

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI PEDIATRIA

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE PEDIATRICHE
(XIV CICLO)

Coordinatore del Corso Prof. S. Auricchio

TERAPIA FARMACOLOGICA E NUTRIZIONALE DELLE
INFEZIONI INTESTINALI NEL BAMBINO
IMMUNOCOMPETENTE ED IMMUNODEFICIENTE

CANDIDATA

Dott. Eugenia Bruzzese

TUTORE

Prof. Alfredo Guarino

ANNO ACCADEMICO 2000-2001

INTRODUZIONE	3
CAPITOLO 1. NUOVI APPROCCI TERAPEUTICI DELLA GASTROENTERITE ACUTA IN ETA' PEDIATRICA	7
Introduzione: La gastroenterite acuta	7
Obiettivi delle ricerche	9
Strategie di approccio e metodologie	9
Studi clinici randomizzati controllati	9
Analisi statistica	10
Risultati delle ricerche	11
1a. Efficacia della diosmectite nel trattamento della diarrea acuta lieve-moderata.....	11
1b. Valutazione comparativa di differenti microrganismi probiotici nel trattamento della diarrea acuta	14
Discussione dei dati alla luce delle conoscenze disponibili	18
CAPITOLO 2. NUOVI APPROCCI TERAPEUTICI DELLA DIARREA INTRATTABILE DELL'INFANZIA	21
Introduzione:La diarrea intrattabile dell'infanzia	21
Obiettivi delle ricerche	22
Strategie di approccio e metodologie	23
Studi in vitro.....	23
Analisi statistica	24
Studi in vivo.....	24
Analisi statistica	25
Risultati delle ricerche	26
2a. Effetti in vitro del GH sull'intestino: effetto proassorbitivo/antisecretivo ed effetto trofico.....	26
2b. Effetto in vivo del GH sull'intestino: effetto proassorbitivo/antisecretivo nei pazienti con diarrea "intrattabile"	29
Discussione dei dati alla luce delle conoscenze disponibili	34
CAPITOLO 3. NUOVI ASPETTI FISIOPATOLOGICI E NUOVI APPROCCI TERAPEUTICI DELL'ENTEROPATIA ASSOCIATA AD INFEZIONE DA HIV	37
Introduzione: L'enteropatia associata ad infezione da HIV	37
Obiettivi delle ricerche	38
Strategie di approccio e metodologie	39
Studi in vitro.....	39
Analisi statistica	39
Studi in vivo	39
Analisi statistica	40
Risultati delle ricerche	42
3a. Ruolo della proteina Tat di HIV-1 nella fisiopatologia della disfunzione intestinale associata ad HIV	42
3b. Effetti della nutrizione clinica (enterale e parenterale) sulla funzione assorbitiva intestinale nel paziente con infezione da HIV	47
3c. Effetto della somministrazione di estratti pancreatici nel paziente con infezione da HIV e steatorrea ..	50
Discussione dei dati alla luce delle conoscenze disponibili	52
CONCLUSIONI	55
BIBLIOGRAFIA	57
APPENDICE	64

INTRODUZIONE

La diarrea è la principale manifestazione clinica di un' infezione intestinale. Qualunque sia l'eziologia, la patogenesi della diarrea può essere ricondotta essenzialmente a due meccanismi principali: secretivo ed osmotico.

La diarrea si definisce secretiva quando segue ad un aumento della secrezione di ioni, in genere cloro, nel lume intestinale. Questo tipo di diarrea si verifica quasi sempre per l'azione di tossine, prodotte da alcuni microrganismi, che attivano l'adenilato o la guanilato ciclasi con conseguente accumulo intracellulare di cAMP e cGMP. Un terzo meccanismo è quello che coinvolge il sistema calcio-calmodulina. In quest'ultimo caso alcune enterotossine attivano una fosfolipasi Ca-dipendente che idrolizza alcuni fosfolipidi di membrana. I prodotti dell'idrolisi determinano l'apertura dei canali del calcio e l'aumento del calcio intracellulare che interviene, attraverso l'attivazione di chinasi specifiche o della clamodulina, nella modulazione dell'azione dei nucleotidi ciclici.

L'aumento delle concentrazioni di nucleotidi ciclici determina una riduzione dell'assorbimento di sodio ed un aumento della secrezione di ioni cloro determinando una secrezione attiva di elettroliti ed acqua nel lume intestinale.

Tra le enterotossine che agiscono aumentando i livelli di cAMP ricordiamo la tossina colerica (1) e la tossina termolabile di E. coli. La tossina termostabile di E. coli determina secrezione intestinale aumentando le concentrazioni di cGMP (2). Dati recenti ottenuti nel nostro laboratorio dimostrano che la tossina vacuolizzante di *Helicobacter pylori* è in grado in un modello sperimentale di indurre secrezione di acqua e ioni aumentando i livelli del calcio intracellulare (3).

Una diarrea di tipo osmotico è invece secondaria ad un danno cellulare dovuto sia alla citolisi indotta dalla penetrazione di microrganismi nella mucosa sia all'azione di citotossine prodotte dal microrganismo stesso. Ne deriva una riduzione della superficie assorbitiva con aumento dei soluti nel lume intestinale, richiamo d'acqua e conseguente aumento del volume fecale.

Risulta quindi chiaro che qualsiasi evento in grado di determinare un danno dell'epitelio intestinale con una riduzione della sua capacità assorbitiva si esprime dal punto di vista clinico con una diarrea osmotica.

Un metodo indiretto per valutare il carattere secretivo e/o osmotico della diarrea è quello di calcolare il gap ionico fecale in base all'osmolarità ed alle concentrazioni fecali di sodio e potassio. Un gap ionico fecale inferiore a 70 indica una diarrea secretiva mentre un gap ionico superiore a 70 una diarrea di tipo osmotico. Considerato che lo ione cloro è quello che viene

direttamente secreto nel lume intestinale in seguito a stimoli secretagoghi la sola concentrazione fecale di ioni cloro può essere utilizzata per ottenere informazioni circa il meccanismo fisiopatologico di una diarrea. Concentrazioni superiori a 50 mEq/l indicano una diarrea di tipo secretivo (4).

Ovviamente la classificazione di diarrea osmotica e secretiva è inevitabilmente schematica. Esistono infatti microrganismi che agiscono principalmente attraverso l'uno o l'altro dei due meccanismi, mentre altri possono indurre diarrea con entrambi. Il classico esempio di una diarrea in cui intervengono entrambi i meccanismi è quella indotta dal Rotavirus. Il Rotavirus infatti, dopo la penetrazione per via orale o per via respiratoria si localizza e si replica elettivamente nelle cellule mature dell'epitelio intestinale determinandone la morte per lisi; come conseguenza si verifica un aumento di soluti non assorbiti nel lume che richiamano per osmosi acqua (diarrea osmotica). Nello stesso tempo, l'aumento in proporzione di cellule immature si associa ad una secrezione netta di ioni nel lume (diarrea secretiva). Studi recenti hanno inoltre dimostrato che una glicoproteina non strutturale del Rotavirus è in grado di indurre secrezione di cloro a livello intestinale attraverso un meccanismo calcio-dipendente (5). Da quanto detto si evince che il Rotavirus determina diarrea in tre modi diversi: danneggiando le cellule digestivo-assorbitive, inducendo per compenso un'iperproliferazione di cellule con funzione secretiva e producendo un'enterotossina.

Le infezioni intestinali rappresentano la causa più frequente di diarrea in età pediatrica. Nei paesi cosiddetti in via di sviluppo le conseguenze della diarrea infettiva sono terribili con un tasso di mortalità pari a circa 3 milioni di bambini per anno. Nei paesi industrializzati la mortalità è bassa, anche se non trascurabile mentre la morbilità è elevatissima. La gastroenterite acuta è tra i motivi più frequenti di richiesta di assistenza pediatrica. Il 4-7% delle richieste di visita pediatrica sono legate ad infezioni intestinali e nella fascia di età compresa tra 0 e 3 anni una visita pediatrica su 10 è dovuta a infezione intestinale. I costi della diarrea sono elevatissimi. Negli Stati Uniti il costo stimato per episodio di diarrea è pari a circa 300 dollari, la metà dei quali deriva dai giorni di lavoro persi dai genitori del paziente e il costo totale legato al problema diarrea acuta è pari a 1 miliardo di dollari (6). I costi legati all'ospedalizzazione sono tutt'altro che trascurabili. Negli USA vengono ricoverati 200.000 bambini ogni anno per diarrea e il tasso di mortalità è pari a 500 bambini per anno. La mortalità per diarrea è crollata negli ultimi 20 anni, grazie soprattutto alla diffusione delle soluzioni reidratanti orali. La frequenza delle infezioni intestinali comporta un elevato disagio e costi enormi. Il disagio e i costi sono direttamente collegati alla durata dei sintomi.

Proprio per questo, si e' sviluppata una crescente richiesta di farmaci che diminuiscano la durata della diarrea e le sue conseguenze. Al pediatra viene invariabilmente chiesto qualcosa che faccia guarire il bambino. A questo bisogno emergente, le case farmaceutiche rispondono con una crescente disponibilit  di nuovi farmaci per il trattamento della diarrea. Il pediatra si trova cos  di fronte alla richiesta pressante per un trattamento specifico della diarrea ed ad un'ampia disponibilit  di nuovi farmaci proposti dalle industrie. Questo nuovo scenario e' in fase di rapida evoluzione, visto che fino a non pi  di due anni fa il trattamento della diarrea era limitato alla reidratazione.

Le infezioni intestinali hanno una particolare gravit  in bambini immunodeficienti.

La causa pi  frequente di immunodeficienza in et  pediatrica e' la sindrome dell'immunodeficienza acquisita (AIDS). In paesi cosiddetti in via di sviluppo, le infezioni intestinali sono frequenti e gravi in bambini con AIDS e ne costituiscono una frequente causa di morte. In paesi ricchi, l'infezione da HIV si associa a disfunzione intestinale. La disfunzione intestinale e' una sindrome associata a malassorbimento di nutrienti e ad alterata permeabilit  intestinale, la cui genesi e' largamente oscura. Frequentemente alla disfunzione intestinale si associa un quadro di disfunzione pancreatica, responsabile dell'elevata frequenza di steatorrea. Come mostrato nella figura 1, la diarrea, associata o meno a patogeni enterici identificati, la disfunzione intestinale e quella pancreatica, contribuiscono tutte al derangement nutrizionale, innescando un circolo vizioso con ulteriore peggioramento del danno immunitario.

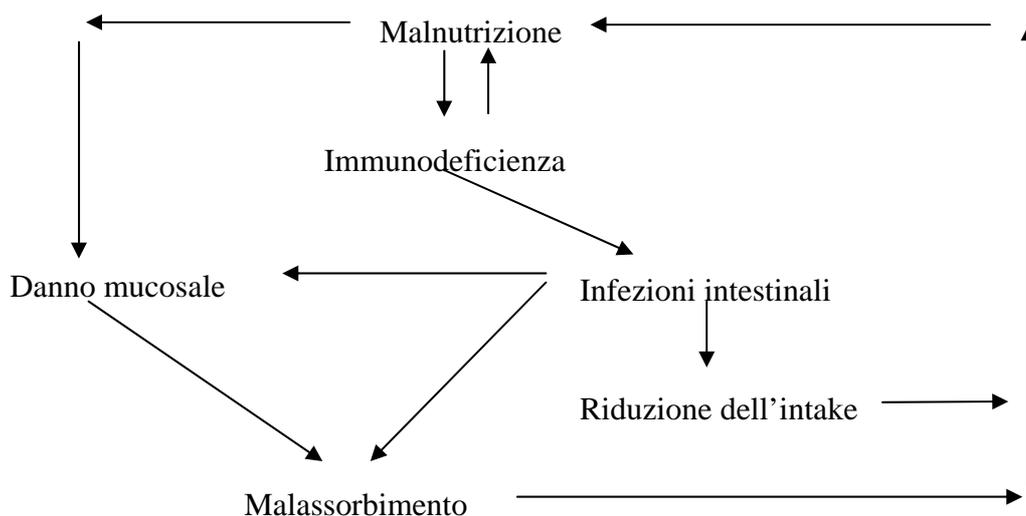


Figura 1. Interazione tra immunodeficienza, malassorbimento e malnutrizione

L'interruzione del circolo vizioso e' legata al ripristino delle condizioni nutrizionali e delle normali funzioni digestivo-assorbitive. Complessivamente quindi, le infezioni intestinali costituiscono un problema frequente e con elevato impatto sulla qualità di vita e con enorme impatto sui costi sanitari in bambini immunocompetenti nei paesi ad alto standard economico-sociale. D'altra parte le infezioni intestinali costituiscono un enorme problema in bambini a rischio, e in particolare in quelli con immunodeficienza. In tali casi, le infezioni intestinali richiedono un approccio terapeutico complesso, basato sull'uso combinato di farmaci e strategie di riabilitazione nutrizionale per interrompere il circolo vizioso.

La presente tesi di dottorato e' il risultato delle ricerche che sono state effettuate nel campo delle strategie terapeutiche farmacologiche e nutrizionali per le infezioni intestinali nel bambino immunocompetente e immunodeficiente.

Sono stati utilizzati diversi approcci, con l'uso di strategie di ricerca in vivo e in vitro.

Sono stati affrontati in particolare 3 problemi:

- Il trattamento attivo delle infezioni intestinali in bambini immunocompetenti
- Il trattamento della diarrea grave e protratta con farmaci attivi sul trasporto intestinale di ioni e acqua: ruolo dell'ormone della crescita (GH)
- La fisiopatologia della diarrea e del danno intestinale in bambini con infezione da HIV e la riabilitazione nutrizionale con l'utilizzazione della nutrizione clinica o con l'uso di enzimi pancreatici.

CAPITOLO 1. NUOVI APPROCCI TERAPEUTICI DELLA GASTROENTERITE ACUTA IN ETÀ PEDIATRICA

INTRODUZIONE: LA GASTROENTERITE ACUTA

La gastroenterite acuta rappresenta ancora oggi una importante causa di mortalità nei paesi in via di sviluppo laddove nei paesi ad alto standard socio-economico resta un problema frequente e ad alta morbilità soprattutto nelle prime epoche della vita. Il pattern epidemiologico della diarrea acuta si è decisamente modificato negli ultimi decenni durante i quali si è assistito ad una progressiva riduzione della mortalità ma anche dell'incidenza. Nel 1988, in Italia l'incidenza media era pari a circa 1 episodio di diarrea per bambino per anno, in bambini di età inferiore ai 3 anni (7); dati più recenti ottenuti a Milano indicano un'incidenza media di circa 0,5 episodi per bambino per anno (8).

Nonostante questo la gastroenterite acuta è ancora oggi una causa molto frequente di ricovero ospedaliero. Dati ISTAT del 1992 indicano un totale di 69000 ricoveri per diarrea in tutte le fasce di età e di questi il 60% in età compresa tra 0 e 14 anni.

Questi dati epidemiologici rendono ragione dei notevoli costi della gastroenterite acuta in Italia. Dati preliminari raccolti da un gruppo di lavoro della Società Italiana di Gastroenterologia ed Epatologia Pediatrica (SIGEP) hanno mostrato un costo medio di circa 420.000 lire per episodio di diarrea lieve-moderato. Considerato che in Italia i bambini sotto i 3 anni sono circa un milione e mezzo e che l'incidenza media per singolo bambino è di 0,5 episodi di diarrea per anno la stima dei costi totali sarebbe pari a 315 miliardi. A Tale stima bisogna aggiungere i costi dell'ospedalizzazione che ammontano a circa 150 miliardi. Si evince quindi che un obiettivo importante in termini di salute pubblica è quello di ridurre l'incidenza della diarrea acuta, ma soprattutto la sua gravità e durata e di conseguenza la necessità di ricovero.

Il cardine della terapia della gastroenterite acuta è tutt'oggi rappresentato dalla soluzione reidratante orale (ORS); tale regime terapeutico insieme ad una rapida rialimentazione consente, se instaurato rapidamente ed in maniera corretta, di mantenere e ripristinare l'omeostasi idroelettrolitica e lo stato nutrizionale riducendo il rischio di complicanze e quindi il ricorso al ricovero ospedaliero. L'eventuale disponibilità di un farmaco antidiarroico efficace e sicuro, unito alla ORS, permetterebbe un'ulteriore notevole riduzione della morbilità e della mortalità per diarrea.

I probiotici sono stati proposti da decenni nella terapia della gastroenterite dell'infanzia ma solo negli ultimi anni sono stati condotti studi clinici controllati che ne hanno definitivamente provato l'efficacia.

Dati generati in situazioni socio-demografiche diverse e da parte di numerosi ricercatori indicano che la somministrazione di *Lactobacillus casei* sp. *rhamnosus* (*Lactobacillus* GG o LGG) è efficace nel trattamento della diarrea acuta infettiva. L'efficacia è particolarmente evidente nelle diarree virali. LGG riduce significativamente la durata della diarrea (9) e la durata dell'escrezione del Rotavirus (10) stimolando la risposta immune locale specifica anti-Rotavirus (11), riduce inoltre il rischio di diarrea protratta e consente una più rapida dimissione dall'ospedale con riduzione della durata del ricovero ospedaliero e dei suoi costi (12). L'efficacia nelle diarree batteriche è meno chiara (13), anche se va sottolineato che in diverse casistiche di gastroenterite l'LGG è risultato efficace a prescindere dall'eziologia. Uno studio multicentrico europeo condotto su bambini ricoverati per diarrea acuta ha mostrato una ridotta durata delle diarrea, Anche in paesi cosiddetti in via di sviluppo, ad alta incidenza di malnutrizione, LGG è efficace nelle diarree acute non ematiche (14). Altri probiotici, quali il *Saccharomyces boulardii*, l'*Enterococcus faecium* SF68 e il *Lactobacillus reuteri*, si sono dimostrati efficaci nel ridurre la durata della diarrea nell'adulto e nel bambino (15-17).

Una recente metanalisi fondata sui criteri dell'Evidence Based Medicine ha evidenziato che meno di 10 degli oltre 100 lavori pubblicati rispondevano alle caratteristiche dell'Evidence Based Medicine. L'analisi dei dati ha dimostrato inequivocabilmente che LGG è efficace per la terapia delle gastroenterite acute virali (18). Altri probiotici e in particolare il *Lactobacillus reuteri*, *Saccharomyces boulardii* e *Lactobacillus acidophilus* sono risultati efficaci ma le dimostrazioni non sono conclusive.

Le evidenze cliniche di efficacia dell'uso dei probiotici nella terapia delle infezioni intestinali sono ritenute talmente convincenti che la somministrazione dei probiotici, per i quali esiste una solida dimostrazione scientifica di efficacia è stata inclusa nelle raccomandazioni per la terapia della gastroenterite acuta dell'infanzia (19,20).

Altre terapie sono state proposte per il trattamento della diarrea acuta. Dati contrastanti esistono per l'antidiarroico più utilizzato negli USA e cioè il bismuto. Per il momento l'evidenza di una modesta efficacia, i costi, e i problemi collegati alla modalità di somministrazione (il bismuto deve essere somministrato non meno di 4 volte al giorno) non incoraggiano l'uso su larga scala del bismuto nella terapia della diarrea acuta (21).

Dati recenti dimostrano che la smectite, un aluminosilicato non sistemico, esercita un'azione protettiva della mucosa intestinale ed è in grado di adsorbire tossine batteri ed alcuni virus tra i quali il Rotavirus (22,23). La smectite è inoltre efficace nel ripristinare la funzione di barriera intestinale come dimostrato dalla normalizzazione del test di permeabilità intestinale di bambini con diarrea acuta trattati con smectite (24). Questi dati clinici sono confermati dalla dimostrazione, in vitro, che la smectite ripristina l'integrità dell'epitelio intestinale danneggiato dall'esposizione al TNF α (25). Evidenze preliminari suggeriscono che la smectite riduce la durata della diarrea nei paesi in via di sviluppo in bambini ricoverati per gastroenterite acuta (26,27).

Esistono quindi molti e diversi approcci alla gastroenterite acuta giustificati dai costi elevatissimi legati alla frequenza del problema.

L'utilizzo su larga scala di farmaci in grado di ridurre la durata della diarrea acuta in età pediatrica permetterebbe di ridurre considerevolmente i costi.

OBIETTIVI DELLE RICERCHE

- Valutare l'efficacia della diosmectite nel trattamento della gastroenterite acuta di grado lieve-medio
- Comparare l'efficacia di differenti microrganismi probiotici nel trattamento della gastroenterite acuta di grado lieve-medio

STRATEGIE DI APPROCCIO E METODOLOGIE

Studi clinici randomizzati controllati

Per la valutazione dell'efficacia della diosmectite e di differenti probiotici nel trattamento della diarrea acuta sono stati condotti, in collaborazione con i pediatri di base studi clinici randomizzati, controllati contro placebo.

Sono stati arruolati bambini con diarrea acuta definita come la presenza di 3 o più evacuazioni di feci molli o liquide al giorno, di grado lieve moderato. Criteri di esclusione sono stati l'assunzione di antibiotici, probiotici o altri farmaci considerati attivi a livello intestinale nelle tre settimane precedenti, la presenza di malnutrizione definita da un rapporto peso/altezza inferiore a 5° percentile e la presenza di qualsiasi malattia cronica o immunodeficienza congenita, acquisita o da farmaci. I pazienti sono stati suddivisi in maniera randomizzata in differenti gruppi. Il gruppo dei controlli riceveva solo soluzione reidratante orale (ORS Na⁺ 60 mM) gli altri gruppi ricevevano soluzione reidratante orale in associazione al prodotto

testato. Tutti i pazienti sono stati reidratati per le prime 4-6 ore e rialimentati precocemente in accordo con le linee guida dell' European Society of Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) (28-30).

Sono stati considerati come parametri di efficacia:

- la durata della diarrea (tempo in ore tra la prima e l'ultima evacuazione molle o liquida)
- incidenza e durata media di vomito e febbre (temperatura corporea superiore a 38°C),
- rischio di decorso protratto della diarrea (superiore a 7 gg),
- necessità di ospedalizzazione
- numero dei giorni di lavoro persi dai genitori (solo nello studio sull'efficacia dei probiotici).

Per definire la consistenza delle feci è stato usato il seguente score: 1 (feci di consistenza normale), 2 (feci di consistenza molle), 3 (feci di consistenza semiliquida), 4 (feci di consistenza liquida).

I parametri di efficacia ed i motivi di sospensione della terapia sono stati registrati, su un'apposita scheda, consegnata ai genitori al momento dell'arruolamento; a distanza di una settimana circa dal termine dell'episodio acuto le schede compilate sono state restituite al pediatra curante.

Il protocollo dello studio sull'efficacia della diosmectite è stato approvato dal Comitato di Ricerca SIGEP (Società Italiana di Gastroenterologia ed Epatologia Pediatrica)

Analisi statistica

Per valutare le differenze intergruppo dei diversi parametri di efficacia è stata utilizzata l'analisi della varianza ANOVA test (SPSS Inc. Chicago IL). Il test χ^2 è stato utilizzato per l'analisi della consistenza delle evacuazioni tra i diversi gruppi. I dati sono stati espressi come media \pm ES.

RISULTATI DELLE RICERCHE

1a. Efficacia della diosmectite nel trattamento della diarrea acuta lieve-moderata

Sono stati arruolati 898 bambini di età compresa tra 3 mesi e 5 anni con diarrea acuta. Di questi, 94 sono stati esclusi per mancanza di dati completi al termine dello studio.

I pazienti sono stati suddivisi in maniera randomizzata in due gruppi:

- i controlli (398 bambini) hanno ricevuto solo ORS (Na^+ 60 mM)
- i trattati (406 bambini) hanno ricevuto ORS in associazione a Diosmectite (Diosmectal; Malesci S.P.A. Firenze Italia).

Lo schema di trattamento prevedeva 3 o 6 grammi (rispettivamente per i bambini di età inferiore o superiore a 1 anno di età) in due somministrazioni per 5 giorni. Per le prime 4-6 ore tutti i pazienti sono stati reidratati e successivamente è stata iniziata la somministrazione della diosmectite.

Non sono state osservate differenze significative tra i due gruppi per le variabili sesso, febbre e vomito al momento dell'arruolamento e durata della diarrea prima del ricovero (Tabella 1a.1). Una piccola ma significativa differenza è stata osservata per l'età media e la severità della diarrea. In particolare i bambini trattati con diosmectite erano più piccoli e presentavano una diarrea prima del ricovero più severa rispetto ai controlli.

Tabella 1a.1. Caratteristiche dei pazienti all'arruolamento

	Controlli	Trattati	p
Età (mesi)	30±17	27±19	<0.01
Maschi	39	42	NS
Febbre (%)	57	59	NS
Vomito (%)	64	62	NS
Evacuazioni giorno1	5±2.2	5±2.6	<0.05
Durata diarrea (ore)	34±6	31±5	NS

Circa l'80% dei bambini aveva una disidratazione di grado lieve, il 20% una disidratazione di grado moderato. La durata media della diarrea è risultata ridotta in tutti i bambini trattati con diosmectite. La somministrazione di diosmectite ha ridotto il numero di evacuazioni (figura 1a.1) e ha determinato un più rapido aumento della consistenza delle feci (figura 1a.2). Entrambi gli effetti sono risultati evidenti a partire dal giorno successivo all'inizio della terapia con diosmectite.

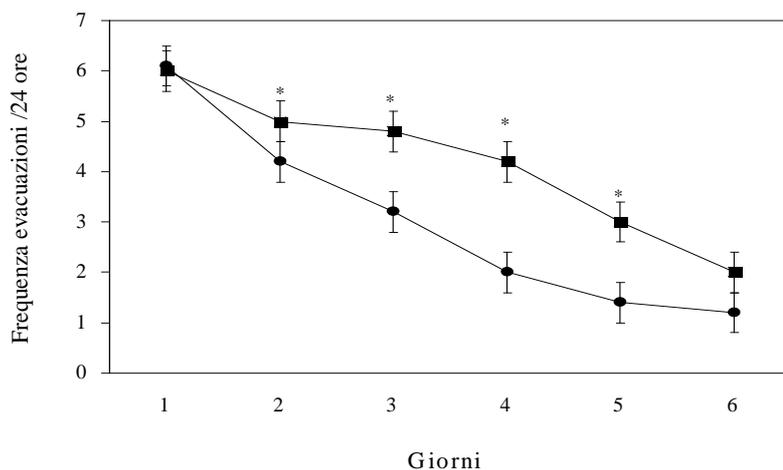


Figura 1a.1. Frequenza delle evacuazioni in bambini trattati con ORS e con ORS e diosmectite. La somministrazione di diosmectite si associa ad una significativa riduzione del numero di evacuazioni ($p < 0.05$).

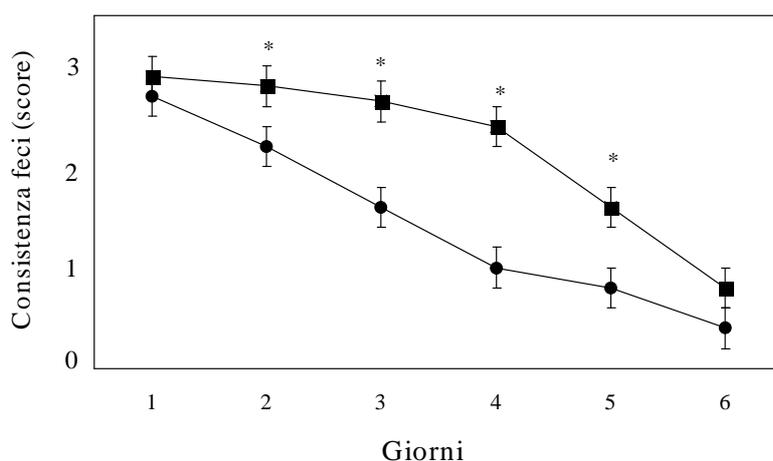


Figura 1a.2. Consistenza delle evacuazioni in bambini trattati con ORS e con ORS e diosmectite. La somministrazione di diosmectite si associa ad un significativo aumento della consistenza ($p < 0.05$).

In 116 (14%) bambini la diarrea ha avuto una durata superiore a 7 giorni. Di questi il 10% apparteneva al gruppo dei trattati (44 bambini) e il 18% al gruppo dei controlli. I pazienti trattati con diosmectite hanno quindi mostrato un rischio minore di decorso protratto della diarrea ($p < 0.01$). Il ricovero ospedaliero è stato necessario in 13 pazienti (7 nel gruppo dei

trattati e 6 nel gruppo dei controlli). L'incidenza e la durata del vomito e della febbre non hanno mostrato differenze significative tra i due gruppi.

Dei 406 bambini trattati con diosmectite, 30 si sono rifiutati fin dall'inizio di assumere il farmaco (2,8%); tale percentuale è aumentata con il migliorare delle condizioni generali. Il 20% dei bambini non ha completato la terapia. Il motivo più comune di rifiuto del farmaco è stato il gusto sgradevole (figura 1a.3).

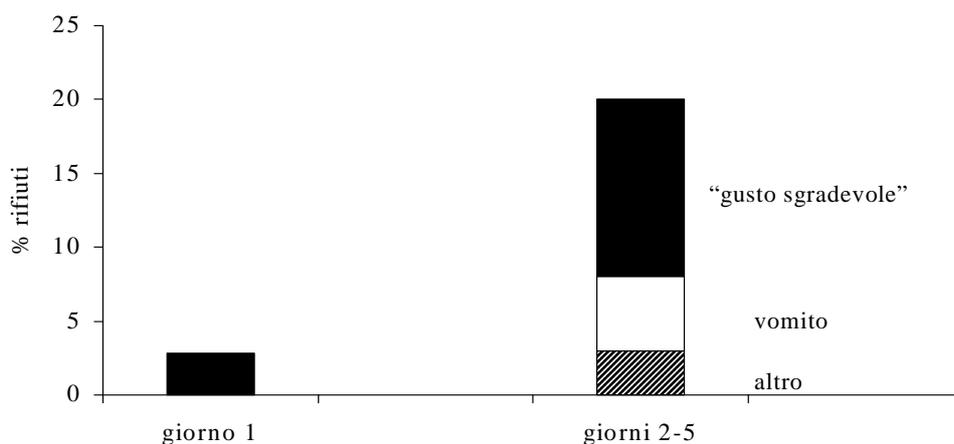


Figura 1a.3 Percentuale di bambini che rifiutavano di assumere la diosmectite. La non compliance aumenta in parallelo al miglioramento delle condizioni cliniche. Il motivo principale del rifiuto è il gusto sgradevole del composto.

1b. Valutazione comparativa di differenti microrganismi probiotici nel trattamento della diarrea acuta

Sono stati arruolati 600 bambini, di età compresa tra 3 mesi e 3 anni, con diarrea acuta.

I pazienti sono stati suddivisi in maniera randomizzata in 6 gruppi:

- gruppo 1: ORS
- gruppo 2 : ORS + Lactobacillus GG
- gruppo 3: ORS + Saccharomyces boulardii
- gruppo 4 : ORS + Bacillus subtilis
- gruppo 5 : ORS + miscela di Lattobacillus bulgaricus, Streptococcus termophilus, Lactobacillus acidophilus e Bifidobacterium bifidum
- gruppo 6: ORS + Enterococcus SF 68.

Le concentrazioni e la modalità di somministrazione di ciascun probiotico sono riassunte nella tabella 1b.1.

Tabella 1b.1 Composizione e modalità di somministrazione dei probiotici

Gruppo	Probiotico	Dosaggio
1	-	-
2	L. casei strain GG	6×10^9 CFU (2 volte/die)
3	S. boulardii	5×10^9 microrganismi vivi (2 volte/die)
4	B. subtilis	10^9 CFU (2 volte/die)
5	L. bulgaricus + L. acidophilus + S. Termophilus + B. bifidum	10^9 CFU + 10^9 CFU + 10^9 CFU + 5×10^8 CFU (2 volte/die)
6	Enterococcus faecium SF68	15×10^7 CFU (2 volte/die)

Dei 600 bambini arruolati, 52 sono stati esclusi per la mancata raccolta dei dati o per l'uso di antibiotici per malattie respiratorie concomitanti. Due bambini sono stati esclusi perché affetti da malattia celiaca.

Le caratteristiche dei bambini di ciascun gruppo sono indicate nella tabella 2b.2; tra i diversi parametri considerati non sono state osservate differenze statisticamente significative.

Tabella 1b.2 Caratteristiche principali dei bambini arruolati nei differenti gruppi di trattamento.

Gruppi	1	2	3	4	5	6	P
Numero bambini	89 (16%)	97 (17%)	82 (14%)	103 (18%)	93 (17%)	84 (15%)	0.9
Sesso							
Maschi (%)	41 (46%)	60(62%)	44 (54%)	49 (48%)	49 (53%)	39 (46%)	0.2
Femmine (%)	48 (54%)	37(38%)	38 (46%)	54 (52%)	44 (47%)	45 (54%)	
Età (mesi)	19±10	21±11	20±14	21±10	22±17	21±13	0.7
Peso (kg)	12±3	12±3	12±4	12±3	13±5	12±4	0.3
Alimentazione							
Seno (%)	13.5	11.7	13.3	10.0	13.4	17.9	0.8
Formula (%)	55.8	55.0	55.6	60.2	46.2	43.6	
UHT (%)	30.8	33.3	31.1	29.8	40.5	38.5	
Durata diarrea prima del trattamento (ore)							
	11±7	12±10	14.5±10	12±12	15±9	13±11	0.9

La durata media totale della diarrea nei bambini trattati con ORS (gruppo 1) è stata di 120 ± 3 ore, simile a quella dei gruppi 3, 4 e 6 (106 ± 3 , 113 ± 3 e 114 ± 4 ore rispettivamente, $p = \text{NS}$).

La durata media della diarrea è risultata invece significativamente ridotta nei bambini trattati ORS + Lactobacillus GG (80 ± 3 ore, $p < 0.01$) ed in quelli trattati con la miscela di probiotici (77 ± 3.4 ore, $p < 0.01$) (vedi figura 1b.1). Nei gruppi 2 (ORS + Lactobacillus GG) e 5 (miscela di probiotici) rispetto ai controlli, si è osservata inoltre una significativa riduzione del numero delle evacuazioni a partire dal primo giorno di terapia (figura 1b.2), un più rapido ritorno delle feci ad una consistenza normale (figura 1b.3) e un numero minore di giorni lavorativi persi dai genitori (1.3 ± 0.2 e 1.3 ± 0.1 vs 2.3 ± 0.2 giorni rispettivamente, $p < 0.01$, figura 1b.4).

Al contrario, i parametri secondari di efficacia terapeutica (incidenza e durata media di vomito e febbre, il rischio di un decorso protratto della diarrea e la necessità di ospedalizzazione) non sono risultati statisticamente differenti nei diversi gruppi di trattamento rispetto ai controlli. Il numero dei bambini ospedalizzati è risultato comunque inferiore nel gruppo dei trattati.

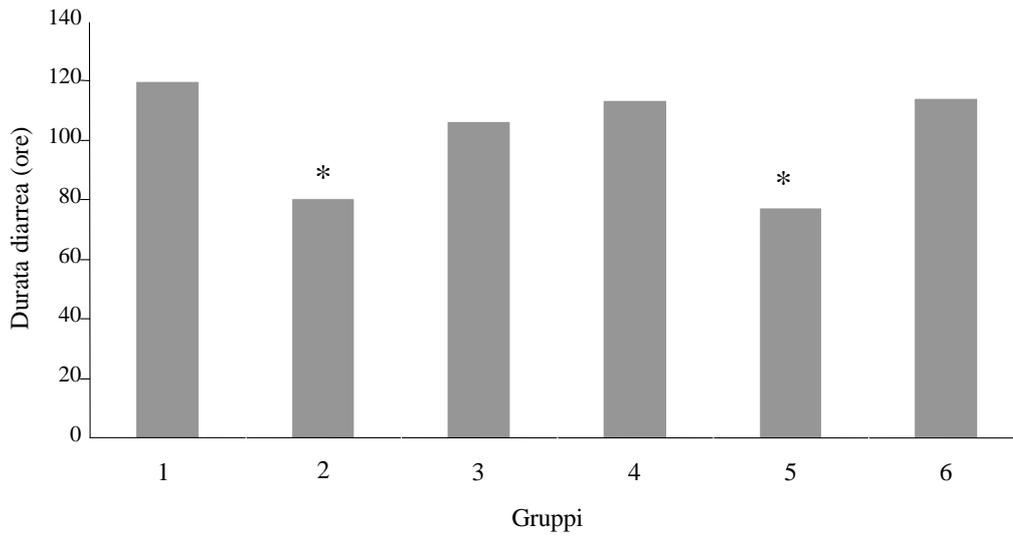


Figura 1b.1 La durata media totale della diarrea risulta significativamente ridotta nei pazienti trattati con ORS + Lactobacillus GG (gruppo 2) e nei pazienti trattati con la miscela di probiotici contenente *L. bulgaricus*, *S. termophilus*, *L. acidophilus* e *B. bifidum* rispetto ai pazienti trattati con la sola ORS e con gli altri probiotici.

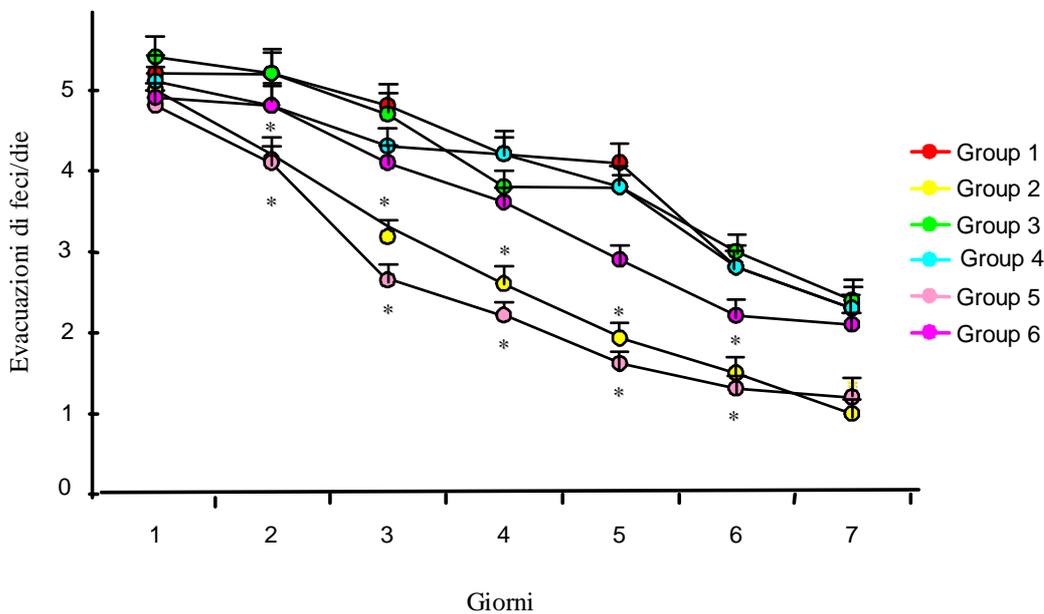


Figura 1b.2 Il numero di evacuazioni/die risulta significativamente ridotto nei pazienti trattati con ORS + Lactobacillus GG (gruppo 2) e nei pazienti trattati con la miscela di probiotici (*L. bulgaricus*, *S. termophilus*, *L. acidophilus* e *B. bifidum*) (gruppo 5).

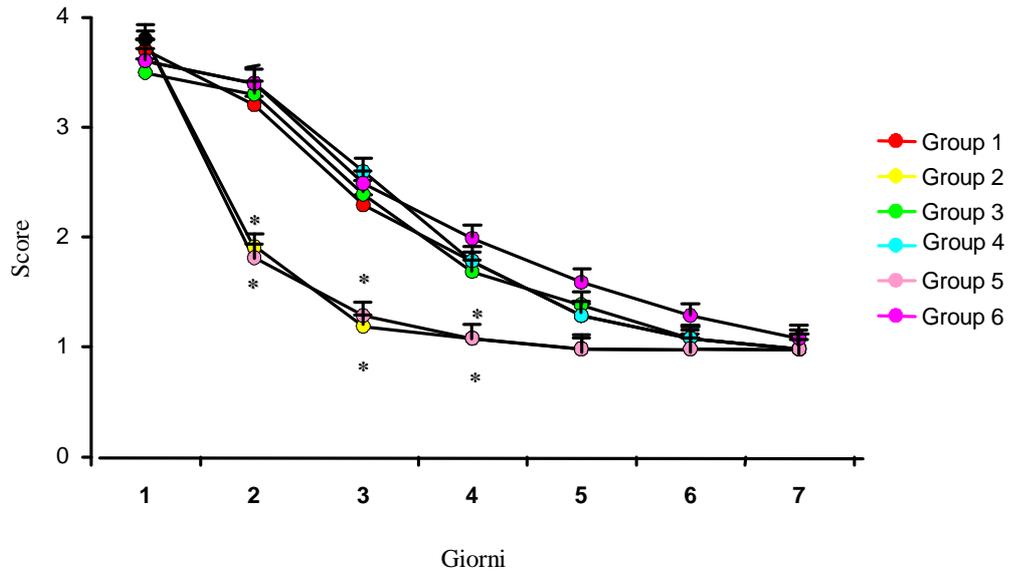


Figura 1b.3 La consistenza delle feci è aumentata nei pazienti trattati con ORS + Lactobacillus GG (gruppo 2) e nei pazienti trattati con la miscela di probiotici contenente *L. bulgaricus*, *S. termophilus*, *L. acidophilus* e *B. bifidum* (gruppo 5)

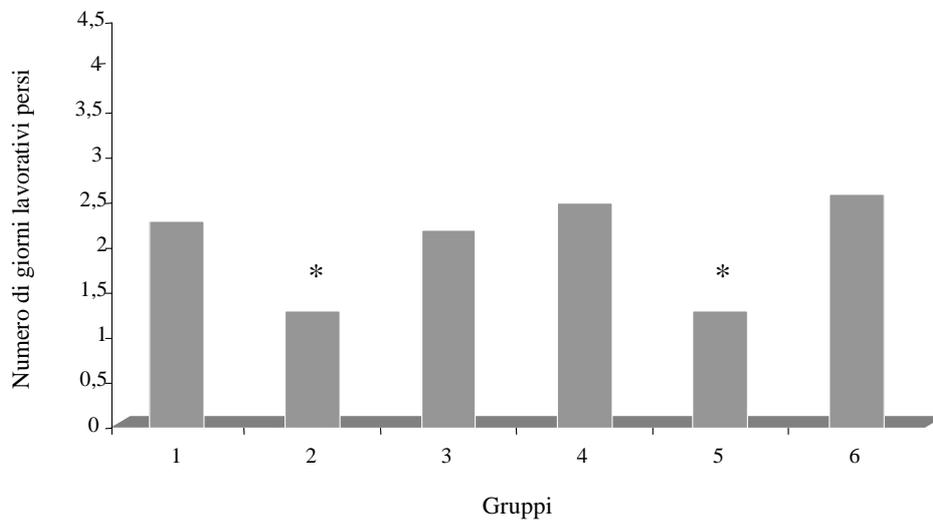


Figura 1b.4 Il numero di giorni lavorativi persi dai genitori risulta significativamente ridotto nei pazienti trattati con ORS + Lactobacillus GG (gruppo 2) e nei pazienti trattati con la miscela di probiotici contenente *L. bulgaricus*, *S. termophilus*, *L. acidophilus* e *B. bifidum* (gruppo 5)

DISCUSSIONE DEI DATI ALLA LUCE DELLE CONOSCENZE DISPONIBILI

La gastroenterite infettiva rappresenta quindi ancora oggi una causa importante di morbilità nei paesi industrializzati ed ha un enorme impatto sulla spesa sanitaria. E' stato calcolato che i costi per la gestione del problema gastroenterite acuta in Italia ammontano a circa 400 miliardi di lire/anno. Risulta evidente che questi costi sono correlati alla durata dei sintomi, pertanto interventi in grado di ridurre la durata della diarrea consentirebbero un importante risparmio della spesa sanitaria. Il cardine della terapia della diarrea acuta rimane la soluzione reidratante orale che consente, se ben utilizzata, di prevenire le gravi complicanze della gastroenterite acuta ed in particolare la disidratazione ma non ha alcun effetto terapeutico nel senso stretto della parola. E' recente la segnalazione che l'uso dell'ORS da sola non soddisfa le aspettative dei genitori che richiedono sempre più spesso un farmaco in grado di fermare rapidamente le manifestazioni cliniche della gastroenterite acuta (31).

Per tali motivi, sebbene la diarrea acuta sia una malattia autolimitantesi, nel corso degli anni sono stati effettuati numerosi tentativi alla ricerca di un farmaco efficace.

Nel passato sono state utilizzate sostanze quali la colestiramina, la loperamide, il caolino, la pectina e il difenossilato (32-35). Negli ultimi anni l'attenzione si è focalizzata sui probiotici e sulla diosmectite. Entrambi posseggono infatti alcuni dei requisiti fondamentali per essere considerati farmaci antidiarroici.

Finora esistono dati clinici di efficacia della diosmectite nel trattamento della diarrea acuta solo in paesi in via di sviluppo dove è risultata in grado di ridurre la durata della diarrea e di favorire un recupero ponderale (26,27). Per i probiotici invece le evidenze di efficacia sia nei paesi industrializzati che nei paesi in via di sviluppo sono numerose e convincenti.

I risultati degli studi condotti, ottenuti su un'ampia popolazione di bambini sani con gastroenterite acuta, hanno dimostrato che sia la diosmectite che alcuni probiotici ed in particolare il *Lactobacillus GG* ed una miscela di diversi probiotici sono efficaci nel ridurre la durata della diarrea.

La diosmectite si è dimostrata efficace sia nell'aumentare la consistenza delle feci che nel ridurre il numero di evacuazioni e pertanto l'effetto ottenuto non può essere considerato un semplice effetto cosmetico; inoltre il rischio di diarrea protratta è risultato significativamente più basso nei pazienti trattati rispetto ai controlli.

In accordo con dati precedentemente pubblicati (25), anche nella nostra popolazione di bambini la diosmectite non ha mostrato effetti benefici sul vomito e sulla febbre. Questo potrebbe essere spiegato da una sua azione limitata all'intestino o dal fatto che il numero di pazienti che presentava tali sintomi in entrambi i gruppi non era sufficiente ad evidenziare un

effetto significativo. Lo stesso può essere affermato per l'effetto sull'ospedalizzazione. Probabilmente un tasso di ospedalizzazione per diarrea acuta dello 0,8% non consente di apprezzare differenze significative.

Nonostante la sua efficacia nella pratica clinica l'uso della diosmectite potrebbe però risultare limitato a causa suo gusto sgradevole.

La maggior parte dei trial clinici finora condotti per valutare l'efficacia dei probiotici nella gastroenterite acuta hanno utilizzato un solo ceppo; non esistono infatti studi comparativi. L'uso di differenti micorganismi probiotici ha consentito di confermare l'efficacia di questi nella terapia della diarrea acuta ma ha anche messo in evidenza che non tutti i probiotici sono ugualmente efficaci. La durata totale della diarrea è risultata ridotta solo con due dei 5 differenti preparati contenenti micorganismi considerati probiotici. La preparazione contenente il *Lactobacillus GG* è risultata associata alla durata più corta; questo risultato non deve sorprendere dal momento che per questo probiotico esistono consistenti prove di efficacia in differenti settings, inclusi bambini ospedalizzati sia nei paesi industrializzati che in quelli in via di sviluppo (9-14). L'altra preparazione efficace è stata la miscela di 4 differenti ceppi. Non esistono trial precedenti che testino l'efficacia di tale preparazione, tuttavia una formula preparata con *Streptococcus termophilus* e *Bifidobacterium bifidum*, due dei ceppi inclusi nella miscela, riduce il rischio di diarrea nosocomiale (36); inoltre dati preliminari hanno evidenziato che la somministrazione di bifidobatteri riduce la durata della diarrea (37).

Una scarsa o assente efficacia è stata invece osservata con le altre tre preparazioni usate. Per il *Saccharomyces boulardii*, la scarsa efficacia è risultata in qualche modo inaspettata. In un precedente trial aperto controllato *Saccharomyces boulardii* è risultato efficace in bambini ospedalizzati e perciò in condizioni cliniche più severe (15). E' probabile che proprio la severità maggiore abbia, in questo caso, consentito di rendere visibile un effetto benefico. Va inoltre sottolineato che alcuni bambini hanno rifiutato di assumere il preparato contenente il *Saccharomyces* a causa del sapore sgradevole.

Per le altre due preparazioni non è stata osservata alcuna efficacia terapeutica. Un precedente trial con *Streptococcus Faecium SF68* ha mostrato la sua efficacia nel ridurre l'incidenza della diarrea associata ad antibiotici in bambini con infezioni respiratorie (38). Infine, nessuno effetto è stato osservato con il *Bacillus subtilis* per il quale non esistono dati a disposizione.

La mancanza di effetti sui parametri di efficacia secondari è probabilmente dovuta alla bassa incidenza di ciascuno dei parametri considerati nella popolazione studiata. Tuttavia, i pazienti

trattati con le due preparazioni efficaci hanno mostrato un modesto anche se non significativo miglioramento dei parametri di efficacia secondaria.

Un risultato particolarmente interessante è la riduzione del numero dei giorni lavorativi persi dai genitori dei bambini trattati. Quest'ultima osservazione ha importanti implicazioni sulla spesa sanitaria se si pensa che circa la metà dei costi della diarrea è dovuta proprio ai giorni di lavoro persi dai genitori.

In conclusione l'uso della diosmectite e di alcuni probiotici consente di ridurre di circa il 20% (pari a circa 1 giorno) la durata dei sintomi correlati alle infezioni intestinali. E' quindi possibile ipotizzare che l'utilizzo su larga scala di questi prodotti in associazione alla ORS, riducendo la durata della diarrea possa ridurre in maniera altrettanto significativa i costi.

CAPITOLO 2. NUOVI APPROCCI TERAPEUTICI DELLA DIARREA INTRATTABILE DELL'INFANZIA

INTRODUZIONE: LA DIARREA INTRATTABILE DELL'INFANZIA

L'insufficienza intestinale è una condizione patologica cronica in cui l'intestino non è in grado di soddisfare i bisogni nutrizionali dell'organismo e pertanto la sopravvivenza e la crescita del paziente dipendono dalla nutrizione parenterale. Questa entità clinica deriva dal riconoscimento della sindrome della "diarrea intrattabile dell'infanzia" che originariamente descriveva una diarrea persistente iniziata entro i 3 mesi di vita, in assenza di infezioni intestinali, non responsiva ad alcun trattamento e gravata da elevata mortalità (39). Nel corso dei decenni l'individuazione di patologie specifiche suscettibili di terapia dietetica e farmacologica hanno determinato una modifica del panorama eziologico della diarrea intrattabile. In particolare le infezioni intestinali che prima rappresentavano un'importante causa di severa prostrazione oggi svolgono un ruolo del tutto marginale. La diarrea intrattabile oggi riconosce come cause principali specifiche alterazioni strutturali dell'enterocita; queste ultime insieme alle alterazioni anatomiche e post-chirurgiche (intestino corto), alle forme su base immunologica (allergica, infiammatoria ed autoimmune) ed alle alterazioni della motilità (pseudostruzione intestinale cronica) costituiscono i 4 principali gruppi eziologici dell'insufficienza intestinale. L'identificazione della patologia di base rappresenta uno step cruciale per definire le appropriate strategie di intervento e per stabilire la prognosi. Per alcune delle cause di insufficienza intestinale esistono trattamenti specifici e spesso risolutivi (gli immunosoppressori nell'enteropatia autoimmune) che consentono di riprendere l'alimentazione per via orale e di sospendere l'alimentazione per via parenterale, per altre quali le alterazioni strutturali dell'enterocita non esistono al momento farmaci efficaci. Il paziente in questi casi dipende in maniera più o meno totale dalla nutrizione parenterale ed in ultima analisi dal trapianto di intestino.

La differente eziologia della diarrea è responsabile delle differenze in termini di fisiopatologia; alcune forme sono infatti caratterizzate da una diarrea osmotica come ad esempio l'intestino corto, mentre altre, quali le alterazioni strutturali dell'enterocita si presentano con una diarrea di tipo secretivo. Dati recenti indicano che in questa forma di diarrea, farmaci attivi sul trasporto intestinale di acqua e ioni quali l'octreotide (analogo della somatostatina) sono risultati efficaci nel ridurre l'output fecale (40,41).

Evidenze sperimentali hanno evidenziato che l'ormone della crescita (GH) agisce sul trasporto transepiteliale di ioni e di acqua nell'intestino di ratto, promuovendo l'assorbimento di acqua e di elettroliti e riducendo la secrezione indotta da diverse sostanze secretagoghe quali la teofillina e la tossina termostabile di *E. coli* (42). L'intensità del suo effetto proassorbitivo è massima a livello del digiuno (43).

Dati contrastanti si sono ottenuti invece sulla capacità del GH di promuovere l'adattamento intestinale in pazienti con sindrome dell'intestino corto. Con il termine di adattamento intestinale si intende un insieme di alterazioni, morfologiche e funzionali a cui va incontro l'intestino che residua dopo un intervento di massiva resezione (44). La risposta alla resezione è immediata e il *primum movens* è rappresentato dalla perdita di tessuto intestinale; più estesa è la resezione più intensa è la risposta di tipo adattativo. Differenti fattori regolano il processo di adattamento intestinale e tra questi vanno ricordati la presenza di nutrienti a livello del lume intestinale, e molti fattori di crescita tra cui l'IGF1, la glutamina, l'ormone della crescita. Il processo di adattamento intestinale ha lo scopo di aumentare le capacità assorbitive dell'intestino e questo si verifica sia inducendo un iperplasia dell'epitelio intestinale che aumentando la capacità degli enterociti residui. A livello enterocitario in risposta alla resezione intestinale si verifica un aumento della trascrizione del sistema di cotrasporto Na^+ /glucosio (45) e dell'attività degli enzimi digestivi (46).

L'intestino corto chirurgico è una delle cause più frequenti di insufficienza intestinale e di dipendenza dalla nutrizione parenterale totale con tutti i rischi che questa comporta. La conoscenza dei meccanismi con cui si verifica l'adattamento intestinale e l'identificazione di fattori che possano accelerare tale processo rappresentano il punto di partenza per poter stabilire nuove strategie terapeutiche. Nel 1995 Byrne e collaboratori hanno dimostrato che una combinazione di dieta ad alto contenuto di carboidrati, glutamina ed ormone della crescita determinava, in 47 pazienti adulti con intestino corto chirurgico, un miglioramento dell'assorbimento di nutrienti, una riduzione del volume fecale ed una riduzione degli apporti per via parenterale (47). Studi clinici randomizzati controllati più recenti non hanno confermato questo effetto (48-50). Nella maggioranza dei pazienti trattati con GH si verifica però una riduzione del volume fecale ed un aumento dell'assorbimento di elettroliti. Da queste evidenze è nata l'idea di utilizzare il GH nei pazienti con diarrea intrattabile in nutrizione parenterale .

OBIETTIVI DELLE RICERCHE

- Studiare i meccanismi dell'effetto proassorbitivo/antisecretivo dell'ormone della crescita

- Valutare gli effetti della somministrazione dell'ormone della crescita a pazienti con diarrea intrattabile

STRATEGIE DI APPROCCIO E METODOLOGIE

Studi in vitro

Sono state utilizzate cellule epiteliali intestinali derivanti da carcinoma umano del colon (Caco2). Le cellule sono state cresciute in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ad alta concentrazione di glucosio, supplementato con FBS al 10%, aminoacidi non essenziali 1% ed antibiotici (penicillina streptomina). Sono stati condotti esperimenti per valutare l'effetto sul trasporto transepiteliale di elettroliti e l'effetto sulla proliferazione cellulare.

Studi di trasporto intestinale. Sono state utilizzate cellule cresciute su filtro in policarbonato (Costar Italia Milano Italia). A 15 giorni post confluenza le cellule sono state montate in camere di Ussing e sono stati monitorati, prima e dopo l'aggiunta mucosale e sierosale del GH, i seguenti parametri elettrici: differenza di potenziale transepiteliale (PD) espressa in mV, intensità di corrente di corto circuito (Isc), espressa in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, conduttanza tissutale (G) espressa in mS/cm^2 . Alla fine di ciascun esperimento la vitalità cellulare è stata valutata misurando la risposta elettrica evocata dall'aggiunta, dal lato sierosale, di teofillina (5mM).

Studi di proliferazione cellulare sono stati utilizzati due differenti metodi: incorporazione di timidina triziata e conta cellulare.

Per l'incorporazione di timidina triziata le cellule sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti (10^4 cellule/pozzetto) per le prime 12 ore (tempo necessario a farle passare nella fase di proliferazione) sono state incubate con DMEM supplementato e per le successive 48 ore con GH. Al termine di tale periodo è stata aggiunta timidina triziata (0.5 mCi/pozzetto). Dopo 18 ore è stata effettuata la lettura della radioattività mediante spettrometro a scintillazione (Packard).

Per la conta cellulare le cellule sono state piastrate in piastre da 24 pozzetti (10^4 cellule/pozzetto) e cresciute in DMEM supplementato per 72 ore; per le successive 24 ore le cellule sono state cresciute in DMEM senza siero e poi trattate con il GH per 48 ore. Al termine dell'incubazione sono state contate in cieco da un operatore. La vitalità cellulare è stata testata con il trypan blue.

Per valutare il ruolo della tirosina kinasi nell'effetto del GH sul trasporto e sulla crescita cellulare è stato utilizzato uno specifico inibitore di tale enzima, il genistein.

Tutti i chimici utilizzati sono stati forniti dalla Sigma (St. Louis, MO, U.S.A)

I mezzi di coltura sono stati forniti dalla Life Technologies (GIBCO BRL Mascia e Brunelli, Milano, Italia).

Il GH ricombinante è stato fornito dalla Serono (Industria Farmaceutica Serono Roma Italia), la timidina triziata dalla Amersham Italia (Milano, Italia), il genistein dalla Calbiochem (San Diego, CA, U.S.A).

Analisi statistica

Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato ed è stato ripetuto almeno 3 volte. I risultati sono espressi come media \pm DS. Il test T student è stato usato per l'analisi statistica.

Studi in vivo

Per la valutazione dell'efficacia del GH nel paziente con diarrea intrattabile è stato condotto uno studio aperto non randomizzato.

Sono stati arruolati 7 bambini (età media $6,5 \pm 1,5$ mesi, range 3-20 mesi; 6 maschi) ricoverati presso il nostro reparto per diarrea intrattabile, in nutrizione parenterale. Dei 7 pazienti, 5 al momento dell'inizio del trattamento avevano una diarrea di tipo secretivo, due erano affetti da sindrome dell'intestino corto chirurgico ed avevano una diarrea di tipo osmotico. E' stata definita diarrea intrattabile una diarrea protratta associata ad insufficienza intestinale per la quale la nutrizione parenterale rappresentava l'unica possibilità di garantire un adeguato apporto calorico e consentire una crescita staturale-ponderale soddisfacente.

Tutti i pazienti sono stati trattati con ormone della crescita (0.1 U/kg/die pari a 0.1 mg/kg/die rhGH-Saizen Serono Laboratories Norwell, MA) somministrato per via sottocutanea 1 volta al giorno per 15 giorni. Al momento dell'inizio del trattamento tutti i bambini erano in condizioni stabili cioè erano in nutrizione parenterale da un tempo sufficiente a garantire una stabilità dal punto di vista metabolico (durata media della nutrizione parenterale precedente il GH 120 ± 30 giorni) e presentavano variazioni del volume fecale e del contenuto fecale in elettroliti inferiore al 10% negli ultimi 10 giorni. Tutti i pazienti erano in NPT esclusiva in quanto ogni tentativo di ridurre la nutrizione parenterale e di introdurre alimenti per via enterale era fallito.

L'apporto calorico con la nutrizione parenterale era distribuito, tra i principali macronutrienti, nel seguente modo: 14 ± 1 % proteine, 38 ± 2 % lipidi, 48 ± 2 % carboidrati. L'apporto proteico era pari circa $2 \pm 0,2$ g/kg/die.

Sono stati scelti come parametri di efficacia della terapia le modificazioni del volume fecale, del contenuto in elettroliti e del gap ionico fecale e della concentrazione sierica di elettroliti .

Il volume fecale è stato valutato pesando le feci delle 24 ore. Il dosaggio degli elettroliti fecali e la valutazione dell'osmolarità fecale sono stati effettuati il giorno prima di iniziare la terapia ed al termine di questa; un gap ionico fecale inferiore a 70 è stato considerato indice di diarrea secretiva mentre un gap superiore a 70 indice di diarrea osmotica. Il peso corporeo è stato misurato quotidianamente. I risultati in termini di peso sono stati espressi come Δ di incremento medio in % in un periodo di 15 giorni. In particolare è stato calcolato l'incremento medio di peso nei 15 giorni prima, nei 15 giorni di terapia e nei 15 giorni dopo la terapia con GH.

Nessun altro farmaco è stato utilizzato contemporaneamente.

Il protocollo è stato approvato dal comitato Etico del Dipartimento di Pediatria dell'Università di Napoli "Federico II" e il consenso informato è stato richiesto ai genitori del bambino prima di iniziare lo studio.

Analisi statistica

I risultati sono espressi come media \pm DS.

Il test T di student è stato utilizzato per paragonare il numero di evacuazioni, il volume fecale, l'apporto di liquidi giornaliero le concentrazioni medie di elettroliti nel siero e nelle feci dei pazienti prima e dopo terapia e le modificazioni del peso.

RISULTATI DELLE RICERCHE

2a. Effetti in vitro del GH sull'intestino: effetto proassorbitivo/antisecretivo ed effetto trofico

Studi di trasporto intestinale. L'aggiunta del GH dal lato sierosale di un monolayer di cellule Caco2 montate in camere di Ussing, ha determinato una riduzione dell'Isc senza alcuna modifica della conduttanza. Tale effetto è in genere espressione di un assorbimento intestinale di ioni. Il decremento massimo si è verificato entro 50 minuti dall'aggiunta del GH (figura 2a.1)

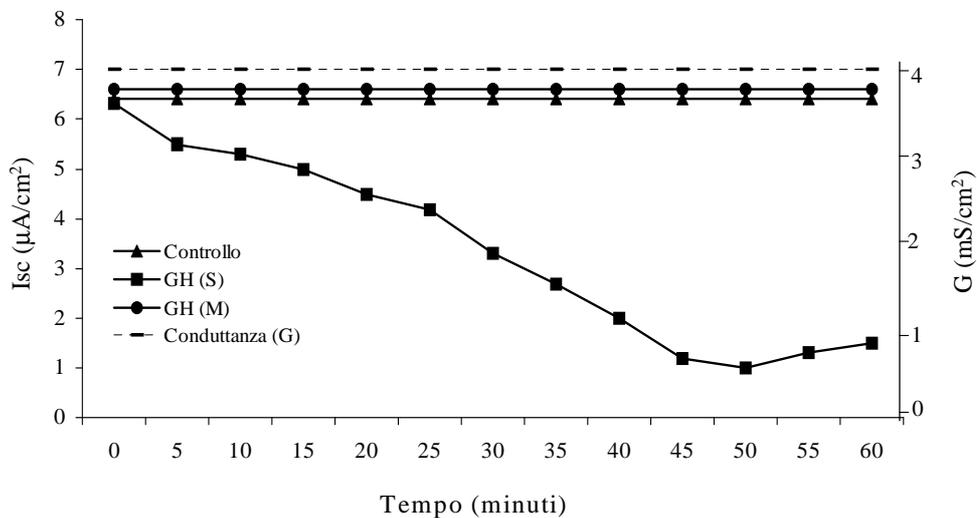


Figura 2a.1. Modificazione della corrente di corto circuito e della conduttanza in seguito all'aggiunta di GH dal lato sierosale e mucosale di un monolayer di cellule Caco2.

L'intensità dell'effetto è risultato dipendente dalla concentrazione del GH; la concentrazione massima efficace è stata 4×10^{-9} M. Concentrazioni maggiori non hanno determinato ulteriori riduzioni dell'Isc indicando una saturazione dell'effetto (figura 2a.2). L'effetto indotto dal GH sulla corrente di corto circuito è cloro-dipendente perché, gli stessi esperimenti condotti in assenza di cloro non hanno evidenziato alcuna modifica dell'Isc.

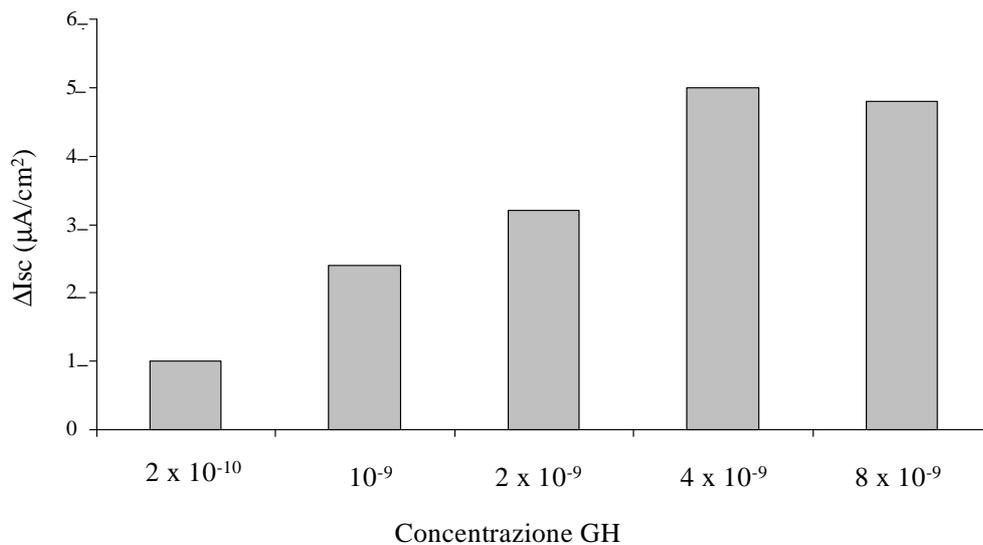


Figura 2a.2 Risposta della corrente di corto circuito in seguito all'aggiunta di concentrazioni crescenti di GH. ΔI_{sc} è la massima differenza tra le cellule controllo e le cellule esposte per 60 minuti al GH.

Per valutare il ruolo della tirosino kinasi nell'effetto proassorbitivo del GH le cellule sono state incubate per 30' con il genistein. L'aggiunta del genistein ha determinato un aumento rapido ma transitorio e non significativo dell' I_{sc} . La successiva aggiunta di GH non ha avuto alcun effetto (figura 2a.3).

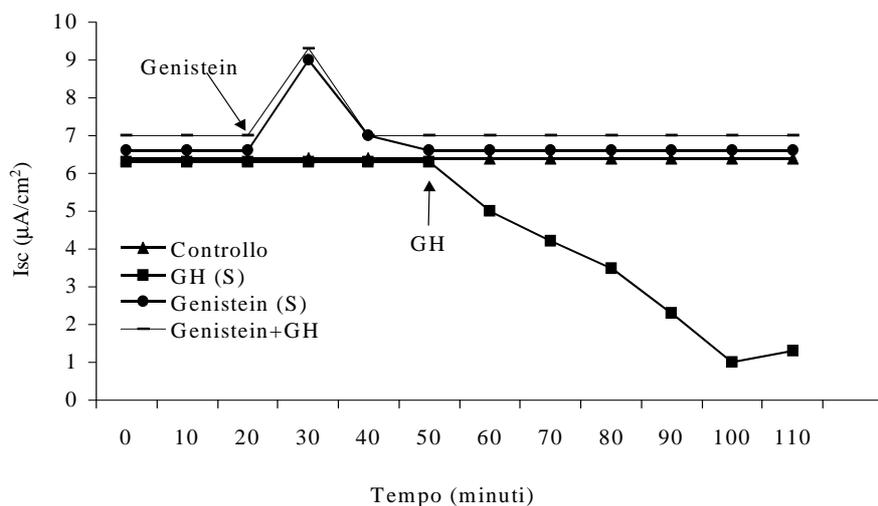


Figura 2a.3. Effetto del genistein da solo o in combinazione con il GH sulla corrente di corto circuito di un monolayer di cellule Caco2.

Studi di crescita cellulare L'esposizione per 48 ore, di cellule non a confluenza, al GH ha indotto un incremento dell'incorporazione di timidina triziata . L'incremento massimo (64% in più rispetto al controllo) è stato ottenuto con una concentrazione di GH pari a 4×10^{-9} M ovvero la stessa concentrazione che ha indotto il massimo effetto proassorbitivo. Gli esperimenti di conta cellulare hanno confermato la capacità del GH di esercitare un effetto trofico a livello intestinale (figura 2a.4). Per valutare se anche l'effetto trofico fosse secondario all'attivazione della tirosino-kinasi, gli esperimenti di incorporazione di timidina e di conta cellulare sono stati condotti pretrattando le cellule con il genistein. La preincubazione con il genistein ha abolito la capacità dell'ormone della crescita di indurre un aumento della proliferazione (figura 2a.4).

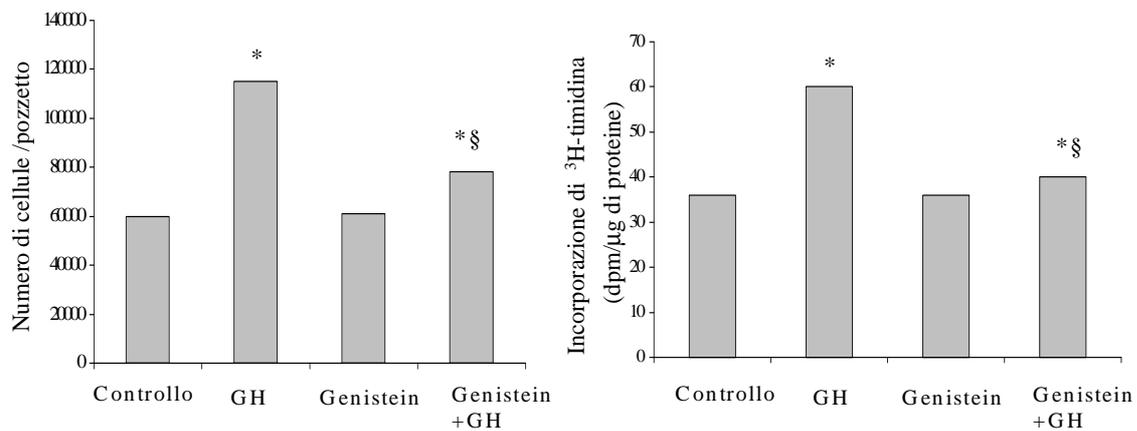


Figura 2a.4. Effetto del genistein sull'incorporazione di timidina e sulla proliferazione cellulare in condizioni basali ed in presenza di GH. La preincubazione del monolayer di cellule Caco2 con il genistein riduce ma non abolisce del tutto l'effetto trofico del GH; la conta cellulare e l'incorporazione di timidina triziata delle cellule incubate con genistein e GH risultano significativamente maggiori rispetto ai controlli.

2b. Effetto in vivo del GH sull'intestino: effetto proassorbitivo/antisecretivo nei pazienti con diarrea "intrattabile"

Sono stati arruolati 7 bambini (età media $6,5 \pm 1,5$ mesi, range 3-20 mesi; 6 maschi), ricoverati presso il nostro Dipartimento per essere alimentati per via parenterale a causa di diarrea intrattabile. Tutti i pazienti hanno completato i 15 giorni di terapia. Durante la terapia con ormone della crescita tutti i parametri presi in considerazione hanno mostrato un significativo miglioramento. Il numero medio di evacuazioni si è ridotto in maniera significativa ($11,8 \pm 5,1$ vs $4,1 \pm 1,5$ $p < 0,01$). La riduzione è stata particolarmente evidente e significativa nei 5 bambini con diarrea secretiva (da $13,8 \pm 4,7$ a $3,6 \pm 1,5$ $p < 0,01$) laddove entrambi i bambini con diarrea osmotica non hanno mostrato alcuna variazione nel numero di evacuazioni (figura 2b.1). L'effetto è stato rapido e progressivo come dimostrato da una riduzione significativa del numero di evacuazioni già in settima giornata di terapia (figura 2b.1). Alla sospensione del trattamento il numero medio di evacuazioni è progressivamente aumentato anche se a distanza di 15 giorni dal termine della terapia risultava ancora inferiore rispetto al valore basale ($p = NS$) (figura 2b.1).

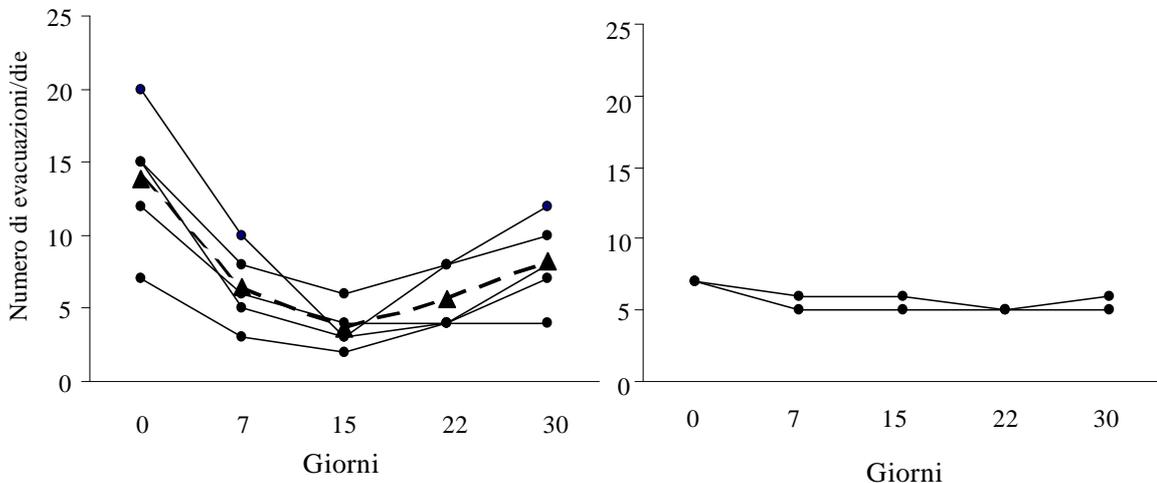


Figura 2b.1. Modificazione del numero di evacuazioni nei bambini trattati con GH. I bambini con diarrea secretiva (pannello A) hanno mostrato una significativa riduzione del numero di evacuazioni a differenza dei bambini con diarrea osmotica (pannello B) durante la somministrazione del GH. La riduzione era significativa già dopo 7 giorni di trattamento e persisteva tale 7 giorni dopo la sospensione. ($p < 0,01$)

In seguito alla somministrazione di GH il volume fecale totale si è ridotto (da 47+/-25 ml/kg/die a 25+/-9 ml/kg/die; $p < 0.05$) consentendo una parallela riduzione dell'apporto di liquidi con la nutrizione parenterale (da 172 +/- 36 ml/kg/die a 125 +/- 36 ml/kg/die; $p < 0.05$) (figura 2b.2).

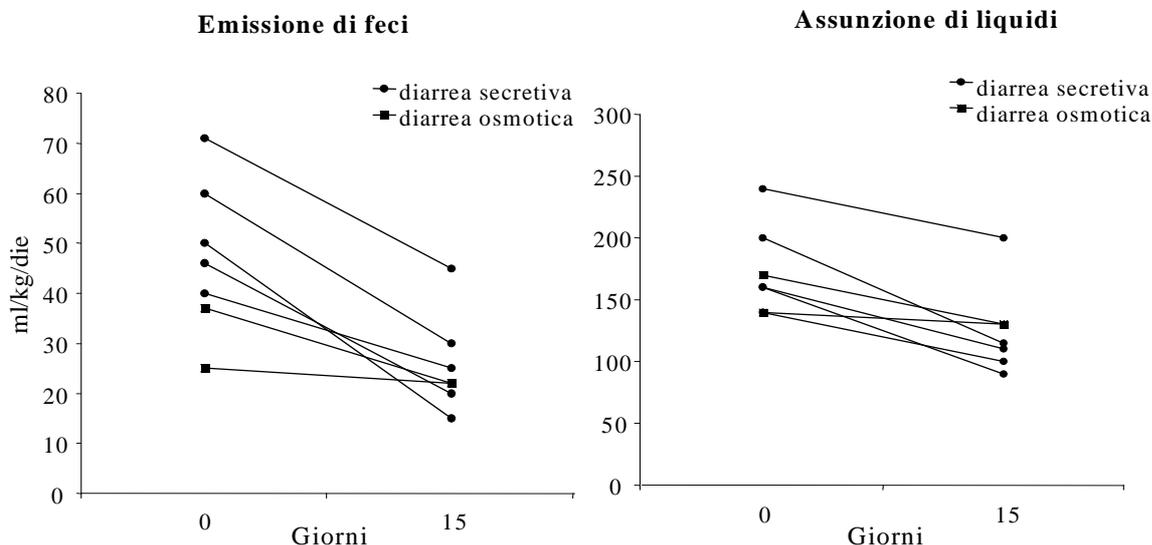


Figura 2b.2. La terapia con GH determina una riduzione del volume fecale (pannello A) in tutti i pazienti trattati anche se in maniera più significativa nei bambini con diarrea secretiva (●) rispetto a quelli con diarrea osmotica (■). Nel pannello B è mostrata la parallela riduzione dell'apporto di liquidi con la nutrizione parenterale.

La somministrazione di GH ha inoltre determinato una significativa riduzione delle concentrazioni fecali di ioni Na^+ e di ioni K^+ (rispettivamente da 98 +/- 26 mEq/l a 43 +/- 42 mEq/l; $p < 0.05$ e da 57 +/- 41 mEq/l a 13 +/- 11mEq/l; $p < 0.05$) (figura 2b.3 e figura 2b.4). Ancora una volta l'effetto è stato più evidente nei 5 bambini con diarrea secretiva; nel bambino con intestino ultracorto le concentrazioni fecali di Na^+ sono rimaste invariate laddove nell'altro bambino con intestino corto si è osservata una sostanziale riduzione del contenuto di sodio nelle feci. L'effetto del GH sulle concentrazioni fecali di Na^+ e K^+ ha mostrato un andamento simile negli stessi pazienti; la riduzione massima del Na^+ si è infatti verificata negli stessi pazienti che hanno presentato le maggiori variazioni del K^+ .

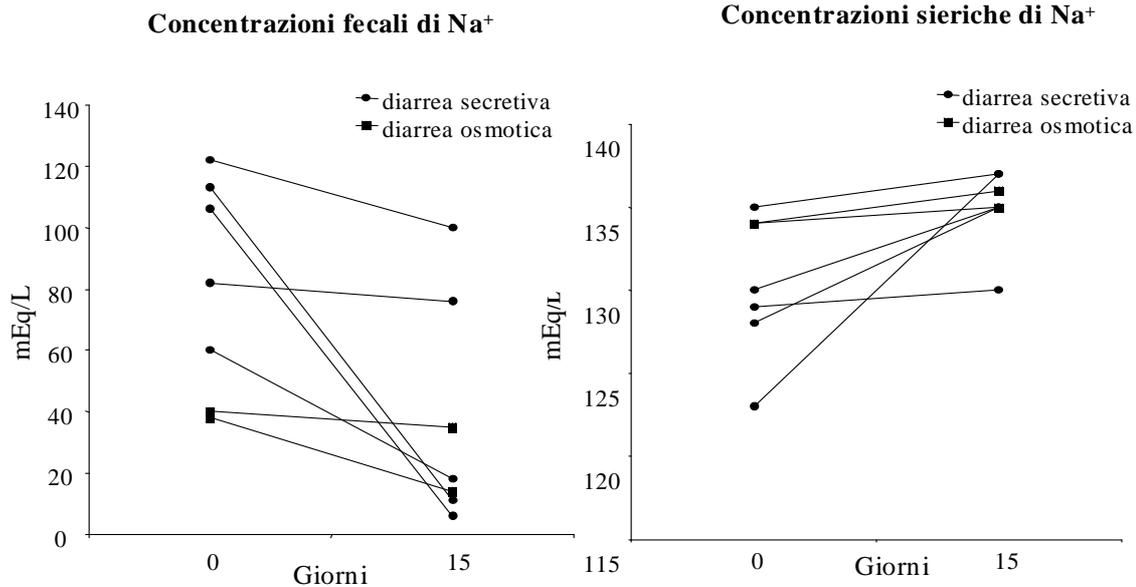


Figura 2b.3. La terapia con GH determina una riduzione delle perdite fecali di Na⁺ (pannello A) in tutti i pazienti trattati anche se in maniera più significativa nei bambini con diarrea secretiva (●) rispetto a quelli con diarrea osmotica (■). Nel pannello B è mostrata il parallelo incremento delle concentrazioni sieriche del Na⁺.

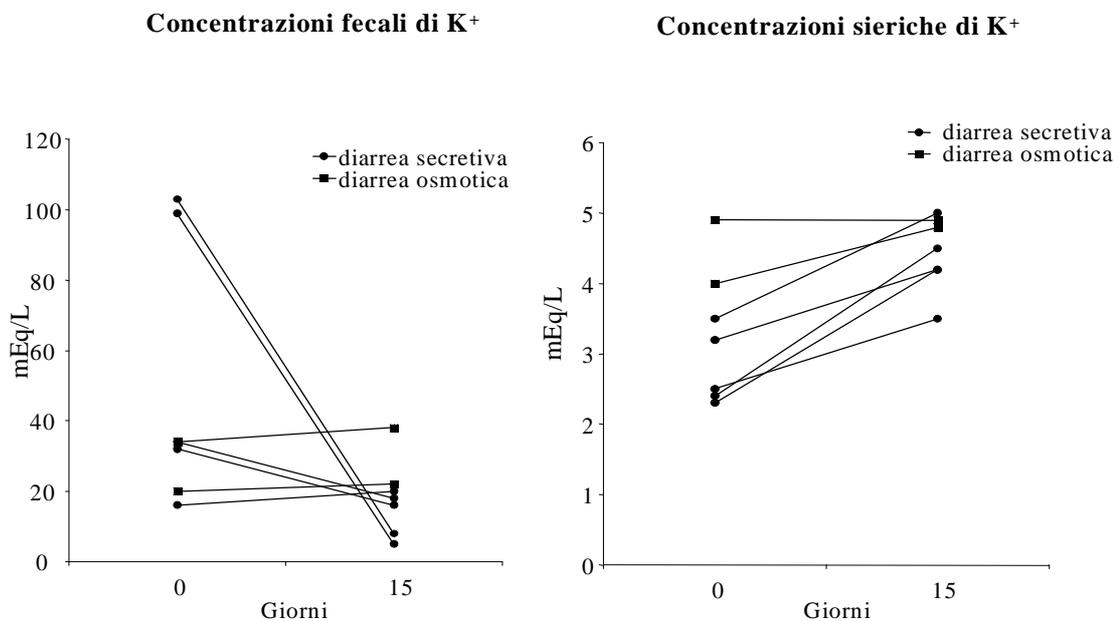


Figura 2b.4. La terapia con GH determina una riduzione delle perdite fecali di Na⁺ (pannello A) in tutti i pazienti trattati anche se in maniera più significativa nei bambini con diarrea secretiva (●) rispetto a quelli con diarrea osmotica (■). Nel pannello B è mostrata il parallelo incremento delle concentrazioni sieriche del Na⁺.

Parallelamente ad una riduzione della concentrazione fecale è stato osservato un aumento delle concentrazioni sieriche degli elettroliti (figura 2b.3 e figura 2b.4).

Infine come conseguenza delle variazioni del contenuto in elettroliti delle feci il gap ionico è aumentato fino a raggiungere valori fisiologici. (da 32 ± 39 a 142 ± 56 ; $p < 0.01$) (figura 2b.5.)

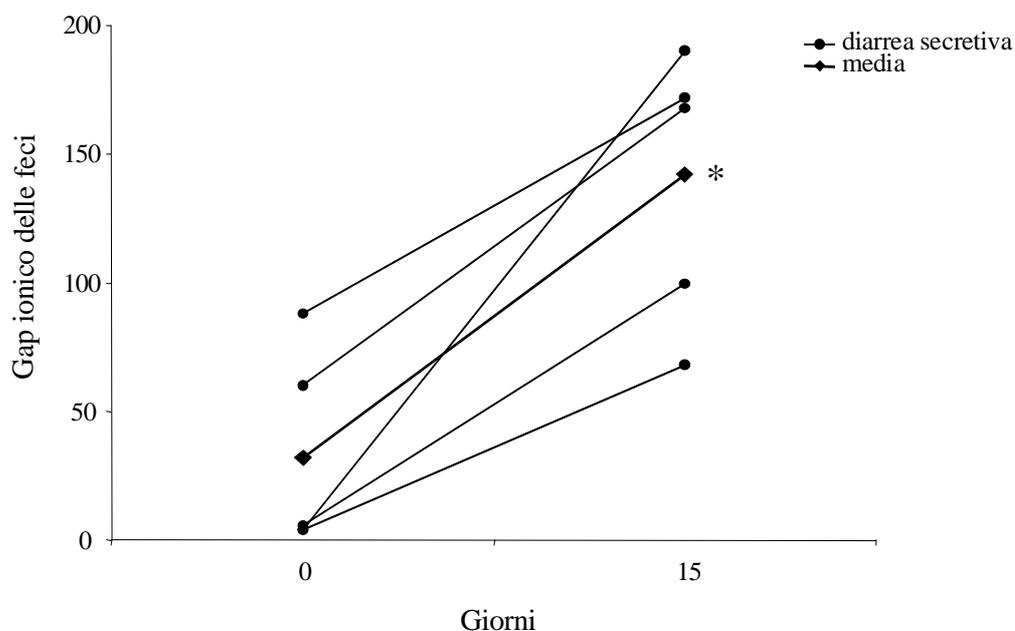


Figura 2b.5 Aumento del gap ionico nei pazienti con diarrea secretiva dopo il trattamento con GH

Durante la terapia con GH l'incremento medio in % del peso è risultato significativamente superiore rispetto a quello dei 15 giorni precedenti l'inizio della terapia ($8,5\%$ vs $2,8\%$; $p < 0.05$); dopo 15 giorni di sospensione l'incremento medio sebbene più basso risultava ancora superiore anche se non significativamente rispetto ai valori basali (figura 2b.6).

Nessun caso di edema periferico è stato osservato nei nostri pazienti; 2 pazienti hanno lamentato dolore articolare all'anca sinistra e al gomito destro rispettivamente, che è regredito spontaneamente dopo alcuni giorni, senza sospensione del trattamento.

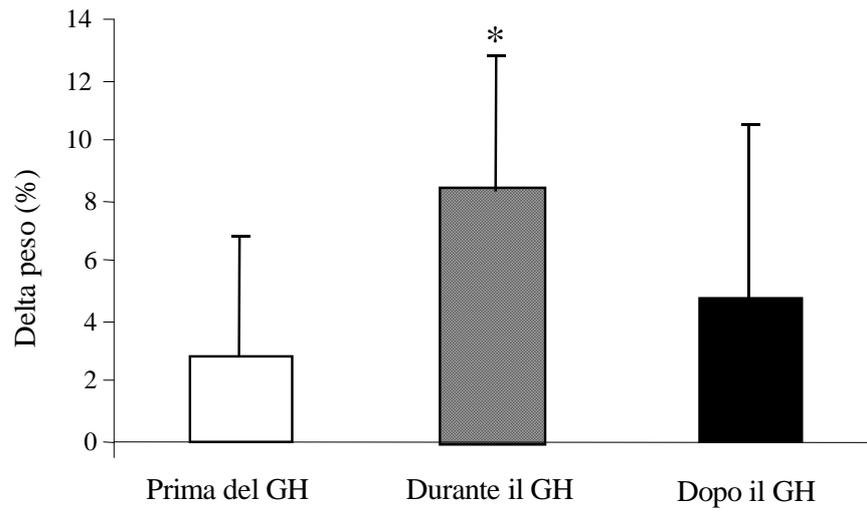


Figura 2b.6 La somministrazione di GH si associa ad un significativo incremento di peso. Tale effetto si riduce nei 15 giorni successivi anche se non si osserva un ritorno ai valori basali..

DISCUSSIONE DEI DATI ALLA LUCE DELLE CONOSCENZE DISPONIBILI

La diarrea intrattabile dell'infanzia è un'entità clinica caratterizzata spesso da una diarrea di tipo secretivo con perdita massiva di acqua e di ioni e da un malassorbimento di nutrienti. Laddove non si riesce a riconoscere una specifica eziologia e quindi ad effettuare un intervento terapeutico mirato il paziente dipende in maniera più o meno totale dalla nutrizione parenterale con tutti i rischi che tale tipo di alimentazione comporta. Quando anche la nutrizione parenterale non è più possibile o per la indisponibilità di accessi vascolari o per la comparsa di gravi effetti collaterali (insufficienza epatica) il paziente con diarrea intrattabile diventa un candidato al trapianto intestinale. Dati recenti della letteratura dimostrano che enormi progressi sono stati effettuati sia in termini di tecnica chirurgica che di gestione del paziente trapiantato. Nonostante ciò si tratta ancora di una procedura gravata da un'elevata mortalità e che pertanto non può e non deve essere considerata di prima scelta. Il trapianto di intestino deve essere preso in considerazione solo quando l'alternativa è rappresentata dall'impossibilità di garantire in altro modo la sopravvivenza del paziente. Per tali motivi, negli ultimi anni sono stati compiuti numerosi sforzi per identificare nuove terapie efficaci nei bambini con diarrea intrattabile. L'ormone della crescita possiede a livello intestinale un duplice effetto: proassorbitivo e trofico. L'effetto proassorbitivo è espresso dalla riduzione della corrente di corto circuito che rappresenta l'equivalente elettrico di un aumentato flusso di anioni dal compartimento mucosale a quello sierosale. Questo può essere a sua volta la conseguenza di un aumentato assorbimento o di una ridotta secrezione. L'abolizione dell'effetto in assenza di ioni cloro suggerisce che il trasporto di tale anione è sicuramente coinvolto. La presenza di effetto proassorbitivo solo quando il GH viene aggiunto dal lato sierosale è in accordo con la dimostrata presenza di recettori specifici per il GH solo sulla membrana basolaterale dell'enterocita. L'effetto trofico, espresso da un aumento dell'incorporazione di timidina triziata e da un aumento della conta cellulare rappresenta un'altra dimostrazione di una diretta interazione tra GH ed enterocita anche se è probabile, che almeno in parte, questo effetto sia mediato dall'IGF II e da altri mediatori autocrini. La riduzione di entrambi gli effetti in presenza di genistein, inibitore specifico dell'attività tirosina kinasica suggerisce che l'azione del GH a livello intestinale è mediata da tale enzima. Dati recenti indicano che lo stesso meccanismo è coinvolto nell'assorbimento di NaCl indotto dall'EGF e mediato dal carrier Na^+/H^+ (51). Va sottolineato che mentre l'effetto proassorbitivo è totalmente abolito dalla preincubazione con il genistein parte dell'effetto trofico residua. Questo fa ipotizzare la coesistenza di meccanismi d'azione multipli il principale di quali sarebbe la tirosina kinasi.

La dimostrazione che l'ormone della crescita possiede a livello intestinale due effetti così importanti rappresenta il razionale per un suo utilizzo in condizioni cliniche, quali la diarrea intrattabile e l'insufficienza intestinale, in cui vengono ad essere alterate sia la funzione assorbitiva digestiva che la funzione di trasporto transepiteliale di elettroliti.

I risultati dello studio clinico, sebbene ottenuti in campione piccolo di pazienti, sono stati incoraggianti. Tutti i bambini con diarrea secretiva hanno mostrato una riduzione delle perdite intestinali di acqua, e di elettroliti.

Il ruolo diretto e specifico del GH nell'effetto proassorbitivo è indicato da un peggioramento della diarrea e del peso osservato alla sospensione del trattamento.

Un effetto simile è stato descritto in pazienti adulti con sindrome dell'intestino corto che ricevevano GH e glutamina in associazione ad una dieta ricca in carboidrati e povera di lipidi (47,48). In questo caso non era chiaro se l'effetto era direttamente correlato al GH perché una simile risposta si aveva anche con la dieta da sola o con la dieta associata a GH o glutamina.

Dati contrastanti, invece, sono stati ottenuti da Hogenauer che non ha evidenziato alcun effetto proassorbitivo in 6 volontari sani trattati con GH per via sottocutanea (52).

Esistono quindi dati in favore di una efficacia del GH in soggetti malati ma non in volontari sani; questo suggerisce che il GH potrebbe agire in condizioni di alterata omeostasi (massiva perdita di intestino in seguito a interventi di resezione) e che quindi potrebbe promuovere e facilitare il processo di adattamento. Comunque, al momento, non esistono ancora prove dirette. E' noto che numerosi fattori come ad esempio la glutamina e l'alimentazione stessa possono svolgere funzioni importanti. Nessuno dei nostri pazienti era alimentato per via orale al momento della terapia con GH e non abbiamo dati sull'assorbimento di nutrienti perché la breve durata del trattamento non sarebbe stata sufficiente ad indurre significative modificazioni delle funzioni assorbitive intestinali. Ciò nonostante l'effetto positivo del GH si è mantenuto, anche se di grado minore, per 15 giorni dopo la sospensione; questo potrebbe essere spiegato dall'attivazione di una cascata di segnali intracellulari che attiverebbero specifici geni regolatori della crescita (53).

L'effetto sul trasporto transepiteliale di ioni è stato chiaro ed evidente nei pazienti con diarrea secretiva ed anzi maggiori erano le perdite intestinali di acqua e di elettroliti e più significativa è stata la risposta. Meno chiaro invece è risultato il ruolo del GH nei pazienti con sindrome dell'intestino corto in quanto solo in uno dei 2 pazienti si è verificata una riduzione sia del volume che delle concentrazioni fecali di sodio. Le spiegazioni potrebbero essere diverse; in primo luogo il paziente che non ha risposto aveva un intestino ultracorto (solo 12 cm) e quindi veniva a mancare il sito d'azione del GH. In secondo luogo entrambi i pazienti

non avevano importanti perdite intestinali di acqua e di elettroliti e pertanto la risposta clinica potrebbe non essere stata altrettanto evidente. In terzo luogo 2 pazienti sono pochi per poter confermare o negare l'efficacia di un intervento terapeutico.

In conclusione i dati riportati indicano che la somministrazione di GH a pazienti con diarrea secretiva è in grado di ridurre le perdite intestinali di acqua ed elettroliti consentendo di ridurre anche l'apporto di liquidi per via parenterale. Considerato che il GH in vitro possiede effetti proassorbitivi e trofici sull'epitelio intestinale è ipotizzabile che un trattamento più lungo possa indurre anche effetti benefici sulla funzione assorbitiva intestinale. Questi risultati rappresentano quindi la premessa per uno studio clinico randomizzato controllato che confermi l'efficacia del GH nel trattamento della diarrea intrattabile dell'infanzia.

CAPITOLO 3. NUOVI ASPETTI FISIOPATOLOGICI E NUOVI APPROCCI TERAPEUTICI DELL'ENTEROPATIA ASSOCIATA AD INFEZIONE DA HIV

INTRODUZIONE: L'ENTEROPATIA ASSOCIATA AD INFEZIONE DA HIV

L'intestino rappresenta uno degli organi bersaglio dell' infezione da HIV in età pediatrica. Durante la progressione della malattia la diarrea cronica ed il malassorbimento contribuiscono ad una progressiva perdita di peso ed all'instaurarsi di uno stato di distrofia con aumento della morbilità e della mortalità nei pazienti con infezione da HIV (54).

L'eziologia della diarrea in questi pazienti rimane sconosciuta in più del 30 % dei casi ed è stato ipotizzato che lo stesso virus HIV possa essere responsabile del danno intestinale che si riscontra all'esame istologico. Quest'ultimo, caratterizzato da un'atrofia dei villi intestinali con ipertrofia delle cripte associata a difetti di maturazione dell'enterocita, configura la cosiddetta enteropatia da HIV (55). A supporto dell'ipotesi di un ruolo eziologico del virus HIV nella fisiopatologia della diarrea cronica e della sindrome da malassorbimento esistono evidenze del riscontro di proteine virali o di acido nucleico del virus HIV in cellule epiteliali intestinali. E' stato inoltre dimostrato che alcune cellule di derivazione epiteliale umana possono essere infettate dal virus (56). Dati recenti dimostrano inoltre che alcuni effetti dell' infezione da HIV non sono direttamente correlati alla propagazione del virus ma sono mediati da proteine virali; è stato ipotizzato che il virus HIV possa alterare la morfologia e la funzione maturativa delle cellule intestinali senza necessariamente infettare l'enterocita (57). Il virus dell'immunodeficienza umana acquisita codifica oltre che per proteine strutturali ed enzimatiche anche per un gruppo di proteine regolatorie tra le quali la proteina Tat, indispensabile per la replicazione virale. Nonostante la sua localizzazione nucleare la proteina Tat viene escreta, ed è riscontrabile nel siero dei pazienti con infezione da HIV. Evidenze sempre più numerose sostengono il ruolo svolto dalla proteina Tat in diverse disfunzioni immuni e non, associate alla infezione da HIV (58-60). Prima dell'introduzione della terapia di combinazione con inibitori delle proteasi il danno intestinale era molto più frequente e più grave; molto spesso i pazienti con infezione da HIV presentavano quadri severi di malassorbimento intestinale di carboidrati associato a perdite fecali di proteine e di lipidi (61,62) con aumento della permeabilità intestinale e malassorbimento di ferro (63). Studi molto recenti hanno inoltre dimostrato che parte della steatorrea che si riscontra nei pazienti con infezione asintomatica da HIV può essere spiegata dal riscontro di un'insufficienza pancreatica (64,65). Qualunque sia la causa, lo stato di malnutrizione contribuisce in maniera significativa al peggioramento dell'immunodeficienza ed all'aumento del rischio di infezioni

(66). Le infezioni intestinali sono particolarmente frequenti e severe nel bambino con infezione da HIV; in questi pazienti esiste inoltre un rischio maggiore di decorso protratto della diarrea con peggioramento dello stato di malassorbimento e quindi di malnutrizione. Questo spiega perchè nel paziente immunodeficiente con gastroenterite acuta vanno eseguite indagini microbiologiche: Lo scopo è quello di conoscere l'agente eziologico e di instaurare un'adeguato trattamento farmacologico. In particolare per l'infezione da Rotavirus in attesa che venga ripreso il programma vaccinale, la somministrazione di immunoglobuline sieriche per via orale alla dose di 300 mg/kg risulta efficace nel ridurre la durata della sintomatologia e l'escrezione virale (67). A prescindere dalla terapia specifica dell'episodio acuto, un intervento nutrizionale adeguato è fondamentale per garantire una migliore qualità di vita del paziente. L'obiettivo fondamentale è quello di prevenire deficit nutrizionali e/o di correggere gli eventuali deficit già presenti. La somministrazione di un elevato apporto calorico può essere effettuata in due modi: le diete ipercaloriche e la nutrizione enterale continua tramite pompa peristaltica; quest'ultima consente di aumentare il tempo di contatto della superficie intestinale con il cibo in modo da sfruttare a pieno le residue funzioni assorbitive/digestive. Esistono evidenze cliniche che adulti malnutriti con AIDS conclamato rispondono alla riabilitazione nutrizionale effettuata per via parenterale o enterale con un incremento del peso e della massa grassa (68-70). I dati in età pediatrica sono ancora preliminari ed indicano che bambini con infezione da HIV supplementati per gastrostomia mostrano un incremento significativo del peso; la risposta clinica alla terapia nutrizionale è migliore nel gruppo di pazienti con livelli più elevati di CD4 (71,72).

Esistono quindi i presupposti per pensare che interventi di tipo nutrizionale possano migliorare le funzioni assorbitive intestinali del paziente con HIV.

OBIETTIVI DELLE RICERCHE

- Stabilire il ruolo della proteina Tat prodotta dal virus HIV nella fisiopatologia del danno intestinale associato all'infezione da HIV.
- Valutare l'effetto della nutrizione clinica sul malassorbimento di carboidrati nei bambini con infezione da HIV.
- Valutare l'effetto della terapia con estratti pancreatici nel malassorbimento di lipidi associato all'infezione da HIV.

STRATEGIE DI APPROCCIO E METODOLOGIE

Studi in vitro

I materiali ed i metodi utilizzati per valutare l'effetto di Tat 1 a livello intestinale sono stati precedentemente descritti (vedi capitolo 2). Sono stati condotti esperimenti per lo studio degli effetti di Tat sul trasporto intestinale utilizzando le camere di Ussing e studi di proliferazione cellulare utilizzando la conta cellulare e l'incorporazione di timidina triziata. In aggiunta, considerato che Tat 1 è considerata una tossina in grado di indurre apoptosi in altri modelli sperimentali, per valutare un eventuale effetto citotossico a livello intestinale sono stati effettuati anche esperimenti per lo studio dell'integrità dell'epitelio intestinale. Quest'ultima è stata valutata misurando la resistenza elettrica transepiteliale (TEER) di un monolayer di cellule a 15 giorni postconfluenza. Il monitoraggio della TEER è stato effettuato con apposito voltmetro (Millicel-ERS; Millipore, Milano Italia). I suoi valori sono espressa in ohms/cm².

Tutti gli esperimenti per valutare l'effetto di Tat sono stati condotti anche in presenza di specifici anticorpi anti Tat.

Tutti i chimici utilizzati sono stati forniti dalla Sigma (St. Louis, MO, U.S.A)

I mezzi di sono state fornite dalla Life Technologies (GIBCO BRL Mascia e Brunelli, Milano, Italia), la proteina Tat di HIV1 e gli anticorpi policlonali anti Tat dalla Tecnogen (Piana di Monteverna, Italy).

Analisi statistica

Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato ed è stato ripetuto almeno 3 volte. I risultati sono espressi come media \pm ES. Per l'analisi statistica è stato usato il test T student.

Studi in vivo

Gli studi clinici condotti nel paziente con infezione da HIV e malassorbimento intestinale sono stati condotti in collaborazione con altri Centri che aderiscono al Registro Italiano per l'infezione da HIV in età Pediatrica. Sono stati studi aperti in cui parametri auxologici, parametri di funzione intestinale e alcuni parametri immunologici sono stati valutati prima e dopo l'intervento terapeutico stabilito (nutrizione enterale/parenterale per il malassorbimento dei carboidrati e la somministrazione di estratti pancreatici per il malassorbimento di lipidi).

Per la valutazione dell'effetto della nutrizione enterale o parenterale sulla funzione assorbitiva intestinale sono stati arruolati tutti i pazienti con infezione da HIV sottoposti per motivi clinici ad un intervento di tipo nutrizionale.

E' stata definita nutrizione parenterale la somministrazione attraverso una vena centrale di almeno l' 80% dell'apporto calorico quotidiano per un minimo di 15 giorni mentre la nutrizione enterale è stata intesa come la somministrazione di nutrienti (formule prive di lattosio e/o idrolisati, ad alto contenuto calorico) attraverso un sondino nasogastrico per un minimo di 15 giorni; l'infusione è stata effettuata in maniera continua nelle 24 ore tramite una pompa peristaltica; successivamente, una volta raggiunta una stabilità delle condizioni nutrizionali, l'infusione di 24 ore è stata sostituita da un'enterale notturna consentendo un normale accesso all'alimentazione per via orale durante il giorno. L'apporto calorico è stato calcolato considerando quello di un bambino della stessa età con un peso corrispondente al 50° percentile.

Per ciascun paziente arruolato il Centro di Riferimento ha fornito una scheda in cui venivano precisate le indicazioni all'inizio dell'alimentazione clinica ed alcune informazioni riguardanti parametri auxologici, la conta dei CD4 e la classe HIV. Quest'ultima è stata stabilita utilizzando i criteri per la classificazione dell'infezione da HIV in età pediatrica dei CDC di Atlanta del 1994 (73).

La funzione assorbitiva intestinale è stata valutata con il test allo xilosio; il valore cut-off della concentrazione ematica di xilosio era 25 mg %; valori più bassi sono stati considerati indice di malassorbimento di carboidrati.

Per lo studio volto alla valutazione dell'effetto della terapia con estratti pancreatici sulla steatorrea del paziente con HIV sono stati arruolati pazienti con malassorbimento di lipidi definito dal riscontro in almeno due occasioni consecutive di uno steatocrito al di sopra dei valori normali per l'età (74). Anche per questi pazienti sono state richieste al Centro di Riferimento informazioni riguardanti lo stato della malattia.

La perdita di lipidi nelle feci è stata valutata con il metodo dello steatocrito al momento dell'arruolamento, due settimane dopo in assenza di trattamento specifico e a distanza di 2 settimane dall'inizio della somministrazione di estratti pancreatici (1000 unità di lipasi per grammo di grassi assunti con l'alimentazione).

Al momento dell'arruolamento è stata effettuata una valutazione della funzione pancreatica, effettuando il dosaggio nelle feci di elastasi e chimotripsina, per stabilire se la steatorrea fosse secondaria ad insufficienza pancreatica o ad un malassorbimento intestinale di lipidi.

Analisi statistica

Per lo studio sul malassorbimento dei carboidrati le variabili categoriche sono state analizzate con il Pearson's χ^2 , applicando il test di Fisher quando necessario. Tutte le variabili continue sono state paragonate con il test T Student. Le modificazioni dei livelli di CD4, dello xilosio

e del peso prima e dopo la riabilitazione nutrizionale sono state analizzate con il test Wilcoxon. I risultati sono espressi come media +/- ES.

Per paragonare i valori di steatocrito durante le differenti fasi dello studio è stato utilizzato il test di Student per dati appaiati. Il test di Fischer è stato utilizzato per paragonare la frequenza di casi che avevano uno steatocrito normale con o senza supplementazione con estratti pancreatici. Il test χ^2 per valutare la frequenza dei casi di malassorbimento guariti, migliorati o rimasti invariati con o senza la terapia con enzimi pancreatici. Infine è stato applicato il test di correlazione di Spearman per determinare la presenza di correlazione tra i valori basali di steatocrito e le sue modificazioni durante le fasi dello studio con i seguenti parametri: classe HIV, peso e conta di linfociti CD4.

RISULTATI DELLE RICERCHE

3a. Ruolo della proteina Tat di HIV-1 nella fisiopatologia della disfunzione intestinale associata ad HIV

Effetti di Tat sul trasporto ionico transepiteliale in cellule Caco2. L'aggiunta di Tat al lato sierosale di un monolayer di cellule Caco2 ha determinato un effetto di tipo secretivo caratterizzato da un aumento dell'Isc e del PD senza modificazioni della conduttanza ionica tissutale, come da movimento transepiteliale di ioni senza modificazione dell'integrità tissutale. L'Isc ha avuto un picco entro 40' dall'aggiunta della Tat (figura 3a.1). L'effetto sull'Isc è risultato dose-dipendente con una concentrazione minima efficace di 0.001 nM. L'effetto massimo si è osservato con concentrazioni di 0.1 nM, concentrazioni più alte non hanno determinato ulteriori incrementi dell'Isc indicando che l'effetto enterotossico era saturabile (figura 3a.2). In presenza di soluzione Ringer senza Cl⁻ l'effetto elettrico è stato virtualmente abolito indicando che l'effetto della Tat sull'Isc è interamente dovuto a secrezione transepiteliale di Cl⁻. Per dimostrare la specificità dell'effetto enterotossico, sono stati effettuati esperimenti di neutralizzazione, utilizzando anticorpi policlonali anti Tat. Tat (0.1 nM) è stata incubata a 37 ° in soluzione Ringer per 1 ora con concentrazioni crescenti di anticorpi prima della sua aggiunta in camere di Ussing. In queste condizioni sperimentali l'effetto elettrico della Tat è risultato significativamente ridotto (figura 3a.1).

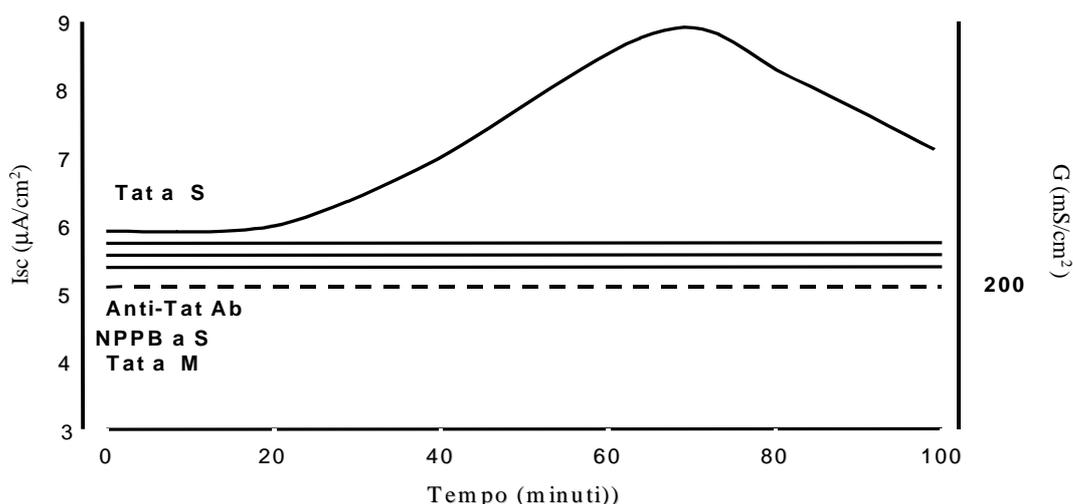


Figura 3a.1 L'aggiunta di Tat dal lato sierosale determina un aumento dell'Isc con un picco massimo a 40 minuti. Tale aumento non si accompagna ad un aumento della conduttanza tissutale. L'effetto non è presente quando la Tat viene aggiunta dal lato mucosale. In presenza di NPPB (inibitore dei canali del Cloro) l'effetto non viene elicitato. Lo stesso accade con l'uso di anticorpi specifici anti-Tat.

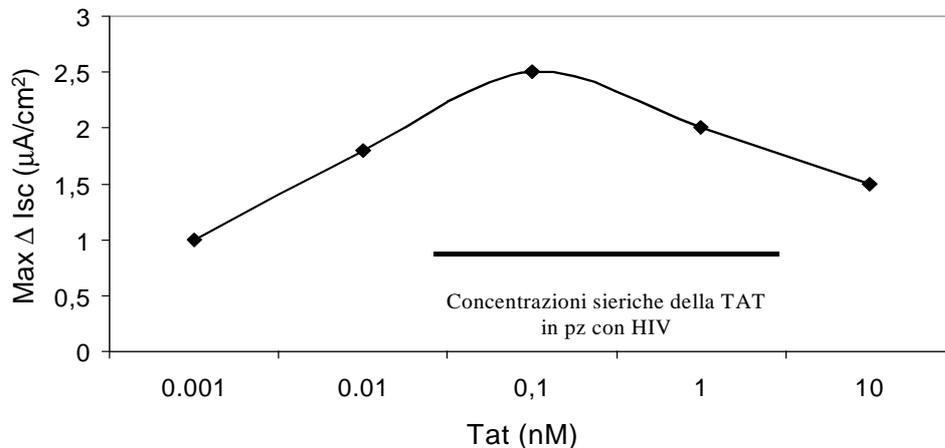


Figura 3a.2. La concentrazione minima di Tat in grado di indurre l'effetto elettrico è 0.001 nM. L'effetto è massimo con concentrazioni di 0.1 nM; concentrazioni più alte non determinano un ulteriore incremento dell'Isc.

Meccanismi dell'effetto enterotossico Tat indotto. Esperimenti condotti in presenza di acido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)-benzoico (NPPB), inibitore dei canali del cloro, non hanno evidenziato alcun effetto enterotossico di Tat (figura 3a.1) confermando che tale effetto è correlato all'attività dei canali del cloro.

Considerato che la maggior parte delle enterotossine batteriche agisce attraverso una modificazione della concentrazione intracellulare di cAMP e cGMP, per valutare il possibile coinvolgimento di questi sistemi nell'effetto di Tat, le concentrazioni di entrambi i nucleotidi ciclici sono state determinate prima e dopo l'esposizione alla proteina virale. L'aggiunta di Tat non ha determinato alcuna modifica delle concentrazioni di cAMP e di cGMP.

Dal momento che Tat in altri modelli sperimentali interagisce con i canali L del calcio sono stati condotti esperimenti in presenza di un agonista specifico di questi canali, il Bay K8644. Le cellule sono state incubate per 20' con Bay K8644 (1 mM) dal lato sierosale, e successivamente è stata aggiunta Tat (0.1 nM) dal lato sierosale. L'aumento dell'Isc in queste condizioni è risultato significativamente minore rispetto a quello indotto dalla sola Tat.

Effetti di Tat sul trasporto ionico intestinale umano. Lo studio dell'effetto enterotossico di Tat è stato effettuato anche su frammenti di mucosa colonica umana ottenuti da campioni chirurgici. L'aggiunta di Tat 0.1 nM dal lato sierosale di epitelio colonico umano ha determinato un effetto secretivo simile a quello ottenuto in cellule Caco2, caratterizzato cioè

da un aumento nell'Isc interamente correlato ad una modificazione della differenza di potenziale senza variazioni della conduttanza (figura 3a.3). Non è stato osservato alcun effetto sui parametri elettrici quando Tat è stata aggiunta dal lato mucosale.

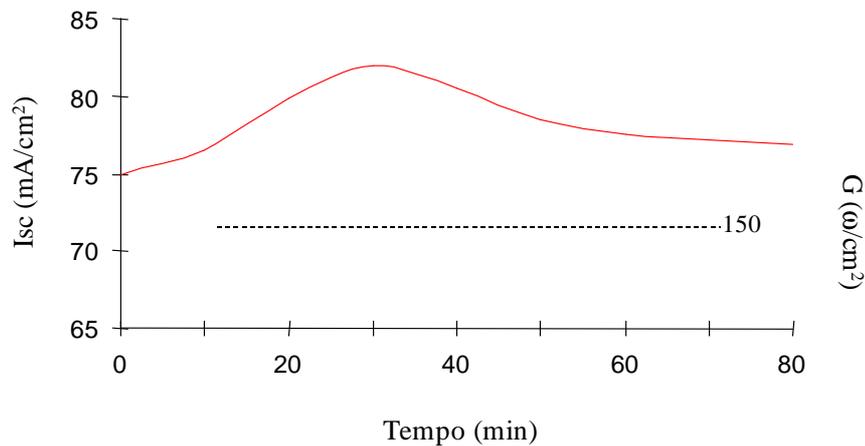


Figura 3a 3. L'aggiunta di tat dal lato sierosale di frammenti di colon umano determina un aumento dell'Isc con un picco massimo a 40 minuti. Tale incremento dell'Isc non si accompagna ad alcuna modifica della conduttanza tissutale.

Effetti della Tat sull'integrità dell'epitelio intestinale. Per valutare se Tat, analogamente a quanto dimostrato in altri modelli sperimentali, avesse anche a livello intestinale un effetto citotossico sono stati condotti esperimenti di monitoraggio della resistenza elettrica transepiteliale, indice di integrità del monolayer cellulare, e studi sulla proliferazione cellulare. Concentrazioni di Tat mucosali o sierosali superiori a 100 nM non hanno determinato alcuna modifica della TEER (figura 3a.4).

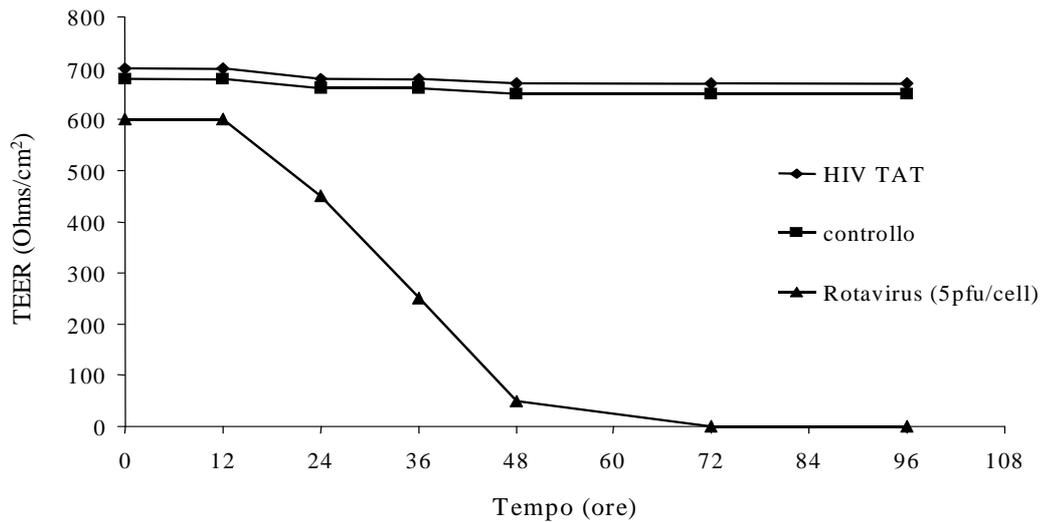


Figura 3a.4. L'aggiunta di Tat dal lato sierosale di cellule Caco2 non induce una riduzione della resistenza elettrica transepiteliale.

L'effetto di Tat sul trofismo della mucosa intestinale è stato studiato utilizzando: l'incorporazione di timidina triziata e la conta cellulare. L'esposizione continua di cellule Caco2 a Tat per 48 ore ha determinato un'inibizione, dose-dipendente, dell'incorporazione di timidina (figura 3a.5); l'inibizione massima (più del 50%) si è verificata con 0.1 nM ovvero la stessa concentrazione in grado di indurre il massimo effetto sul trasporto di ioni. Gli esperimenti di conta cellulare hanno confermato i risultati dell'incorporazione di timidina triziata.

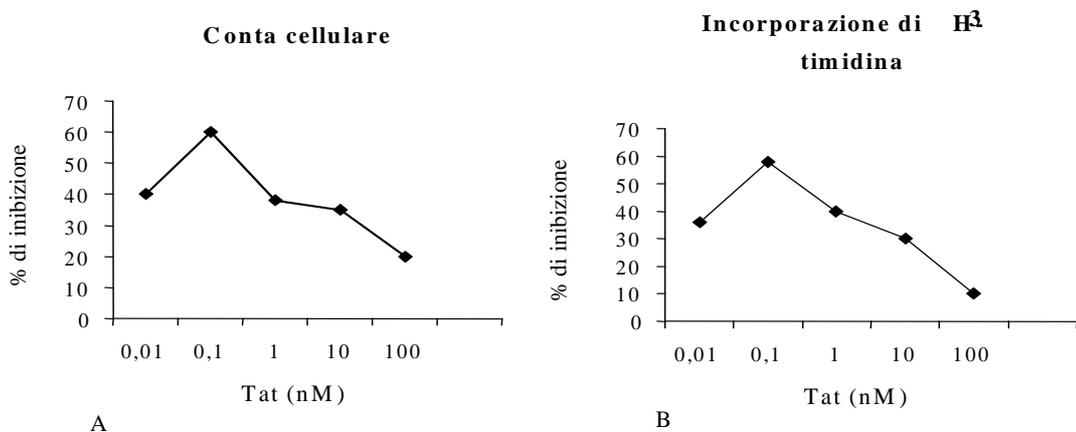


Figura 3a.5. L'esposizione di cellule Caco2 a Tat inibisce la proliferazione cellulare. Tat (0.1 nM) determina una riduzione della conta cellulare (pannello A) e dell'incorporazione di timidina triziata (pannello B) di più del 50% .

L'aggiunta di Bay K8644 (1mM) al mezzo di coltura 1 ora prima dell'aggiunta di Tat e l'incubazione di tat con anticorpi specifici anti-Tat ha inibito in maniera significativa l'effetto indotto dalla proteina virale sulla crescita cellulare (figura 3a.6).

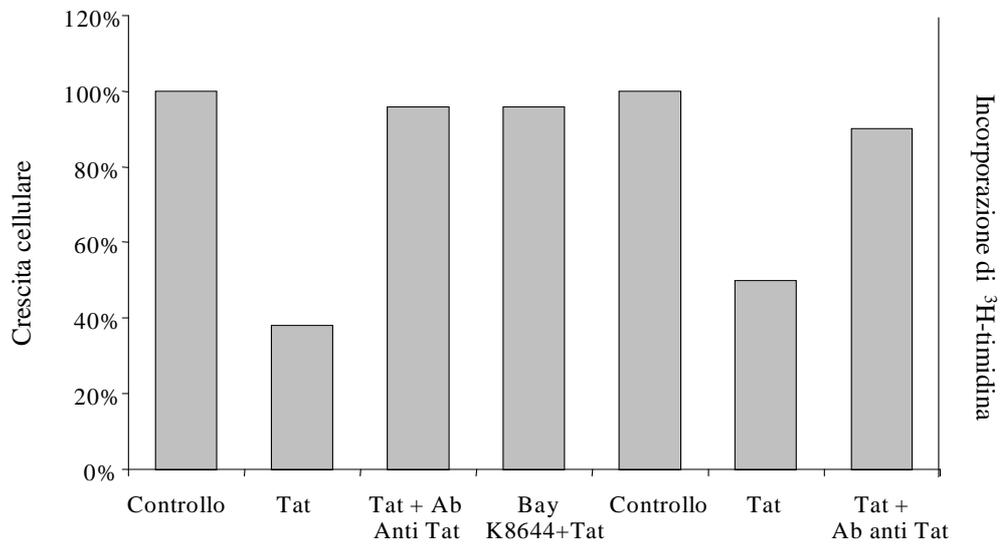


Figura 3a.6. L'incubazione di Tat con un anticorpo specifico anti-Tat inibisce in maniera significativa l'effetto di Tat sulla crescita cellulare sia quando valutata con la conta cellulare che con l'incorporazione di timidina tritiata. Il blocco dei canali L del calcio con il Bay K8644, annulla l'effetto antiproliferativo di Tat.

3b. Effetti della nutrizione clinica (enterale e parenterale) sulla funzione assorbitiva intestinale nel paziente con infezione da HIV

Sono stati arruolati 62 bambini (24 maschi; età media 5,5 +/- 4,0 anni), 42 hanno effettuato la riabilitazione nutrizionale per via parenterale (14 maschi; età media 6,2 +/- 3,8 anni) e 16 per via enterale (10 maschi; età media 4,8 +/- 2,5 anni).

La durata media della nutrizione parenterale è stata 157 +/- 146 giorni/bambino (range 25-180 giorni); la durata media della nutrizione enterale è stata 142 +/- 159 giorni/bambino (range 17-210 giorni).

Tutti i bambini tranne 3 erano in classe C3 (lo stadio più avanzato dell'infezione da HIV), 3 pazienti erano in classe B3 ed erano tutti nel gruppo della riabilitazione per via enterale. Tutti i bambini presentavano una severa compromissione della risposta immune (secondo il Sistema di Classificazione dei CDC) ed erano in terapia antiretrovirale prima di iniziare la nutrizione clinica, con uno o al massimo 2 inibitori della trascrittasi inversa.

La diarrea ed il malassorbimento rappresentavano i motivi che più frequentemente portavano alla decisione di un intervento di riabilitazione nutrizionale. Solo 4 dei bambini in nutrizione parenterale e nessuno di quelli in enterale erano in condizioni cliniche gravi.

Come mostrato in figura 3b.1 lo z score medio del peso per l'età era -2.0 +/- 0.8 nel gruppo in nutrizione parenterale e -1.5 +/- 0.5 nel gruppo in enterale al momento di iniziare la nutrizione clinica. Quest'ultima ha determinato un aumento del peso in entrambi i gruppi che è risultato significativo per il gruppo in enterale ($p < 0.01$) ma non per quello in parenterale ($p = NS$). Un incremento di peso del 5 % è stato osservato in 36 dei 46 bambini in parenterale ed in 14 dei 16 bambini in enterale.

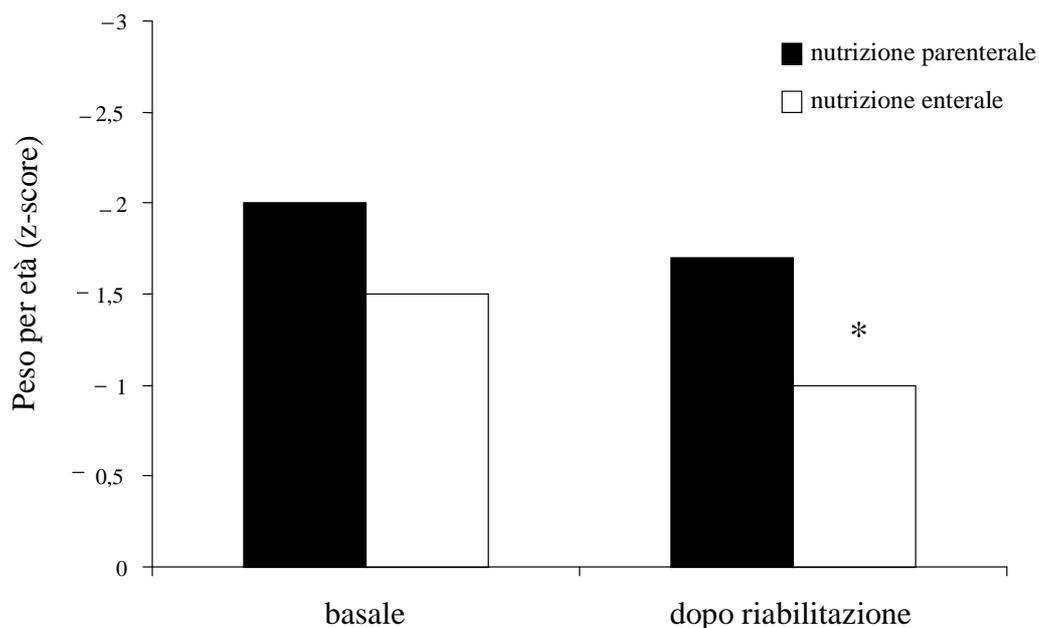


Figura 3b.1. L'intervento di riabilitazione nutrizionale determina un aumento del peso significativo nei pazienti in nutrizione enterale ma non in quelli in nutrizione parenterale.

Tutti i bambini in nutrizione clinica avevano livelli di CD4 basali molto bassi (143 +/- 54 cellule/mm³ nei bambini in enterale e 55 +/- 15 cellule/mm³ nei bambini in parenterale). Il numero medio di CD4 è risultato significativamente aumentato nel gruppo di bambini in nutrizione enterale ($p < 0.01$) ma non modificato in maniera significativa nel gruppo dei bambini in parenterale (figura 3b.2). In aggiunta nel gruppo dei pazienti in nutrizione enterale un maggior numero di bambini ha avuto un aumento significativo dei CD4 (11/16) rispetto a quanto osservato nel gruppo dei pazienti in parenterale (18/46).

I dati sulla funzione assorbitiva intestinale hanno evidenziato un significativo aumento dei livelli di xilosio dopo carico orale nei pazienti trattati con la nutrizione enterale ($p < 0.01$); 9/12 pazienti per i quali era disponibile il test di assorbimento hanno mostrato una normalizzazione dei livelli di xilosio dopo il carico orale. Nei pazienti in parenterale si è osservata una tendenza alla normalizzazione della funzione assorbitiva con una differenza prima e dopo la riabilitazione nutrizionale ai limiti della significatività statistica (figura 3b.3).

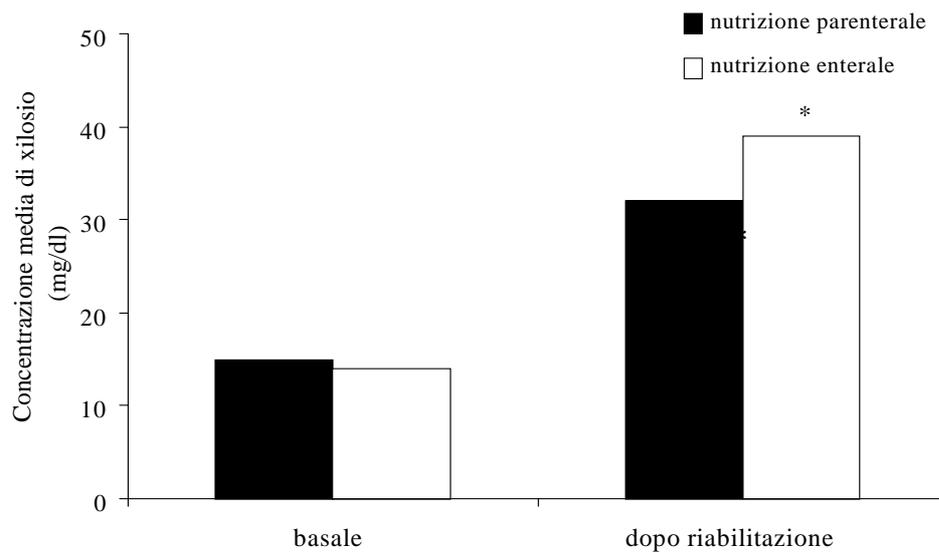


Figura 3b.2. La funzione assorbitiva intestinale migliora significativamente solo dopo l'intervento di nutrizione enterale come dimostrato dall'aumento della concentrazione di xilosio ematico dopo carico orale.

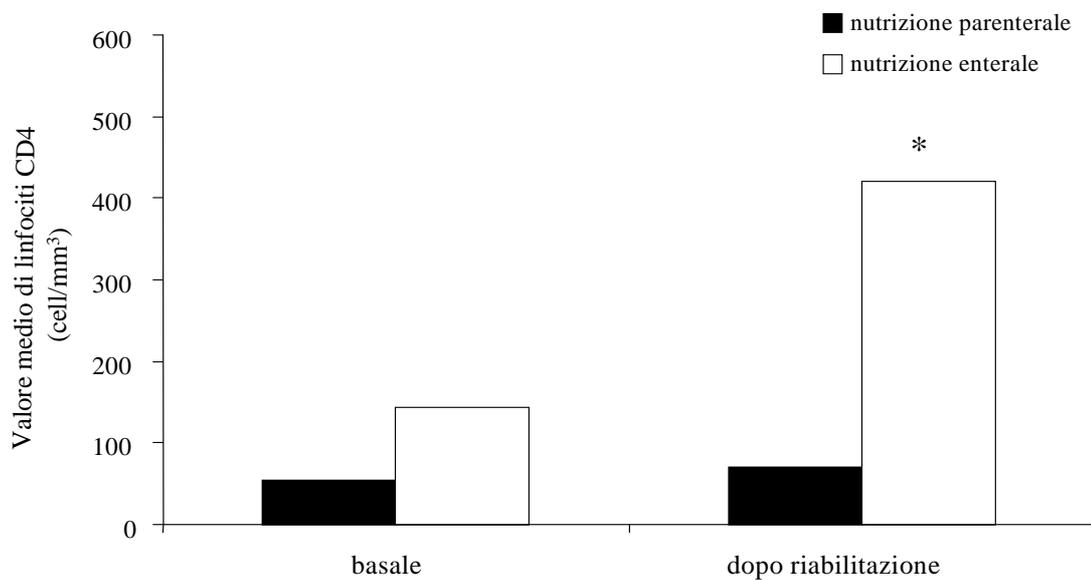


Figura 3b.3. I pazienti in nutrizione enterale mostrano un significativo miglioramento della funzione immunitaria come dimostrato dall'aumento dei CD4. Tale effetto non si osserva nei pazienti in nutrizione parenterale

3c. Effetto della somministrazione di estratti pancreatici nel paziente con infezione da HIV e steatorrea

Sono stati arruolati 24 bambini con infezione da HIV e steatorrea (11 maschi, età media 9,1 anni; range 1-14 anni). Nessuno di questi pazienti era in terapia antiretrovirale di combinazione. All'arruolamento (T0) sono state valutate anche la funzione pancreatica, lo stato dell'infezione (indicato dalla classe, clinica e immunologica) ed i parametri auxologici. Dopo 2 settimane è stato effettuato un secondo controllo della steatorrea (T1) e successivamente è stato iniziato il trattamento con estratti pancreatici la cui durata è stata di 2 settimane. Durante tutto il periodo di studio i pazienti hanno seguito una dieta con un contenuto medio di lipidi pari a circa 2 grammi/kg.

Tutti i pazienti all'arruolamento presentavano valori patologici di steatocrito ma solo 6 basse concentrazioni fecali di elastasi e chimotripsina, marcatori di insufficienza pancreatica. Il controllo dello steatocrito dopo 2 settimane in assenza di alcun intervento terapeutico ha confermato il malassorbimento di lipidi; nessuno dei pazienti in tale occasione ha infatti mostrato valori normali di steatocrito (tabella 3c.1).

Tabella 3c.1. Efficacia della supplementazione con estratti pancreatici sullo steatocrito di pazienti con infezione da HIV e malassorbimento di lipidi.

	T-0	T-1	T-2
Valore medio dello steatocrito	7.4 ± 2.6	7.3 ± 3.7	3.9 ± 2.1*
Numero di pazienti con steatocrito normale	0/19	0/19	8/19

*p < 0.0001 (T-0 vs T-2 e T1-vs T-2)

Dei 24 pazienti arruolati, 5 hanno dovuto interrompere il trattamento a causa della comparsa di dolori addominali regrediti nel giro di 24 ore dalla sospensione dell'assunzione. Gli altri 19 pazienti hanno completato il ciclo. Al termine delle 2 settimane di terapia 8 dei 19 pazienti hanno mostrato una normalizzazione dello steatocrito. Il valore medio dello steatocrito è risultato significativamente più basso rispetto al valore di partenza ($p < 0.001$) (tabella 3c.1). Durante le due settimane di terapia su 24 pazienti, 5 non hanno risposto al trattamento (gli stessi 5 pazienti che hanno dovuto interrompere la terapia per la comparsa di dolori

addominali), 11 hanno avuto una risposta parziale e 8 una risposta completa. Tali dati sono risultati significativamente superiori rispetto a quelli ottenuti durante le due settimane in cui non è stata somministrata alcuna terapia ($p < 0.005$) (tabella 3c.2).

Tabella 3c.2. Differente risposta dello steatocrito durante le due settimane di terapia con estratti pancreatici e durante le due settimane precedenti.

	Risposta assente	Risposta parziale	Risposta completa
Durante la terapia con estratti pancreatici	5/24 (19%)	11/24 (48%)	8/24 (33%)
In assenza di terapia con estratti pancreatici	9/24 (34%)	15/24 (61%)	0/24 (0%)

E' stata inoltre osservata una correlazione positiva tra valore basale dello steatocrito e classe HIV (coefficiente r di Spearman = 0.60; $p < 0.0005$) (figura 3c.1). Anche la riduzione del valore dello steatocrito durante le due settimane di trattamento (intesa come la differenza tra lo steatocrito in T2 e quello in T0) correlava positivamente con la classe CDC (coefficiente r di Spearman = 0.38; $p < 0.005$).

Dei 6 pazienti con basse concentrazioni fecali di elastasi e/o chimotripsina, tre hanno normalizzato lo steatocrito e altri tre hanno avuto una risposta parziale al trattamento.

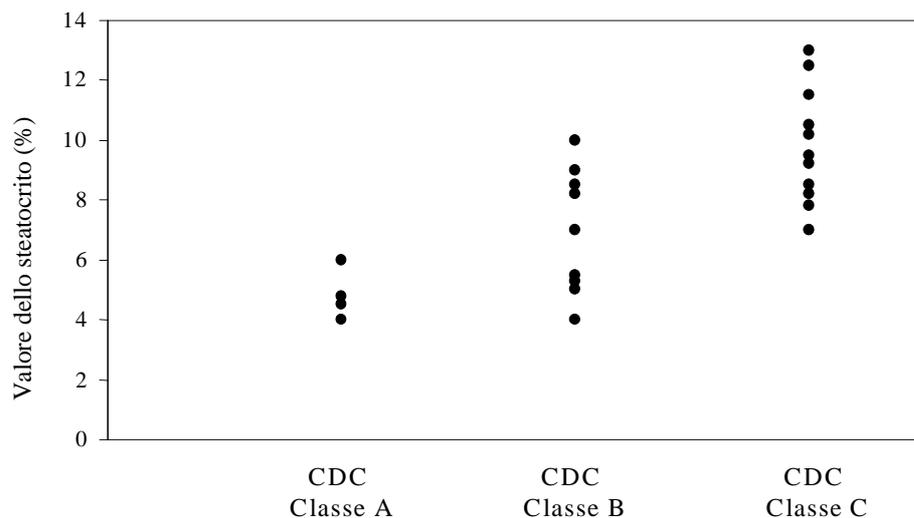


Figura 3c.1. Relazione tra steatocrito al momento dell'arruolamento e stato dell'infezione da HIV.

DISCUSSIONE DEI DATI ALLA LUCE DELLE CONOSCENZE DISPONIBILI

L'enteropatia associata ad HIV è una condizione complessa che si riscontra prevalentemente nelle fasi avanzate della malattia e che è responsabile di un ulteriore aggravarsi della sintomatologia determinando un malassorbimento di nutrienti e quindi una malnutrizione. Esistono evidenze che la malnutrizione cronica induce alterazioni del sistema immunitario predisponendo ad una condizione di immunodeficienza. Nel paziente con infezione da HIV la malnutrizione, la compromissione immunologica e la progressione della malattia sono eventi strettamente correlati. Capire come differenti fattori agiscono nel determinismo del danno intestinale è quindi il punto di partenza per qualsiasi intervento terapeutico che si voglia attuare per migliorare le condizioni nutrizionali e di conseguenza le condizioni generali del paziente .

Da alcuni anni è stata avanzata l'ipotesi che lo stesso virus HIV giochi un ruolo chiave nella patogenesi dell'enteropatia HIV-associata anche se le dimostrazioni ottenute non sono state conclusive. Gli esperimenti condotti hanno dimostrato per la prima volta un'interazione diretta tra Tat ed enterociti ed un effetto dannoso di questa proteina a livello intestinale. Agendo come un'enterotossina, Tat interagisce con gli enterociti ed induce secrezione di ioni cloro. L'effetto di Tat è di tipo polare nel senso che si verifica solo quando interagisce con la membrana basolaterale e non con la membrana apicale; questo riscontro ha un'importante implicazione clinica dal momento che Tat è secreta, da cellule infettate, nel siero dei pazienti con AIDS. E' interessante che la concentrazione di Tat generalmente riscontrata nel siero dei pazienti infetti corrisponde alla concentrazione massima efficace in vitro. Considerato che la conduttanza e la resistenza elettrica transepiteliale sono parametri sensibili di danno cellulare l'assenza di modificazioni di entrambi i parametri dopo l'esposizione del monolayer cellulare alla Tat indica che gli enterociti a differenza dei neuroni sono insensibili all'effetto citotossico indotto da Tat (58). Nonostante ciò Tat è capace di indurre indirettamente danno epiteliale come dimostrato dalla riduzione sia della conta cellulare che dell'incorporazione di timidina triziata in cellule in attiva replicazione ed indifferenziate. Infine l'abolizione di entrambi gli effetti con gli anticorpi policlonali anti-Tat supporta la specificità degli effetti stessi.

Il miglioramento della funzione assorbitiva intestinale secondario all'utilizzo degli inibitori delle proteasi (75) e la correlazione inversa tra titolo anticorpale anti Tat e progressione della malattia depongono in favore quindi di un ruolo di Tat nello sviluppo di disfunzione intestinale nel paziente con infezione da HIV. L'abolizione degli effetti indotti da Tat in cellule intestinali con l'uso di specifici anticorpi, fa ipotizzare che il blocco di Tat attraverso

immunizzazione attiva o passiva potrebbe ridurre i suoi effetti patogeni . Recentemente infatti è stata proposta come candidato per un vaccino una preparazione funzionalmente inattivata ma immunogena di Tat (tossoidi Tat) (76).

Il danno indotto da Tat rappresenterebbe il momento iniziale della patogenesi dell'enteropatia da HIV ma la malnutrizione ed il peggioramento della compromissione immunologica con il conseguente maggiore rischio di infezioni intestinali contribuirebbero al suo aggravarsi.

Nel paziente adulto con infezione da HIV il malassorbimento intestinale è correlato all'immunosoppressione ed esistono dati che indicano come durante la progressione della malattia si assiste ad un progressivo deterioramento della funzione intestinale (77).

In età pediatrica le cose sono meno chiare. L'ipotesi che una riabilitazione nutrizionale possa avere effetti benefici sia sulla funzione assorbitiva intestinale che sulla risposta immune ha una rilevanza clinica molto importante soprattutto per i paesi in via di sviluppo dove l'accesso alle costose terapie antiretrovirali è più difficile.

L'alimentazione enterale continua si basa sul presupposto che una ridotta superficie intestinale (in termini quali e/o quantitativi) viene sfruttata per tempi lunghi in modo da aumentare l'assorbimento di nutrienti. La prova di una ridotta superficie assorbitiva intestinale nei nostri pazienti era rappresentata da livelli basali di xilosio dopo carico orale patologici. La nutrizione enterale è risultata efficace nel ripristinare una normale funzione assorbitiva come dimostrato dalla normalizzazione del test allo xilosio nella maggior parte dei pazienti al termine del periodo di riabilitazione per via enterale.

L'aumento dei CD4 al termine della nutrizione per via enterale rappresenta la prima evidenza del fatto che la malnutrizione contribuisce direttamente al peggioramento dell'immunosoppressione nel bambino con infezione da HIV.

Un aumento dei linfociti totali, ma non dei CD4, è stato già osservato in pazienti adulti con infezione da HIV dopo alimentazione enterale. E' noto che a differenza di quanto accade negli adulti in età pediatrica la terapia di combinazione con inibitori delle proteasi si associa ad un aumento significativo di CD4 "naive" dovuto alla presenza di timo ancora funzionante (78); è quindi probabile che in età pediatrica il miglioramento dello stato nutrizionale si esprima in un miglioramento della risposta immunitaria ancora più significativo rispetto a quello riscontrato nel paziente adulto.

Indipendentemente dall'eziologia bambini malnutriti non infetti da HIV mostrano una riduzione del rapporto CD4/CD8, una riduzione dei CD4, un aumento delle immunoglobuline ed una alterata ipersensibilità ritardata (79). Tutte alterazioni reversibili con un'adeguata riabilitazione nutrizionale. E' quindi ipotizzabile che parte dell'immunodepressione

riscontrata nei bambini con infezione da HIV sia secondaria alla malnutrizione e pertanto correggibile con un adeguato apporto nutrizionale.

Nei pazienti del gruppo in parenterale si sono riscontrati effetti simili ma meno evidenti probabilmente a causa delle condizioni cliniche generali più severe. La nutrizione parenterale ha consentito di aumentare l'assorbimento di xilosio e di mantenere stazionari, per un periodo di 5 mesi, il peso ed il numero dei CD4, rallentando, in tal modo il rapido deterioramento delle condizioni generali tipico degli stadi terminali dell'infezione da HIV.

Recentemente grande attenzione è stata rivolta al ruolo dell'attività pancreatica nel malassorbimento intestinale di pazienti con HIV e molti studi hanno dimostrato la presenza di insufficienza pancreatica nel paziente con HIV e steatorrea (64,65). La terapia con estratti pancreatici nel paziente con infezione da HIV e steatorrea ha quindi un presupposto razionale ed in effetti ha determinato una riduzione dei valori di steatocrito e quindi delle perdite fecali di lipidi in tutti i pazienti trattati ed una completa normalizzazione in 1/3 dei pazienti. Resta sorprendente l'effetto benefico degli estratti pancreatici nei pazienti che non avevano insufficienza pancreatica. Questo può essere spiegato dal fatto che i test utilizzati per la diagnosi di insufficienza pancreatica non sono abbastanza sensibili e quindi non consentono di individuare forme lievi oppure dal fatto che gli estratti pancreatici possono aver indotto una modifica del microambiente intestinale riducendo l'overgrowth batterica e favorendo quindi le funzioni assorbitive intestinali.

In conclusione sia l'intervento di riabilitazione nutrizionale ed in particolare la nutrizione enterale che la terapia con estratti pancreatici si sono dimostrati efficaci nel migliorare la funzione assorbitiva intestinale come indicato dall'aumento dei valori dello xilosio dopo carico e dalla riduzione della steatorrea.

Inoltre la riabilitazione nutrizionale sembra migliorare la funzione immunitaria in particolare se instaurata negli stadi precoci dell'infezione da HIV. Negli stadi terminali sembra semplicemente in grado di rallentare il rapido e progressivo deterioramento dell'immunità. Anche se con l'introduzione della terapia di combinazione si è assistito ad un rapido e persistente miglioramento delle condizioni generali ed anche della funzione intestinale del paziente con HIV questi risultati restano importanti perché ci danno conferma della relazione esistente tra malassorbimento intestinale, malnutrizione e progressione della malattia. La loro rilevanza clinica è ancora maggiore se si pensa ai paesi in via di sviluppo dove la malnutrizione è all'ordine del giorno e dove l'uso su larga scala delle nuove terapie antiretrovirali non è ancora possibile.

CONCLUSIONI

Negli ultimi anni sono stati fatti enormi progressi nel campo delle infezioni intestinali che hanno dato risultati di grande rilievo. La mortalità infantile è stata dimezzata grazie alle conoscenze sui meccanismi di trasporto intestinale ed al conseguente concetto di ripristinare l'equilibrio idroelettrolitico o addirittura di prevenire gli squilibri che si possono verificare in corso di diarrea. Abbiamo visto come una reidratazioni rapida e corretta ed una rialimentazione precoce favoriscono una più rapida guarigione oltre ad impedire la comparsa di complicanze. Accanto a questo l'utilizzo nelle forme lievi di gastroenterite acuta di nuove terapie come la diosmectite ed alcuni probiotici riducendo la durata della diarrea può portare ad un enorme risparmio di risorse che possono essere destinate a programmi di prevenzione o di ricerca.

La situazione è del tutto diversa quando la diarrea si manifesta in un bambino immunodeficiente o affetto da altre patologie croniche. In questo caso la gestione deve necessariamente essere diversa perché a causa delle condizioni di base questi pazienti sono a rischio di infezioni più severe, a decorso protratto e che vanno a peggiorare il quadro drammatico spesso caratterizzato da malassorbimento intestinale e malnutrizione. Pertanto in questi casi diventa indispensabile ottenere informazioni sull'eziologia della diarrea per poter stabilire un idoneo ed efficace trattamento dal quale può dipendere la sopravvivenza stessa del paziente. Le infezioni intestinali nel paziente immunodeficiente possono non essere più frequenti ma sono sicuramente più gravi. Basti pensare che la criptosporidiosi enterica che, nel bambino immunocompetente è caratterizzata da una diarrea di grado lieve ed autolimitata, nel paziente con infezione da HIV si manifesta con una diarrea severa associata a grave disidratazione e a marcata perdita di peso. Ma l'infezione intestinale nel paziente malnutrito o immunodeficiente non si limita a creare problemi solo durante la fase acuta. Abbiamo visto infatti che deficit immunitario, malnutrizione/malassorbimento intestinale e rischio di infezioni sono collegati tra loro e spesso si viene a creare un circolo vizioso che si autoalimenta anche quando la causa che lo ha innescato è stata eliminata. Un adeguato apporto calorico ottenuto ricorrendo anche ad un'alimentazione per via enterale, migliorando la funzione intestinale e lo stato nutrizionale, può contribuire a ridurre il rischio di infezioni. Altra categoria di paziente a rischio è il paziente con insufficienza intestinale che oltre ad essere malnutrito spesso si presenta con forme molto severe di diarrea secretiva. In questo tipo di paziente si deve quindi intervenire su due fronti diversi; da un lato bisogna garantirgli un adeguato apporto calorico ma dall'altro bisogna in qualche modo ridurre le perdite intestinali

di acqua ed elettroliti. Numerosi tentativi terapeutici sono stati effettuati ma non esistono dati conclusivi. L'ormone della crescita che esercita a livello intestinale sia un effetto proassorbitivo/antisecretivo che un effetto trofico potrebbe essere considerato un possibile candidato per la terapia del bambino con diarrea intrattabile.

BIBLIOGRAFIA

1. Hyun C, Kimmich GA. Effect of cholera toxin on cAMP levels and Na⁺ influx in isolated intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* 1982; 24: C107-15.
2. Field M, Graf LH, Laird WJ, Smith PL. Heat Stable enterotoxins of *Escherichia coli*: in vitro effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration and ion transport in small intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 2800-04.
3. A. Guarino, M. Bisceglia, R. Berni Canani, MC. Boccia, G. Mallardo, E. Bruzzese, P. Massari, R. Rappuoli, J. Telford. Enterotoxic effect of the vacuolating toxin produced by *Helicobacter Pylori* in Caco2 cells. *J Infect Dis* 1998; 178:1373-8
4. Eherer AJ, Fordtran JS. Fecal osmotic gap and pH in experimental diarrhea of various causes. *Gastroenterology* 1992; 103: 545-51.
5. Dong Y Zeng CQ, Ball JM, Estes MK, Morris AP. The Rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C- mediated inositol 1,4,5 triphosphate production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3960-65.
6. Avendano P, Matson DO, Long J, Whitney S, Matson CC, Pickering LK. Costs associated with office visits for diarrhea in infants and toddlers. *Pediatr Infect Dis J* 12: 897-902, 1993.
7. Guandalini S, Mazzarella G, Fontana M. Childhood diarrhea in Italy. *Acta Paediatr* 1989; 364 suppl:5-12.
8. Fontana M. Le infezioni intestinali. Epidemiologia ed impatto sulla spesa sanitaria. Congresso della Società Italiana di Infettivologia Pediatrica. Milano novembre 2000. Abstract Book: 16-7.
9. Isolauri E, Juntunen M, Rautanen T, Sillanauke P, Koivula T. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics* 1991;88:90-97.
10. Guarino A, Berni Canani R, Spagnuolo MI, Albano F, Di Benedetto L. Oral bacterial therapy reduces the duration of diarrhea and of viral excretion in children with mild diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997;25:516-519.
11. Majamaa H, Isolauri E, Saxelin M, Vesikari T. Lactic acid bacteria in the treatment of acute Rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutrition* 1995; 20:333-338.

12. Shornikova AV, Isolauri E, Burkanova L, Lokovnikova S, Vesikari T. A trial in the Karelian Republic of oral rehydration and *Lactobacillus GG* for acute diarrhoea. *Acta Paediatr* 1997; 86: 460-5.
13. Guandalini S, Pensabene L, Kikri MA, Dias JA, Gobio Casali L, Hoekstra H et al. *Lactobacillus GG* administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30:54-60.
14. Raza S, Graham SM, Allen SJ, Sultanas, Cuevas L, Hart CA. *Lactobacillus GG* promotes recovery from acute nonbloody diarrhea in Pakistan. *Pediatr Infect Dis* 1995; 14: 107-11.
15. Chapoy P. Treatment of acute infantile diarrhea: controlled trial of *Saccharomyces*. *Ann Pediatr (Paris)* 1985; 32:561-563.
16. Buydens P, Debeuckelaere S. Efficacy of SF68 in the treatment of acute diarrhea: A placebo-controlled trial. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31:887-891.
17. Shornikova AV, Casas IA, Mykkanen H, Salo E, Vesikari T. Bacteriotherapy with *Lactobacillus reuteri* in rotavirus gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16: 1103-7.
18. Szajewska H, Mrurowicz J. Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 33: S17-25
19. Guarino A, Albano F. Proposte di linee guida per l'approccio ambulatoriale al bambino con diarrea acuta. *Riv Ital Pediatr* 2000; 26: 1036-42.
20. Guarino A, Albano F. Guidelines for the approach to outpatient children with acute diarrhoea. *Acta Paediatr* 2001; 90: 1087-95.
21. Guarino A, Bruzzese E. Which place for bismuth subsalicylate in the treatment of enteric infections? *Acta Paediatrica* 2001; 90: 601-4
22. Brouillard MY, Rateau JG. Pouvoir d'absorption de deux argiles, la smectite et le kaolin sur des enterotoxines bacteriennes. *Gastroenterol Clin Biol*. 1989, 13:18-24.
23. Rey C. Diarrhees virales a Rotavirus. Interet de la smectite. *Rev Int Pediatr*. 1989; 196:1-6.
24. Dupont C, Moreno JL, Barau E et al. Effect of diosmectite on intestinal permeability changes in acute diarrhea: a double blind-placebo-controlled trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992; 14:413-9.
25. Maharai L, Heyman M, Plique O, et al. Apical effect of diosmectite on damage to the intestinal barrier function induced by tumor necrosis factor- α . *Gut* 1997; 40: 339-43.

26. Madkur AA, Madina EMH, El-Azzouni O EZ, et al. Smectite in acute diarrhea in children: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 17:176-81.
27. Vivatvakin B, Jongpipatvanich S, Harikul S et al. Control study of oral rehydration solution (ORS)/(ORS+dioctahedral smectite) in hospitalized Thai infants with acute secretory diarrhea. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1992; 23: 414-19.
28. Booth I, Cunha Ferreira R, Desjeux J-F, et al. Recommendations for composition of oral rehydration solutions for the children of Europe. Report of an ESPGHAN Working Group. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992; 14: 113-5.
29. Provisional Committee on quality improvement : Subcommittee on Acute Gastroenteritis. Practice parameters: the management of acute gastroenteritis in young children. *Pediatrics* 1996; 97: 424-36.
30. Walker-Smith JA, Sandhu BK, Isolauri E, et al. Recommendations for feeding on childhood gastroenteritis: guidelines prepared by the ESPGHAN Working Group on Acute Diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1997; 24: 619-20.
31. Desjeux D, Favre I, Simongiovanni J et al. Why is oral therapy associated with drugs in the treatment of diarrhea? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1996; 22:112-3.
32. Bergstrom T, Alestig K, Thoren K et al. Symptomatic treatment of acute infectious diarrhea : loperamide versus placebo in a double-blind trial. *J Infect* 1986; 12: 35-8.
33. Isolauri E, Vesikari T. Oral rehydration, rapid feeding and cholestyramine for treatment of acute diarrhea, *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1985; 3: 252-6.
34. Diarrhoeal Diseases Study Group (UK). Loperamide in acute diarrhoea in childhood : results of double blind, placebo controlled multicentre clinical trial. *Br Med J* 1984; 289:1263-7.
35. Portnoy BL, DuPont HL, Pruitt D, et al. Antidiarrheal agents in the treatment of acute diarrhea in children. *JAMA* 1976; 236: 844-6.
36. Saavedra JM, Bauman NA, Oung I, Perman JA, Yolken RH. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. *Lancet* 1994; 344:1046-1049.
37. Chouraqui JP, Van Egroo LD, Fichot MC. Prevention of diarrhea by feeding infants with an acidified milk formula containing *Bifidobacterium bifidum*. *J Pediatr gastroenterol Nutr* 1998; 26:539 A.

38. Bellomo G, Mangiagli A, Nicastro L, Frigerio G. A controlled double-blind study of SF68 strain as a new biological preparation for the treatment of diarrhea in pediatrics. *Curr Ther Res* 1980; 27: 927-36.
39. Avery GB, Villavicencio O, Lilly JR, Randolph JG. Intractable diarrhea in early infancy. *Pediatrics* 1968; 41: 712-22.
40. Harris AG, D'Orisio TM, Woltering EA, Anthony LB, Burton FR, Geller RB, Grendell JH, Levine B, Redfern JF. Consensus statement: octreotide dose titration in secretory diarrhea. Diarrhea management consensus development panel. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 1464-73.
41. Guarino A, Berni Canani R, Spagnuolo MI, Bisceglia M, Boccia MC, Rubino A. In vivo ed in vitro efficacy of octreotide for treatment of enteric Cryptosporidiosis. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 436-41.
42. Guarino A, Berni Canani R, Iafusco M, Casola A, Russo R, Rubino A. In vivo and in vitro effects of human growth hormone on rat intestinal transport. *Pediatr Res* 1995; 37: 576-80.
43. Berni Canani R, Iafusco M, Russo R, Bisceglia M, Polito G, Guarino A. Comparative effects of growth hormone on water and ion transport in rat jejunum, ileum and colon. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 1076-81.
44. Williamson RCN. Intestinal adaptation : structural, functional and cytogenic changes. *N Engl J Med* 1978; 298: 1393-1402.
45. Hines OJ, Bilchik AJ, Zinner MJ, Skotzko MJ, Moser JA, McFadden DW, Ashley SW. Adaptation of the Na/glucose cotransporte following intestinal resection. *J Surg Res* 1994; 57:22-27.
46. Chaves M, Smith M, Williamson RCN. Increased activity of digestive enzymes in ileal enterocytes adapting to proximal small bowel resection. *Gut* 1987; 28:981-87.
47. Byrne TA, Persinger RL, Young LS, Ziegler TR, Wilmore DW. A new treatment for patients with short bowel syndrome. Growth hormone, glutamine and a modified diet. *Ann Surg* 1995; 222: 243-55.
48. Scolapio JS, Camilleri M, Fleming CR et al . Effect of growth hormone, glutamine and diet on adaptation in short bowel syndrome: a randomized controlled study. *Gastroenterology* 1997; 113:1074-81.
49. Vanderhoof JA, Kollmann KA, Griffin S, Thomas EA. Growth hormone and glutamine do not stimulate intestinal adaptation following massive small bowel resection in rat. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 25:327-31.

50. Szkudlarek J, Jeppesen PB, Mortensen BP. Effect of high dose growth hormone with glutamine and no change in diet on intestinal absorption in short bowel patients: a randomised, double-blind, crossover, placebo controlled study. *Gut* 2000; 47: 199-205.
51. Donowitz M, Montgomery JLM, Walker MS, Cohen ME. Brush-border tyrosine phosphorylation stimulates ileal neutral NaCl absorption and brush-border Na⁺/H⁺ exchange. *Am J Physiol* 1994; 266:G647-56.
52. Hogenauer C, Santa Ana CA, Porter JL, Fordtran JS. Discrepancies between effects of recombinant human growth hormone on absorption and secretion of water and electrolytes on the human jejunum compared to results reported on rat jejunum. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 457-61.
53. Hodin RA, Saldinger P, Meng S. Small bowel adaptation: counter regulatory effects of epidermal growth factor and somatostatin in the program of early gene expression. *Surgery* 1995; 118: 206-11.
54. Sharpstone D, Gazzard B. Gastrointestinal manifestations of HIV infection. *Lancet* 1996; 348:379-383.
55. Seidman EG, Russo P. Gastrointestinal manifestations of AIDS and other secondary immunodeficiencies. In: *Pediatric Gastrointestinal Disease: pathophysiology, diagnosis, management*. Edition by W. Allan Walker, et al. 2nd ed. 1996:606-24.
56. Delezay O, Yahi N, Tamalet C, Baghdiguian S, Boudier JA, Fantini J. Direct effect of type 1 human immunodeficiency virus on intestinal epithelial cell differentiation: relationship to HIV-1 enteropathy. *Virology* 1997;238:231-242.
57. Kotler DP. Characterization of intestinal disease associated with human immunodeficiency virus infection and response to antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 1999;179 (Suppl 3):S454-6.
58. Rubarteli A, Poggi A, Sitia R, Zocchi MR. HIV-1 Tat: a polypeptide for all season. *Trends Immunol Today* 1998;19:543-45
59. Gallo RC. Tat as one key to HIV-induced immune pathogenesis and Tat toxoid as an important component of a vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8324-26
60. Zocchi MR, Rubartelli A, Morgavi P, Poggi A. HIV-1 Tat inhibits human natural killer cell function by blocking L-type calcium channels. *J Immunol* 1998;161:2938-43.
61. Guarino A, Tarallo L, Guandalini s et al. Impaired intestinal function in symptomatic HIV infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991; 12: 453-58.

62. Miller TL, Orav EJ, Martin SR et al . Malnutrition and carbohydrate malabsorption in children with vertically transmitted human immunodeficiency virus 1 infection. *Gastroenterology* 1991; 100: 1296-1302.
63. Castaldo A, Tarallo L, Palomba E et al. Iron deficiency and intestinal malabsorption in HIV disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1996; 22:359-363.
64. Carroccio A, Fontana M, Spagnuolo MI et al. Pancreatic dysfunction and its association with fat malabsorption in HIV-infected children. *Gut* 1998; 63:358-63.
65. Carroccio A, Di Palma L, Di Grigoli C et al. Exocrine pancreatic function and fat malabsorption in human immunodeficiency virus-infected patients, *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 729-34.
66. Tovo PA, De Martino M, Gabiano C et al. Prognostic factors and survival in children with perinatal HIV-1 infection. *Lancet* 1992; 339:1249-53
67. Guarino A, Albano F, Berni Canani R, Bruzzese E. HIV, fatal Rotavirus infection and treatment options. *Lancet* 2001, in press.
68. Singer P, Rubinstein A, Askanazi J et al. Clinical and immunologic effects of lipid based parenteral nutrition in AIDS. *J Parenter Enter Nutr* 1992; 16:165-7
69. Kotler DP, Tierney AR, Culpepper-Morgan JA, Wang J, Pierson RN. Effect of home parenteral nutrition on body composition in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Parenter Enter Nutr* 1990; 14:454-8
70. Kotler DP, Tierney AR, Ferraro R et al. Enteral alimentation and repletion of body cell mass in malnourished patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Clin Nutr* 1991; 53:149-54
71. Henderson RA, Saevedra JM, Perman JA, Hutton N, Livingston RA, Yolken RH. Effect of enteral tube feeding on growth of children with symptomatic human immunodeficiency virus infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994; 18:429-34
72. Miller TL, Awnetwant EL, Evans S, Morris VM, Vazquez IM, McIntosh K. Gastrostomy tube supplementation for HIV-infected children. *J Pediatr* 1995; 96:696-702
73. Centers for Disease Control and Prevention: 1994 Revised Classification system for human immunodeficiency virus infection in children less than 13 years of age. *MMWR* 1994; 43:1-10
74. Guarino A, Tarallo L, Greco L, Cesarano L, Guandalini S, Rubino A. Reference values of the steatocrit and its modification in diarrheal disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992; 14: 268-74.

75. Berni Canani R, Spagnuolo MI, Cirillo P, Guarino A. Ritonavir combination therapy restores intestinal function in children with advanced human immunodeficiency virus disease. *J Acquir Immune Defic Syndrom Hum Retrovirol* 1999 ;21 :307-12.
76. Ensoli B, Cafaro A. Control of viral replication and disease onset in cynomolgus monkeys by HIV-1 Tat vaccine. *J Biol Regul Homeost Agents* 2000; 14: 22-6.
77. Keating J, Bjarnason I, Somasundaram S et al. Intestinal absorptive capacity, intestinal permeability and jejunal histology in HIV and their relation to diarrhoea. *Gut* 1995; 37:623-629
78. Gibb DM, Newberry A, Klein N, de Rossi A, Grosch-Woerner I, Babiker A, Pediatric European Network for Treatment of AIDS (PENTA) Steering Committee. Immune repopulation after HAART in previously untreated HIV-1-infected children. *Lancet* 2000;355:1331-2.
79. Beisel WR. Nutrition and immune function: overview. *J Nutr* 1996; 126:2611S-2615S

APPENDICE

Copia dei lavori inerenti la tesi pubblicati durante i 3 anni del Dottorato di Ricerca

1. R. Berni Canani, M. Bisceglia, E. Bruzzese, G. Mallardo, A. Guarino. Growth hormone stimulates, via tyrosina kinase, ion transport and proliferation in human intestinal cells. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1999; 28:315-20.
2. Alfredo Guarino, Massimo Bisceglia, Giuseppe Castellucci, Giuseppe Iacono, Luigi Gobbio Casali, Eugenia Bruzzese, Antonella Musetta, Luigi Greco, and SIGEP Study Group for Smectite in acute diarrhea. Smectite in the treatment of acute diarrhea: a nationwide randomized controlled study of the Italian Society of Pediatric Gastroenterology and Hepatology (SIGEP) in collaboration with primary care pediatricians. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 32: 71-75.
3. Alfredo Guarino and Eugenia Bruzzese. Which place for bismuth subsalicylate in the treatment of enteric infections? *Acta Paediatrica* 2001; 90:601-604.
4. Carroccio A, Guarino A, Zuin G, Berni Canani R, Fontana M, Bruzzese E, Montalto G, Notarbartolo A. Efficacy of oral pancreatic enzyme therapy for the treatment of fat malabsorption in HIV-infected patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 1619-27.
5. Alfredo Guarino, Maria Immacolata Spagnuolo, Vania Giacomet, Roberto Berni Canani, Eugenia Bruzzese, Carlo Giaquinto, Paola Roggero, Anna Plebani, Guido Castelli Gattinara. Nutritional rehabilitation restores intestinal absorption and increase CD4 cell number in HIV-infected children. Accettato per la pubblicazione su *Journal Pediatric Gastroenterology and Nutrition*.

Copia dei manoscritti inerenti la tesi sottoposti a revisione

1. Roberto Berni Canani, Pia Cirillo, Giuseppe Mallardo, Eugenia Bruzzese, Fabio Albano, Francesco Selvaggi, Alfredo Guarino. Enterotoxic and cytotoxic effects of HIV-1 Tat protein on human intestinal epithelial cells. Sottoposto per la revisione a *Gastroenterology*.