cervello di ratti affetti da malattia di Parkinson, ne rallentavano la progressione fino all'arresto ha aperto orizzonti rivoluzionari nel trattamento di questa malattia. Il potenziale di questa terapia cellulo mediata è considerevole rispetto alla classica terapia farmacologica per i disordini del sistema nervoso centrale.

La maggior parte delle patologie del sistema nervoso centrale comporta una disfunzione o degenerazione cellulare focale che spesso non può essere trattata efficacemente attraverso il rilascio sistemico diffuso di farmaci. Il fine che ha portato allo sviluppo del nuovo trattamento per la malattia di Parkinson basato sul trapianto di cellule è proprio quello di sostituire i neuroni che sono morti (Langston JW., 2005).

Grazie ad un significativo sviluppo gli studi scientifici sulla rigenerazione neuronale cerebrale, dimostrando che i neuroni fetali trapiantati possono integrarsi all'interno di circuiti precedentemente danneggiati in un cervello completamente maturo, hanno modificato la visione precedentemente costruita, secondo la quale il cervello adulto era ritenuto essere un sistema strettamente correlato ed immutabile (Isacson O. e Breakfield XO., 1997).

I neuroni fetali di maiale, ad esempio, hanno un periodo relativamente lungo di crescita e capacità di sviluppare grandi assoni (Daecon T. *et al.*, 1994).

Studi condotti su ratti immunosoppressi hanno dimostrato che alcuni mesi dopo essere stati impiantati nel nucleo striato i neuroni di origine suina sono cresciuti, sviluppando regolari connessioni anatomiche (Isacson O. *et al.*, 1995). Questo ha portato ad un miglioramento delle anomalie comportamentali precedentemente indotte, in un modello sperimentale di malattia di Parkinson

Studi clinici attualmente in corso utilizzano tessuto cerebrale fetale sia allogeneico (entro specie) che xenogeneico per l'impianto in pazienti con malattia di Parkinson o con malattia di Huntington.

Il trapianto di cellule nervose nell'uomo è ancora nelle prime fasi dello sviluppo tecnologico, e le procedure necessitano di essere ottimizzate nei confronti dei protocolli chirurgici, delle fonti cellulari, dei tipi cellulari, della preparazione cellulare, del rilascio cellulare, delle procedure ausiliarie (come ad esempio la co-introduzione di fattori della crescita) e della modulazione di parametri immunitari.

Benché vi sia controversia a riguardo della fonte ottimale di approvvigionamento delle cellule, è chiaro che i neuroni dopaminergici hanno, come fenotipo biologico, la capacità di regolare il rilascio di dopamina all'interno di concentrazioni nanomolari nello striatum ospitante.

L'importanza di questo è evidente quando si consideri che il rilascio eccessivo o non regolato di dopamina è il fenomeno che sottende l'insorgere di altre sindromi neurologiche, come ad esempio la discinesia, la distonia e potenzialmente anche la schizofrenia (Hurtig HI., 1997).

I neuroni adulti non rappresentano una fonte sfruttabile poiché essi non sopravvivono all'isolamento (o al trapianto), in quanto il ripetersi di lunghi processi differenziati e di danni metabolici portano alla morte cellulare (di solito dopo alcuni minuti dall'isolamento).

Altri tipi cellulari utilizzati, come ad esempio i fibroblasti cutanei ricavati dallo stesso paziente e quindi modificati geneticamente per il rilascio di dopamina, vengono distribuiti in maniera diffusa per creare un diverso gradiente di concentrazione: alto nel punto dell'impianto e più basso allontanandosi da esso. Il cervello risponde mediante una down-regolazione dei recettori della dopamina nelle cellule vicine all'impianto e con una up-regolazione dei recettori nelle cellule più lontane (Fisher LJ. *et al.*, 1991).

I trapianti di neuroni dopaminergici fetali, al contrario, inviano processi neuronali e formano connessioni sinaptiche con una vasta gamma dei neuroni endogeni, realizzando così un rilascio regolato e risposte nervose appropriatamente modulate (Isacson O. e Breakfield XO., 1997).

E' difficile immaginare come cellule non-nervose possano funzionare meglio di cellule nervose in questo protocollo di trapianto.

In futuro, la diffusione e la manipolazione di cellule progenitrici nervose per generare una fonte sufficiente di neuroni di fenotipo appropriato potrà essere una potenziale alternativa ai neuroni fetali.

Tuttavia, anche in queste fasi iniziali di utilizzo, il trapianto di cellule fetali umane ha fornito risultati promettenti, annoverando in alcuni casi marcati segnali di recupero nei pazienti con malattia di Parkinson, accompagnati dalla restituzione di sinapsi dopaminergiche nel cervello ricevente e da una ridotta necessità di una più energica azione di L-dopa ed altre terapie (Isacson O. e Breakfield XO., 1997).

Problemi insiti nell'utilizzo del trapianto di cellule umane fetali nei pazienti con malattia di Parkinson vengono ad essere le preoccupazioni di natura etica e

pratica nell'usare i tessuti fetali, l'incapacità di ottenere un numero sufficiente di neuroni umani fetali appropriati e le difficoltà di un rapido ed estensivo screening per gli agenti patogeni. Per tutte queste ragioni si stanno cercando altre fonti cellulari.

Modelli animali sperimentali hanno dimostrato che neuroni xenotrapiantati, quali i neuroni allotrapiantati, possono mediare comportamenti di recupero in una varietà di condizioni neurodegenerative.

Un esperimento con roditori adulti, utilizzati come modello della malattia di Parkinson, dimostrò un recupero strutturale e funzionale dalla neurodegenerazione mediante impianto di tessuto cerebrale fetale dal topo, criceto, coniglio, maiale e uomo.

Questi e altri studi sugli xenotrapianti fetali neurologici hanno dimostrato una notevole plasticità e congruenza nella morfologia neurologica tra le specie, non solo dovuta alla sopravvivenza delle cellule nervose nelle diverse specie ma in quanto esse formavano anche connessioni funzionali molto specifiche.

Questi studi hanno confermato che la riparazione funzionale può essere ottenuta utilizzando neuroni da donatori esogeni di cellule in un certo numero di specie di mammiferi (Isacson O. e Breakfield XO., 1997).

Il maggiore rischio di una preparazione di cellule xenogeniche nervose per il destinatario sembra essere la perdita o il rigetto delle cellule (Pakzaban P. e Isacson O., 1994).

Sebbene l'encefalo sia considerato un organo particolarmente isolato dal punto di vista immunologico, lo xenotrapianto di neuroni va incontro comunque a rigetto. L'ostacolo principale al successo degli xenotrapianti di neuroni è rappresentato dall'attivazione delle cellule T. In esperimenti condotti sui ratti è stato evidenziato che i neuroni di maiale trapiantati venivano rigettati alcune settimane dopo il trapianto, contemporaneamente ad una improvvisa infiltrazione di cellule T (Melchior B. *et al.*, 2002). Nonostante questo tipo di trapianti permetta un certo grado di recupero funzionale nelle prime fasi, appare evidente che il trattamento immunosoppressivo con gli inibitori della calcineurina non è sufficiente a proteggere i neuroni xenogenici dal rigetto in

tempi più lunghi (Larsson LC. *et al.*, 2000); probabilmente questo tipo di immunosoppressione inibisce la reattività delle cellule T a livello periferico ma poco nell'encefalo, a causa della bassa permeabilità della barriera ematoencefalica (Tsuji A. *et al.*, 1993). Questa evidenza trova anche conferma in altre pubblicazioni, nelle quali si è dimostrato che la sopravvivenza a lungo termine di uno xenotrapianto nell'encefalo è possibile, ma richiede una somministrazione continuata di alte dosi di Ciclosporina A, o trattamenti con svariati agenti immunosoppressori (Pedersen EB. *et al.*, 1997; Fink JS. *et al.*, 2000). Di conseguenza, per ottenere una durata stabile di xenotrapianti neuronali discordanti, risulta necessario o un trattamento immunosoppressivo ad alte dosi o la manipolazione genetica dei tessuti animali da trapiantare.

Con riferimento a quest'ultimo punto, è stato recentemente generato un ceppo di maiali transgenici esprimenti la CTLA4-Ig umana (hCTLA4-Ig), una proteina di fusione in grado di bloccare il segnale costimolatorio mediato dalla molecola CD28 (Linsley PS. *et al.*, 1991), capace inoltre di stimolare l'attività immunosoppressiva di cellule presentanti antigene sia nell'uomo che nel primate non umano (Grohmann U. *et al.*, 2002). Studi condotti *in vitro* su neuroni che esprimono l'hCTLA-Ig, derivanti da feti suini di 28 giorni, hanno evidenziato una riduzione del 50% della risposta proliferativa delle cellule T in un esperimento di proliferazione xenogenica. Dopo trapianto di neuroni di origine suina in ratti immunosoppressi tale proteina viene regolarmente secreta. Tuttavia, sembra che in questo modello animale l'attività immunosoppressiva del CTLA4-Ig di origine umana sia particolarmente debole (Martin C. *et al.*, 2005).

Anche in roditori riceventi completamente immunodepressi, dove gli innesti cerebrali normalmente sopravvivono per un lungo periodo, almeno il 90-95% del numero totale dei neuroni fetali impiantati (sia nei tessuti donatori allo che xenogenici) muore; questo è causato probabilmente dallo sviluppo intrinseco di segnali e dal danno sostenuto durante la preparazione cellulare, da un supporto trofico inadeguato e dallo stress ossidativo (Isacson O. e Breakfield XO., 1997).

MALATTIA DI PARKINSON

La morte primariamente non immunologica di cellule neurologiche può essere superata in una certa misura aumentando la dose cellulare iniziale o proteggendo le cellule con fattori trofici e antiossidanti; inoltre, la reazione cellulo-mediata o anticorpo-mediata può uccidere le cellule trapiantate e causare potenzialmente una risposta antinfiammatoria estremamente dannosa nel ricevente, nella misura in cui potrebbe danneggiare i neuroni e causare edema cerebrale.

In ogni caso la risposta infiammatoria del Sistema Nervoso Centrale, anche durante il rigetto di cellule xenogeniche in animali immunocompetenti, appare ridotta e la risultante morte delle cellule trapiantate di solito lascia danni molto minori nei tessuti riceventi adiacenti.

La relativamente ridotta reazione immunitaria nel cervello è stata attribuita al basso livello di espressione del MHC-I e II nel tessuto nervoso.

I neuroni normalmente quasi non esprimono il MHC-I (complesso di istocompatibilità maggiore di classe I), benché sia le cellule gliali che i neuroni possano essere indotti ad esprimere markers immunologici in condizioni di infiammazione, infezione o inattività (Neumann H. *et al.*, 1995).

Inoltre la barriera ematoencefalica, che consiste di uno strato endoteliale con strette giunzioni, una spessa membrana basale e terminazioni astrocitarie, filtra il sangue entrante nel cervello e può, in una certa misura, ridurre l'entrata del complemento e delle cellule immunitarie.

Nello xenotrapianto di cellule nervose fetali in cervelli di roditori riceventi (in assenza di anticorpi preformati anti-specie specifici) la ciclosporina e altri farmaci immunosoppressivi, che sono regolarmente utilizzati nell'uomo per il trapianto renale e cardiaco allogenico, sono di norma sufficienti nel prevenire un rigetto massivo.

Durante il rigetto è stata evidenziata un'up-regolazione degli antigeni del MHC di classe I e di classe II, sia nel tessuto del donatore che in quello del ricevente. Questo può ulteriormente limitare le risposte immunitarie stimulate dalle cellule T di classe I e II e, tramite espansione clonale, attivare pienamente la via

effidente del sistema immunitario, senza che vengano somministrati trattamenti immunosoppressivi (Isacson O. e Breakfield XO., 1997).

Il tessuto xenogenico donatore al di fuori del cervello è di solito vigorosamente rigettato, anche in presenza di soppressione immunitaria.

Questo rigetto complemento-mediato di tipo iperacuto scaturisce dal complemento e dagli anticorpi del siero preformati contro i fattori antigenici xenogenici, come il galattosio alpha (1,3) epitopi galattosio contenenti nel tessuto donatore.

Benché questo tipo di rigetto iperacuto sia meno vigoroso nel tessuto cerebrale rispetto ad altri siti oggetto di trapianto, si conosce meno circa gli effetti di cellule di maiale in un cervello ricevente di un primate non umano o di un uomo (Sachs D.M. & Bach F.H., 1990).

Un recente studio clinico di fase I approvato da FDA-U.S., utilizzando uno xenotrapianto neurologico in 12 pazienti con malattia di Parkinson, ha coinvolto il trapianto di cellule nervose mesencefaliche fetali di maiale nella regione del putamen e del caudato unilaterale dei cervelli dei pazienti, seguito in 6 casi da continua soppressione del sistema immunitario con ciclosporina (Isacson O. e Breakfield XO., 1997); seppure con limitazioni nel numero cellulare e nella lateralità, il recupero da un Parkinsonismo devastante è stato in alcuni casi notevole, comparabile a quello visto precedentemente ottenuto tramite i tessuti umani fetali donatori, e gli effetti collaterali della ciclosporina sono stati modesti (Schumacher J.M. *et al.*, 2000).

La morte prematura di uno dei pazienti, avvenuta sette mesi dopo l'intervento, apparentemente dovuta a cause non correlate con lo xenotrapianto (un embolismo polmonare) ha consentito una valutazione dettagliata del destino delle cellule trapiantate. In questo paziente Parkinsoniano solo circa lo 0.1% del totale delle cellule dopaminergiche fetali di maiale trapiantate era sopravvissuto dopo i sette mesi trascorsi dal trapianto fino alla morte, ma connessioni assionali estensive si erano formate tra i neuroni di maiale sopravvissuti e i neuroni umani riceventi. Inoltre, le cellule di maiale non nervose (presumibilmente gliali) erano presenti in numero maggiore (circa 10 volte) e si erano sviluppate in

un'area leggermente più grande del putamen del paziente rispetto ai neuroni di maiale sopravvissuti (Isacson O. e Breakfield XO., 1997).

Per quanto riguarda l'utilizzo di altre terapie nel trattamento della malattia di Parkinson ancora ad uno stadio sperimentale, negli Stati Uniti è stato intrapreso lo studio e l'utilizzo della terapia genica; essa è stata messa in pratica da un team di ricercatori guidato da Michael Kaplitt, del New York Presbyterian Hospital/Weill Cornell Medical Center (Kaplitt MG e Loewy AD., 1995). Il virus con il gene viene iniettato in una zona precisa del cervello, il nucleo subtalamico, che regola il circuito motorio. Il neurotrasmettitore GABA "calma" i neuroni iperattivi; esso è deficitario nei pazienti affetti da Parkinson i quali, di conseguenza, presentano disturbi motori e tremori. Iniettando il gene per il GABA all'interno del cervello, i ricercatori hanno tentato di stimolare la produzione del neurotrasmettitore, per normalizzare la funzione del circuito motorio. La tecnica, ancora in fase di sperimentazione 1 (di 3) ha dato risultati promettenti senza il verificarsi di effetti collaterali (se non i rischi di una "iniezione" cerebrale), dimostrandosi ragionevolmente sicura, ma è necessario ovviamente mantenere la dovuta cautela e continuare la sperimentazione con ulteriori studi.

Recentemente è stata prodotta una linea di suini transgenici esprime la molecola immunosoppressiva CTLA4-Ig umana, sotto controllo trascrizionale del promotore della Enolasi neurono-specifica (Martin C. *et al.*, 2005). I neuroni ottenuti da feti transgenici esprimono il CTLA4-Ig dopo differenziazione sia *in vivo* che *in vitro*, e nelle colture linfocitarie miste questi neuroni prevengono la proliferazione di linfociti T umani xenoreattivi. Poiché la CTLA4-Ig umana dimostra una scarsa affinità nei confronti dei recettori B7 del roditore, serve un modello animale messo a punto su primate non umano per valutare se questi neuroni transgenici siano in grado di prevenire il rigetto di xenotrapianti.

Altri mezzi per rallentare la progressione della malattia consistono nella terapia dietetica (utilizzo di alimenti ricchi in antiossidanti – Vitamina C, E), in un adeguato esercizio fisico, nell'impiego della psicoterapia e della fisioterapia.

CAP. 2 RUOLO DEI MODELLI SPERIMENTALI NELLO STUDIO DELLA MALATTIA DI PARKINSON E DEI PARKINSONISMI

Per quanto siano trascorsi 50 anni da quando il deficit nigrostriatale di dopamina venne identificato costituire l'alterazione neurochimica alla base della malattia di Parkinson (Ehringer H. e Hornykiewicz O., 1960), l'eziopatogenesi e la fisiopatologia di questa malattia neurodegenerativa presentano ancora molte zone d'ombra.

Proprio questa alterazione della dopamina nigrostriatale, aspetto centrale della malattia di Parkinson, è stata il punto di partenza per lo sviluppo dei modelli sperimentali per lo studio della patologia.

Sicuramente lo studio della patogenesi della malattia di Parkinson può trarre vantaggio dallo scambio reciproco di informazioni tra la ricerca clinica ed epidemiologica e la ricerca sperimentale di laboratorio (Donato A. Di Monte, 2007).

Un modello animale ideale per la malattia di Parkinson dovrebbe includere la causa reale della patologia così come i relativi sintomi comportamentali, la patologia e un tempo di progressione simili a quelli nella malattia di Parkinson umana; maggiori vengono ad essere le similitudini tra un modello sperimentale e la malattia e più alta è la validità predittiva dell'efficacia clinica dei risultati ottenuti dal modello.

Per i ricercatori è però molto difficile mimare questa complessa sindrome progressiva, multisistemica e multisintomatica, che si presenta con marcate differenze individuali circa l'età di comparsa, la velocità del suo sviluppo, i sintomi preferenziali e le complicazioni correlate al trattamento terapeutico.

Lo sviluppo di un modello parkinsoniano che sia simile all'insorgere della malattia di Parkinson, e di conseguenza peggiori nel tempo, è particolarmente importante per l'individuazione di terapie che siano di supporto nel rallentamento o nella conclusione della progressione della malattia.

Infatti la capacità del sistema nigrostriatale di adattarsi ad una relativamente piccola perdita di dopamina, adattamento che appare un miglioramento

spontaneo del sistema, è una sfida costante nel riprodurre un modello sperimentale.

Affinché gli scienziati comprendano più a fondo l'eziologia e la patofisiologia della malattia di Parkinson serve un'attenta stima sia delle possibilità che dei limiti della validità dei modelli sperimentali di malattia di Parkinson, nonché una valutazione circostanziata degli aspetti che abbisognano di ulteriori miglioramenti, che possono influenzare lo sviluppo e l'applicazione di nuove terapie (Emborg EM., 2007).

Proprio per questo i ricercatori si avvalgono di modelli sperimentali di malattia di Parkinson basati sull'impiego di specie animali diverse, che continuano a fornire informazioni preziose, consentendo di sperimentare nuove e alternative strategie terapeutiche.

I modelli sperimentali chiaramente dovrebbero avere somiglianze strette con la malattia di Parkinson idiopatica o quanto meno ai seguenti tre livelli:

- 1) patologia: maggiore o uguale al 60% la perdita di neuroni della dopamina tirosin idrossilasi immunoreattivi (Thir) nella pars compacta della sostanza nigra (SNc), accompagnata da una maggiore o uguale all'80% di riduzione della dopamina striata;
- 2) sintomi: deficits nella performance motoria caratterizzati da bradicinesia/acinesia, rigidità, instabilità posturale e tremore;
- 3) risposta terapeutica: i sintomi migliorano rimpiazzando la dopamina con un trattamento farmacologico dato da una combinazione di levodopa e carbidopa e/o farmaci dopamina-agonisti (Collier TJ. *et al.*, 2003).

In base alle tecniche impiegate nell'indurre le alterazioni anatomico-patologiche e funzionali tipiche della malattia, i modelli animali sperimentali per la malattia di Parkinson si dividono fondamentalmente in due categorie: modelli farmacologici e modelli transgenici.

I modelli transgenici, che rappresentano un'ulteriore evoluzione dei modelli sperimentali per la malattia di Parkinson ancora poco utilizzati, si basano sull'induzione dell'espressione del gene codificante per l'alfa-sinucleina umana, sia nella forma normale che nelle forme recanti una o entrambe le mutazioni

legate alla malattia di Parkinson familiare (A53T e A30P). I modelli transgenici attualmente impiegati sono sostanzialmente di due tipi, e si differenziano a seconda che l'espressione del gene per la sinucleina sia ubiquitaria oppure limitata al sistema nervoso. I dati ottenuti fino ad oggi per mezzo di entrambi i modelli non risolvono, comunque, uno dei quesiti fondamentali: se l'accumulo di sinucleina nel sistema nervoso centrale sia la causa oppure l'effetto del processo neurodegenerativo della malattia di Parkinson (Blandini F., 2005).

I modelli farmacologici sono di gran lunga i più utilizzati e si basano sulla riproduzione della lesione anatomo-patologica tipica della malattia, ovvero la degenerazione dei neuroni dopaminergici della pars compacta della substantia nigra (SNc), indotta dalla somministrazione di neurotossine specifiche per via sistemica o locale (Blandini F., 2005). Questi modelli prevedono essenzialmente l'impiego di primati non umani o di roditori. Attualmente esistono tre tecniche per la riproduzione della patologia di Parkinson nei modelli animali sperimentali:

- 1) lesione unilaterale con 6-idrossidopamina nei ratti;
- 2) iniezione sistemica di 1-metil 4-feniltetraidropiridina (MPTP) nei topi e nei Primati non umani;
- 3) iniezione sistemica di rotenone nei ratti.

Nei primati non umani la lesione viene prodotta mediante somministrazione di 1-metil-4 fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), una neurotossina identificata nei primi anni '80 negli Stati Uniti quando, in seguito all'osservazione di numerosi casi di parkinsonismo in ragazzi giovani, si notò che questi, consumando uno stupefacente di sintesi, avevano assunto inconsapevolmente la tossina formata come prodotto collaterale del processo chimico (Langston JW. *et al.*, 1983).

L'MPTP infatti, una volta attraversata la barriera ematoencefalica, viene trasformata dalle monoaminossidasi cerebrali (MAO) nel suo metabolita attivo, 1-metil-4- fenilpiridinio (MPP+). L'MPP+ si accumula selettivamente nella SNc, sfruttando il sistema di trasporto per la dopamina, e una volta all'interno del

neurone si lega al complesso I della catena respiratoria mitocondriale, causando morte cellulare (Blandini F., 2005).

Questa tossina nei primati non umani causa l'insorgenza di un parkinsonismo sperimentale che, dal punto di vista sintomatologico, è ad oggi il più simile alla malattia di Parkinson idiopatica dell'uomo. Infatti le funzioni motorie e cognitive degli animali divengono alterate, come negli umani; in particolar modo essi denotano rigidità muscolare, acinesia e tremori, contemporaneamente ad una marcata assenza di memoria (DeLong MR., 1990).

L'impiego dei modelli animali nella malattia di Parkinson, soprattutto di quelli più recenti, continua a fornire informazioni preziose nella comprensione dei meccanismi patogenetici della malattia.

Sebbene non sia stato ancora identificato il "primum movens" che avvia la cascata di eventi che conducono all'espressione della malattia, l'introduzione del modello del rotenone e l'uso di animali transgenici hanno permesso ai ricercatori di addentrarsi ulteriormente nei meccanismi intrinseci del processo degenerativo nigrostriatale, analizzando soprattutto il ruolo dell'alfa-sinucleina e, più in generale, delle alterazioni del catabolismo proteico intra-cellulare.

Nella caratterizzazione delle modificazioni anatomo-funzionali che interessano i nuclei della base in seguito al danno nigro-striatale il contributo dei modelli sperimentali è risultato fondamentale.

I modelli sperimentali della malattia di Parkinson, soprattutto di quelli che si avvalgono di primati non umani, sono ampiamente sfruttati anche nella valutazione di nuovi approcci terapeutici, sia di tipo farmacologico che di tipo genico e trapiantologico, prima del loro relativo utilizzo in pazienti umani (Blandini F., 2005).

In particolare, negli ultimi anni l'attenzione dei ricercatori si è concentrata sullo sviluppo di terapie neuroprotettive, in grado cioè di bloccare la progressione del danno nigrostriatale, promuovendo un recupero funzionale dei nuclei della base.

Risulta evidente alla luce di quanto finora evidenziato il fatto che i modelli sperimentali, da quelli classici fino ai più recenti, continuano a fornire informazioni essenziali per una piena comprensione dei meccanismi eziopatogenetici e fisiopatologici della malattia di Parkinson.

Essi rappresentano, inoltre, un terreno di sperimentazione di enorme valore scientifico per le possibili ricadute nel campo delle innovazioni terapeutiche di tipo farmacologico, transgenico e trapiantologico (Blandini F., 2005).

CAP.3 PRIMATI NON UMANI COME MODELLI DI PATOLOGIA DI PARKINSON

Esistono numerosi modelli con primati non umani per lo studio della malattia di Parkinson, ognuno con caratteristiche che li rendono sfruttabili per lo studio di differenti aspetti della malattia o di potenziali nuove terapie.

La validità di tutti i modelli di malattia di Parkinson è però offuscata dall'incertezza che ancora riguarda la vera eziologia della malattia.

I vari modelli sono utili in particolar modo nel rappresentare aspetti differenti della malattia in determinati intervalli di tempo; questo concetto fornisce chiavi di sviluppo di nuovi modelli accuratamente mirati di primati non umani e facilita il trasferimento dei risultati ottenuti nella successiva pratica clinica (Emborg EM., 2007).

Sicuramente i numerosi miglioramenti effettuati nella comprensione e nel trattamento della malattia di Parkinson possono essere direttamente ricondotti alla scoperta e alla determinazione di una serie di agenti implicati nella patogenesi, proprio grazie all'utilizzo di modelli animali sperimentali in vivo (Collier TJ. *et al.*, 2003): biologici (invecchiamento), tossici (6-idrossidopamina (6-OHDA) e 1-metil-4 fenil-1,2,3,6- tetraidropiridina (MPTP)), fattori genetici (animali transgenici). Probabilmente la più valida risorsa sperimentale per la ricerca nella malattia di Parkinson è costituita dalla disponibilità di accurati

modelli di malattia nelle specie che assomigliano per dimensioni e complessità al sistema nervoso umano.

Mentre importanti informazioni derivano da studi su cellule in coltura, roditori e altri modelli, lo stadio finale per la valutazione preclinica della terapia è spesso fornita al meglio dagli studi sui primati non umani.

L'utilità dei primati non umani come modelli per lo sviluppo di nuovi fattori terapeutici è direttamente correlata alla loro capacità di rappresentare accuratamente le caratteristiche della malattia di Parkinson; infatti gli elementi distintivi dei primati non umani sono strettamente analoghi a quelli umani, per similitudini filogenetiche e comportamentali; questo è vero in particolar modo relativamente alla struttura tissutale, al sistema immunitario, alla fisiologia e al metabolismo (Sibal LR. e Samson KJ., 2001; Emborg EM., 2007).

Le abilità motorie e cognitive dei primati non umani, infatti, tanto quanto la loro complessità neuroanatomica assomigliano da vicino a quelle degli umani e questo può permettere un raffronto diretto sugli aspetti che hanno impatto clinico (Capitanio JP. e Emborg EM., 2007).

Esempio rilevante di questa somiglianza neuroanatomica particolarmente utile per lo studio della malattia di Parkinson è la conformazione dello striatum: le fibre corticali sia nei primati non umani che negli esseri umani sono raggruppate nelle capsule interne, che separano la massa striatale dorsomedialmente nei nuclei caudati e ventrolateralmente nei putamen. Nei ratti, per contrasto, lo striatum appare come una singola massa forata, attraversata da fibre corticali (Parent A., 1986).

L'utilizzo dei primati non umani come modello sperimentale è emerso essere non solo un ponte per collegare la ricerca di base all'applicazione clinica ma anche un valido modello animale ideale per il conseguimento della salute umana e la ricerca delle patologie (Sibal LR. e Samson KJ., 2001).

Le specie di primati non umani maggiormente utilizzate come modelli sperimentali sono le *Cynomolgus* (tra cui *Cynomolgus* Monkey conosciuto anche come *Macaca Fascicularis* tabella 1 e 2) (Lindburg D., 1980), le Rhesus e le scimmie verdi Africane (Sibal LR. e Samson KJ., 2001; Collier TJ *et al.*, 2003).

MALATTIA DI PARKINSON

Regno	Animalia
Phylum	Cordata
Classe	Mammalia
Ordine	Primates
Sottordine	Anthropoidea
Infraordine	Catarrhini
Famiglia	Cercopithecidae
Sottofamiglia	Cercopithecinae
Genere	Macaca
Specie	Macaca Fascicularis

Tabella 1 Classificazione di *Macaca Fascicularis* (Lindburg D., 1980)

Peso animale adulto	Maschio: 3,5-8,3 kg Femmina: 2,5-5,7kg
Frequenza respiratoria	30-50 atti/minuto
Frequenza cardiaca	162-240 battiti/minuto
Pressione sistolica	150-170 mmHg
Pressione diastolica	70-90 mmHg
Pressione media	100-110 mmHg
Temperatura rettale	38,4-39,6°C

Tabella 2 Caratteristiche fisiologiche generali Macaca (tratto da GISAL/SSFA)

Dal punto di vista legislativo in Italia, nel D.L.vo 116/92, le sorti dei primati non umani vengono accomunate a quelle dei cani, dei gatti e degli animali appartenenti alle specie in via di estinzione (Comini A., 2006).

Infatti, al capo II (Disposizioni derogatorie) l'art.8 riporta che "il Ministero della Salute può autorizzare esperimenti su primati soltanto per verifiche medico-

biologiche essenziali purché la specie considerata si riveli, eccezionalmente, l'unica adatta allo scopo”.

Questo concetto viene ribadito nella Circolare n.8 del 22/04/94, emanata dal Ministero della Salute, che prevede inoltre che la deroga sia concessa solo dopo che gli organismi preposti abbiano valutato accuratamente la procedura e le tecniche che si intendono utilizzare nonché il relativo fine da conseguire nella ricerca; pertanto, le relative richieste di autorizzazione devono essere supportate da un'adeguata documentazione tecnico-scientifica e validate dal Ministero della Salute.

Secondo alcuni studiosi la sperimentazione effettuata sugli animali ha consentito di acquisire molte delle attuali conoscenze in campo biomedico e di ottenere risultati difficilmente raggiungibili in altro modo, in quanto al momento ancora pochi metodi possono risultare alternativi e sostituire in maniera efficace un esperimento eseguito su modelli animali (Comini A., 2006).

Nonostante in percentuale i primati non umani usati nella ricerca siano esigui, sembra che proprio questa specie abbia permesso i maggiori progressi nella prevenzione e nelle cure di malattie infettive quali la polio-mielite, l'epatite B e alcune patologie degenerative croniche del sistema nervoso centrale (Sibal LR. e Samson KJ., 2001).

In accordo con la regolamentazione FDA, inoltre, tutti i farmaci candidati per la cura delle patologie neurologiche, come la malattia di Alzheimer e la malattia di Parkinson, devono essere sperimentati sui primati non umani prima di venire studiati in trial clinici.

Anche le terapie cellula-basate e gene-indotte richiedono di venire sperimentate proprio tramite modelli animali con primati prima di passare alla prima fase del trial clinico su pazienti umani (Emborg EM., 2007).

Alla luce di quanto detto, i primati giocano un ruolo essenziale come modello della malattia di Parkinson nella comprensione della patofisiologia della malattia e nella sperimentazione delle diverse terapie.

La ricerca con i primati permette anche l'identificazione dei fattori di rischio ambientale per lo sviluppo della malattia di Parkinson: studi di elettrofisiologia su modelli di primati non umani con malattia di Parkinson, ad esempio, hanno

identificato il circuito neurologico responsabile dei sintomi motori della patologia e questa conoscenza ha condotto allo sviluppo delle relative tecniche chirurgiche, quali l'ablazione chirurgica subtalamica e la stimolazione cerebrale profonda (Blandini F., 2005).

Similmente ai pazienti umani con malattia di Parkinson, i primati non umani parkinsoniani rispondono positivamente alle terapie di rimpiazzo della dopamina e presentano complicazioni associate al suo uso nel lungo termine: una somiglianza questa che facilita l'individuazione di nuovi trattamenti sintomatici, quali gli agonisti dopaminergici.

Nuove generazioni di componenti e di terapie che usano direttamente la liberazione intracerebrale di farmaci, di cellule e di vettori virali traggono beneficio da valutazioni precliniche ricavate da modelli con primati non umani.

La proficua applicazione di ogni modello, ovviamente, dipende da quanto questo corrisponde alla ricerca scientifica che necessita di una risposta: adeguati protocolli sperimentali, rilevazioni ed elaborazioni multiple dei risultati di notevole importanza clinica e un appropriato numero di animali fonte di studio sono essenziali nel minimizzare i limiti dei modelli e aumentarne la validità clinica predittiva.

Proprio per questo, i modelli sperimentali con primati sono uno strumento chiave per decifrare la patofisiologia della malattia di Parkinson e valutare le strategie terapeutiche della stessa (Emborg EM., 2007).

Gli attuali modelli sperimentali basati sull'utilizzo dei primati non umani allo scopo di mimare quanto più possibile le differenti caratteristiche della malattia di Parkinson sono incentrati su temi quali: l'invecchiamento, la trasmissione genetica e le neurotossine (Emborg EM., 2007).

Per quanto concerne l'invecchiamento, diversi studi hanno identificato l'età avanzata quale fattore critico di rischio per lo sviluppo di malattia di Parkinson negli esseri umani (Tanner CM. *et al.*, 1999).

Benché non vi siano raccolte di dati sullo sviluppo spontaneo della malattia di Parkinson nei primati non umani, similmente agli esseri umani essi presentano una disfunzione età-correlata del sistema nigrostriatale, associata ad

incoordinazione motoria che si evidenzia in leggero tremore, postura bloccata e disturbi della mano, del portamento e dell'equilibrio (Emborg EM., 2007).

Nei primati non umani, in particolare nelle scimmie Rhesus (*Macaca mulatta*) e nelle scimmie scoiattolo (*Saimiri sciureus*), sono stati descritti i seguenti cambiamenti dopaminergici nigrostriatali correlati all'età:

- perdita di dopamina striatale (Emborg EM., 2007).
- diminuita funzionalità dei recettori D2 della dopamina (Arnste AF. *et al.*, 1995; Morris ED. *et al.*, 1999);
- deterioramento della trasmissione di dopamina (Gerhardt GA. *et al.*, 1995);
- perdita di fibre striatali tirosina idrossilasi positive (TH1; limitando gli enzimi della sintesi della dopamina) (Collier TJ. *et al.*, 2007);
- diminuito numero dei neuroni nigrali immunoreattivi trasportatori di tirosina idrossilasi (TH) e di dopamina (DAT), contati tramite metodi stereologici (Emborg EM. *et al.*, 1998; Siddiqi ZA e Peters A., 1999);
- minore dimensione dei neuroni nigrali TH e DAT trasportatori di dopamina positivi (Collier TJ. *et al.*, 2007; Emborg EM. *et al.*, 1998);
- diminuita densità ottica di TH nei neuroni nigrali (Collier TJ. *et al.*, 2007);
- accumulo di lipofucsina (Kanaan NM. *et al.*, 2007, Siddiqi ZA. e Peters A., 1999);
- morfologia dendritica anormale dei neuroni nigrali TH-positivi (Siddiqi ZA e Peters A., 1999).

Immagini dal vivo hanno dimostrato un diminuito uptake della fluorodopa striatale, misurato con la tomografia ad emissione di positroni (PET) (De Jesus OT. *et al.*, 2001) e ricercatori hanno utilizzato la risonanza magnetica (MRI) per dimostrare che l'aumentato accumulo di ferro con l'età predice i declini nella funzione motoria (Cass WA. *et al.*, 2007).

I cambiamenti sopraelencati riguardano una malattia di Parkinson allo stadio iniziale, destinata perciò a peggiorare col tempo. Questa caratteristica è difficile da raggiungere con altri modelli sperimentali che non siano basati su primati.

Bisogna ricordare ovviamente che l'invecchiamento è un processo naturale, e non essendo propriamente una malattia i relativi sintomi possono presentare sottili differenze tra i diversi individui.

La malattia di Parkinson è una malattia dell'invecchiamento e la maggioranza dei pazienti candidati alle terapie sperimentali sono i soggetti più anziani.

Valutare la sindrome di Parkinson nei primati non umani anziani può essere limitativo tuttavia importante nel predire la potenziale efficacia dei presidi terapeutici nella popolazione.

Per questo, una risposta positiva al trattamento con levodopa deve essere misurata solo con prove che tengano in considerazione anche lo stile di vita (Emborg EM., 2007).

Inoltre i criteri per definire "vecchi" gli animali variano a seconda delle differenti specie (l'età post menopausa per le scimmie rhesus è sopra i 25 anni, mentre per le scimmie scoiattolo è approssimativamente dopo i 15 anni) e possono influenzare la comparazione dei dati riferiti a gruppi di età e specie diverse.

E' quindi importante considerare attentamente tali fattori durante lo studio, la selezione delle specie e i metodi di valutazione da adottare; ad esempio, le conte stereologiche dei neuroni TH (tirosin idrossilasi) positivi nel sistema nervoso di scimmie rhesus dai 26 ai 28 anni ha evidenziato una perdita significativa (Emborg EM. *et al.*, 1998) mentre altri ricercatori non hanno ritrovato cambiamenti nei numeri di neuroni nigrali TH positivi nelle scimmie scoiattolo tra i 15,8 ai 21 anni, notando invece una perdita rilevante di dopamina nel loro sistema nervoso (Irwin I. *et al.*, 1994).

Una volta adottato questo modello sperimentale, bisogna considerare anche che i primati non umani hanno una prospettiva di vita di molte decadi, che i soggetti anziani richiedono cure specialistiche e che trovare colonie invecchiate è piuttosto costoso (Emborg EM., 2007).

Da non dimenticare poi che i primati non umani anziani possono sviluppare malattie tipiche della vecchiaia, quali cancro, artrite o diabete, tanto quanto difficoltà cognitive che possono portare a risposte tardive (Roberts JA., 2002).

Questi cambiamenti possono influenzare i risultati sperimentali nello studio della malattia di Parkinson, in maniera molto simile alle complicazioni che molti pazienti affetti da malattia di Parkinson incontrano invecchiando.

I modelli con primati non umani anziani forniscono però una visione d'insieme sulla problematica oggetto di studio che può sia influenzare positivamente le

terapie applicate ad un sistema invecchiato sia evidenziare il ruolo dell'invecchiamento nello sviluppo della malattia di Parkinson (Kanaan NM. *et al.*, 2007; Emborg EM., 2007).

In merito al tema della trasmissione genetica, bisogna ricordare che il 5% di tutti i casi di malattia di Parkinson sono di origine familiare e i ricercatori hanno identificato molteplici mutazioni genetiche relative a questa malattia (Hardy J. *et al.*, 2006).

L'alfasinucleina è uno dei maggiori componenti dei corpi di Lewy e dei neuriti di Lewy nella malattia di Parkinson sporadica (Spillantini MG. *et al.*, 1997-98); due mutazioni mancanti nel gene dell'alfa sinucleina (A53T e A30P) sono state identificate in molte famiglie con parkinsonismo autosomico dominante (Kruger R. *et al.*, 1998; Emborg EM., 2007).

Tuttavia non ci sono dati riguardanti primati non umani con simili mutazioni spontanee, ed è difficile allevare soggetti con mutazioni genetiche mirate.

E' importante notare che un modello sperimentale di trasferimento di geni sui primati richiede personale e strumenti chirurgici specifici per eseguire la chirurgia stereotattica del cervello e poter garantire successivamente le cure necessarie.

La risonanza magnetica è raccomandata per mirare con precisione la chirurgia nigrale e per applicare questo modello ad altre specie di primati non umani simili alle scimmie rhesus (Subramanian T. *et al.*, 2005).

Bisogna tenere presente che se lo studio richiede un modello di malattia di Parkinson sistemico, il rilascio unilaterale stereotattico dei vettori nella sostanza nigra non riproduce fedelmente la sindrome multisistemica e multisintomatica che caratterizza sia la forma sporadica che quella familiare della malattia (Emborg EM., 2007).

Una caratteristica attraente di questo modello di trasferimento di geni è che l'uso di vettori AAV induce un incremento progressivo nell'espressione della proteina che richiede più settimane per raggiungere il suo picco (i sintomi divengono evidenti a nove settimane), con lo sviluppo di lesioni in più intervalli di tempo.

E' importante riconoscere che questa caratteristica è vettore dipendente, ad esempio i vettori lentivirali raggiungono i livelli di picco di espressione in pochi giorni (Lo Bianco C. *et al.*, 2002) e differenti vettori mostrano un tropismo ed una efficienza di trasferimento diversi (Burger C. *et al.*, 2004; Emborg EM., 2007).

Sicuramente, però, le neurotossine 6-idrossidopamina (6-OHDA 1) e 1-metil-4 fenil-1,2,3,6 tetraidropiridina (MPTP 1) sono le più usate per riprodurre la malattia di Parkinson nei modelli animali (Emborg EM., 2007).

Sia i modelli di primati non umani intossicati con MPTP che i 6-OHDA sono prodotti dall'esposizione a neurotossine selettive.

L'esposizione ad una tossina ambientale, infatti, può essere un fattore che contribuisce allo sviluppo della malattia di Parkinson, ma non chiarisce la comparsa della maggior parte dei casi della malattia.

Comunque i meccanismi attraverso i quali MPTP e 6-OHDA producono degenerazione nel sistema dopaminergico collimano con i dati ed i ragionamenti concernenti la morte delle cellule nella malattia di Parkinson (Collier TJ. *et al.*, 2003).

Il danno comincia dai terminali dopaminergici all'interno dello striatum e comporta stress ossidativo e disfunzione mitocondriale quali fattori scatenanti della degenerazione neuronale (Collier TJ. *et al.*, 2003).

L'6-OHDA è la prima neurotossina catecolaminergica ad essere stata identificata (Jonsson G. e Sachs C., 1975; Thoenen H. e Tranzer JP, 1968; Ungerstedt U., 1968); essa induce la morte cellulare mediante stress ossidativo, dopo uptake della dopamina e norepinefrina tramite il sistema di trasporto delle catecolamine.

Questa neurotossina non è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica e richiede una somministrazione intracerebrale per indurre i suoi effetti tossici.

Il composto è sensibile alla luce e dev'essere quindi adeguatamente protetto da essa. Poiché l' 6-OHDA facilmente ossida in soluzione è importante prepararla al momento della somministrazione (approssimativamente una nuova dose per ora per procedure prolungate o multiple) sciogliendo la polvere in soluzione

salina e acido ascorbico, di solito una concentrazione di 4-5 microgrammi/microlitro (Emborg EM., 2007).

Il tempo di sviluppo e la gravità della malattia indotta dipende dal numero, dalla quantità e dalla localizzazione (striatum, sostanza nigra o lobo frontale-mediale del cervello) delle iniezioni di 6-OHDA (Emborg EM., 2004; Zigmond MJ. e Stricker EM., 1989).

Un'importante complicazione insita in questo modello è costituita dai numerosi passaggi intracerebrali con l'ago necessari per raggiungere un'appropriata distribuzione di 6-OHDA e diminuire il tempo di guarigione spontanea.

Come con le altre procedure stereotattiche, questo modello richiede strutture chirurgiche adeguate e personale istruito per poter eseguire la procedura chirurgia cerebrale e provvedere alle successive cure dei primati (Emborg EM., 2007).

L'approccio segue quello descritto da Sauer H. e Oertel WH. (1994) nei ratti e utilizza iniezioni multiple intrastriatiali di neurotossina 6-OHDA per produrre una degenerazione parziale progressiva (4- 6 mesi) dei neuroni dopaminergici del sistema nervoso centrale e una riduzione della dopamina striatale (Collier TJ. *et al.*, 2003).

La risonanza magnetica mirata è raccomandata nelle applicazioni di questo metodo alle specie di primati non umani, come ad esempio le scimmie macaca. Similmente agli altri metodi stereotattici la somministrazione striatale unilaterale di 6-OHDA non riproduce pienamente la sindrome multisistemica e multisintomatica che caratterizza la malattia di Parkinson.

Nonostante presenti alcune limitazioni, questo modello induce una relativamente retrograda e progressiva lesione nigrostriatale (dopo approssimativamente due settimane) e può fornire una finestra di tempo per studiare lo stress ossidativo e la neurodegenerazione, nonché poter testare nuove strategie neuroprotettive (Emborg EM., 2007).

Ad oggi il migliore modello sperimentale della malattia di Parkinson è basato sull'esposizione dei primati non umani alla neurotossina MPTP.

L'MPTP è una tossina altamente lipofila, un inibitore del complesso mitocondriale I, ed è stata scoperta per caso in umani intossicati (Davis GC. *et*

al., 1979; Langston JW. *et al.*, 1983); essa attraversa facilmente la barriera ematoencefalica e diviene tossica attraverso la sua trasformazione a MPP+ tramite l'enzima MAO-B.

Il sistema di trasporto della dopamina conduce poi l'MPP+ nei neuroni della dopamina (Blandini F., 2005; Emborg EM., 2007).

I pazienti umani intossicati da MPTP hanno risposto alla terapia standard antiparkinson, consistente nella somministrazione di levodopa/carbidopa e farmaci agonisti della dopamina.

La rimarchevole somiglianza negli esseri umani tra il parkinsonismo MPTP-indotto e il parkinsonismo idiopatico ha portato allo sviluppo e alla caratterizzazione di modelli sperimentali che utilizzano l'intossicazione con MPTP negli animali e, tra le specie più sensibili all'esposizione di questa tossina vi sono proprio i primati non umani (Collier TJ. *et al.*, 2003).

Diverse specie di primati non umani sviluppano il parkinsonismo dopo l'esposizione sistemica alla tossina MPTP, incluse marmosets, scimmie scoiattolo, macachi e vervet monkeys (Collier TJ. *et al.*, 2003).

La sindrome di parkinsonismo bilaterale nelle scimmie trattate con MPTP presenta sorprendenti similitudini al parkinsonismo umano, caratterizzato da: una degenerazione dei neuroni dopaminergici del sistema nervoso centrale moderatamente forte e relativamente specifica, una diminuzione dell'80% o più della dopamina striatale, stabili segni di comportamento che includono bradicinesia/acinesia, rigidità e alterazioni posturali. Tutte le scimmie affette, inoltre, rispondono ai trattamenti convenzionali con sostituti della dopamina (Collier TJ. *et al.*, 2003; Emborg EM., 2007).

Gli studiosi e coloro che si prendono cura degli animali sperimentali devono evitare l'esposizione cronica anche a piccole quantità di MPTP, a causa dell'aumentato rischio a lungo termine di sviluppare la malattia di Parkinson (Langston JW., 1996). Un attento rispetto delle procedure nel maneggiare e utilizzare la neurotossina riduce il rischio di esposizione; prima di utilizzare MPTP gli studiosi devono quindi assicurarsi che vi siano: un piano istituzionale per la ricerca su patologie MPTP correlate, aree adibite per la quarantena dei primati non umani dopo l'iniezione di MPTP, rifiuti differenziati per il materiale

contaminato e una corretta informazione ed un addestramento adeguato di tutto il personale interessato, per un sicuro utilizzo della neurotossina (Przedborski S. *et al.*, 2001).

A seconda del metodo di somministrazione della tossina, i primati non umani intossicati presentano una sindrome unilaterale o bilaterale.

Un modello di lesione unilaterale può essere prodotto mediante la somministrazione intracarotidea di MPTP, il quale colpisce in modo grave l'emisfero cerebrale nella sede ipsilaterale all'iniezione, con minori cambiamenti nella sede controlaterale.

Questo modello unilaterale riproduce accuratamente la sindrome di Parkinson su di una parte del cervello, producendo deficits stabili sulla parte controlaterale del corpo, ma evitando al contempo la debilitazione sistemica grave che a volte accompagna il modello bilaterale (Collier TJ. *et al.*, 2003).

I modelli MPTP sistemici presentano il vantaggio di indurre una sindrome bilaterale che rende possibile l'uso di ogni emisfero del cervello per analisi differenti e per influenzare altri sistemi, oltre a quello nigrostriatale (Emborg EM., 2007).

Morfologicamente, la caratteristica più sorprendente dopo la somministrazione di MPTP è costituita dalla perdita di neuroni dopaminergici nigrali, associata alla perdita di terminali striatali dopaminergici. Sebbene non siano state ritrovate le tipiche strutture dei corpi di Lewy, i ricercatori riportano inclusioni di corpi eosinofilo-positivi nella sostanza nigra, locus coeruleo, nucleus basalis di Meynert, nucleo motorio dorsale del vago e nucleus del raphe in una scimmia scoiattolo cronicamente trattata con MPTP per via sistemica (Forno LS. *et al.*, 1986-1993).

I ricercatori hanno osservato un'inflammatione nigrale nelle scimmie MPTP trattate per via sistemica (Barcia C. *et al.*, 2004; McGeer PL. *et al.*, 2003) e per via intracarotidea (McGeer PL *et al.*, 2003) a distanza di anni dopo l'avvenuta intossicazione (Emborg EM., 2007).

Metodi appropriati per la somministrazione sistemica della tossina MPTP nei primati non umani sono le iniezioni per via intramuscolare, sottocutanea o intravenosa.

Importante notare come le iniezioni intraperitoneali nei primati non umani non siano invece consigliabili, poiché aumentano il rischio di infezione o di complicazioni gastrointestinali (Emborg EM., 2007).

Si è visto, ad esempio, che una somministrazione da 0.3 a 0,6 mg/kg di MPTP per via intramuscolare a scimmie verdi africane St Kitts (*Cercopithecus aethiops sabaeus*) per 4–5 giorni consecutivi può indurre una grave perdita dopaminergica nigrostriatale bilaterale associata ad una grave sindrome di Parkinson bilaterale (Emborg EM., 2007). Può anche essere presente un tremore a riposo, caratteristica altrimenti difficile da riprodurre nei primati non umani (Tetrud J. *et al.*, 1986).

Questo protocollo presenta comunque un'ampia variabilità individuale, cosicché animali sottoposti allo stesso trattamento possono essere asintomatici o solo lievemente affetti dalla malattia e mostrare col tempo anche una guarigione spontanea (Emborg EM., 2007).

La predittibilità, la stabilità e la velocità dell'inizio dei sintomi dipendono generalmente dal regime di dosaggio, sebbene anche la stessa variabilità individuale influenzi la risposta alla MPTP.

Un punto chiave del modello con MPTP è infatti la variabilità individuale in risposta alla somministrazione della tossina; molti reports sulle lesioni indotte da MPTP nei primati non umani indicano che alcuni animali sono più colpiti di altri e che un miglioramento spontaneo può verificarsi nei soggetti colpiti meno gravemente.

Esiste infatti una grande variabilità nella natura della tossicità acuta sistemica dell'MPTP ed i primati non umani possono o meno presentare segni di malattia di Parkinson dopo i primi due/ tre dosaggi di MPTP; in particolare, con un basso dosaggio i segnali possono richiedere periodi di mesi per divenire evidenti.

E' importante individuare l'opportuno dosaggio di MPTP e la frequenza di somministrazione in base all'età, al peso e alla specie di primate non umano al fine di indurre con successo la malattia di Parkinson senza gravi debilitazioni.

L'ammontare della dose individuale ed il numero totale delle dosi possono essere modificate per produrre gradi simili di disabilità da malattia di Parkinson

(misurati con una scala progressiva) come definito dal singolo disegno sperimentale.

Gli stadi presintomatici possono presentare disordini cognitivi, mentre le disabilità motorie diventano evidenti dopo dosi successive e persistono per molti anni (Brownwell AL. *et al.*, 1998).

I primi sintomi ad apparire sono lentezza (bradicinesia) e ridotto range di movimento (ipocinesia), mentre rigidità posturale, disturbi nella postura e disequilibri nell'abilità motoria possono seguire dopo le dosi successive.

I sintomi iniziali possono essere difficili da individuare senza un appropriato training ed una conoscenza dei primati non umani sia con un comportamento normale che con i sintomi caratteristici della malattia di Parkinson.

E' importante monitorare da vicino gli animali (peso del corpo, caratteristiche delle feci ecc.) e provvedere con cure mirate al bisogno.

Animali che sono in buone condizioni al momento della somministrazione dei primi dosaggi possono diventare estremamente deboli dopo le successive; alti dosaggi di MPTP possono causare acinesia totale e ulcere gastrointestinali (Ueki A. *et al.*, 1989).

Gli effetti generali dell'MPTP o le difficoltà che ne risultano nel movimento possono causare negli animali la diminuzione di ingestione di cibo e di liquidi e quindi ripercuotersi in una perdita di peso.

I ricercatori dovrebbero anticipare quest'effetto e prendersi cura degli animali prima che essi perdano significativamente peso (>10%). Vi sono molti modi per affrontare questo problema: offrire una varietà di nuovi cibi invoglia gli animali a mangiare, biscotti per le scimmie ammorbiditi in succo d'arancio o yogurt sono più facili da mangiare rispetto a quelli secchi. Addestrare gli animali prima dei dosaggi di MPTP a bere liquidi supplementari (che forniscono fluidi addizionali, calorie e nutrienti) da una siringa offerta da una persona a loro conosciuta può facilitare la cura dopo la somministrazione di MPTP. Anche il rilascio nasogastrico di supplementi dietetici liquidi e fluidi può essere appropriato in certi casi (Emborg EM., 2007).

Calore supplementare dovrebbe essere disponibile allorché gli animali trattati diventino ipotermici a causa della combinazione tra la decrescente ingestione

calorica, la debilitazione generale e il probabile effetto dell'MPTP sull'ipotalamo, similmente alla deregolazione termica che incorre in alcuni pazienti umani con malattia di Parkinson (Davis TL., 2005).

Classificare e selezionare gli animali in accordo alla gravità dei deficits comportamentali può minimizzare i problemi di gestione: è stato dimostrato che le scimmie affette dalla malattia in modo grave non mostrano un miglioramento della dopamina striatale per almeno un anno dopo il trattamento con MPTP, mentre gli animali meno colpiti mostrano miglioramenti significativi (Emborg EM., 2007).

Una scala validata per giudicare i sintomi della malattia di Parkinson (Imbert C. *et al.*, 2000) è utile nella valutazione dei primati non umani prima del dosaggio di MPTP, per determinarne la loro tolleranza così come la loro disabilità motoria.

La terapia con farmaci sostituti della dopamina può facilitare la cura degli animali, nonostante possa inficiare i risultati sperimentali, in particolare nello studio delle discinesie.

E' importante valutare gli animali dopo ogni dose per determinare i sintomi dovuti alla malattia di Parkinson e gli effetti generali dell'intossicazione MPTP-indotta, per fermarne la somministrazione se necessario (Emborg EM., 2007).

Modelli sistemici cronici lenti sono proficuamente utilizzabili specialmente in funzione degli studi sulla progressione della malattia di Parkinson, in quanto essi assomigliano da vicino nelle caratteristiche biochimiche e patologiche della malattia stessa, incluso lo sviluppo tipico della discinesia L-DOPA indotta (Emborg EM., 2007).

Similmente ai pazienti umani affetti da malattia di Parkinson, i primati non umani intossicati con MPTP (in particolare quelli con parkinsonismo bilaterale) possono anche presentare sintomi clinici non motori, inclusi deficits cognitivi fronto striatali (Schneider JS. e Kovelowski CJ., 1990; Schneider JS. e Pope-Coleman A., 1995) e cambiamenti nelle abitudini del sonno (Almirall H. *et al.*, 1999; Barcia C. *et al.*, 2003).

I ricercatori hanno anche documentato temporanei disturbi riguardanti l'innervazione cardiaca noradrenergica (Emborg EM., 2007).

MALATTIA DI PARKINSON

Analisi biochimiche della dopamina striatale nei primati non umani parkinsoniani rivelano differenze che dipendono dal metodo di somministrazione e, in minor grado, da variabili individuali. Un comune ritrovamento è la deplezione generalizzata di dopamina nel nucleus caudato e putamen; questa caratteristica differisce dalla malattia di Parkinson umana poiché la perdita di dopamina è più rilevante nel nucleo caudale putamen e rostrale caudato (Emborg EM., 2007).

Si è ritrovato, inoltre, che l'MPTP colpisce anche i livelli di altre monoammine cerebrali.

Pifl e colleghi (1991) compararono i livelli di dopamina, noradrenalina e serotonina in 45 regioni del cervello in 9 scimmie rhesus trattate cronicamente per via sistemica con MPTP; come ci si aspettava le alterazioni più significative avvennero nel sistema della dopamina nigrostriatale ma anche molte regioni extrastriatali subcorticali e del tronco cerebrale soffrirono di una sostanziosa perdita di dopamina, con perdita di noradrenalina meno ampiamente diffusa nel tronco cerebrale e i livelli di serotonina meno intaccati.

Nella corteccia cerebrale la perdita di noradrenalina fu maggiore rispetto alla serotonina, a sua volta superiore a quella relativa alla dopamina. Nella corteccia cerebellare le concentrazioni di dopamina e noradrenalina furono ridotte significativamente, mentre il livello di serotonina rimase invariato. Un'interessante scoperta fu che molti dei cambiamenti subcorticali e corticali nei primati non umani sintomatici apparvero anche negli animali asintomatici, suggerendo differenze individuali nei meccanismi funzionali compensatori (Emborg EM., 2007).

Una volta che la sindrome si è stabilizzata (di solito 2-3 mesi dopo l'ultima dose di MPTP) possono essere studiati alcuni interventi terapeutici addizionali, quali strategie di supporto con farmaci, trasferimenti genetici o terapie cellulo-mediate.

I ricercatori che mirano ad ottenere risultati veloci e/o ad applicare questi modelli sperimentali con efficacia devono tener presente che un modello cronico lento richiede molti mesi per poter disporre di scimmie con segni equivalenti alla malattia di Parkinson, e che questo aumenta il costo totale dell'ospedalizzazione dei primati non umani (Emborg EM., 2007).

Sebbene la somministrazione sistemica acuta possa indurre una sindrome simile alla malattia di Parkinson in 4-5 giorni, le sue limitazioni principali sono la debilitazione grave dell'animale e la mancanza di predittibilità.

La neurotossina, infatti, può contrastare l'effetto delle terapie, in particolare nei trattamenti cellulo mediati che siano iniziati prima della fine della sua somministrazione.

Le terapie, a loro volta, possono influenzare il metabolismo e la tossicità dell'MPTP, e quest'effetto dev'essere valutato quale fattore che può potenzialmente confondere durante gli studi neuroprotettivi (Emborg EM., 2007).

L'utilizzo delle tecniche di diagnostica per immagini nei primati permettono di investigare la funzione della dopamina in vivo e di valutare il danno neurologico, esattamente come avviene nella pratica clinica nei pazienti umani (Doudet DJ. *et al.*, 1993; Subramanian T. *et al.*, 2005).

I metodi funzionali di diagnostica per immagini, quale ad esempio la tomografia ad emissione di positroni, possono essere strumenti utili nello stimare la degenerazione dei neuroni dopaminergici, la denervazione simpatica, le risposte adattative ai danni e, molto importante, l'effetto degli interventi terapeutici (Brownell AL. *et al.*, 1998; Eberling JL. *et al.*, 2008; Sanchez-Pernaute R. *et al.*, 2002).

Traccianti differenti (F-DOPA, F-meta-tirosina, - 2 beta carbometoxi-3- beta – (4-fluorofenil) tropane (CFT) tetrabenazina, raclopride), marcati con emissione di positroni quali ^{18}F o ^{11}C , forniscono visioni dell'integrità del sistema dopaminergico a differenti livelli (Pate BD. *et al.*, 1991; Emborg EM., 2007).

Un'alternativa all'uso dei marcatori radiomarcanti dei percorsi dopaminergici è lo studio del comportamento nel restante metabolismo del glucosio, misurato da ^{18}F Fluoro-2-detossid-glucosio (FDG) (Eidelberg D. *et al.*, 1995; Emborg EM., 2007).

Le caratteristiche dell'FDG possono essere associate alle registrazioni elettrofisiologiche, per stabilire l'attività neuronale delle distinte aree del cervello (Kazumata K. *et al.*, 1997).

Il raffronto con i risultati delle registrazioni elettrofisiologiche ottenute dagli animali sani, sebbene difficili da ottenere nei primati non umani (Wichmann T. *et al.*, 1999), possono aiutare ulteriormente a comprendere i cambiamenti fisiologici indotti da strategie terapeutiche che tendono a contrastare la patologia.

Le immagini di risonanza magnetica (MRI) sono un metodo utile per ottenere coordinate precise da utilizzare nelle procedure intracerebrali, così come nel fornire informazioni circa una possibile rottura della barriera ematoencefalica, la presenza di edema, di infiammazione, di lesioni precedenti, di alterazioni causate da agente parkinsoniano o di un accumulo di ferro nel tessuto cerebrale (Subramanian T. *et al.*, 2005; Emborg EM., 2007).

Si possono inoltre utilizzare la risonanza magnetica spettroscopica con protoni (MRS), l'MRI funzionale (f MRI) e la risonanza magnetica per diffusione di immagini (d MRI) per individuare in vivo le dinamiche del cambiamento associate alle neurodegenerazioni ed ai trattamenti antiparkinsoniani (Andersen AH. *et al.*, 2002; Brownell AL. *et al.*, 1998).

L'MRI farmacologica (ph MRI) è proposta quale metodo per mappare la funzione della dopamina nei primati non umani analizzando i relativi cambiamenti nel flusso sanguigno cerebrale dopo la somministrazione di farmaci, quali l'anfetamina, e può diventare uno strumento diagnostico per la malattia di Parkinson (Chen YC. *et al.*, 2005; Jenkins BG. *et al.*, 2004).

La diagnosi definitiva della malattia di Parkinson idiopatica nell'uomo richiede un'identificazione istologica delle inclusioni nei corpi di Lewy, positiva per alfa sinucleina nella degenerazione dei neuroni del SNC.

La presenza o assenza di queste inclusioni non è stata invece riportata nel modello sperimentale con 6-OHDA.

I veri corpi di Lewy non sono stati rilevati nelle scimmie trattate con MPTP dopo tempi di sopravvivenza relativamente breve, ma un recente studio riporta come nei primati sono determinabili alterazioni dei livelli di alfa sinucleina e della sua deposizione, che possono rappresentare un primo stadio nella formazione dei corpi di Lewy (Emborg EM., 2007).

Per gli obiettivi della neuroscienza, quindi, il modello ideale per la malattia di Parkinson è quello che descrive nel modo migliore le complesse interazioni di fattori che generano i sintomi clinici della malattia; per ora questo modello è proprio quello che utilizza i primati non umani intossicati con MPTP.

Gli studi con primati intossicati con MPTP sono risultati essere fondamentali nella valutazione preclinica di numerosi interventi terapeutici potenziali, tra i quali l'utilizzo di antiossidanti, di antagonisti dei recettori del glutammato, della stimolazione cerebrale profonda, della chirurgia ablativa, del trapianto cellulare, dell'infusione di fattori neurotrofici e della terapia genica (Emborg EM., 2007).

CAP.4 CONSIDERAZIONI ANESTESIOLOGICHE

Le procedure sperimentali possono provocare negli animali dolore e sofferenza, che devono essere ridotti al minimo o eliminati, per evidenti ragioni etiche tanto quanto scientifiche.

Le ragioni scientifiche divengono palesi quando si constata che il dolore e il disagio nell'animale inducono una serie di risposte fisiologiche che interessano numerosi sistemi corporei; l'eliminazione o il controllo del dolore possono ridurre l'intensità di questi effetti, a vantaggio della validità del modello sperimentale (Busetto R. *et al.*, 2001).

E' importante ricordare, tuttavia, che la maggior parte degli agenti anestetici ed analgesici influenzano vari sistemi dell'organismo, rischiando quindi di interferire con il protocollo sperimentale.

Per rendere minime queste interazioni, i protocolli anestesioologici devono essere scelti con cura, tenendo in considerazione le proprietà farmacologiche delle sostanze utilizzate, le peculiarità anatomico-fisiologiche e di temperamento del soggetto, la tipologia e la durata dell'intervento e della procedura

diagnostica, nonché gli obiettivi che si vogliono raggiungere (Van Zutphen L.F.M *et al.*, 1993).

E' quindi assodato che il presupposto fondamentale per la buona riuscita di un lavoro di ricerca sperimentale che coinvolga l'utilizzo di animali sia l'adozione di un adeguato protocollo anestesilogico ed analgesico (Busetto R. *et al.*, 2001).

4.a TECNICHE E SOMMINISTRAZIONI ANESTESIOLOGICHE

Come accesso endovenoso nei primati si possono utilizzare (in base alla dose ed al tempo si somministrazione dei farmaci) la vena cefalica, la safena, la femorale e la brachiale.

Cateteri endovenosi da utilizzare durante la procedura possono essere facilmente sicuri nella vena safena in molti primati non umani, così come nelle vene brachiale o cefalica negli animali più grandi.

La vena femorale è comunemente utilizzata per la somministrazione di volumi di sangue relativamente grandi.

L'arteria femorale può essere utilizzata per un prelievo di sangue o per il monitoraggio diretto della pressione sanguigna arteriosa (Sulli J. Popilskis *et al.*, 1997).

4.b PREMEDICAZIONE

Sostanze definite "preanestetici" vengono somministrate al fine di preparare l'animale all'induzione ed al mantenimento dell'anestesia: farmaci quali sedativi, tranquillanti ed analgesici sono infatti d'aiuto sia al paziente che all'anestesista.

Essi permettono di ridurre all'animale lo stress derivato dalle manovre di manipolazione, e contemporaneamente preservano gli operatori da eventuali reazioni aggressive da parte dell'animale (Zanichelli S. *et al.*, 1990).

4.c KETAMINA CLORIDRATO

Si tratta di un composto feniciclidinico, parzialmente solubile, con peso molecolare di 238 Dalton, che produce rapidamente una profonda anestesia dissociativa, ed è stato largamente utilizzato per l'anestesia nei primati non umani fin dagli anni '70.

Il meccanismo d'azione della ketamina non è completamente noto, ma sembra si comporti da agonista sia nei confronti dei recettori muscarinici per l'acetilcolina a livello del sistema nervoso centrale sia nei confronti dei recettori degli oppioidi.

Secondo altri autori, la ketamina interagisce anche sui recettori nicotinici, serotoninergici ed adrenergici (Zanichelli S. *et al.*, 1990).

Questo farmaco deprime l'attività del nucleo centrale del talamo e delle vie talamo-neocorticali implicate nella percezione conscia del dolore; allo stesso tempo, essa stimola il sistema limbico, incluso l'ippocampo (Lumb&Jones', 2007).

Proprio per questa duplice azione, la ketamina viene classificata come anestetico dissociativo. L'effetto sul paziente è quello di indurre un'alterazione nella percezione degli stimoli esterni, causando la dissociazione del soggetto interessato rispetto all'ambiente circostante (Lumb&Jones', 2007).

Questo farmaco è in grado di indurre lo stadio I e II dell'anestesia e di portare l'animale ad uno stato catalettico, caratterizzato da rigidità inerte dei muscoli (Booth NH. e Mc Donald LC., 1991).

Lo stato di anestesia indotto dalla ketamina è caratterizzato dal mantenimento dei riflessi oculari, delle vie respiratorie e dalla posizione centrale dell'occhio.

La persistenza dei riflessi laringei e faringei può provocare l'insorgenza di laringospasmi, broncospasmi e tosse secondaria alle secrezioni e alla manipolazione dell'orofaringe (Lumb&Jones', 1996).

Grazie alla sua liposolubilità, la ketamina attraversa rapidamente la barriera ematoencefalica e, dopo somministrazione endovenosa, raggiunge l'equilibrio in meno di un minuto. L'azione insorge quindi velocemente, e dura circa 15-20 minuti.

Il suo legame con le proteine plasmatiche si aggira attorno al 10% e varia al variare del pH: diminuisce infatti per valori di pH inferiori a 7,4, mentre aumenta per valori più elevati (Bhattacharya PS., 1993).

La ketamina si distribuisce rapidamente in tutti i tessuti dell'organismo, con predilezione per il tessuto adiposo, il fegato, il polmone ed il cervello (Konrad F., 1998).

Il metabolismo della ketamina è epatico, ed avviene per dimetilazione ed idrossilazione. Questi processi portano alla formazione di glucuronidi idrosolubili, che vengono poi eliminati con le urine (White PF. *et al.*, 1982).

La cessazione dell'attività di questo farmaco è dovuta però alla sua rapida redistribuzione, piuttosto che al suo metabolismo. L'emivita biologica apparente di questo farmaco nell'uomo è comunque di sole 2-3 ore (Konrad F., 1998).

A livello di sistema nervoso centrale, la somministrazione di ketamina determina un aumento del flusso ematico, un incremento della pressione intracranica, del liquido cerebrospinale e del metabolismo cerebrale.

L'ipertensione cerebrale può essere aggravata dall'impedimento del ritorno venoso dalla testa, causato dall'aumento di tono della muscolatura scheletrica del torace e dell'addome.

Dal punto di vista cardiovascolare, la ketamina ha attività stimolante sul sistema nervoso simpatico, inibendo la captazione delle catecolamine, ed effetto simpaticomimetico a livello di sistema nervoso centrale. Inoltre, essa ha effetto diretto sulla muscolatura liscia vasale, ed effetto inotropo positivo sul miocardio; comporta quindi un aumento della gittata, della frequenza cardiaca, della pressione aortica media, della pressione arteriosa polmonare e della pressione venosa centrale.

Dopo la somministrazione di ketamina si osservano comunemente lacrimazione e ipersalivazione. L'uso di atropina per diminuire la salivazione è tuttavia sconsigliato, visto l'effetto cronotropo positivo additivo dei due farmaci (White PF. *et al.*, 1982).

La ketamina non deprime significativamente l'attività respiratoria, non inibisce i riflessi di iperventilazione all'ipossia o all'ipercapnia ed è dotata di potere broncodilatatore (Booth NH. e Mc Donald LC., 1991); essa viene utilizzata in

medicina veterinaria per la sua capacità di produrre uno stato di anestesia dissociativa profonda, ma di breve durata, caratterizzata da un rapido risveglio. La ketamina non è un buon miorilassante, ma possiede buone capacità analgesiche, soprattutto a livello somatico (Lumb&Jones', 2007).

Nei primati non umani la ketamina ha un ampio margine di sicurezza, ed è quindi il farmaco più comunemente scelto per l'induzione dell'anestesia (Winterborn AN. *et al.*, 2008).

Essa presenta una combinazione di proprietà che la rendono l'anestetico di prima scelta in molte circostanze: rapida ed affidabile induzione dell'anestesia dopo somministrazione intramuscolare, minima o assente depressione cardiovascolare e respiratoria (Young SS. *et al.*, 1999).

La ketamina è stata usata a dosaggi che variano dai 5 mg/kg ai 20 mg/kg IM in molte specie come agente per il contenimento ed induzione per successiva somministrazione di altri farmaci anestetici iniettabili o gassosi (Sulli J. Popilskis *et al.*, 1997); nei primati non umani, infatti, essa produce una rapida induzione, richiede circa 5 minuti dalla somministrazione intramuscolare, redistribuzione e risveglio (per il risveglio completo servono dai 40 ai 60 minuti, in relazione al dosaggio utilizzato).

La somministrazione di un singolo bolo fornisce il contenimento per circa 15-30 minuti.

La ketamina viene metabolizzata dal citocromo P450 epatico, ed escreta con le urine; produce uno stato cataleptoide che comporta incoscienza, una buona analgesia somatica, minima depressione respiratoria e stabilità emodinamica.

Tuttavia, se usata da sola, essa produce uno scarso rilassamento muscolare, e in alcuni casi può indurre movimenti tonico clonici e reazioni psicotomimetiche, soprattutto nei soggetti giovani, potendo causare fenomeni di ipersalivazione in alcune specie.

Dopo la somministrazione di ketamina, i primati non umani mantengono i riflessi faringeo e palpebrale; di conseguenza, il laringospasmo non è raro durante l'intubazione, dopo la somministrazione di ketamina, per il mantenuto riflesso faringeo e l'irritazione delle corde vocali dovuto alle secrezioni orofaringee.

Eventualmente, può essere somministrata dell'atropina ad un dosaggio di 0,02-0,05 mg/kg IM, al fine di limitare la salivazione.

Sembra che l'utilizzo della ketamina non alteri le funzioni endocrine nei *Macaca Fascicularis*, ma possa invece diminuire i parametri ematologici, quali i valori della conta leucocitaria, delle proteine totali, dell'albuminemia e della calcemia. Rimangono costanti i valori di ematocrito, di emoglobinememia, del colesterolo totale, dei trigliceridi, degli enzimi epatici (GOT, GPT) e dell'attività della fosfatasi alcalina.

Nei dieci minuti che seguono la somministrazione di ketamina si registra un aumento temporaneo della glicemia.

La sedazione con ketamina aumenta il cortisolo urinario sia nei macachi a lunga coda (*Macaca fascicularis*) che nei macachi a coda di maiale (*Macaca nemestrina*), e favorisce la riduzione delle curve di tolleranza del glucosio nei macachi Stumptail (*Macaca arctoides*).

Nei ratti, nei conigli e nei primati non umani la ketamina intramuscolare è riconosciuta come causa di infiammazione tissutale, necrosi muscolare, infiammazione perineurale e fibrosi. Il danno tissutale può essere correlato al basso pH della ketamina (pH 3,5-5) (Winterborn A. *et al.*, 2007).

In molti primati la ketamina, al dosaggio di 5-15 mg/kg per via intramuscolare, fornisce un grado di immobilizzazione sufficiente per effettuare un esame clinico, una cateterizzazione uretrale o venosa, un prelievo di sangue, una medicazione di ferite ed il test della tubercolina (Lumb&Jones', 2007).

Fino al dosaggio di 25mg/kg essa è in grado di dare una sedazione profonda, mentre in dosi più elevate induce un'anestesia chirurgica superficiale (Flecknell PA., 1996).

Vista la breve durata d'azione, questo farmaco può essere somministrato in boli ripetuti secondo necessità, con minimo accumulo; bisogna però avere l'accortezza di associare ad essa dei sedativi e dei miorilassanti, poichè in caso di somministrazioni ripetute la qualità del risveglio peggiora, con la possibilità che si verifichino fenomeni eccitativi, tremori muscolari ed allucinazioni.

Sarebbe utile inoltre somministrare ai soggetti anche dell'ossigeno, in modo da evitare di indurre ipossia (Knorad F., 1998).

4.d XILAZINA

La xilazina è un potente agonista α_2 -adrenergico, poco selettivo (selettività α_1 : α_2 1:160), appartenente alla grande famiglia degli agonisti alfa2-adrenergici, farmaci che provocano sedazione, analgesia e rilasciamento muscolare attraverso la stimolazione dei recettori alfa2-adrenergici e competendo con l'agonista endogeno.

Nel caso di composti poco selettivi, come la xilazina, è possibile inoltre la stimolazione dei recettori α_1 ; l'effetto del farmaco, in quest'ultimo caso, diviene dose-dipendente anche per quanto riguarda la selettività della stimolazione, con dosi elevate del farmaco che determinano effetti di stimolazione α_1 più marcati, quali eccitazione ed aumento dell'attività motoria.

L'elevata selettività aumenta l'affidabilità del farmaco nell'indurre gli effetti desiderati, tuttavia la notevole potenza così conseguita lo rende al tempo stesso poco maneggevole.

Caratteristico degli α_2 agonisti è, infatti, il raggiungimento più o meno rapido di un effetto soglia, oltre il quale sia gli effetti desiderati che quelli collaterali non aumentano significativamente. L'aumento della dose somministrata oltre questa soglia determina, invece, un allungamento della durata d'azione del farmaco (Lumb & Jones', 2007).

Con farmaci molto potenti l'effetto massimo viene conseguito a dosi basse, cosicché può risultare non facile dosare il farmaco in modo fine. All'estremo opposto, nel caso di farmaci meno selettivi, l'effetto può essere più dosabile, ma a basse dosi può essere molto diverso da quello conseguibile somministrando dosi più elevate (Corletto F., 2006).

In generale, i recettori α_2 sono distribuiti in diversi tessuti dell'organismo, e la noradrenalina ne è il loro neurotrasmettitore. I recettori α_2 esistono sia presinaptici che post sinaptici, in tessuti neuronali e non neuronali, e in posizione extrasinaptica nell'endotelio vascolare. Gli effetti sedativo e ansiolitico degli α_2 agonisti sono mediati dall'attivazione dei recettori α_2 adrenergici presenti nel locus coeruleus, responsabile dell'attivazione corticale. Ovviamente, considerato l'effetto agonista competitivo del farmaco, in caso di

stimolazione eccessiva l'effetto inibitorio sulla funzione del locus coeruleus può essere prevaricato, nel qual caso la sedazione cesserà in modo improvviso ed inaspettato, mentre gli effetti analgesici derivano dall'attivazione dei recettori localizzati nel corno dorsale del midollo spinale (Lumb & Jones', 2007).

Il sistema α_2 adrenergico è risultato essere ancora più complesso dopo la scoperta di almeno tre sottotipi di recettori α_2 (A, B, C), la cui distribuzione e densità è specie e tessuto-specifica. E' stato dimostrato che il sottotipo 2B è responsabile principalmente della vasocostrizione periferica e della bradicardia di riflesso, il sottotipo 2A sembra essere coinvolto nella sedazione, nell'ansiolisi e nella diminuzione del tono simpatico centrale e conseguente bradicardia e ipotensione, oltre che in una possibile neuroprotezione, ed infine il sottotipo 2C nell'analgesia a livello spinale, nell'ipotermia e nel sinergismo con gli oppioidi (Corletto F., 2006).

La farmacocinetica della xilazina è stata determinata nel bovino, nel cavallo e nel cane dopo la somministrazione endovenosa e intramuscolare. Dopo la somministrazione endovenosa, l'emivita di eliminazione è di 36, 50 e 30 minuti rispettivamente nel bovino, nel cavallo e nel cane; dopo la somministrazione intramuscolare, entro 15 minuti si raggiunge il picco della concentrazione plasmatica, e l'emivita di eliminazione è di 58 e 35 minuti rispettivamente nel cavallo e nel cane (Lumb & Jones', 2007).

Nella pratica clinica, gli α_2 agonisti sono tradizionalmente usati come sedativi/analgesici, da soli o in combinazione con oppioidi, ketamina, ketamina-diazepam, per procedure diagnostiche e chirurgiche minori (Lumb & Jones', 2007).

Una caratteristica importante degli α_2 agonisti è il fatto che i loro effetti sedativi e cardiovascolari possano essere antagonizzati mediante l'utilizzo di farmaci α_2 antagonisti (tolazolina, yohimbina e atipamezolo). In particolar modo, la yohimbina è il farmaco maggiormente utilizzato come antagonista della xilazina (Lumb & Jones', 2007).

La xilazina è caratterizzata da un rapido assorbimento e da una metabolizzazione altrettanto rapida, che termina con l'escrezione urinaria; essa può indurre bradicardia e ipotensione, associate al diminuito flusso di impulsi

del sistema nervoso simpatico alla periferia. La generale diminuzione del tono simpatico e della liberazione di catecolamine stabilizza il sistema cardiocircolatorio, a spese di una modica depressione dose-dipendente.

La somministrazione di xilazina induce inizialmente un breve periodo di attivazione dei recettori α_2 postsinaptici periferici, che determina vasocostrizione, con conseguente ipertensione e bradicardia di riflesso. Questa fase lascia rapidamente il posto ad una ben più lunga fase di attivazione dei recettori α_2 centrali e periferici presinaptici, che provocano una riduzione del tono simpatico, e una conseguente diminuzione della gittata cardiaca e della pressione arteriosa (Afshair F.S. *et al.*, 2005; Lumb & Jones', 2007).

Dopo la somministrazione di xilazina si osservano comunemente anche bradicardia sinusale e aritmie, queste ultime in risposta dell'aumento del tono vagale; inoltre, essa sensibilizza il cuore all'azione aritmizzante dell'adrenalina (Lumb & Jones', 2007).

Sebbene la frequenza respiratoria diminuisca dopo la somministrazione di xilazina, nel gatto, nel cane e nel cavallo il pH, la PO₂ e la PCO₂ arteriose rimangono invariate.

La diminuzione della frequenza respiratoria è accompagnata da un aumento del volume tidale polmonare, che permette di mantenere relativamente costanti la ventilazione alveolare ed i valori dei gas presenti nel sangue arterioso (Lumb & Jones', 2007).

Sono state descritte in diverse specie alterazioni della funzione gastrointestinale dopo la somministrazione di xilazina. Una eccessiva salivazione può avere luogo nei soggetti a cui non sono stati somministrati anticolinergici.

Nel cane, diminuisce la pressione dello sfintere gastroesofageo e può aumentare l'incidenza del reflusso gastroesofageo.

Nel cane e nel gatto, la xilazina ha anche effetto emetico, collegato all'attivazione dei recettori α_2 centrali.

In molte specie, tra cui il cane, la pecora ed il cavallo, la somministrazione di xilazina diminuisce la motilità e prolunga il tempo di transito gastrointestinale. Il rilassamento della muscolatura liscia intestinale e l'analgesia mediate dall'attivazione dei recettori α_2 centrali e periferici giocano anche un importante

ruolo nel ridurre il dolore addominale. Tali modificazioni sono seguite anche da una diminuzione del flusso sanguigno a livello intestinale, in maniera però non direttamente proporzionata alla sistemica diminuzione della gittata cardiaca, suggerendo che i recettori α_2 possano mediare un effetto di vasocostrizione nei vasi intestinali (Lumb & Jones', 2007).

Dopo la somministrazione di xilazina nel bovino, nel cavallo, nel pony e nel gatto aumenta l'eliminazione di urina. Nel cane, benché dopo la somministrazione di xilazina il grado di contrazione uretrale diminuisca sia nei maschi che nelle femmine, vengono mantenuti i normali riflessi di minzione (Lumb & Jones', 2007).

In diverse specie, dopo sedazione con xilazina o anestesia con un protocollo che incorporasse la xilazina, sono state riportate anche ipoinsulinemia e iperglicemia transitorie. L'iperglicemia deriva dall'inibizione α_2 mediata del rilascio di insulina dalle cellule beta del pancreas, e il grado di durata di questi effetti è dose dipendente.

La xilazina può indurre inoltre altre modificazioni passeggero nei livelli ormonali dell'ormone della crescita, del testosterone, della prolattina, dell'ormone antidiuretico e dell'ormone follicolo stimolante (Lumb & Jones', 2007).

La somministrazione di xilazina causa midriasi, che può essere dovuta sia all'inibizione centrale della stimolazione parasimpatica all'iride, sia all'attivazione diretta dei recettori α_2 a livello dell'iride, o ad entrambe le cause.

La somministrazione di xilazina diminuisce anche la pressione intraoculare nel coniglio, nel gatto e nella scimmia, riducendo il tono simpatico ed il flusso di umor acqueo (Lumb & Jones', 2007).

E' stato inoltre dimostrato come la somministrazione di xilazina sia in grado di abbassare la temperatura rettale nel Rhesus monkey (Reutlinger RA. *et al.*, 1980).

4.e COMBINAZIONI DI ANESTETICI DISSOCIATIVI

La dose di ketamina può essere diminuita combinandola con gli α_2 agonisti (quali xilazina o medetomidina), che possono indurre sedazione, analgesia addizionale e rilassamento muscolare, oppure in combinazione con farmaci benzodiazepinici (diazepam e midazolam), per indurre sedazione o rilassamento muscolare (Sulli J. Popilskis *et al.*, 1997).

L'associazione della xilazina, α_2 -agonista, all'agente anestetico dissociativo ketamina fornisce sedazione, rilassamento muscolare ed una maggiore analgesia, sufficiente per minori procedure chirurgiche.

Tra le varie combinazioni, l'associazione tra ketamina, al dosaggio di 10 mg/kg, e xilazina a 0,25mg/kg fornisce un tempo significativo di anestesia di circa 45 minuti; incrementando il dosaggio di xilazina a 2mg/kg la durata dell'anestesia aumenta fino a 138 minuti circa.

La xilazina, da sola o combinata con ketamina, statisticamente produce significative diminuzioni nella pressione sanguigna arteriosa e nella frequenza cardiaca, nei confronti degli animali a cui viene somministrata la sola ketamina; questo denota come gli effetti della xilazina sovrastino quelli eccitatori indotti dalla ketamina (Sulli J. Popilskis *et al.*, 1997).

Nella scimmia, l'associazione di ketamina e xilazina (al dosaggio di 7 mg/kg e 0.6 mg/kg rispettivamente) ha determinato una diminuzione della pressione arteriosa e della frequenza cardiaca entro 30 minuti dalla somministrazione (Reutlinger RA. *et al.*, 1980).

4.f MONITORAGGIO ANESTESIOLOGICO E PROFONDITA' DELL'ANESTESIA

Il monitoraggio anestesiológico fornisce gli strumenti per stabilizzare le funzioni fisiologiche durante l'anestesia e durante il tempo necessario ad accertarsi del più appropriato funzionamento dell'equipaggiamento anestesiológico. Bisogna

inoltre fare molta attenzione durante l'anestesia, poiché non è insolito nei primati non umani perdere una quantità significativa del proprio calore corporeo. Per il monitoraggio cardiovascolare, nei primati di dimensioni più grandi, l'inserimento di uno stetoscopio esofageo durante il periodo operatorio facilita la precoce scoperta di cambiamenti nella frequenza cardiaca e nel ritmo, provvedendo all'adeguatezza di informazioni sulla ventilazione.

La pressione sanguigna arteriosa può essere misurata posizionando un manicotto sull'avambraccio o sulla tibia dell'arto posteriore.

Nel monitoraggio respiratorio, l'utilizzo di ossigenazione e di ventilazione durante l'anestesia è essenziale. La valutazione della PO₂ può essere ottenuta mediante l'emogas analisi del sangue arterioso, oppure in modo non invasivo con l'impiego di monitors quali la pulsossimetria, il volume end tidalico di CO₂ o la spettrometria di massa.

La pulsossimetria fornisce una misura continua della saturazione di ossigeno arterioso.

Si ritiene oramai assodato che la misurazione della CO₂ espirata sia il metodo più efficace che, anche quando utilizzato da solo, può determinare la capacità e l'adeguatezza della ventilazione.

La profondità dell'anestesia è di solito ottenuta tramite il monitoraggio di diversi parametri, e tra quelli usati con maggiore frequenza si possono elencare:

- la perdita dei riflessi palpebrali e corneali;
- il grado di rilassamento muscolare;
- la frequenza e la profondità del respiro;
- la mancanza di risposte somatiche agli stimoli chirurgici.

Il grado di profondità dell'anestesia è cruciale per evitare complicazioni e massimizzare il successo dell'esperimento (Sulli J. Popilskis *et al.*, 1997).

I ricercatori devono tenere sempre presente che il movimento dell'animale durante la chirurgia e nelle procedure sperimentali può non indicare necessariamente che esso sia in qualche modo "sottoanestetizzato"; infatti, come regola generale, la valutazione della profondità dell'anestesia non dovrebbe basarsi solo su di una singola valutazione od osservazione da parte

dell'anestesista, bensì sulla rilevazione dell'interazione di un certo numero di parametri fisiologici.

4.h ANESTESIA PER METODICHE DIAGNOSTICHE COMPLESSE

Le tecniche di risonanza magnetica, tomografia ad emissione di positroni, hanno guadagnato popolarità per la loro relativa non-invasività e capacità di ottenere informazioni di tipo sia biochimico che spaziale, senza distruggere il campione in esame.

Uno svantaggio nell'utilizzo di queste metodiche diagnostiche complesse, specialmente per quanto concerne la MRI funzionale, è però la loro marcata sensibilità ai movimenti, che crea l'esigenza di evitare qualsiasi tipo di attività dell'animale, al fine di minimizzare l'eventuale errore nell'interpretazione dei dati.

Una buona sedazione e anestesia sono quindi essenziali per evitare il manifestarsi di improvvisi ed importanti movimenti da parte del paziente (Sulli J. Popilskis *et al.*, 1997).

4.i TRATTAMENTI POST ANESTESIA

Le complicazioni più frequentemente incontrate durante il periodo post anestesia includono complicazioni polmonari e circolatorie, ipotermia e dolore. Non sono infrequenti per i primati non umani episodi di vomito al risveglio dall'anestesia.

L'estubazione dovrebbe essere posticipata fino a che l'animale riguadagna il riflesso della deglutizione e altri segni di movimento volontario (es. movimento della testa e masticazione).

Se il vomito compare dopo l'estubazione l'animale deve essere posizionato in posizione prona, con la testa abbassata, per evitare l'aspirazione del vomito.

MALATTIA DI PARKINSON

Per evitare una inadeguata respirazione, durante il periodo post operatorio generalmente non si estuba se la PO₂ è inferiore a 60mmHg e la PCO₂ è superiore a 50mmHg.

L'ipotermia post operatoria si incontra frequentemente durante le procedure chirurgiche.

Una grave ipotermia può ritardare il risveglio, riducendo il metabolismo e l'escrezione di farmaci anestetici; essa può provocare anche una manifesta compromissione emodinamica, con riduzione della gittata cardiaca e bradicardia.

L'ipotensione e la tachicardia sono comuni complicazioni circolatorie associate al primo periodo post operatorio: residui degli effetti anestetici e un inadeguato recupero della perdita di sangue durante la chirurgia sono spesso cause di ipotensione.

In generale, il risveglio di tutti i primati dovrebbe essere accompagnato dal minor rumore possibile e da movimenti ridotti allo stretto necessario al solo monitoraggio visivo (Sulli J. Popilskis *et al.*, 1997).

CAP. 5 CONSIDERAZIONI ANESTESIOLOGICHE IN PAZIENTI CON MALATTIA DI PARKINSON

Nei pazienti umani con malattia di Parkinson gli usuali regimi farmacologici terapeutici devono essere somministrati il più vicino possibile all'inizio dell'anestesia: l'emivita della L-DOPA è infatti breve (1-3 ore) e l'interruzione della terapia può provocare una grave rigidità muscolo scheletrica, interferendo con la respirazione.

I pazienti umani possono autosomministrarsi L-DOPA addizionale, ed è quindi importante conoscere esattamente quanta essi ne stiano assumendo (Nicholson G. *et al.*, 2002).

Levodopa e carbidopa sono assorbite nel piccolo intestino e quindi il primo passaggio gastrico rende la somministrazione di tavolette orali, attraverso una

sonda gastrica, non ottimale o addirittura inefficace, poiché i pazienti affetti da malattia di Parkinson spesso hanno uno svuotamento gastrico ritardato.

Per questo, può essere necessaria una sonda duodenale quando sia previsto un lungo periodo di alimentazione assistita (Rudra A. *et al.*, 2007); è inoltre essenziale assicurare che ai pazienti non manchino le dosi di medicazione post operatoria, per evitare il peggioramento dei sintomi. Essi dovrebbero essere in grado di assumere L-DOPA sia tramite sorsi di acqua sia tramite tubo naso gastrico.

I farmaci antagonisti della dopamina (fenotiazine, butirrofenoli-droperidolo) che possono causare sintomi extrapiramidali, in grado di bloccare i recettori della dopamina, e la metoclopramide non devono essere somministrati; quest'ultima può causare anche malattia di Parkinson farmaco-indotta (Nicholson G. *et al.*, 2002).

La malattia di Parkinson farmaco indotta viene trattata semplicemente eliminando i farmaci in questione, ma una prevedibile ricaduta può essere falsamente diagnosticata come malattia di Parkinson idiopatica, e richiedere la successiva somministrazione di L-DOPA.

Deve sempre essere tenuta in considerazione anche la potenziale interazione tra i vari farmaci: infatti, vi sono casi di agitazione, rigidità muscolare e ipertermia in pazienti umani ricevuti meperidina e selegilina, cosicché questa combinazione deve essere evitata (Nicholson G. *et al.*, 2002).

Pazienti in trattamento con farmaci MAOIs sono stati a lungo motivo di particolare preoccupazione per gli anestesisti, ma con il largo uso di selegilina, una MAOI inibitrice di tipo b, è diminuita la probabilità di dover anestetizzare un paziente dovendo utilizzare un inibitore MAOI.

L'uso di potenti agenti antinfiammatori non steroidei ha evitato la necessità di analgesici narcotici in pazienti sottostanti a terapia con MAOIs per le procedure chirurgiche minori (Nicholson G. *et al.*, 2002).

Per quanto riguarda gli agenti anestetici endovenosi, alcuni casi riportano descrizioni di episodi simil-parkinsoniani in pazienti umani che ricevono la somministrazione di tiopentale; negli studi effettuati sugli animali, il tiopentale riduce il rilascio della dopamina da sinapsi striatali. La rilevanza clinica di

questo non è completamente chiara, e il tiopentale non è stato direttamente coinvolto nell'esacerbazione dei sintomi parkinsoniani (Nicholson G. *et al.*, 2002).

La ketamina deve essere usata con assoluta cautela, a causa delle sue potenziali interazioni con la levodopa e per le sue caratteristiche simpaticomimetiche; comunque, sino ad oggi essa è stata utilizzata senza provocare alcun incidente operatorio.

La probabilità di coesistenza di patologie cardiache nei pazienti anziani con malattia di Parkinson, tuttavia, rende l'utilizzo della ketamina meno indicato (Rudra A. *et al.*, 2007); da notare, però, che in un caso riportato in letteratura la somministrazione preoperatoria di ketamina intravascolare a basso dosaggio (20 mg) ha determinato la completa scomparsa dei gravi tremori causati dalla malattia. Questo ha suggerito che, probabilmente, a basso dosaggio la ketamina, somministrata ad effetto, possa fornire una sedazione ottimale al paziente, consentendo il controllo preoperatorio del tremore parkinsoniano (Wright JJ. *et al.*, 2009).

Il recente interesse si è focalizzato sull'uso del propofol in pazienti con il Parkinson, particolarmente in quelli sottoposti a pallidotomia stereotattica o talamotomia.

Il propofol produce sia discinesia che ablazione dei tremori a riposo, suggerendo che esso possa avere effetti allo stesso tempo eccitatori ed inibitori in questo tipo di pazienti; in alcuni soggetti in procinto di sottoporsi a procedure stereotattiche sono stati descritti sia degli effetti dischinetici che l'abolizione totale del tremore, portando addirittura alla sospensione della chirurgia (Nicholson G. *et al.*, 2002).

Poiché i pazienti che devono sottostare a chirurgia stereotattica subiscono un'interruzione prechirurgica della terapia antiparkinson, che va dalle dodici alle ventiquattro ore, tale da consentire agli operatori la valutazione dei sintomi ed il successivo monitoraggio post-operatorio, viene raccomandato di non utilizzare il propofol per questo tipo di procedure, a causa dei suoi effetti imprevedibili e imprevedibili (Nicholson G. *et al.*, 2002).

Non vi sono indicazioni circa possibili effetti collaterali relativi all'utilizzo dell'isofluorano, del sevofluorano o del desflurano in pazienti umani con malattia di Parkinson; bisogna invece prestare attenzione all'eventuale incremento delle tachiaritmie catecolamino-indotte in seguito alla somministrazione di levodopa e di alotano.

L'alfentanil e il fentanyl potenzialmente possono esacerbare la rigidità muscolare.

La morfina è stata descritta diminuire la discinesia se usata a basse dosi, ma accrescerla per dosi elevate (Rudra A. *et al.*, 2007).

Si sono verificati casi di agitazione, rigidità muscolare ed ipertermia in pazienti a cui erano state somministrate petidina e selegilina. Tuttavia, l'esperienza clinica indica che l'anestesia avviene generalmente in assenza di imprevisti nei pazienti riceventi la seligilina (Rudra A. *et al.*, 2007).

Non vi sono evidenze di farmaci bloccanti neuromuscolari non depolarizzanti che peggiorino i sintomi della malattia di Parkinson. Esistono tuttavia controversie a riguardo dell'utilizzo del suxamethonium; è stato riportato da un ricercatore che il suxamethonium causa iperkaliemia nella malattia di Parkinson (Gravlee GP., 1980). Un altro gruppo di ricercatori ha invece affermato che il suxamethonium non induceva iperkaliemia (Muzzi DA. *et al.*, 1989) (tabella 3).

Nel caso sia richiesto l'utilizzo di un agente anticolinergico in pazienti con malattia di Parkinson, allora si deve scegliere come farmaco il glicopirrolato, dal momento che esso non attraversa la barriera ematoencefalica.

Una delle più comuni cause di morte tra i pazienti con malattia di Parkinson è l'aspirazione polmonare di materiale gastrico; per evitare questo fenomeno, si possono utilizzare agenti procinetici, quali cisapride o domperidone, che non producono effetti sull'equilibrio dopaminergico e costituiscono una valida alternativa alla metoclopramide.

Anche l'ondasetron, un antagonista della serotonina, sembra essere una sicura alternativa al droperidolo, nel prevenire o trattare l'emesi in questi pazienti (Nicholson G. *et al.*, 2002).

L'insufficienza del sistema nervoso autonomo può frequentemente costituire un problema; questa condizione influenza infatti l'abilità dei pazienti con la malattia

di Parkinson nel rispondere alla ipovolemia e alla vasodilatazione, a volte associate all'anestesia e alla chirurgia.

Una disfunzione della pressione ortostatica, della termoregolazione o del sistema genitourinario suggerisce un'insufficienza del sistema nervoso autonomo preesistente e deve aumentare la consapevolezza della potenziale instabilità emodinamica perioperatoria, potendo alterare le risposte a farmaci vasopressori, quali la noradrenalina (Nicholson G. *et al.*, 2002).

L'adeguatezza della ventilazione ed i riflessi respiratori devono essere attentamente stabilizzati prima dell'estubazione dei pazienti affetti da moderata o grave malattia (Rudra A. *et al.*, 2007).

L'anestesia locale ha degli ovvi vantaggi rispetto a quella generale, in quanto evita gli effetti collaterali degli anestetici generali e gli arresti neuromuscolari farmacologici, che possono mascherare i tremori (Nicholson G. *et al.*, 2002).

Se si necessita di mera sedazione, la difenidramina è stata descritta essere particolarmente utile nelle procedure oftalmiche: la sua attività centrale anticolinergica è vantaggiosa per i pazienti con malattia di Parkinson, nei quali il tremore può rendere difficile la chirurgia.

Con l'utilizzo dell'anestesia periferica si evita inoltre la nausea postchirurgica ed il vomito, che può provocare l'aspirazione di materiale ingerito.

Il risveglio dall'anestesia, perfino in pazienti sani, è caratterizzato spesso da una temporanea comparsa di una varietà di sintomi, che possono essere altrimenti considerati dei riflessi neurologici patologici, inclusi i riflessi iperattivi di estensione, le mioclonie dell'anca, il riflesso di Babinski e la postura da decerebrazione (Nicholson G. *et al.*, 2002).

Il verificarsi di brividi è comune dopo l'anestesia generale e l'analgia periferica, ma questi non devono essere confusi con i sintomi propri della malattia di Parkinson.

In pazienti svegli, alcune ore dopo l'intervento, sono stati riportati nel post chirurgico movimenti involontari della glottide e delle strutture sopraglottidee, che causarono ostruzioni intermittenti delle vie respiratorie, laringospasmo e arresti respiratori (Nicholson G. *et al.*, 2002).

MALATTIA DI PARKINSON

Altri motivi di accortezza post-operatoria devono essere la pulizia polmonare, la prevenzione di trombosi, la ripresa il prima possibile della terapia fisioterapeutica e della deambulazione.

Sicuramente, i pazienti con malattia di Parkinson sono più predisposti alla incoordinazione post operatoria e alle allucinazioni (Nicholson G. *et al.*, 2002).

In conclusione, si può affermare che non esiste un protocollo anestesiológico semplice per i pazienti affetti da malattia di Parkinson.

L'assenza di studi che valutino le diverse tecniche e farmaci anestesiológicos rinforza la raccomandazione che si possono utilizzare i dati presenti in bibliografia, con tutte le relative ovvie limitazioni.

Infatti, una meticolosa preparazione pre-operatoria, il mantenimento della terapia farmacologica fino all'inizio dell'anestesia e nel tempo operatorio successivo, l'evitare l'utilizzo di farmaci riconosciuti quali aggravanti la patologia sono i fattori chiave nella riduzione della morbilità e della mortalità post-operatoria (Rudra A. *et al.*, 2007).

FARMACO	COMMENTI
Farmaci per induzione	
Propofol	Evitare nelle procedure stereo tattiche
Etomidato	Probabilmente sicuro
Tiopentale	Probabilmente sicuro
Analgesici	
Fentanyl	Possibile rigidità muscolare
Meperidina	Evitare nei pazienti in terapia con selegilina
Morfina	Possibile rigidità muscolare
Alfentanyl	Possibili reazioni distoniche
Agenti anestetici volatili	
Isoflurano	Probabilmente sicuro
Sevoflurano	Probabilmente sicuro
Enflurano	Probabilmente sicuro
Alotano	Possibili aritmie
Bloccanti neuromuscolari	
Succinilcolina	Possibile iperkaliemia
Agenti non depolarizzanti	Probabilmente sicuri

Tabella 3 Possibili interazioni tra farmaci in pazienti con malattia di Parkinson (Nicholson G. *et al.*, 2002).

SEZ.2 OBIETTIVI

L'attuale sperimentazione sulla malattia di Parkinson, che coinvolge l'Università degli Studi di Padova, utilizza come modello sperimentale i primati non umani e ha come obiettivo quello di ottenere maggiori conoscenze sui processi riguardanti la patogenesi della malattia e sulla funzionalità fisiologica delle cellule fetali neuronali suine trapiantate nel primate dopo l'intossicazione con MPTP.

I primati utilizzati in questo studio vengono sottoposti ad anestesia generale per permettere l'esecuzione della metodica diagnostica, la tomografia ad emissione di positroni (PET), necessaria per valutarne l'evoluzione dei cambiamenti neurodegenerativi cerebrali indotti dalla sperimentazione stessa.

In particolare, l'obiettivo di questo studio è proprio quello di considerare le possibili differenze nella risposta al medesimo protocollo anestesiológico di un gruppo di primati, durante l'esecuzione della PET nelle diverse fasi della sperimentazione: iniziando con i dati basali, dopo intossicazione con MPTP e, infine, dopo lo xenotrapianto neuronale.

Questo al fine di dedicare particolare attenzione alla gestione del piano anestesiológico utilizzato, per garantire in primis il benessere degli animali durante ogni trattamento sperimentale e permettere il completo svolgimento dell'indagine diagnostica.

Compito fondamentale del medico veterinario che si occupa della sperimentazione animale è, infatti, quello di evitare all'animale quanto più possibile ogni situazione di sofferenza, dolore, stress e distress (Russell WMS. e Burch RL., 1959).

L'analisi dei dati raccolti consentirà di apportare eventuali modifiche e/o miglioramenti alla gestione dei futuri piani anestesiológicos, da impiegare in altre sperimentazioni su soggetti della stessa specie.

E' importante ricordare, inoltre, che la maggior parte degli agenti anestetici ed analgesici influenzano i vari sistemi dell'organismo, potendo quindi interferire col protocollo sperimentale; presupposto fondamentale per la buona riuscita di un lavoro di ricerca sperimentale che coinvolga l'utilizzo di animali è proprio

OBIETTIVI

l'adozione di un adeguato protocollo anestesiologicalo ed analgesico (Busetto R. *et al.*, 2001).

SEZ.3-MATERIALI E METODI

3.a MODELLO SPERIMENTALE

Questo studio è stato condotto con la collaborazione tra l'Università degli Studi di Padova, nella fattispecie le Facoltà di Medicina e Chirurgia e di Medicina Veterinaria, l'Azienda Ospedaliera di Padova, l'Azienda Ospedaliera di Rovigo, il CORIT (Consorzio per la Ricerca sul Trapianto di Organi, Tessuti, Cellule e Medicina Rigenerativa) e l'Istituto Zooprofilattico delle Venezie, l'equipe del Prof. Philippe Hantraye, responsabile dell'Institut d'Imagerie Biomédicale I2BM, presso il Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), con sede a Parigi. La sperimentazione dal titolo "Valutazione preclinica di strategie per migliorare la sopravvivenza e la funzione di neuroni di maiale trapiantati nel primate non umano" è stata autorizzata dal Ministero della Salute (n° autorizzazione 151/2007-C del 21 dicembre 2007).

Nel corso di questo studio sono stati utilizzati sette primati appartenenti alla specie *Macaca fascicularis*, originaria delle Filippine, tutti di sesso femminile e di età compresa tra i 7 e i 12 anni; essi facevano parte di un selezionato gruppo di primati nati in cattività in un allevamento che fornisce animali da sperimentazione.

Dal momento che i primati sono potenziali portatori di pericolosi virus zoonotici, e vista la relativamente stretta correlazione filogenetica con gli esseri umani, il rischio della trasmissione è più grande rispetto all'impiego di altri animali di laboratorio (National Research Council NRC 2003); in qualsiasi ricerca che ne preveda l'utilizzo si deve quindi porre molta attenzione alla sicurezza e alla salute del personale addetto, tanto quanto alla biosicurezza degli animali stessi. Bisogna infatti ricordare che numerosi organismi patogeni possono essere trasmessi dai Primati agli esseri umani ma anche che, viceversa, molti patogeni umani sono trasmissibili ai Primati.

In base a quanto stabilito dal D.L.vo 116/92, in merito al monitoraggio sanitario sugli animali da esperimento, al loro arrivo in sede i primati sono stati messi in quarantena e quindi sottoposti agli opportuni accertamenti per conseguire l'idoneità sanitaria: sono stati eseguiti i test virologici per le principali zoonosi

MATERIALI E METODI

(Epatite B, Herpes virus, Marburg, Ebola, STLV, SIV, Varicella zoster, Cytomegalovirus, Rabbia), la prova della tuberculina, i trattamenti antiparassitari (protozoi, elminti, Plasmodium ed ectoparassiti), lo screening ematobiochimico di popolazione (esame emocromocitometrico con conta cellulare completa e differenziale, parametri ematochimici per la funzionalità epatica, renale, status lipidico ed equilibrio acido-base).

Gli animali utilizzati in questo protocollo sperimentale dovevano essere sani; l'esame clinico di ogni paziente è stato quindi fondamentale per individuare eventuali patologie, e soprattutto per verificare la funzionalità dei vari apparati.

Per monitorare le condizioni di salute non solo fisica, ma anche mentale, molto importante dal momento che si tratta di primati, tutti i soggetti venivano sottoposti ad una visita clinica settimanale e ad osservazione etologica costante.

I parametri clinici più importanti erano:

- Peso compreso tra 2,9 e 4,1 kg;
- Temperatura, variabile per ogni individuo, e compresa fisiologicamente tra 38.4- 39.6°C;
- Frequenza cardiaca, molto influenzata dallo stress da manipolazione, compresa tra 162-240 battiti al minuto;
- Frequenza respiratoria di circa 30-50 atti al minuto.

L'osservazione etologica mirava a mantenere uno stato di benessere dell'animale, importante non solo per motivi etici, ma anche per una buona riuscita del progetto sperimentale.

I primati inseriti in questo studio, dopo essere stati sottoposti ad ulteriori procedure diagnostiche per immagini, quali MRI e PET, per ottenere i dati di base, venivano quindi sottoposti a trattamento con la neurotossina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidro-piridina (MPTP), alle dosi raccomandate da Kulak (Kulak *et al.*, 2004) due volte al giorno per circa una settimana, al fine di indurre una patologia sovrapponibile al morbo di Parkinson.

Gli animali venivano valutati dopo ogni dose, mediante l'utilizzo di appositi scores clinici, per determinare la comparsa dei sintomi di malattia di Parkinson e gli effetti generali da intossicazione da MPTP, al fine di prolungare o eventualmente interrompere la somministrazione, qualora necessario.

MATERIALI E METODI

I meccanismi attraverso i quali la tossina MPTP produce degenerazione nel sistema dopaminergico sono paragonabili ai processi che provocano la morte cellulare nella malattia di Parkinson: il danno inizia dai terminali dopaminergici all'interno dei nuclei della base e, mediante stress ossidativo e disfunzione mitocondriale quali fattori scatenanti la degenerazione neuronale, porta alla deplezione di dopamina in questi nuclei.

Bisogna ricordare che questo protocollo sperimentale presenta comunque un'ampia variabilità individuale, cosicché animali sottoposti allo stesso trattamento possono risultare asintomatici o solo lievemente affetti dalla malattia, e possono anche presentare guarigione spontanea tardiva.

Qualora la sintomatologia parkinsoniana indotta dall'azione tossica dell'MPTP si fosse dimostrata essere gravemente debilitante per gli animali coinvolti, veniva aggiunta una terapia sintomatica a base di L-DOPA, in grado di contenere adeguatamente la sintomatologia neurologica, mantenendola a livelli sostenibili e compatibili con la prosecuzione dell'esperimento, nel rispetto del benessere degli animali coinvolti (Bezard *et al.*, 2005).

Dopo una valutazione sull'effettivo grado di patologia indotta, sia clinica che mediante tecniche diagnostiche di MRI e PET, gli animali ritenuti essere parkinsoniani con sintomatologia irreversibile venivano sottoposti al trapianto di cellule staminali, quale protocollo terapeutico sperimentale per contrastare le lesioni neurologiche indotte dalla malattia di Parkinson.

L'intervento chirurgico prevedeva innanzitutto la fase di prelievo dei neuroni dal corpo striato di feti suini transgenici per la hCTLA4-Ig, effettuato con tecnica microchirurgica. Veniva così isolata e dissezionata la specifica regione da cui estrarre le cellule da trapiantare; queste erano poi sottoposte a procedure di laboratorio, per renderle disponibili al trapianto sotto forma di emulsione.

Il modello richiedeva, dal punto di vista tecnico, la partecipazione alla fase operatoria di neurochirurghi e anatomici esperti in anatomia e microchirurgia fetale; per la fase pre e post operatoria era necessaria inoltre la consulenza di neurologi esperti in malattie neurodegenerative comportamentali.

Il trapianto vero e proprio era un intervento di chirurgia stereotattica, durante il quale un neurochirurgo introduceva e depositava con precisione submillimetrica le cellule nervose fetali nelle specifiche zone del cervello sede della degenerazione neuronale, cioè nei nuclei della base del cervello di primati

MATERIALI E METODI

riceventi (*Macaca fascicularis*). I neuroni utilizzati potevano essere sia di origine corticale che mesencefalica (Martin C. *et al.*, 2005).

Si è scelto di utilizzare feti di maiale geneticamente modificati, in quanto era necessario che le cellule neuronali trapiantate fossero in fase di crescita, prive dunque dei contatti intercellulari propri dei neuroni di neonati e adulti.

Il trapianto di neuroni veniva effettuato nel corpo striato di Primati riceventi, perché a questo livello vi è la naturale sede di produzione ed azione della dopamina. Questa sede di trapianto risulta essere anche più facilmente ispezionabile mediante tecniche di diagnostica per immagini, necessarie per il monitoraggio postoperatorio dell'innesto (Figura 2). Gli esperimenti "in vivo" hanno consentito la valutazione del ruolo dei transgenici CTLA4-Ig in termini di resistenza nei confronti del rigetto cerebrale cellule T-mediate.

MATERIALI E METODI

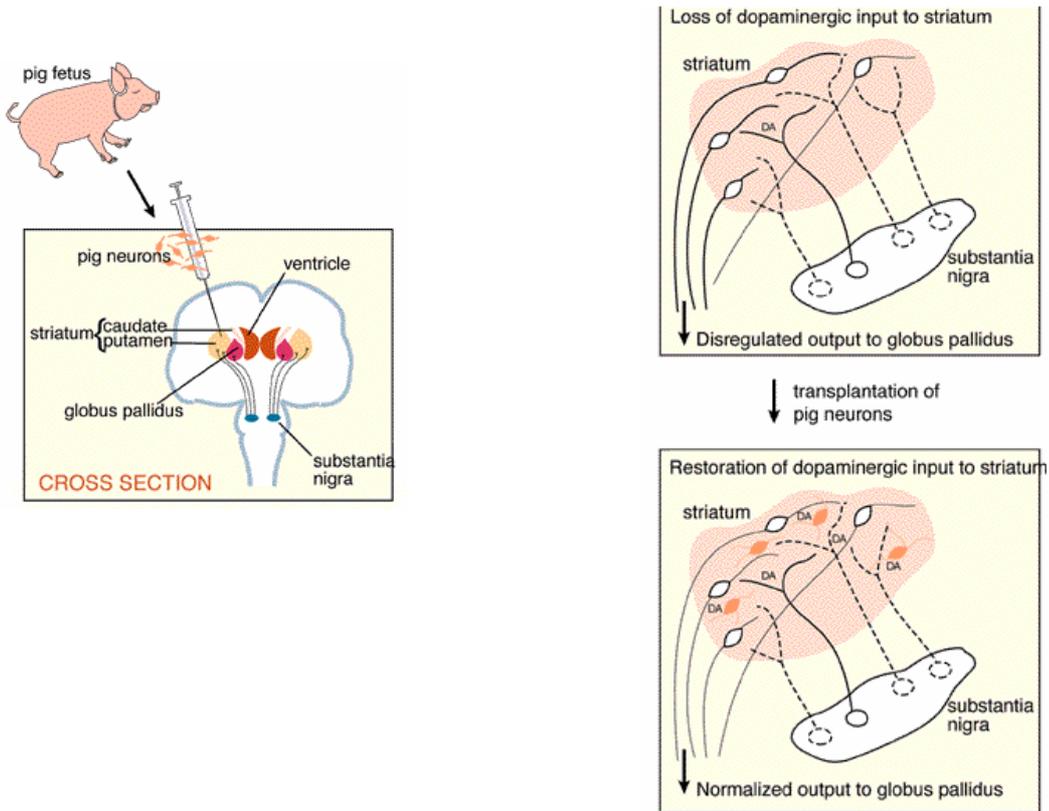


FIG 2. Trattamento della malattia di Parkinson mediante il trapianto di neuroni da feti di maiale. *a*, le cellule sono ottenute dalla regione mesencefalica del cervello di feti di maiale in condizioni ottimizzate per la sopravvivenza cellulare.

Le cellule sono iniettate all'interno dello striato unilaterale nel cervello del paziente con malattia di Parkinson, in anestesia generale.

b, i pazienti con malattia di Parkinson soffrono della perdita di neuroni dopaminergici nella sostanza nigra, che invia stimoli nervosi allo striatum. Questo provoca un rilascio insufficiente di dopamina (DA) nello striatum, attraverso i neuroni che si proiettano nel globo pallido o nella sostanza nigra. Il risultato è la perdita del controllo del movimento, rigidità e tremore.

c, il trapianto di neuroni di feti di maiale nello striatum potenzialmente rigenera gli inputs sinaptici dopaminergici attraverso i neuroni che si proiettano fuori dallo striatum e permette il recupero dei movimenti normali (Ole Isacson e Xandra O. Breakfield, 1997).

MATERIALI E METODI

Il monitoraggio degli animali da sani, dopo intossicazione indotta con MPTP e successivamente al trapianto è stato sia di tipo clinico che strumentale, secondo modalità operative standard, già in essere presso i laboratori di ricerca del Consorzio CORIT, a cura del Servizio interno di *Animal Care*.

A) Esame obiettivo

Il controllo clinico veniva eseguito quotidianamente, sia nei giorni feriali che festivi, al fine di valutare sistematicamente ed approfonditamente le condizioni generali dei soggetti sui quali era stata indotta la malattia di Parkinson, per tutta la durata delle varie fasi dell'esperimento. In queste occasioni venivano rilevati i parametri vitali quali peso, temperatura corporea, frequenza del battito cardiaco, produzione di urine e feci, assunzione di cibo ed acqua. Ogni rilievo veniva registrato nelle apposite cartelle cliniche individuali degli animali, che erano in seguito archiviate e custodite nello stabulario per Primati della sede del CORIT, sita a Legnaro (PD).

Era inoltre disponibile, per i casi di emergenza, un servizio di pronta assistenza per gli animali, attivo 7 giorni su 7 nell'arco delle 24 ore.

B) Esami ematologici e biochimici

Sono stati eseguiti periodici prelievi ematici.

C) Esami microbiologici

Esami colturali su materiale biologico (sangue, urina, feci).

D) Esami immunologici

Livelli anticorpali emolitici anti-maiale (APA), di prassi ogni giorno durante il primo mese e successivamente ogni 2 giorni.

E) Dosaggio farmaci:

Ciclosporina A ($\mu\text{g/L}$): 3 volte/settimana,

Acido micofenolico (mg/L): 3 volte/settimana;

F) Esami strumentali

Al fine di un corretto follow-up ogni animale da sano, dopo intossicazione indotta con MPTP e in seguito al trapianto è stato sottoposto periodicamente ad accertamento mediante tecniche di diagnostica per immagini (PET, MRI).

3.b TOMOGRAFIA AD EMISSIONE DI POSITRONI

I sette soggetti di femmine adulte sane di *Macaca fascicularis* (peso tra=2.94 - 4.1 Kg, età tra 7-12 anni) sono stati sottoposti a PET/CT cerebrale dinamica con ^{18}F -DOPA.

E' stato utilizzato un sistema ibrido PET/CT 16 slices (GE Discovery STE), con FOV tarata elettronicamente a 15 cm (Grassetto G. *et al.*, 2009).

La tomografia a emissione di positroni (PET) è una tecnica di medicina nucleare e di diagnostica medica che produce immagini tridimensionali o mappe dei processi funzionali all'interno del corpo.

Mentre gli altri metodi di scansione, come la TAC e la RMN, permettono di identificare eventuali alterazioni organiche e anatomiche del paziente, le scansioni PET sono in grado di rilevare le alterazioni a livello biologico molecolare che spesso precedono l'alterazione anatomica; questo avviene tramite l'uso di marcatori molecolari, che presentano un diverso ritmo di assorbimento secondo il tessuto interessato.

L'animale, anestetizzato ed intubato (vedi punto 3.c Protocollo anestesilogico), veniva posizionato in posizione decubito sternale con iperestensione del collo sul lettino mobile all'interno del tomograph gantry e quindi riscaldato con boule di acqua calda, con telo isotermico e vello di pecora.

L'esame iniziava con CT cerebrale, seguita dalla somministrazione endovenosa di ^{18}F -DOPA, composto da un isotopo tracciante con emivita breve (^{18}F) legato chimicamente ad una molecola attiva a livello metabolico (dopamina), alla dose di 37 MBq/Kg, ad un'attività media di 148 MBq.

Gli isotopi traccianti sono infatti incorporati in composti normalmente assimilati dal corpo umano, come il glucosio, l'acqua o l'ammoniaca, e quindi iniettati nel corpo del paziente da analizzare per tracciare i luoghi in cui essi si distribuiscono.

L'acquisizione delle immagini PET iniziava immediatamente, fornita in sequenza in list-mode per un totale di 90 min; i dati venivano poi riformulati, ottenendo 9 immagini di circa 10 minuti ciascuno.

Tecnicamente, le immagini PET si ottengono poiché l'isotopo ^{18}F decade, emettendo un positrone; dopo un percorso di pochi millimetri il positrone si

MATERIALI E METODI

annichila con un elettrone, producendo una coppia di fotoni (con energia paragonabile a quella dei raggi gamma) emessi in direzioni opposte fra di loro. Questi fotoni vengono rilevati allorché raggiungono uno scintillatore, situato all'interno del dispositivo di scansione, dove creano un lampo luminoso, rilevato attraverso alcuni tubi fotomoltiplicatori.

Punto cruciale della tecnica è la rilevazione simultanea di coppie di fotoni: i fotoni che non raggiungono il rilevatore in coppia, cioè entro un intervallo di tempo di pochi nanosecondi, non vengono presi in considerazione.

Dalla misurazione della posizione in cui i fotoni colpiscono il rilevatore si può ricostruire la posizione del corpo da cui sono stati emessi, permettendo la determinazione dell'attività o dell'utilizzo chimico all'interno delle parti del corpo investigate.

Lo scanner utilizza la rilevazione delle coppie di fotoni per mappare la densità dell'isotopo nel corpo, sotto forma di immagini di sezioni (generalmente trasverse) separate fra loro di 5 mm circa.

La mappa risultante rappresenta i tessuti in cui si è maggiormente concentrata la molecola campione, nel nostro caso la dopamina, ed è stata letta ed interpretata da uno specialista in medicina nucleare, il Dr. Domenico Rubello.

Sezioni cerebrali trans-assiali, sagittali e coronali venivano ricostruite tramite il metodo OSEM e, dopo allineamento, 6 ROI volumetrici (VOI) di dimensione 5x5x5 mm (125 µl in volume) venivano automaticamente generati bilateralmente su caudato e putamen anteriore e posteriore.

Un ulteriore VOI è stato ottenuto nella corteccia cerebellare per misurare BKG (i recettori dopaminergici sono assenti nel cervelletto).

Per ogni VOI il software ha eseguito la misurazione automatica del massimo conteggio, che veniva poi corretta per il decadimento utilizzando la formula $C_{t0}=C_t * e^{-0.693(t/T1/2)}$, dove C rappresenta il conteggio, $T1/2$ il tempo di dimezzamento di ^{18}F (109.8 min) e t il tempo della fase considerata.

I dati sono stati poi corretti anche per BKG, e sono state create le curve di tempo/attività.

3.c PROTOCOLLO ANESTESIOLOGICO

I sette primati oggetto di questo studio sono stati sottoposti a PET da sani, dopo circa 3 mesi dall'intossicazione indotta con MPTP, e infine a circa 6 mesi dal trapianto di cellule staminali.

Per l'esecuzione di questo esame diagnostico è stato necessario ricorrere all'anestesia generale, al fine di garantire l'immobilità del paziente per tutta la durata della scansione tomografica.

Abbiamo quindi raccolto i dati anestesiológicos corrispondenti alle tre fasi della sperimentazione, suddividendoli in tre diversi gruppi che chiameremo di seguito:

GRUPPO 1: dati di base dei sette primati utilizzati;

GRUPPO 2: dati di sei primati del gruppo 1, dopo un tempo medio di 97,83 (\pm 40,37) giorni dall'intossicazione indotta con MPTP;

GRUPPO 3: dati di tre primati del gruppo 2, dopo un tempo medio di 187,67 (\pm 25,03) giorni dallo xenotrapianto neuronale.

PREMEDICAZIONE

L'animale, mantenuto a digiuno dalla sera precedente, veniva premedicato con xilazina e ketamina, per facilitarne la manipolazione ed il contenimento, al dosaggio individuale di 5 mg/kg per ketamina e 0,5mg/kg per xilazina.

La quantità dei farmaci da somministrare veniva stabilita per ogni soggetto in base al peso dell'animale, riscontrato la mattina stessa della procedura diagnostica.

La somministrazione veniva facilmente effettuata mantenendo il primate all'interno dell'apposita gabbia, detta da "anestesia" (Arthur J.R. e Curtis E.T., 1968); tale gabbia, grazie alla possibilità di scorrimento a slitta della parete posteriore su due binari, permette di ridurre lo spazio disponibile all'animale. Facendo ciò si può quindi immobilizzare l'animale tra la parete e la griglia anteriore, trattenendogli un arto ed iniettandovi i sedativi attraverso le sbarre.

Dopo circa cinque minuti dalla fine della somministrazione dei sedativi, l'animale cominciava a manifestare i primi sintomi: si distendeva sul fondo della

MATERIALI E METODI

gabbia, ed era quindi sistemato su di un apposito letto per eseguire le successive procedure.

Veniva eseguita la tricotomia della coscia, per permettere l'inserimento del catetere endovenoso nella vena safena laterale utilizzando un ago cannula da 22G.

INDUZIONE

In tutti i soggetti è stata utilizzata l'associazione ketamina e xilazina per ottenere l'induzione. Il dosaggio individuale era di 10 mg/kg per ketamina e 1mg/kg per xilazina.

Il paziente veniva disteso in una posizione la più fisiologica possibile. La compressione del torace, l'angolazione acuta del collo, l'iperestensione o la compressione degli arti e della vena cava da parte dei visceri potevano infatti portare al rischio di grosse complicazioni, tra le più frequenti l'ipoventilazione, i danni ai muscoli e/o ai nervi ed il mancato ritorno venoso.

Se un unico bolo di questa associazione tra xilazina e ketamina non era sufficiente ad ottenere la perdita del riflesso laringeo, indispensabile per l'intubazione, venivano somministrati ulteriori boli, fino ad ottenere l'effetto desiderato.

INTUBAZIONE

Una procedura particolarmente delicata ed importante è stata quella del posizionamento di un tubo oro tracheale, indispensabile per il mantenimento di una buona ventilazione durante tutta la procedura diagnostica.

Per consentire l'intubazione endotracheale, l'animale doveva aver raggiunto uno stato di anestesia sufficientemente profondo da consentire l'apertura della bocca e lo spostamento della lingua, senza causare risposte di deglutizione o di masticamento.

Per l'intubazione di tutti i sette animali sono stati utilizzati:

- tubi orotracheali di Murphy: si tratta di tubi in silicone dotati di una cuffia ad alto volume e bassa pressione, scelti in base alle dimensioni della trachea;

MATERIALI E METODI

- laringoscopio dotato di luce e lama Bizzarri-Giuffrida ad uso pediatrico;
- lidocaina cloridrato al 2%, da spruzzare in laringe alcuni minuti prima dell'inserimento del tubo.

Per permettere questa procedura si posizionava l'animale in decubito dorsale, con la testa estesa sul collo, in modo da mantenere la pervietà delle vie aeree ed evitare l'inginocchiamento del tubo.

Prima di procedere al posizionamento del tracheotubo bisognava verificare che il primate avesse raggiunto uno stadio di anestesia sufficientemente profondo; per fare questo si provava ad aprire la bocca ed a spostare la lingua: se l'animale opponeva resistenza a questa operazione, si somministravano altri boli dell'associazione ketamina e xilazina, fino a quando l'azione dei muscoli masseteri scompariva.

La bocca veniva aperta da un aiutante, mentre chi intubava afferrava gentilmente la lingua tra le dita della mano destra e la estendeva all'esterno della cavità orale; tenendo il laringoscopio con l'altra mano, l'anestesista posizionava la punta della lama alla base dell'epiglottide ed esercitava una leggera pressione verso il basso. In questo modo era possibile visualizzare la laringe, abbassando la piega glossoepiglottica e quindi l'epiglottide stessa.

A questo punto il tubo orotracheale veniva fatto avanzare con la mano destra all'interno della laringe fino alla trachea.

L'estremità terminale del tubo orotracheale, la cuffia, andava posizionata nella trachea cervicale, al massimo all'ingresso del torace, per evitare di ventilare selettivamente un bronco: il corretto posizionamento del tubo veniva verificato dall'anestesista mediante auscultazione bilaterale dei campi polmonari.

Il connettore del tubo veniva invece posizionato a livello dei denti incisivi, per minimizzare lo spazio morto.

Il passaggio successivo era quello dell'insufflazione della cuffia; questa veniva insufflata in misura sufficiente a sigillare le vie aeree, ma non oltre. Una pressione eccessiva nella cuffia tende infatti a danneggiare la mucosa tracheale adiacente, dando esito a fenomeni ischemici e, in animali di così piccole dimensioni, può lesionare anche le cartilagini degli anelli tracheali fino a causarne la rottura.

Prima di collegare il tracheotubo all'erogatore di ossigeno si verificava il suo corretto posizionamento. Infatti, anche se l'utilizzo del laringoscopio riduce il

MATERIALI E METODI

rischio del passaggio della sonda nell'esofago, questa eventualità rappresenta una grave complicazione e va quindi assolutamente evitata; se non diagnosticato questo può causare meteorismo gastrico e addirittura morte del soggetto per arresto respiratorio, in caso di apnea prolungata.

I principali sistemi che si sono utilizzati per verificare il corretto posizionamento del tubo orotracheale sono stati:

- visualizzazione, grazie al laringoscopio, del tubo che imboccava la via corretta;
- evidenziazione del passaggio di aria attraverso il tubo trasparente, accertata tramite appannamento dello stesso in seguito ad un atto respiratorio spontaneo;
- auscultazione dei campi polmonari del paziente per verificare che non sia stato intubato un solo bronco, vista la brevità della trachea dei primati se paragonata a quella del cane o degli altri animali domestici;
- riscontro di quantità normali di CO₂ nei gas espirati mediante l'utilizzo di un capnometro o di un capnografo.

Dopo essere stato intubato l'animale veniva mantenuto in respirazione spontanea ed inspirava ossigeno al 100%.

Venivano inoltre somministrati dei fluidi per via endovenosa, utilizzando il catetere precedentemente posizionato nella vena safena laterale; nello specifico, è stata impiegata soluzione fisiologica ad una velocità di 5 ml/kg/h.

MANTENIMENTO DELL'ANESTESIA

Il mantenimento dell'anestesia nei soggetti è stato ottenuto con la somministrazione di ulteriori boli dell'associazione ketamina e xilazina, nel caso si fossero palesati dei segni clinici di superficializzazione quali: aumento della frequenza cardiaca, aumento e/o irregolarità del respiro, ammiccamento, movimenti degli arti.

Al fine di controllare la perdita di calore del paziente, aiutando quindi il mantenimento della normotermia, questi era riscaldato mediante "boulle" di acqua calda e coperto con un vello di pecora ed un telino isotermico.

MATERIALI E METODI

Durante tutta la durata della procedura diagnostica venivano inoltre monitorati, mediante l'utilizzo di un'apparecchiatura Datex Cardiocap 2 (Datex-Ohmeda, Helsinki, Finland):

- Frequenza cardiaca ed ECG;
- Frequenza respiratoria ;
- Pressione arteriosa (sistolica, diastolica e media) indiretta (NIBP), tramite manicotto applicato sul braccio;
- Saturimetria (%SpO₂)
- Co₂ espirata (%Et CO₂).

Questi parametri sono stati monitorati costantemente e trascritti ogni cinque minuti su di un'apposita scheda. La registrazione di tali valori iniziava dal momento del posizionamento dell'animale sul tavolo della tomografia ad emissione di positroni e terminava quando il paziente veniva estubato.

Sono state quindi calcolate, per ogni parametro, le medie e le deviazioni standard.

I dati sono stati poi riportati in un foglio di lavoro del programma SAS, e quindi analizzati mediante test T student; le differenze tra le variabili associate a probabilità $p < 0.05$ sono state accettate come significative.

FINE DELLA PROCEDURA DIAGNOSTICA

Al termine della procedura diagnostica la somministrazione di fluidi endovenosi proseguiva ancora per qualche minuto e veniva mantenuta l'erogazione di ossigeno, fino a quando l'animale riprendeva il riflesso di deglutizione, momento in cui si procedeva alla rimozione del tubo orotracheale.

L'animale, nel frattempo, veniva mantenuto avvolto all'interno del vello di pecora e del telo isoteramico, nonché riscaldato con delle "boule" piene di acqua calda.

Quando l'animale risultava normotermico ed in grado di riprendere la stazione, veniva messo in un trasportino di legno che permetteva la posizione da seduto e trasportato nuovamente allo stabulario del CORIT.

SEZ.4- RISULTATI E DISCUSSIONE

4.a GESTIONE PROTOCOLLO ANESTESIOLOGICO

La durata media della procedura diagnostica è stata di 111,43 (\pm 11,07) minuti nei soggetti del gruppo 1, 104,16 (\pm 5,85) minuti del gruppo 2 e di 110 (\pm 8,16) minuti per i soggetti del gruppo 3. La lunga durata della procedura ha reso spesso necessario il ricorso a dosi supplementari di anestetico utilizzate, nel momento in cui si manifestava un alleggerimento del piano anestesiológico.

La profondità dell'anestesia è di solito ottenuta grazie al monitoraggio di diversi parametri, tra i quali abbiamo tenuto in particolare considerazione:

- la perdita dei riflessi palpebrali e corneali;
- il grado di rilassamento muscolare;
- la frequenza e la profondità del respiro;
- la frequenza cardiaca.

Sono state considerate il numero delle dosi aggiuntive utilizzate in ciascun gruppo ed è stato confrontato il loro utilizzo nei soggetti sani e in quelli intossicati, al fine di valutare l'influenza della malattia sulla gestione dell'anestesia.

La media delle dosi anestetiche suppletive del gruppo 1 è stata di 3,7 (\pm 1,98), mentre nel gruppo 2 di 3,5 (\pm 1,76).

Statisticamente questa differenza non risulta significativa, ma si può valutare graficamente come si sono comportati i singoli soggetti (Grafico 1).

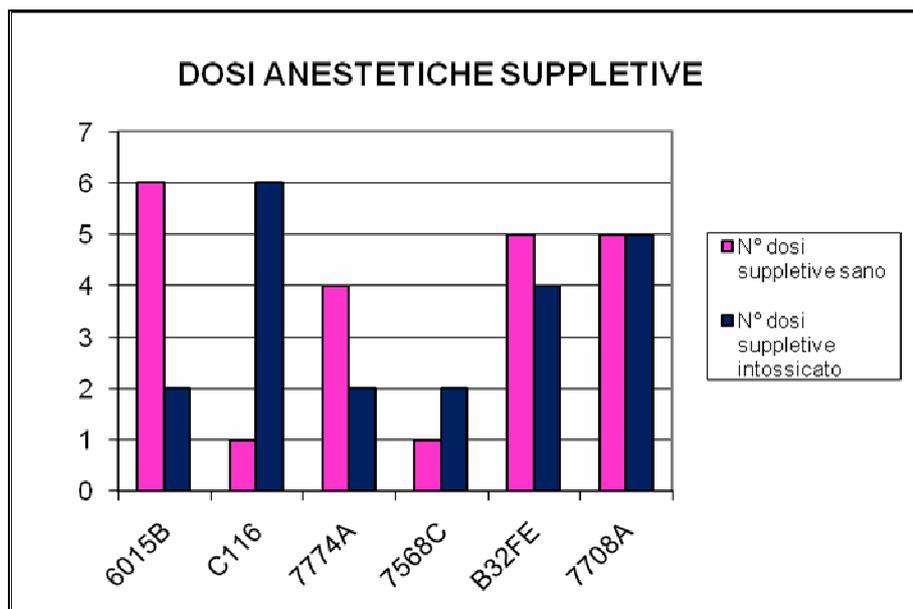


Grafico 1: numero dosi anestetiche suppletive per ciascun soggetto.

Come si può rilevare dal grafico, tre soggetti hanno ricevuto il maggior numero di dosi suppletive di anestetici da sani, due soggetti hanno ricevuto più dosi da intossicati e un soggetto ha ricevuto lo stesso numero.

In particolar modo, osserviamo che il soggetto C116 dimostra una notevole differenza tra le dosi ricevute da intossicato rispetto a quelle ricevute da sano.

Durante l'esecuzione della tomografia ad emissione di positroni su questo soggetto in seguito all'intossicazione è risultato infatti difficile valutare accuratamente la profondità dell'anestesia, in quanto permanevano degli evidenti movimenti della mano sinistra, della coda e altre contrazioni muscolari.

Il soggetto, dopo premedicazione e dopo induzione, ha presentato subito un aumento del tono muscolare e delle contrazioni spastiche dei diversi muscoli del corpo; tuttavia risultava facile aprirgli la bocca ed esso dimostrava di tollerare la lidocaina diluita, spruzzata sull'epiglottide, senza riflesso della deglutizione. Al momento dell'intubazione, avvenuta 5 minuti dopo l'induzione, non ha presentato né il riflesso della deglutizione né tosse.

Dalle osservazioni dell'animale durante la stabulazione dopo intossicazione con MPTP, si era registrata, infatti, una tendenza a non utilizzare il braccio destro mentre il braccio e la mano di sinistra presentavano spesso spasmi, scatti e contrazioni, a volte anche associati al corrispondente arto posteriore.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Comparando i sintomi presentati dal soggetto con la manifestazione clinica della malattia di Parkinson in un paziente umano, possiamo supporre che esso abbia sviluppato una forma ipercinetica della patologia stessa.

Infatti, nei pazienti umani affetti da malattia di Parkinson, in base alla prevalenza di alcuni sintomi e segni piuttosto che di altri, si possono distinguere due forme di evoluzione della malattia: la forma ipercinetica, con età di esordio più precoce, evoluzione meno invalidante e più lenta dominata dal tremore che si manifesta tipicamente "a riposo", con bassa frequenza, scompare durante i movimenti volontari e in genere peggiora nelle situazioni di stress emozionale, o la forma acinetico-ipertonica, dominata quest'ultima da rigidità ed acinesia, più rapidamente invalidante (Nicholson G. *et al.*, 2002).

La patologia nel paziente umano colpisce tutti i distretti muscolari, anche se in genere esordisce a livello dei muscoli assiali e col passare del tempo diventa prevalente nei muscoli flessori ed adduttori.

Per la gestione del piano anestesiológico di questo soggetto post-intossicazione, quindi, vista la permanenza di questi tremori, si è deciso di somministrare le ulteriori dosi dei farmaci anestetici quando ai movimenti della mano sinistra si associavano ammiccamento continuo, aumento della frequenza respiratoria e altri movimenti che potessero indicare una reale superficializzazione anestesiológica.

Si è potuto osservare che, anche dopo le somministrazioni anestetiche suppletive, i movimenti della mano sinistra, alcuni movimenti degli arti posteriori e della coda non sembravano essere correlabili al piano anestesiológico, ma probabilmente imputabili al danno neurologico post-intossicazione.

Tramite l'intossicazione dei primati con MPTP, infatti, si viene a ricreare una delle caratteristiche principali nella patogenesi della malattia di Parkinson, ovvero la perdita di neuroni dopaminergici nello striatum, determinando la deplezione di dopamina nei nuclei della base (Collier T.J. *et al.*, 2003; Emborg E.M., 2007).

La conseguente carenza di dopamina favorisce l'aumento dell'attività dell'acido gamma-aminobutirrico (GABA), che inibisce i nuclei talamici, e del troncoencefalico: l'eccessiva inibizione talamica provoca soppressione del sistema motorio corticale, con la comparsa di acinesia, rigidità e tremori, mentre

RISULTATI E DISCUSSIONE

l'inibizione delle aree motorie del troncoencefalico può comportare anomalie della postura e dell'andatura (Rudra A. *et al.*, 2007).

Anche l'animale con il numero di riconoscimento 7708A, sottoposto ad anestesia post-intossicazione, presentava dei movimenti della coda, probabilmente imputabili al parkinsonismo indotto, poiché non venivano controllati dalle dosi anestetiche suppletive, nonostante l'assenza di ammiccamento e diminuzione della frequenza cardiaca e respiratoria tali da giustificare un'adeguata profondità del piano anestesiológico. Ricordiamo che, nel nostro studio, per garantire un'uniformità e standardizzazione dei risultati ottenuti, potevamo utilizzare unicamente come farmaci anestetici l'associazione di ketamina e xilazina, prevista dal protocollo della sperimentazione.

La ketamina, come riportato in letteratura nei pazienti umani con malattia di Parkinson, fa parte degli anestetici endovenosi meno indicati, da utilizzare con assoluta cautela a causa delle sue potenziali interazioni con la levodopa e viste le sue caratteristiche simpatico mimetiche, che possono provocare un aumento del tremore parkinsoniano (Rudra A *et al.*, 2007).

Non abbiamo invece ritrovato dati in bibliografia sugli effetti della xilazina nei pazienti con malattia di Parkinson.

Attualmente, in medicina umana non esiste un protocollo anestesiológico che si sia dimostrato totalmente efficace e sicuro per i pazienti affetti da malattia di Parkinson, ma si raccomanda una attenta valutazione del singolo soggetto e delle possibili interazioni tra i farmaci stessi (Rudra A *et al.*, 2007).

Il recente interesse, ad esempio, si è focalizzato sull'uso del propofol in pazienti con il Parkinson, particolarmente in quelli sottoposti a pallidotomia stereotattica o talamotomia.

Il propofol produce sia discinesia che ablazione dei tremori a riposo, suggerendo che esso possa avere effetti allo stesso tempo eccitatori ed inibitori in questo tipo di pazienti; in alcuni soggetti, in procinto di sottoporsi a procedure stereotattiche, sono stati descritti sia degli effetti dischinetici che l'abolizione totale del tremore, portando addirittura alla sospensione della chirurgia (Nicholson G. *et al.*, 2002).

Per quanto riguarda invece i tre soggetti che hanno ricevuto un numero superiore di dosi anestetiche da sani, ed in particolare l'animale con il numero

RISULTATI E DISCUSSIONE

di riconoscimento 6015B, possiamo supporre che essi dopo intossicazione con MPTP abbiano sviluppato una forma acinetico-ipertonica, dominata da rigidità ed acinesia.

Infatti, durante l'anestesia di questi soggetti dopo intossicazione, non vengono segnalati tremori involontari e la somministrazione della dose anestetica suppletiva viene eseguita al verificarsi di sintomi quali ammiccamento ed irregolarità del respiro, associabili ad una possibile superficializzazione del paziente stesso.

E' stato valutato, inoltre, il tempo della somministrazione della prima dose anestetica suppletiva in entrambi i gruppi: nel gruppo 1 è stata somministrata al tempo medio di 42,86 (\pm 28,41) minuti dall'inizio della procedura, mentre nel gruppo 2 a 36,7 (\pm 21,37) minuti.

Qui di seguito il grafico raffigurante i tempi medi di somministrazione delle singole dosi anestesologiche suppletive nei due gruppi (Grafico 2).

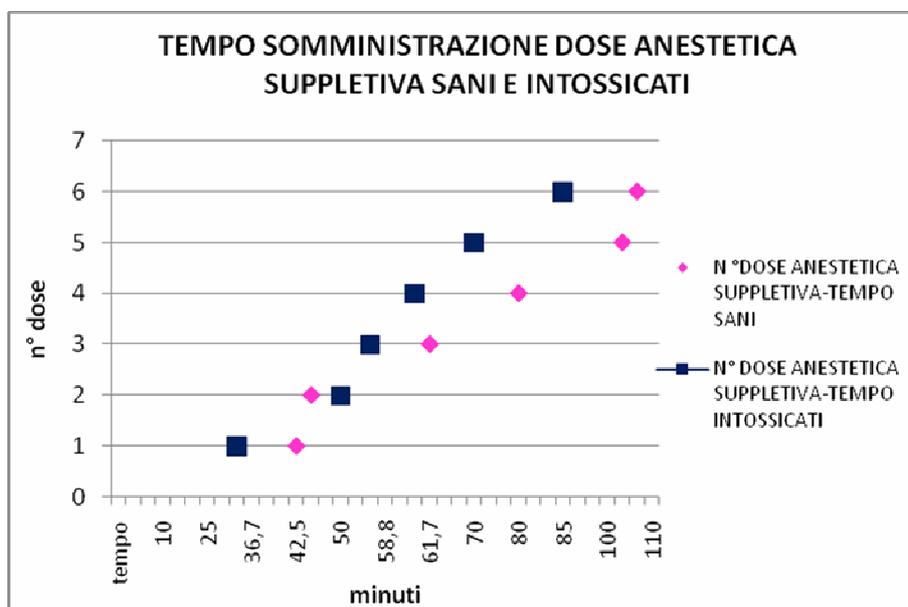


Grafico 2: Tempo medio di somministrazione delle dosi anestetiche suppletive nei soggetti da sani e dopo intossicazione.

RISULTATI E DISCUSSIONE

La scelta da parte dell'anestesista di somministrare una dose anestetica suppletiva è giustificata dalla necessità di assenza di movimento degli animali, sia volontario che involontario, per permettere lo svolgimento della procedura diagnostica.

Come si può osservare dal grafico 2, eccetto per quanto riguarda la seconda somministrazione, gli animali dopo intossicazione ricevono sempre la dose anestetica suppletiva precedentemente a quando sani.

Questo può essere correlato ad una minore durata d'azione dei farmaci somministrati nei soggetti post-intossicazione, oppure al permanere di tremori involontari similparkinsoniani, causati dal danno neurologico MPTP indotto, che i farmaci anestetici utilizzati, la ketamina in particolare, non sono in grado di inibire ma possono addirittura esacerbare.

4.b APPARATO CARDIOVASCOLARE

FREQUENZA CARDIACA

Durante l'intera durata della procedura diagnostica la frequenza cardiaca del gruppo 1 ha mostrato un andamento relativamente costante, mantenendosi su valori compresi tra i 75 e i 103 battiti/minuto, con una frequenza cardiaca media di 93,93 ($\pm 18,71$) battiti/minuto (Grafico 3).

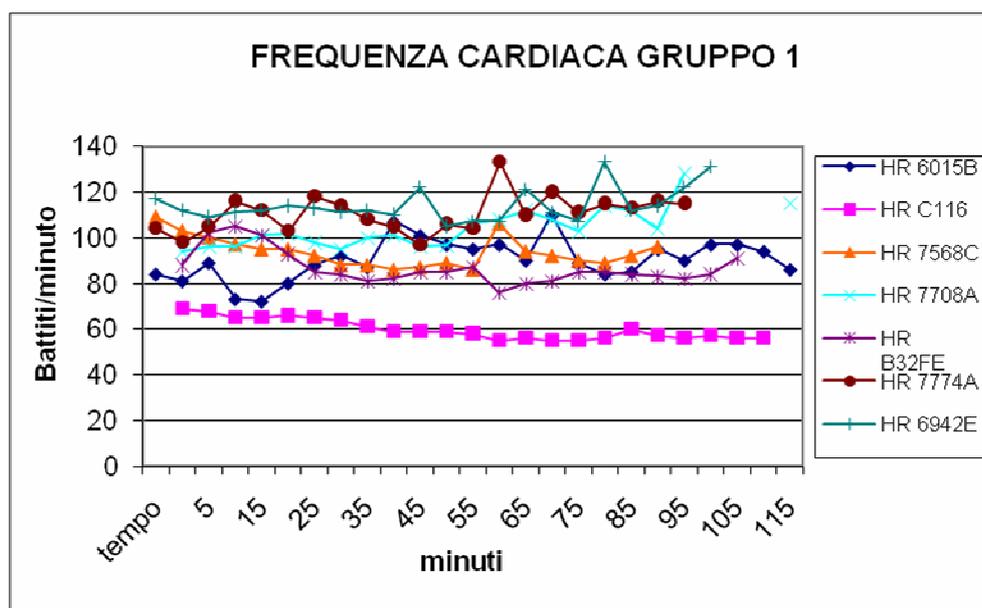


Grafico 3: Andamento frequenza cardiaca dei singoli soggetti del gruppo 1.

Analizzando dal grafico 3 l'andamento della frequenza cardiaca dei singoli animali da sani, si può valutare come il soggetto C116, presenta una frequenza cardiaca con valori notevolmente inferiori agli altri animali, compresa tra i 55 e i 69 battiti al minuto, con un andamento tendenzialmente lineare. L'animale, durante tutta l'esecuzione della procedura diagnostica, riceve solamente un bolo anestetico suppletivo al 85 minuto (Grafico 1) per un movimento improvviso delle mani, che non produce però effetti percepibili sulla frequenza cardiaca. Quindi possiamo pensare che in questo soggetto si manifesti particolarmente l'azione depressante della xilazina.

La xilazina, infatti, da sola o combinata con ketamina, statisticamente produce significative diminuzioni nella frequenza cardiaca, rispetto agli animali a cui viene somministrata la sola ketamina; questo indica come gli effetti della xilazina sovrastino quelli eccitatori indotti dalla ketamina (Sulli J. Popilskis *et al.*, 1997).

Comunque, per poter interpretare correttamente l'effetto dei farmaci anestetici sulla funzionalità cardiorespiratoria degli animali, soprattutto prima di ciascun trattamento sperimentale, avremmo dovuto conoscere i valori basali prima della somministrazione anestesologica relativi alla loro frequenza cardiaca, respiratoria e pressione arteriosa, ma qualsiasi manovra atta a registrare questi

RISULTATI E DISCUSSIONE

parametri avrebbe comportato comunque uno stress nel soggetto, cosicché da provocare un'alterazione dei suddetti valori rendendoli non più attendibili.

Nei soggetti con numero di riconoscimento 7774A, 6942E e 7568C gli aumenti della frequenza cardiaca rappresentati dal grafico rispettivamente al minuto 65 per il 7774A, ai minuti 50,70 e 85 per il 6942E e al minuto 65 per il 7568C sono accompagnati clinicamente anche da ammiccamento e respiro irregolare, segnali che fanno presupporre all'anestesista un inizio di superficializzazione del paziente.

In queste occasioni viene quindi somministrata ai soggetti una dose anestetica suppletiva che determina una diminuzione della frequenza cardiaca, una regolarizzazione del respiro e la scomparsa dell'ammiccamento, riportandoli al piano anestesilogico necessario per il proseguimento della procedura diagnostica.

Similmente a quanto appena descritto, anche nel soggetto con numero di riconoscimento 6015B l'aumento della frequenza cardiaca al minuto 75 è accompagnato da sintomi quali tosse e movimenti muscolari, tali da giustificare la somministrazione di una dose anestetica suppletiva, che determina la scomparsa del riflesso tossigeno, dei movimenti e, come rappresentato dal grafico, una diminuzione della frequenza cardiaca.

Si può quindi osservare come i sintomi presentati dagli animali da sani, durante lo svolgimento della procedura diagnostica (ammiccamento, tosse, movimento ecc), siano imputabili a superficializzazioni del piano anestesilogico, che vengono comunque perfettamente controllati mediante la somministrazione di dosi anestetiche suppletive.

Il gruppo 2 durante tutta la durata della procedura diagnostica, ha presentato una frequenza cardiaca con un andamento relativamente costante, che si è mantenuta su valori compresi tra i 103 e i 146 battiti/minuto, con una frequenza cardiaca media di 115,98 (\pm 18,66) battiti/minuto (Grafico 4).

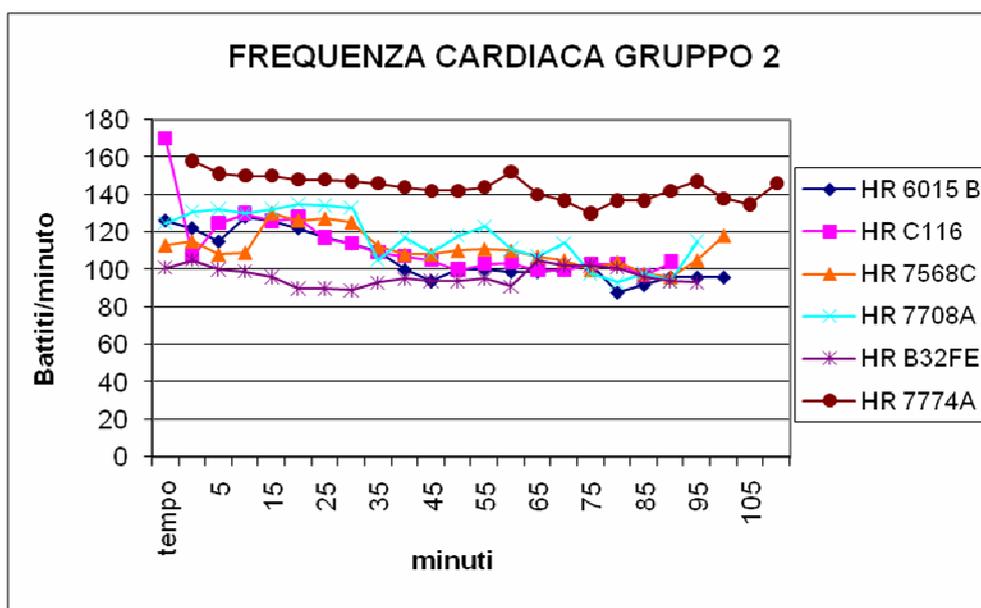


Grafico 4: Andamento frequenza cardiaca dei singoli soggetti del gruppo 2.

Analizzando il grafico dell'andamento della frequenza cardiaca dei singoli soggetti dopo intossicazione possiamo notare che non si verificano innalzamenti improvvisi per tale parametro, rispetto a quanto precedentemente descritto negli animali quando sani.

Si può osservare che il soggetto con numero di riconoscimento 7774A presenta la frequenza cardiaca con i valori più alti del gruppo; questo primate riceve solamente due dosi anestetiche suppletive (Grafico 1) dopo aver manifestato ammiccamento e respiro irregolare, una al minuto 65 e la successiva al minuto 100; tali somministrazioni comportano solo una lieve diminuzione nella frequenza cardiaca.

L'animale con il numero di riconoscimento 7568C presenta un aumento della frequenza cardiaca, con valori che raggiungono i 130 battiti al minuto, dal minuto 20 al minuto 35. Al minuto 40 il soggetto inizia ad ammiccare, e gli viene somministrata una dose anestetica suppletiva, che comporta la scomparsa dell'ammiccamento e una riduzione della frequenza cardiaca, con valori compresi tra 108 e 96 battiti al minuto. La frequenza cardiaca del soggetto torna poi a risalire spontaneamente al termine della procedura.

RISULTATI E DISCUSSIONE

CONFRONTO TRA GRUPPI

Confrontando le frequenze cardiache medie tra i gruppi è risultato che i soggetti dopo intossicazione (gruppo 2) hanno avuto una frequenza cardiaca media superiore a quella che avevano da sani (gruppo 1) (tabella 4). Questa differenza tra le medie delle frequenze cardiache del gruppo 1 e del gruppo 2 è risultata statisticamente significativa nell'elaborazione dei dati mediante T test ($p < 0.0001$).

Calcolato successivamente il T test, per confrontare le frequenze cardiache medie tra i soggetti del gruppo 1 ed i soggetti del gruppo 2 in ogni tempo della procedura diagnostica, la frequenza cardiaca del gruppo 2 si è confermata essere superiore in modo statisticamente significativo rispetto a quella del gruppo 1 per ogni tempo della procedura diagnostica, come si può valutare dal seguente grafico (Grafico 5).

RISULTATI E DISCUSSIONE

SOGGETTO	FREQUENZA CARDIACA MEDIA BASALE (Battiti/minuto)	FREQUENZA CARDIACA MEDIA POST-MPTP (Battiti/minuto)
C116	59,87 (± 4,54)	112,60 (± 16,96)
7568C	93,70 (± 6,59)	111,14 (± 9,24)
6015B	90,40 (± 9,12)	106,50 (± 12,51)
7708A	104,10 (±8 ,54)	116,86 (±14,09)
B32FE	86,77 (± 7,41)	96,43 (± 4,91)
7774A	110,62 (± 8,18)	143,96 (± 6,49)
6942E	114,23 (± 7,39)	
GRUPPO	93,93 (± 18,71)	115,98 (± 18,66)

Tabella 4 Valori medi della frequenza cardiaca allo stato basale e dopo intossicazione dei singoli soggetti e dei due gruppi. Dati espressi come media ± D.S.

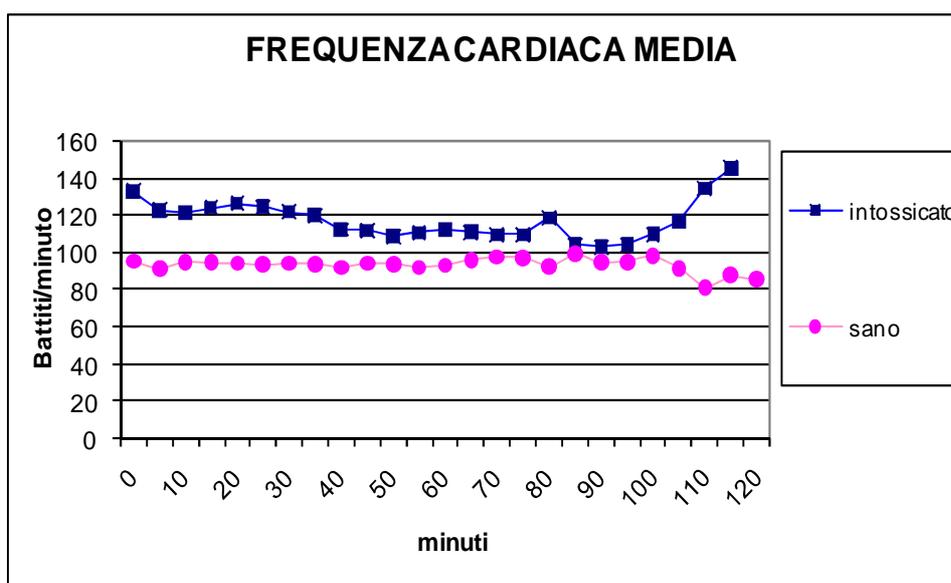


Grafico 5: Andamento della frequenza cardiaca media di base (gruppo1) e dopo intossicazione (gruppo2) misurata ogni 5 minuti.

Da un'analisi descrittiva dell'andamento della frequenza cardiaca media del gruppo 1 e del gruppo 2 si può notare come questa differenza tra le frequenze cardiache dei due gruppi sia evidente soprattutto durante i primi 45 minuti della procedura diagnostica, e si ripresenti poi negli ultimi 25 minuti.

Valutando il grafico si può osservare che, anche nei primi 35 minuti della procedura, in cui entrambi i gruppi non ricevono ulteriori somministrazioni farmacologiche, la frequenza cardiaca dei soggetti dopo intossicazione è costantemente superiore a quella di base.

Nel nostro studio tramite l'intossicazione dei primati con MPTP si viene a ricreare una delle caratteristiche principali nella patogenesi della malattia di Parkinson, ovvero la perdita di neuroni dopaminergici nello striatum, determinando la deplezione di dopamina nei nuclei della base (Collier TJ. *et al.*, 2003; Emborg EM., 2007). Quale aspetto secondario del diminuito rilascio di dopamina deriva una minore attività adrenergica e un aumento degli effetti dell'attività colinergica, che dovrebbero comportare una diminuzione della frequenza cardiaca e della pressione arteriosa (Aguggini A. *et al.*, 1992; Nicholson G. *et al.*, 2002).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nei pazienti umani con malattia di Parkinson, infatti, la tachicardia non viene segnalata quale fenomeno frequente durante le procedure anestesiolgiche, ma si riscontrano piuttosto fenomeni ipotensivi, aritmie cardiache ed altre disfunzioni del sistema nervoso autonomo con ripercussioni cardiovascolari (Nicholson G. *et al.*, 2002).

Bisogna ricordare, però, che i pazienti umani parkinsoniani sottoposti ad anestesia sono normalmente dei soggetti anziani e quindi difficilmente sviluppano un aumento della frequenza cardiaca in seguito ad episodi ipotensivi, mentre nei nostri soggetti dopo l'intossicazione con MPTP potrebbe essersi sviluppata una tachicardia di riflesso all'ipotensione.

Considerando a tale riguardo i farmaci anestesiolgici somministrati, dal punto di vista cardiovascolare la ketamina ha attività stimolante sul sistema nervoso simpatico, inibendo la captazione delle catecolamine e l'effetto simpaticomimetico a livello di sistema nervoso centrale. Inoltre, essa ha effetto diretto sulla muscolatura liscia vasale, ed effetto inotropo positivo sul miocardio; la ketamina provoca quindi un aumento della gittata, della frequenza cardiaca, della pressione aortica media, della pressione arteriosa polmonare e della pressione venosa centrale.

La somministrazione di xilazina induce inizialmente un breve periodo di attivazione dei recettori α_2 postsinaptici periferici, che determina vasocostrizione, con conseguente ipertensione e bradicardia di riflesso. Questa fase lascia rapidamente il posto ad una ben più lunga fase di attivazione dei recettori α_2 centrali e periferici presinaptici, che provocano una riduzione del tono simpatico e una conseguente diminuzione della gittata cardiaca e della pressione arteriosa (Afshair F.S. *et al.*, 2005; Lumb & Jones', 2007).

La xilazina combinata con ketamina statisticamente produce significative diminuzioni nella pressione sanguigna arteriosa e nella frequenza cardiaca, rispetto agli animali a cui viene somministrata la sola ketamina (Sulli J. Popilskis *et al.*, 1997).

La circostanza che i soggetti intossicati abbiano presentato una frequenza cardiaca superiore a quella da sani potrebbe essere pertanto riconducibile al prevalere dell'azione cardiostimolante della ketamina sull'effetto depressante della xilazina, oppure all'instaurarsi di una tachicardia di riflesso in un quadro

RISULTATI E DISCUSSIONE

ipotensivo, creato dal danno neurologico post-intossicazione e dall'azione della xilazina.

Valutando anche l'andamento della frequenza cardiaca in ciascun animale, prima da sano e poi da intossicato, si può verificare come, tranne che in alcuni intervalli di tempo, sia confermata essere superiore la frequenza cardiaca nel soggetto intossicato rispetto al sano (Grafico 6-7-8-9-10-11).

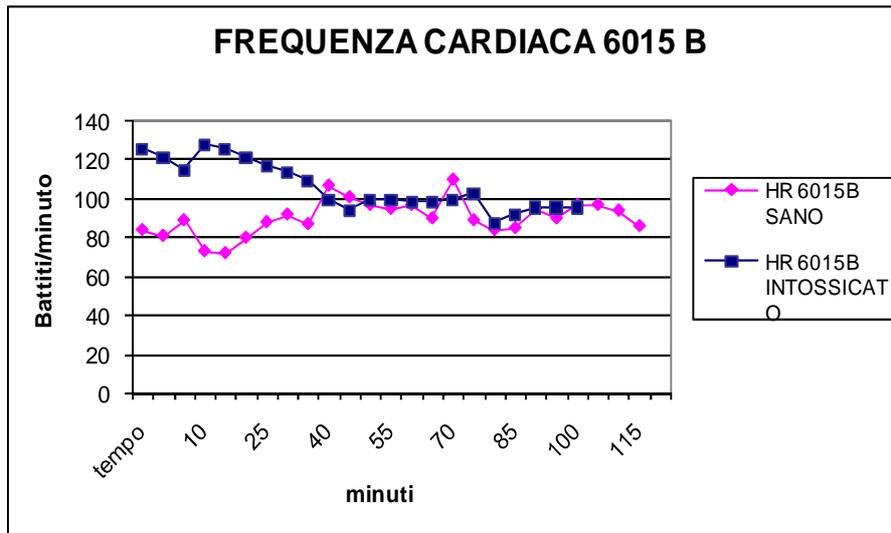


Grafico 6: Confronto dell'andamento della frequenza cardiaca di base e dopo intossicazione del soggetto 6015B.

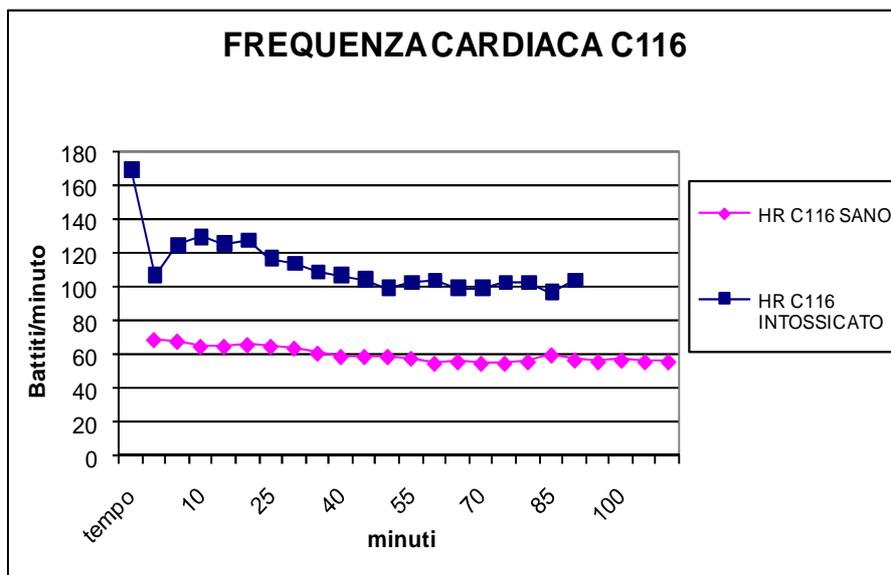


Grafico 7: Confronto dell'andamento della frequenza cardiaca di base e dopo intossicazione del soggetto C116

RISULTATI E DISCUSSIONE

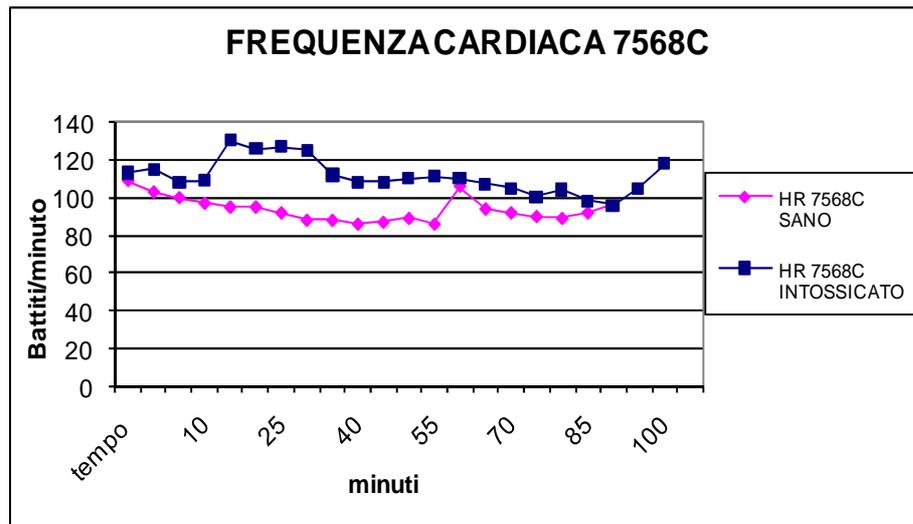


Grafico 8: Confronto dell'andamento della frequenza cardiaca di base e dopo intossicazione del soggetto 7568C.

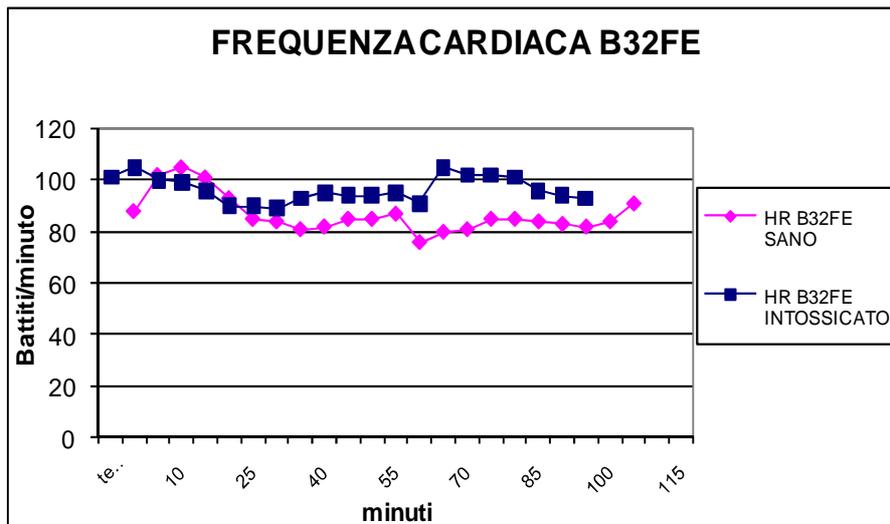


Grafico 9: Confronto dell'andamento della frequenza cardiaca di base e dopo intossicazione del soggetto B32FE.

RISULTATI E DISCUSSIONE

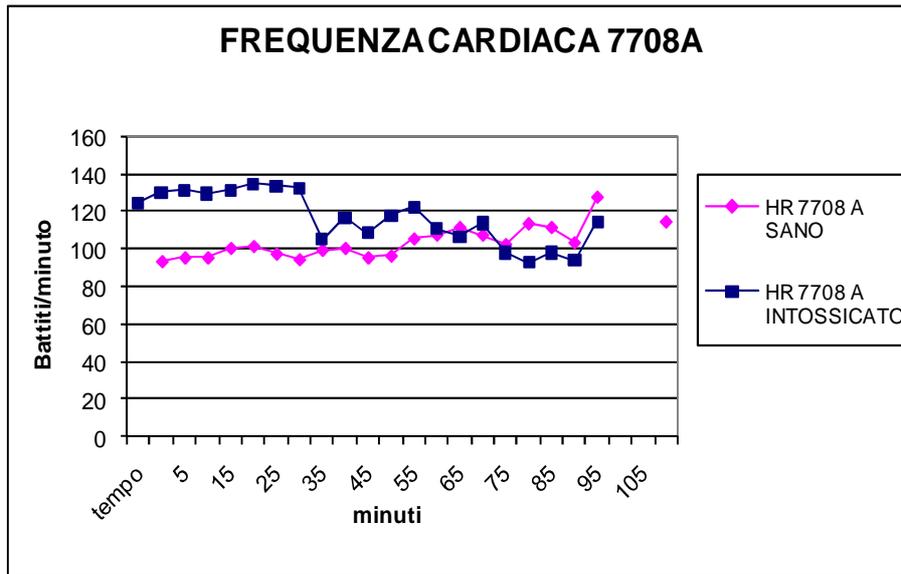


Grafico 10: Confronto dell'andamento della frequenza cardiaca di base e dopo intossicazione del soggetto 7708A

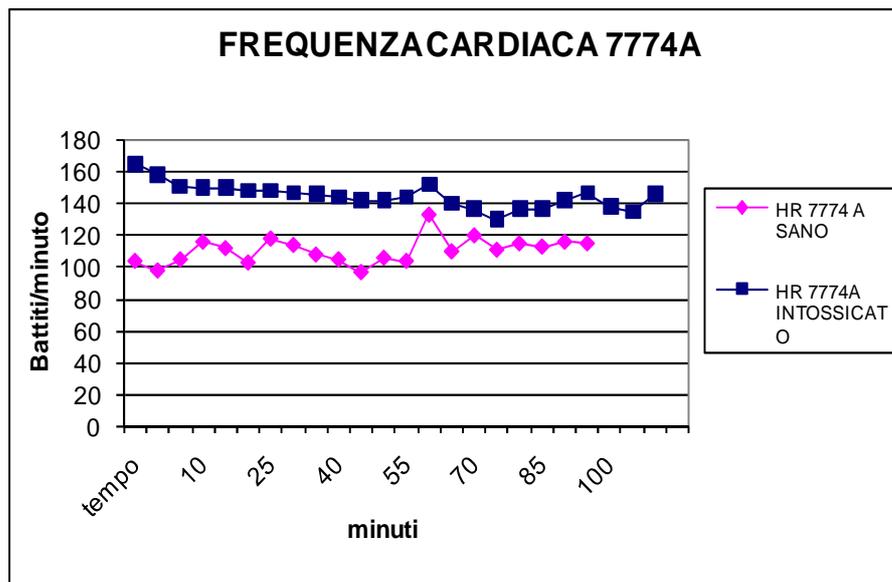


Grafico 11 Confronto dell'andamento della frequenza cardiaca di base e dopo intossicazione del soggetto 7774A

RISULTATI E DISCUSSIONE

PRESSIONE ARTERIOSA NON INVASIVA

Sebbene il metodo ottimale per la misurazione della pressione arteriosa resti la rilevazione diretta mediante cateterismo arterioso, la scelta dell'utilizzo della misurazione non invasiva tramite metodo oscillometrico elettronico è dettata dalla facilità e dalla praticità del suo utilizzo.

Il metodo non invasivo presenta tuttavia notevoli limitazioni, tra cui una scarsa affidabilità e la notevole influenza delle irregolarità del polso (aritmie, tachicardia) sul sistema di rilevamento della pressione. Può essere infatti utilizzato per misurare l'andamento pressorio in soggetti normotesi, ma non è completamente affidabile nella misurazione del valore assoluto. Questa misura è di fatto influenzata in modo significativo dal rapporto tra la larghezza della cuffia e il diametro dell'arto, nonché dal modo in cui la cuffia è posizionata sull'arto (Lumb e Jones, 1996).

Questi fattori possono rendere discontinuo il monitoraggio del trend pressorio durante la procedura diagnostica, in quanto non sempre è possibile registrarne il valore. I dati, e di conseguenza anche i grafici, relativi alle pressioni sistolica, diastolica e media non sono quindi precisi e totalmente affidabili.

In considerazione del fatto che non sono stati rilevati i valori di tutti gli animali durante ogni intervallo di tempo, per l'analisi statistica sono state calcolate le medie campionarie sulla base del numero di osservazioni del campione.

L'analisi statistica è stata quindi effettuata sui valori di pressione media così calcolati; anche se questi valori non sono perfettamente corrispondenti a quelli reali, essi possono essere utilizzati comunque per rappresentare una stima accettabile dell'andamento della pressione nel corso della procedura diagnostica.

Un'utile misurazione della pressione arteriosa sarebbe stata quella diretta, ottenuta con l'incannulazione di un'arteria. Questo avrebbe causato però un notevole allungamento nella durata dell'indagine diagnostica, viste le notevoli difficoltà pratiche che avrebbe comportato l'incannulazione di un vaso di calibro così ridotto.

Una soluzione potrebbe essere quindi quella di adottare un piccolo apparecchio per l'ecodoppler portatile: questo apparecchio permetterebbe infatti di ottenere misurazioni affidabili, precise e costanti, ma anche in questo caso possono

RISULTATI E DISCUSSIONE

presentarsi delle limitazioni al suo utilizzo, relative al posizionamento e all'ingombro della strumentazione, oltre al fatto che la rilevazione della pressione potrebbe essere influenzata dall'operatore.

Valutando quindi i dati raccolti, il gruppo 1 ha evidenziato:

- Pressione arteriosa sistolica media di 129,50 (\pm 52,28) mmHg (media pesata sui valori validi) (Grafico 12);

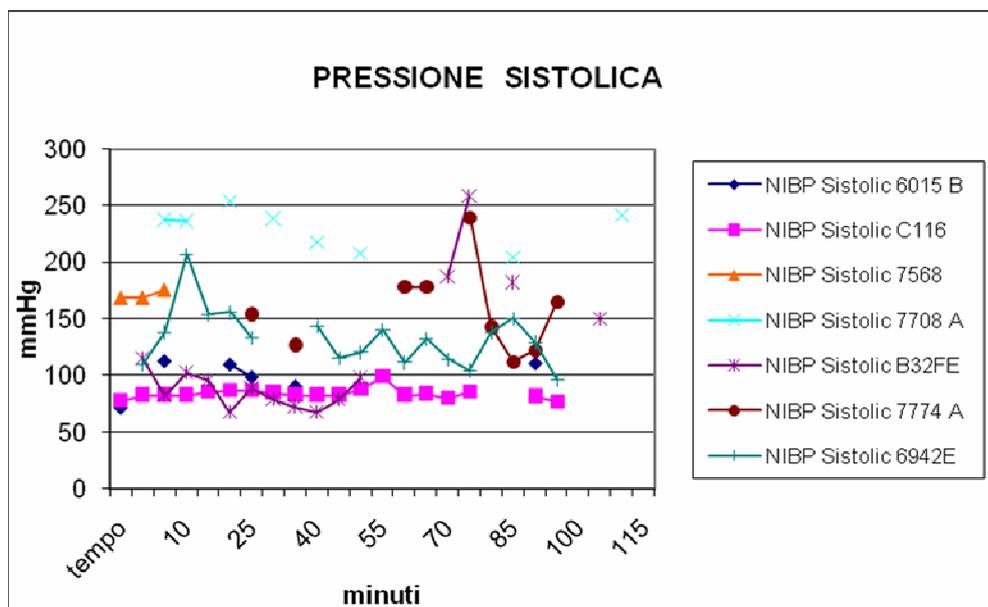


Grafico 12: Andamento della pressione arteriosa sistolica dei singoli soggetti del gruppo 1

- Pressione arteriosa diastolica media di 69,95 (\pm 39,02) mmHg (Grafico 13);

RISULTATI E DISCUSSIONE

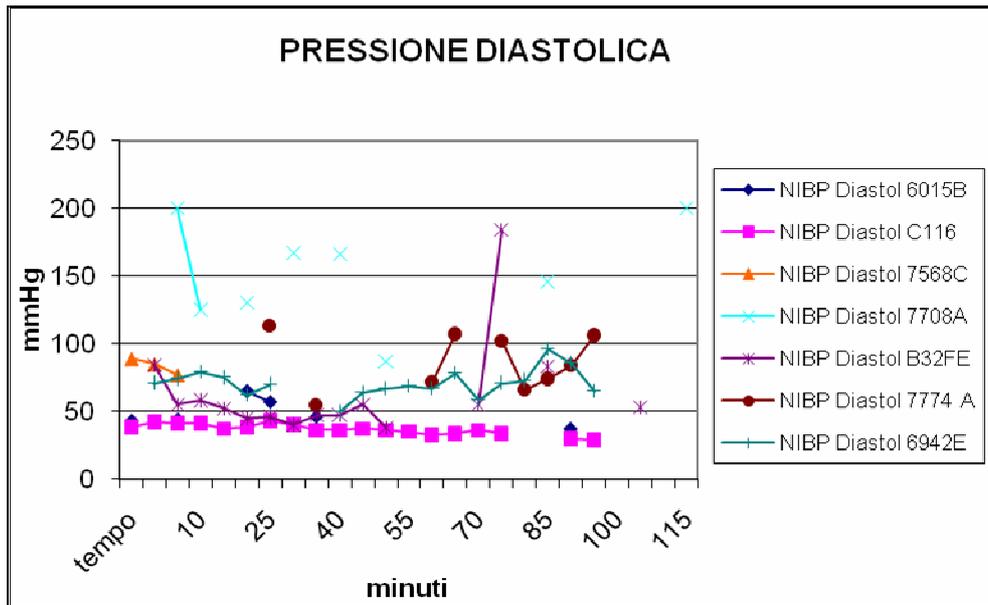


Grafico 13: Andamento della pressione arteriosa diastolica dei singoli soggetti del gruppo 1.

- Pressione arteriosa media di 93,86 (\pm 44,12) mmHg (Grafico 14).

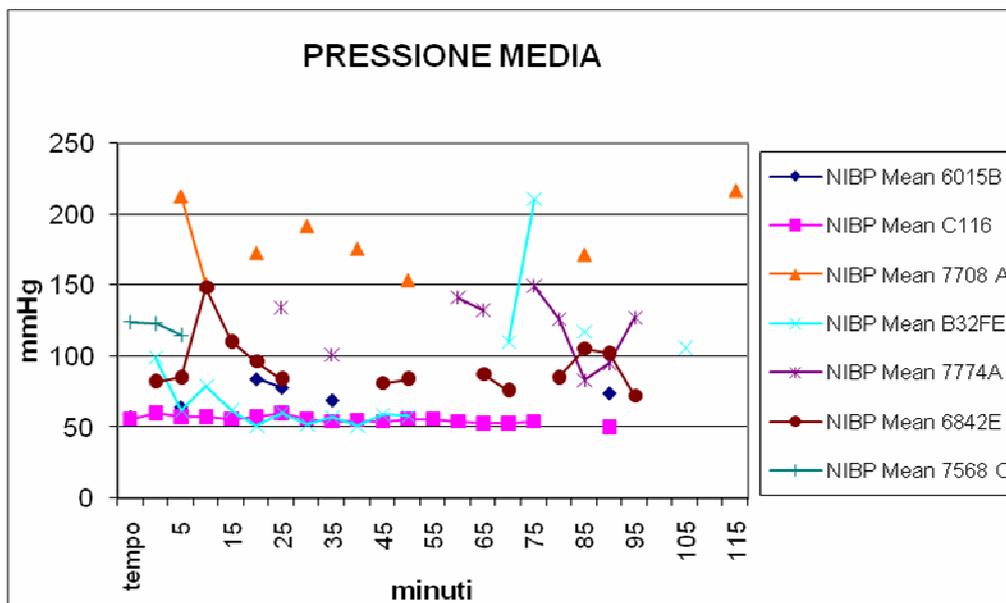


Grafico 14: Andamento della pressione arteriosa media dei singoli soggetti del gruppo1.

Il gruppo 2 ha complessivamente evidenziato:

- Pressione arteriosa sistolica media di 97,68 (\pm 37,59) mmHg (Grafico 15);

RISULTATI E DISCUSSIONE

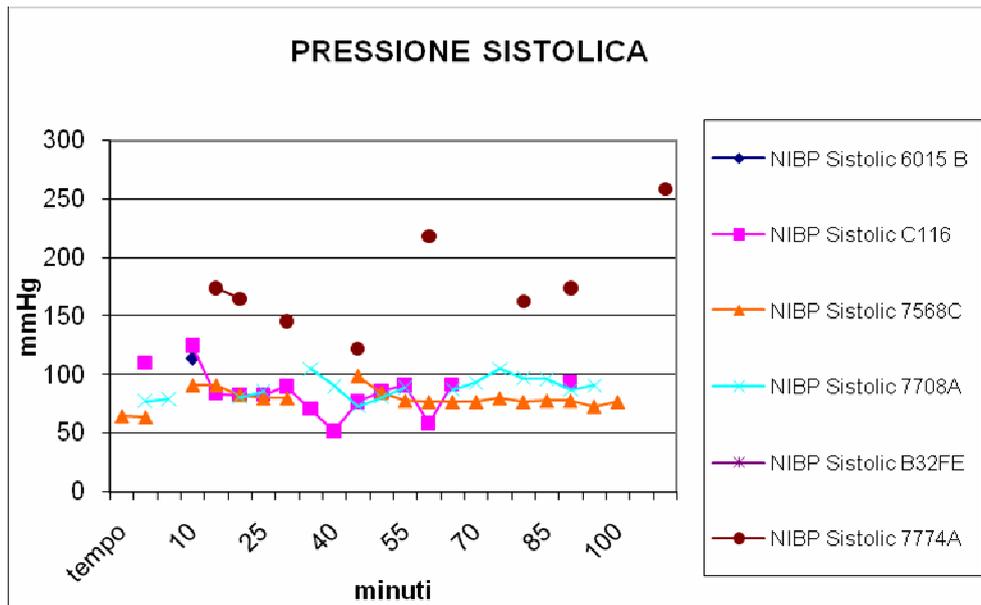


Grafico 15: Andamento della pressione arteriosa sistolica dei singoli soggetti del gruppo2.

- Pressione arteriosa diastolica media di 53,56 (\pm 25,29) mmHg (Grafico16);

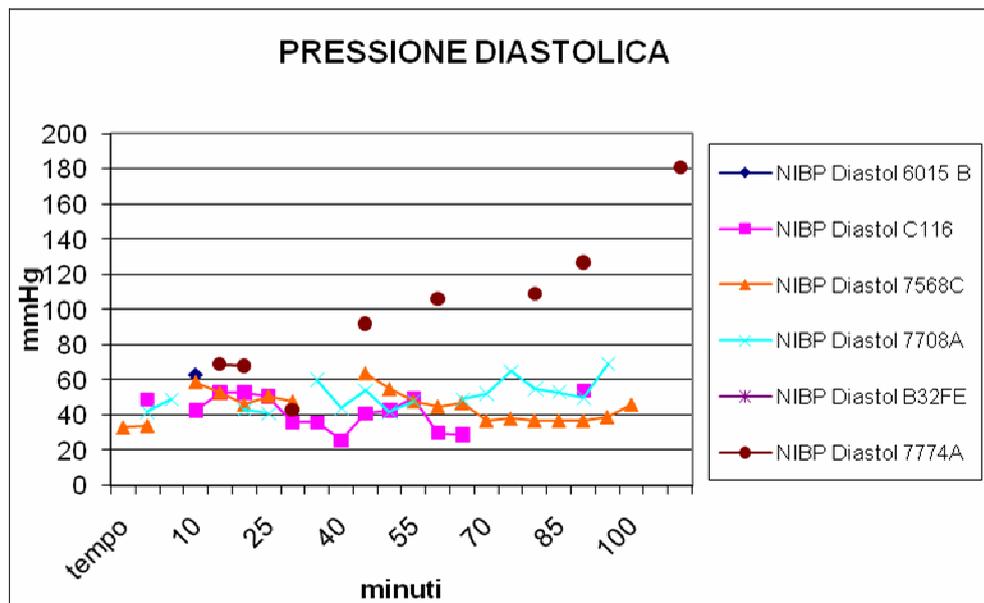


Grafico 16: Andamento della pressione arteriosa diastolica dei soggetti del gruppo2.

RISULTATI E DISCUSSIONE

- Pressione arteriosa media di $67,77 (\pm 23,87)$ mmHg (Grafico 17).

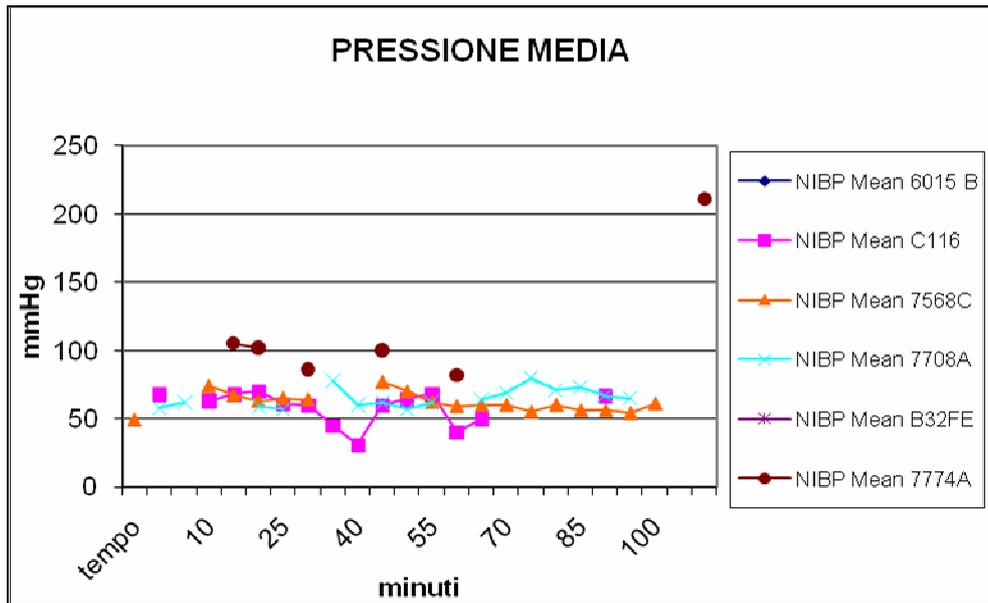


Grafico 17: Andamento della pressione arteriosa media dei singoli soggetti del gruppo2.

CONFRONTO TRA GRUPPI

Gli animali, da sani, hanno evidenziato una pressione arteriosa sistolica media superiore a quella post-intossicazione (tabella 5). Questa differenza tra le medie della pressione arteriosa sistolica del gruppo 1 e del gruppo 2 è risultata essere statisticamente significativa nell'elaborazione dei dati mediante T test

($p = 0.0001$).

Calcolato il T test per confrontare soggetti sani ed intossicati, questo andamento non è confermato essere statisticamente significativo per ogni tempo della procedura diagnostica, come si può valutare dal seguente grafico (Grafico 18).

RISULTATI E DISCUSSIONE

	PRESSIONE SISTOLICA MEDIA (mmHg)	PRESSIONE DIASTOLICA MEDIA (mmHg)	PRESSIONE MEDIA (mmHg)
BASALE	129,50 (± 52,28)	69,95 (± 39,02)	93,86 (± 44,12)
DOPO INTOSSICAZIONE	97,68 (± 37,59)	53,56 (± 25,29)	67,77 (± 23,87)

Tabella 5 Valori medi della pressione sistolica, distolica e media allo stato basale e dopo intossicazione. Dati espressi come media ± D.S

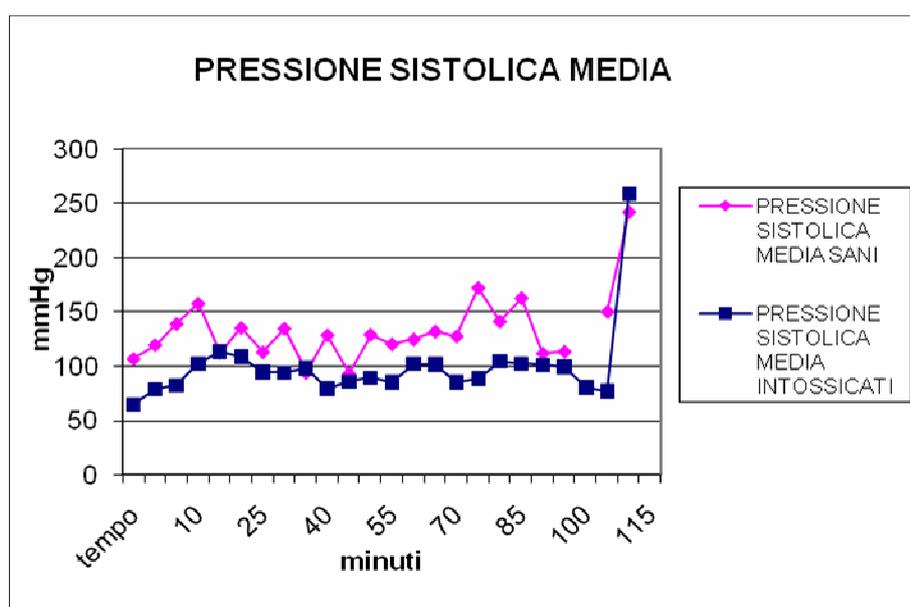


Grafico 18: Andamento della pressione arteriosa sistolica media di base (gruppo 1) e dopo intossicazione (gruppo 2) misurata ogni 5 minuti

Gli animali, da sani, hanno avuto una pressione arteriosa diastolica media superiore a quella post-intossicazione (tabella 5). Questa differenza tra le medie della pressione arteriosa diastolica del gruppo 1 e del gruppo 2 è risultata

RISULTATI E DISCUSSIONE

statisticamente significativa nell'elaborazione dei dati mediante T test ($p=0.0064$).

Calcolato il T test per confrontare gli animali da sani ed intossicati, in ogni tempo della procedura diagnostica, questo andamento è però confermato risultare statisticamente significativo solo in alcuni tempi della procedura, come si può valutare dal seguente grafico (Grafico 19).

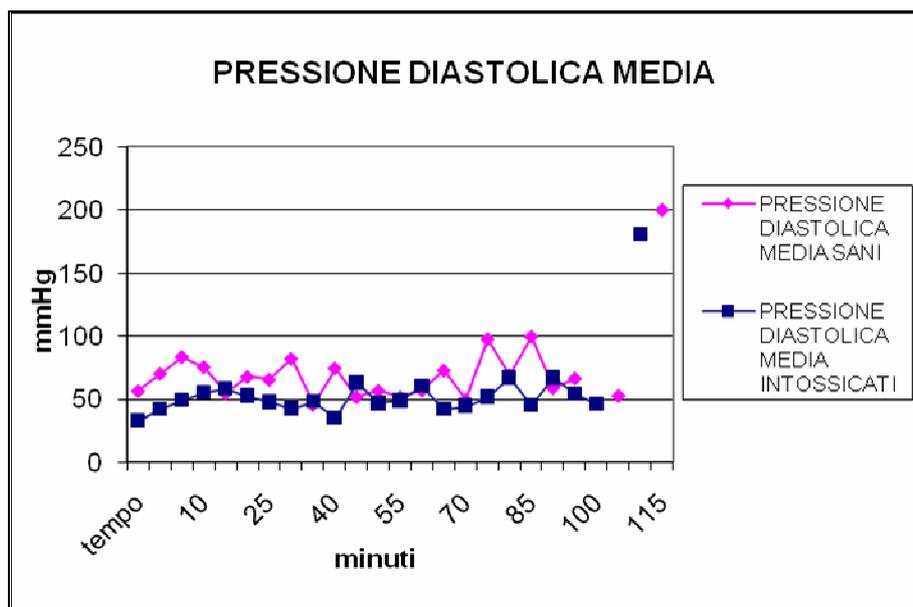


Grafico 19: Andamento della pressione arteriosa diastolica media di base (gruppo 1) e dopo intossicazione (gruppo 2) misurata ogni 5 minuti.

Infatti, come si vede anche dal grafico, gli andamenti della pressione diastolica media dei due gruppi si sovrappongono in molti punti.

Gli animali, da sani, hanno evidenziato una pressione arteriosa media superiore a quella post-intossicazione (tabella 5). Questa differenza tra le medie della pressione arteriosa media del gruppo 1 e del gruppo 2 è risultata statisticamente significativa nell'elaborazione dei dati mediante T test ($p=0.0002$).

Calcolato il T test, per confrontare sani e intossicati, questo andamento non è confermato essere statisticamente significativo per ogni tempo della procedura diagnostica, come si può valutare dal seguente grafico (Grafico 20).

RISULTATI E DISCUSSIONE

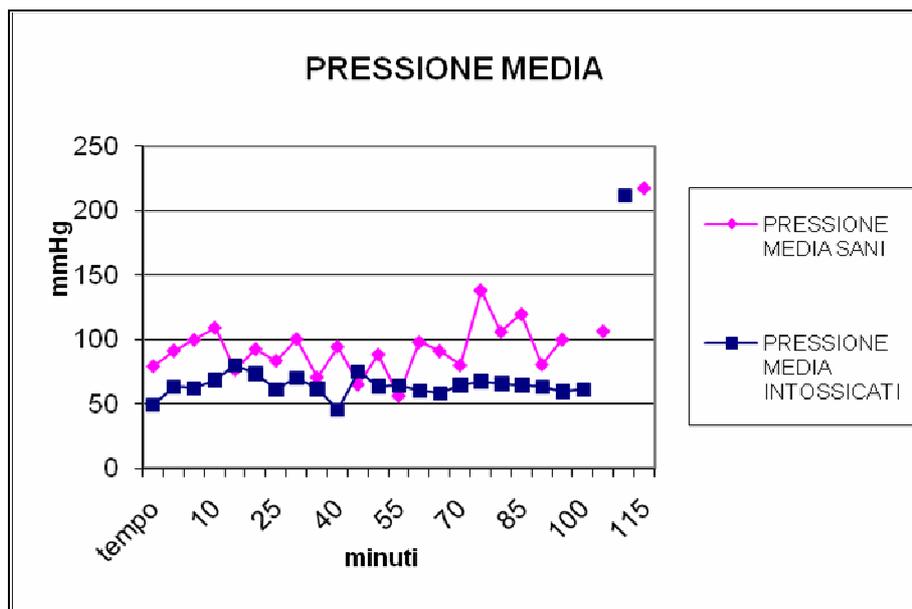


Grafico 20: Andamento della pressione arteriosa media di base (gruppo1) e dopo intossicazione (gruppo2) misurata ogni 5 minuti.

Da recenti studi clinici effettuati sull'uomo si è potuto accertare che importanti problemi di carattere cardiocircolatorio, quali difficoltà nel controllo della circolazione sanguigna, della pressione arteriosa (ipotensione ortostatica) e della funzionalità cardiaca, si sviluppano frequentemente come conseguenza di patologie di tipo neurologico, malattia di Parkinson compresa (Goldstein DS., 2006).

Le ripercussioni cardiocircolatorie nel paziente umano affetto da patologie neurologiche, infatti, possono costituire un fattore di rischio cardiovascolare da non sottovalutare.

Nel nostro studio, tramite l'intossicazione dei primati con MPTP si viene a ricreare una delle caratteristiche principali nella patogenesi della malattia di Parkinson, ovvero la perdita di neuroni dopaminergici nello striatum, determinando la deplezione di dopamina nei nuclei della base (Collier TJ. *et al.*, 2003; Emborg EM., 2007); la patologia così indotta segue i medesimi meccanismi concernenti la morte delle cellule nella malattia di Parkinson idiopatica nell'uomo, da cui potrebbe derivare una diminuzione dei livelli di dopamina nell'organismo. Quale aspetto secondario del diminuito rilascio di dopamina deriva una minore attività adrenergica e un aumento degli effetti dell'attività colinergica, che dovrebbero comportare una diminuzione della

RISULTATI E DISCUSSIONE

frequenza e della gittata cardiaca e vasodilatazione (Aguggini A. *et al.*, 1992; Nicholson G. *et al.*, 2002).

I nostri soggetti post-intossicazione, infatti, presentano pressione sistolica e diastolica media inferiori rispetto a quando sani.

Similmente ai pazienti umani affetti da malattia di Parkinson, anche nei nostri soggetti, in seguito al danno provocato dalla tossina MPTP, potrebbe essere venuta a mancare l'azione vasocostrittiva adrenergica indotta dalla dopamina; di conseguenza, si sarebbe verificato un quadro di vasodilatazione, da cui un abbassamento sia della pressione diastolica media che della pressione sistolica media correlata alla diminuita gittata cardiaca, derivante dal ridotto precarico ventricolare (Aguggini A. *et al.*, 1992; Nicholson G. *et al.*, 2002).

Considerando, inoltre, i farmaci anestesiológicos somministrati, dal punto di vista cardiovascolare la ketamina ha effetto diretto sulla muscolatura liscia vasale ed effetto inotropo positivo sul miocardio; essa provoca, quindi, un aumento della gittata, della frequenza cardiaca, della pressione aortica media, della pressione arteriosa polmonare e della pressione venosa centrale (White PF. *et al.*, 1982).

La somministrazione di xilazina induce inizialmente un breve periodo di attivazione dei recettori α_2 postsinaptici periferici, che determina vasocostrizione, con conseguente ipertensione e bradicardia di riflesso. Questa fase lascia rapidamente il posto ad una ben più lunga fase di attivazione dei recettori α_2 centrali e periferici presinaptici, che provocano una riduzione del tono simpatico e una conseguente diminuzione della gittata cardiaca e della pressione arteriosa (Afshair F.S. *et al.*, 2005; Lumb & Jones', 2007).

La xilazina, da sola o combinata con ketamina, statisticamente produce significative diminuzioni nella pressione sanguigna arteriosa rispetto agli animali a cui viene somministrata la sola ketamina; questo indica come effetti della xilazina sovrastino quelli eccitatori indotti dalla ketamina (Sulli J. Popilskis *et al.*, 1997).

Quindi è probabile che, nel nostro studio, nei soggetti dopo l'intossicazione siano ancora più evidenti gli effetti conseguenti all'azione ipotensiva della xilazina.

Recentemente, i Ricercatori del National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) hanno riscontrato, mediante tomografia ad emissione di

RISULTATI E DISCUSSIONE

positroni (PET), che i pazienti umani affetti da malattia di Parkinson presentano una diminuzione a livello cardiaco del numero delle terminazioni nervose norepinefrina-rilascianti.

Questo ritrovamento ha suggerito che la malattia di Parkinson nell'uomo sia molto più di una patologia cerebrale associata alla perdita di neuroni dopamina secernenti: essa può essere causata da un'anomalia che colpisce il sistema nervoso nella sua totalità, compreso il sistema nervoso simpatico (Goldestein DS., 2000).

Nei pazienti umani affetti da malattia di Parkinson, infatti, l'ipotensione ortostatica, il mancato controllo della termoregolazione e del sistema genitourinario suggeriscono un'insufficienza del sistema nervoso autonomo; proprio la perdita delle terminazioni nervose simpatiche a livello cardiaco sembra essere la causa dell'ipotensione ortostatica (Martignoni E. *et al.*, 2006). Questa disfunzione del sistema nervoso autonomo, influenzando l'abilità a rispondere alla ipovolemia e alla vasodilatazione, può anche determinare una potenziale instabilità emodinamica anestesiológica e perioperatoria (Goldestein DS., 2000).

4.c APPARATO RESPIRATORIO

FREQUENZA RESPIRATORIA E CO₂ ESPIRATA

Durante l'intera durata della procedura diagnostica, la frequenza respiratoria del gruppo 1 ha evidenziato un andamento relativamente costante, mantenendosi su valori compresi tra i 23 e i 35 atti/minuto, con una frequenza respiratoria media di 29,64 (\pm 5,24) atti/minuto (Grafico 21) e CO₂ espirata media di 38,37 (\pm 5,25) % (Grafico 22).

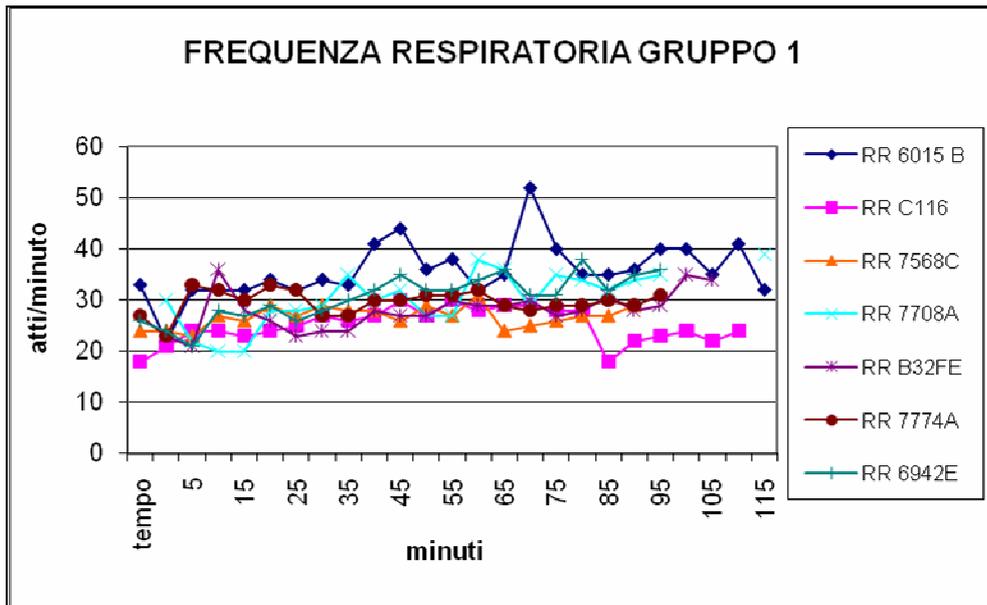


Grafico 21 Andamento frequenza respiratoria dei singoli soggetti del gruppo 1.

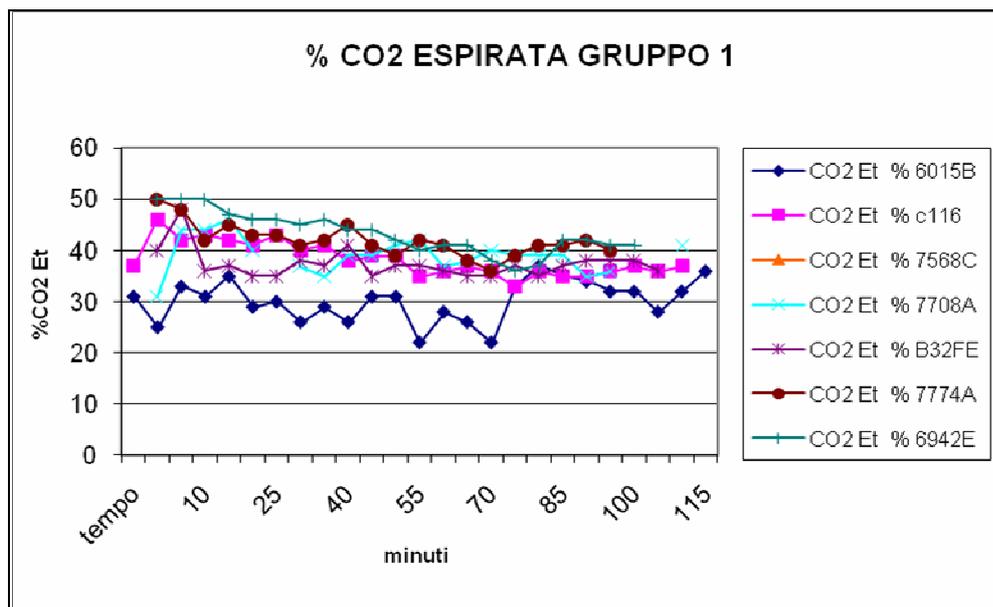


Grafico 22 Andamento della %CO2 espirata dei singoli soggetti del gruppo 1.

Analizzando il grafico 21 sull'andamento della frequenza respiratoria dei singoli soggetti da sani, si possono osservare in particolare due aumenti della frequenza respiratoria dell'animale con numero di riconoscimento 6015B, rispettivamente al minuto 50 e 80, in concomitanza a segni clinici quali tosse e ammiccamento.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Tali manifestazioni sono state acquisite dall'anestesista quali sintomi di superficializzazione del piano anestesiológico del paziente, ed è stata somministrata in entrambe le occasioni una dose anestetica suppletiva, che ha comportato una diminuzione della frequenza respiratoria e la contemporanea scomparsa sia dell'ammiccamento che del riflesso tossigeno.

Dobbiamo inoltre ricordare che tutti gli animali venivano preventivamente intubati e, in respirazione spontanea, inspiravano ossigeno al 100%; quindi, la loro frequenza respiratoria non veniva influenzata da possibili alterazioni nella concentrazione di tale parametro (es. stati di ipossia), che potrebbe eventualmente determinare la stimolazione dei chemiorecettori (vedi discussione del confronto tra i gruppi).

Il gruppo 2 ha avuto frequenza respiratoria media di 24,34 ($\pm 7,39$) atti/minuto (Grafico 23), con valori tra i 15 atti/minuto e i 45 atti/minuto, con una maggiore variabilità intragruppo rispetto al gruppo 1. Il gruppo 2 ha inoltre evidenziato una CO₂ espirata media di 37,27($\pm 4,94$) % (Grafico 24).

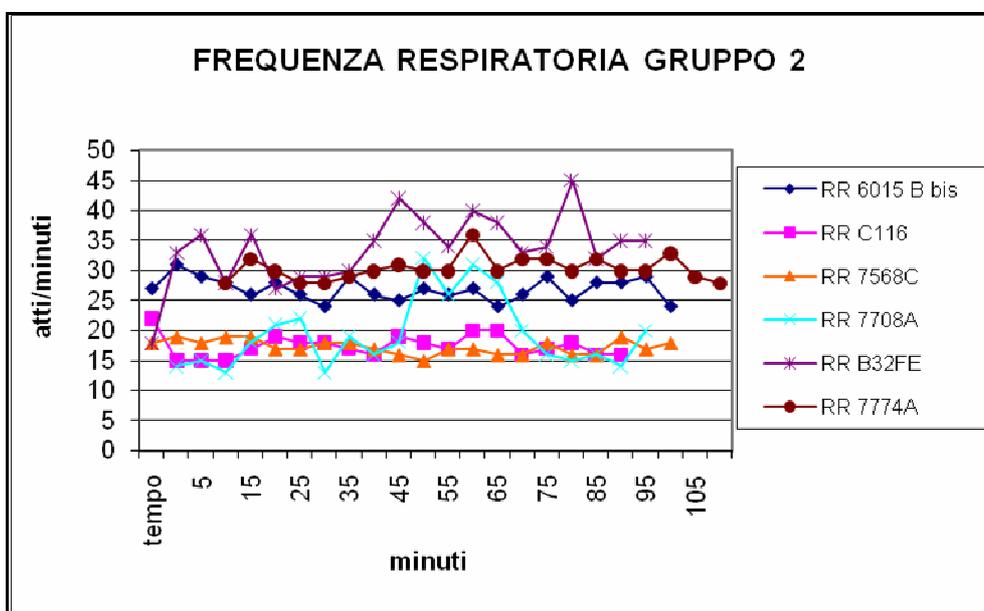


Grafico 23 Andamento frequenza respiratoria dei singoli soggetti del gruppo 2

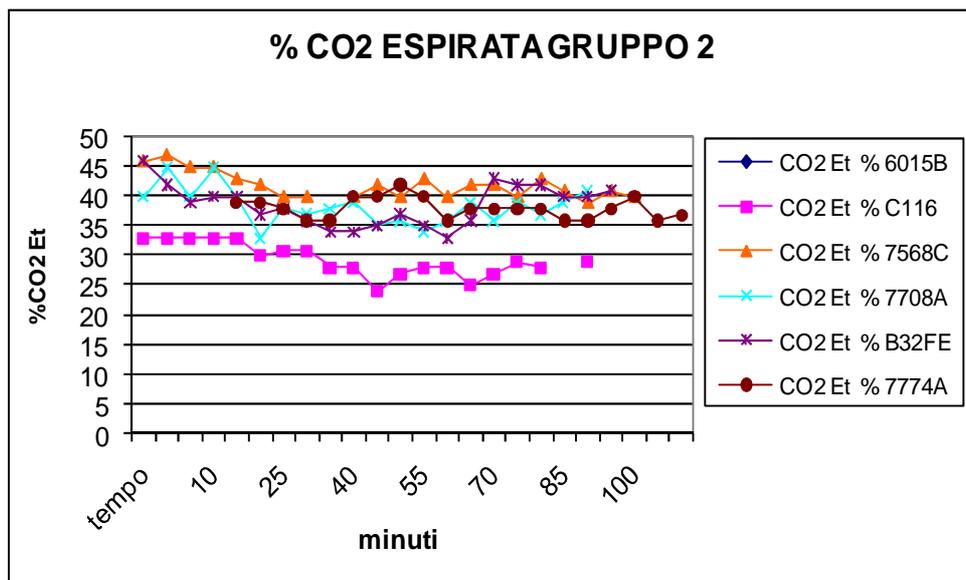


Grafico 24 Andamento CO2 espirata dei soggetti del gruppo 2

Valutando gli andamenti della frequenza respiratoria dei singoli soggetti post-intossicazione si può rilevare come gli animali con il numero di riconoscimento C116 e 7568C siano quelli che presentano i valori più bassi. Dobbiamo ricordare che il soggetto C116 post-intossicazione ha ricevuto numerose dosi anestetiche suppletive (vedi grafico 1), e che queste dosi potrebbero aver determinato una maggiore depressione della frequenza respiratoria.

Il soggetto 7568C riceve invece solamente due dosi anestetiche suppletive, al minuto 40 e 50, durante tutto lo svolgimento della procedura diagnostica: possiamo quindi supporre che in esso sia prevalente l'azione depressante della xilazina, oppure che l'intossicazione possa aver determinato una riduzione della frequenza respiratoria (come successivamente descritto nella discussione del confronto tra i gruppi).

Gli aumenti nel valore di frequenza respiratoria presentati dal soggetto con il numero di riconoscimento 7708A corrispondono ai momenti in cui esso manifestava contemporaneamente dei movimenti della coda. L'anestesista ha quindi ritenuto opportuno somministrare al paziente le dosi anestetichette suppletive, ottenendo una diminuzione della frequenza respiratoria, a significare

RISULTATI E DISCUSSIONE

un approfondimento del piano anestesilogico ma, come già discusso in precedenza, i movimenti della coda sono risultati non rispondenti ai farmaci.

Gli aumenti della frequenza respiratoria del soggetto B32FE, dal minuto 45 al 65, poiché associati a sintomi quali l'ammiccamento, sono stati gestiti con la somministrazione di dosi anestetiche suppletive, ottenendo un approfondimento del piano anestesilogico e la scomparsa dell'ammiccamento. Il picco presentato al minuto 85, invece, non è stato accompagnato da altre manifestazioni di superficializzazione del paziente e non ha perciò richiesto ulteriori somministrazioni suppletive.

Anche in questo caso tutti gli animali venivano preventivamente intubati e, in respirazione spontanea, inspiravano ossigeno al 100% per evitare la comparsa di possibili stati ipossici.

Come si può evincere dal grafico 24, i soggetti dopo intossicazione con MPTP hanno avuto un andamento relativamente costante della CO₂ espirata, con valori compresi tra 34% e 41,50%, eccetto il singolo soggetto C116, che si differenzia dal gruppo per valori inferiori (la discussione è ripresa nel paragrafo del confronto tra i gruppi).

CONFRONTO TRA I GRUPPI

Gli animali hanno evidenziato una frequenza respiratoria media di base superiore a quella post-intossicazione (tabella 6). Questa differenza tra le medie nella frequenza respiratoria del gruppo 1 e del gruppo 2 è risultata statisticamente significativa nell'elaborazione dei dati mediante T test ($p < 0.0001$).

Calcolato il T test tra le frequenze respiratorie medie del gruppo 1 e del gruppo 2, in ogni tempo della procedura diagnostica, la frequenza respiratoria del gruppo 1 è risultata superiore a quella del gruppo 2 in modo statisticamente significativo per ogni tempo della procedura diagnostica, come si può valutare dal seguente grafico (Grafico 25).

RISULTATI E DISCUSSIONE

SOGGETTO	FREQUENZA RESPIRATORIA MEDIA BASALE (Atti/minuto)	FREQUENZA RESPIRATORIA MEDIA POST MPTP (Atti/minuto)
C116	25,04 (\pm 3,41)	17,45 (\pm 1,88)
7568C	26,80 (\pm 2,09)	17,32 (\pm 1,17)
7774A	29,67 (\pm 2,39)	30,38 (\pm 1,96)
7708A	30,48 (\pm 5,40)	19,35 (\pm 5,80)
B32FE	28,05 (\pm 3,82)	33,67 (\pm 5,81)
6015B	35,84 (\pm 5,57)	26,91 (\pm 1,90)
6942E	30,62 (\pm 4,35)	
GRUPPO	29,64 (\pm 5,24)	24,34 (\pm 7,39)

Tabella 6 Valori medi della frequenza respiratoria allo stato basale e dopo intossicazione dei singoli soggetti e dei due gruppi. Dati espressi come media \pm D.S.

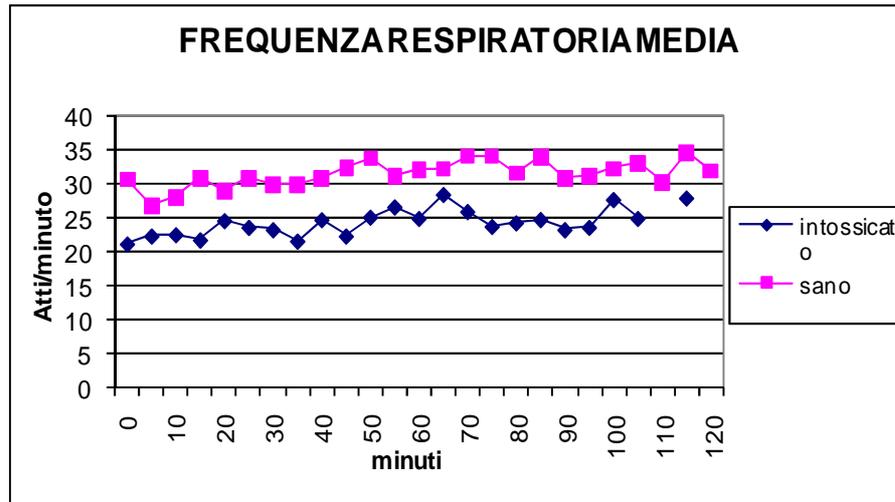


Grafico 25 Andamento della frequenza respiratoria media di base (gruppo 1) e dopo intossicazione (gruppo 2) misurata ogni 5 minuti.

Gli animali, da sani, hanno avuto una CO₂ espirata media superiore a quella post-intossicazione (tabella 7), ma la differenza tra le medie della CO₂ espirata tra i due gruppi non è risultata statisticamente significativa all'elaborazione dei dati mediante T test ($p = 0.1056$).

Calcolato il T test per confrontare soggetti sani e dopo intossicazione, questo andamento è confermato non essere statisticamente significativo in ogni tempo della procedura diagnostica, come si può valutare dal seguente grafico (Grafico 26).

RISULTATI E DISCUSSIONE

SOGGETTO	%CO ₂ ESPIRATA MEDIA BASALE	%CO ₂ ESPIRATA MEDIA POST MPTP
C116	38,33 (± 3,25)	29,37 (± 2,79)
7568C	Non registrata	41,95 (± 2,25)
7774A	41,95 (± 3,24)	38,05 (± 1,76)
7708A	39,10 (± 3,49)	38,35 (± 3,12)
6015B	30,16 (± 4,06)	Non registrata
B32FE	37,32 (± 2,88)	38,57 (± 3,47)
6942E	43,29 (± 4,08)	
GRUPPO	38,37 (± 5,25)	37,27 (± 4,94)

Tabella 7 Valori medi della percentuale di CO₂ espirata allo stato basale e dopo intossicazione dei singoli soggetti e dei due gruppi. Dati espressi come media ± D.S.

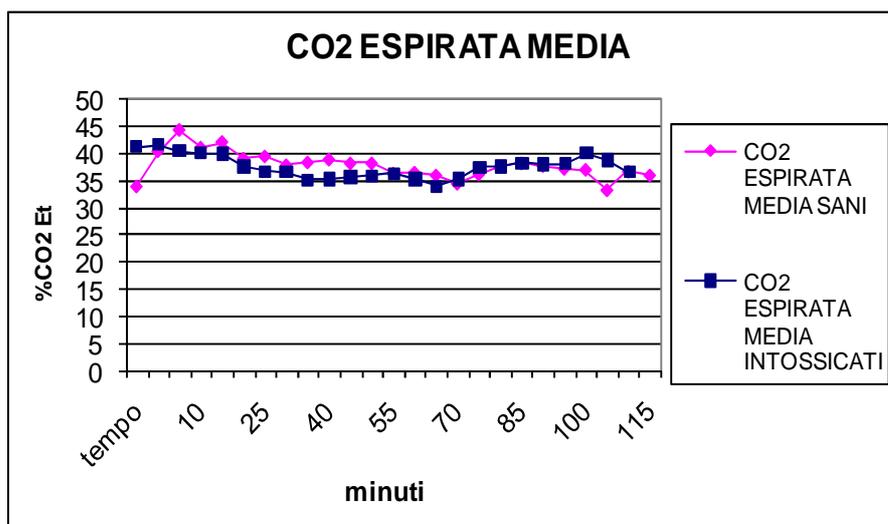


Grafico 26 Andamento della CO2 espirata media di base (gruppo1) e dopo intossicazione (gruppo2) misurata ogni 5 minuti.

In base ai dati appena esposti, abbiamo riscontrato una diminuzione della frequenza respiratoria nei soggetti intossicati, similmente a quanto può avvenire nei soggetti umani parkinsoniani.

Ricordiamo che la ketamina non deprime significativamente l'attività respiratoria e, pur riducendo il volume tidalico, non inibisce i riflessi di iperventilazione all'ipossia o all'ipercapnia, ed è dotata di potere broncodilatatore (Booth NH. e Mc Donald LC., 1991).

La xilazina è in grado di diminuire la frequenza respiratoria, contestualmente ad un incremento del volume tidalico polmonare, che permette di mantenere relativamente costanti la ventilazione alveolare ed i valori dei gas presenti nel sangue arterioso (Lumb and Jones', 2007).

Anomalie respiratorie sono state riscontrate in pazienti umani con malattia di Parkinson fin dalla scoperta della malattia nel 1817, e prima dell'avvento dell'uso della levodopa erano proprio i problemi respiratori che più di ogni altro conducevano alla morte i pazienti parkinsoniani (Hoehn MM. e Yahr MD., 1967).

Uno degli aspetti patogenetici della malattia di Parkinson è la disfunzione del sistema nervoso autonomo, dovuta principalmente alla perdita di neuroni dopaminergici nella pars compacta della sostanza nigra (SNpc), nel mesencefalo dorsale e in altri nuclei pigmentati del tronco encefalico (come il

RISULTATI E DISCUSSIONE

Locus Coeruleus); questa disfunzione può provocare una diminuzione del controllo della funzione respiratoria, nonché altre alterazioni di tipo restrittivo della capacità ventilatoria (Severn A.M., 1988).

Dal punto di vista neurologico, infatti, la funzione respiratoria è determinata dall'attività di neuroni localizzati sia nel midollo allungato, parte inferiore principale del tronco encefalico, che nel ponte, porzione del tronco encefalico che collega il midollo allungato al mesencefalo (Aguggini G. *et al.*, 1992).

Nel nostro studio, i soggetti vengono intossicati mediante la somministrazione della tossina MPTP, in grado di provocare la distruzione dei nuclei della base, i quali esercitano una funzione di controllo e di regolazione dell'attività motoria volontaria, involontaria e dell'attività tonica muscolare (Aguggini G. *et al.*, 1992). E' probabile perciò che nella difficoltà motoria causata dalla patologia vengano coinvolti anche i muscoli dell'apparato respiratorio: la diminuzione della frequenza respiratoria riscontrata nei soggetti dopo intossicazione può essere quindi dovuta ad un'alterazione del controllo dell'attività motoria ad essa correlata, o al maggiore effetto dell'azione depressante sul respiro della xilazina.

Fisiologicamente, la frequenza e l'ampiezza degli atti respiratori sono regolati in risposta a diversi fattori e stimoli dell'organismo: la profondità dell'inspirazione dipende da quanto velocemente il centro respiratorio del midollo allungato stimola i muscoli respiratori, la frequenza dell'inspirazione è determinata da quanto a lungo il centro inspiratorio è attivo.

Molti fattori regolati dal centro inspiratorio midollare possono modificare la frequenza e l'ampiezza respiratoria di base; i più importanti sono: i livelli di diossido di carbonio, di ossigeno e di ioni idrogeno nel sangue arterioso. Le oscillazioni di tali parametri sono percepite da chemiorecettori, localizzati nel midollo e nei grandi vasi del collo (Tierney D., 1998).

Nel nostro studio, però, tutti i soggetti venivano intubati, mantenuti in respirazione spontanea e inspiravano ossigeno al 100%; quindi, tale parametro e la conseguente possibile stimolazione dei chemiorecettori non veniva modificato tra l'animale da sano e dopo intossicazione, senza condizionare la differenza nella frequenza respiratoria riscontrata.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I muscoli laringei intrinseci e la maggior parte degli altri muscoli che circondano le prime vie respiratorie sono quasi sempre coinvolti nei movimenti involontari caratteristici della malattia di Parkinson.

Proprio la disfunzione delle prime vie respiratorie costituisce un fattore importante, che porta alla ritenzione delle secrezioni, ad atelettasia, a fenomeni di aspirazione involontaria, con conseguenti infezioni respiratorie, che si riscontrano frequentemente nei pazienti umani con malattia di Parkinson.

Altre potenziali complicazioni includono il laringospasmo post estubazione e l'insufficienza respiratoria postoperatoria (Nicholson G. *et al.*, 2002).

Nel nostro studio non si sono verificati i possibili sintomi a livello delle prime vie respiratorie, poiché tutti i soggetti venivano preventivamente intubati, proprio per garantire il mantenimento di una buona ventilazione durante l'intera procedura diagnostica.

Nel corso del presente studio è stato inoltre valutato l'andamento della frequenza respiratoria e della CO₂ espirata nei sei soggetti, prima da sani e poi da intossicati; in alcuni pazienti non erano però disponibili dati confrontabili a riguardo della CO₂ espirata.

Osservando i grafici, si può notare come sia quasi sempre superiore la frequenza respiratoria nel soggetto da sano (Grafici 27-29-30-31), salvo due eccezioni: il soggetto B32FE (Grafico 33), dove la frequenza respiratoria è superiore post-intossicazione, e il soggetto 7774A (Grafico 35), dove i valori si sovrappongono in diversi punti. Nella valutazione della CO₂ espirata, tranne nel soggetto C116 (Grafico 28), non si rilevano variazioni significative dei valori tra il soggetto da sano e successivamente l'intossicazione (Grafico 32-34-36).

Dobbiamo ricordare che la sola valutazione della frequenza, quale parametro per valutare la funzionalità respiratoria, non è completamente sufficiente; bisognerebbe infatti poterla correlare anche ad altri parametri, quali ad esempio la profondità degli atti respiratori, il volume tidale, ecc. (Afshar F.S. *et al.*, 2005).

La misurazione della CO₂ espirata rappresenta un metodo efficace, che può determinare la capacità e l'adeguatezza della ventilazione.

Nei soggetti dopo intossicazione, nonostante si verifichi una diminuzione della frequenza respiratoria, considerando che inspiravano ossigeno al 100%, non

RISULTATI E DISCUSSIONE

abbiamo rilevato un'alterazione significativa negli scambi gassosi; solamente il soggetto con numero di riconoscimento C116 ha presentato una minore percentuale di CO₂ espirata, facendo presupporre un ristagno di aria e un possibile aumento della capacità respiratoria residua.

Nei pazienti umani con la malattia di Parkinson la frequenza del coinvolgimento del sistema respiratorio è in genere superiore a quella normalmente percepita da un punto di vista clinico, e la disfunzione respiratoria rimane una delle maggiori cause di morte nei pazienti umani (Sathyaprabha TN. *et al.*, 2005).

Anche se la dispnea non è una complicazione frequente nei pazienti umani con malattia di Parkinson, è sicuramente ben documentato che le anomalie della funzione respiratoria sono molto comuni (Mikaelee H. *et al.*, 2007).

Proprio questi riferimenti bibliografici ci hanno indotto ad intubare i nostri pazienti, anche per poter gestire eventuali complicanze respiratorie tipiche della malattia.

Nei pazienti umani il quadro del coinvolgimento polmonare probabilmente non viene rilevato durante la progressione della patologia, anche perché la disabilità fisica che accompagna la malattia di Parkinson porta il paziente a condurre spesso una vita sedentaria, limitandone le attività fisiche che metterebbero in evidenza i sintomi respiratori.

Uno studio dimostra però che le anomalie nella funzione polmonare esistono nei pazienti con malattia di Parkinson anche in assenza di sintomi respiratori: è stato rilevato un quadro ostruttivo con anomalie ventilatorie nel 52% dei pazienti, consistente in un difetto ventilatorio ostruttivo, in una limitazione del flusso di aria e in un ristagno di aria, come evidenziato da una capacità respiratoria residua >120% del valore normale (Mikaelee H. *et al.*, 2007).

Precedenti ricerche avevano invece indicato che le anomalie nella funzione polmonare erano causate da un aumento nell'attività parasimpatica (Obenour WH *et al.*, 1972), e altri studi hanno dimostrato una restrizione polmonare per la bassa compliance della parete toracica, secondaria alla rigidità della parete toracica, quale principale causa della difficoltà respiratoria nei pazienti di malattia di Parkinson (Sathyaprabha TN. *et al.*, 2005).

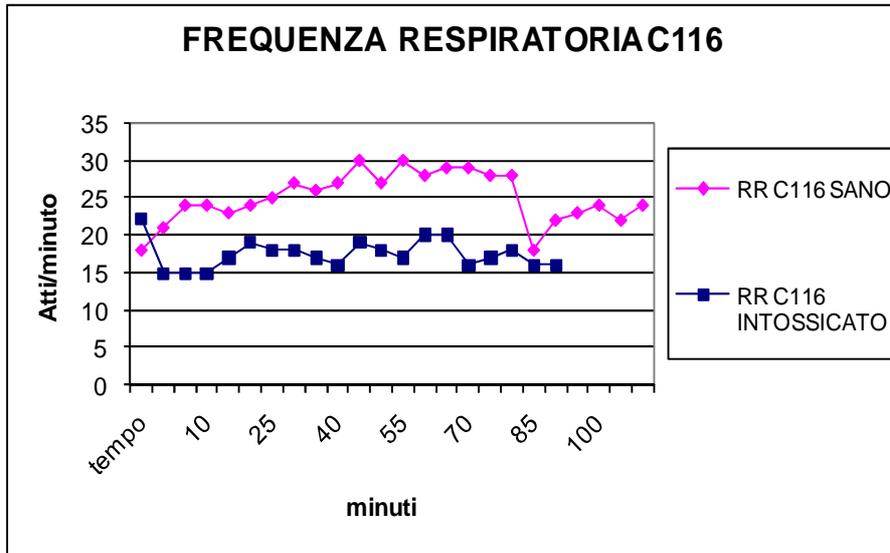


Grafico 27 Confronto dell'andamento della frequenza respiratoria di base e dopo intossicazione del soggetto C116

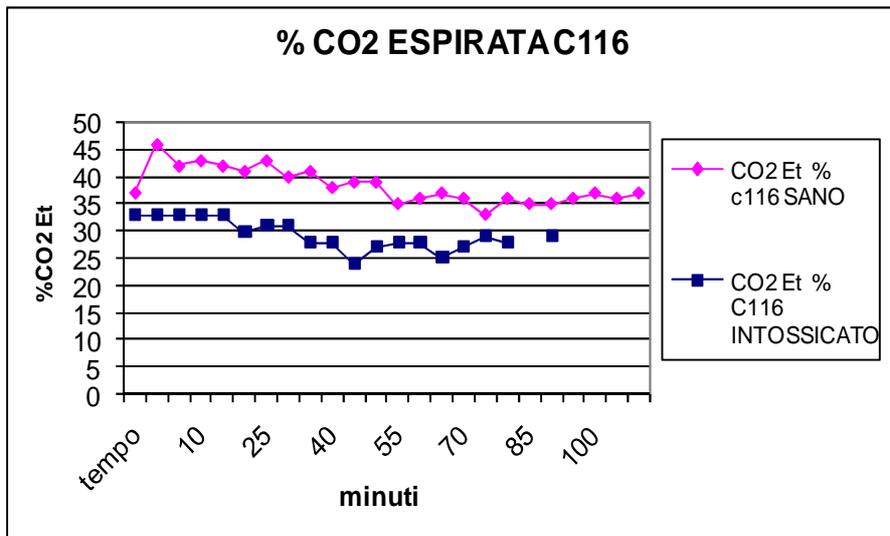


Grafico 28 Confronto dell'andamento della %CO2 espirata di base e dopo intossicazione del soggetto C116

RISULTATI E DISCUSSIONE

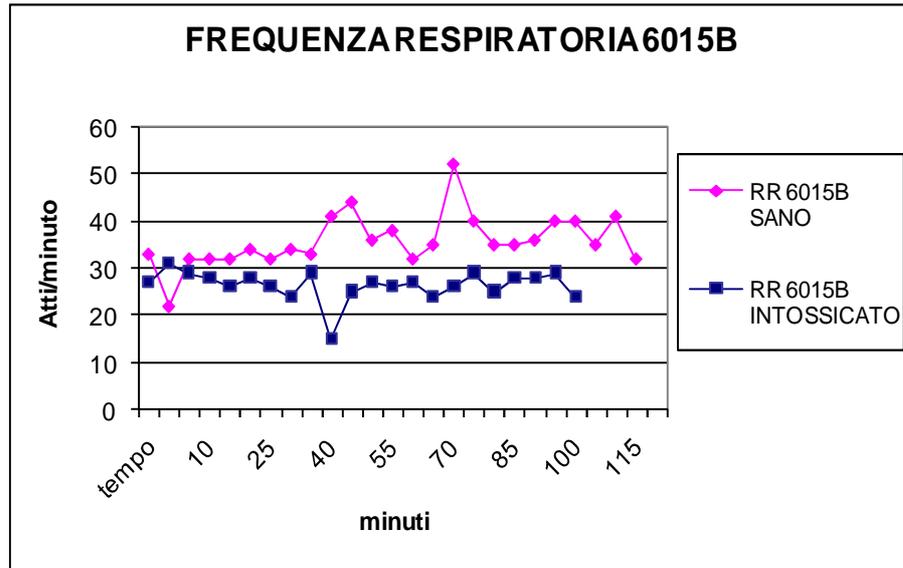


Grafico 29 Confronto dell'andamento della frequenza respiratoria di base e dopo intossicazione del soggetto 6015B

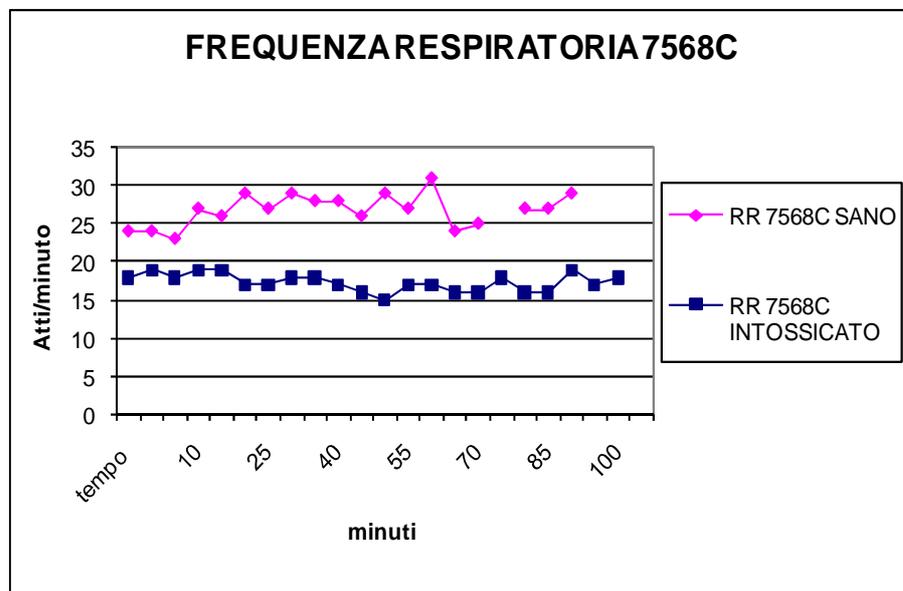


Grafico 30 Confronto dell'andamento della frequenza respiratoria di base e dopo intossicazione del soggetto 7568C

RISULTATI E DISCUSSIONE

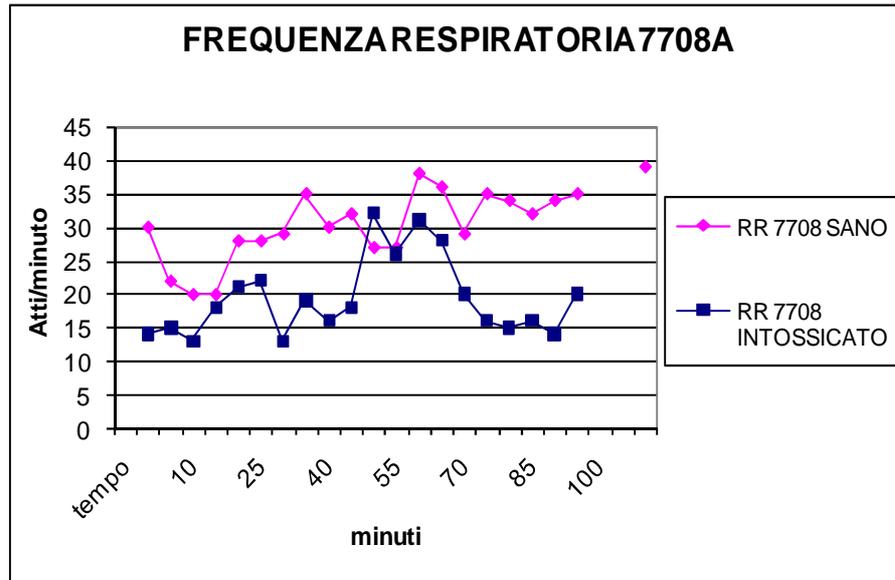


Grafico 31 Confronto dell'andamento della frequenza respiratoria di base e dopo intossicazione del soggetto 7708A

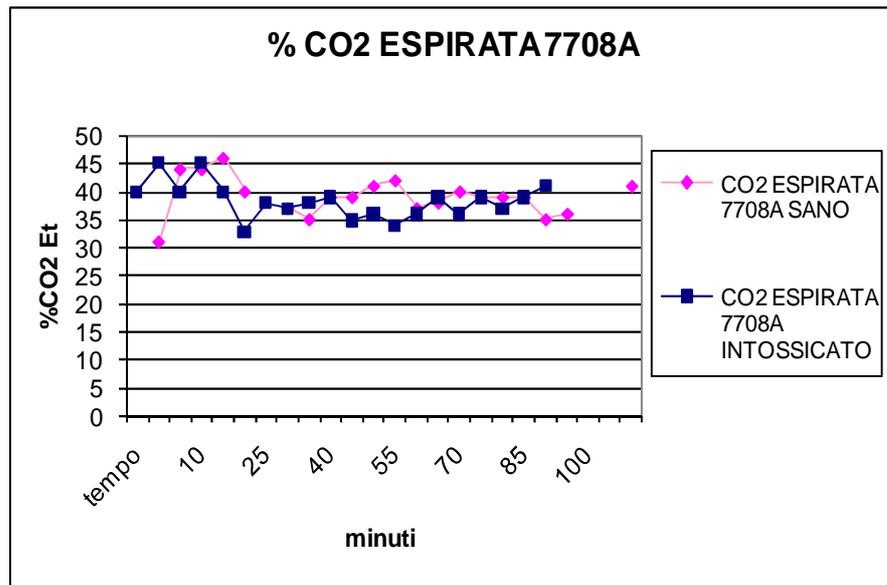


Grafico 32 Confronto dell'andamento della %CO2 espirata di base e dopo intossicazione del soggetto 7708A

RISULTATI E DISCUSSIONE

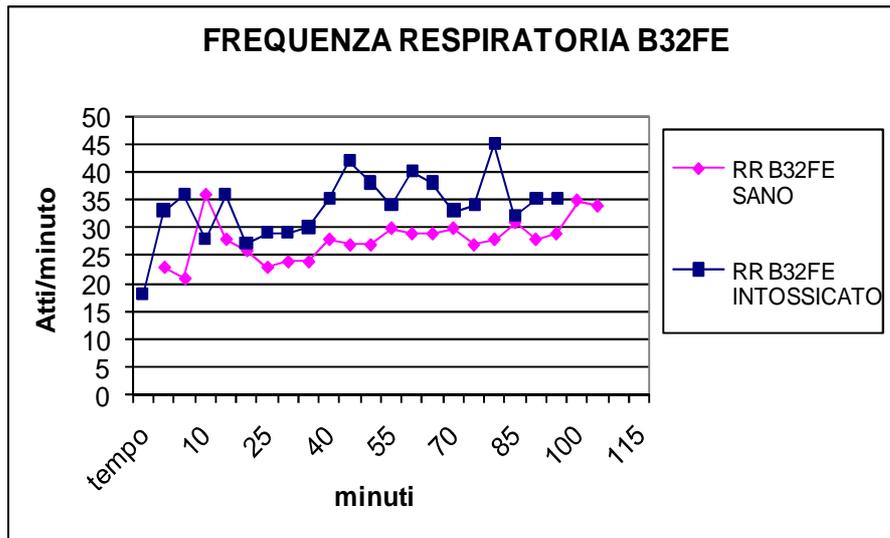


Grafico 33 Confronto dell'andamento della frequenza respiratoria di base e dopo intossicazione del soggetto B32FE

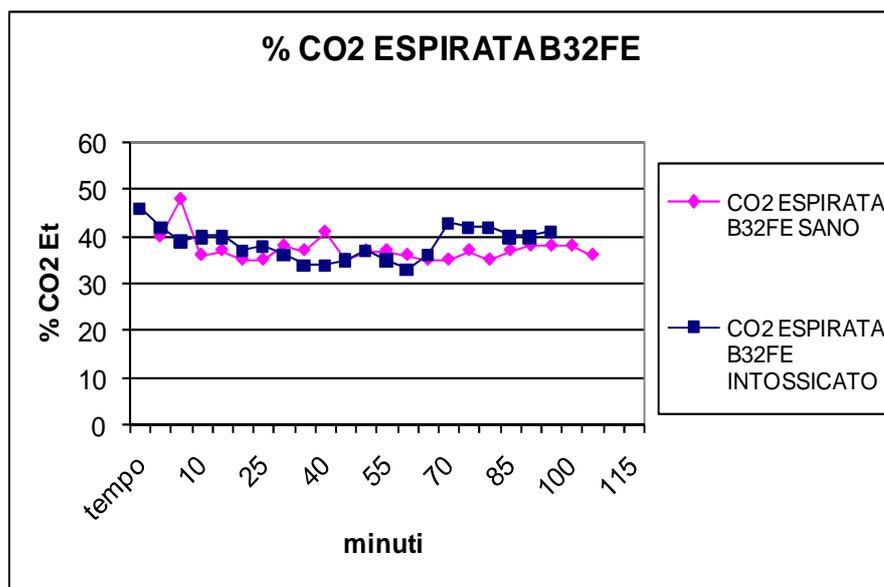


Grafico 34 Confronto dell'andamento della %CO2 espirata di base e dopo intossicazione del soggetto B32FE

RISULTATI E DISCUSSIONE

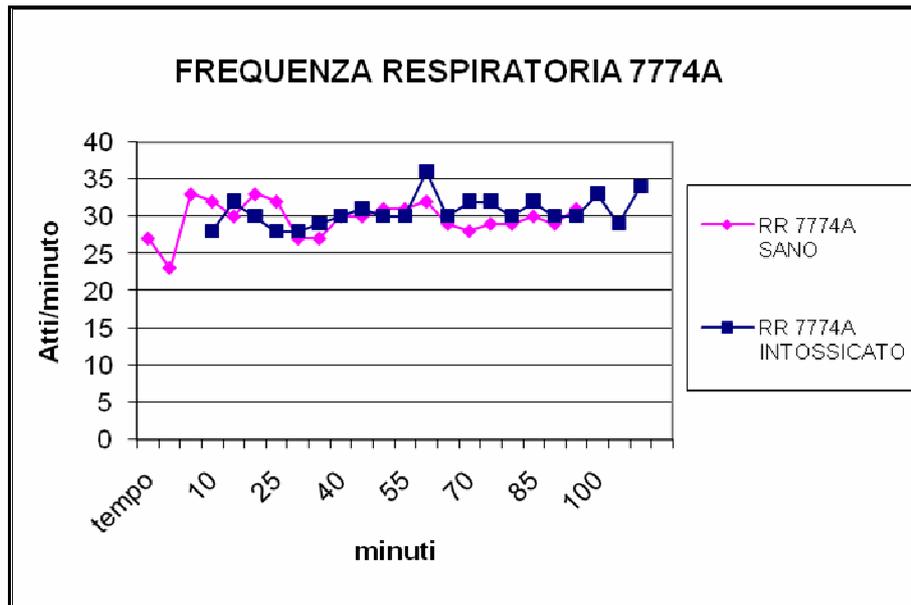


Grafico 35 Confronto dell'andamento della frequenza respiratoria di base e dopo intossicazione del soggetto 7774A

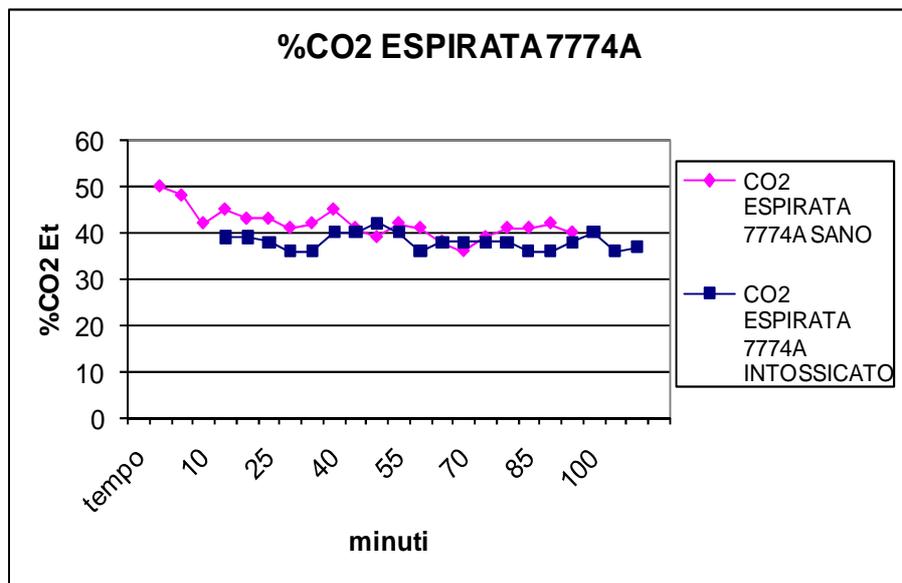


Grafico 36 Confronto dell'andamento della %CO2 espirata di base e dopo intossicazione del soggetto 7774A

4.d VALUTAZIONE DEI SOGGETTI DEL GRUPPO 3

I dati anestesiológicos registrati dei tre soggetti, dopo un tempo medio di 187,67 ($\pm 25,03$) giorni dallo xenotrapianto neuronale, riguardano: la durata della procedura diagnostica, la somministrazione delle dosi anestetiche suppletive, la frequenza cardiaca e respiratoria.

A causa della limitatezza dei dati disponibili, non è stato possibile effettuare un'analisi statistica, ma si è voluto comunque esaminare graficamente quelli a nostra disposizione, in particolar modo comparandoli ai valori raccolti per gli stessi soggetti da sani e post-intossicazione.

La durata media della procedura diagnostica dei tre soggetti dopo lo xenotrapianto è stata di 110 ($\pm 8,16$) minuti, mentre era durata 106,67 ($\pm 11,55$) e 106,67 ($\pm 7,64$) minuti rispettivamente allo stato basale e dopo intossicazione con MPTP.

Dopo aver subito lo xenotrapianto neuronale gli animali hanno ricevuto un numero medio di dosi anestetiche suppletive pari a 2,67 ($\pm 2,08$), mentre avevano ricevuto da sani e dopo intossicazione rispettivamente un numero medio di dosi suppletive pari a 2 ($\pm 1,73$) e 3,33 ($\pm 2,31$).

Nel grafico 37 viene rappresentato il numero medio delle dosi anestetiche suppletive somministrate ai soggetti da sani, dopo intossicazione e dopo lo xenotrapianto neuronale, per garantire una adeguata profondità del piano anestesiológico durante l'esecuzione della procedura diagnostica.

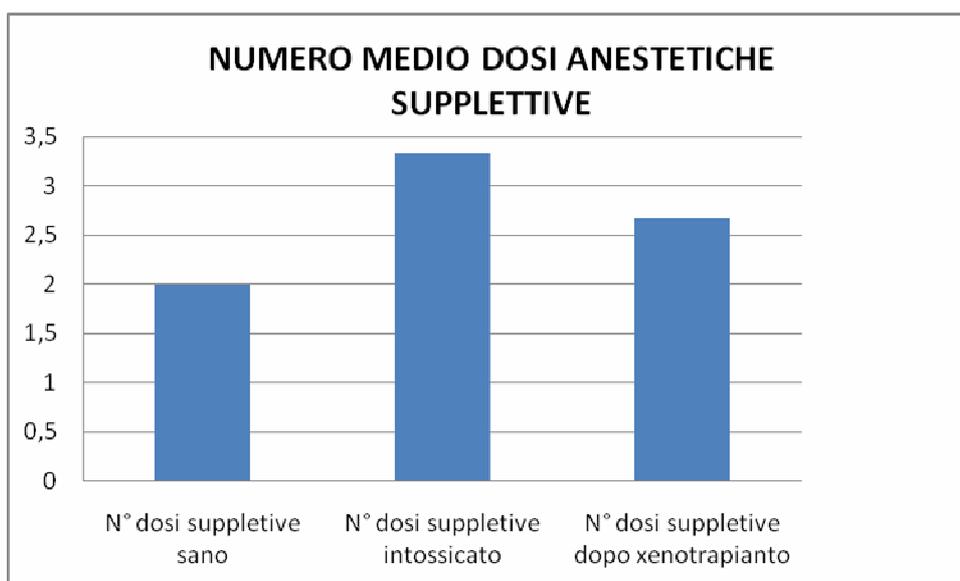


Grafico 37 numero medio delle dosi anestetiche suppletive somministrate ai tre soggetti da sano, post-intossicazione e dopo lo xenotrapianto neuronale

Come si può osservare dal grafico 37, dopo lo xenotrapianto i soggetti ricevono un numero inferiore di dosi anestetiche suppletive rispetto a dopo l'intossicazione con MPTP.

Durante la gestione del protocollo anestesiológico nei soggetti dopo il trattamento chirurgico, infatti, in particolar modo nel soggetto con numero di riconoscimento C116, si è potuto osservare che erano scomparsi quei tremori involontari che si erano manifestati dopo l'intossicazione, e che erano stati interpretati dall'anestesista quale segnale di superficializzazione del paziente.

Valutando nello specifico il soggetto C116, dopo lo xenotrapianto esso riceve un numero di dosi anestetiche suppletive decisamente inferiori rispetto a dopo l'intossicazione (grafico 38), poichè non presentava più quei tremori della mano sinistra e della coda che aveva invece manifestato dopo l'intossicazione e che si erano dimostrati addirittura non responsivi alla somministrazione delle sei dosi anestetiche suppletive.

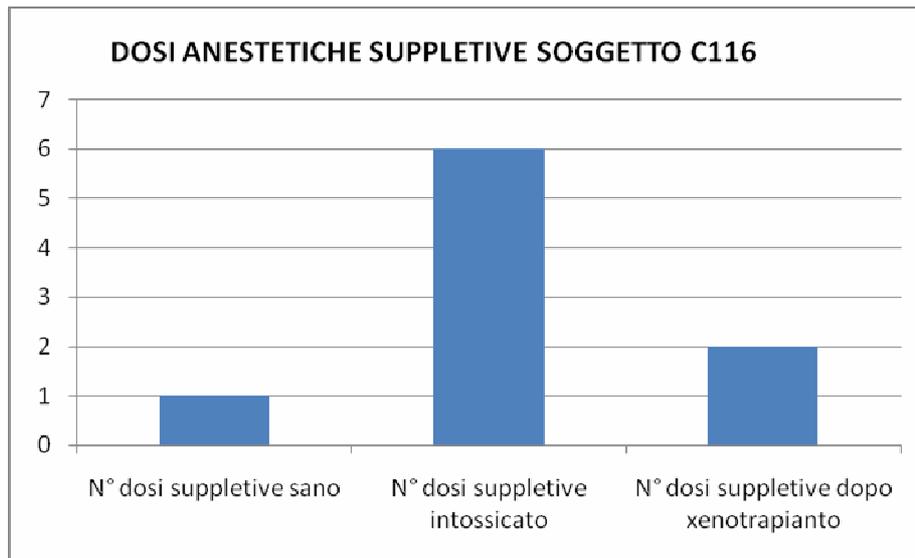


Grafico 38 numero dosi anestetiche suppletive somministrate al soggetto C116 da sano, post-intossicazione e dopo lo xenotrapianto neuronale

Abbiamo quindi ipotizzato che il recupero neuronale ottenuto grazie allo xenotrapianto, evidenziabile anche dalle immagini PET, abbia migliorato la sintomatologia similparkinsoniana sviluppata dal primate e che i tremori sviluppati dopo l'intossicazione con MPTP fossero realmente involontari, per questo non correlabili al piano anestesilogico.

Sono stati inoltre valutati i tempi medi della somministrazione delle singole dosi anestetiche suppletive nei soggetti dopo xenotrapianto con quelli degli stessi soggetti da sani e dopo intossicazione (Grafico 39).

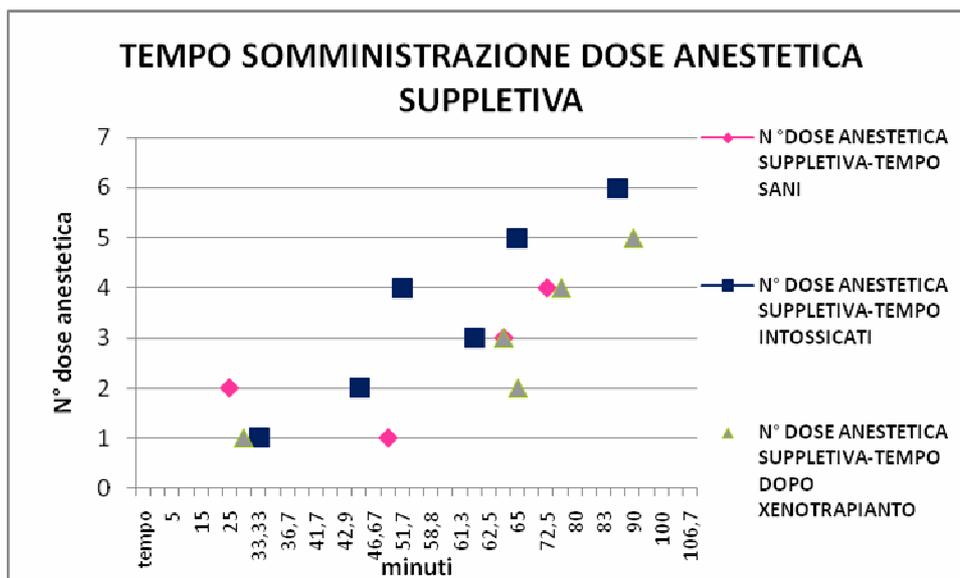


Grafico 39 Tempo medio di somministrazione delle dosi anestetiche suppletive nei tre soggetti da sani, dopo intossicazione e dopo xenotrapianto neuronale.

Come si può osservare dal grafico 39, gli animali, tranne per quanto riguarda le prime due dosi, dopo lo xenotrapianto hanno ricevuto la dose anestetica suppletiva ad intervalli di tempo similari a quando sani, facendo supporre che in essi i farmaci somministrati riacquistino una durata d'azione comparabile a quella allo stato basale.

I tre primati appartenenti al gruppo 3 hanno presentato una frequenza cardiaca media di 111,30 ($\pm 4,0$) battiti/min.; gli stessi soggetti sani e dopo intossicazione avevano evidenziato un frequenza cardiaca media rispettivamente di 87,09 ($\pm 22,59$) e 123,20 ($\pm 19,18$) battiti al minuto (vedi tabella 8).

RISULTATI E DISCUSSIONE

SOGGETTO	FREQUENZA CARDIACA MEDIA BASALE (Battiti/minuto)	FREQUENZA CARDIACA MEDIA POST-MPTP (Battiti/minuto)	FREQUENZA CARDIACA MEDIA DOPO XENOTRAPIANTO (Battiti/minuto)
C116	59,87 (± 4,54)	112,60 (± 16,96)	128,95 (± 4,01)
7568C	93,70 (± 6,59)	111,14 (± 9,24)	107,28 (± 3,71)
7774A	110,62 (± 8,18)	143,96 (± 6,49)	99,56 (± 11,77)
GRUPPO	87,09 (± 22,59)	123,20 (± 19,18).	111,30 (± 4,0)

Tabella 8 Valori medi della frequenza cardiaca allo stato basale, dopo intossicazione e dopo xenotrapianto neuronale di ciascuno dei tre primati e del gruppo formato da questi tre soggetti.

Dati espressi come media ± D.S.

Confrontando l'andamento della frequenza cardiaca dei soggetti dopo il trapianto con quello relativo agli stessi animali da sani e da intossicati (Grafico 40) si può valutare come questa, successivamente al trapianto, mantenga valori e andamento similare a quello dopo intossicazione.

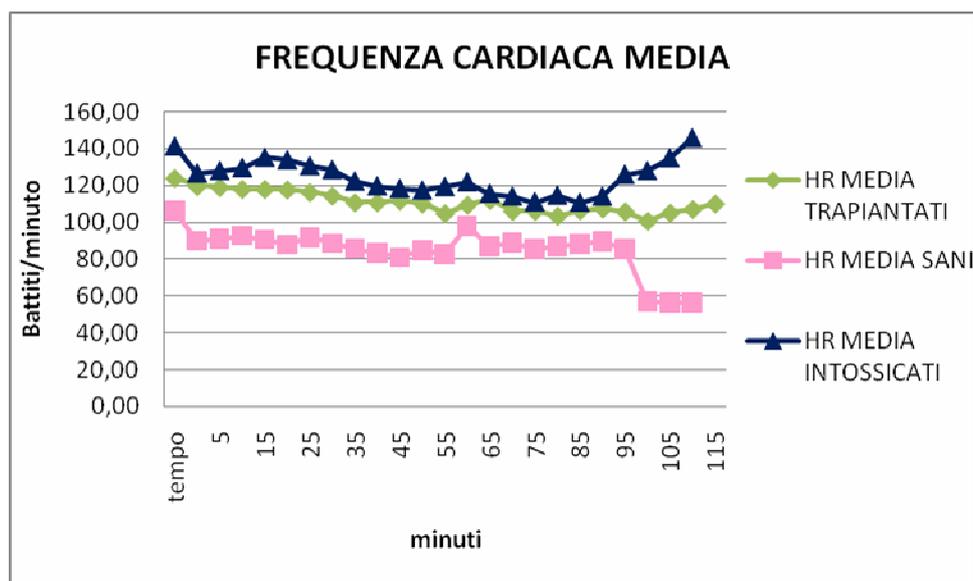


Grafico 40 Andamento della frequenza cardiaca media dei soggetti di base, dopo intossicazione e dopo xenotrapianto.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Gli animali, dopo lo xenotrapianto, hanno evidenziato dei valori più elevati della frequenza cardiaca, come già discusso per il periodo post intossicazione, rispetto a quando sani; purtroppo, non ne sono stati registrati i relativi valori pressori, utili alla valutazione della permanenza o meno dello stato ipotensivo. Abbiamo quindi ipotizzato che tali valori aumentati della frequenza cardiaca rispetto ai dati di base siano giustificabili unicamente col prevalere dell'azione cardiostimolante della ketamina sull'effetto depressante della xilazina.

Gli animali, dopo lo xenotrapianto neuronale, hanno mostrato una frequenza respiratoria media di 25,96 ($\pm 3,53$) atti/minuto, e una CO₂ espirata media di 43 ($\pm 5,52$)%.

Gli stessi animali hanno presentato una frequenza respiratoria media di 27,26 ($\pm 3,61$) e una CO₂ espirata media di 39,97 ($\pm 3,69$) quando sani, e una frequenza respiratoria media di 21,71 ($\pm 6,4$) e una CO₂ espirata media di 36,67 ($\pm 5,73$) dopo intossicazione con MPTP (tabelle 9 e 10).

SOGGETTO	FREQUENZA RESPIRATORIA MEDIA BASALE (Atti/minuto)	FREQUENZA RESPIRATORIA MEDIA POST MPTP (Atti/minuto)	FREQUENZA RESPIRATORIA MEDIA DOPO XENOTRAPIANTO (Atti/minuto)
C116	25,04 ($\pm 3,41$)	17,45 ($\pm 1,88$)	27,05 ($\pm 4,07$)
7568C	26,80 ($\pm 2,09$)	17,32 ($\pm 1,17$)	24,67 ($\pm 3,81$)
7774A	29,67 ($\pm 2,39$)	30,38 ($\pm 1,96$)	26,30 ($\pm 2,18$)
GRUPPO	27,26 ($\pm 3,61$)	21,71 ($\pm 6,4$)	25,96 ($\pm 3,53$)

Tabella 9 Valori medi della frequenza respiratoria allo stato basale, dopo intossicazione e dopo xenotrapianto neuronale di ciascuno dei tre primati e del gruppo formato da questi tre soggetti.

Dati espressi come media \pm D.S.

RISULTATI E DISCUSSIONE

SOGGETTO	%CO ₂ ESPIRATA MEDIA BASALE	%CO ₂ ESPIRATA MEDIA POST MPTP	%CO ₂ ESPIRATA MEDIA POST TRAPIANTO
C116	38,33 (± 3,25)	29,36 (± 2,79)	50,55 (± 1,90)
7568C	Non registrata	41,95 (± 2,25)	37,76 (± 1,61)
7774A	41,95 (± 3,24)	38,05 (± 1,76)	42,13 (± 1,77)
GRUPPO 3	39,97 (± 3,69)	36,67 (± 5,73)	43 (± 5,52)

Tabella 10 Valori medi della percentuale di CO₂ espirata allo stato basale, dopo intossicazione e dopo xenotrapianto neuronale di ciascuno dei tre primati e del gruppo formato da questi tre soggetti. Dati espressi come media ± D.S.

Confrontando l'andamento della frequenza respiratoria media dei soggetti dopo il trapianto con quelli relativi agli stessi animali da sani e da intossicati (Grafico 41) si può notare come, dopo lo xenotrapianto neuronale, essi riacquistino una frequenza respiratoria con andamento e valori intermedi tra i soggetti da sani e dopo intossicazione.

Questo incremento della frequenza respiratoria, che dopo intossicazione aveva evidenziato dei valori più bassi, può significare che, in seguito allo xenotrapianto neuronale, i soggetti abbiano recuperato parte del controllo motorio anche nei muscoli collegati alla respirazione.

RISULTATI E DISCUSSIONE

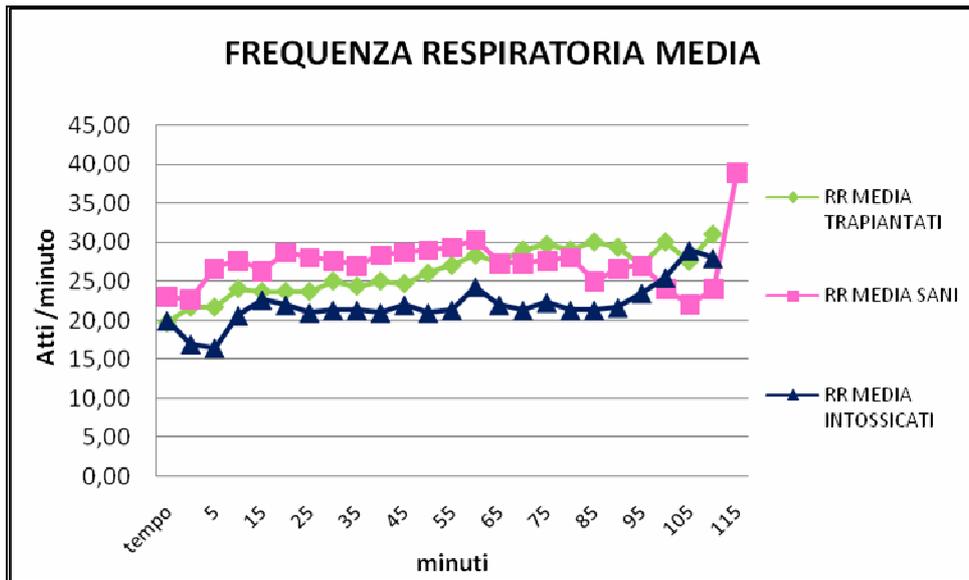


Grafico 41 Andamento della frequenza respiratoria media dei tre soggetti di base, dopo intossicazione e dopo xenotrapianto.

Abbiamo inoltre valutato l'andamento della percentuale di CO₂ espirata media nei soggetti dopo lo xenotrapianto, mettendola in relazione a quella degli stessi animali da sani e dopo intossicazione (grafico 42).

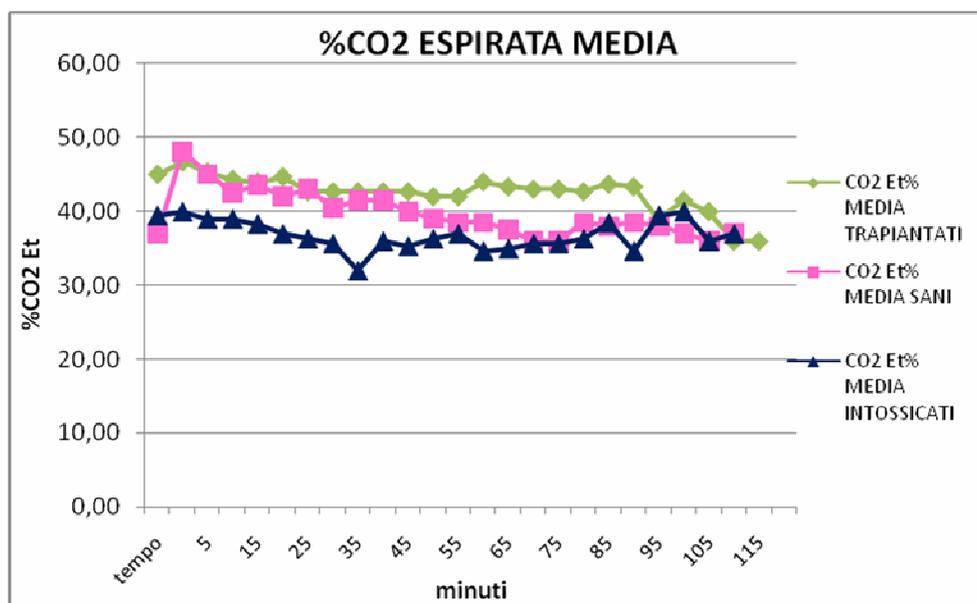


Grafico 42 Andamento della % di CO₂ espirata media dei soggetti di base, dopo intossicazione e dopo xenotrapianto.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Come si può osservare dal grafico 42, in seguito allo xenotrapianto neuronale i soggetti presentano una percentuale di CO₂ espirata con valori simili, ma in media superiori, a quelli osservati quando sani. E' ipotizzabile, quindi, che nei soggetti, dopo il trattamento chirurgico, si manifesti maggiormente l'effetto depressante a livello respiratorio delle dosi anestetiche suppletive somministrate; queste, determinando una diminuzione del volume tidalico, provocano una conseguente riduzione degli scambi gassosi, con un aumento della percentuale di CO₂ espirata. E' quindi plausibile pensare che l'aumento della frequenza respiratoria, riscontrata nei soggetti dopo lo xenotrapianto, possa derivare anche in risposta all'aumento della CO₂.

Abbiamo valutato nello specifico l'andamento della CO₂ espirata nel soggetto con numero di riconoscimento C116 (Grafico 43) poiché esso, dopo essere stato intossicato, oltre ad una diminuzione della frequenza respiratoria è risultato l'unico ad evidenziare una minore percentuale di CO₂ espirata. Questo ci aveva fatto supporre un possibile ristagno di aria e un aumento della capacità respiratoria residua a livello polmonare, similmente a quanto può avvenire nei pazienti umani con malattia di Parkinson (Mikaelee H. *et al.*, 2007).

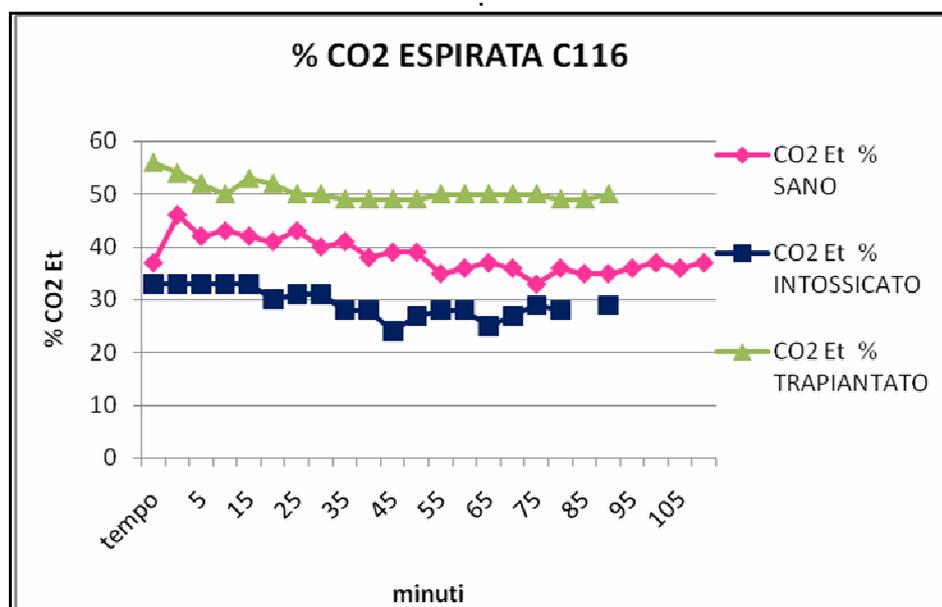


Grafico 43 Andamento della % di CO₂ espirata del soggetto C116 di base, dopo intossicazione e dopo xenotrapianto.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Come si può osservare dal grafico 42, dopo lo xenotrapianto neuronale il soggetto C116 presenta un aumento della percentuale di CO₂ espirata con valori decisamente superiori a quelli presentati da sano. Anche questi dati si possono interpretare come conseguenza del maggiore effetto depressante a livello respiratorio delle due dosi anestetiche suppletive somministrategli dopo lo xenotrapianto che, determinando una diminuzione del volume tidalico del soggetto, provocano un incremento della percentuale di CO₂ espirata.

Per quanto dal punto di vista statistico possano essere scarsamente significativi, poichè riferiti a tre soli soggetti, questi dati risultano comunque interessanti poichè denotano come, grazie al trattamento chirurgico mediante lo xenotrapianto di cellule neuronali, i pazienti sembrano manifestare un parziale recupero nel controllo delle funzionalità motoria e respiratoria.

SEZ.5- CONCLUSIONI

I numerosi miglioramenti fatti nella comprensione e nel trattamento della malattia di Parkinson si possono ricondurre direttamente alla scoperta e alla determinazione di diversi agenti implicati nella sua patogenesi, fattori biologici (invecchiamento), tossici (6-idrossidopamina (6-OHDA) e 1-metil-4 fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP)) e fattori genetici (animali transgenici), proprio grazie all'utilizzo di modelli animali sperimentali in vivo (Collier TJ. *et al.*, 2003).

Sicuramente, tra i modelli sperimentali, quelli utilizzando i primati MPTP-indotti costituiscono lo strumento chiave nello studio della patofisiologia e nella realizzazione di nuove strategie terapeutiche, atte a contrastare la malattia di Parkinson; essi sono uno strumento fondamentale nelle ricerche che riguardano il trapianto di cellule dopaminergiche (Redmond DE. Jr., 2002), la terapia trofica e la neuroprotezione (Emborg EM. *et al.*, 2007).

Sulla scia di questi filoni di ricerca, l'attuale sperimentazione sulla malattia di Parkinson, di cui il nostro studio fa parte, utilizzando come modello sperimentale i primati, ha come obiettivo quello di ottenere maggiori conoscenze sui processi riguardanti la patogenesi della malattia e sulla funzionalità dello xenotrapianto di cellule fetali neuronali suine.

L'esame diagnostico utilizzato nel nostro studio, la tomografia ad emissione di positroni con l'utilizzo di F18L-6 fluorodopa, risulta indicato per la misurazione dell'integrità della struttura striatale dopaminergica nei pazienti umani normali, in pazienti sofferenti di parkinsonismo idiopatico o di altre forme di parkinsonismo e nei primati (Pate BD. *et al.*, 1991).

Per permettere la completa esecuzione della procedura diagnostica, evitando quanto più possibile fenomeni stressanti, i primati sono stati sottoposti ad anestesia generale. L'obiettivo di questo studio era proprio quello di valutare le possibili differenze nella risposta anestesiológica, utilizzando il medesimo protocollo, in uno stesso gruppo di primati da sani, dopo essere stati intossicati con MPTP e (anche se in soli 3 soggetti fino ad ora) dopo xenotrapianto neuronale.

Tutto questo al fine di ottenere un miglioramento attivo nel livello del benessere degli animali utilizzati nella sperimentazione, riducendo il più possibile il dolore

CONCLUSIONI

presente o potenziale, lo stress e gli altri effetti collaterali (Russell WMS. e Burch RL., 1959) prima, durante e dopo ciascun trattamento sperimentale.

Questo sforzo porta ad un miglioramento della qualità di vita di ciascun animale utilizzato, così come un'ottimizzazione della qualità della ricerca stessa (Vitale e al. 2008).

Bisogna sottolineare innanzitutto che, per quanto riguarda gli ausili bibliografici sull'anestesia di media-lunga durata in *Macaca Fascicularis*, già esigui per gli animali in condizioni fisiologiche, essi sono addirittura inesistenti per i soggetti con induzione di malattia di Parkinson e dopo il successivo xenotrapianto neuronale.

E' possibile invece reperire del materiale riguardante i primati utilizzati in altri studi, ad esempio sulla farmacocinetica e sugli effetti di alcuni farmaci in particolari apparati, oppure sull'associazione di alcuni agenti anestetici.

Per questo, nel discutere i dati ottenuti per i soggetti dopo l'intossicazione ci siamo confrontati con alcuni lavori sull'anestesia in pazienti umani con malattia di Parkinson.

In considerazione della complessità della gestione di un protocollo anestesilogico in corso di malattia di Parkinson e dei dati relativi ai diversi anestetici, molto vari e poco standardizzati, si è pensato di utilizzare l'associazione di ketamina e xylazina, che è risultata essere la più facilmente omologabile.

Nei primati la ketamina ha un ampio margine di sicurezza, ed è il farmaco più comunemente scelto per l'induzione dell'anestesia in condizioni fisiologiche (Winterborn AN. *et al.*, 2008), mentre risulterebbe teoricamente controindicata nei pazienti umani con malattia di Parkinson, poiché in questi ultimi provoca un'esagerata risposta simpatica (Nicholson G. *et al.*, 2002). Non abbiamo invece trovato dati in bibliografia sugli effetti della xilazina nei pazienti con malattia di Parkinson.

Nel complesso, il protocollo utilizzato nella nostra sperimentazione ha soddisfatto sia le esigenze di mantenere un piano anestesilogico costante ed adeguato per lo svolgimento della procedura diagnostica, sia quelle relative alle necessità di tutela del benessere animale senza provocare eventuali

CONCLUSIONI

problematiche cliniche, quali ad esempio fenomeni di apnea o di arresto cardiocircolatorio.

Gli animali non hanno patito nessuno stress in ciascuna delle fasi che ha riguardato la nostra sperimentazione, così come sia l'induzione dell'anestesia che il risveglio sono stati gradualmente e tranquilli, senza il verificarsi di effetti collaterali indesiderati.

L'utilizzo dell'associazione di ketamina e xylazina in premedicazione ha permesso di alleviare pressoché totalmente lo stress a cui gli animali erano sottoposti durante la fase di preparazione alla tomografia.

Particolari problemi anestesilogici che si sarebbero potuti presentare erano quelli di carattere neurologico, respiratorio e cardiovascolare.

Durante lo svolgimento del nostro studio abbiamo potuto osservare che, come avviene nel paziente umano con la malattia di Parkinson, dopo l'intossicazione con MPTP alcuni soggetti hanno sviluppato una forma clinica ipercinetica, dominata prevalentemente dal tremore. In questi soggetti il protocollo anestesilogico utilizzato, in particolare la ketamina, nonostante la somministrazione di dosi suppletive, non è stato in grado di controllare questi movimenti involontari (prevalentemente agli arti anteriori e coda), imputabili ad un danno neurologico simil parkinsoniano a livello dei nuclei della base.

Nonostante le differenze della funzionalità cardio-respiratoria che abbiamo riscontrato tra i soggetti prima e dopo l'induzione della malattia, durante la gestione del protocollo anestesilogico non si sono in alcun modo manifestati episodi di gravità tale da poter mettere in pericolo la vita degli animali.

Abbiamo riscontrato che gli animali dopo intossicazione presentano una frequenza cardiaca superiore mentre pressione arteriosa sistolica, diastolica e media inferiore rispetto a quelle basali.

L'aver riscontrato una diminuzione della pressione arteriosa nei soggetti intossicati sottolinea l'importanza nel fornire un sostegno alla funzione circolatoria, mediante l'utilizzo di fluidoterapia durante l'intero svolgimento del protocollo anestesilogico.

Va però ricordato che non è stato possibile effettuare, in nessuna fase della sperimentazione, un monitoraggio costante e preciso della pressione arteriosa

CONCLUSIONI

diretta; i dati riportati sono quindi approssimativi, scarsamente affidabili, ed utilizzabili solo per valutare il trend pressorio.

Sicuramente, dai dati raccolti nel corso del nostro studio risulta che i soggetti dopo intossicazione riducono significativamente la loro frequenza respiratoria e, così come riportato in bibliografia a riguardo dei pazienti umani con malattia di Parkinson, necessitano di particolare attenzione per quanto concerne la funzionalità respiratoria.

Tutti i soggetti erano stati comunque preventivamente intubati e, in respirazione spontanea, hanno inspirato ossigeno al 100%, dal momento dell'induzione dell'anestesia fino al momento dell'estubazione. Questo ha impedito, soprattutto nei soggetti intossicati, che si creassero fenomeni ipossici, vista anche la significativa riduzione della frequenza respiratoria. La bradipnea, riscontrata nei soggetti post-intossicazione, non ha comportato una variazione statisticamente significativa della CO₂ espirata, dimostrando che la somministrazione di ossigeno al 100% per via orotracheale ha supportato una capacità ventilatoria potenzialmente inalterata dopo l'intossicazione.

Anche gli accorgimenti adottati per far fronte alla dispersione termica si sono rivelati essere pienamente efficaci.

Per quanto statisticamente poco significativi, poiché riferiti a tre primati che al momento della stesura del presente lavoro erano stati sottoposti anche a xenotrapianto neuronale, i dati ottenuti dopo il trattamento chirurgico sono risultati comunque interessanti poiché hanno evidenziato, in particolar modo, un significativo recupero della funzionalità motoria e probabilmente anche del controllo della capacità respiratoria compensatoria dei soggetti.

L'analisi dei dati raccolti in questo studio evidenzia alcune importanti variazioni nelle risposte anestesilogiche dei primati sottoposti alle diverse fasi della ricerca, fornendo informazioni preziose per la gestione anestesilogica futura di soggetti della stessa specie impiegati in sperimentazioni affini.

Il protocollo analizzato, infatti, potrebbe essere ulteriormente perfezionato e migliorato. La misurazione della pressione arteriosa potrebbe venir effettuata utilizzando un apparecchio eco-doppler portatile, in grado di ottenere dati più affidabili e continui; tale monitoraggio potrebbe così fornire importanti elementi sulla funzione cardiocircolatoria, utili alla sperimentazione stessa. Esiste tuttavia

CONCLUSIONI

una problematica tecnica da non sottovalutare nella messa in pratica di tale rilevazione, in quanto l'operatore dovrebbe rimanere esposto alle radiazioni emesse dall'isotopo tracciante utilizzato nella tomografia per l'intera durata della procedura.

Un'altra modifica possibile è l'utilizzo del propofol come agente anestetico. Il propofol dovrebbe essere in grado di controllare gli eventuali tremori muscolari involontari che si sono dimostrati non responsivi al protocollo del presente studio. Dai dati riportati in bibliografia, infatti, il propofol sui pazienti umani con malattia di Parkinson produce effetti inibitori, portando addirittura all'abolizione totale del tremore, tanto da esserne sconsigliato l'utilizzo nelle procedure stereotattiche (Nicholson G. *et al.*, 2002).

Ringraziamenti:

- al mio stimatissimo Prof. Roberto Busetto, che mi ha dato la possibilità di partecipare ad un progetto così importante ed interessante, per la sua estrema disponibilità;
- alla Dott.ssa Giulia Maria De Benedictis, che si è sempre dimostrata essere un valido punto di riferimento, per il suo ineguagliabile aiuto;
- al Prof. Massimo Morgante, per la sua grande disponibilità ed il sostegno fornitomi in tutti questi anni di ricerca;
- allo staff del CORIT, che mi ha supportato con estrema professionalità e gentilezza;
- allo staff dell'Azienda Ospedaliera di Padova, dell'Azienda Ospedaliera di Rovigo e l'equipe del Prof. Philippe Hantraye, per avermi concesso di partecipare e collaborare a questo progetto di ricerca, accogliendomi con grande disponibilità e gentilezza.

BIBLIOGRAFIA

1. Afshar F.S., Baniadam A., Marashipour S.P. *Effect of xilazine-ketamine on arterial blood pressure, arterial blood Ph, blood gases, rectal temperature, heart and respiratory rates in goats*. Bull.Vet Inst Pulawy. (2005). 49, p.481-484.
2. Aguggini G., Beghelli V., Giulio LF. *Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia*. UTET. 1992.
3. Allam MF., Del Castillo AS., Navajas RF. *Parkinson's disease risk factors: Genetic, enviromental, or both?*. Neurol Res. (2005), 7, p.206-208.
4. Almirall H., Pigarev I., de la Calzada M., Pigareva M., Herrero MT., Sagales T. *Nocturnal sleep structure and temperature slope in MPTP treated monkeys*. J. Neural Transm. (1999), 106, p.1125-1134.
5. Andersen AH., Zhang Z., Barber T., Rayens WS., Zhang J., Grondin R., Hardy P., Gerhardt GA., Gash DM. *Functional MRI studies in awake rhesus monkeys: Methodological and analytical strategies*. J Neurosci Methods. (2002), 118, p. 141-152.
6. Arnsten AF., Cai JX., Steere JC., Goldman-Rakic PS. *Dopamine D2 receptor mechanisms contribute to age-related cognitive decline: The effects of quinpirole on memory and motor performance in monkeys*. J Neurosci. (1995), 15, p. 3429-3439.
7. Arthur J.R., Curtis E.T. *Use of Primates as Behavioral Research Subjects*. In *Methods of Animal Experimentation*, volume III, ed.da Gray W.I. Accademic Press. (1968), p.81-121.
8. Barcia C., Bautista V., Sanchez-Bahillo A., Fernandez-Villalba E., Navarro-Ruis JM., Barreiro AF. Poza YP., Herrero MT. *Circadian determinations of cortisol, prolactin and melatonin in chronic methyl-phenyl-tetrahydropyridine-treated monkeys*. Neuroendocrin. (2003), 78, p 118-128.
9. Barcia C., Sanchez-Bahillo A., Fernandez-Villalba E., Bautista V., Poza Y., Poza M., Fernandez-Barreiro A., Hirsch EC., Herrero MT. *Evidence of*

BIBLIOGRAFIA

- active microglia in substantia nigra pars compacta of parkinsonian monkeys 1 year after MPTP exposure.* *Glia.* (2004), 46, p.402-429.
10. Bezard E., Brotchie JM., Gross CE. *Pathology of levodopa-induced dyskinesia: Potential for new therapies.* *Nat Rev Neurosci.* (2001), 2, p.577-588.
 11. Bhattacharya PS. *Effect of Ketamine as an anesthetic in Rhesus Monkey.* *Indian Veterinary Journal.* (1993), 70,8, p.771-772.
 12. Bjorklund A, Dunnett SB, Brundin P, Stoessl AJ, Freed CR, Breeze RE et al. *Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease.* *Lancet Neurol.* (2003), 2, p. 437–445.
 13. Blandini F. (Internet) *Ruolo dei modelli sperimentali nello studio della malattia di Parkinson e dei parkinsonismi.* Lab Neurochim.Funz.Istit.Neurolog.Pavia. 2005. <http://www.limpe.it/2004/relazioni/pag%5B1%5D.%2022.pdf>. (accesso effettuato il 16 marzo 2009).
 14. Booth NH., Mc Donald LE. *Farmacologia e terapeutica veterinaria.* Ed. EMSI,1991.
 15. Braak H., Braak E. *Pathoanatomy of Parkinson's disease.* *J. Neurology,* (2000), 247:II, p. 3-10.
 16. Brooks DJ. *PET and SPECT studies in Parkinson's disease.* *Baillieres Clin Neurol.,* (1997), 6, p.69-87.
 17. Brownell AL., Jenkins BG., Elmaleh DR., Deacon TW., Spealman RD., Isacson O. *Combined PET/MRS brain studies show dynamic and long-term physiological changes in a primate model of Parkinson disease.* *Nat. Med.,* (1998), 4, p.1308-1312.
 18. Brunetti L. (Internet) *Catecolamine.* 2006. farmacia.unich.it/farmacologia/didattica/tox/amfetaminacocaina.pdf. (accesso effettuato il 23 ottobre 2008).
 19. Buhler L., Friedman T., Iacomini J., Cooper D.K.C. *Xenotransplantation: state of the art.* *Frontieres In Bioscience,* (1999), 4, p. 416-432.
 20. Burger C., Gorbatyuk O., Velardo MJ., Williams W. Peden C., Williams I., Zolotukhin S., reier P., Mandel R., Muzyczka N. *Recombinant AAV viral vectors with viral capsids from serotypes 1,2 and 5 display differential*

BIBLIOGRAFIA

- efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. Mol. Therapy, (2004),10, p.302-317.*
21. Busetto R., Iacopetti I., Isola M., De Benedictis G.M., Michielan F., Corletto F. *Anestesia in Macaca Fascicularis in corso di Xenotrapianto di rene: risultati preliminari. Atti VIII Congresso Nazionale S.I.C.V., 2001.*
 22. Capitanio JP., Emborg ME. *The use of nonhuman primates in neuroscience research. Lancet (In Press), 2007.*
 23. Cass WA., Grondin R., Andersen AH., Zhang Z., Hardy PA., Hussey-Andersen LK., Rayens WS., Gerhardt GA., Gash DM. *Iron accumulation in the striatum predicts aging-related decline in motor function in the rhesus monkeys. Neurobiol. Aging., (2007), 28, p. 258-271.*
 24. Chen YC., Choi JK., Andersen SL., Rosen BR., Jenkins BG. *Mapping dopamine D2/D3 receptor function using pharmacological magnetic resonance imaging. Psychopharm., (2005), 180, p.705-715.*
 25. Cittadini G. *Diagnostica per immagini e radioterapia. Genova, ECIG, 2002.*
 26. CNBB (Comitato Nazionale per la biosicurezza e le biotecnologie). *Linee guida per la sperimentazione clinica degli xenotrapianti. Pres. Cons.Min., 2002, p. 9-16.*
 27. Collier TJ., Steece-Collier Kathy, Kordower Jeffrey H. *Primate models of Parkinson's disease. Experimental Neurology, (2003),183, p.258-262.*
 28. Collier TJ., Lipton J., Daley BF., Palfi S., Chu Y., Sortwell C., Bakay RA., Sladek JR Jr., Kordower JH. *Aging-related changes in the nigrostriatal dopamine system and the response to MPTP in nonhuman primates: Diminished compensatory mechanisms as a prelude to parkinsonism. Neurobiol. Dis., (2007), 26, p.56-65.*
 29. Comini A. (Internet). *Sperimentazione animale e primati non umani: il ruolo del veterinario. 2006. www.sivemp.it/_uploadedFiles/.../10_sperimentazione61_78.pdf - (accesso effettuato il 9 marzo 2009).*
 30. Corbellini G. (Internet). *Gli animali donatori di organi da destinare all'uomo. I risvolti etici degli xenotrapianti partendo dallo stato attuale della ricerca scientifica in materia. 2001. Dip.Informazione e*

- Relaz.pubbl.Farindustria. SCIENZA. 3.2.
www.farindustria.it/pubblico/sci003.pdf (accesso effettuato il 3 Aprile 2009)
31. Corletto F. *Gli alfa2 agonisti:chi sono e cosa fanno?*. 53^{ra} Intern. Cong. Ital. Ass. Companion Animal Vet., 2006.
 32. Deacon TW., Pakzaban P., Burns LH., Dinsmore J., Isacson O. *Cytoarchitectonic development, axon-glia relationships, and long distance axon growth of porcine striatal xenografts in rats*. Exp. Neurol., (1994), 130, p.151-67.
 33. Davis TL. *Disorders of thermoregulation in Parkinson's disease*. In: Ebadi M., Pfeiffer RF., eds. Parkinson's Disease. New York: CRC Press., 2005, p.319-322.
 34. Davis GC., Williams AC., Markey SP., Ebert MH., Caine ED., Reichert CM., Kopin IJ. *Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues*. Psychiatry Res., (1979), 1, p. 249-254.
 35. De Jesus OT., Endres CJ., Shelton SE., Nickles RJ., Holden JE. *Noninvasive assessment of aromatic L-amino acid decarboxylase in aging rhesus monkey brain in vivo*. Synapse, (2001), 39, p. 58-63.
 36. DeLong MR. *Primate models of movement disorders of basal ganglia origin*. Trends Neurosci., (1990), 13, p. 281-285.
 37. Di Monte DA. (Internet). 2007. *Modelli sperimentali di fattori di rischio nella malattia di Parkinson*. The Parkinson's Inst,California. www.limpe.it/2006/relazioni/testo%2010.pdf (accesso effettuato il 23 marzo 2009).
 38. Doudet DJ., Wyatt RJ., Cannon-Spoor E., Suddath R., McLellan CA., Coehn RM. *6-F18 Fluoro-L-DOPA and Cerebral Blood Flow in Unilaterally MPTP-Treated Monkeys*. Jour. Neural. Transp.& Plasticity, (1993), Vol.4 (1), p. 27-38.
 39. Ebadi M., Sharma S., Shevali S., El Rfaey H. *Neuroprotective actions of selegiline*. J. Neurosci. Res., (2002), 67, p. 285-289.
 40. Eberling JL., Bankiewicz KS., O'Neil JP., Jagust WJ. *PET 6- F18 fluoro-L-m-tyrosine studies of dopaminergic function in human and non human primates*. Front. in Human Neurosci., (2008),1,9, p.1-5.

BIBLIOGRAFIA

41. Edge AS., Gosse ME., Dinsmore J. *Xenogeneic cell therapy: current progress and future developments in porcine cell transplantation*. Cell Transplant., 1998, p. 525-39.
42. Eidelberg D., Moeller JR., Ishikawa T., Dhawan V., Spetsieris P., Chaly T., Belakhlef A., Mandel F., Przedborski S., Fahn S. *Early differential diagnosis of Parkinson's disease with 18F-fluorodeoxyglucose and positron emission tomography*. Neurology, (1995), 45, p.1995-2004.
43. Emborg EM., Ma SY., Mufson EJ., Levey AI., Taylor MD., Brown WD., Holden JE., Kordower JH. *Age-related declines in nigral neuronal function correlate with motor impairments in rhesus monkeys*. J. Comp. Neurol., (1998), 401, p. 253-265.
44. Emborg ME. *Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies*. J. Neurosci. Methods, (2004),139, p.121-143.
45. Emborg EM. *Nonhuman Primate Models of Parkinson's Disease*, 2007, Vol.48, Number 4.
46. Ehringer H., Hornykiewicz O. *Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system*. Klin. Wochenschr., (1960), 38, p.1236-1239.
47. Fink JS, Schumacher JM, Ellias SL, Palmer EP, Saint-Hilaire M, Shannon K et al. *Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results*. Cell Transplant., (2000), 9, p. 273–8.
48. Fisher L.J., Jinnah, H.A., Kale, L.C., Higgins, G.A. & Gage, F.H. *Survival and function of intrastrially grafted primary fibroblasts genetically modified to produce L-dopa*. Neuron., (1991), 6, p. 371-380.
49. Flecknell PA. *Laboratory Animal Anaesthesia*. Seconda ed. Academy Press inc. San Diego,1996, p. 213-16.
50. Forno LS., DeLanney LE., Irwin L., Langston JW. *Neuropathology of human idiopathic Parkinson's disease*. In: Markey SP.,Castagnoli N., Trevor AJ., and Kopin IJ., eds MPTP:A Neurotoxin Producing a Parkinsonian Syndrome. New York:Academic Press, 1986, p. 119-140.
51. Forno LS., DeLanney LE, Irwin I., Langston JW. *Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's*

BIBLIOGRAFIA

- disease: *Neuropathologic considerations*. Adv. Neurol., (1993), 60, p.600-608.
52. Forno LS. *Neuropathology of Parkinson's disease*. J. Neuropathol. Exp. Neurol., (1996), 55, p. 259.
53. Gerhardt GA., Cass WC., Henson M., Zhang Z., Ovadia A., Hoffer BJ., Gash D. *Age related changes in potassium-evoked overflow of dopamine in the striatum of the rhesus monkey*. Neurobiol. Aging, (1995), 16, p. 939-946.
54. G.I.S.A.L. (Gruppo Internazionale Scienze Animali da Laboratorio). *L'animale da laboratorio. Principi etico-scientifici, tecnici e legislativi* Manuale tecnico. (1991), N°4. O EM F spa .
55. Goetz CG., Poewe W., Rascol O., Sampaio C., Stebbins GT., Counsell C., Giladi N., Holloway RG., Moore CG., Wenning GK., Yahr MD., Seidl L. *Movement Disorder Society Task Force Report on the Hoehn and Yahr Staging Scale: Status and Recommendations*. Movement Disorders, (2004), Vol. 19 No 9, p. 1020-1028.
56. Goldstein DS., Holmes C., Li ST., Bruce S., Metman LV., Cannon R. O III. *Cardiac Sympathetic Denervation in Parkinson's Disease*. Ann. Int. Med., (2000), Vol 133 (5), p. 338-347.
57. Goldstein DS. *Cardiovascular aspects of Parkinson disease*. J. Neural. Transm., (2006), 70, p. 339-342.
58. Grassetto G., Massaro A., Cittadin S., Padoan A., Manara R., d'Avella D., Zampieri P., Marzola M., Rampin L., Banti E., Fante F., De Benedictis G., Cozzi E., Ancona E., Rubello D. *Kinetic of ¹⁸F-DOPA in basal ganglia of non-human primate*. In: Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine: Barcellona, Spagna, 10-14 Ottobre 2009.
59. Gravlee GP. *Succinylcholine-induced hyperkalemia in a patient with Parkinson's disease*. Anesth. Analg., (1980), 59, p. 444-6.
60. Green CJ., Knight J., Precious S., Simpkin S. *Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10 year experience*. Lab. Anim., (1981), 15, p.163-170.

BIBLIOGRAFIA

61. Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A et al. *CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo*. *Nat. Immunol.*, (2002), 3, p.1097–1101.
62. Haake EM, Brown BW, Thompson MR, Venkatesan R. *Magnetic resonance imaging: Physical Principles & Sequence Design*. J Wiley-Liss, 1999.
63. Hardy J., Cai H., Cookson MR., Gwinn-Hardy K., Singleton A. *Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism*. *Ann. Neurol.*, (2006), 60, p. 389-398.
64. Hoehn MM., Yahr MD. *Parkinsonism: onset, progression and mortality*. *Neurology*, (1967), 17, p. 427-442.
65. Hurtig HI. *Problems with current pharmacologic treatment of Parkinson's disease*. *Exp. Neurol.*, (1997), 144, p. 10-16.
66. Imbert C., Bezard E., Guitraud S., Boraud T., Gross CE. *Comparison of eight clinical rating scales used for the assessment of MPTP-induced parkinsonism in the macaque monkey*. *J. Neurosci. Methods*, (2000), 96, p.71-76.
67. Irwin I., Delanney LE, McNeill T., Chan P., Forno LS., Murphy GM Jr, DiMonte DA., Sandy MS., Langston JW. *Aging and the nigrostriatal dopamine system: A non-human primate study*. *Neurodegeneration*, (1994), 3, p. 251-265.
68. Isacson O., Deacon TW., Pakzaban P., Galpern WR., Dinsmore J., Burn LH. *Transplanted xenogeneic neural cells in neurodegenerative disease models exhibit remarkable axonal target specificity and distinct growth patterns of glial and axonal fibres*. *Nat. Med.*, (1995), 1, p. 1189-94.
69. Isacson O. e Breakfield X.O. *Benefits and risks of hosting animal cells in the human brain*. *Nature Med.*, (1997), 3, p. 964-969.
70. Jellinger KA. *Pathology of Parkinson's disease: Changes other than the nigrostriatal pathway*. *Mol. Chem. Neuropathol.*, 1991, p.14:153.
71. Jenkins BG., Sanchez-Pernaute R., Brownell AL., Chen YC., Isacson O. *Mapping dopamine function in primates using pharmacologic magnetic resonance imaging*. *J. Neurosci.*, (2004), 24, p. 9553-9560.

BIBLIOGRAFIA

72. Jonsson G., Sachs C. *Actions of 6-hydroxydopamine quinones on catecholamine neurons*. J. Neurochem., (1975), 25, p. 509-516.
73. Kanaan NM., Kordower JH., Collier TJ. *Age-related accumulation of Marinesco bodies and lipofuscin in rhesus monkey midbrain dopamine neurons: Relevance to selective neuronal vulnerability*. J. Comp. Neurol., (2007), 502, p.683-700.
74. Kaplitt MG e Loewy AD. *Viral Vectors: Gene Therapy and Neuroscience Applications*. San Diego, CA: Academic Press, 1995.
75. Kazumata K., Antonini A., Dhawan V., Moeller JR., Alterman RL., Kelly P., Sterio D., Fazzini E., Beric A., Eidelberg D. *Preoperative indicators of clinical outcome following stereotaxic pallidotomy*. Neurology, (1997), 49, p. 1083-1090.
76. Kish SJ., Shama K., Hornykiewicz O. *Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease: Pathophysiology and clinical implications*. N. Eng. J. Med., (1988), 318, p. 876-880.
77. Konrad F. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 1998.
78. Korell M., Tanner CM. *Epidemiology of Parkinson's disease: An overview*. Ebadi M., Pfeiffer RF., eds. Parkinson's Disease. New York: CRC Press, 2005, p. 39-50.
79. Kruger R., Kuhn W., Muller T., Woitalla D., Graeber M., Kosel S., Przunte H., Epplen JT., Schois L., Riess O. *A1a30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease*. Nat. Genet., (1998), 18, p.106-108.
80. Kulak JM, Schneider JS. *Differences in alpha7 nicotinic acetylcholine receptor binding in motor symptomatic and asymptomatic MPTP-treated monkeys*. Brain Research, (2004), 999(2), p. 193-202.
81. Langston JW., Ballard P., Tetrud JW., Irwin I. *Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis*. Science, (1983), 219, p. 979-980.
82. Langston JW. *The etiology of Parkinson's disease with emphasis on the MPTP story*. Neurology, (1996), 47, p.153-160.

BIBLIOGRAFIA

83. Langston JW., Ballard P., Tetrud JW., Irwin I. *Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis*. Science, (1983), 219, p. 979-980.
84. Langston JW. *The promise of stem cells in Parkinson disease*. J. Clin. Invest., (2005), 115, p. 23-25.
85. Larsson LC, Czech KA, Brundin P and Widner H. *Intrastriatal ventral mesencephalic xenografts of porcine tissue in rats: immune responses and functional effects*. Cell Transplant., (2000), 9, p. 261–72.
86. Le Bihan D., Breton E., Lallemand D., Grenier P., Cabanis E., Laval-Jeantet M. *MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders*. Radiology, (1983), 161 (2), p. 401-407.
87. Lindburg D. *The Macaques: ecology, behavior and evolution*. Van Nostrand Rheinland Co. (1980), p.76-88.
88. Lindvall O., Brundin P., Widner H. et al. *Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease*. Science, (1990), 247, p. 574-7.
89. Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA. *CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7*. J. Exp. Med., (1991), 174, p. 561–9.
90. Lo Bianco C., Ridet JL., Schneider BL., Deglon N., Aebischer P. *Alpha-synucleinopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2002), 99, p. 10813-10818.
91. Lopiano L., Cinquepalmi A., Pesare M., Ricci S. *Terapia chirurgica della malattia di Parkinson*. Neurol. Sci., (2003), 24, p. 205-209.
92. Lumb & Jones. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*. Quarta edizione, London, 2007
93. Martignoni E., Tassorelli C., Nappi G. *Cardiovascular dysautonomia as a cause of falls in Parkinson's disease*. Parkin. & relet Disor. Elsev., (2006), Vol.12 (4), p.195-204.
94. Martin C., Plat M., Nerriere-Daguin V., Coulon F., Uzbekova S., Venturi E., Conde F., Hermel JM., Hantraye P., Tesson L., Anegon I., Melchior

BIBLIOGRAFIA

- B., Peschanski M., Le Mauff B., Boeffard F., Sergent-Tanguy S., Neveu I., Naveilhan P., Soullillou JP., Terqui M., Brachet P., Vanhove B. *Transgenic expression of CTLA4-Ig by fetal pig neurons for xenotransplantation*. *Transgenic Res.*, (2005), 4(4), p. 373-84.
95. McGeer PL., Schwab C., Parent A. Doudet D. *Presence of reactive microglia in monkey substantia nigra years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration*. *Ann. Neurol.*, (2003), 54, p. 599-604.
96. Melchior B., Remy S., Nerriere-Daguin V., Heslan JM., Soullillou JP., Brachet P. *Temporal analysis of cytokine gene expression during infiltration of porcine neuronal grafts implanted into the rat brain*. *J. Neurosci. Res.*, (2002), 68(3), p. 284-92.
97. Mikaelee H., Yazdchi M., Ansarin K., Arami M. *Pulmonary Function Tests Abnormalities In Parkinson Disease*. *The Internet Journal of Pulmonary Medicine*. (2007), Vol 8 Number 2.
98. Montgomery EB. Jr., Koller WC., LaMantia TJ., Newman MC., Swanson-Hyland E., Kaszniak AW. Lyons K. *Early detection of probable idiopathic Parkinson's disease. I. Development of diagnostic test battery*. *Mov. Disord.*, (2000), 15, p. 467-473.
99. Morris ED., Chefer SI., Lane MA., Muzic RF. Jr., Wong DF., Dannals RF., Matochik JA., Bonab AA., Villemagne VL., Grant SJ., Ingram DK., Roth GS. *Loss of D2 receptor binding with age in rhesus monkeys: Importance of correction for differences in striatal size*. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, London ED., (1999), 19, p. 218-229.
100. Muzzi DA., Black S., Cucchiara RF. *The lack of effect of succinylcholine on serum potassium in patients with Parkinson's disease*. *Anesthesiology*, (1989), 71, p. 322.
101. Neumann H., Cavalie, A., Jenne, D.E. & Wekerle, H. *Induction of MHC class I genes in neurons*. *Science*, (1995), 269, p. 549-552.
102. Nicholson G., Pereira A.C., Hall G.M. *Parkinson's disease and anesthesia*. *Br. J. Anaesth.*, (2002), 89 (6), p. 904-916.

BIBLIOGRAFIA

103. Obenour WH, Stevens PM, Cohen AA, McCutchen JJ. *The causes of abnormal pulmonary function in Parkinson's disease*. Am. Rev. Respir. Dis., (1972), 105, p.382-7.
104. Pakzaban, P. & Isacson, O. *Neural xenotransplantation: reconstruction of neuronal circuitry across species barriers*. Neuroscience, (1994), 62, p. 989-1001.
105. Parent A. *Comparative Neurobiology of the Basal Ganglia*. New York: Wiley, 1986.
106. Parkinson J. *An Essay on the Shaking Palsy*. London: Sherwoods, Neely and Jones. 1817.
107. Pate BD., Snow BJ., Hewitt KA., Morrison KS., Ruth TJ., Calne DB. *The Reproducibility of Striatal Uptake Data Obtained with Positron Emission Tomography and Fluorine-18-L-6-Fluorodopa Tracer in Non-Human Primates*. The Journal of Nuclear Med., (1991), Vol.32 (6), p.1246-1251.
108. Pedersen EB, Zimmer J and Finsen B. *Triple immunosuppression protects murine intracerebral, hippocampal xenografts in adult rat hosts: effects on cellular infiltration, major histocompatibility complex antigen induction and blood-brain barrier leakage*. Neuroscience, (1997), 78, p. 685–701.
109. Popilskis SJ., Lee DR., Elmore DB. *Anesthesia and Analgesia in Nonhuman Primates*. Anesth. and Analg. in Lab. Anim., 2nd Edit., (1997), cap.12, p. 335-363.
110. Przedborski S., Jackson-Lewis V., Naini AB., Jakowec M., Petzinger G., Miller R., Akram M. *The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): A technical review of its utility and safety*. J. Neurochem., (2001), 76, p.1265-1274.
111. Przedborski S., Kostic V., Giladi N., Eidelberg D. *Dopaminergic systems in Parkinson's disease*. Sidhu A., Laruelle M., Vernier P., Grignon S., eds., Dopamine Receptors and Transporters, New York: Marcel Dekker, 2003, p. 363-402.
112. Rajput A., Rajput AH. *Parkinson's disease management strategies*. Expert Rev. Neurother., (2006), 6, p. 91-99.

BIBLIOGRAFIA

113. Ravina B., Eidelberg D., Ahlskog JE., Albin RL., Brooks DJ., Carbon M., Dhawan V., Feigin A., Fahn S., Guttman M., Gwinn-Hardy K., McFarland H., Innis R., Katz RG., Kieburtz K., Kish SJ., Lange N., Langston JW., Marek K., Morin L., Moy C., Murphy D., Oertel WH., Oliver G., Palesch Y., Powers W., Seibyl J., Sethi KD., Shults CW., Sheehy P., Stoessl AJ., Holloway R. *The role of radiotracer imaging in Parkinson disease.* *Neurology*, (2005), 64, p. 208-215.
114. Redmond DE Jr. *Cellular replacement therapy for Parkinson's disease-where are we today?* *Neuroscientist*, (2002), 8, p. 457-488.
115. Reutlinger RA., Karl AA., Vinal SI., Nieser MJ. *Effects of ketamine HCl-xylazine HCl combination on cardiovascular and pulmonary values of the rhesus macaque (Macaca mulatta).* *Am. J. of Vet. Res.* (1980)
116. Roberts JA. *The aged rhesus macaque in neuroscience research: Importance of the nonhuman primate model.* In: Erwin JM., Hof PR., eds. *Aging in Nonhuman Primates*, Basel: Karger, 2002, p.155-177.
117. Robinson CA., Rajput AH. *The neuropathology of Parkinson's disease and other parkinsonian disorders.* Ebadi M., Pfeiffer RF. eds., *Parkinson's Disease.* New York: CRC Press, 2005, p. 401-418.
118. Rudra A., Rudra P., Chatterjee S., Das T., Ray M., Kumar P. *Parkinson's Disease and Anesthesia.* *Indian Journal of Anesthesia*, (2007), 51 (5), p. 382-388.
119. Russell WMS.e Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*, 1959.
120. Sachs D.M. & Bach F.H. *Immunology of xenograft rejection.* *Hum. Immunol.*, (1990), 28, p. 245-251.
121. Sainsbury AW., Eaton BD., Cooper JE. *An Investigation into the use of propofol in long-tailed macaques.* *Journal of Vet. Anesth.*, (1991), 18, p. 38-41.
122. Sanchez-Pernaute R., Brownell AL., Isacson O. *Functional imaging of the dopamine system: In vivo evaluation of dopamine deficiency and restoration.* *Neurotoxicology*, (2002), 23, p. 469-478.

BIBLIOGRAFIA

- 123.Sathyaprabha TN., Kapavarapu PK., Pal PK., Thennarasu K., Raju TR. *Pulmonary functions in Parkinson's Disease*. Indian J. Chest. Dis. Allied Sci., (2005), 47:251-257.
- 124.Schneider JS., Kovelowski CJ. *Chronic exposure to low doses of MPTP. 1. Cognitive deficits in motor asymptomatic monkeys*. Brain Res., (1990), 519, p.122-128.
- 125.Schneider JS., Pope-Coleman A. *Cognitive deficits precede motor deficits in a slowly progressing model of parkinsonism in the monkey*. Neurodegeneration, (1995), 4, p. 245-255.
- 126.Schumacher J.M., Ellias S.A., Palmer E. P., Kott H.S., Dinsmore J., Dempsey P. K., Fischman A. J., Thomas C., Feldman R. G., Kassissieh S., Raineri R., Manhart C., Penney D., Fink J. S. and Isacson O. *Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD*. Neurol., (2000), 54, p.1042-1050.
- 127.Severn A.M. *Parkinsonism and the anaesthetist*. Br.J.Anaesth., (1988), 61, p. 761-770.
- 128.Sibal LR., Samson KJ. *Nonhuman Primates: A Critical Role in Current Disease Research*. ILAR Journal, (2001), 42 (2), p.74-84.
- 129.Siddiqi ZA., Peters A. *The effect of aging on pars compacta of the substantia nigra in rhesus monkey*. J. Neuropathol. Exp. Neurol., (1999), 58, p. 903-920.
- 130.Spillantini MG., Schmidt ML., Lee VM., Trojanowski JQ., Jakes R., Goedert M. *Alpha-synuclein in Lewy bodies*. Nature, (1997), 388, p. 839-840.
- 131.Subramanian T., Deogaonkar M., Brummer M., Bakay R. *MRI guidance improves accuracy of stereotaxic targeting for cell transplantation in parkinsonian monkeys*. Exp. Neurol. (2005) 193: p.172– 180.
- 132.Tanner CM., Ottman R., Goldman SM., Ellenberg J., Chan P., Richard M., Langston JW. *Parkinson's disease in twins: An etiologic study*. JAMA, (1999), 281, p. 341-346.

BIBLIOGRAFIA

133. Tetrud J., Langston J., Redmond D., Roth R., Sladek J.Jr., Angel R. *MPTP-induced tremor in human and non-human primates*. *Neurology*, (1986), 36, p. 308.
134. Thoenen H., Tranzer JP. *Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-hydroxydopamine*. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, (1968), 261, p. 271-288.
135. Tierney D. (Internet). *Discuss the importance of carbon dioxide in the control of breathing*. 1998. www.gayyoga.gn.apc.org/Respiration.htm - Regno Unito (accesso effettuato il 28 ottobre 2009).
136. Tsuji A., Tamai I., Sakata A., Tenda Y. e Terasaki T. *Restricted transport of cyclosporin A across the bloodbrain barrier by a multidrug transporter, P-glycoprotein*. *Biochem Pharmacol.*, (1993), 46, p.1096–1099.
137. Ueki A., Chong A., Albanese A., Rose S., Chivers JK., Jenner P., Marsden CD. *Further treatment with MPTP does not produce parkinsonism in marmosets showing behavioural recovery from motor deficits induced by an earlier exposure to the toxin*. *Neuropharmacol.*, (1989), 28, p.1089-1097.
138. Ungerstedt U. *6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons*. *Eur. J. Pharmacol.*, (1968), 5, p.107-110.
139. Van Zutphen L.F.M., Baumans V., Beynen A.C. *Principi di scienza dell'animale da laboratorio*. Ed. Italiana a cura di Cavalletti E., Cocilovo A., Filippeschi S., Melloni E., AISAL, ed La Goliardica Pavese, 1993, 287-317.
140. Varassi G., Marinangeli F., Cocco C. *Il Dolore acuto*. (1999), 1-6
141. Vitale A. (Internet). *Aspetti gestionali e applicativi dell'uso dei primati non-umani in sperimentazione biomedica*. Dip. Biologia cellulare e Neuroscienze Istituto Superiore di Sanità. 2008. http://www.uniroma2.it/didattica/mo_di_in/deposito/vitale_A.ppt (accesso effettuato il 16 ottobre 2009)
142. Wichmann T., Bergman H., Starr PA., Subramanian T., Watts RL., DeLong MR. *Comparison of MPTP-induced changes in spontaneous*

BIBLIOGRAFIA

- neuronal discharge in the internal pallidal segment in the substantia nigra pars reticulata in primates. Exp. Brain Res.*, (1999), 125, p.397-409.
- 143.Wikipedia (Internet). *Positron emission tomography* .2009. [en.wikipedia.org/.../Positron emission tomography](http://en.wikipedia.org/.../Positron%20emission%20tomography) (accesso effettuato il 14 settembre 2009)
- 144.Winterborn AN., Bates WA., Feng C., Wyatt JD. *The efficacy of orally dosed ketamine and ketamine/medetomidine compared with intramuscular ketamine in rhesus macaques (Macaca mulatta) and the effects of dosing route on hematological stress markers. J. Med. Primatol.*, (2008), 37, p.116-127.
- 145.White PF., Way WL., Trevor AJ. *Ketamine: its pharmacology and therapeutic uses. Anesthesiology*, 1982, p.304.
- 146.Wolters EC., Braak H. *Parkinson's disease:Premotor clinicopathological correlations. J. Neural. Transm.*, (2006), 70 (Suppl), p. 309-319.
- 147.Wright JJ., Goodnight PD., McEvoy MD. *The Utility of Ketamine for the Preoperative Management of a Patient with Parkinson's Disease. Anesth. Analg.*, (2009), 108, p. 980-982
- 148.Young H., Baum R., Cremerius U., Herholz K., Hoekstra O., Lammertsma AA., Pruim J., Price P. *Measurement of clinical and subclinical tumour response using [¹⁸F]-fluorodeoxyglucose and positron emission tomography: review and 1999 EORTC recommendations. Eur. J. Cancer.*, (1999), 35, p.1773–1782.
- 149.Young SS., Schilling AM., Skeans S., Ritacco G. *Short duration anesthesia with medetomidine and ketamine in cynomolgus monkeys. Lab. Animal.*, (1999), 33, p. 162-168.
- 150.Zanichelli S., Scrollavezza P. *Manuale di Anestesiologia Veterinaria*.parte I. Ed. Scientifiche Oppici, 1990, 23-57.
- 151.Zigmond MJ., Stricker EM. *Animal models of parkinsonism using selective neurotoxins: Clinical and basic implications. Int. Rev. Neurobiol.*, (1989), 31: p.1-79.

BIBLIOGRAFIA

Decreto Legislativo 116/92. Attuazione della Direttiva CEE n.609/86 in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici.