



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Dottorato di Ricerca

in

**TECNOLOGIE INNOVATIVE NELLE MALATTIE DELLO SCHELETRO, DELLA CUTE E DEL
DISTRETTO ORO-CRANIO-FACCIALE**

Curriculum DERMATOLOGIA, ANATOMIA E CHIRURGIA PLASTICA (XXXIV° ciclo)

Coordinatore: Prof. Diego Ribuffo

Titolo della Tesi

**IMPLEMENTAZIONE DELLA DIAGNOSTICA NON INVASIVA A
SUPPORTO DELLA PRATICA CLINICA**

Relatori:

Prof. Alfredo Rossi

Prof. Antonio Costanzo

Candidato:

Dott. Michele Cardone

ANNO ACCADEMICO 2020/2021



“La mente scientifica non fornisce tanto le giuste risposte,
quanto le giuste domande.”

Claude Lévi-Strauss (1908 – 2009)
Antropologo, psicologo e filosofo francese.

ABSTRACT

L'uso di strumenti, intesi in senso lato come tutti quegli oggetti attraverso i quali possiamo interagire con l'ambiente e modificarlo, fa parte della nostra esperienza quotidiana.

Ad esempio, quando usiamo uno smartphone per comprare un biglietto ferroviario stiamo di fatto agendo sull'ambiente, causando conseguenze tangibili attraverso uno strumento.

Nella specie umana l'uso di strumenti è il risultato di un processo cognitivo complesso, che richiede di rappresentare mentalmente la possibilità di raggiungere uno scopo in maniera mediata piuttosto che diretta.

Il legame tra strumenti e sviluppo della specie umana è centrale. Attraverso lo studio degli strumenti che i diversi ominidi sono stati in grado di produrre ed utilizzare, i paleoantropologi hanno da sempre cercato di caratterizzare i passi evolutivi che hanno portato all'emergere della nostra specie e delle nostre capacità cognitive. Questi primi utensili assumono, col tempo, forme sempre più elaborate e il cervello segue, a sua volta, un percorso evolutivo che porta a un aumento considerevole di dimensioni. Di fatto si può parlare, per questa particolare interazione, di un processo di co-evoluzione.

Esaminando parallelamente la storia della medicina si evince come anche l'evoluzione di quest'ultima vada di pari passo al progresso tecnologico e di conseguenza delle strumentazioni a suo supporto. Le nuove tecnologie hanno di fatto trasformato la medicina e l'imminente avvento dell'intelligenza artificiale sarà l'elemento in grado di stravolgerla e conferirle una spinta evolutiva senza precedenti, fornendo di fatto il trait d'union tra strumenti tangibili e quelli astratti.

In campo dermatologico, per tecniche diagnostiche non invasive ci si riferisce a un gruppo di metodiche in vivo che si affiancano alla valutazione clinica del paziente e che adoperano apparecchiature ad alta tecnologia per lo studio e la diagnosi di patologie cutanee, sia di natura infiammatoria che neoplastica.

Questa speculazione prende in esame alcune tra le strumentazioni diagnostiche più moderne ed innovative in Dermatologia, al fine di mostrarne le potenzialità ed i benefici nel delicato e basilare "momento diagnostico" e nella validazione dei risultati ottenuti dagli studi di laboratorio in applicazioni cliniche, tipico esempio di ricerca translazionale.

SEZIONI

1. CAPILLAROSCOPIA: UNA NUOVA APPLICAZIONE PER LA VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI AVVERSI CARDIOVASCOLARI INDOTTI DALLA CHEMIOTERAPIA.
2. IL DERIVATO DELLA GLUCOSAMINA NAPA SOPPRIME L'ATTIVAZIONE DI MAPK E RIPRISTINA LA DEPOSIZIONE DI COLLAGENE NEI FIBROBLASTI DIPLOIDI UMANI ESPOSTI A LIVELLI AMBIENTALI DI UVB: STUDIO IN VITRO ED IN VIVO CON ANALISI MULTISPETTRALE TRAMITE ANTERA 3D.
3. FLUORESCENCE ADVANCED VIDEO DermOSCOPY (FAV): UNA NUOVA METODICA DIAGNOSTICA NON INVASIVA IN TRICOLOGIA A CONFRONTO CON LE TECNICHE GOLD STANDARD
4. INNOVAZIONE IN DERMATOLOGIA: MESOSCOPIA OPTOACUSTICA (RSOM) PER LA DIAGNOSI NON INVASIVA (PROGETTO INNODERM - ongoing)

CAPILLAROSCOPIA: UNA NUOVA APPLICAZIONE PER LA VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI AVVERSI CARDIOVASCOLARI INDOTTI DALLA CHEMIOTERAPIA

INDICE

• Acronimi	p.6
• Introduzione	p.7
• Tecnica d'esame	p.8
• Semeiotica capillaroscopica	p.10
• Principali anomalie capillaroscopiche	p.14
• Chemioterapici e rischio cardiovascolare	p.17
– Introduzione	
– Epidemiologia	
– Fisiopatologia ed effetti clinici	
• Agenti chemioterapici tradizionali	p.24
– Antracicline	
– Bleomicina	
– Taxani	
– Agenti alchilanti e Alkylating-Like	
– Antimetaboliti	
– Inibitori del proteasoma	
– Agenti immunomodulatori	
• Target therapy	p.30
– Inibitori erbB	
– Inibitori del VEGF	
– Inibitori di BCL-ABL	
• Terapia ormonale	p.36
– Anti androgeni	
– Modulatori selettivi del recettore degli estrogeni	
• Radioterapia	p.37
• Scopo dello studio	p.37
– Pazienti e metodi	
– Risultati	
– Conclusioni e prospettive future	
• Immagini	p.43
• Bibliografia	

ACRONIMI

(ASV) Acrosindrome vascolare
(CAD) Malattia coronarica
(CCB) Bloccanti dei canali del calcio
(CM) Cardiomiopatia
(CTD) Malattie del tessuto connettivo
(CV) Cardiovascolare
(ECG) Elettrocardiogramma
(FR) Fenomeno di Raynaud
(FRp) FR primitivo
(FRs) Secondario
(HER) Human endothelial growth factor receptor
(HF) Insufficienza cardiaca
(HIF) Fattore indotto da ipossia
(HTN) Ipertensione
(ILD) Imaging laser doppler
(IMA) Infarto miocardico acuto
(MP) Microcircolo periungueale
(MP) Microparticelle circolanti
(NFC, NVC) Video capillaroscopia periungueale
(PAI-1) Plasminogen activator inhibitor-1
(PVSP) Plesso venoso sub-papillare
(RT) Radioterapia
(SIR) Rapporto di incidenza standardizzato
(SSc) Sclerosi sistemica
(TCV) Tossicità cardio-vascolare
(TF) Fattore endoteliale tissutale
(Top2 β) (Topoisomerasi beta 2)
(vWF) Fattore Von Willebrand

INTRODUZIONE

La popolazione dei “cancer survivors” è in graduale aumento negli ultimi decenni. Uno studio effettuato negli Stati Uniti mostra che circa 14,5 milioni di americani aveva anamnesi positiva per neoplasie [1]. Il loro numero dovrebbe aumentare del 31% fino a raggiungere i 19 milioni nei prossimi anni [2]. Tale aumento riflette la maggior sopravvivenza conseguente ai miglioramenti diagnostici, ai progressi terapeutici, ai trattamenti adiuvanti ed a un numero crescente di nuove diagnosi in una popolazione numericamente in crescita e che invecchia inesorabilmente [1,3,4]. Tuttavia, i cancer survivors sono a rischio per condizioni correlate sia alla possibilità di una ripresa di malattia, che alle complicanze dovute al trattamento, quest’ultime di gravità crescente man mano che i tassi di sopravvivenza migliorano. Le complicanze cardiovascolari sono effetti indesiderati comuni di queste terapie; [5,6] esse possono determinare un consistente aumento di morbilità e mortalità [7,8], pertanto capire come migliorare prevenzione e diagnosi precoce di tali effetti indesiderati è una priorità nel “to cure” e nel “to care” dei pazienti.

La capillaroscopia è una metodica d’indagine semplice, incruenta, rapida e non invasiva, che consente lo studio “in vivo” delle caratteristiche del microcircolo. Essa viene utilizzata con successo nello studio di molteplici patologie, classicamente i disordini del tessuto connettivo. Recentemente è stato evidenziato il suo potenziale utilizzo nel valutare e quantificare il danno vascolare indotto dalla chemioterapia antineoplastica [9]. Invero, la tossicità endoteliale derivante dai trattamenti determina, nell’immediato e, ancor più a distanza di anni, considerevoli alterazioni vascolari non sempre accompagnate da manifestazioni cliniche evidenti [10,11]. Svariati sono i meccanismi con i quali queste si realizzano: le anomalie evidenziate nei pazienti trattati con bleomicina possono trovare origine nell’alterata autoregolazione nelle arteriole terminali; l’iperattività del sistema nervoso simpatico nei pazienti trattati con chemioterapia a base di cisplatino potrebbe essere il risultato dell’effetto neurotossico di tale agente alchilante; gli inibitori tirosinasi (es. nilotinib) determinano ischemia dovuta a trombosi; i VEGF-inibitori (es. bevacizumab) determinano disfunzione endoteliale causata da squilibrio tra ossido nitrico/endotelina, e così via [12].

Come già noto molti di questi farmaci (agenti alchilanti, antimetaboliti e antibiotici antitumorali) sono cardiotossici, invero, recenti evidenze

sostengono che la disfunzione endoteliale indotta dalla chemioterapia costituisca un marker predittivo di eventi cerebro-cardio-vascolari futuri (inclusi ipertensione, trombosi, scompenso cardiaco, cardiomiopatie ed aritmie) comportandosi propriamente come i tradizionali fattori di rischio. Con l'uso crescente di regimi polichemioterapici moderni e l'aumentata sopravvivenza dei pazienti, l'incidenza delle malattie cardiovascolari in questa popolazione non può che continuare ad aumentare.

Nel 1949 Knisely e Bloch, espressero due concetti di fondamentale importanza [13]:

- Lo stato del microcircolo di un distretto è sovrapponibile a quello di tutti i distretti.
- L'integrità di un distretto è dipendente dalla integrità del suo microcircolo. Fatta questa premessa è lecito attendersi che la valutazione dello stato del microcircolo periungueale, possa rappresentare un utile strumento per identificare i soggetti asintomatici ad alto rischio per lo sviluppo di eventi cerebro-cardio-vascolari, e per la stratificazione del rischio nei pazienti con malattia già nota. Attraverso l'esame capillaroscopico in tale popolazione di pazienti è di fatto possibile evidenziare pattern specifici di anomalie, che ben si correlano alla gravità del danno. Vista la sua utilità, tale metodica dovrebbe, pertanto, entrare a far parte dell'armamentario diagnostico del clinico, consentendogli di attuare strategie di intervento multidisciplinari (dermatologo, cardiologo, oncologo) efficaci per prevenire o minimizzare l'impatto di questi effetti avversi.

TECNICA D'ESAME

La tecnica di elezione per lo studio in vivo del microcircolo è la capillaroscopia, una metodica di indagine non-invasiva che consente la valutazione delle sue caratteristiche morfologiche e funzionali. Essa trova indicazione in tutte le condizioni la cui patogenesi riconosce un'anomalia anatomica e/o funzionale microvascolare [1]. I grandi vantaggi sono rappresentati dalla non invasività, la notevole sensibilità, la facilità, la rapidità di esecuzione e dal valore predittivo su estensione ed evoluzione di molte patologie. I limiti consistono nella talvolta scarsa specificità, l'essere operatore dipendente e dalla variabilità dei pattern di normalità [2]. L'esame si esegue sulle dita delle mani, a livello della porzione ventrale della piega ungueale prossimale (eponichio) poiché in questa zona l'asse

maggiore dei capillari presenta un decorso parallelo rispetto alla superficie cutanea, più adatto ad uno studio morfologico. Tale zona, tuttavia, è la più soggetta a variabilità inter ed intraindividuale. Infatti la struttura microvascolare può risultare alterata nella donna dall'uso di smalto, manicure e traumi dovuti ad esempio a lavori domestici, mentre nell'uomo da traumatismi legati all'attività professionale e manuali; tali alterazioni potrebbero portare ad un risultato falsamente positivo dell'esame. L'esame va effettuato a livello di tutte le dita, con particolare attenzione al IV° e V° dito della mano non dominante, in quanto a questo livello la cute si presenta di minor spessore ed è solitamente meno soggetta a traumi, permettendo una migliore visualizzazione [3]. Le altre zone anatomiche sulle quali l'esame potrebbe essere realizzato presentano dei limiti: la capillaroscopia congiuntivale presenta le maggiori difficoltà esecutive, per i movimenti dell'occhio e la scarsa tollerabilità all'illuminazione diretta della congiuntiva.

La capillaroscopia della mucosa orale è poco agevole per la difficoltà a mantenere un corretto posizionamento dello strumento. La capillaroscopia della mucosa labiale può talvolta essere utile nei pazienti con Sclerosi sistemica progressiva in cui, per la presenza di edema interstiziale e per la ridotta trasparenza cutanea, non è possibile effettuare la capillaroscopia periungueale.

La corretta esecuzione della metodica prevede in un primo momento che il paziente, il quale non deve aver assunto sostanze eccitanti come caffeina e nicotina da almeno 4 ore, venga posto in un ambiente con temperatura costante (20-22°C) per 15 minuti, in maniera da equilibrare la temperatura cutanea con quella ambientale (fase di acclimatazione termica) [4]. L'esame si esegue in posizione seduta, con il palmo della mano appoggiato sul piano di osservazione. Sulla cute periungueale si applica una quantità adeguata di olio diafanizzante (in genere cedro o paraffina), indispensabile per garantire le migliori condizioni di visibilità [5]. L'esame e l'eventuale cattura di immagini clinicamente significative richiedono un tempo non superiore ai 15 minuti. La documentazione fotografica refertata può essere stampata e archiviata su PC.

La capillaroscopia periungueale può essere effettuata con strumenti ottici di vario tipo: oftalmoscopio, apparati di macrofotografia, microscopio ottico "convenzionale", stereomicroscopio, apparati a sonda ottica in epiluminescenza; tuttavia, lo strumento maggiormente utilizzato è il videocapillaroscopio a sonda ottica che consente, grazie a maggiori

ingrandimenti, una migliore visione dei dettagli morfologici e reologici del microcircolo. Per l'illuminazione del campo di osservazione si può ricorrere a sorgenti luminose di vario tipo. Di particolare utilità risultano le lampade a fibre ottiche a luce fredda, che consentono sia di evitare la vasodilatazione dovuta al riscaldamento, che di modificare l'angolazione del fascio luminoso rispetto al piano della cute o delle mucose, evitando la formazione di riflessi che disturbano l'osservazione. Si preferisce l'utilizzo di ottiche da 200X che consentono di rilevare il flusso sanguigno, i fenomeni di aggregazione eritrocitaria ed i capillari o le venule in cui il flusso è rallentato o assente [6].



Microscopio – capillaroscopio digitale

SEMEIOTICA CAPILLAROSCOPICA

La capillaroscopia non visualizza il capillare in toto, ma i globuli rossi che in esso circolano. Esso appare classicamente nella forma di ansa a forcina, di colorito omogeneo e senza interruzioni, nel quale possono essere distinti ramo afferente (arterioso) e un ramo efferente (venoso). Per poter definire normale un quadro capillaroscopico, le atipie non devono essere presenti in più del 20% delle anse capillari esaminate [1]. I parametri rilevabili in corso di esame capillaroscopico sono distinti in:

- **Morfologici o statici**, distinti a loro volta in:
 - Descrittivi (plesso venoso sub-papillare, morfologia, orientamento, tortuosità delle anse, neoangiogenesi, microemorragie)
 - Misurabili (lunghezza e diametro delle anse, diametro delle ectasie e/o megacapillari, ampiezza delle aree avascolari, densità capillare)

- **Funzionali o dinamici:** caratteristiche del flusso

I valori normali dei parametri capillaroscopici sono riportati in tabella [2].

Parametri capillaroscopici di normalità

Parametro capillaroscopico	Immagine normale
Trasparenza e visibilità	Trasparente, capillari chiaramente visibili
Edema pericapillare	Assente
Plesso venoso sub-papillare (PVSP)	Visibile in più del 30% delle persone sane Non o debolmente visibile: soggetto normale Diminuita visibilità: pelle pigmentata, lavoratori manuali Aumentata visibilità: atrofia cutanea, bambini, anziani
Disposizione e architettura capillare	Rettilinei, perpendicolari all'unghia
Morfologia	A forcina
Diametro ansa capillare	<20 µm
Tortuosità	Usualmente assenti
Anse dilatate (20-50 µm) o giganti (> 50 µm)	Assenti
Capillari ramificati	Assenti
Neoangiogenesi	Assente
Emorragie, depositi di emosiderina	Usualmente assenti, presenti dopo trauma locale
Densità capillare	9-13 / mm

Aree vascolari (distanza tra le anse > 500 μm)	Assenti
Flusso sanguigno capillare	Continuo, dinamico, senza stasi o trombosi
Lunghezza delle anse	Da 200 a 400 μm
Diametro afferente/efferente	Da 8 a 10 μm / da 10 a 14 μm
Fondo	Rosa chiaro e trasparente, con profili delle anse capillari ben definiti.

1) **Plesso venoso sub-papillare (PVSP):** è visibile in circa il 30% della popolazione sana, con predilezione per l'età pre-pubere, in condizioni di atrofia cutanea e nelle persone anziane. E' meno visibile nelle persone di colore e nei lavoratori manuali. La classificazione più utilizzata è quella di Maricq, che attribuisce un punteggio da zero a quattro in base alla sua visibilità (0= PVSP non visibile, 1= PVSP appena visibile, in qualche distretto, 2= PVSP visibile solo in alcuni tratti dell'area periungueale, 3= PVSP visibile su tutta l'area, senza estensione prossimale, 4= PVSP visibile su tutta l'area con estensione prossimale).

2) **Morfologia delle anse:** per il decorso parallelo dei capillari rispetto alla superficie cutanea, a livello periungueale, la conformazione più usuale è quella ad "U rovesciata"; nelle altre sedi, dove il decorso è perpendicolare, l'aspetto comune è a punto o a virgola. Tuttavia possono essere riscontrate diverse atipie (anse tortuose, anse ramificate, anse arborescenti, anse glomerulari). La morfologia inoltre può variare in funzione della sede di osservazione, in funzione dell'età del soggetto (nella prima infanzia ad esempio i capillari hanno un aspetto a cupola con simmetria fra la branca afferente ed efferente, mentre in età post-puberale si assiste ad una progressiva trasformazione nella morfologia tipica dell'età adulta).

3) **Densità capillare:** Inteso come numero di anse per unità di superficie, solitamente compreso tra 9 e 13 capillari per millimetro. Ancora oggi non si è trovato un valore universalmente valido, tuttavia secondo Allegra tale parametro è compreso fra 14 e 17, mentre secondo Grassi risulta fra 10 e 15 [3].

4) **Lunghezza delle anse:** tale parametro è spesso di difficile definizione, poiché condizionato dalla proiezione del vaso sulla superficie cutanea. Infatti se il suo decorso è parallelo rispetto alla superficie, il capillare apparirà più lungo, viceversa se il decorso sarà obliquo, il capillare apparirà più corto. Anche in questo caso c'è notevole variabilità; secondo Allegra è compreso fra i 100 e 300 μ , mentre secondo Grassi oscilla fra i 200 e i 500 μ .

5) **Diametro delle anse:** secondo Allegra il diametro della branca afferente è di circa 8-12 μ , mentre secondo Grassi il diametro di questa è compreso fra i 5-16 μ , quello della branca efferente è compreso fra i 7-18 μ . Secondo Kabasakal il diametro normale misura < 25 μ , mentre si parla di anse *lievemente dilatate* se il loro diametro è compreso tra 1 e 3 volte il diametro normale; *dilatate*, quando la dilatazione è circoscritta ed asimmetrica (spesso simile a microaneurismi) ed il loro diametro è compreso tra 4 e 10 volte il diametro normale; *megacapillari* quando la dilatazione dell'ansa è omogenea e supera di 10 volte il diametro normale [4].

6) **Flusso:** esso è strettamente dipendente dall'integrità morfo-funzionale e da una stimolazione biumorale adeguata. Una iperaggregabilità degli elementi corpuscolari del sangue, determina il cosiddetto fenomeno di "sludge", che può presentarsi come masses (minuti ammassi eritrocitari che conferiscono un aspetto granuloso) o come aggregates (numerosi macroaggregati che possono provocare arresti o inversioni del flusso). La capillaroscopia consente di distinguere un flusso continuo o nastriforme, uno granuloso per la presenza di microaggregati eritrocitari, uno intermittente per la visualizzazione di spazi otticamente vuoti (plasma gaps). La velocità del flusso può essere determinata con l'utilizzo di un videoregistratore o attraverso la valutazione del tempo di comparsa, permanenza e scomparsa di un tracciante fluorescente [5].

PRINCIPALI ANOMALIE CAPILLAROSCOPICHE

In condizioni normali o in presenza di fenomeno di Raynaud primitivo (escluso durante il test di esposizione a freddo), il normale pattern capillaroscopico della plica ungueale mostra una disposizione regolare delle anse capillari. Tuttavia, una o più anomalie capillaroscopiche, in numero consistente, dovrebbero far sospettare al clinico la presenza di una sottostante patologia del connettivo o di altra natura [1].

Dilatazioni capillari: Le anse capillari omogeneamente ingrandite (capillari giganti) sono la caratteristica più precoce e suggestiva di FR secondario. Le dilatazioni mostrano una forma caratteristica (simmetrica) che li rende diverse da quelle osservate in altre condizioni patologiche, come il diabete mellito e l'acrocianosi. Capillari con forma e diametro normali possono coesistere nella maggior parte dei casi, insieme ad anse ingrandite, microaneurismatiche, tortuose o giganti. Anche il reperto di una singola ansa con un aumento omogeneo del diametro $> 50 \mu\text{m}$ dovrebbe essere considerato un potenziale marker di microangiopatia correlata a una manifestazione precoce di un disturbo sclerodermiforme. È stato suggerito che la dilatazione microvascolare costituisca una risposta autoregolatoria locale all'ipossia tissutale, rappresentando così il primo segno di danno alla parete vascolare [2].

Microemorragie: Si associano a danno della parete vascolare con stravasamento di globuli rossi, e rappresentano il "collegamento" tra la presenza di megacapillari e la loro conseguente perdita e "desertificazione". La forma delle microemorragie è notevolmente variabile. Le emorragie recenti hanno confini scarsamente definiti e colorito sfumato, differentemente da quelle inveterate che sono più organizzate ed hanno un colorito più scuro.

Edema: il background del quadro capillaroscopico nel FR secondario è caratterizzato da un aspetto "nebbioso", sfocato dovuto allo stravasamento di plasma dai vasi danneggiati. In particolare, le papille dermiche appaiono bianche / gialle e spesso vuote a causa dell'aumento di proteine della matrice extracellulare.

Capillari ramificati / a cespuglio (neo-angiogenesi): In pazienti con RP secondario, varie atipie morfologiche dovute alla neoangiogenesi possono essere osservate. Infatti, cluster di anse capillari notevolmente tortuose e arborizzate, spesso delimitate da desertificazione, sono caratteristiche

dell'angiogenesi. Il principale segno distintivo morfologico è la presenza di tortuosità con eterogeneità di forma (capillari glomerulari o a cespuglio).

Perdita di capillari e/o aree vascolari: Con tale definizione si intende uno spazio > 500 μ , privo di capillari o la perdita di 2 capillari contigui (densità capillare <30 per 5 mm) [3]. E' importante comunque distinguere le aree avascolari vere da quelle pseudoavascolari, legate, queste ultime, semplicemente ad una scarsa visibilità per edema diffuso a carico del connettivo interstiziale (effetto flou di fondo). È stato stimato che il numero di capillari normali può essere ridotto a solo il 20% nei pazienti con SSc [4]. La scomparsa dei capillari può generare vaste aree avascolari con aspetto "desertificato". Nei pazienti con recente insorgenza di FR, la comparsa di una perdita capillare rapidamente progressiva può rappresentare il primo reperto di una SSc severa. La progressiva perdita di capillari è stata associata a un coinvolgimento cutaneo e d'organo più esteso, con prognosi infausta.

Disorganizzazione dell'architettura vasale: Le alterazioni dell'architettura vasale rappresentano una caratteristica morfologica tardiva nella SSc e in altre malattie autoimmuni del connettivo. È interessante notare che, nei pazienti con FR secondario di recente insorgenza, questi cambiamenti possono essere più scarsi e limitati alle singole dita.

Quadro capillaroscopico "normale"

- Disposizione regolare "a pettine" dei capillari
- Capillari periungueali con aspetto a forcina, asse maggiore parallelo alla superficie cutanea
- Densità capillare: 9-13/mm
- Diametro branca afferente (arteriosa): 8-10 μ m
- Diametro branca efferente (venosa): 10-14 μ m
- Fondo trasparente
- Rare e isolate atipie morfologiche (tortuosità, ectasie omogenee, depositi di emosiderina)

Quadro capillaroscopico "lievemente alterato"

- Modesto disordine del pettine capillare
- Anse tortuose <50%, arborescenti o allungate <20%

- Flusso alterato (granuloso, intermittente, rallentato)
- Rare ectasie
- Microemorragie assenti

Quadro capillaroscopico “gravemente alterato”

- Alterata architettura capillare
- Anse tortuose >50%, arborescenti o allungate >20%
- Flusso irregolare
- Ectasie frequenti con megacapillari
- Microemorragie a tappeto

Pattern sclerodermici secondo Cutolo [5]

- Pattern iniziale: architettura capillare conservata, rari dilatazioni capillari e microemorragie, assente perdita di capillari.

- Pattern attivo: modesta disorganizzazione dell'architettura vascolare, numerosi dilatazioni capillari e microemorragie, moderata perdita di capillari, rare ramificazioni capillari.

- Pattern avanzato: grave sovvertimento dell'architettura vascolare, rare o assenti dilatazioni e microemorragie, estese aree avascolari con perdita di capillari, numerose ramificazioni capillari con neoangiogenesi.

CHEMIOTERAPICI E RISCHIO CARDIO-VASCOLARE

Introduzione

“Is it time for oncologists to get to know their cardiologists?” questa domanda, ancor oggi attualissima, compariva su un editoriale di più di 10 anni fa [1]. Oggi, alla luce delle attuali conoscenze e competenze nella gestione delle tossicità di cute e annessi, potrebbe aggiungersi a pieno titolo anche la figura del Dermatologo, in modo da dar vita ad un team multidisciplinare e multiprofessionale veramente efficace.

In letteratura sono presenti numerose trattazioni riguardanti gli effetti negativi esercitati dalle terapie oncologiche sul sistema cardio-vascolare. Le più comuni sono: 1) cardiomiopatia o insufficienza cardiaca (HF), 2) cardiopatia ischemica o malattia coronarica (CAD), 3) ipertensione, 4) tromboembolismo 5) ipertensione polmonare. Invero, mentre i meccanismi, il monitoraggio e la gestione della cardiotossicità hanno ricevuto ampia attenzione, le tossicità vascolari rimangono ad oggi poco studiate e conosciute, sebbene entrambe siano intrinsecamente correlate. Tali incertezze rendono difficile stabilire un consenso su prevenzione, gestione e trattamento di tali eventi. La capillaroscopia potrebbe, a tal riguardo, fornire informazioni utili sullo stato del microcircolo evidenziando l'eventuale presenza di danno microvascolare, prima ancora che esso si manifesti sotto forma di alterazione funzionale.

Epidemiologia

La popolazione dei cancer survivors è in graduale aumento negli ultimi decenni. Uno studio effettuato negli Stati Uniti mostra che nel 2014 circa 14,5 milioni di americani aveva anamnesi positiva per neoplasie [1]. Il loro numero dovrebbe aumentare del 31% fino a raggiungere i 19 milioni nei prossimi anni [1,2].

L'aumento riflette la maggior sopravvivenza di questa popolazione di pazienti dovuta ai miglioramenti diagnostici, ai progressi terapeutici, ai trattamenti adiuvanti ed a un numero crescente di nuove diagnosi in una popolazione in crescita e che invecchia inesorabilmente [1,3,4]. Tuttavia, i cancer survivors sono a rischio per condizioni correlate sia alla possibilità di una ripresa di malattia, che alle complicanze dovute al trattamento; quest'ultime di importanza crescente man mano che i tassi di sopravvivenza migliorano. Le complicanze cardiovascolari sono effetti

indesiderati comuni di queste terapie [5-7]. In un ampio studio, 10.397 pazienti oncologici avevano un rischio relativo di 15.1 (IC 95% 4.8-47.9) di sviluppare insufficienza cardiaca, 14.8 (7.2-30.4) di sviluppare una seconda neoplasia, 10.4 (4.1-25.9) per lo sviluppo di malattia coronarica (CAD) e 9.3 (4.1-21.2) per malattia cerebrovascolare, rispetto alla popolazione generale [5]. Le complicanze possono verificarsi in modo acuto durante o immediatamente dopo il trattamento, oppure manifestarsi nel corso di mesi o anni [8,9]. La fisiopatologia di questi effetti non è ancora del tutto chiarita, ma una parte importante si suppone derivi dall'alterazione delle proprietà strutturali e funzionali dell'endotelio [10,11], che si traducono in aterosclerosi, tromboembolismo arterioso (inclusa la CAD e la malattia cerebrovascolare) ma, anche ipertensione e tromboembolismo venoso. Poiché queste condizioni possono determinare un consistente aumento di morbilità e mortalità, capire come migliorare prevenzione e diagnosi precoce di tali condizioni sono una priorità cardine nel "to cure" e nel "to care" dei cancer survivors.

Un'analisi di EURO CARE, il più grande studio cooperativo oncologico in Europa, ha mostrato i maggiori aumenti della sopravvivenza a 5 anni dal 1999-2001 al 2005-2007 per cancro alla prostata (73,4% [95% CI 72,9-73,9] vs 81,7% [81,3-82,1]), linfoma non-Hodgkin (53,8% [53,3-54,4] vs 60,4% [60,0-60,9]) e carcinoma del retto (52,1% [51,6-52,6] vs 57,6% [57,1-58,1]) [3]. I tumori con la più alta sopravvivenza a 5 anni per i pazienti diagnosticati nel 2000-2007 erano: testicolo (88,6%, IC 95% 87,4-89,7), tiroide (86,5%, 86,1-87,0), prostata (83,4%, 83,1- 83,6), melanoma cutaneo (83,2%, 82,9-83,6), mammella (solo donne, 81,8%, 81,6-82,0) e linfoma di Hodgkin (80,8%, 80,2-81,4) [1]. In tutto il mondo ci sono variazioni regionali nei trend di sopravvivenza, ma i dati dei paesi europei sono concordi con i dati basati sulle popolazioni della maggior parte dei paesi sviluppati [13]. Anche per quanto riguarda l'oncologia pediatrica la sopravvivenza è aumentata; per i tumori complessivamente considerati, la sopravvivenza a 5 anni è aumentata dal 76,1% (74,4-77,7) per il 1999-2001, al 79,1% (77,3-80,7) per il 2005-2007 [14]. I più comuni tumori nell'uomo sono il cancro alla prostata (43%), il cancro del colon-retto (9%) e il melanoma (8%); mentre nella donna sono il cancro al seno (41%), il corpo uterino (8%) e colon/retto (8%) [1]. La maggior parte dei cancer survivors sono individui anziani; approssimativamente, il 25% e il 45% hanno rispettivamente un'età compresa tra 60 e 69 anni e 70 anni o più. Circa il 5% dei malati oncologici ha meno di 40 anni, anche se questa fascia è in aumento [1,4].

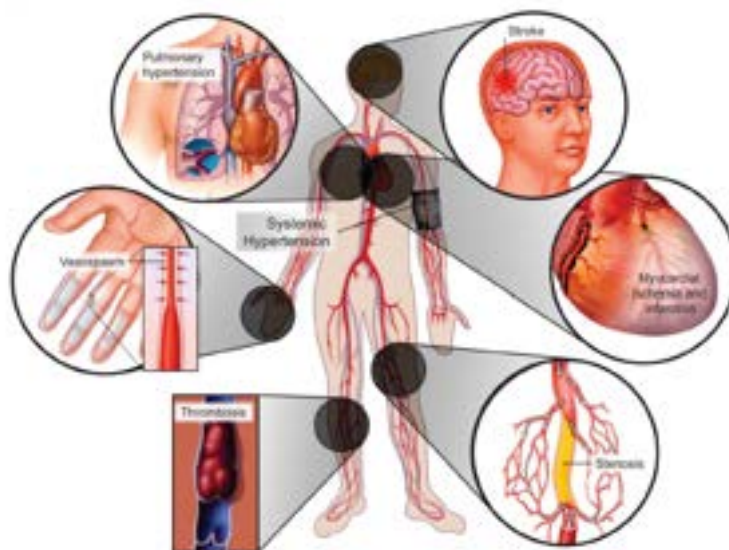
L'aumento del rischio di sviluppare complicanze vascolari a seguito di trattamenti chemioterapici è dimostrato in numerosi studi. Uno studio condotto su tumori infantili e adolescenziali, su 20.483 pazienti seguiti per cinque anni, il tasso di mortalità per seconda neoplasia era 15.2 (IC 95% 13.9-16.6) mentre 7.0 (5.9-8.2) riguardava la morte per cause cardiache [7]. I pazienti sopravvissuti al tumore del testicolo, comunemente diagnosticato in età relativamente giovane (18-35 anni), hanno un aumentato rischio a lungo termine di sviluppare malattia cardiovascolare. Nella coorte dei Late Adverse Treatment Effects in Netherlands Testicular (LATENT) cancer survivors, costituita da 2.707 pazienti colpiti da tumore del testicolo, il rapporto di incidenza standardizzato (SIR) per malattia coronarica (CAD) era 1,17 (95% CI 1,04-1,31), nonostante l'età relativamente giovane dei pazienti [14]. Questo stesso studio ha mostrato che tale manifestazione era particolarmente presente nei pazienti di età più giovane: il rapporto di incidenza standardizzato per infarto miocardico in pazienti con tumore del testicolo non seminoma con età inferiore a 45 anni era 2.06, rispetto a 1.86 dei i pazienti > 45 anni. A 54 anni anche i pazienti con carcinoma differenziato della tiroide avevano un hazard ratio aumentato (HR) di 3,35 (1,66-6,74) per eventi cardiovascolari rispetto a una popolazione di controllo corrispondente per età e sesso [15]. Il rischio di sviluppare malattie cardiovascolari dipende dal tipo di neoplasia, dalle modalità del trattamento antitumorale e dalla dose ricevuta. Ad esempio, il rischio di malattia coronarica è particolarmente elevato nei pazienti che hanno ricevuto radioterapia mediastinica [14,16]. Per i pazienti che hanno ricevuto sia la radioterapia che la chemioterapia per il linfoma di Hodgkin in fase iniziale, il rischio di eventi cardiovascolari ha superato il rischio di recidiva dopo 20 anni [17]. Anche nel cancro mammario, è stata osservata un'aumentata incidenza di eventi cardiaci in quelle donne che avevano ricevuto chemioterapia contenente ciclofosfamide e doxorubicina [18]. La presenza di fattori di rischio cardiovascolare come ipertensione e l'ipercolesterolemia all'inizio del trattamento sono fattori determinanti nell'aumento del rischio. Nello studio Childhood Cancer Survivor, il rischio relativo di CAD per i pazienti con uno, due, tre o quattro fattori di rischio cardiovascolare (ipertensione, diabete, obesità e dislipidemia) era rispettivamente 4,0 (IC 95% 2,5-6,4), 10,4 (6,1- 17.7), 13.7 (6.7-27.8) e 17.6 (5.3-58.3), rispetto ai pazienti senza fattori di rischio [19]. I rischi aggiuntivi per CAD, insufficienza cardiaca, malattia valvolare e aritmie sono derivanti dall'interazione tra fattori di rischio cardiovascolare e l'esposizione al

trattamento. Inoltre, una recente analisi di 91.612 pazienti affette da tumore mammario nel database SEER (Surveillance, Epidemiology e End Results Program del U.S. National Cancer Institute) ha mostrato un aumento del rischio di ospedalizzazione per evento cardiovascolare o morte entro 6 e 24 mesi dalla diagnosi, per donne con una storia pregressa di malattie cardiovascolari (HR 1,51, IC 95% 1,40-1,63) o presenza di uno o più fattori di rischio cardiovascolare (HR 1.42, 1.19-1.67), ma non in donne senza queste condizioni (HR 1.03, 0.80- 1,32) [21].

FISIOPATOLOGIA ED EFFETTI CLINICI

Le malattie cardiovascolari e il cancro sono due condizioni patologiche associate ad una voce importante all'interno del bilancio sanitario. Si stima che siano circa 15 milioni le persone con malattia CV e 14 milioni quelle con una storia di cancro; talvolta fattori di rischio e meccanismi biologici sono condivisi da entrambe queste condizioni. Lo studio delle malattie CV nei pazienti oncologici ha determinato la nascita di una nuova e prospera disciplina nota come cardio-oncologia. Questo campo multidisciplinare comprende la cura dei pazienti con malattia CV che sviluppano il cancro; pazienti oncologici e cancer survivors che sono a rischio per lo sviluppo di malattie cardiovascolari secondarie alle terapie oncologiche; e pazienti oncologici che sviluppano una chiara malattia cardiovascolare.

Spettro semplificato delle tossicità/malattie vascolari indotte dai chemioterapici [3]



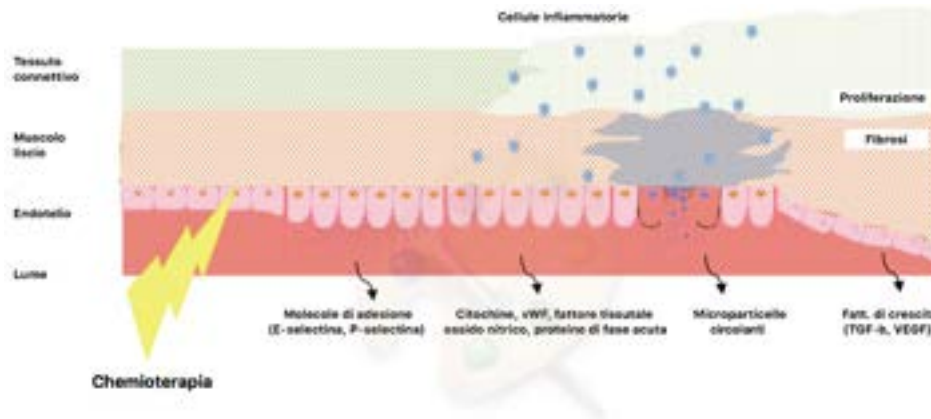
La malattia cardiovascolare correlata ai trattamenti antineoplastici viene spesso definita cardiotossicità. Le patologie incluse in tale termine non comprendono solo insufficienza cardiaca (HF) e disfunzione ventricolare sinistra (LV) (quest'ultima a volte indicata come cancer therapeutics cardiac dysfunction o CTRCD), [4] ma anche, ipertensione (HTN), ischemia miocardica, aritmie, ipertensione polmonare, malattia pericardica, malattia valvolare, malattia vascolare periferica e trombosi venosa e arteriosa (vedi tabella [5]). Si ritiene che l'incidenza e, quindi, l'importanza di tali tossicità siano in aumento. La precisa fisiopatologia degli effetti esercitati a tale livello non è tuttavia facilmente intelligibile. Si suppone che l'azione di specifici farmaci sia la risultante della combinazione tra fattori di rischio di base (qualora presenti, vedi tabella) e effetti citotossici della terapia, attraverso un'azione diretta ed indiretta sulle cellule dell'endotelio e della muscolatura liscia.

Fattori di rischio convenzionali della cardiotossicità indotta da chemioterapia

Sesso femminile
Età (<18 anni,> 75 anni)
Ipertensione incontrollata o diabete mellito
Insufficienza renale
Storia precedente di cardiotossicità
Cardiopatía preesistente: ipertrofia ventricolare sinistra, malattia coronarica
Cardiomiopatia: ridotta frazione di eiezione ventricolare sinistra
Radioterapia concomitante o precedente che coinvolge il cuore
Chemioterapia concomitante: antracicline / trastuzumab

Attualmente l'endotelio non viene più considerato un semplice monostrato cellulare che separa il sangue dalle pareti vascolari, ma ad esso viene attribuito un ruolo chiave nel mantenimento dell'omeostasi vascolare, attraverso la produzione di sostanze vasoattive come l'endotelina-1 (ET-1), angiotensina II (Ang II), trombossano A2, specie reattive dell'ossigeno, monossido di azoto (NO) e prostaciclina [1]. L'omeostasi dell'intero sistema cardiovascolare viene mantenuta solo in presenza di un endotelio sano. Le cellule endoteliali (EC) mature, le cellule progenitrici endoteliali e le EC circolanti partecipano al mantenimento dell'omeostasi del tessuto cardiovascolare, compreso il tono vasale, la permeabilità e lo spessore dell'intima, il rimodellamento vascolare e l'angiogenesi, la coagulazione e la fibrinolisi. Al contrario, la disfunzione endoteliale è coinvolta nella fisiopatologia di diverse malattie, tra cui

aterotrombosi, diabete, sepsi, ipertensione polmonare, microangiopatia associata a malattie neurodegenerative, steatosi epatica, finanche il processo di metastatizzazione [2].



Indipendentemente dall'insulto o dal meccanismo iniziale, sembra esserci un repertorio limitato di risposte che includono apoptosi, aumento della permeabilità vascolare, trombosi, alterata regolazione della muscolatura liscia e, infine, proliferazione e fibrosi della parete vascolare. Alcuni degli effetti si manifestano clinicamente durante il trattamento, mentre altri danno luogo a effetti tardivi, solo in un primo momento subclinici. In generale, la distruzione dell'endotelio, la trombosi e gli eventi tromboembolici sono i precursori dell'aterosclerosi e, conseguentemente, dell'ischemia cardiaca e cerebrale. L'ipertensione sembra essere correlata alla diminuzione dell'attività dell'ossido nitrico sintetasi (iNOS) e alla fibrosi della parete vascolare, determinando effetti a lungo termine sulla funzione degli organi, come l'ipertrofia cardiaca, l'insufficienza cardiaca ed eventi cerebrovascolari.

Agenti antineoplastici e principali complicanze.

SOSTANZA	EFFETTO	NOTE
Antracicline (Doxorubicina, daunorubicina, epirubicina, idarubicina, mitoxantrone)	Aritmie cardiache, CM, HF	Fattori di rischio includono: dose cumulativa (sebbene la variazione genetica possa conferire un aumento del rischio a più bassi dosaggi), fattori di rischio CV convenzionali, ulteriori terapie cardiotossiche (tra cui RT o trastuzumab)
Taxani Paclitaxel	Aritmia, ischemia miocardica	Può esacerbare il rischio di cardiotossicità da antracicline
Agenti alchilanti Ciclofosfamide;	Miopericardite, aritmie;	Raro, Complicanze CV riportate solo a dosaggi elevati

Cisplatino, carboplatino, oxaliplatino	Disfunzione endoteliale, vasospasmo arterioso, HTN	
Antimetaboliti 5-fluorouracile, capecitabina	Vasospasmo coronarico, ischemia miocardica, infarto, aritmie, alterazioni dell'ECG, morte improvvisa.	Possono essere correlati a danno endoteliale, vasocostrizione e vasospasmo
Inibitori di anticorpi monoclonali / tirosin-chinasi Bevacizumab Trastuzumab Pertuzumab	HTN, CM, HF, trombosi CM, HF CM, HF	Basso rischio di CM o HF Aumento del rischio con antracicline; Anche l'HTN, l'obesità e la LVEF con valori borderline sono fattori di rischio stabiliti
Inibitori del proteasoma Bortezomib Carfilzomib	CM, HF, edema CM, HF, edema	Inibitore di proteasoma reversibile. Inibitore del proteasoma irreversibile; tassi di cardiotoxicità maggiori
Inibitori tirosin-chinasici Sunitinib Sorafenib Imatinib Nilotinib Ponatinib Dasatinib	HTN, CM, HF, trombosi HTN, CM, ischemia, trombosi CM, edema, versamento pericardico. Malattia vascolare periferica, ischemia cardiaca Malattia vascolare periferica, ischemia cardiaca HTN polmonare, versamento pericardico	Rischio di HTN che tende a manifestarsi precocemente; resta da stabilire la relazione tra postcarico e rischio CM. Rischio di HTN; associato all'ischemia. Rischio di CM molto basso
Agenti immunomodulatori Talidomide Lenalidomide Inibitori del check-point immunitario	Edema, trombosi, aritmia Edema, trombosi, aritmia Miocardite	
Analoghi delle gonadotropine Leuprolide, goserelin, triptorelina, flutamide, bicalutamide	Sindrome metabolica, ischemia, coronaropatie	

Modulatori del recettore degli estrogeni Tamoxifen	Trombosi	
Inibitori dell'aromatasi (anastrozolo, letrozolo, exemestane)	Ipercolesterolemia, HTN, aritmia, valvulopatia e pericardite	
Radioterapia	Malattia valvolare, malattia pericardica e vascolare, malattia coronarica, CM, HF.	Gli eventi CV maggiori tendono a manifestarsi in ritardo, sebbene vi siano anomalie precoci nella funzione cardiaca e nella perfusione.

AGENTI CHEMIOTERAPICI TRADIZIONALI

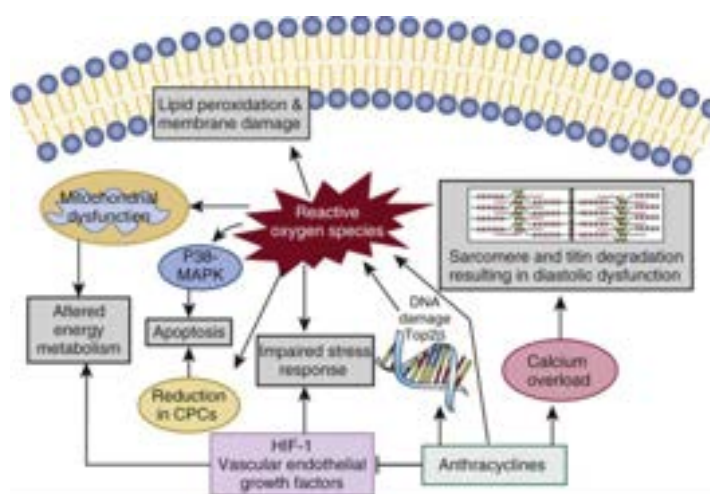
Antracicline

Le antracicline sono farmaci antitumorali appartenenti alla categoria degli antibiotici citotossici, ovvero un gruppo di farmaci, isolati per lo più da fonti naturali, la cui azione antineoplastica è dovuta ad interazione con il DNA ed enzimi coinvolti nella regolazione del grado di superavvolgimento della doppia elica (topoisomerasi I e II). Sin dagli anni '50, le antracicline sono ampiamente utilizzate negli adulti e nei bambini e, notoriamente, il loro impiego si associa ad un aumentato rischio di cardiotoxicità, che si manifesta principalmente come HF (insufficienza cardiaca) e LVD (disfunzione del ventricolo sinistro). Contrariamente, la tossicità vascolare è stata meno estesamente analizzata; tuttavia, anch'essa può essere responsabile di un aumento della morbilità e / o della mortalità, che ne limitano così l'efficacia complessiva. Storicamente, la tossicità è classificata come acuta, subacuta o cronica [1], sebbene studi più recenti abbiano messo in discussione questo paradigma. La cardiotoxicità acuta tende a manifestarsi precocemente, durante la terapia, ed in genere è rara ($\approx 1\%$), manifestandosi con aritmie, alterazioni elettrocardiografiche, pericardite o eventualmente anche miocardite e HF. La cardiotoxicità subacuta, che tipicamente si verifica entro 1 anno di terapia, e la cardiotoxicità cronica (o tardiva) sono eventi più frequenti, con un'incidenza che varia ampiamente, dall'1,6% al 23%. La cardiotoxicità a esordio tardivo può verificarsi da 10 a 20 anni dopo la terapia, possibilmente nel contesto di un ulteriore "stressor". Uno dei principali fattori che ne determinano l'insorgenza è il dosaggio del chemioterapico. Le analisi retrospettive suggeriscono un'incidenza di insufficienza cardiaca, definita da segni e sintomi clinici, dell'1,7% con l'utilizzo di una dose cumulativa di 300 mg/m², del 4,7% a 400 mg/m², del 15,7% a 500 mg/m² ed infine del 48% a 650 mg/m² [2]. Dati più recenti indicano anche che alcuni polimorfismi

del singolo nucleotide (SNP) modificano l'associazione tra dosaggio di antraciclina e rischio di CM [3]. Negli adulti, ulteriori fattori di rischio per lo sviluppo di cardiotossicità includono l'età, i tradizionali fattori di rischio CV (HTN, diabete, obesità e iperlipidemia), la presenza di malattia coronarica o CM, una precedente RT del torace o terapia cardiotossica aggiuntiva [3]. La doxorubicina è stata associata ad una marcata attenuazione della flow-mediated dilatation (FMD) misurata a livello dell'arteria brachiale ($6,5 \pm 1,0\%$ contro $2,5 \pm 1,1\%$, $p = 0,0004$). Uno studio di follow-up a lungo termine (20 anni) in pazienti con pregressa leucemia linfoblastica acuta, ha riscontrato che quelli sottoposti a chemioterapia presentavano una risposta della FMD significativamente ridotta rispetto ai controlli ($9,5 \pm 2,9\%$, $p < 0,0001$). Questo suggerisce un declino, nel lungo termine, della funzione endoteliale, piuttosto che della contrattilità della muscolatura liscia [4]. Diversi meccanismi di base sono stati proposti per spiegare la cardiotossicità indotta da antracicline; tra questi, la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e l'aumento dello stress ossidativo attraverso il ciclo redox della porzione chinonica della doxorubicina, la formazione di complessi ferro-antracicline e l'inibizione della topoisomerasi-2 β [5]. Inoltre, è stato dimostrato che esse causano un alterato signaling del calcio e il suo sequestro intracellulare influenzando la funzionalità delle fibre contrattili, una diminuzione delle cellule progenitrici cardiache e l'alterazione del signaling neuregulina (NRG)/ErbB [5,6]. Di questi potenziali meccanismi, quello più ampiamente citato e accettato comprende la formazione di ROS, che conduce allo stress ossidativo e conseguente danno ai miociti cardiaci e alle cellule endoteliali [5,6]. Una porzione dell'antraciclina entra nelle cellule e subisce un ciclo redox, generando radicali liberi attraverso, sia una via enzimatica che coinvolge la catena respiratoria mitocondriale, sia una via non enzimatica che coinvolge le interazioni dirette tra antracicline e ferro intracellulare. I radicali idrossilici del complesso antraciclina-ferro agiscono come messaggeri citotossici. Ciò si traduce in alterata funzione mitocondriale, danni alla membrana cellulare e citotossicità. L'ossido nitrico sintasi (NOS) contribuisce, inoltre, alla generazione di specie azotate reattive, instaurando il cosiddetto "stress nitrosativo". Dati più recenti suggeriscono che la formazione di ROS si verifica anche attraverso l'isoenzima Top2 e, più specificamente, Top2 β , nei cardiomiociti [5]. I topi privi di Top2 β sono protetti dal danno al DNA indotto dalle antracicline, dalla morte dei cardiomiociti e dalla diminuzione della funzione cardiaca. È interessante notare che il dexrazoxano, un chelante del ferro e un cardioprotettore, si lega alla Top2 β e ne provoca la degradazione. I dati ottenuti in modelli animali ed in vitro supportano l'ipotesi che le antracicline influenzino anche le cellule progenitrici cardiache, dando origine a

una compromissione della risposta allo stress e alla riparazione del danno. La chemioterapia con antracicline può anche rendere più sensibili i cardiomiociti alle alterazioni del signaling NRG-1 / ErbB [6,7]. La somministrazione di NRG-1 è infatti protettiva nel contesto della tossicità indotta da antracicline e, viceversa, gli eterozigoti NRG-1 hanno un ridotto tasso di sopravvivenza rispetto ai wild type. Studi in vitro hanno anche dimostrato un effetto inibitorio della doxorubicina sul fattore indotto da ipossia (HIF).

Meccanismi proposti della cardiotoxicità da antracicline



Bleomicina

La bleomicina è un antibiotico antitumorale prodotto dal batterio *Streptomyces verticillus*, in grado di legarsi al DNA (grazie al nucleo bistiazolico) e aprirne i filamenti producendo radicali liberi (grazie agli N) i quali ossidano lo stesso e provocano aberrazioni cromosomiche, rottura e frammentazione del DNA stesso, e di conseguenza morte cellulare [8]. La tossicità è selettiva in quanto alcuni tessuti presentano bleomicina idrolasi, tuttavia assenti nella cute e nei polmoni. Sono stati descritti vari effetti tossici della bleomicina sulle cellule endoteliali [9,10]. L'evento principale che determina il danno non è esattamente noto, ma l'espressione di citochine (IL-1b, TNF-a, TGF-b, IL-8) e di molecole di adesione (molecole di adesione intercellulare ICAM – 1 ed E-selectina) nell'endotelio [9,10] oltre alla generazione di radicali liberi, possono svolgere un ruolo [11]. La bleomicina da sola o in associazione con alcaloidi della vinca, cisplatino o etoposide, può indurre il fenomeno di Raynaud [11-13], ischemia miocardica e infarto, trombosi ed eventi tromboembolici [14]. Inoltre, la polmonite interstiziale che si verifica con il suo utilizzo è stata imputata alla tossicità vascolare del farmaco

[15]. In studi di follow-up a lungo termine, il fenomeno di Raynaud si è manifestato in circa un terzo dei pazienti che hanno ricevuto bleomicina [16,17]. Nei pazienti, il danno capillare può essere visualizzato mediante capillaroscopia a livello della plica periungueale, anche in pazienti asintomatici [18]. La microalbuminuria, come indicatore di danno endoteliale, è stata riscontrata nel 22% dei long-term survivor con pregresso tumore del testicolo, trattati con chemioterapia combinata a base di cisplatino-bleomicina [14].

Taxani

I taxani, il paclitaxel (Taxolo) e il suo semisintetico analogo docetaxel (Taxotere), sono farmaci leganti i microtubuli, il cui principale meccanismo d'azione si basa sull'inibizione della divisione cellulare, della separazione e della crescita dei cromatidi, ed infine la morte cellulare. Utilizzati da soli, questi farmaci mostrano una relativamente scarsa cardiotossicità; con prevalenza di bradicardia asintomatica e blocco atrioventricolare [19]. Tuttavia, quando il paclitaxel viene somministrato in stretta associazione con la doxorubicina ad alte dosi, si osservano alti tassi di HF (21%). Si ritiene che questo evento sia secondario alle alterazioni nel metabolismo della doxorubicina quando somministrata insieme con i taxani. Essi, inoltre, influenzano l'angiogenesi inibendo proliferazione, migrazione e l'invasione delle cellule endoteliali [20]. Modificando l'integrità del sistema dei microtubuli, si pensa che i taxani abbiano anche effetti diretti sulle vie di segnalazione di membrana e influenzino il traffico proteico. Il paclitaxel aumenta l'espressione del fattore tissutale endoteliale (TF) con effetti protrombotici. La tossicità vascolare del docetaxel contribuisce alla iperpermeabilità capillare in maniera dose-dipendente. Inoltre, esso è anche in grado di modificare l'attivazione della c-jun chinasi (JNK), la down-regolazione della trombomodulina e l'aumento della nitratura proteica [21].

Agenti alchilanti e Alkylating-Like

La *ciclofosfamida*, conosciuta anche come citofosfano è un agente alchilante [22]. Utilizzata nel trattamento del cancro della mammella e nelle neoplasie ematologiche, è generalmente ben tollerata. Può indurre l'apoptosi delle cellule endoteliali [23], contribuendo così alla tossicità d'organo, in particolare di cuore e polmoni. In studi pre-clinici, è stata descritta la sua capacità di provocare un danno significativo in modo concentrazione-dipendente nelle cellule endoteliali polmonari [24]. L'alterazione endoteliale dei capillari miocardici con conseguente stravasamento di plasma, globuli rossi e metaboliti tossici, è stato inoltre descritto [25,26]. Le complicanze vascolari della ciclofosfamida includono l'ipertensione,

l'ischemia e insufficienza cardiaca [27-31]. A dosi più elevate (superiori a 100 mg/kg) sono stati riportati casi di miocardite emorragica, tachiaritmie, HF e malattia pericardica. Gli *agenti a base di platino*, spesso considerati agenti Alkylating-Like, sono comunemente usati nel cancro del testicolo, così come nei tumori alle ovaie, ai polmoni e al seno e altri tumori solidi. La cardiotossicità del platino è stata molto ben studiata nella popolazione di pazienti con tumore del testicolo. Tale patologia ha alti tassi di guarigione e i pazienti vivono da 30 a 50 anni dopo il trattamento, tuttavia con un aumento del rischio a lungo termine di eventi CV ritenuti correlati alla terapia oncologica. Uno studio epidemiologico con un tempo di osservazione mediano di 19 anni ha riportato un aumento del rischio di malattia coronarica aumentato di 5,7 volte e di 2,3 volte per quanto riguarda coronaropatie, malattia cerebrovascolare e arteriopatia periferica in pazienti trattati con regimi chemioterapici a base di platino, rispetto ai pazienti non sottoposti a chemioterapia. Questi effetti erano inoltre aggravati nei pazienti trattati con RT concomitante e in quelli che avevano livelli anormali di androgeni. Alcuni studi hanno anche suggerito che composti a base di platino determinano danno endoteliale, anche perché i livelli plasmatici di tale metallo rimangono rilevabili fino a 20 anni dopo l'esposizione terapeutica [32]. La citotossicità indotta da cisplatino nelle cellule endoteliali è stata collegata a un'aumentata produzione di microparticelle endoteliali procoagulanti e radicali liberi [33, 34]. Ad esempio, i pazienti con cancro del testicolo trattati esclusivamente con orchietomia hanno mostrato minori livelli plasmatici dei marcatori pro-trombotici endoteliali PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor-1) e vWF (fattore Von Willebrand) rispetto a quelli trattati con cisplatino [35]. La neuropatia correlata al cisplatino può avere origine vascolare, poiché il danno apoptotico endoteliale si verifica anche a livello dei vasa nervorum, con il conseguente sviluppo di neuropatia ischemica [36]. Inoltre, la vasodilatazione NO-dipendente (vasodilatazione mediata dal flusso) sembra essere compromessa nei cancer survivors che hanno ricevuto chemioterapia a base di cisplatino rispetto ai pazienti non trattati [37].

Antimetaboliti

5-Fluorouracile (5-FU), un analogo pirimidinico, è usato nel trattamento di molti tumori solidi, inclusi il cancro del tratto gastrointestinale, della mammella, testa/collo e del pancreas. Gli effetti sul sistema CV comprendono l'ischemia miocardica, la più comune, così come le aritmie cardiache, ipertensione, l'ipotensione, la cardiomiopatia e l'arresto cardiaco. Studi in vitro e in vivo suggeriscono che il 5-FU si associa a danno endoteliale, vasospasmo, vasocostrizione e fibrosi interstiziale. I meccanismi sottostanti all'effetto prodotto

sui vasi del 5-FU sembrano essere molteplici [38]. Un effetto citotossico diretto del 5-FU sulle cellule endoteliali e quindi l'effetto protrombotico sono stati dimostrati in studi clinici, così come l'aumento delle specie reattive dell'ossigeno, ROS [39]. È stato dimostrato che il trattamento con 5-FU induce cambiamenti strutturali nell'endotelio di vari organi e il distretto coronarico ha ricevuto la maggiore attenzione [40].

Basaki et al. hanno dimostrato che il 5-FU sopprime l'angiogenesi bloccando l'effetto stimolatorio del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) sulla sintesi del DNA, durante la mitosi delle cellule endoteliali [41]. Gli studi hanno mostrato effetti tossici diretti sull'endotelio vascolare coinvolgenti la NO-sintetasi endoteliale che conducono allo spasmo coronarico e alla vasocostrizione endotelio-indipendente, attraverso la protein-chinasi C [42]. In uno studio prospettico su 106 pazienti trattati con 5FU, il 9% (8,5%) presentava sintomi da cardiotoxicità, principalmente sotto forma di angina ed alterazioni del tracciato ECG [43]. L'aumento di biomarker cardiaci come il pro-peptide natriuretico cerebrale N-terminale (NT-proBNP) è stato inoltre osservato. Questi sintomi, spesso curabili con nitrati e calcio-antagonisti, sono stati storicamente attribuiti al vasospasmo, sebbene meccanismo e fisiopatologia restino poco definiti. La capecitabina, un farmaco che, dopo assunzione orale, viene trasformato per via enzimatica in 5-FU dalla timidina fosforilasi, ha effetti tossici significativamente meno gravi. Essa è stata associata ad un'incidenza del 6,5% di eventi cardiovascolari: angina, infarto miocardico, tachicardia ventricolare e morte improvvisa [44].

Inibitori del proteasoma

Gli inibitori del proteasoma, come bortezomib e carfilzomib, sono usati nel trattamento del mieloma multiplo. Le strategie per trattare il mieloma includono l'uso di inibitori del proteasoma; il proteasoma è responsabile della degradazione della maggior parte delle proteine regolatrici, comprese quelle che controllano la progressione del ciclo cellulare, l'apoptosi e la riparazione del DNA [45]. Le cellule tumorali generalmente hanno livelli più alti di attività proteasomiale rispetto alle cellule normali e si ritiene quindi che siano particolarmente suscettibili agli effetti proapoptotici degli inibitori del proteasoma. L'omeostasi proteica, tuttavia, si ipotizza svolga un ruolo anche nel mantenimento della funzione cardiaca [46]. Nei pazienti con CM dilatativa, per esempio, i depositi proteici oligomerici si trovano nei cardiomiociti e sono associati a un aumento dello stress cardiaco. Sia il bortezomib, che provoca un'inibizione reversibile, sia il carfilzomib, un inibitore irreversibile, sono associati a un'incidenza di scompenso cardiaco rispettivamente

del 4% e del 7%. Con queste terapie sono state osservate ulteriori cardiotoxicità, quali ipertensione, disfunzione diastolica, ipertensione polmonare, aumenti dei peptidi natriuretici e peggioramento della dispnea.

Agenti immunomodulatori

Talidomide e lenalidomide sono usati nel trattamento del mieloma multiplo [47]. Questi agenti sono principalmente associati ad un aumentato rischio di eventi tromboembolici venosi, nell'ordine del 2% - 4%, secondari agli effetti antiangiogenici e alle alterazioni di fattori quali: trombomodulina, fattore di von Willebrand e fattore VIII. Secondo quanto riportato in letteratura, questa incidenza aumenta in modo significativo quando tali agenti vengono utilizzati in combinazione con altri agenti come desametasone o antracicline. Per mitigare il rischio di tromboembolia, l'International Myeloma Working Group raccomanda l'uso di aspirina, eparina a basso peso molecolare o warfarin con terapia combinata.

Gli inibitori del checkpoint immunitario sono una nuova classe di agenti usati in una varietà di tumori solidi. Questi agenti sono associati a un rischio molto basso, ma clinicamente significativo, di miocardite. Le segnalazioni di casi di pazienti trattati con anticorpi anti-CTLA-4 e anti-PD1 hanno descritto casi fatali secondari a gravi compromissioni cardiache.

TARGET THERAPIES

Il trattamento di numerose neoplasie è cambiato radicalmente negli ultimi anni con l'avvento delle cosiddette target therapy. A differenza dell'approccio della chemioterapia classica, che agisce su meccanismi aspecifici legati a caratteristiche proprie di tutte le cellule a rapida proliferazione, comprese quelle normali, la terapia target interviene sui meccanismi legati all'espressione di fattori e vie di segnale che sono specificamente alterati in determinati tipi di neoplasie. L'obiettivo di questo approccio era quello di ridurre le tossicità tipiche dei chemioterapici standard (ad esempio, alopecia, tossicità gastrointestinale, mielotossicità) e allo stesso tempo di aumentarne l'efficacia. In alcune situazioni, tali obiettivi sono stati raggiunti, ma sono emerse preoccupazioni per la cardiotoxicità derivante dall'utilizzo di diversi agenti. I meccanismi attraverso cui la tossicità cardiovascolare si realizza si dividono in due principali tipi. Il primo è costituito dalla tossicità "on-target", causata dall'inibizione delle chinasi bersaglio le quali vengono espresse anche in altri sistemi come quello cardio-vascolare. Tale tossicità si verifica tipicamente con imatinib, mediante l'inibizione dei recettori del

fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFRs), del c-kit, del membro della famiglia Src Lck, del CSF1R, del Cdc2 e del recettore del dominio della discoidina (DDR) 1. Il secondo tipo di tossicità è la tossicità “off-target”; in questo caso, essa si verifica in quanto il farmaco inibisce anche chinasi che non sono tra i suoi bersagli principali e che svolgono un ruolo nella fisiologia di cuore e vasi. L'inibizione della protein-chinasi attivata da AMP (AMPK) da parte di Sunitinib è un esempio di tossicità “off target”.

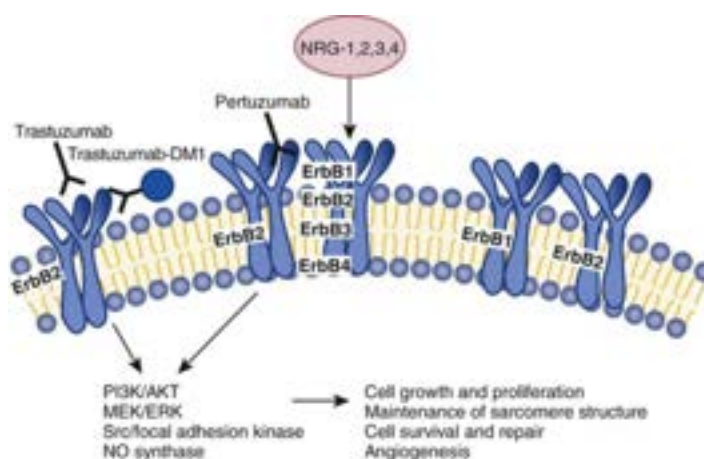
Antagonisti ErbB (Trastuzumab, Pertuzumab, T-DM1)

Trastuzumab è un anticorpo monoclonale umanizzato che si lega al sottodominio IV del recettore 2 del fattore di crescita epidermico umano (HER2) / neu, noto anche come ErbB2. Anche se il rischio di cardiotoxicità significativa da farmaci anti-Her-2 sembra essere basso, ErbB2 svolge un ruolo chiave nella crescita cellulare, inclusa la crescita dei miociti e l'inibizione dell'apoptosi [1-3]. Le cellule endoteliali cardiache producono il fattore di crescita NRG1, che attiva il complesso Her-2 / Her-4, innescando il pathway ERK-MAPK e PI3K-Akt, che promuove la sopravvivenza cellulare [4]. È importante notare che NRG-1 regola l'angiogenesi e la desensibilizzazione NOS-dipendente alla stimolazione adrenergica. Il trattamento con Trastuzumab agisce su Her-2 riducendo i segnali di sopravvivenza e inducendo disfunzione mitocondriale. Inoltre, fattori di stress, come il precedente trattamento con antracicline, aumentano la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) [5]. In condizioni normali, le cellule limitano questo evento sovraesprimendo Her-2 e conducendo così all'attivazione di pathway che consentono la sopravvivenza cellulare [6-9]. È importante notare che anche l'inibizione di ErbB2 è responsabile di una perdita della funzione vascolare dovuta alla riduzione della biodisponibilità dell'ossido nitrico (NO), all'aumento della produzione di ROS e alla riduzione dei segnali di sopravvivenza [10,11]. Secondo la teoria più accreditata, il trastuzumab interferisce con la dimerizzazione del recettore dell'human endothelial growth factor (HER) influenzando vari pathways, specialmente quelli attivati in risposta allo stress [12-13]. Il nesso con l'endotelio è giustificato dal fatto che il ligando naturale che realizza la dimerizzazione dell'HER è la neuregulina 1, prodotta dalle cellule endoteliali della microcircolazione. Le cellule endoteliali disfunzionali posseggono una ridotta disponibilità di neuregulina-1 e conseguentemente una minor capacità del miocardio a rispondere a qualsiasi fattore di stress. In effetti, è stata osservata una correlazione inversa tra i livelli circolanti di neuregulina-1 e la gravità della malattia coronarica [14]. Inoltre, la diminuita sintesi di NRG-1 altera il recupero cardiaco a seguito di un insulto ischemico, e la compromissione della segnalazione NRG-1 /

HER è stata riscontrata in modelli sperimentali di cardiomiopatia diabetica [15-16]. Come atteso, i pazienti con CAD e quelli con diabete sono maggiormente esposti alla cardiotossicità indotta da antracicline, e l'aggiunta di neuregolina-1 migliora la funzione cardiaca dopo un danno miocardico indotto da antracicline [17]. Ciò spiegherebbe l'alta incidenza di cardiomiopatia quando il trastuzumab viene somministrato in stretta prossimità temporale alle antracicline. Un'osservazione unica, infatti, è la rarefazione dei periciti microvascolari senza una variazione della densità capillare nel miocardio dei topi trattati con sunitinib. È importante sottolineare che questi hanno sviluppato disfunzione microvascolare con compromissione della riserva di flusso coronarico e della funzione contrattile [18,19].

Meccanismi proposti di cardiotossicità da trastuzumab:

Il trastuzumab determina perturbazioni del pathway neuregulina (NRG) / ErbB; ciò si traduce nell'inibizione di vie di segnalazione cardiovascolari fondamentali, responsabili della crescita cellulare, del mantenimento della struttura dei cardiomiociti, della sopravvivenza cellulare e dell'angiogenesi.

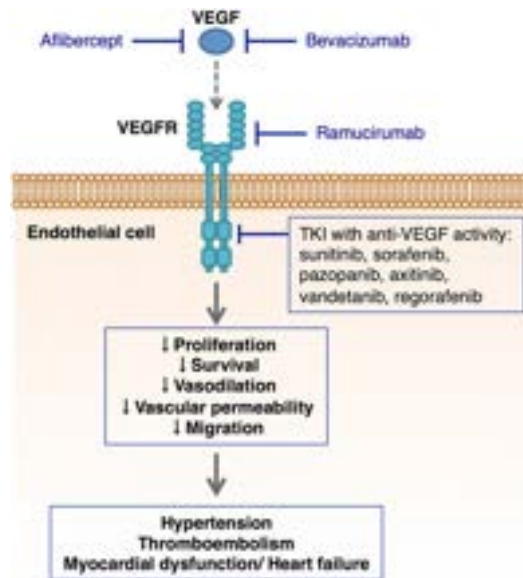


Inibitori del Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Gli inibitori della via di segnalazione del recettore del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGFR) sono utilizzati nel trattamento dei tumori metastatici del rene; tumori stromali gastrointestinali; della tiroide, epatocellulari e del colon; e sono tuttora in studio per altre applicazioni. Bevacizumab è un anticorpo anti-VEGF ricombinante umanizzato. I rischi cardiovascolari associati all'utilizzo di bevacizumab includono HTN; una bassa incidenza di HF (dell'ordine dell'1,6%, ma con un rischio relativo di 4,7 rispetto al placebo); e un'aumentata incidenza di eventi tromboembolici arteriosi (7,1% con Bevacizumab rispetto al 2,5% con l'utilizzo di chemioterapia da sola).

Meccanismi di tossicità cardiovascolare indotta dagli inibitori del pathway del VEGF.

Il legame del VEGF ai recettori avvia una cascata tirosin-chinasica che conduce ad un aumento della proliferazione, sopravvivenza, permeabilità e migrazione cellulare. Gli inibitori del VEGF inducono uno squilibrio tra vasodilatazione e vasocostrizione riducendo NO e PGI₂ ed aumentando l'ET-1; di conseguenza, essi aumentano resistenza vascolare periferica e pressione sanguigna [20].

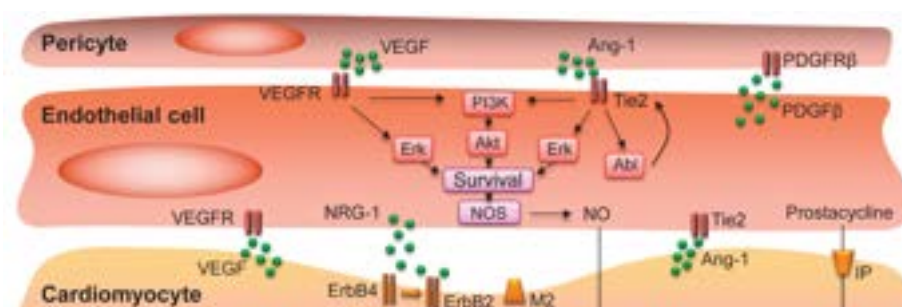


Sorafenib è un inibitore TK che blocca il VEGFR e il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFR) e le Raf-chinasi; è usato nel trattamento del carcinoma renale, della tiroide e dei tumori epatocellulari e di altri tumori solidi. Sorafenib è associato a ischemia cardiaca e HTN. Sia il bevacizumab che il sorafenib hanno un effetto cardiotossico meno pronunciato di sunitinib. Quest'ultimo è un inibitore TK orale, multi-target, utilizzato nel trattamento del carcinoma a cellule renali metastatico, dei tumori stromali gastrointestinali e dei tumori neuroendocrini [21, 22]. Axitinib e pazopanib sono altri inibitori TK che influenzano anche la via di segnalazione del VEGFR. Questi inibitori TK antiangiogenetici sono stati associati a HTN, CM e HF, ischemia cardiaca e eventi trombotici arteriosi. E' interessante notare che le target therapies hanno sottolineato l'importanza di un tipo cellulare in precedenza poco studiato: il pericita. La perdita di periciti precede la riduzione della riserva di flusso coronarico e della funzione cardiaca; queste conseguenze sono state prevenute utilizzando strategie di protezione dei periciti, ad es. trattamento concomitante con talidomide [23]. Queste osservazioni sono rivoluzionarie poiché sottolineano per la prima volta il ruolo chiave di tale tipo cellulare nella microvascolarizzazione coronarica e di una sequenza che esordisce con il danno dei periciti, evolve con la formazione di alterazioni microvascolari e culmina nella disfunzione cardiaca. Il cross-talk sul livello del microcircolo

coronarico si estende a periciti, cellule endoteliali e cardiomiociti. Queste nuove osservazioni possono modificare il concetto di “coupling endotelio-miocardio” che si è infatti evoluto sulla base degli studi condotti sui meccanismi della cardi tossicità indotta da trastuzumab [24]. Inaspettatamente, sono stati ottenuti nuovi approfondimenti sui meccanismi della disfunzione microvascolare coronarica e sul significato dell'accoppiamento cellule endoteliali-periciti al fine del mantenimento dell'integrità microvascolare.

Presentazione schematica dell'interazione periciti-endotelio-miocardici.

AC = adenilato ciclasti, Ang-1 = angiopoietina 1, IP = recettore della prostaciclina, M2 = recettore muscarinico, NO = ossido nitrico, NOS = NO sintasi, NRG-1 = neuregulin-1, sGC = guanilato ciclasti solubile, PDGR = platelet-derived growth factor, PDGRR = recettore del PDGR, VEGF = vascular endothelial growth factor, VEGFR = recettore del VEGF.



Come illustrato, le cellule endoteliali producono PDGF per mantenere la sopravvivenza dei periciti, i quali a loro volta producono VEGF e angiopoietina-1 necessari al trofismo delle cellule endoteliali. L'osservazione che pazienti in terapia con farmaci come il bevacizumab sviluppano cardiomiopatia e insufficienza cardiaca, porta a domandarsi se questo sia il riflesso di un impatto diretto del VEGF sui cardiomiociti o un impatto indiretto del VEGF sulla funzione miocardica attraverso le cellule endoteliali e la microvascolarizzazione coronarica. Gli studi iniziali hanno indicato che i cardiomiociti sono la principale fonte di VEGF nel cuore e in modo paracrino rimangono essenziali per la microvascolarizzazione coronarica [25]. Infatti, topi con delezione di VEGF sviluppavano, in concomitanza con una ridotta vascolarizzazione, cardiomiopatia dilatativa con assottigliamento della parete ed una risposta contrattile significativamente attenuata dalla dobutamina [25]. Ulteriori esperimenti hanno inoltre indicato che il VEGF miocardico è un elemento critico per far corrispondere densità microvascolare e perfusione [26]. La segnalazione autocrina del VEGF a livello delle cellule endoteliali, tuttavia, rimane fondamentale [27]. I topi con delezione di VEGF confinata all'endotelio (ma

conservata nei cardiomiociti) avevano una densità vascolare minore nel cuore e svilupparono cardiomiopatia dilatativa e microinfarti. Questi infarti erano conseguenti a perdita per apoptosi delle cellule endoteliali, attivazione e aggregazione piastrinica e alla formazione di trombi intravascolari. Questo spiegava la morte cardiaca improvvisa in topi di 20-25 settimane [27]. Queste speculazioni chiaramente hanno evidenziato che il VEGF endoteliale è fondamentale per la stabilità del sistema cardiovascolare. Studi in vitro hanno suggerito inoltre che quest'ultimo diventa ancora più importante in condizioni di stress come l'ipossia e che le fonti paracrine di VEGF non possono compensare eventuali modificazioni nella segnalazione autocrina del VEGF (come quella prodotta dai TKI) è vitale per la sopravvivenza delle cellule endoteliali.

Inibitori di Bcr-Abl

Imatinib, il primo inibitore TK diretto contro la proteina di fusione Bcr-Abl, derivante dalla traslocazione cromosomica che da origine al cromosoma Philadelphia, ha rivoluzionato il trattamento della leucemia mieloide cronica. Studi in modelli murini ed in vitro hanno inizialmente suggerito una relazione tra imatinib e CM [28]. Clinicamente, imatinib è associato a una bassa incidenza di HF. I nuovi inibitori TK di Bcr-Abl hanno sollevato preoccupazioni più serie. Dasatinib, con attività più potente di imatinib contro Bcr-Abl, è stato associato allo sviluppo di HTN polmonare, sebbene ampiamente reversibile con la sospensione del farmaco [28]. Questo risultato ha spinto la FDA a raccomandare che i pazienti vengano valutati per malattia cardiopolmonare prima e durante il trattamento con dasatinib. Nilotinib e ponatinib sono stati entrambi associati a malattia vascolare periferica e cardiopatia ischemica. Inoltre, nilotinib è stato associato ad effetti cardiometabolici (tra cui iperglicemia e iperlipidemia) e ponatinib con HTN probabilmente correlata all'inibizione di VEGFR1. Studi retrospettivi suggeriscono che l'incidenza della malattia arteriosa periferica si attesti nell'ordine dell'1,3% al 6,2% e l'incidenza di eventi CV combinati, tra cui cardiopatia ischemica, malattia cerebrovascolare ischemica e malattia arteriosa periferica, possa essere nell'ordine del 10% al 15,9% [28]. I meccanismi biologici esatti della cardiotossicità rimangono inesplorati; decifrare in modo completo i meccanismi di questi inibitori rimane difficile data la loro non selettività, vista l'influenza su più di 30 diversi pathways.

TERAPIA ORMONALE

Anti-androgeni

Nel carcinoma prostatico, la terapia di deprivazione androgenica (ADT) viene utilizzata per ridurre i livelli di androgeni nella circolazione e diminuire la crescita delle cellule prostatiche. I potenziali agenti includono gli agonisti dell'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH), come leuprolide, goserelina e triptorelina e gli antiandrogeni, come la flutamide e la bicalutamide. Queste terapie hanno effetti metabolici avversi, e gli studi osservazionali suggeriscono come effetto secondario al loro utilizzo un aumento del peso corporeo, una diminuzione della sensibilità all'insulina e la dislipidemia. I cambiamenti nella composizione corporea si verificano presto, entro i primi mesi di terapia. Studi di coorte multipli indicano un aumento del rischio di eventi cardiovascolari negli uomini, tra cui malattia coronarica, infarto miocardico, morte cardiaca improvvisa o morte dovuta a malattia CV [29]. Non tutti gli studi confermano questo effetto, tuttavia, in accordo con numerosi esperti è ragionevole affermare che potrebbe esserci una relazione tra ADT e eventi CV [29].

Modulatori selettivi del recettore degli estrogeni e inibitori dell'aromatasi

Il tamoxifene è un modulatore selettivo del recettore estrogenico ampiamente usato nella terapia adiuvante per il carcinoma mammario positivo al recettore (ER+). I dati riguardanti l'effetto cardioprotettivo del tamoxifene sono stati contrastanti. Il tamoxifene esercita un effetto favorevole sui lipidi, con una riduzione dei livelli di colesterolo totale e LDL. Alcuni studi dimostrano un potenziale effetto sulla riduzione dell'incidenza di ischemia cardiaca, con un rischio relativo di 0,76 (IC 95%, da 0,60 a 0,95, P = 0,02), [30] sebbene altri studi non dimostrino alcun effetto significativo. Un aumentato rischio di eventi tromboembolici, tuttavia, è ben stabilito; essi si verificano in gran parte durante i primi 2 anni di esposizione e nelle donne anziane. Una metanalisi ha confermato un significativo, ma piccolo, aumento del rischio di tromboembolismo venoso con tamoxifene. Gli inibitori dell'aromatasi (ad es. Anastrozolo, letrozolo, exemestano) bloccano la conversione degli androgeni in estrogeni. Le due principali classi attualmente in uso differiscono in base alla loro capacità di legarsi in modo reversibile o irreversibile all'aromatasi. I dati riguardanti i potenziali effetti CV degli inibitori dell'aromatasi sono stati contrastanti, ma è stato ipotizzato che questi agenti inibiscano gli effetti benefici degli estrogeni correlati alla regolazione dei lipidi, alla coagulazione, ai sistemi antiossidanti e alla produzione di ossido nitrico. Gli inibitori dell'aromatasi sono associati a ipercolesterolemia e HTN peggiori e una maggiore durata dell'esposizione è associata ad un aumentato rischio di malattia

CV. Dati ottenuti da più studi di coorte di grandi dimensioni, suggeriscono che vi è un rischio modestamente aumentato di malattia CV, intesa come infarto miocardico, angina o HF, con inibitori dell'aromatasi rispetto a tamoxifene (odds ratio [OR], 1,26, 95% CI, Da 1.10 a 1.43; P <0.001) [31]. Una recente analisi retrospettiva di 13.273 donne in postmenopausa, con carcinoma mammario positivo al recettore ormonale senza precedente malattia CV e, follow-up massimo di 21 anni ha determinato che rispetto al tamoxifene, gli inibitori dell'aromatasi non erano associati a un aumentato rischio di ischemia cardiaca o ictus. Tuttavia, c'era un'associazione non significativa con HF e CM e un'associazione significativa con aritmia, disfunzione valvolare e pericardite [32].

DANNI VASCOLARI INDOTTI DA RADIOTERAPIA

Le lesioni indotte dalle radiazioni ionizzanti sono mediate da un effetto vascolare, come descritto per il danno cardiaco [33]. La radioterapia porta ad una diminuzione della densità capillare; questo può realizzarsi anche subito dopo la seduta radioterapica e tali cambiamenti sono in gran parte subclinici. La radioterapia può anche accelerare l'aterosclerosi dei vasi sanguigni e tale effetto può richiedere anni per diventare clinicamente oggettivabile [33]. Il maggior rischio di sviluppare eventi cardiaci si è dimostrato particolarmente presente nei pazienti trattati con dose/volumi più elevati nell'area cardiaca [33]. Non è noto se gli effetti del danno cardiaco indotto da chemioterapia o radioterapia siano additivi o sinergici. Studi condotti su popolazioni di pazienti pediatrici hanno mostrato come l'aggiunta della radioterapia alla chemioterapia aumenti significativamente l'incidenza di eventi cardiaci maggiori [20]. Le lesioni cardiache associate alla radioterapia sono state riconosciute per decenni come causa dell'aumento della mortalità. In un'analisi di Cuzick et al., l'aggiunta della radioterapia adiuvante a regimi chemioterapici si associava a peggiore sopravvivenza (7% di differenza assoluta, p = 0,21) a 10-15 anni, con un numero sostanziale di decessi correlati a malattie cardiovascolari [34].

SCOPO DELLO STUDIO

Lo studio si pone come obiettivo quello di determinare l'efficacia della videocapillaroscopia computerizzata nel valutare il danno vascolare esercitato dai chemioterapici, al fine di stabilire se essa possa o meno rappresentare uno

strumento prognostico valido ed attendibile nel predire il rischio di sviluppare futuri eventi cardio-cerebro-vascolari.

PAZIENTI E METODI

Sono stati ammessi a partecipare allo studio 30 pazienti oncologici selezionati, afferenti all'Ambulatorio Tricologico del Policlinico Umberto I (29 di sesso femminile e 1 di sesso maschile) affetti dai seguenti tipi di neoplasie:

Tipo di neoplasia	N° di pazienti
Carcinoma mammario	24
Carcinoma endometriale	3, di cui 1 affetta anche da ca. mammario
Oligodendroglioma anaplastico	1
Adenocarcinoma polmonare	1, sesso maschile
Leucemia linfatica acuta	1

L'età media dei soggetti è 53,8 anni (55 età mediana). Tali pazienti sono stati arruolati in diverse fasi del trattamento chemioterapico o dopo la conclusione dello stesso (intervallo di tempo tra inizio della chemioterapia e capillaroscopia: media 41 mesi, mediana 12 mesi).

I farmaci chemioterapici utilizzati dai pazienti sono stati i seguenti:

Agenti alchilanti (Temozolomide, ciclofosfamide), Alkilating-like (carboplatino), Antimetaboliti (5-FU, capecitabina, metotrexate, mercaptopurina), Antracicline (epirubicina, doxorubicina) Taxani (docetaxel, taxolo, paclitaxel), Inibitori della ribonucleosidodifosforedduttasi (oncocarbide), Antagonisti ErbB (pertuzumab, trastuzumab), Inibitore EGFr (afatinib), Antimitotici (vincristina).

Nessuno di loro aveva precedentemente effettuato capillaroscopia, né riferiva di aver mai sofferto di acrosindromi vascolari e/o connettiviti. Sono stati altresì esclusi i pazienti con documentata esposizione a sostanze tossiche (es. cloruro di vinile) o microtraumatismi conseguenti all'utilizzo di strumenti a percussione o vibranti. Non sono stati arruolati pazienti con significativo linfedema degli arti superiori, preesistente o conseguente al trattamento della neoplasia. Ogni soggetto è stato sottoposto a valutazione clinica (anamnesi ed esame obiettivo, evidenziando l'eventuale presenza di lesioni distrofiche acrali e/o onicopatie) e dei principali fattori di rischio cardiovascolari (diabete, ipertensione,

ipercolesterolemia, fumo e BMI). Lo studio è stato progettato come studio in aperto, non controllato, tenendo conto del fatto che le anomalie capillaroscopiche nella popolazione sana sono assenti o presenti in scarso numero sotto forma di anomalie morfologiche minori [Cutolo M. – Atlas of capillaroscopy in rheumatic disease, Elsevier 2011].

L'esame videocapillaroscopico è stato condotto presso l'Istituto Dermatologico San Gallicano, nell'ambulatorio di capillaroscopia diretto dalla Dott.ssa Beatrice Amorosi, secondo le seguenti modalità:

1. permanenza del soggetto in una stanza a temperatura costante (20-25°C) per 15 minuti
2. applicazione di olio diafanizzante sul margine periungueale
3. attrezzatura impiegata: VCSO – DERMASCOPE con obiettivo 200X, collegato ad un software analizzatore di immagini
4. analisi morfologica delle immagini registrate
5. durata complessiva dell'esame di circa 30 minuti (rilevazione, fotografia, analisi).

I parametri rilevati sono stati:

- **Trasparenza cutanea e visibilità:** normale, alterata
- **Edema:** presente, assente
- **PVSP (plesso venoso sub papillare):** visibile, non visibile.
- **Architettura capillare:** conservata, alterata.
- **Densità capillare** (nr° anse/mm): normale, lieve riduzione, severa riduzione. Calcolata utilizzando la seguente scala che considera normale un valore di 9-13/mm, lieve riduzione $6 < x < 9$ /mm, severa < 6 /mm. Lo score medio è stato ottenuto dall'analisi delle ultime 4 dita di ogni mano, valutando in ogni dito 4 aree adiacenti
- **Tortuosità:** presenti, assenti.
- **Lunghezza delle anse:** allungate, accorciate o normoconformate.
- **Ectasie delle anse:** presenti/assenti. E' stato considerato normale un diametro $< 25\mu$, ectasico un diametro compreso tra 3 e 10 volte il diametro normale, megacapillare un diametro maggiore di 10 volte il diametro normale.
- **Microaneurismi:** presenti, assenti.
- **Emorragie capillari:** presenti, numerose, assenti
- **Aree avascolari:** presenti, assenti.
- **Neoangiogenesi:** presente, assente
- **Flusso:** distinto in normale ed alterato (intermittente, granuloso, statico).

RISULTATI

L'analisi dei parametri capillaroscopici ottenuta dalle immagini è stata favorita da una buona visibilità dei campi esaminati, con scarso *edema* e conservata *trasparenza cutanea* nella maggior parte dei soggetti presi in esame. Ciò grazie anche alla collaborazione dei pazienti nella fase propedeutica all'esame. Il *PVSP* risulta, come atteso, non evidenziabile nel 63.3% dei pazienti, considerando anche l'età media (assente popolazione pediatrica e pochi pazienti >70 anni). *L'architettura del pettine capillare* (intesa come eterogeneità di forma, allineamento e distribuzione delle anse) risulta alterata nella totalità dei pazienti vista la presenza di anomalie in vario numero. In alcuni pazienti è infatti difficile individuare anse di forma, lunghezza, e diametro simili. Tali alterazioni possono essere comprese sia nei disordini dello "scleroderma-spectrum" che nel contesto di una "microangiopatia senile". Per ciò che riguarda la *densità capillare* questa si è mantenuta nel range di normalità (9-13/mm), nella stragrande maggioranza con solo rari casi di lieve riduzione età-correlati e assenza di aree di desertificazione. Di frequentissimo riscontro sono state invece le *tortuosità* delle anse capillari, sebbene presenti anche nei soggetti normali, si ritrovano in varie condizioni patologiche che vanno dal diabete mellito, al fenomeno di raynaud, acrocianosi, sclerosi sistemica, artrite reumatoide e psoriasi artropatica. Una valutazione oggettiva della lunghezza delle anse è difficile da realizzare in quanto dipendente dalla trasparenza cutanea, dalla visibilità e, non per ultimo, dalla capacità della macchina di effettuare misurazioni (non possibili con la strumentazione a nostra disposizione). Sono tuttavia stati rilevati quadri capillaroscopici abbastanza eterogenei, apparentemente di difficile interpretazione senza un valido follow-up. Le *ectasie* sono state riscontrate in praticamente tutti i pazienti, inducendo a ipotizzare che queste potessero rappresentare uno dei marker di danno indotto dai chemioterapici. Tuttavia, non vi è una definizione universalmente accettata che descriva tale aspetto. Una marcata e omogenea distribuzione di ectasie capillari è una caratteristica dello "scleroderma spectrum disorders", specie sclerosi sistemica. La loro origine è discussa. Probabilmente esse sono provocate da un danno aspecifico endoteliale o costituiscono un meccanismo di protezione che permette una superficie endoteliale e, conseguentemente, di scambio maggiore. Assenti tuttavia veri e propri microaneurismi. Sorprendentemente, *emorragie capillari* erano presenti nel 26.7% dei pazienti (8) e numerose nel 13.3% (4). Solitamente esse sono repertate nei disordini sclerodermiformi e in altre patologie reumatologiche, e si associano a capillari dilatati che sono facilmente soggetti a rottura. Quest'ultime rappresentano il reperto più significativo di danno

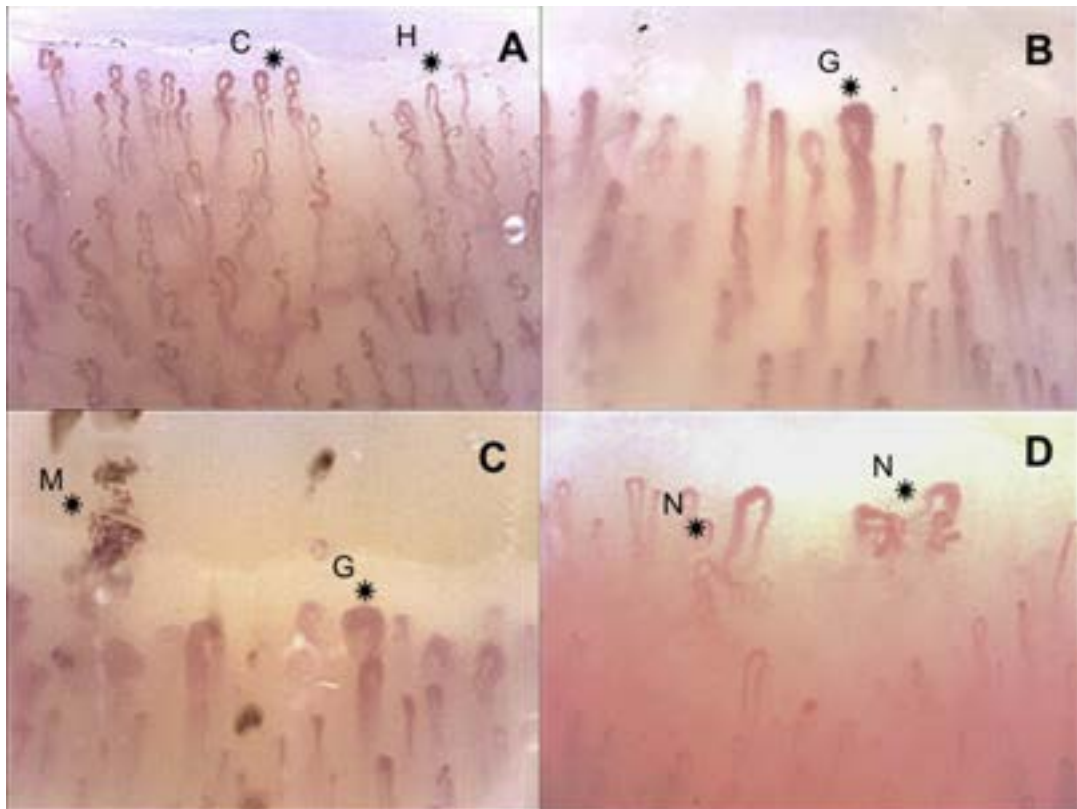
capillare in assenza di connettivopatia ed è pertanto lecito attendersi una loro origine a partire dall'insulto indotto dai chemioterapici. Il *flusso ematico* è risultato non regolare sebbene dinamico, e solo in pochi casi con presenza di sludge. Concludendo, un dato importante viene fuori mettendo a confronto le pazienti con più lungo intervallo chemioterapia-capillaroscopia. In tal modo risulta infatti che più tempo intercorre dal trattamento chemioterapico maggiore è il numero e la gravità delle anomalie riscontrate, ciò ad evidenziare un'evoluitività del danno indotto da chemioterapici. Tutto questo in maniera non strettamente età-correlata. Pertanto, considerati nel complesso tali parametri, se studiati in un'ottica prospettica con un follow-up adeguato, potrebbero fornire importanti informazioni sullo stato di salute microcircolatoria del soggetto in esame, consentendone pertanto di attuare misure preventive efficaci.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

L'analisi di morbilità e mortalità cardiovascolare in pazienti con precedenti fattori di rischio, mostra che essi traggono beneficio da un trattamento precoce in termini di anni di vita aggiuntivi o anni senza sviluppo di malattia [1,2]. Attualmente, i modelli di prevenzione primaria maggiormente utilizzati per valutare il rischio cardiovascolare sono il Framingham Risk Score (FRS) e l'European SCORE model [3,4]. Questi modelli sono stati tuttavia criticati a causa di alcune mancanze [5,6]. Essi sono ostacolati da un orizzonte temporale di soli 10 anni, che non tiene conto del rischio durante tutto l'arco della vita; inoltre, importanti fattori di rischio cardiovascolare, non vengono presi in considerazione. L'aumento del rischio nei pazienti oncologici trattati non è menzionato. La presenza di diabete mellito o artrite reumatoide, ad esempio, dovrebbero determinare l'aggiunta di 15 anni all'età reale del paziente per una corretta stima. Nessuna correzione di questo tipo è stata rilevata nelle linee guida per i cancer survivors in termini di aumento del rischio cardiovascolare (RCV). Pertanto, sarebbe logico considerare anche il trattamento antineoplastico. Da queste considerazioni nasce la necessità di modelli di previsione più ampi, in grado di stimare opportunamente la possibilità di complicanze cardiovascolari a seguito di tali trattamenti.

Esistono dati limitati relativamente allo screening e al monitoraggio degli effetti sul sistema cardio-circolatorio dei trattamenti antitumorali. Il National Cancer Institute Cardiovascular Toxicities Panel propone lo screening dei pazienti per la valutazione del RCV prima dell'inizio del trattamento, durante il trattamento e dopo il suo completamento, con un follow-up a lungo termine [7]. Attualmente

non esistono linee guida o studi specifici riguardanti la gestione dei fattori di rischio cardiovascolare nei cancer survivors [8-10]; in aggiunta la valutazione dei fattori di rischio o del danno CV (subclinico) non è ancora parte integrante dell'assistenza a lungo termine dei pazienti oncologici. Alla luce dell'aumentata incidenza di complicanze cardio-cerebro-vascolari nei pazienti oncologici rispetto alla popolazione generale, è necessario uno stretto controllo e la messa a punto di metodiche strumentali non invasive che permettano una valutazione dello "stato di salute del microcircolo" di tali soggetti. La capillaroscopia, vista la facilità d'impiego e le numerose informazioni che essa fornisce, si presta in maniera efficace nell'individuare alterazioni microcircolatorie e reologiche indotte dalle terapie. Implementarne l'esecuzione, lo studio e l'approfondimento in questa delicata categoria di pazienti, può renderla uno strumento indispensabile nella gestione dei trattamenti, siano essi chemioterapici classici o, ancor più, le nuove target therapies, ancora molto poco conosciute sotto il profilo degli eventi avversi vascolari.



Pattern capillaroscopici

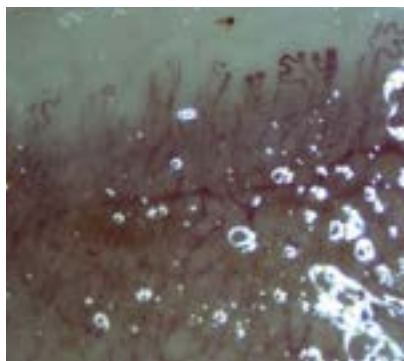
A) Capillaroscopia normale valutata qualitativamente. Notare l'allineamento e la distribuzione regolare dei capillari, la normale forma a forcina (H) e le variazioni aspecifiche: incroci una o due volte (C). **B)** Pattern sclerodermico "early": Notare la presenza di capillari giganti (G). Assente perdita di capillari. **C)** Pattern sclerodermico "active": Notare la presenza della combinazione di capillari giganti, perdita di capillari e microemorragie (M). **D)** Pattern sclerodermico "late": Notare la presenza di neoangiogenesi (N) e perdita di capillari.



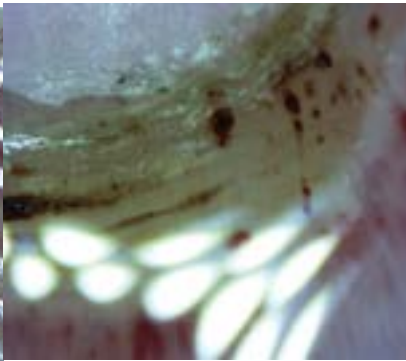
Megacapillari



Tortuosità capillari



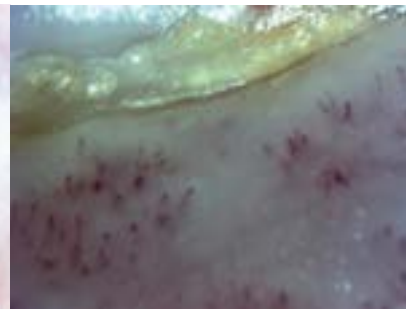
Ramificazioni



Microemorragie



Allungamento



Aree avascolari

BIBLIOGRAFIA

Introduzione

[1] Desantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, Alteri R, Robbins AS, Jemal A. Cancer Treatment and Survivorship Statistics 2014. *CA Cancer J Clin* 2014;64:252-71.

[2] <http://cancercontrol.cancer.gov/ocs/statistics/graphs.html>.

[3] De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, Trama A, Visser O, Brenner H, Ardanaz E, Bielska-Lasota M, Engholm G, Nennecke A, Siesling S, Berrino F, Capocaccia R; EUROCARE-5 Working Group. Cancer survival in Europe 1999–2007 by country and age: results of EUROCARE-5—a populationbased study. *Lancet Oncol* 2014;15:23–34.

[4] Ward E, Desantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. Childhood and Adolescent Cancer Statistics 2014. *CA Cancer J Clin* 2014;64:83–103.

[5] Oeffinger KC, Mertens AC, Sklar CA, Kawashima T, Hudson MM, Meadows AT, Friedman DL, Marina N, Hobbie W, Kadan-Lottick NS, Schwartz CL, Leisenring W, Robinsan LL; Childhood Cancer Survivor Study. Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med* 2006;355:1572–82.

[6] Mertens AC, Liu Q, Neglia JP, Wasilewski K, Leisenring W, Armstrong GT, Robison LL, Yasui Y. Cause-specific late mortality among 5-year survivors of childhood cancer: The childhood cancer survivor study. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:1368–79.

[7] de Haas EC, Oosting SF, Lefrandt JD, Wolffenbuttel BH, Sleijfer DT, Gietema JA. The metabolic syndrome in cancer survivors. *Lancet Oncol* 2010;11:193–203.

[8] Altena R, Perik PJ, van Veldhuisen DJ, de Vries EG, Gietema JA. Cardiovascular toxicity caused by cancer treatment: strategies for early detection. *Lancet Oncol* 2009;10:391–9.

[9] Scardina GA, Cacioppo A, Messina P. Changes of oral microcirculation in chemotherapy patients: A possible correlation with mucositis? *Clin Anat*. 2014 Apr;27(3):417-22. doi: 10.1002/ca.22300. Epub 2013 Oct 5. PubMed PMID: 24123285.

[10] Nuver J, Smit AJ, Sleijfer DT, Gessel AI Van, Roon AM Van, van der Meer J, van den Berg MP, Burgerhof JG, Hoekstra HJ, Sluiter WJ, Gietema JA. Microalbuminuria , decreased fibrinolysis , and inflammation as early signs of atherosclerosis in longterm survivors of disseminated testicular cancer. *Eur J Cancer* 2004;40:701–6.

[11] Lennernas B, Albertsson P, Lennernas H, Norrby K. Chemotherapy and Antiangiogenesis - drug-specific, dose-related effects. *Acta Oncol* 2003;42(4): 294-303.

[12] Di Lisi D, Madonna R, Zito C, Bronte E, Badalamenti G, Parrella P, Monte I, Tocchetti CG, Russo A, Novo G. Anticancer therapy-induced vascular toxicity: VEGF inhibition and beyond. *Int J Cardiol*. 2017 Jan 15;227:11-17. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.11.174.

[13] Bloch EH. 1956. Microscopic observations of the circulating blood in the bulbar conjunctiva in man in health and disease. *Ergebnisse D Anat Entwicklunngs* 35:1–98

Tecnica d'esame

- [1] Jammal M, Kettaneh A, Cabane J, Tiev K, Toledano C. [Periungueal capillaroscopy: an easy and reliable method to evaluate all microcirculation diseases]. *Rev Med Interne*. 2015 Sep;36(9):603-12.
- [2] Souza EJ, Kayser C. [Nailfold capillaroscopy: relevance to the practice of rheumatology]. *Rev Bras Reumatol*. 2015 May-Jun;55(3):264-71.
- [3] Stefania Seidenari: Diagnostica non invasiva in dermatologia. Collana medico scientifica 1998.
- [4] C. Pizzorni, A. Sulli, C. Craviotto, M. Tuccio, B. Serio, M. Cutolo: Prospettive diagnostiche nelle vasculopatie reumatologiche: l'impiego della videocapillaroscopia. *Reumatismo*, 2002; 54(2):99-104.
- [5] G. Guzzo, M. Senesi, N. Giordano, M. Montagnani: La capillaroscopia in medicina. Collana medico scientifica 1996.
- [6] Lambova SN, Muller-Ladner U. Nailfold Capillaroscopy of Fingers and Toes - Variations of Normal. *Curr Rheumatol Rev*. 2018 Apr 20;14(1):28-35.

Semeiotica capillaroscopica

- [1] Atlas of capillaroscopy in rheumatic diseases – M. Cutolo, Ed. Elsevier, 2011.
- [2] Capillaroscopy – a role in modern rheumatology. Marek M. Chojnowski, Anna Felis-Giemza, Marzena Olesińska Department of Connective Tissue Diseases, National Institute of Geriatrics, Rheumatology and Rehabilitation, Warsaw, Poland. *Reumatologia* 2016; 54, 2: 67–72 DOI: 10.5114/reum.2016.60215
- [3] Walter Grassi, PD Medico, F Izzo, C. Cervini: Microvascular involvement in systemic sclerosis: capillaroscopic findings . *Semin Arthritis Rheum*.2001;30.397-402
- [4] Kabasakal Y, D.M. Elvins, E.F.J. Ring, N.J. Mc Hugh: Quantitative nailfold capillaroscopy findings in a population with connective tissue disease and in normal healthy controls. *Annals of Rheumatic diseases* 1996, 55: 507-512.
- [5] G. Guzzo, M. Senesi, N. Giordano, M. Montagnani: La capillaroscopia in medicina. Collana medico scientifica 1996

Principali anomalie capillaroscopiche

- [1] Atlas of capillaroscopy in rheumatic diseases – M. Cutolo , Elsevier ,2011.
- [2] Colwell JA, Halusshka PV, Sarji KE et al. Vascular disease in diabetes. Pathophysiological mechanisms and therapy. *Archiv für innere Medizin* 1979; 139: 225–230

[3] Houtman PM, Kallenberg CGM, Fidler V et al. Diagnostic significance of nailfold capillary patterns in patients with RP: an analysis of patterns discriminating patients with and without connective tissue disease. *The Journal of Rheumatology* 1986; 13: 556–563.

[4] Jayson MIV. The microcirculation in systemic sclerosis. *Clinical and Experimental Rheumatology* 1984; 2: 85–91

[5] M. Cutolo, C. Pizzorni, M.Tuccio, A. Burrioni, C.Craviotto, M. Basso: Nailfold videocapillaroscopic patterns and serum autoantibodies in systemic sclerosis. *Rheumatology* 2004;43:719-726.

Chemioterapici e rischio cardio-vascolare

[1] Van Heeckeren WJ, Bhakta S, Ortiz J, Duerk J, Cooney MM, Dowlati A, McCrae K, Remick SC. Promise of new vascular-disrupting agents balanced with cardiac toxicity: Is it time for oncologists to get to know their cardiologists? *J Clin Oncol*. 2006; 24:1485–1488.

[2] Desantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, Alteri R, Robbins AS, Jemal A. Cancer Treatment and Survivorship Statistics 2014. *CA Cancer J Clin* 2014;64:252-71.

[3] <http://cancercontrol.cancer.gov/ocs/statistics/graphs.html>.

[4] De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, Trama A, Visser O, Brenner H, Ardanaz E, Bielska-Lasota M, Engholm G, Nennecke A, Siesling S, Berrino F, Capocaccia R; EURO CARE-5 Working Group. Cancer survival in Europe 1999–2007 by country and age: results of EURO CARE-5—a populationbased study. *Lancet Oncol* 2014;15:23–34.

[5] Ward E, Desantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. Childhood and Adolescent Cancer Statistics 2014. *CA Cancer J Clin* 2014;64:83–103.

[6] Oeffinger KC, Mertens AC, Sklar CA, Kawashima T, Hudson MM, Meadows AT, Friedman DL, Marina N, Hobbie W, Kadan-Lottick NS, Schwartz CL, Leisenring W, Robinsan LL; Childhood Cancer Survivor Study. Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med* 2006;355:1572–82.

[7] Mertens AC, Liu Q, Neglia JP, Wasilewski K, Leisenring W, Armstrong GT, Robison LL, Yasui Y. Cause-specific late mortality among 5-year survivors of childhood cancer: The childhood cancer survivor study. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:1368–79.

[8] de Haas EC, Oosting SF, Lefrandt JD, Wolffenbuttel BH, Sleijfer DT, Gietema JA. The metabolic syndrome in cancer survivors. *Lancet Oncol* 2010;11:193–203.

[9] Altena R, Perik PJ, van Veldhuisen DJ, de Vries EG, Gietema JA. Cardiovascular toxicity caused by cancer treatment: strategies for early detection. *Lancet Oncol* 2009;10:391–9.

[10] Nuver J, Smit AJ, Sleijfer DT, Gessel AI Van, Roon AM Van, van der Meer J, van den Berg MP, Burgerhof JG, Hoekstra HJ, Sluiter WJ, Gietema JA. Microalbuminuria, decreased fibrinolysis, and inflammation as early signs of atherosclerosis in longterm survivors of disseminated testicular cancer. *Eur J Cancer* 2004;40:701–6.

[11] Lennernas B, Albertsson P, Lennernas H, Norrby K. Chemotherapy and Antiangiogenesis - drug-specific, dose-related effects. *Acta Oncol* 2003;42(4): 294-303.

[12] Di Lisi D, Madonna R, Zito C, Bronte E, Badalamenti G, Parrella P, Monte I, Tocchetti CG, Russo A, Novo G. Anticancer therapy-induced vascular toxicity: VEGF inhibition and beyond. *Int J Cardiol.* 2017 Jan 15;227:11-17. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.11.174.

[13] Gatta G, Botta L, Rossi S, Aareleid T, Bielska-Lasota M, Clavel J, Dimitrova N, Jakab Z, Kaatsch P, Lacour B, Mallone S, Marcos-Gragera R, Minicozzi P, Sánchez-Pérez MJ, Sant M, Santaquilani M, Stiller C, Tavilla A, Trama A, Visser O, Peris-Bonet R; EUROCARE Working Group. Childhood cancer survival in Europe 1999-2007: Results of EUROCARE-5-a population-based study. *Lancet Oncol* 2014;15:35-47.

[14] van den Belt-Dusebout AW, Nuver J, de Wit R, Gietema JA, ten Bokkel Huinink WW, Rodrigus PT, Schimmel EC, Aleman BM, van Leeuwen FE. Long-Term Risk of Cardiovascular Disease in 5-Year Survivors of Testicular Cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:467-75.

[15] Klein Hesselink EN, Klein Hesselink MS, de Bock GH, Gansevoort RT, Bakker SJ, Vredeveld EJ, van der Horst-Schrivers AN, van der Horst IC, Kamphuisen PW, Plukker JT, Links TP, Lefrandt JD. Long-term cardiovascular mortality in patients with differentiated thyroid carcinoma: an observational study. *J Clin Oncol* 2013;31:4046-53.

[16] Zagar TM, Cardinale DM, Marks LB. Breast cancer therapy-associated cardiovascular disease. *Nat Rev Clin Oncol* 2016;13:172-84.

[17] Armitage JO. Early-Stage Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med* 2010;363:653-62.

[18] Shapiro CL, Hardenbergh PH, Gelman R, Blanks D, Hauptman P, Recht A, Hayes DF, Harris J, Henderson IC. Cardiac effects of adjuvant doxorubicin and radiation therapy in breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1998;16:3493-501.

[19] Armstrong GT, Oeffinger KC, Chen Y, Kawashima T, Yasui Y, Leisenring W, StovallIM, Chow EJ, Sklar CA, Mulrooney DA, Mertens AC, Border W, Durand JB, Robison LL, Meacham LR. Modifiable risk factors and major cardiac events among adult survivors of childhood cancer. *J Clin Oncol* 2013;31:3673-80.

[20] Darby SC, Ewertz M, McGale P, Bennet AM, Blom-Goldman U, Brønnum D, Correa C, Cutter D, Gagliardi G, Gigante B, Jensen MB, Nisbet A, Peto R, Rahimi K, Taylor C, Hall P. Risk of Ischemic Heart Disease in Women after Radiotherapy for Breast Cancer. *N Engl J Med* 2013;368:987-98.

[21] Onwudiwe NC, Kwok Y, Onukwugha E, Sorkin JD, Zuckerman IH, Shaya FT, Daniel Mullins C. Cardiovascular event-free survival after adjuvant radiation therapy in breast cancer patients stratified by cardiovascular risk. *Cancer Med* 2014;3:1-11.

Fisiopatologia ed effetti clinici

[1] Schiffrin EL. A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38 [suppl 2]: S3-S6

[2] Green D, Jones H, Thijssen D et al. Flow-Mediated Dilatation and Cardiovascular Event Prediction Does Nitric Oxide Matter? *Hypertension* 2011;57:363-369. //// Park K-A, Park WJ. Endothelial dysfunction: clinical complications in cardiovascular disease and therapeutic approaches. *J Korean Med Sci* 2015; 30:1213-25.

[3] Herrmann J, Yang EH, Iliescu CA, Cilingiroglu M, Charitakis K, Hakeem A, Toutouzas K, Leesar MA, Grines CL, Marmagkiolis K. Vascular Toxicities of Cancer Therapies: The Old and the New--An Evolving Avenue. *Circulation*. 2016 Mar 29;133(13):1272-89. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018347

[4] Plana JC, Galderisi M, Barac A, et al. Expert consensus for multimodality imaging evaluation of adult patients during and after cancer therapy: a report from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2014;15(10):1063–1093

[5] Di Lisi D, Madonna R, Zito C, Bronte E, Badalamenti G, Parrella P, Monte I, Tocchetti CG, Russo A, Novo G. Anticancer therapy-induced vascular toxicity: VEGF inhibition and beyond. *Int J Cardiol*. 2017 Jan 15;227:11-17. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.11.174. Epub 2016 Nov 9. Review. PubMed PMID: 27866063.

Agenti chemioterapici tradizionali

[1] Plana JC, Galderisi M, Barac A, et al. Expert consensus for multimodality imaging evaluation of adult patients during and after cancer therapy: a report from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2014;15(10):1063–1093.

[2] Bloom MW, Hamo CE, Cardinale D, et al. Cancer Therapy-Related Cardiac Dysfunction and Heart Failure: Part 1: Definitions, Pathophysiology, Risk Factors, and Imaging. *Circ Heart Fail*. 2016;9(1):e002661

[3] Zamorano JL, Lancellotti P, Rodriguez Muñoz D, et al. 2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines: The Task Force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2016;37(36):2768–2801

[4] Krystal JJ, Reppucci M, Mayr T, et al. Arterial stiffness in childhood cancer survivors. *Pediatr Blood Cancer* 2015;62:1832-7

[5] Oeffinger KC, Mertens AC, Sklar CA, Kawashima T, Hudson MM, Meadows AT, Friedman DL, Marina N, Hobbie W, Kadan-Lottick NS, Schwartz CL, Leisenring W, Robison LL; Childhood Cancer Survivor Study. Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med* 2006;355:1572–82.

[6] Laar M Van, Feltbower RG, Gale CP, Bowen DT, Oliver SE, Glaser A. Cardiovascular sequelae in long-term survivors of young peoples' cancer: a linked cohort study. *Br J Cancer* 2014;110:1338–41.

[7] Mertens AC, Liu Q, Neglia JP, Wasilewski K, Leisenring W, Armstrong GT, Robison LL, Yasui Y. Cause specific late mortality among 5-year survivors of childhood cancer: The childhood cancer survivor study. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:1368–79.

[8] Sikic BI. Biochemical and cellular determinants of bleomycin cytotoxicity. *Cancer Surv* 1986;5:81–91.

[9] Dirix LY, Libura M, Libura J, Vermeulen PB, De Bruijn EA, van Oosterom AT. In vitro toxicity studies with mitomycins and bleomycin on endothelial cells. *Anticancer Drugs* 1997;8:859–68.

[10] Phan SH, Gharaee-Kermani M, Wolber F, Ryan US. Stimulation of rat endothelial cell transforming growth factor-beta production by bleomycin. *J Clin Invest* 1991;87:148–54.

[11] Meinardi MT, Gietema JA, van Veldhuisen DJ, van der Graaf WT, de Vries EG, Sleijfer DT. Long-term chemotherapy-related cardiovascular morbidity. *Cancer Treat Rev* 2000;26:429–47.

- [12] Berger CC, Bokemeyer C, Schneider M, Kuczyk MA, Schmoll HJ. Secondary Raynaud's phenomenon and other late vascular complications following chemotherapy for testicular cancer. *Eur J Cancer* 1995;31A:2229–38.
- [13] Glendenning JL, Barbachano Y, Norman AR, Dearnaley DP, Horwich A, Huddart RA. Long-term neurologic and peripheral vascular toxicity after chemotherapy treatment of testicular cancer. *Cancer* 2010;116:2322–31.
- [14] Meinardi MT, Gietema JA, Veldhuisen DJ Van, Runne MA, Sluiter WJ, Mulder NH, van den Berg MP, Koops HS, Sleijfer DT. Cardiovascular Morbidity in Long-Term Survivors of Metastatic Testicular Cancer. *J Clin Oncol* 2000;18:1725–32.
- [15] Sleijfer S. Bleomycin-Induced Pneumonitis. *Chest* 2001;120:617–24.
- [16] Berger CC, Bokemeyer C, Schneider M, Kuczyk MA, Schmoll HJ. Secondary Raynaud's phenomenon and other late vascular complications following chemotherapy for testicular cancer. *Eur J Cancer* 1995;31A:2229–38.
- [17] Glendenning JL, Barbachano Y, Norman AR, Dearnaley DP, Horwich A, Huddart RA. Long-term neurologic and peripheral vascular toxicity after chemotherapy treatment of testicular cancer. *Cancer* 2010;116:2322–31.
- [18] Bellmunt J, Navarro M, Morales S, Jolis L, Carulla J, Knobel H, Vilardell M, Sole LA. Capillary Microscopy Is a Potentially Useful Method for Detecting Bleomycin Vascular Toxicity. *Cancer* 1990;65:303–9.
- [19] de Haas EC, Oosting SF, Lefrandt JD, Wolffenbuttel BH, Sleijfer DT, Gietema JA. The metabolic syndrome in cancer survivors. *Lancet Oncol* 2010;11:193–203.
- [20] Verweij J, Clavel M, Chevalier B. Paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere): not simply two of a kind. *Ann Oncol* 1994;5:495–505. [76] Schwartz EL. Antivascular actions of microtubule-binding drugs. *Clin Cancer Res* 2009;15:2594–601
- [21] Hotchkiss KA, Ashton AW, Mahmood R et al. Inhibition of endothelial cell function in vitro and angiogenesis in vivo by docetaxel (Taxotere): association with impaired repositioning of the microtubule organizing center. *Mol Cancer Ther* 2002;1:1191–200
- [22] Mikaelian I, Buness A, de Vera-Mudry MC et al. Primary endothelial damage is the mechanism of cardiotoxicity of tubulin-binding drugs. *Toxicol Sci* 2010; 117: 144–51.
- [23] McCarroll N, Keshava N, Cimino M, Chu M, Dearfield K, Keshava C, Kligerman A, Owen R, Protzel A, Putzrath R, Schoeny R. An evaluation of the mode of action framework for mutagenic carcinogens case study: Cyclophosphamide. *Environmental Mol Mutagen* 2008;49:117–31
- [24] Gottdiener JS, Appelbaum FR, Ferrans VJ, Deisseroth A, Ziegler J. Cardiotoxicity associated with high-dose cyclophosphamide therapy. *Arch Intern Med* 1981;141:758–63.
- [25] Gottdiener JS, Appelbaum FR, Ferrans VJ, Deisseroth A, Ziegler J. Cardiotoxicity associated with high-dose cyclophosphamide therapy. *Arch Intern Med* 1981;141:758–63.
- [26] Yeh ET, Tong AT, Lenihan DJ, Yusuf SW, Swafford J, Champion C, Durand JB, Gibbs H, Zafarmand AA, Ewer MS. Cardiovascular Complications of Cancer Therapy: Diagnosis, Pathogenesis, and Management. *Circulation*

2004;109:3122–31.

[27] McCarroll N, Keshava N, Cimino M, Chu M, Dearfield K, Keshava C, Kligerman A, Owen R, Protzel A, Putzrath R, Schoeny R. An evaluation of the mode of action framework for mutagenic carcinogens case study: Cyclophosphamide. *Environmental Mol Mutagen* 2008;49:117–31.

[28] Kachel DL, Martin WJ. Cyclophosphamide-induced lung toxicity: mechanism of endothelial cell injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;268:42–6.

[29] Gottdiener JS, Appelbaum FR, Ferrans VJ, Deisseroth A, Ziegler J. Cardiotoxicity associated with high-dose cyclophosphamide therapy. *Arch Intern Med* 1981;141:758–63.

[30] Yeh ET, Tong AT, Lenihan DJ, Yusuf SW, Swafford J, Champion C, Durand JB, Gibbs H, Zafarmand AA, Ewer MS. Cardiovascular Complications of Cancer Therapy: Diagnosis, Pathogenesis, and Management. *Circulation* 2004;109:3122–31.

[31] Meinardi MT, Gietema JA, van Veldhuisen DJ, van der Graaf WT, de Vries EG, Sleijfer DT. Long-term chemotherapy-related cardiovascular morbidity. *Cancer Treat Rev* 2000;26:429–47

[32] Gietema JA, Meinardi MT, Messerschmidt J, Gelevert T, Alt F, Uges DR, Sleijfer DT. Circulating plasma platinum more than 10 years after cisplatin treatment for testicular cancer. *Lancet* 2000;355:1075–6

[33] Demkow U, Emmel AS. Cardiotoxicity of cisplatin-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer patients. *Respiratory Physiology Neurobiology* 2013;1:64-67.

[34] Lechner D, Kollars M, Gleiss A et al. Chemotherapy induced thrombin generation via procoagulant endothelial microparticles is independent of tissue factor activity. *J Thromb Haemost* 2007;5:2445–52.

[35] Ito H, Okafuji T, Suzuki T. Vitamin E prevents endothelial injury associated with cisplatin injection into the superior mesenteric artery of rats. *Heart Vessels* 1995;10:178–84.

[36] Kirchmair R, Walter DH, Li M, Rittig K, Tietz AB, Murayama T, Emanuelli C, Silver M, Wecker A, Amant C, Schratzberger P, Yoon YS, Weber A, Panagiotou E, Rosen KM, Bahlmann FH, Adelman LS. Antiangiogenesis Mediates Cisplatin-Induced Peripheral Neuropathy: Attenuation or Reversal by Local Vascular Endothelial Growth Factor Gene Therapy Without Augmenting Tumor Growth. *Circulation* 2005;111:2662–70

[37] Nuver J, Smit AJ, Sleijfer DT et al. Microalbuminuria, decreased fibrinolysis, and inflammation as early signs of atherosclerosis in long-term survivors of disseminated testicular cancer. *Eur J Cancer* 2004;40:701–6.

[38] Focaccetti C, Bruno A, Magnani E, Bartolini D, Principi E, Dallaglio K, Bucci EO, Finzi G, Sessa F, Noonan DM, Albin A. Effects of 5-Fluorouracil on Morphology, Cell Cycle, Proliferation, Apoptosis, Autophagy and ROS Production in Endothelial Cells and Cardiomyocytes. *PLoS One* 2015;10:e0115686.

[39] Cwikiel M, Zhang B, Eskilsson J, Wieslander JB, Albertsson M. The influence of 5-fluorouracil on the endothelium in small arteries. An electron microscopic study in rabbits. *Scanning Microsc* 1995;9:561–76. [48] Cwikiel M, Eskilsson J, Albertsson M, Stavenow L. The influence of 5-fluorouracil and methotrexate on vascular endothelium. An experimental study using endothelial cells in the culture. *Ann Oncol* 1996;7:731–7.

[40] Focaccetti C, Bruno A, Magnani E, Bartolini D, Principi E, Dallaglio K, Bucci EO, Finzi G, Sessa F, Noonan DM, Albin A. Effects of 5-Fluorouracil on Morphology, Cell Cycle, Proliferation, Apoptosis, Autophagy and ROS Production in Endothelial Cells and Cardiomyocytes. *PLoS One* 2015;10:e0115686.

[41] Basaki Y, Chikahisa L, Aoyagi K, Miyadera K, Yonekura K, Hashimoto A, Okabe S, Wierzba K, Yamada Y. gamma-Hydroxybutyric acid and 5-fluorouracil, metabolites of UFT, inhibit the angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. *Angiogenesis* 2001;4:163–73.

[42] Mosseri M, Fingert HJ, Varticovski L, Chokshi S, Isner JM. In vitro evidence that myocardial ischemia resulting from 5- fluorouracil chemotherapy is due to protein kinase C-mediated vasoconstriction of vascular smooth muscle. *Cancer Res* 1993;53:3028–33. [51] Südhoff T, Enderle MD, Pahlke M, Petz C, Teschendorf C, Graeven U, Schmiegel W. 5-Fluorouracil induces arterial vasoconstrictions. *Ann Oncol* 2004;15(4):661–4. [52] Alter P, Herzum M, Soufi M, Schaefer JR, Maisch B. Cardiotoxicity of 5-fluorouracil. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2006;4:1–5.

[43] Jensen SA, Hasbak P, Mortensen J, Sørensen JB. Fluorouracil induces myocardial ischemia with increases of plasma brain natriuretic peptide and lactic acid but without dysfunction of left ventricle. *J Clin Oncol*. 2010;28(36):5280–5286.

[44] Chen MH, Force T. Cardiovascular Complications of Cancer Therapeutic Agents. Mann DL, Zipes DP, Libby P, Bonow R. Braunwald's Heart Disease. 10th ed. Elsevier/Saunders: St. Louis; 2014:1613–1623.

[45] Chen MH, Force T. Cardiovascular Complications of Cancer Therapeutic Agents. Mann DL, Zipes DP, Libby P, Bonow R. Braunwald's Heart Disease. 10th ed. Elsevier/Saunders: St. Louis; 2014:1613–1623.

[46] Willis MS, Patterson C. Proteotoxicity and cardiac dysfunction—Alzheimer's disease of the heart? *N Engl J Med*. 2013;368(5):455–464.

[47] Palumbo A, Rajkumar SV, San Miguel JF, et al. International Myeloma Working Group consensus statement for the management, treatment, and supportive care of patients with myeloma not eligible for standard autologous stem-cell transplantation. *J Clin Oncol*. 2014;32(6):587–600.

Target therapies

[1] Suter TM, Ewer MS. Cancer drugs and the heart: importance and management. *Eur Heart J* 2013;34:1102-11.

[2] Ky B, Vejpongsa P, Yeh ET et al. Emerging paradigms in cardiomyopathies associated with cancer therapies. *Circ Res* 2013;113:754-64.

[3] Quillard T, Devalliere J, Coupel S, Charreau B. Inflammation dysregulates Notch signaling in endothelial cells: implication of Notch2 and Notch4 to endothelial dysfunction. *Biochem Pharmacol* 2010; 80:2032–41.

[4] Shalkey-Hahn V, Lenihan DJ, Ky B. Cancer therapy induced cardiotoxicity: basic mechanisms and potential cardioprotective Therapies. *Journal of the American Heart Association* 2014; 3: e000665

[5] Lim SL, Lam CS, Segers VF et al. Cardiac endothelium-myocyte interaction: clinical opportunities for new heart failure therapies regardless of ejection fraction. *Eur Heart J* 2015;36:2050-2060.

[6] Cheng H, Force T. Molecular mechanisms of cardiovascular toxicity of targeted cancer therapeutics. *Circ Res* 2010;106:21-34.

[7] Eschenhagen T, Force T, Ewer MS et al. Cardiovascular side effects of cancer therapies: a position

statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail* 2011;13:1-10

[8] P. Rizzo, D. Mele, C. Caliceti et al. The Role of Notch in the Cardiovascular System: Potential Adverse Effects of Investigational Notch Inhibitors. *Front Oncol* 2015;4:384.

[9] Sawyer DB, Zuppinger C, Miller TA et al. Modulation of anthracycline-induced myofibrillar disarray in rat ventricular myocytes by neuregulin-1 β and anti-erbB2: potential mechanism for trastuzumab-induced cardiotoxicity. *Circulation* 2002; 105:1551–1554.

[10] Hervent AS, De Keulenaer GW. Molecular mechanisms of cardiotoxicity induced by ErbB receptor inhibitor cancer therapeutics. *Int J Mol Sci* 2012;13:12268-86.

[11] Sandoo A, Kitas G, Carmichael A. Endothelial dysfunction as a determinant of trastuzumab mediated cardiotoxicity in patients with breast cancer. *Anticancer Res* 2014;1152:1147–51.

[12] De Keulenaer GW, Doggen K, Lemmens K. The vulnerability of the heart as a pluricellular paracrine organ: Lessons from unexpected triggers of heart failure in targeted erbb2 anticancer therapy. *Circ Res.* 2010; 106:35–46. [PubMed: 20056944]

[13] Lemmens K, Doggen K, De Keulenaer GW. Role of neuregulin-1/erbB signaling in cardiovascular physiology and disease: Implications for therapy of heart failure. *Circulation.* 2007; 116:954–960. [PubMed: 17709650]

[14] Geisberg CA, Wang G, Safa RN, Smith HM, Anderson B, Peng XY, Veerkamp B, Zhao DX, Blakemore D, Yu C, Sawyer DB. Circulating neuregulin-1beta levels vary according to the angiographic severity of coronary artery disease and ischemia. *Coron Artery Dis.* 2011; 22:577-582. [PubMed: 22027878]

[15] Hedhli N, Huang Q, Kalinowski A, Palmeri M, Hu X, Russell RR, Russell KS. Endothelium-derived neuregulin protects the heart against ischemic injury. *Circulation.* 2011; 123:2254–2262. [PubMed: 21555713]

[16] Gui C, Zhu L, Hu M, Lei L, Long Q. Neuregulin-1/erbB signaling is impaired in the rat model of diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Pathol.* 2012; 21:414–420. [PubMed: 22285193]

[17] Jay SM, Murthy AC, Hawkins JF, Wortzel JR, Steinhauser ML, Alvarez LM, Gannon J, Macrae CA, Griffith LG, Lee RT. An engineered bivalent neuregulin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity with reduced proneoplastic potential. *Circulation.* 2013; 128:152–161. [PubMed: 23757312]

[18] Duquaine D, Hirsch G a, Chakrabarti A, Han Z, Kehrer C, Brook R, Joseph J, Schott A, Kalyanaraman B, Vasquez-Vivar J, Rajagopalan S. Rapid-onset endothelial dysfunction with adriamycin: evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase. *Vasc Med* 2003;8(2):101–7.

[19] Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1998;339:900–5

[20] Tajiri K, Aonuma K, Sekine I. Cardiovascular toxic effects of targeted cancer therapy. *Jpn J Clin Oncol.* 2017 Sep 1;47(9):779-785. doi: 10.1093/jjco/hyx071. Review. PubMed PMID: 28531278

[21] Chintalgattu V, Rees ML, Culver JC, et al. Coronary microvascular pericytes are the cellular target of sunitinib malate-induced cardiotoxicity. *Sci Transl Med.* 2013;5(187):187ra169.

[22] Rini BI, Cohen DP, Lu DR, et al. Hypertension as a biomarker of efficacy in patients with metastatic renal

cell carcinoma treated with sunitinib. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(9):763–773.

[23] Chintalgattu V, Rees ML, Culver JC, Goel A, Jiffar T, Zhang J, Dunner K Jr, Pati S, Bankson JA, Pasqualini R, Arap W, Bryan NS, Taegtmeyer H, Langley RR, Yao H, Kupferman ME, Entman ML, Dickinson ME, Khakoo AY. Coronary microvascular pericytes are the cellular target of sunitinib malate-induced cardiotoxicity. *Sci Transl Med.* 2013; 5:187ra169.

[24] Lim SL, Lam CS, Segers VF, Brutsaert DL, De Keulenaer GW. Cardiac endothelium-myocyte interaction: Clinical opportunities for new heart failure therapies regardless of ejection fraction. *Eur Heart J.* 2015; 36:2050–2060. [PubMed: 25911648]

[25] Steinherz LJ, Steinherz PG, Tan CT, Heller G, Murphy ML. Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy. *JAMA* 1991;266:1672–7.

[26] Sikic BI. Biochemical and cellular determinants of bleomycin cytotoxicity. *Cancer Surv* 1986;5:81–91.

[27] Dirix LY, Libura M, Libura J, Vermeulen PB, De Bruijn EA, van Oosterom AT. In vitro toxicity studies with mitomycins and bleomycin on endothelial cells. *Anticancer Drugs* 1997;8:859–68.

[28] Moslehi JJ, Deininger M. Tyrosine Kinase Inhibitor-Associated Cardiovascular Toxicity in Chronic Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol.* 2015;33(35):4210–4218.

[29] Levine GN, D'Amico AV, Berger P, et al. Androgen-deprivation therapy in prostate cancer and cardiovascular risk: a science advisory from the American Heart Association, American Cancer Society, and American Urological Association: endorsed by the American Society for Radiation Oncology. *Circulation.* 2010;121(6):833–840.

[30] Davies C, Pan H, Godwin J, et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet.* 2013;381(9869):805–816.

[31] Amir E, Seruga B, Niraula S, et al. Toxicity of adjuvant endocrine therapy in postmenopausal breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(17):1299–1309.

[32] Haque R, Shi J, Schottinger JE, et al. Cardiovascular Disease After Aromatase Inhibitor Use. *JAMA Oncol.* 2016;2(12):1590–1597.

[33] Darby SC, Ewertz M, McGale P, Bennet AM, Blom-Goldman U, Brønnum D, Correa C, Cutter D, Gagliardi G, Gigante B, Jensen MB, Nisbet A, Peto R, Rahimi K, Taylor C, Hall P. Risk of Ischemic Heart Disease in Women after Radiotherapy for Breast Cancer. *N Engl J Med* 2013;368(9):987–98.

[34] Oppelt P, Betbadal A, Nayak L. Approach to chemotherapy-associated thrombosis. *Vasc Med* 2015;20:153–61.

Conclusioni e prospettive future

[1] Berry JD, Dyer A, Cai X, Garside DB, Ning H, Thomas A, Greenland P, Van Horn L, Tracy RP, Lloyd-Jones DM. Lifetime Risks of Cardiovascular Disease. *N Engl J Med* 2012;366:321–9.

- [2] Wilkins JT, Ning H, Berry J, Zhao L, Dyer AR, Lloyd-Jones DM. Lifetime risk and years lived free of total cardiovascular disease. *JAMA* 2012;308:1795–801.
- [3] Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of Coronary Heart Disease Using Risk Factor Categories. *Circulation* 1998;97:1837–47.
- [4] Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, De Bacquer D, Ducimetière P, Jousilahti P, Keil U, Njølstad I, Oganov RG, Thomsen T, Tunstall-Pedoe H, Tverdal A, Wedel H, Whincup P, Wilhelmsen L, Graham IM; SCORE project group. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: The SCORE project. *Eur Heart J* 2003;24:987–1003.
- [5] Lloyd-Jones DM. Cardiovascular risk prediction: Basic concepts, current status, and future directions. *Circulation* 2010;121:1768–77.
- [6] Cooney MT, Dudina A, Agostino RD, Graham IM. Risk Prediction in Cardiovascular Medicine Cardiovascular Risk-Estimation Systems in Do They Differ ? Do They Make a Difference ? Can We See the Future ? The Rationale for CVD Risk Estimation. *Circulation* 2010;122:300–10.
- [7] <http://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccct/steering-committees/investigational-drug>.
- [8] Cardinale D, Bacchiani G, Beggiato M, Colombo A, Cipolla CM. Strategies to prevent and treat cardiovascular risk in cancer patients. *Semin Oncol* 2013;40:186–98.
- [9] Lancellotti P, Nkomo VT, Badano LP, Bergler-Klein J, Bogaert J, Davin L, Cosyns B, Coucke P, Dulgheru R, Edvardsen T, Gaemperli O, Galderisi M, Griffin B, Heidenreich PA, Nieman K, Plana JC, Port SC, Scherrer-Crosbie M, Schwartz RG, Sebag IA, Voigt JU, Wann S, Yang PC; European Society of Cardiology Working Groups on Nuclear Cardiology and Cardiac Computed Tomography and Cardiovascular Magnetic Resonance; American Society of Nuclear Cardiology, Society for Cardiovascular Magnetic Resonance, and Society of Cardiovascular Computed Tomography. Expert consensus for multi-modality imaging evaluation of cardiovascular complications of radiotherapy in adults: a report from the European Association of Cardiovascular Imaging and the American Society of Echocardiography. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2013;14:721–40.
- [10] Albin A, Pennesi G, Donatelli F, Cammarota R, De Flora S, Noonan DM. Cardiotoxicity of anticancer drugs: The need for cardio-oncology and cardiooncological prevention. *J Natl Cancer Inst* 2010;102:14–25.

**IL DERIVATO DELLA GLUCOSAMINA NAPA SOPPRIME
L'ATTIVAZIONE DI MAPK E RIPRISTINA LA DEPOSIZIONE DI
COLLAGENE NEI FIBROBLASTI DIPLOIDI UMANI ESPOSTI A
LIVELLI AMBIENTALI DI UVB:
STUDIO IN VITRO ED IN VIVO CON ANALISI MULTISPETTRALE
TRAMITE ANTERA 3D.**

INDICE

Premessa	p.57
Introduzione	p.63
La pelle e i fibroblasti	p.63
Photoaging	p.68
Generazione dei ROS e danno diretto	p.70
Infiammazione	p.72
Degradazione matrice extracellulare	p.81
SCOPO DEL LAVORO	p.83
MATERIALI E METODI	p.85
Sintesi del NAPA	p.88
Isolamento e colture di fibroblasti	p.89
Trattamento cellule	p.89
Vitalità cellulare	p.90
ROS	p.91
Estrazione RNA totale	p.92
Retrotrascrizione	p.93
Quantitative-Real Time PCR (Q-RT-PCR)	p.93
Western Blot	p.95
ELISA	p.96
Formazione sferoidi	p.96
Isto chimica	p.97
Studio pilota in vivo	p.98
RISULTATI E DISCUSSIONE	p.98
CONCLUSIONI	p.105
BIBLIOGRAFIA	

Premessa

La fotografia digitale sta cambiando il mondo dell'immagine e di conseguenza anche della dermatologia. Camere e sensori sempre più potenti rendono la fotografia uno strumento di analisi della materia. Oltre alla capacità di fuoco e al numero di informazioni per unità di superficie, è possibile oggi superare ciò che ai nostri occhi è consentito vedere. Le proprietà chimico-fisiche della materia sono trasmesse infatti attraverso tutte le bande di radiazione dello spettro della luce, compreso IR e UV. Catturarle significa identificare la firma spettrale di ciascun elemento o aggregato: basterà un click per conoscere lo stato della materia che compone l'immagine, il carattere dei suoi pigmenti, le alterazioni fino al livello cellulare. Quando guardiamo un film al cinema o un programma in TV, o quando leggiamo un documento al PC, i nostri occhi vedono l'energia emessa dagli schermi, e generalmente si tratta di tre canali: rosso, verde e blu. Se fossimo un pesce rosso, vedremmo la luce in modo diverso: un pesce rosso infatti può vedere la radiazione infrarossa che è invisibile all'occhio umano. [*Seeing the rainbow: mechanisms underlying spectral sensitivity in teleost fishes - Karen L Carleton et al*]. I calabroni invece possono visualizzare la luce ultravioletta. Ancora una volta, gli umani non possono vedere tali radiazioni. Ad oggi la possibilità di poter vedere il mondo con gli occhi di un umano, di un pesce rosso e di un calabrone messi insieme è stata resa possibile grazie alle telecamere multispettrali. L'imaging multispettrale è un metodo basato sull'acquisizione di un numero limitato (tipicamente da tre a 10) di immagini all'interno di bande spettrali relativamente strette e non sovrapposte, le cosiddette immagini spettrali [*Multispectral Imaging. online: http://www.imaging.org/site/PDFS/Reporter/Articles/REP27_4_CIC20_TOMINA_GA_p177.pdf (accessed on 12 March 2017)*]. Le immagini spettrali della pelle catturate possono essere ulteriormente convertite in immagini parametriche, ad esempio mappe 2-D che specificano la distribuzione delle concentrazioni di cromofori della pelle [*Jakovels, D.; Kuzmina, I.; Berzina, A.; Valeine, L.; Spigulis, J. Noncontact monitoring of vascular lesion phototherapy efficiency by RGB multispectral*

imaging. J. Biomed. Opt. 2013, 18, 126019. [CrossRef] [PubMed]]. Nell'intervallo spettrale visibile, è possibile applicare un modello di pelle a 3 cromofori relativamente semplice per ottenere mappe di distribuzione dei cromofori sull'area dell'immagine [*Jakovels, D.; Spigulis, J. 2-D mapping of skin chromophores in the spectral range 500–700 nm. J. Biophoton. 2010, 3, 125–129. [CrossRef] [PubMed]*]. L'hardware che implementa questo approccio dovrebbe garantire una facile acquisizione di tre immagini spettrali della pelle a banda stretta il più velocemente possibile. Un'opzione per questo è la successiva illuminazione a banda stretta per mezzo di LED di colore diverso e l'acquisizione di un'immagine spettrale in ciascuna modalità di illuminazione [*Jakovels, D.; Spigulis, J.; Rogule, L. RGB mapping of hemoglobin distribution in skin. Proc. SPIE 2011, 8087, 80872B*]. Questo approccio è stato esaminato in precedenza da un sistema ad anello di illuminazione a LED e fotocamera RGB compatto per la ricerca [*Jakovels, D.; Spigulis, J. RGB imaging device for mapping and monitoring of hemoglobin distribution in skin. Lith. J. Phys. 2012, 52, 50–54.*]. Come passaggi successivi, sono stati sviluppati tre prototipi di dispositivi comprendenti fotocamere commerciali per consumatori e illuminatori spettrali specifici. Un utilizzo tipico applicativo dello spettro elettromagnetico è nelle telecomunicazioni per veicolare informazione attraverso segnali (portante modulata) sul canale di comunicazione tra mittente e destinatario, utilizzando la banda ottica e quella dell'infrarosso per le comunicazioni ottiche, quella a microonde e a radiofrequenza per le radiocomunicazioni (spettro radio). [*Benefits and hazards of electromagnetic waves, telecommunication, physical and biomedical: a review S Batool, A Bibi, F Frezza, F Mangini.*] Lo spettro infrarosso è coinvolto in tutti i processi di scambio di calore tra corpi per irraggiamento e quindi anche nei sistemi di riscaldamento, mentre un'altra applicazione è nei forni a microonde dove si utilizza appunto la banda delle microonde per la cottura dei cibi. Questa tecnologia da qualche tempo viene utilizzata anche nel campo dell'agricoltura di precisione. Ad esempio si utilizza l'indice NDVI (Normalized Difference Vegetation Index). Quest'indice multispettrale è correlato al contenuto di clorofilla. Con il solo utilizzo di quest'indice è possibile ottenere una serie d'informazioni che

genereranno azioni mirate e utili alla gestione attiva e preventiva delle colture, ma anche analisi e studio di aree oggetto di incendi, il rilevamento delle discariche, l'identificazione delle coperture in cemento-amianto, l'analisi delle anomalie termiche in acqua [*Applications of Photonics in Agriculture Sector: A Review Tan Jin Yeong et al PMID: 31137897 PMID: PMC6571790 DOI: 10.3390/molecules 24102025*]. La possibilità di acquisire informazioni simultaneamente su diverse lunghezze d'onda e l'opportunità di visualizzare le bande in diverse combinazioni e a falsi colori, rende la tecnica di interpretazione delle immagini multispettrali di grande interesse anche per la gestione del Patrimonio culturale. Infatti uno dei principali vantaggi che offrono i sensori multispettrali è la possibilità di rilevare siti archeologici o monumenti sommersi che non sono individuabili nelle lunghezze d'onda del visibile. La riflettografia infrarossa, tecnica consolidata nella diagnostica di dipinti, consiste nell'illuminare un'opera mediante radiazione infrarossa (IR) e nel rivelare la radiazione da essa retro-diffusa in una singola banda spettrale. Il principio che è alla base della riflettografia è la trasparenza della maggior parte dei pigmenti alla radiazione IR: questo fenomeno consente di rivelare caratteristiche nascoste dallo strato pittorico quali il disegno preparatorio, pentimenti o ritocchi dovuti ad interventi di restauro subiti dall'opera. Recentemente la riflettografia è stata implementata dal CNR-INO con la modalità multispettrale: tale nuova tecnica genera un set di immagini monocromatiche (ipercubo) acquisite nella regione spettrale del vicino IR da 800 a 2300 nm, in intervalli spettrali di larghezza 100 nm. Rispetto alla tradizionale tecnica monobanda, con la riflettografia multispettrale si acquisiscono contemporaneamente dati spettrali (per ogni pixel delle immagini) e immagini ad alta risoluzione spaziale (una per ogni lunghezza d'onda). Queste informazioni consentono lo studio dei materiali pittorici e della loro mappatura sulla superficie del dipinto; inoltre, permettono di poter scegliere la lunghezza d'onda opportuna che rende più efficace la visualizzazione di determinati dettagli, insieme all'elaborazione di differenti piani immagine in modo da estrarre informazioni nascoste. L'elaborazione delle immagini è immediata in quanto il dispositivo

sviluppato fornisce immagini che sono automaticamente registrate, metricamente corrette e calibrate. Sono state effettuate analisi multispettrali di numerosi capolavori che hanno dimostrato l'utilità della riflettografia multispettrale nell'analisi di dipinti, sia con finalità conoscitive sia per un'opportuna progettazione dell'intervento di restauro. [*Analytical and mathematical methods for revealing hidden details in ancient manuscripts and paintings: A review. Anna Tonazzini et al PMID: 31193359 PMID: PMC6526198*]



L'analisi multispettrale trova impiego anche nello studio della pelle, ad integrazione e affinamento delle possibilità diagnostiche in Dermatologia. Tale strumentazione, totalmente non invasiva, prende il nome di sistema Antera 3D. Essa si basa su una tecnologia avanzata sviluppata presso il Trinity College di Dublino, il quale permette una valutazione di immagini digitalizzate della superficie cutanea in più dimensioni, abbinabili ad una misurazione multispettrale della cute. Questa consiste nella estrapolazione digitale di parametri importanti per l'analisi dei più diversi attributi della pelle, quali caratteristiche ed intensità del colore rosso (emoglobina), del colore bruno (melanina), della texture (trama) della rugosità e dei profili cutanei. La tecnologia è in grado di identificare dei riferimenti precisi e riproducibili in una singola area anatomica, tali dal riconoscere la stessa area in fase di controllo. Il sistema permette di misurare numericamente e

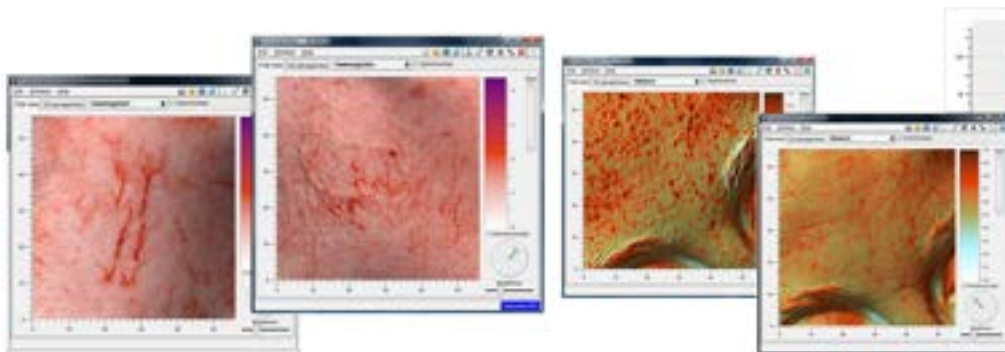
monitorare pertanto nel tempo i risultati dei numerosi trattamenti dermatologici a disposizione, in particolare i trattamenti laser vascolari, laser pigmento-specifici, il ringiovanimento laser non-ablativo ed ablativo, il trattamento con fillers (acido ialuronico), con tossina botulinica, le variazioni di profilo e caratteristiche delle cicatrici, la risposta terapie in malattie infiammatorie cutanee, analisi e follow-up di ulcere, rimozione tatuaggi, ecc.

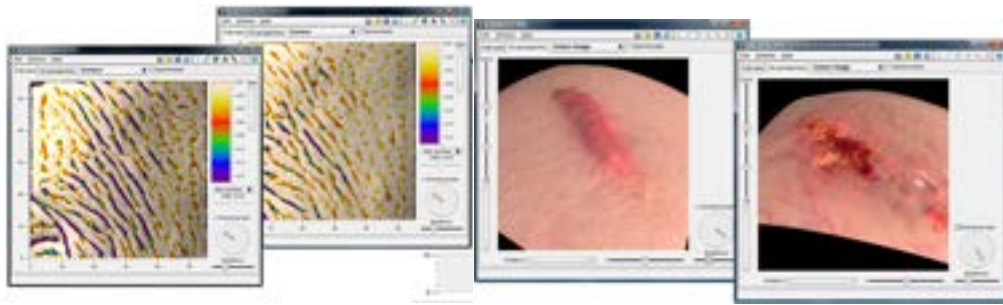


Antera 3D camera

Esso consente pertanto:

- Visualizzazione immagine in 3D
- Analisi quantitativa di rugosità della pelle e profondità di ruga
- Misura della melanina e dell'emoglobina





Acne, rosacea ed altre lesioni vascolari sono curate in maniera efficace utilizzando particolari tecniche laser (dye laser 595nm). Antera 3D determina la dimensione, l'estensione e la distribuzione dei capillari e quantifica la concentrazione di emoglobina. Con Antera 3D è possibile misurare lunghezza e larghezza dei capillari, l'area della lesione e la concentrazione di emoglobina. Determinare la dimensione e la distribuzione dei capillari è funzionale alla scelta dei parametri migliori per il loro trattamento. Ideale infine per ottenere informazioni circa lesioni vascolari, scleroterapia, rosacea, angiomi. ANTERA 3D utilizza un innovativo metodo d'acquisizione ottica e complessi algoritmi per acquisire immagini in tre dimensioni. Essa non si limita a visualizzare la cute in 3D, ma è in grado di fornire una misura quantitativa della sua rugosità e trama e misurare larghezza, lunghezza e profondità di linee sottili, rughe e solchi. Questo fornisce un potente strumento per la valutazione dei danni cutanei e per quantificare il miglioramento a seguito di trattamenti o, come in questo, caso l'efficacia in vivo di una molecola precedentemente sintetizzata in laboratorio e studiata in vitro.

INTRODUZIONE

Il “photoaging” deriva da danni cumulativi provocati dall’esposizione ai raggi ultravioletti che causano l’insorgenza di molte patologie tra cui melanoma e altri tumori cutanei non-melanocitari. In laboratorio abbiamo studiato gli effetti di un derivato della glucosammina, NAPA, ovvero il 2-(N-Acetil)-L-fenilalaninamido-2-deossi- β -D-glucosio, sui fibroblasti primari umani stimolati in vitro con raggi UVB. Abbiamo misurato la produzione di ROS con la 2',7'-diclorofluoresceina-diacetato e la vitalità cellulare ed il Crystal Violet. La produzione di interleuchine e di chemochine è stata misurata con il saggio ELISA e la RT-PCR, l’attivazione delle MAPK tramite western blot e la degradazione del Collagene tipo I con l’immunoistochimica. I fibroblasti umani sono stati irraggiati con una dose di raggi UVB pari a 0.04 J/cm^2 . Questa dose ha indotto l’attivazione delle MAPK, prevalentemente ERK 1/2 ed in misura minore JNK. Queste a loro volta hanno stimolato la produzione di c-fos e c-jun che formano AP-1, fattore di trascrizione nucleare che regola le MMPs. Abbiamo visto come il trattamento con NAPA sia in grado di inibire l’aumento di IL-6 e di IL-8 attraverso l’inibizione della fosforilazione di ERK e di JNK quindi anche la conseguente attivazione di AP-1. Inoltre NAPA ha anche inibito la degradazione di Col I indotta dai raggi UVB. NAPA quindi può essere considerata una molecola foto-riparatrice e foto-protettiva da poter utilizzare anche in altre patologie a carattere infiammatorio che portano alla degradazione delle componenti della matrice extracellulare.

LA CUTE E I FIBROBLASTI

La cute è l’organo più esteso: costituisce circa il 7% della massa corporea e la sua superficie varia con l’altezza e con il peso, ad esempio, in un individuo di 1,8 metri e peso di 90 kg, la superficie della pelle è di circa $2,2 \text{ m}^2$. (Gray’s Anatomy, 40th edition). Il suo spessore varia tra 1,5 e 4 mm a seconda dell’età e della localizzazione nelle diverse sedi del corpo. Annessi alla cute vi sono peli, unghie, e

ghiandole sebacee e sudoripare, che si sviluppano a partire dallo strato germinativo dell'epidermide. Inoltre, il colore, la trama e le pieghe cutanee contribuiscono a definire i tratti somatici individuali. (Istologia di V. Monesi, Piccin). La pelle consente la sintesi e lo storage di nutrienti vitali nel corpo, e fornisce una barriera contro le sostanze pericolose che potrebbero penetrare nell'organismo contestualmente ad una protezione dagli effetti dannosi delle radiazioni dei raggi ultravioletti emessi dal sole; svolge diversi processi biochimici, compresa la formazione di vitamina D sotto l'influenza dei raggi ultravioletti di tipo B (UVB) e la sintesi di citochine e di fattori di crescita; è anche il bersaglio di diversi ormoni che ne influenzano l'aspetto e la funzione. Altra importante funzione della pelle è il mantenimento della temperatura corporea, attuato attraverso il controllo della perdita di calore, riducendo o aumentando il flusso sanguigno, e tramite la sudorazione. Ha buone proprietà di resistenza all'attrito e mostra notevole elasticità. Strutturalmente la cute è composta da uno strato superficiale detto epidermide che poggia su una sottile struttura istologica intermedia chiamata lamina o membrana basale che lo separa dal secondo strato denominato derma o corion e da un terzo strato più profondo denominato ipoderma. (Dermatologia medica e chirurgica V ed, Mc Graw Hill).

EPIDERMIDE

L'epidermide, che nei mammiferi mantiene la capacità di auto-rinnovarsi sia in condizioni normali che in presenza di lesioni mantenendo una popolazione di cellule mitoticamente attive nel follicolo pilifero e nello strato basale più interno (Segre, 2006), svolge la funzione principale di impedire la disidratazione e la penetrazione dei batteri e di altri agenti patogeni. Altre importanti funzioni includono la percezione sensoriale, la sorveglianza immunologica, la termoregolazione e il controllo della perdita di fluidi (Skin anatomy. Medscape). È un epitelio pavimentoso multistrato di origine ectodermica, priva di nervi e di vasi

sanguigni. È formato prevalentemente da cheratinociti, oltre che da cellule di Langherans, con attività fagocitaria e che svolgono un ruolo nell'immunosorveglianza verso le infezioni virali e le neoplasie, grazie alla capacità di esprimere numerosi antigeni di superficie, tra i quali gli antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità (major histocompatibility complex; MHC), da cellule di Merkel, a funzione sensoriale e da melanociti. (Dermatologia medica e chirurgica V ed, Mc Graw Hill). In base all'aspetto morfologico che assumono i cheratinociti e al loro stadio di maturazione, il processo di differenziazione, definito cheratinizzazione e che li porta a migrare progressivamente verso la superficie cutanea, è possibile distinguere cinque strati epidermici:

- strato germinativo o basale, formato da una o due file di cellule cuboidali che poggiano direttamente sulla membrana basale tramite giunzioni dette emidesmosomi e dalla cui divisione dipende il continuo rinnovamento dell'epidermide.
- strato spinoso costituito da continui strati di cheratinociti poligonali uniti tra loro da estroflessioni citoplasmatiche definite "spine".
- strato granuloso composto da cheratinociti dello strato spinoso, i quali in seguito alla spinta proliferativa delle cellule basali, passano nello strato granuloso acquisendo grandi granuli basofili citoplasmatici, i granuli di cheratoialina, una proteina acida altamente fosforilata ad elevato PM e ricca di istidina, da cui prende origine la filaggrina, proteina basica che funge da matrice per il corretto assemblaggio delle fibre cheratiniche. Tale proteina è importante per il mantenimento dell'idratazione dello strato corneo, in quanto può essere incorporata nei corneociti. (Natsuga, 2014).
- strato lucido presente solo nella cute spessa che ricopre il palmo della mano e la pianta del piede, è composto da cheratinociti strettamente adesi, pieni di cheratina e privi di nuclei e organuli.

- strato corneo costituito dai cheratinociti che completano quindi il loro cammino maturativo trasformandosi in cellule anucleate dello strato corneo, i corneociti. (Naldi, Rebora, 2006). (Fig. 1)

DERMA

Ancorato alla membrana basale si trova il derma, tessuto connettivo di derivazione mesodermica. È verso il terzo mese dello sviluppo fetale che le cellule aumentano gradualmente di numero e, in gran parte, si trasformano in fibroblasti. Alla sedicesima settimana, mentre cominciano a formarsi le fibre di collagene, si può distinguere lo strato papillare dal sottostante strato reticolare. Durante lo sviluppo della vita fetale aumenta notevolmente la quantità di collagene nel derma e oltre ai fibroblasti questo tessuto viene popolato da altre cellule quali i mastociti, istiociti e linfociti. Il derma, in cui sono contenuti vasi sanguigni, vasi linfatici, nervi e gli annessi cutanei, peli, ghiandole sudoripare e ghiandole sebacee, svolge una funzione trofica e di sostegno nei confronti dell'epidermide e, mediante modificazioni del flusso sanguigno, influisce sulla regolazione della temperatura corporea. (Shin et al., 2019). Nel derma si distinguono due strati: uno più superficiale e più sottile detto strato papillare o avventiziale e uno più profondo e più spesso detto strato reticolare o anche laminare. La Matrice extracellulare (ECM) del derma è costituita da una sostanza fondamentale amorfa, composta da acqua, glicosaminoglicani (GAG), il principale dei quali è l'acido ialuronico, glicoproteine, proteoglicani e dalle fibre di collagene e di elastina. Il collagene è la proteina fibrosa più abbondante della ECM, sintetizzata principalmente dai fibroblasti e costituisce circa il 90 % della cute (Kwon, 2019). Si conoscono circa 26 tipi di collagene; quello di tipo I, II, III (pelle, denti, cartilagine, tendini, legamenti), quello di tipo IV e VII (membrane basali) sono quelli più comuni nel corpo. (Drag-Zalesinska et al., 2019). Il collagene di tipo I dermico garantisce spessore alle fibre mentre quello di tipo III crea una rete. Una singola molecola di collagene è formata da tre catene polipeptidiche sinistrorse che si avvolgono una

sull'altra a formarne una destrorsa stabilizzata dalla presenza di legami a idrogeno. Ha una composizione amminoacidica peculiare: quasi 1/3 dei suoi residui è costituito da glicina (Gly) e un altro 15-30 % da prolina (Pro) e 4-idrossiprolina, sono presenti anche due residui di 3-idrossiprolina e di 5-idrossiprolina in quantità inferiore. I collagene di tipo I e III sono i più abbondanti nel derma e forniscono elasticità e sostegno alla pelle (Gelse, Pöschl and Aigner, 2003). La sua struttura consiste in due catene $\alpha 1$ ed una catena $\alpha 2$, ha una massa molecolare pari a circa 285 kDa, un diametro di circa 14 Å ed una lunghezza di circa 3000 Å (Voet). Il collagene rinforza l'ECM, la organizza, la rende flessibile. Anomalie nella composizione e nella struttura dell'ECM sono associate allo sviluppo e alla progressione di diverse condizioni patologiche quali sindrome di Ehlers-Danlos "Coll I", osteogenesi imperfetta ed osteoporosi, aneurisma arterioso "Coll III", osteoartite "Coll II, IX e XI" e tumori della pelle "Coll I, II, III, V, IX" (Achilleas,D. Theocharis, 2016).

IPODERMA

L'ipoderma è un tessuto connettivo. La componente cellulare, immersa tra le fibre, è composta, oltre che da fibroblasti, da ammassi di adipociti, i lobuli, che hanno la funzione di accumulare trigliceridi che fungono da riserva energetica e contribuiscono a mantenere costante la temperatura corporea. L'ipoderma è diversamente distribuito in rapporto all'età, razza, sesso e regione corporea, si riduce progressivamente con l'età e con il digiuno. Appare microscopicamente suddiviso da setti connettivali in aree romboidali o ovoidali denominate lombi adiposi e da tralci fibrosi più sottili divisi in lobuli da 1 cm di diametro.

FIBROBLASTI

I fibroblasti si differenziano a partire dalle cellule mesenchimali, e sono responsabili della sintesi e della degradazione delle proteine fibrose e amorfe

dell'ECM. I fibroblasti sono deputati a elaborare gli elementi costitutivi della componente fibrosa della matrice extracellulare, ma sono anche responsabili della sintesi delle glicoproteine e proteoglicani della matrice amorfa. (Recherche et al., 2015). Lo studio dei fibroblasti è necessario per comprendere il meccanismo molecolare dell'invecchiamento del derma. Nella pelle giovane infatti, i fibroblasti aderiscono all'ECM e questo gli consente di esercitare forze di adesione sull'ECM che li circonda, di diffondere e di mantenere una forma allungata; nella pelle non più giovane l'adesione è compromessa a causa della degradazione dell'ECM. Pertanto si ha alterazione della loro morfologia; a sua volta questa alterazione può portare ad un aumento della formazione di Specie Radicaliche dell'Ossigeno (ROS) mitocondriali. (Shin et al., 2019). I fibroblasti sono spesso disposti lungo i fasci di fibre di collagene e appaiono allora come elementi fusati con nucleo allungato; in altre sedi presentano forma stellata con numerosi prolungamenti. In prossimità del nucleo sono situati i centrioli e l'apparato del Golgi; sono presenti mitocondri lunghi e sottili e cisterne appiattite di reticolo endoplasmatico. È ben rappresentato nei fibroblasti il citoscheletro: microtubuli di 20-25 nm, filamenti intermedi di 10 nm – contenenti vimentina - e microfilamenti actino-simili e miosino-simili di 5 nm di spessore distribuiti nel citoplasma, ma soprattutto concentrati nella zona corticale, subito al di sotto della membrana plasmatica. (Istologia, Monesi, Piccin). Tutte queste strutture filamentose sono facilmente visibili al microscopio elettronico, ma sono osservabili anche al microscopio ottico, utilizzando specifici anticorpi fluorescenti (Fig. 2). Ben evidenti sono nei fibroblasti le strutture di adesione al substrato: i podosomi e le adesioni focali.

PHOTOAGING

La cute, come tutti gli organi dell'organismo vivente, va incontro al fenomeno dell'invecchiamento cronologico, il processo inarrestabile e inevitabile, durante il quale si verificano cambiamenti fisiologici e strutturali. Ma, a differenza degli organi interni che invecchiano secondo leggi biologiche, la pelle subisce un

invecchiamento aggiuntivo, estrinseco, causato principalmente dall'esposizione alle radiazioni UV solari e artificiali. Con il termine photoaging, invecchiamento fotoindotto, si intendono proprio quei cambiamenti nelle caratteristiche cliniche, istologiche e funzionali della pelle che vengono osservati in aree solitamente esposte al sole e consiste in una sovrapposizione cronica di danni, spesso subdoli, alla pelle. Il sole emette radiazioni elettromagnetiche di diverse lunghezze d'onda e frequenze tra le quali le radiazioni UV che presentano una lunghezza d'onda (λ), compresa tra 100 e 400 nm e vengono divise in tre categorie principali: UVA, UVB e UVC. UVA e UVB rappresentano la maggior parte dei raggi UV che raggiungono la superficie terrestre mentre gli UVC normalmente non raggiungono la superficie della terra in quanto ampiamente assorbiti dallo strato di ozono dell'atmosfera. Il Joule (J) è l'unità di misura più usata per esprimere la quantità di energia della luce. La potenza dell'irradiazione è detta irradianza e viene espressa in W/cm². L'energia della luce applicata alla pelle è definita dose, viene espressa in J/cm² ed è il prodotto dell'irradianza per il tempo (Hussein MR, 2005). Il 90-95% dello spettro solare UV è costituito da radiazione ultravioletta A, (UVA), con compresa tra 320–400 nm. Questa ampia gamma UV viene definita la "radiazione dell'invecchiamento" perché in grado di penetrare nell'epidermide e nel derma, fino a una profondità di circa 1000 μm ; è la causa del photoaging quindi contribuisce alla formazione di rughe e può inoltre sopprimere alcune funzioni immunitarie. È stato dimostrato da numerosi studi che l'esposizione prolungata e continua ai raggi UVA porta alla formazione di tumori benigni e neoplasie maligne. Gli UVA, diversamente dagli UVB e UVC, agiscono debolmente in maniera diretta sul DNA e sono in grado di produrre un basso numero di dimeri di pirimidine nella pelle, quindi, è stato ipotizzato che la loro azione mutagenica e carcinogena sia data dalla generazione indiretta di ROS, i radicali liberi dell'ossigeno, che causano rotture del filamento di DNA e il danneggiamento delle proteine e dei lipidi. Circa il 5% della radiazione UV solare totale è costituita da UVB, 280-315 nm. Gli UVB penetrano la pelle ad una profondità di circa 160-180 μm quindi, sono in grado di attraversare l'intero strato epidermico, penetrare il compartimento dermico e

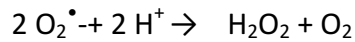
indurre effetti biologici dannosi sia diretti che indiretti, che includono induzione di stress ossidativo, danno del DNA, invecchiamento prematuro della pelle e molteplici effetti sul sistema immunitario. Per quanto la pelle possieda un elaborato sistema di difesa, formato da componenti enzimatici e non enzimatici, deputato a proteggerla, l'esposizione eccessiva sopprime il sistema di difesa cutaneo portando allo sviluppo di diverse patologie. La terza componente degli UV solari, gli UVC, 100-280 nm, ha un'enorme energia ed è mutagenica. Gli UVC possono penetrare la cute ad una profondità approssimativa di 60-80 μm , e possono danneggiare le molecole di DNA. Tuttavia, gli esseri viventi sulla terra sono protetti da questa radiazione dallo strato di ozono della nostra atmosfera. In conclusione, il raggio UV solare è una radiazione ambientale molto importante ed è nota per essere una delle principali cause dei tumori della pelle come i melanomi e NMSC (Poon, Kang and Chien, 2015). La capacità di penetrazione e quindi la loro "pericolosità" per l'uomo diminuiscono all'aumentare della lunghezza d'onda e, di conseguenza, al diminuire della frequenza. L'identikit istopatologico del photoaging si caratterizza per elastosi, atrofia epidermica e alterazioni distinte nel collagene. La pelle che è segnata dal photoaging estremo o grave mostra frammentazione e addensamento delle fibre di collagene. Queste possono anche presentare reticolazione progressiva e calcificazione. (Baumann. L., 2007).

GENERAZIONE DEI ROS E DANNO DIRETTO

Sia l'invecchiamento che numerose patologie degli esseri viventi sono causati da stress ossidativo, derivante da fattori estrinseci o ambientali, e da una eccessiva produzione di radicali liberi, i quali causano danno diretto o indiretto del DNA e provocano la modificazione strutturale delle proteine (Valko M, 2006). All'interno della cellula, i ROS si concentrano principalmente nel mitocondrio. In condizioni fisiologiche, dall'1 al 3% delle molecole di ossigeno presenti nel mitocondrio sono convertite in superossido, durante il trasferimento elettronico della catena

respiratoria. I ROS possono essere prodotti anche nel reticolo endoplasmatico, dove il citocromo P-450 catalizza l'ossidazione di agenti xenobiotici e li trasforma in molecole meno tossiche, utilizzando ossigeno come agente ossidante. (Valavanidis, Vlachogianni and Fiotakis, 2009). Elemento chiave nei processi di invecchiamento è lo stress ossidativo, (Fulle S et al., 2004), che è l'espressione biologica di un danno che si verifica quando vi è uno squilibrio tra il meccanismo fisiologico di difesa ed i ripetuti insulti subiti dalle cellule che non sono più in grado di neutralizzarli tramite difese antiossidanti endogene (la superossido dismutasi "SOD", coenzima Q10, perossidasi, catalasi) ed esogene (antiossidanti presenti negli alimenti)(Sies, 1991; Bernabucci et al., 2002; Castillo et al., 2005). I ROS (Reactive Oxygen Species), sono molecole reattive derivate dall'ossigeno molecolare, O_2 che presentano un elettrone spaiato nell'orbitale più esterno. Questa situazione di elevata instabilità li rende altamente reattivi nei confronti di altre molecole che cedendo loro un elettrone, rendono più stabili i ROS, ma diventano a loro volta molto reattive innescando un meccanismo a "catena" che può durare da frazioni di secondo ad alcune ore e può essere ridotto o arrestato solo dalla presenza degli antiossidanti (Gemma.C, 2007). Sebbene i ROS siano generalmente segnalati come specie tossiche a causa della loro elevata reattività, che causa diversi eventi deleteri, svolgono anche ruoli chiave come messaggeri intra/intercellulari nelle trasduzioni del segnale e del ciclo cellulare a dosi basse o moderate (Valko M, 2006). Anione superossido $O_2^{\bullet-}$, perossido di idrogeno H_2O_2 e altri perossidi, radicale idrossile OH^{\bullet} e ossigeno singoletto sono i principali esempi di ROS generati durante le reazioni fotodinamiche. (Tada and Baptista, 2015) e sembrano infatti avere un ruolo fondamentale nel meccanismo modulatore di rilascio di altri mediatori dell'infiammazione (Guzik et al., 2003). La molecola dell'anione superossido pur presentando un elettrone spaiato sull'orbitale elettronico esterno non possiede un'elevata reattività poiché, per la presenza della carica negativa non è in grado di attraversare la membrana mitocondriale. La sua formazione avviene spontaneamente soprattutto nell'ambiente ricco di ossigeno in prossimità della membrana interna del mitocondrio. Due molecole di

anione superossido reagiscono rapidamente a dare perossido di idrogeno e 2 di ossigeno molecolare in una reazione catalizzata dalla superossido dismutasi.



Il perossido di idrogeno pur essendo un composto non radicalico è un forte ossidante molto reattivo e che riveste un ruolo importante per la sua capacità di penetrare velocemente attraverso le membrane biologiche. È inoltre precursore di iniziatori radicalici come la produzione di HO^\bullet in seguito a reazione con Fe^{2+}



La sua rimozione è a carico di sistemi enzimatici: la catalasi, le glutatione-perossidasi (Voet). Il Radicale idrossile OH^\bullet è estremamente reattivo. La mancanza di meccanismi di inattivazione endogena lo rendono la specie reattiva in grado di generare i maggiori danni alle proteine, agli acidi nucleici, ai glicosaminoglicani e soprattutto agli acidi grassi poliinsaturi dei fosfolipidi di membrana. I ROS, la cui generazione è promossa dai raggi UV, sono molto dannosi per il processo di guarigione in quanto causano danni alla ECM, in particolar modo sul collagene, sui cheratinociti e fibroblasti (Palungwachira et al., 2019). Aumentano l'espressione di citochine e chemochine (Kimura et al., 2003; Brzozowski et al., 2003), stimolano l'attività della MAP-kinasi (che conduce all'attivazione di più fattori di trascrizione) e possono fungere da secondi messaggeri nella trasduzione del segnale infiammatorio (Guzik et al., 2003).

INFIAMMAZIONE

L'infiammazione o flogosi è un processo reattivo e locale che coinvolge il microcircolo e l'interstizio, e protegge l'organismo dai danni provocati da agenti chimici, fisici e biologici. Il ruolo dell'infiammazione è quello di inattivare o distruggere il patogeno coinvolto, rimuovere le sostanze irritanti e porre le basi per la riparazione tissutale (Guzik et al., 2003), (Le basi patologiche delle malattie, Robbins e Cotran XIII edizione). Il processo infiammatorio viene differenziato in

acuto o cronico. La forma acuta ha un esordio rapido, della durata di pochi secondi o minuti, una durata breve, fino a qualche giorno, ed è caratterizzata dalla presenza di essudato, dalla formazione dell'edema, e da migrazione leucocitaria. L'infiammazione cronica ha una durata maggiore ed è associata alla presenza di linfociti e macrofagi, proliferazione dei vasi sanguigni, fibrosi e necrosi tissutale (Kumar et al., 2005). Fu Aulo Cornelio Celso, scrittore e medico romano del I secolo d.C., il primo ad elencare i quattro segni cardinali evidenti sia dell'infiammazione acuta che cronica: Rubor, (arrossamento), fenomeno iniziale dovuto all'aumento della quantità di sangue che giunge al tessuto infiammato, Tumor, (gonfiore), causato dall'aumento della permeabilità dei vasi capillari determinante per la fuoriuscita di liquidi verso l'interstizio, Calor, (calore), dovuto all'aumento della temperatura dell'area lesa dipendente sia dall'incremento di sangue in loco, che da una lesione metabolica mitocondriale responsabile della trasformazione, in energia termica, di una quota di quella chimica proveniente dalle ossidazioni, Dolor, (dolore), espressione delle modifiche biochimiche locali, rapidamente avvertite dalle terminazioni nervose. Il quinto segno clinico, ossia Functio laesa (perdita di funzione) incapacità della zona colpita dall'infiammazione di mantenere inalterate le proprie capacità funzionali che risulteranno, in varia misura, diminuite, fu aggiunto da Rudolf Karl Virchow, patologo polacco nel XIX d.C. L'infiammazione è alla base di numerosi processi fisiologici e patologici; numerose sono le condizioni che innescano l'infiammazione con conseguente reclutamento di leucociti e proteine plasmatiche al sito d'interesse. (Medzhitov R, 2008) (Taglietti, 2006), e molti sono i mediatori chimici, cellulari e plasmatici, identificati. Per lo studio ci limiteremo a trattare le citochine e più precisamente le interleuchine, (IL). Le citochine (cytokines, dal greco cyto, cellula, e kinos, movimento) sono potenti mediatori proteici solubili che mettono in comunicazioni le cellule e l'ambiente esterno (Tayal et al. 2008). Oltre che nell'infiammazione fungono da mediatori in molte altre funzioni, regolano l'immunità, l'ematopoiesi, la proliferazione e la differenziazione delle cellule immunitarie. Generalmente le citochine agiscono a breve distanza e in tempi brevi. A concentrazioni basse

possono avere un effetto sulla stessa cellula che le ha secrete (azione autocrina) o su cellule adiacenti (azione paracrina). Alcune citochine possono invece agire in modo endocrino, modificando il comportamento di cellule facenti parte di tessuti o organi molto distanti. Le citochine vengono sintetizzate e secrete in risposta a stimoli inducenti, prodotti principalmente da linfociti Th e da macrofagi, ma anche da cellule di tipo non immune, come fibroblasti, cellule endoteliali, cellule epiteliali (Tayal et al. 2008). Nel termine generico "citochina" vengono comprese le linfochine (prodotte dai linfociti), le monochine (prodotte dai monociti), le interleuchine (che hanno come target principale i leucociti), i colony stimulating factors (CSFs), gli interferoni (Interferons, IFNs), i fattori di necrosi tumorale (Tumor Necrosis Factor, TNFs) e le chemochine, citochine che mediano la chemiotassi tra le cellule).

INTERLEUCHINA 6 (IL-6)

L'interleuchina 6 (IL-6) è una citochina pleiotropica che ha effetti sia sul sistema ematopoietico che su quello immunitario (Taga et al., 1992) è secreta da vari tipi cellulari del sistema immunitario tra cui i macrofagi ed i mastociti ma anche dai fibroblasti. Le sue funzioni sono strettamente correlate a IL-1 e TNF- α (Le basi dell'immunologia; fisiopatologia del sistema immunitario, Abul K. Abbas, IV ed.). IL-6, che sembra avere un ruolo importante nella cronicizzazione dell'infiammazione, è una glicoproteina costituita da 184 residui amminoacidici disposti in quattro α -eliche. (Seehra, 1997). Tra le eliche C e D si osserva una quinta struttura ad elica, (E), in cui si trova il sito di legame per uno dei due recettori specifici per IL-6 (IL-6R α). IL recettore per l'IL-6 può esistere in due diverse forme: di membrana e citosolica. Nella via di segnale mediata dall'IL-6 interviene una ulteriore proteina regolatoria: gp130. Tale proteina può trovarsi in due diverse forme: associata alla membrana (m gp130) e citosolica (s gp130). L'associazione tra IL-6 e IL-6R con s gp130 inibisce la via di segnalazione di IL-6, mentre la formazione del complesso ligando-recettore-m gp130 causa omodimerizzazione con conseguente formazione di un esamero che attiva la

trasduzione del segnale con conseguente attivazione del pathway delle MAPK chinasi (Taga and Kishimoto.,1997).

INTERLEUCHINA 8 (IL-8)

L'interleuchina 8 o CXCL8 appartiene alla famiglia delle alfa-chemochine, molecole in grado di indurre chemiotassi e quindi di richiamare cellule nel sito di infiammazione. (Vandercappellen, J. 2008). È un piccolo polipeptide (P.M. 8KDa) prodotto da numerosi tipi cellulari quali monociti, cellule epiteliali, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce, fibroblasti e cellule nervose ed è caratterizzato dalla presenza di un motivo amminoacidico, acido glutammico-leucina-arginina, in prossimità della porzione N-terminale che esplica spesso attività angiogenica (Hooks, J. 2002). La sintesi è indotta da diversi stimoli tra cui: batteri, citochine quali TNF- α e IL-1. IL-8 è termostabile, resiste alla proteolisi e a variazioni di pH. Tali caratteristiche le conferiscono una emivita abbastanza lunga nel sito di flogosi. A livello della regolazione dell'espressione genica dell'IL-8 interverrebbero anche fattori ossidanti, quali le specie reattive dell'ossigeno, che vengono liberate in eccesso in seguito al danno da riperfusione (Remick, 2005). L'IL-8 promuove l'attivazione di PI3K promuovendo l'attivazione di Akt, PKC e la cascata delle MAPK che controlla l'attività di un largo numero di fattori trascrizionali. L'aumentata espressione dell'IL-8 o dei suoi recettori è stata osservata nelle cellule tumorali, nelle cellule endoteliali, nei neutrofili e nei macrofagi tumore-associati suggerendo che l'IL-8 può agire come fattore di regolazione nello sviluppo tumorale (Bendre et al.,2005).

MAP-CHINASI

Le MAP-chinasi, "Mitogen-activated protein kinase", (MAPK), costituiscono una famiglia di protein chinasi che svolge un ruolo chiave in molti processi cellulari come proliferazione, differenziazione, sviluppo e apoptosi (Proliferation, Biology and Sciences, 2002). Le MAP-chinasi sono tra le più antiche vie di trasduzione del segnale, infatti la loro funzione e regolazione si è conservata nel corso dell'evoluzione (Johnson, G.L. 2002). Sono le componenti principali di pathways che controllano la trascrizione genica, la sintesi proteica, l'embriogenesi, il differenziamento, la crescita e la morte cellulare e sono coinvolte in numerosi processi quali la risposta immunitaria, dalla fase di avvio dell'immunità innata, all'attivazione dell'immunità adattativa alla morte cellulare (Chen Dong et al.2002). Hanno un ruolo cruciale nella sintesi di numerose citochine e chemochine pro-infiammatorie che mobilitano il sistema immunitario a combattere infezioni di patogeni (Liu and Shanley, 2009).

Nelle cellule normali, in assenza di stimoli, le MAPKs presentano una ridotta attività catalitica, mentre, in seguito all'esposizione della cellula a ligandi extracellulari, fattori di crescita e stress, l'attività di tali enzimi può aumentare anche di 1000 volte. Delle 14 famiglie esistenti, sono state caratterizzate tre famiglie di MAPK in grado di effettuare importanti punti di controllo:

- MAP-chinasi classica nota anche come ERK
- le chinasi N-terminali c-Jun (JNK)
- le protein chinasi attivate dallo stress (p38 / SAPK)

La famiglia delle MAPK è coinvolta nella proliferazione cellulare, nella differenziazione, apoptosi e infiammazione (Kwon KR, 2019).

Per l'attivazione di queste tre chinasi sono richiesti due step di fosforilazione, all'interno della cascata di chinasi detta a "tre livelli": MAPK, MAPK chinasi (MAPKK) e MAPKK chinasi (MAPKKK). Le MAPKKKs, sono Ser/Thr chinasi, spesso

attivate tramite fosforilazione e/o interazione con proteine della famiglia delle Ras/Rho in risposta a stimoli extracellulari (Savoia et al., 2019). L'attivazione di MAPKKs porta alla fosforilazione e attivazione di MAPKs, che a loro volta stimolano l'attività di MAPKs, attraverso la doppia fosforilazione sui residui di Thr e Tyr all'interno di una sequenza Thr-Pro-Tyr localizzata nel loop di attivazione del sottodominio chinasi. Le MAPK vengono attivate anche da segnali extracellulari, (mitogeni, fattori di crescita, citochine proinfiammatorie come il fattore di necrosi tumorale- α e l'interleuchina 1 β) e da vari tipi di stress cellulare come lo stress ossidativo, genotossico e osmotico (Eun Kyung Kim, 2015). I ROS, attivati dai raggi UVB, ad esempio attivano ERK, JNK e p38 (Bickers and Athar, 2006; Khan et al., 2012).

c-FOS, c-JUN

La proteina c-fos è un proto-oncogene costituito da 380 amminoacidi (Van Straaten, 1983), appartenente alla famiglia dei geni a rapida induzione: immediated early genes (IEGs). Sono state identificate 4 proteine della famiglia Fos: C-Fos, Fos B, Fra-1 e Fra-2, che sono codificate da geni contenenti quattro esoni e tre introni e posseggono il motivo a cerniera di leucina (leucin zipper) che promuove l'eterodimerizzazione con un altro membro dei IEG, la famiglia Jun (c-Jun, Jun-B, e Jun-D). L'eterodimero fra un membro della famiglia Fos e quella Jun forma l'activator protein-1 (AP-1), fattore di trascrizione nucleare (Kovacs, K. J., 2015), la cui attività trascrizionale dipende anche dal grado di fosforilazione di c-fos e c-jun. In condizioni basali il c-fos si trova in concentrazioni molto bassa, dopo uno stimolo acuto si ha una maggiore trascrizione dell'mRNA del c-fos entro la prima e la terza ora, e dopo 4-6 ore si ha la sua degradazione (Kovacs and Sawchenko, 1996). È stato dimostrato come l'esposizione di fibroblasti umani all'irradiazione UVB attiva citochine, quali IL-6 e IL-8 ed attiva MAPK quali ERK, JNK e p38 che inducono rapidamente l'attività dell'AP-1 (Sun et al., 2015), che a sua volta, regola le MMPs nella pelle (Kwon, KR, 2019).

NF- κ B

Il fattore di trascrizione NF- κ B è stato individuato per la prima volta nel 1986 dal prof. David Baltimore (Sen & Baltimore, 1986) ed inizialmente si pensava fosse presente soltanto nei linfociti B, poiché era stato trovato legato al tratto enhancer del gene per la catena κ delle immunoglobuline (da cui l'acronimo Nuclear Factor- κ B). Da allora gli studi sono proseguiti in maniera incessante e sono stati individuati cinque elementi proteici, facenti tutti parte della famiglia NF- κ B: p65 (RelA), RelB, REL (c-REL), p50/p105 (NF- κ B1) e p52/p100 (NF- κ B2), che si trovano nelle cellule sotto forma di omo ed eterodimeri. Le proteine NF- κ B sono caratterizzate dalla presenza di un dominio conservato RHD (Rel Homology Domain) localizzato nella regione N-terminale e lungo 300 aminoacidi, responsabile della dimerizzazione e dell'interazione con I κ B e del legame al DNA. Il legame di I κ B mantiene NF- κ B inattivo, impedendone la traslocazione nel nucleo, mentre i dimeri di NF- κ B liberi, nel nucleo, si legano a specifiche sequenze nel promotore e nelle regioni enhancer di geni target (Hayden & Ghosh, 2008) (Hayden & Ghosh, 2004). NF- κ B può essere attivato seguendo una via classica (canonica) o alternativa (non-canonica) (Bonizzi & Karin, 2004). Lo step iniziale comune alle due vie vede l'attivazione del complesso IKK, che consiste di due subunità catalitiche, IKK α e IKK β , e una subunità regolatoria NEMO o IKK γ , cruciale nell'attivazione del complesso, sebbene non sembri avere un ruolo attivo dal punto di vista catalitico. Nella via classica, in seguito a stimolazione da parte delle citochine proinfiammatorie, la via di segnale porta all'attivazione mediante fosforilazione della subunità β del complesso IKK, il quale, a sua volta, fosforila le proteine I κ B, gli inibitori dei fattori NF- κ B, a livello di due residui di serina N-terminali, dissociandole dall'eterodimero p65-p50. Questi eventi portano alla dimerizzazione di NF- κ B in seguito alla degradazione indotta dalla fosforilazione, mediata dal complesso IKK, della proteina inibitoria I κ B, nella via classica. Questo consente ai dimeri di NF- κ B di entrare nel nucleo e attivare specifici bersagli

coinvolti nell'espressione genica. Un ruolo diretto nell'attivazione della via classica è svolto anche dalla chinasi $IKK\alpha$, la quale migra nel nucleo dove attiva per fosforilazione l'istone H3 e inoltre si lega alle regioni regolatrici di diversi geni, controllandone l'espressione. Nella via alternativa, $IKK\alpha$ fosforila p100 trasformandola in p52 (Karin & Ben-Neriah, 2002) che a sua volta entra nel nucleo e attiva l'espressione di specifici geni. I geni espressi in seguito a traslocazione nucleare di NF- κ B, regolano il rilascio di citochine proinfiammatorie, chemochine, COX. Poiché sia da studi svolti in diversi laboratori, che in quello dove ho svolto la speculazione, si evince che il fattore di trascrizione NF- κ B è uno dei più importanti fattori di trascrizione attivati nelle vie infiammatorie, risulta di particolare interesse esplorarlo in maniera dettagliata (Scotto d'Abusco, Politi, Giordano, & Scandurra, 2010).

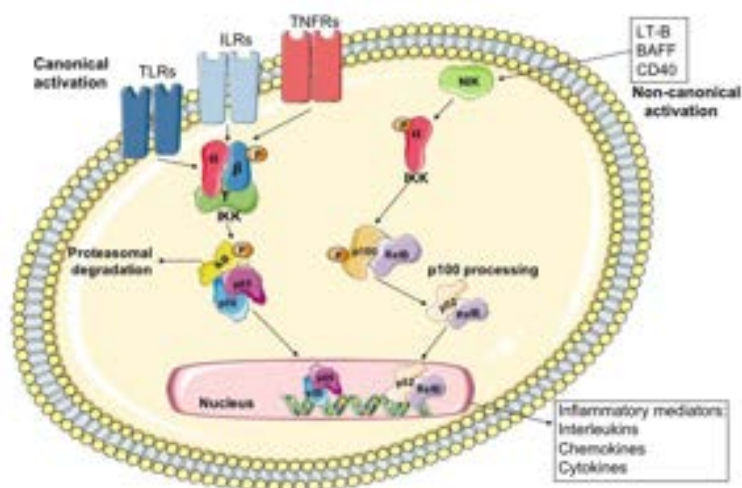


Fig.3 Pathway di NF- κ B attraverso i percorsi canonici e non canonici. Attivato dai mediatori dell'infiammazione come le interleuchine e le citochine, dopo essersi liberato dal complesso I κ B, i dimeri di NF- κ B si spostano nel nucleo e si legano a specifiche sequenze di DNA all'interno della regione del promotore di una vasta gamma di geni aumentando la trascrizione di fattori proinfiammatori.

COX-2

Le cicloossigenasi (COX), prostaglandina-endoperossido sintasi, sono una classe di isoenzimi che catalizzano, attraverso reazioni di cicloossigenazione radicalica, la conversione dell'acido arachidonico (AA), acido grasso a 20 atomi di carbonio, in prostaglandine (PG), molecole lipidiche che mediano l'infiammazione, il dolore e la febbre (Chandrasekharan and Simmons, 2001). Questi enzimi contengono il gruppo eme e possiedono due attività catalitiche: una cicloossigenasi che aggiunge all'arachidonato quattro atomi di ossigeno derivanti da due molecole di O₂, e una perossidasi che trasforma il risultante gruppo idroperossidico in un gruppo OH. La COX esiste in tre isoforme: COX-1 è una glicoproteina costitutiva formata da 576 amminoacidi, espressa in molti tessuti tra cui l'endotelio vascolare, il tratto gastrointestinale, i tubuli renali, piastrine (Tanabe and Tohnai, 2002). COX-2 è formata da 604 amminoacidi ed è espressa in risposta a stimoli infiammatori come IL-1, TNF- α , LPS, INF γ ed è di tipo inducibile (Chandrasekharan and Simmons, 2001). COX-3 è espressa a livello del sistema nervoso centrale. (Voet, 2007). Il sito catalitico delle isoforme, COX 1 e 2 ha una struttura ad α -elica ed un sito di legame per l'eme, simile a quello dell'emoglobina. Nella sintesi delle prostaglandine il primo passo della COX è quello di fissare, attraverso il gruppo eme, l'O₂ e di farlo reagire con l'acido arachidonico: aggiunge così due molecole di ossigeno all'acido arachidonico formando dapprima la prostaglandina G₂ nella quale vi sono due legami perossido (O-O). Successivamente, con la sua attività di perossidasi, rompe uno di questi legami e forma la prostaglandina H₂, la quale a sua volta, attraverso altri enzimi, viene poi convertita in una varietà di prostaglandine diverse. È stato dimostrato che i valori di COX-2, prostaglandine e metaboliti risultano elevati in seguito ad irradiazione con raggi UV (Garret R.H, biochimica, V edizione).

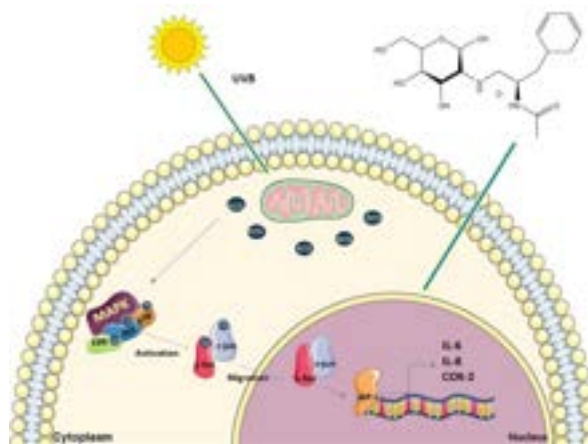


Fig 4. Effetto di NAPA sui pathways infiammatori attivati dai raggi UVB

DEGRADAZIONE MATRICE EXTRACELLULARE

Le maggiori modifiche dovute ai processi di invecchiamento cutaneo, intrinseci (dovuti al passare del tempo) ed estrinseci (dovuti all'esposizione a fattori ambientali), si verificano a livello della ECM, dove componenti biologicamente e strutturalmente diversi, quali proteine, proteoglicani e glicoproteine (Daley et al. 2008), hanno il compito di conferire alla pelle idratazione, elasticità e resistenza. Poiché queste molecole hanno una lunga emivita, sono più esposte a diversi tipi di danno, i quali accumulandosi nel tempo causano perdita di funzionalità. L'invecchiamento intrinseco porta alla degradazione delle componenti fibrose dell'ECM ed alla perdita della frazione oligosaccaridica, influenzando la capacità della pelle di trattenere l'acqua. La conseguenza è un'evidente atrofia extracellulare generalizzata. L'invecchiamento estrinseco, invece, è dovuto ad eventi catabolici ed anabolici di rimodellamento che interessano specifiche componenti della matrice e che sono dose-dipendenti, quali perdita di collagene fibrillare I e III del derma e del collagene VII, che ancora le fibrille alle creste epidermiche. La degradazione della ECM viene stimolata dall'attivazione del pathway di NF- κ B, che porta al rilascio di vari enzimi proteolitici, tra cui

metalloproteasi (MMPs), serin proteasi e citochine pro-infiammatorie (Liao et al., 2019), (Zhang e al., 2019).

LE METALLOPROTEASI

Le metalloproteasi sono una famiglia di enzimi che regolano vari processi infiammatori e riparatori. (Nissinen and Kähäri, 2014). La risoluzione della struttura biologica della famiglia delle metalloproteasi risale ai primi anni '70, quando è stata ottenuta la prima struttura cristallina di chimotripsina e tripsina. Una tipica metalloproteasi è costituita da un prodominio di circa 80 aminoacidi, un sito catalitico di circa 170 residui aminoacidici, un peptide linker di lunghezza variabile (detto hinge region) ed un dominio hemopexin-like di circa 200 aminoacidi. La proteina una volta sintetizzata viene secreta nella sua forma inattiva (pro-MMP), in cui l'atomo di zinco (Zn^{2+}), presente nel sito catalitico, non è disponibile alla formazione di legami a causa della presenza di una cisteina. La successiva attivazione deriva dall'esposizione del sito catalitico che interagisce con i substrati. L'attività catalitica è promossa dalla presenza di un residuo di acido glutammico che funge da nucleofilo e separa i legami peptidici. (Parks, Wilson and Lòpez-Boado, 2004). La MMP-2 insieme alla MMP-9 fanno parte della famiglia delle gelatinasi che hanno attività collageno-litica, degradano la fibronectina e la gelatina; sono inoltre responsabili dell'attivazione di molte citochine e di altre MMP. La MMP-2, essenziale nel rimodellamento tissutale, è composta da una catena singola proteica che si ripiega in quattro domini separati. Il ruolo della MMP-2 è quello di scindere il collagene creando spazi nell'ECM in modo da permettere il passaggio di varie sostanze. Questo processo risulta dannoso però durante la progressione tumorale, in quanto esso facilita la migrazione delle cellule neoplastiche (Li, Tao and Li, 2015). La MMP-9, ha come funzione primaria quella di degradare le proteine della matrice extracellulare per permetterne il rinnovo (turn-over). Inoltre, svolge un ruolo chiave nello sviluppo embrionale ed inibisce il rimodellamento osseo operato dagli osteoclasti. Questo enzima (così

come tutte le metalloproteasi) è fisiologicamente presente nella matrice in forma inattiva legato all'inibitore delle metalloproteasi TIMP. La scissione del legame tra TIMP e MMP promuove il passaggio delle MMP dallo stato inattivo a quello attivo. Anche la MMP-13 (famiglia delle collagenasi) sembra essere coinvolta nel processo di degradazione della ECM in quanto degrada il collagene di tipo I e anche altre componenti della matrice. (Nissinen and Kähäri, 2014) . L'espressione delle MMP è regolata da fattori di trascrizione come il complesso AP-1, che a sua volta è attivato dalla fosforilazione delle MAPKs (Scotto d'Abusco, Cicione, et al., 2007). Altri enzimi coinvolti nella degradazione della ECM sono le serin proteasi, una tipologia di enzimi proteolitici che controllano numerose funzioni fra cui la digestione delle proteine alimentari, attivazione ormonale, l'attivazione di fattori di crescita e del sistema del complemento (Voet et al., 2001).

SCOPO DEL LAVORO

Negli ultimi anni molta attenzione è stata prestata ai danni provocati alla pelle dalle radiazioni solari ultraviolette, infatti molte ricerche sono state volte alla comprensione dei meccanismi che sottendono al processo di photoaging. In particolare, è stato visto che le radiazioni ultraviolette oltre a causare danni al DNA, che si traducono in morte cellulare o in mutazione somatica, stimolano anche l'attivazione dei processi infiammatori, nella fattispecie delle chinasi MAP (MAPKs) e del fattore di trascrizione NF- κ B. I processi infiammatori a loro volta portano alla degradazione della matrice extracellulare con conseguente danneggiamento della pelle. Per cui cercare di inibire i processi infiammatori e stimolare la sintesi di nuova matrice potrebbe essere una scelta promettente nella prevenzione del danno da invecchiamento associato all'esposizione ai raggi UV. In precedenza, sono state condotte ricerche volte alla comprensione dell'attività di molecole derivate dalla glucosammina su condrociti primari umani, allo scopo di individuare molecole utili per un possibile uso nella cura della principale patologia osteoarticolare, la osteoartrite. Un derivato in particolare il 2-(N-Acetil)-L-

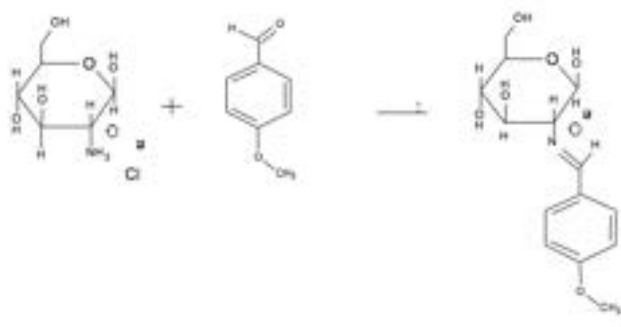
fenilalaninamido-2-deossi- β -D-glucosio (NAPA) è stato dimostrato essere molto efficace sia nel contrastare l'infiammazione che nello stimolare nuova matrice extracellulare. Considerando che il danneggiamento della ECM è alla base sia dell'osteoartrite che del photoaging, ci si è chiesti se NAPA potesse essere in grado di contrastare i danni provocati dall'esposizione ai raggi UVB, bloccando il danno cellulare e di conseguenza il photoaging. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare se NAPA fosse in grado di inibire la risposta infiammatoria provocata dagli UVB, e mediata dalle MAPK e dal fattore di trascrizione NF- κ B e se fosse inoltre in grado di stimolare la sintesi di nuova matrice, in particolare dei collagene.

MATERIALI E METODI

SINTESI DEL NAPA

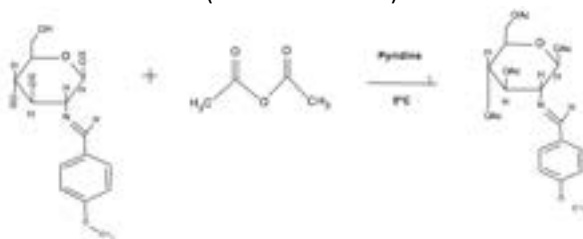
La sintesi del derivato della glucosammina, il NAPA, procede attraverso gli step descritti di seguito:

SINTESI DELLA N-(P-METOSSI-BENZILIDEN)-D-GLUCOSAMMINA (COMPOSTO 1)



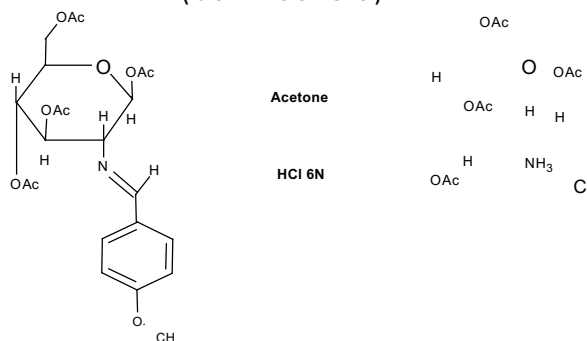
Per ottenere la sintesi del composto finale è necessario avere a disposizione la D-glucosammina attivata per il successivo attacco del carbossile aminoacidico sul gruppo amminico. Per ottenere queste condizioni si utilizza la p-metossibenzaldeide, che reagisce con il gruppo amminico della glucosammina formando un'immina: il composto che si forma è chiamato benzilidene e può essere facilmente allontanato per via elettrochimica o per riduzione con Pd(OH)₂, sfruttando il fatto che il carbonio legato all'azoto è un carbonio benzilico. Ancor più semplicemente, come in questo caso, è sufficiente l'aggiunta di HCl. L'introduzione del gruppo benzilidenico è necessaria per proteggere i gruppi ossidrilici presenti sulla D-glucosammina con gruppi acetilici. Il solido ottenuto dalla reazione è stato lavato con H₂O e in seguito con una miscela 1:1 Et₂O:EtOH. Viene misurato un punto di fusione di 164,5°C, in buon accordo con quanto riportato in letteratura (166°C).

SINTESI DELLA N-(P-METOSSI-BENZILIDEN)-1,3,4,6-TETRA-O-ACETIL-D-GLUCOSAMMINA
(COMPOSTO 2)



Una volta protetto il gruppo amminico si può procedere alla protezione dei gruppi ossidrilici, che rischierebbero di interferire nella formazione del prodotto peptidico; a tale scopo viene eseguita una protezione mediante formazione di un estere, inserendo il gruppo acetilico. Il composto 1, precedentemente descritto, è messo a reagire in ambiente debolmente basico, con anidride acetica, e si ottiene la formazione del prodotto desiderato (composto 2).

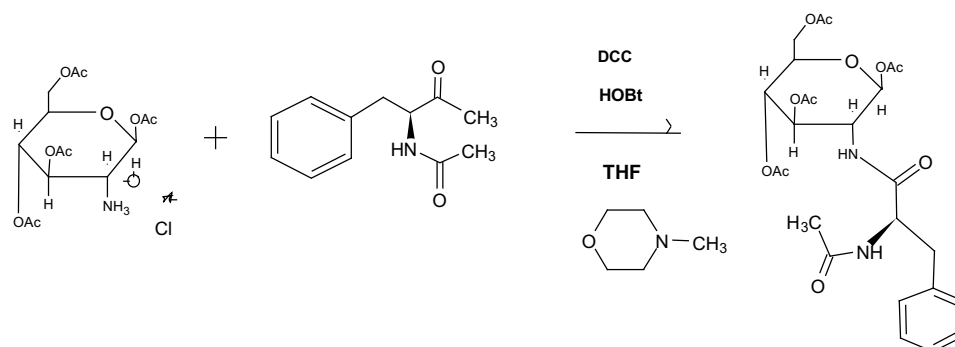
SINTESI DEL CLORIDRATO DELLA 1,3,4,6-TETRA-O-ACETIL-D-GLUCOSAMMINA
(COMPOSTO 3)



Il composto 2 viene a questo punto liberato dal gruppo benzilidenico, in presenza di acetone e acido cloridrico. Queste condizioni non rischiano di provocare la rottura del legame estereo appena formato; la reazione viene condotta in acetone, portato alla temperatura di refluxo in un pallone dotato di refrigerante a bolle. Per aggiunta di HCl 6N si ottiene un precipitato gelatinoso (composto 3);

la precipitazione è completata per aggiunta di etere e lasciando una notte a 4°C. Il solido viene filtrato e lavato con etere etilico, poi asciugato in alto vuoto.

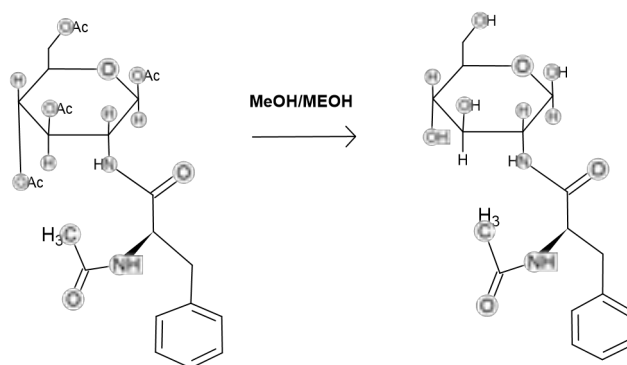
1.1.1 SINTESI DEL 1,3,4,6-TETRA-O-ACETIL-2-(N-ACETIL)-L-FENILALANINAMIDO-2-DEOSSIB-D-GLUCOSIO (COMPOSTO 4)



A questo punto si può procedere con l'accoppiamento dei due composti opportunamente protetti: il cloridrato della glucosammina, per essere reattivo nei confronti dell'accoppiamento peptidico deve essere sbloccato, e a tal fine si utilizza la N-metilmorfolina; l'amminoacido viene attivato e protetto dalla racemizzazione mediante 1-idrossibenzotriazolo (HOBt). Questo composto permette la formazione di un estere attivato che, in presenza di dicicloesilcarbodiimmide (DCC), reagisce formando una O-acil-isourea. È questo il composto che reagisce con il gruppo amminico per dare la formazione del legame peptidico (composto 4). La DCC è un reagente comunemente utilizzato nelle reazioni di accoppiamento peptidico, anche se negli ultimi anni si sono resi disponibili in commercio composti più versatili, che permettono una miglior purificazione del composto finale. Uno degli inconvenienti principali dell'utilizzo della DCC è, infatti, la formazione di urea, insolubile e difficile da eliminare dal grezzo di reazione. La possibilità di reazioni secondarie, quali la disidratazione delle catene laterali di Asn e Gln, in questo caso non rappresenta un problema, né tantomeno abbiamo problemi di solubilità.

Il composto che si forma si presenta in forma colloidale, probabilmente a causa della presenza nel grezzo di reazione di urea. Per ottenere il prodotto purificato è necessario procedere con una estrazione con solventi, eseguendo diverse serie di lavaggi, prima in ambiente acido e poi in ambiente basico.

SINTESI DEL NAPA [2-(N-ACETIL)-L-FENILALANINAMIDO-2-DEOSSO-B-D-GLUCOSIO] (COMPOSTO 5)



Per completare la sintesi è necessario effettuare la deprotezione degli ossidrili presenti sull'anello della glucosammina (composto 5). Tale passaggio sintetico è piuttosto facile, e viene effettuato mediante una classica idrolisi MeONa/MeOH, che non intacca il legame peptidico appena formato. La presenza di quattro gruppi ossidrilici sul composto rende difficile il completo allontanamento dell'acqua nella fase di evaporazione a pressione ridotta; per ottenere il prodotto con la minor presenza di umidità possibile si procede nell'evaporazione a pressione ridotta effettuando delle piccole aggiunte successive di isopropanolo, il quale permette la formazione di un azeotropo e quindi una più efficace disidratazione.

ISOLAMENTO E COLTURE DI FIBROBLASTI

I Fibroblasti umani primari (FB) sono stati isolati a partire da lembi cutanei di prepuzio provenienti da interventi per correzione di fimosi su giovani adulti di età

compresa tra 18 e 27 anni. Gli interventi sono stati eseguiti presso il servizio di Day Surgery e Riabilitazione Uro-Genitale, Centro Chirurgico Multidisciplinare, presidio sanitario di "S. Caterina della Rosa", ASL RM 2. Il prelievo di tale materiale biologico è stato approvato dal Comitato Etico della Sapienza. Al momento della resezione i lembi venivano posti in terreno di trasporto freddo, addizionato con antibiotici e antimicotici e trasportati in laboratorio entro 4h dalla resezione avendo cura di mantenere costantemente la temperatura a +4°C. Per l'espianto e la coltura cellulare venivano impiegati solo lembi cutanei derivati da pazienti che non avevano altra indicazione se non il ristabilimento funzionale dopo l'intervento chirurgico. Inoltre, erano esclusi dalla raccolta anche i pazienti con diabete seppure compensato; pazienti con Lichen, Psoriasi, dermatite atopica, e pazienti con storia di pregressa malattia neoplastica. Ogni paziente aveva rilasciato pieno consenso informato. In laboratorio, dopo aver allontanato il tessuto adiposo e sottocutaneo, il lembo veniva finemente sminuzzato, i frammenti ripetutamente lavati in PBS con antibiotici e tripsinizzati a temperatura ambiente (TA) sotto delicata agitazione. Dopo un'ora si raccoglieva il supernatante e si rinnovava il bagno di tripsina per un'ulteriore ora di incubazione. Le cellule in sospensione venivano centrifugate a 200 xg per 10' e risospese in idoneo mezzo di coltura. I FB primari venivano coltivati in terreno DMEM + 10% FCS + L-glutammina 1%, sodio piruvato 1%, amminoacidi non essenziali 1% in monostrato in incubatore a 37°C, in presenza di CO₂ al 5%. Tutti i risultati sono stati ottenuti con FB compresi tra l'8° e il 20° passaggio in vitro.

TRATTAMENTO CELLULE

I FB sono stati trattati con:

- NAPA
- Raggi UVB
- Raggi UVB + NAPA

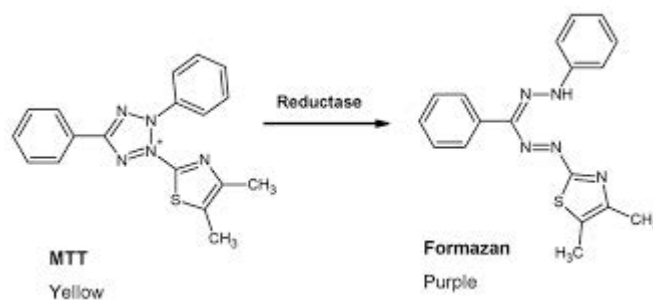
TRATTAMENTO CON UV

I trattamenti con UV venivano eseguiti con il simulatore solare Bio-Sun Vilbert Lourmat (Vilber Lourmat. Suebia, Germany). Questo apparecchio consente di somministrare, con precisione di $\pm 0.005 \text{ J/cm}^2$, la dose e la lunghezza d'onda della radiazione, il tutto in camera chiusa al riparo dalla luce ambientale ed in ambiente termostabile. La camera di irraggiamento veniva sterilizzata con UVC ($\lambda=254 \text{ nm}$) per 15' per complessivi 18 J/cm^2 .

La somministrazione di UVB ($\lambda=312 \text{ nm}$), considerati i brevi tempi di esposizione necessari (tra 0 e 1 minuto nelle diverse condizioni) veniva eseguita direttamente sul monostrato da cui era stato precedentemente rimosso il terreno di coltura per una miglior precisione. Subito dopo l'irraggiamento il terreno veniva aspirato e rimpiazzato con terreno di coltura completo, fresco. Nel caso dell'irraggiamento in piastre da 96 pozzetti (esperimenti di DCF, e curve dose/risposta) il terreno di irraggiamento ammontava a $50 \mu\text{L/pozzetto}$ (corrispondenti a $1,56 \text{ mm}$ di spessore medio). Questo maggior volume si rendeva necessario per evitare che il menisco, dovuto alla tensione superficiale, lasciasse scoperte le parti centrali dei pozzetti.

VITALITÀ CELLULARE

Per determinare la vitalità delle cellule in coltura sottoposte ai diversi trattamenti è stato effettuato il saggio di incorporazione del colorante bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Promega). Si tratta di un metodo colorimetrico basato sulla riduzione del sale di tetrazolio da parte delle deidrogenasi mitocondriali delle cellule vive, che generano un precipitato colorato in violetto.

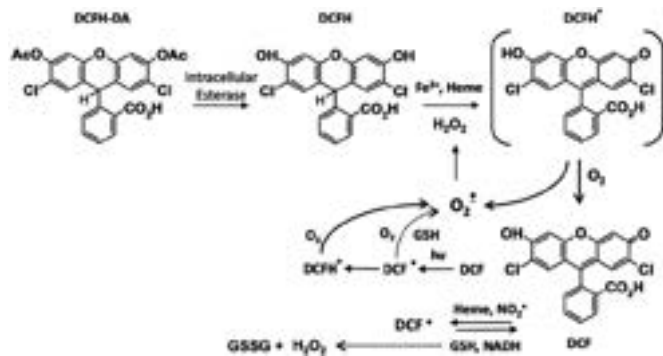


Struttura del sale di tetrazolio (MTT) e del suo prodotto, il formazano.

Le cellule (8×10^3) sono state incubate in pozzetti di una piastra da 96, in un volume finale di 0.1 ml, in presenza delle singole sostanze, per 24h a 37°C. Allo scopo di ottenere un controllo negativo sono state incubate anche cellule su cui non era stato effettuato il trattamento. Dopo 24h, sono stati aggiunti 100 μ l di una soluzione 5mg/ml di MTT in terreno di coltura e incubate per 3h a 37°C, per permettere la formazione dei cristalli di formazano da parte delle cellule vitali. Al termine delle tre ore, eliminato il sovrantante, i cristalli sono stati portati in soluzione mediante l'aggiunta di 0.1ml di DMSO per pozzetto. Dunque, l'intensità del colore prodotto, misurata con metodo spettrofotometrico (Appliskan) a 570 nm è risultata direttamente proporzionale al numero di cellule vive in coltura. Dai valori di densità ottica ottenuti è stato ricavato un valore medio successivamente normalizzato rispetto al controllo (non trattato), la cui densità ottica è stata valutata pari a 100.

ROS

Per il rilevamento dei ROS si è impiegata la 2',7'-diclorofluoresceina-diacetato (DCF-DA). Tale sostanza è permeabile alla membrana cellulare e in presenza di esterasi, che rimuovono i gruppi acetili, diventa polare ed impermeabile alla membrana. Viene quindi ossidata dai ROS prodotti formando la di-cloro-fluoresceina (DCF), molecola altamente fluorescente (Rosenkranz et al. 1992).



Castro-Alf rez, María & Polo-L pez, María & Fernandez-Ibanez, Pilar. (2016). Intracellular mechanisms of solar water disinfection. *Scientific Reports*. 6. 38145. 10.1038/srep38145.

Le colture cellulari sono state seminate, in terreno di coltura adeguato, in 2 piastre da 96 pozzetti con una densit  di 5000 cellule / pozzetto (ca 15000/cm²) tale da consentire una crescita logaritmica per ulteriori 120 h. L'indomani il terreno di semina veniva allontanato e sostituito con 50 L di terreno RPMI senza rosso neutro pi  FCS 0,1% e lasciato equilibrare in termostato per 2h. A questo punto si sostituiva con terreno contenente DCF-DA 10  M ed incubato in termostato per 20'. Le cellule venivano perci  irradiate con le dosi indicate. I ROS endocellulari generati venivano quindi misurati in spettrofluorimetro DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter, Inc. Brea, CA, USA) (Eccitazione 485 nm / Emissione 520 nm) come Relative Fluorescent Unit (RFU) in unit  aritmetiche. L'andamento nelle successive 24 h veniva monitorato mediante successive misurazioni ai tempi   1h 2h 3h 4h 5h 6h 24h. I risultati venivano riportati in grafico con il programma Graphpad 6.0 come media e deviazione standard di 8 determinazioni indipendenti.

ESTRAZIONE RNA TOTALE

Le cellule, portate a confluenza sono state trattate come descritto precedentemente; conclusi i trattamenti è stata effettuata l'estrazione con TRIzol® Reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), secondo il protocollo suggerito dalla ditta. Brevemente, si rimuove dalle capsule il terreno di coltura e si effettua un lavaggio in tampone salino Phosphate Buffered Saline (Dulbecco A) (PBS) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England). Si aggiunge TRIZOL® Reagent in volume 1ml/10cm², viene quindi addizionato CHCl₃ in rapporto 1:5; si agitano i campioni e si centrifugano a 12,000 rpm per 15 min a 4°C per favorire la completa separazione fra la fase acquosa e quella organica. La fase acquosa viene recuperata e addizionata di isopropanolo in rapporto 1:1 e nuovamente centrifugata a 12,000 rpm per 12 min a 4°C, in modo da favorire la formazione di un precipitato bianco opalescente, il pellet di RNA. Quest'ultimo viene lavato in EtOH freddo al 75% e centrifugato nuovamente, a 7,500 rpm per 5 min a 4°C. Si elimina a questo punto l'etanolo e il pellet di RNA viene risospeso in acqua sterile. La qualità e la quantità di RNA nei diversi campioni è determinata mediante analisi spettrofotometrica (A260/A280) e mediante elettroforesi su gel di agarosio 1%

RETROTRASCRIZIONE

I campioni di RNA ottenuti come appena descritto vengono retrotrascritti in DNA complementare (cDNA) utilizzando l'enzima trascrittasi inversa Improm-II (Promega Corporation, Madison, WI, USA), in accordo con il protocollo fornito dal produttore. Brevemente, la miscela di reazione, che ha un volume finale di 20 µl e così composta: 50 µg/ml di RNA, 25 µg/ml di stampo, oligo (dT)₁₅, tampone di reazione (fornito dalla ditta), MgCl₂ 25 mM, miscela di deoxy Nucleotides TriPhosphates 10 mM (dNTP mix), 1 µl di enzima (tutto Promega). RNA e oligo(dT), diluiti con acqua sterile fino ad ottenere un volume complessivo di 5 µl, vengono denaturati a 70°C per 5 min e tenuti in ghiaccio per altri 5 min; a questo punto si

aggiungono gli altri componenti della miscela di reazione, per un volume finale di 20 μ l. La reazione di sintesi prevede 5 min a 25°C per l'appaiamento dello stampo di oligo(dT)₁₅ sulle molecole di RNA e 60 min a 42°C per la sintesi enzimatica di cDNA. I campioni così ottenuti vengono conservati a -20°C fino al loro utilizzo.

QUANTITATIVE-REAL TIME PCR (Q-RT-PCR)

Il cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione del RNA è stato amplificato e analizzato in piastre da 96 pozzetti, utilizzando 50ng di cDNA, e come stampo per ottenere l'amplificazione gli oligonucleotidi (oligo) dei geni di nostro interesse; Per effettuare la reazione di amplificazione è stata utilizzata la macchina ABI Prism 7300 (AppliedBiosystems). Gli oligo sono stati disegnati tramite il software Primer express e sintetizzati dalla BiofabResearch (Rome, Italy). Per poter seguire l'andamento dell'espressione genica, la tecnica Q-RT-PCR sfrutta l'invio di un segnale fluorescente da parte di un fluoroforo presente nella miscela di reazione; nel nostro caso il fluoroforo usato è il SYBR Green, un agente intercalante che si lega in maniera non specifica alla doppia elica del DNA. I cicli di reazione sono regolati da un programma che prevede le seguenti fasi:

- 95°C per 15 secondi
- 60°C per 1 minuto
- 95°C (1 min) - 60°C (30 sec) - 95°C (15 sec) (ciclo di dissociazione)

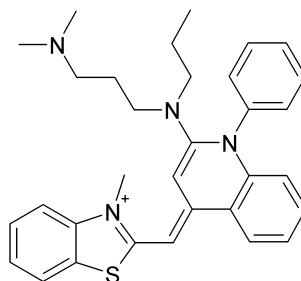


Fig.6 La sonda fluorescente SYBR GREEN

Complessivamente si effettuano 40 cicli. Per motivi di riproducibilità statistica ogni campione viene analizzato in triplicato, preparando un'unica soluzione (60 μ l) che viene suddivisa in tre pozzetti (20 μ l ognuno). La miscela di reazione è composta da SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), Forward primer 20 μ M, Reverse primer 20 μ M, cDNA 2.5 ng/ μ l e acqua sterile. Il volume finale impiegato per la reazione è di 20 μ l. Per effettuare la reazione di amplificazione è stata impiegata una macchina ABI Prism 7300 (Applied Biosystems). I risultati vengono analizzati utilizzando il software Sequence Detection Systems (SDS) fornito dalla ditta insieme allo strumento; il programma identifica in modo automatico il ciclo soglia (Ct). Questo valore rappresenta il punto in cui la reazione di amplificazione è in fase esponenziale ed è rivelabile dal rapido aumento dell'intensità di fluorescenza. L'analisi dei dati viene effettuata con il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizzando come gene di riferimento il 18S (housekeeping).

WESTERN BLOT

I campioni ottenuti dall'estrazione proteica vengono trattati con tampone riducente in quantità 1:1, costituito da Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 2% ml/ml, glicerolo 10% 49 ml/ml, β mercaptoetanolo 0.7 M, Blu di Bromofenolo (BBF) 0.1% ml/ml e messi a bollire per 5 min. Dopo questo trattamento vengono caricati su gel Mini-protean TGX precast (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). La corsa elettroforetica viene effettuata in un tampone costituito da Tris Base (3 g), glicina (14 g), SDS 10% e H₂O (quantità per un litro di soluzione); una volta terminata la corsa, il gel viene trasferito su membrane di PVDF (BioRad). Tali membrane vengono adoperate per rivelare e quantificare la presenza di alcune proteine negli estratti citosolici e nucleari: per prima cosa si mettono le membrane in incubazione per 1h a temperatura ambiente, su piattaforma oscillante, in una soluzione bloccante (blocking solution), costituita da tampone salino (Tween Tris Buffer Salino, TTBS) (50 mM Tris-HCl pH 8, 0.05% Tween-20 e NaCl 150 mM) e 3%

(g/ml) Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma); trascorso questo tempo di incubazione si sostituisce la soluzione bloccante con una soluzione contenente BSA 3% g/ml e l'anticorpo primario alla concentrazione stabilita e si mantengono nuovamente le membrane in incubazione per 1h a temperatura ambiente o, alternativamente, over night (O/N) alla temperatura di 4°C. Le membrane vengono a questo punto lavate in TTBS (3 lavaggi) e nuovamente incubate in soluzione di TTBS e BSA 3% g/ml contenente l'anticorpo secondario alla concentrazione stabilita per 1 h a temperatura ambiente, in agitazione. Si procede effettuando nuovamente dei lavaggi per allontanare l'eccesso di anticorpo e si procede alla rivelazione del segnale: le membrane vengono trattate con un substrato luminescente (Enhanced ChemiLuminescence, ECL) (Amersham) e successivamente rivelate mediante strumento Chemi-Doc (BioRad). La quantificazione dei segnali avviene tramite analisi come ImageLab software.

I diversi anticorpi utilizzati sono:

- anti-ERK 1/2, anti-pERK1/2 (1 µg/ml),
- anti-p38, anti-pp38, anti-JNK, anti-p-JNK (4 µg/ml),
- anti-Ciclooxygenase (Cox-2).

ELISA

La concentrazione di IL-6 e di IL-8 nel terreno è stata misurata col kit ELISA Interleuchina-6 umana e dal test ELISA umano EL-8 Fine Test (Fine Biotech Co., Ltd, Wuhan, Cina), rispettivamente, secondo le istruzioni dei produttori.

FORMAZIONE SFEROIDI

300,000 fibroblasti sono stati pellettati centrifugando per 6 minuti a 37°C, a 250 x g, in tubi da 15 ml e dopo messi in cultura con il 10% di FBS in tensione di ossigeno standard, in presenza di 50 µg / ml di acido ascorbico. Dopo 3 giorni, le culture di

sferoidi sono state delicatamente trasferite in una piastra da 24 pozzetti in un volume di 100 μ l di terreno senza rosso fenolo. Per il trattamento con NAPA, 1h prima dell'irraggiamento con i raggi UVB, gli sferoidi sono stati trasferiti in 1 ml di terreno completo senza rosso fenolo e contenente NAPA alla concentrazione di 0.5 mM e dopo esposti ai raggi UVB come descritto precedentemente. Gli sferoidi non irraggiati sono stati utilizzati come controllo (CTL). Gli sferoidi sono stati analizzati 7 giorni dopo il trattamento con gli UVB. Ogni esperimento è stato ripetuto indipendentemente almeno per tre volte.

ISTOCHIMICA

Una settimana dopo l'irraggiamento, le colture 3D di sferoidi sono state fissate in paraformaldeide al 4% e immerse in paraffina secondo le procedure standard. Per la valutazione immunoistochimica della produzione del collagene, gli sferoidi sono stati tagliati in sezioni da 3 μ m e colorati con l'anticorpo monoclonale anti-mouse-Col1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Dopo l'incubazione, i campioni sono stati lavati e poi incubati con l'anticorpo secondario biotinilato ed in seguito con la streptavidin-biotin-peroxidase (DAKOLSAB Kit peroxidase; DAKO,CA,USA). I segnali sono stati sviluppati incubando con 3,3'-diamminobenzidina (DAB).

STUDIO PILOTA IN VIVO

Due pazienti donne, rispettivamente di 59 e 70 anni, hanno rilasciato il consenso informato e sono state introdotte nello studio. Abbiamo addizionato l'1% di NAPA (500 μ g) a 50 μ l di crema viso idratante. Le pazienti hanno applicato autonomamente questa crema nella zona perioculare una volta al giorno. Hanno applicato sulla stessa zona anche una crema priva di NAPA. I recipienti delle creme erano identici tranne che per le etichette "lato destro" e "lato sinistro". Le caratteristiche della pelle, specialmente le rughe su entrambe le zone periorbitali,

sono state stimate con: Antera 3D Camera Miravex (<http://miravex.com/antera-3d>) al tempo 0 0 (T0) e dopo 4 settimane (4w). Le misurazioni ottenute a T0 sono state comparate con quelle ottenute dopo 4 settimane.

RISULTATI E DISCUSSIONE

EFFETTO DEI RAGGI UVB SULLA VITALITÀ CELLULARE

Per determinare la vitalità cellulare di FB sottoposti a dosi crescenti di raggi UVB è stato utilizzato il metodo di colorazione del Crystal Violet.

Il range di dosi fornite va da 0,01 a 0,08 J/cm² ed è stato scelto sulla base di risultati ottenuti da studi preliminari condotti su cheratinociti umani immortalizzati (De Marco, F. 2007) e sulla base di considerazioni teoriche. Dai risultati riportati in Figura 7, si osserva un intervallo di tossicità che va da una inibizione del tutto trascurabile della vitalità cellulare nel caso della dose più bassa (0,01 J/cm²) fino a una completa tossicità cellulare nel caso della dose più elevata (0,08 J/cm²). La dose intermedia di 0,04 J/cm², è stata utilizzata al fine di sottoporre le cellule ad uno stress che rientrasse in condizioni di tossicità sub-tossiche.

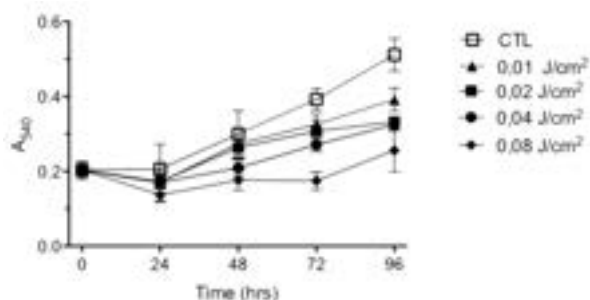


Fig. 7 Effetto della radiazione UVB sulla vitalità cellulare

PRODUZIONE DEI ROS INDOTTA DAI RAGGI UVB

L'irraggiamento con i raggi UVB ha mostrato tre picchi che rappresentano l'incremento dei ROS.

Il primo picco incrementa rapidamente ed è seguito da altri due picchi "secondari", entrambi caratterizzati dalla stessa altezza e da una larghezza maggiore rispetto al primo. Il tempo di insorgenza di questi due picchi, si presenta a tempi diversi:

- nell'intervallo tra 1h e 30' e 3h per il secondo picco;
- nell'intervallo tra 4h e 6h per il terzo;
- In alcuni casi entro le prime 6h post-irraggiamento si sono visti tre picchi indipendenti.

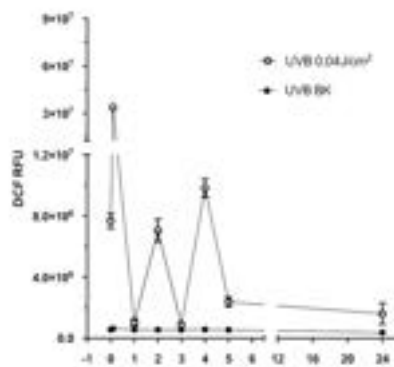


Fig. 8 Effetto delle radiazioni UVB sulla produzione dei RO

NAPA CONTRASTA L'INCREMENTO DI IL-6, IL-8 E COX-2 MEDIATO DAI RAGGI UVB

Il brusco aumento dei ROS a seguito di irraggiamento con i raggi UVB induce una rapida risposta infiammatoria nei fibroblasti umani dermici. Questa è considerata la causa principale del photoaging caratterizzato da: rughe, ispessimento della pelle, atrofia ed elastosi, pigmentazione patologica o depigmentazione. Per analizzare l'effetto di NAPA sulla risposta infiammatoria mediata dai raggi UVB,

abbiamo misurato i livelli di espressione degli mRNA di IL-6, IL-8, COX-2. Come previsto, l'irraggiamento con i raggi UVB ha indotto un'evidente aumento di questi mediatori pro-infiammatori. Nelle cellule pre-trattate con NAPA, ed esposte ai raggi UVB abbiamo constatato una diminuzione dei livelli di espressione dei livelli di mRNA IL-6, IL-8. Al fine di determinare una riduzione della risposta infiammatoria che si riflettesse sui livelli di IL-6 e di IL-8, abbiamo dosato le proteine del supernatante cellulare. NAPA (come mostrato in figura 9) inibisce totalmente l'aumento di IL-6, e in misura minore quella di IL-8. Coerentemente, il trattamento con NAPA inibisce anche l'incremento di mRNA di COX-2. Invece i livelli proteici di COX-2 indotti dall'irraggiamento con i raggi UVB, sono stati solo in minima parte ridotti dalla somministrazione di NAPA e questa modulazione era al di sotto della soglia statisticamente significativa.

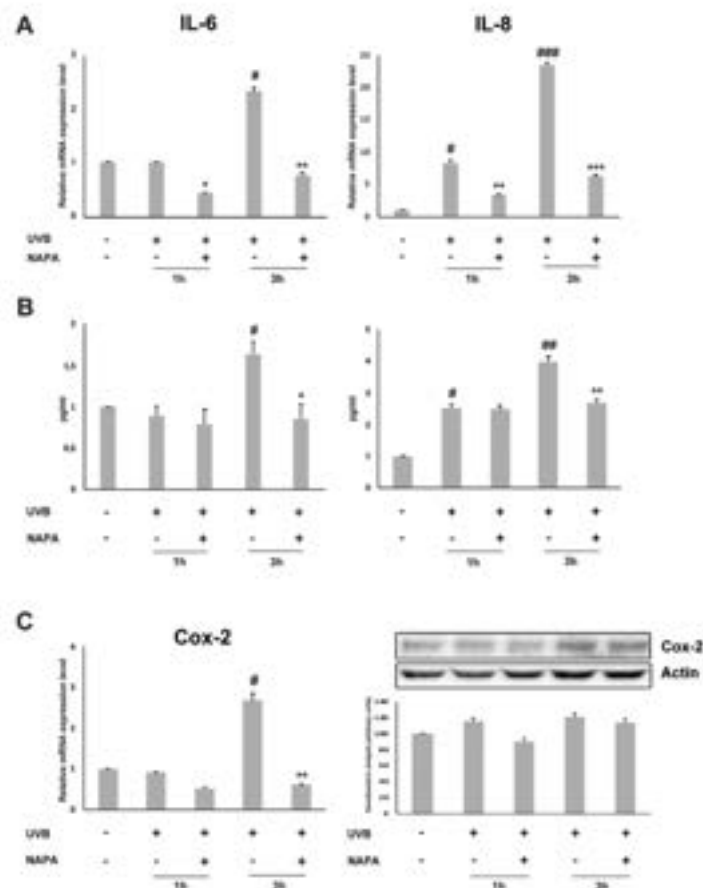


Fig. 9 Effetto di NAPA sui pathway infiammatori stimolati dai raggi UVB

NAPA INTERFERISCE CON LE MAPK INIBENDO L'ATTIVAZIONE DI P-ERK MEDIATA DAGLI UVB.

Abbiamo valutato la capacità di NAPA di inibire l'attivazione delle MAPK, considerando che i ROS, generati dai raggi UVB, le attivano; queste a loro volta inducono la trascrizione di proteine pro-infiammatorie quali IL-6, IL-8, COX-2.

A tal proposito, abbiamo estratto le proteine cellulari da campioni esposti ai raggi UVB trattati e non con NAPA.

L'estratto cellulare è stato analizzato dopo 15', 30' e 1h dal trattamento con NAPA tramite Western blot utilizzando questi anticorpi:

- anti-ERK 1/2, anti-pERK1/2 (1 µg/ml),
- anti-p38, anti-pp38, anti-JNK, anti-p-JNK (4 µg/ml),
- anti-Ciclooxygenase (Cox-2).

Abbiamo visto come la radiazione UVB induce un incremento nella fosforilazione di ERK (p-ERK), un leggero incremento di p-JNK, e non induce p-p38. Il pre-trattamento con NAPA quasi completamente inibisce la fosforilazione di ERK e dei JNK. Inoltre, NAPA inibisce quasi totalmente l'aumento di c-fos, indotto dai raggi UVB. In accordo con la lieve attivazione di JNK, l'espressione dell'mRNA di c-jun aumenta in misura minore. Ciononostante, il trattamento con NAPA è stato in grado di inibire anche questo scarso incremento.

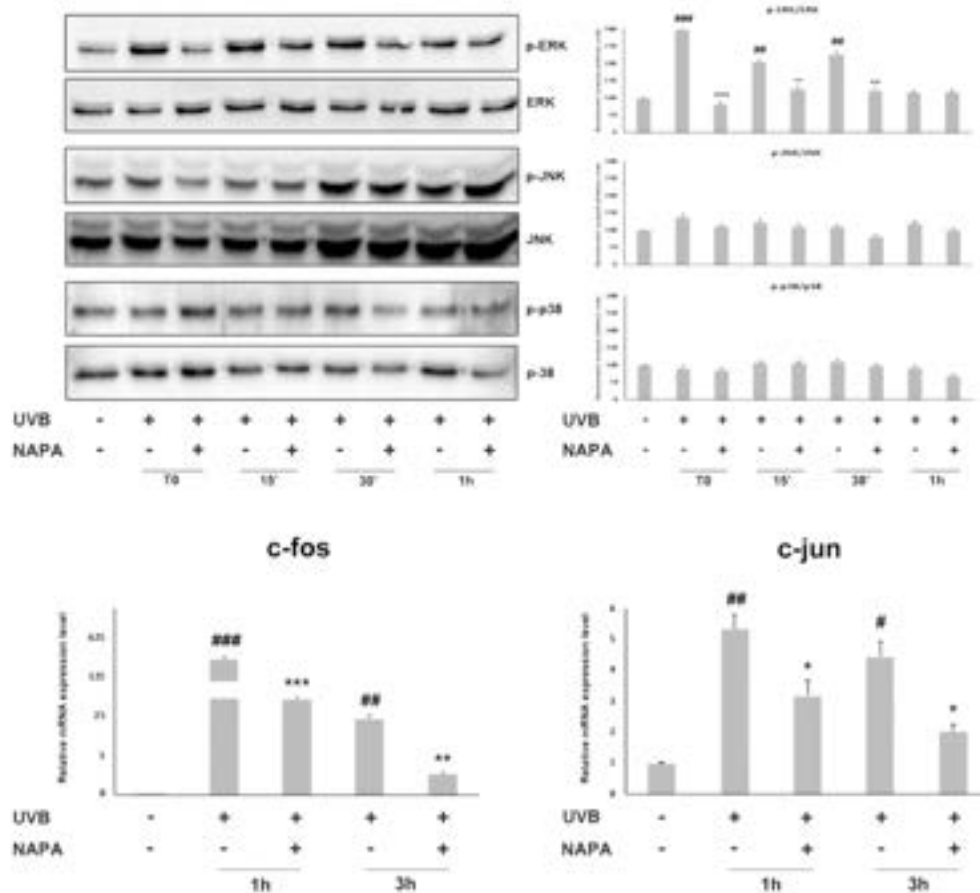


Fig. 10 Effetto di NAPA sulla fosforilazione delle MAPK indotta dai raggi UVB in fibroblasti umani primari.

In alto a sinistra sono riportati i risultati del Western blot.

In alto a destra è riportata l'analisi densitometrica.

In basso è riportata l'espressione dei livelli di mRNA di c-fos e c-jun ottenuta tramite RT-PCR.

NAPA CONTRASTA LA DEGRADAZIONE DEL COLLAGENE E NE STIMOLA L'ACCUMULO NELL'ECM

I mediatori pro-infiammatori inducono la degradazione del collagene ed accelerano il processo del photoaging. Per valutare se la dose di raggi UVB somministrata alle cellule avesse influenzato la degradazione del collagene, e per valutare se NAPA potesse avere un ruolo protettivo o se potesse stimolare la sintesi di collagene, abbiamo analizzato le cellule tramite Western blot. I risultati

hanno mostrato che il trattamento con i raggi UVB inibisce la produzione di Col I e che le cellule pre-trattate con NAPA ed in seguito esposte ai raggi UVB contrastano questa inibizione. Inoltre, NAPA stimola autonomamente la produzione di Col I. Al fine di mimare le condizioni fisiologiche dei FB, abbiamo messo in cultura i FB in un modello tridimensionale producendo gli sferoidi.

Abbiamo quindi:

- un campione di FB non trattati,
- un campione di FB trattati con NAPA,
- un campione di FB esposti ai raggi UVB (dose: 0.04 J/cm²) sia trattati con NAPA che non trattati con NAPA.

10 giorni dopo l'irraggiamento, abbiamo analizzato la produzione di Col I tramite immunoistochimica. Questi risultati hanno confermato che NAPA di per sé stimola la produzione di Col I, che il trattamento con i raggi UVB ne inibisce la produzione e che, nelle cellule pre-trattate con NAPA, questo svolge un ruolo protettivo nei confronti della degradazione del collagene.

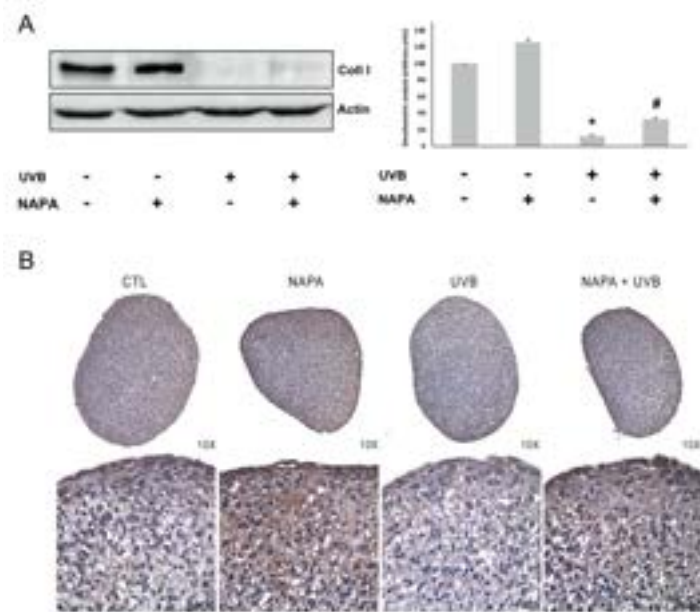


Fig. 11 Effetto di NAPA sulla produzione di Collagene I dopo l'irraggiamento con i raggi UVB in fibroblasti umani primari

NAPA STIMOLA LA RIDUZIONE DI RUGHE IN SOGGETTI TRATTATI CON UNA CREMA A BASE DELLA MOLECOLA

Sono state valutate le rughe nella zona periorbitale di due soggetti donne, prima e dopo 4 settimane di trattamento con crema base addizionata a 1% di NAPA o placebo. Dopo il trattamento, le rughe sottili, medie e profonde appaiono meno evidenti. Nella figura 12 è riportata l'immagine della profondità delle rughe della zona periorbitale, trattate con NAPA al tempo 0 (T0, prima del trattamento), e dopo 4 settimane di trattamento. Come mostrato in figura le rughe della zona periorbitale trattate con NAPA sono diminuite dal 100% all'80%, mentre quelle non trattate dal 100% al 91.4%. Questo è possibile apprezzarlo prendendo in considerazione il colore delle rughe, quelle profonde sono blu, le medie verdi e le sottili rosse. Dopo trattamento con NAPA le rughe blu diventano verdi e le rosse diventano rosso molto chiaro.

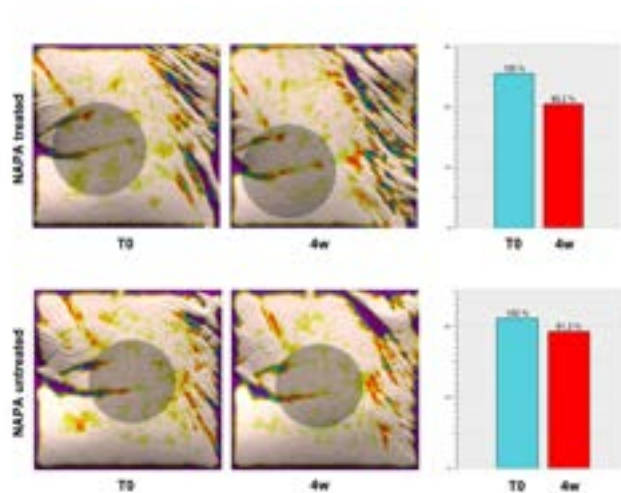


Fig. 12 Effetto dell'applicazione della crema idratante contenente l'1% di NAPA sulla zona periorbitale di una paziente donna.

CONCLUSIONI

L'invecchiamento della pelle è un fenomeno complesso che coinvolge numerosi fattori sia esterni, come l'esposizione ai raggi solari (fotoinvecchiamento) o particolari condizioni ambientali (es. inquinanti, fumo ecc.), sia intrinseci, quali la fisiologica senescenza e la predisposizione genetica. Quando la pelle invecchia perde le sue caratteristiche di tono ed elasticità, e si assiste ad una riduzione dello spessore della matrice del derma. Questa è costituita per la maggior parte da collagene di tipo I e, in proporzione minore, da collagene di tipo III, i quali formano fibre che disponendosi parallelamente alla superficie cutanea le conferiscono forza e resistenza. Il collagene viene degradato da enzimi ad azione proteolitica denominati metalloproteinasi di matrice (MMPs), in grado di rompere in modo specifico le lunghe catene proteiche che costituiscono il collagene, formando frammenti più corti e privi di proprietà meccaniche. Nella pelle giovane e non esposta ai raggi solari, la sintesi di collagene da parte dei fibroblasti e la sua degradazione da parte delle MMPs sono in costante equilibrio, in modo da

garantire il fisiologico ricambio delle macromolecole strutturali, mantenendone invariato il contenuto e la funzionalità, e conservando l'integrità della pelle. Con l'aumento dell'età e quindi con ripetute esposizioni ai fattori esterni, si verifica un progressivo sbilanciamento di tale equilibrio e si assiste ad una graduale riduzione della sintesi dei peptidi precursori del collagene, associata ad un aumento della degradazione del collagene maturo. La conseguenza di tale fenomeno degenerativo è una generale disorganizzazione delle fibre di collagene, che perdono in parte il loro ruolo di sostegno provocando una parziale atrofizzazione della matrice extracellulare, nella quale diminuisce la densità ed il tono. L'esposizione ai raggi ultravioletti, una delle cause esterne di photoaging, stimola diversi processi biochimici fra i quali la produzione in eccesso dei radicali liberi, che causano stress ossidativo. A sua volta lo stress ossidativo altera l'omeostasi dei processi intracellulari ed extracellulari, provocando danni alle biomolecole (acidi nucleici, proteine, lipidi) che modificano la funzionalità delle cellule e l'interazione con la matrice in cui si trovano. Fra le molecole alterate dallo stress ossidativo vanno annoverate le MAPK, che a loro volta stimolano processi pro-infiammatori. Tutto questo porta alla degradazione della matrice extracellulare sopra descritta. In passato nel laboratorio in cui è stata svolta la speculazione sono state studiate molecole derivanti dalla glucosammina, fra queste il NAPA, che in un sistema cellulare di condrociti umani, è stato dimostrato efficace nel contrastare sia i processi infiammatori che stimolare la sintesi di nuova matrice extracellulare. Per questo motivo si è deciso di studiare gli effetti di NAPA su fibroblasti umani, allo scopo di verificare se essa potesse avere un effetto protettivo in tale sistema sperimentale. Poiché eravamo interessati a dosaggi di UVB simili a quelli che si ottengono in seguito ad una normale esposizione al sole, abbiamo analizzato diversi dosaggi, fino a trovare un dosaggio che si può definire sub-tossico, pari a 0.04 J/cm². In queste condizioni le cellule venivano stimolate a produrre ROS, veniva attivata la MAPK ERK 1/2 e veniva stimolata la produzione di citochine e chemochine pro-infiammatori. NAPA si è mostrata in grado di contrastare questa infiammazione. Inibendo la fosforilazione di ERK 1/2, veniva spenta la risposta

infiammatoria. Anche se non confermata, la nostra ipotesi è che NAPA, inibisce la fosforilazione di alcune chinasi, interagendo direttamente con il loro sito attivo. Inoltre la stimolazione da noi usata provocava la diminuzione di Col I, già 24 ore dopo l'insulto da UVB. NAPA riusciva ad attenuare tale diminuzione sia a livello di mRNA che di proteine. Per simulare una situazione quasi fisiologica, le cellule sono state coltivate in 3D, e stimolate con UVB e trattate con NAPA. Anche in queste condizioni, la diminuzione di Col I risultava evidente e NAPA ancora una volta era in grado di attenuare tale effetto. Infine è stata utilizzata in un piccolo esperimento pilota, come crema antirughe, su due volontari. L'applicazione giornaliera per un mese, ha mostrato una leggera diminuzione delle rughe peri-oculari. Per cui possiamo concludere che la nostra molecola ha efficacia come foto-protettore e foto-riparatore, e potrebbe pertanto essere utilizzata, aggiunta in una crema base, come fattore di protezione quotidiano. La prospettiva futura è quella di condurre una sperimentazione su un numero maggiore di volontari per un periodo più lungo e con più applicazioni giornaliere. Inoltre, se la sua azione riparatrice verrà confermata sarebbe interessante provarne l'efficacia anche su piaghe da decubito e nella vulnologia più in generale.

Bibliografia

- 1- Amirlak, B., Shahabi, L., Javaheri, S., Talavera, F., & Stadelmann, W. K. (2011). *Skin anatomy*. www.emedicinemedscape.com/article/1294744-overview.
- 2- Baumann, L. (2007). Skin ageing and its treatment. *J Pathol* 2007; 211: 241–25. (www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/path.2098.
- 3- Bendre MS, Margulies AG, Walser B, Akel NS, Bhattacharya S, Skinner RA, Swain F, Ramani V, Mohammad KS, Wessner LL, Martinez A, Guise TA, Chirgwin JM, Gaddy D, Suva LJ. Tumor-derived interleukin-8 stimulates osteolysis independent of the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand pathway. *Cancer Res*, 2005. 65:11001–11009.
- 4- Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A, 2002. Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. *Journal of dairy science*. 85: 2173-179.
- 5- Bickers, David & Athar, Mohammad. (2007). Oxidative Stress in the Pathogenesis of Skin Disease. *The Journal of investigative dermatology*. 126. 2565-75. 10.1038/sj.jid.5700340.
- 6- Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Kwiecien S, Sliwowski Z, Pajdo R, Duda A, Ptak A, Hahn EG, 2003. Implications of reactive oxygen species and cytokines in gastroprotection against stress-induced gastric damage by nitric oxide releasing aspirin. *International journal of colorectal disease*. 18: 320-329
- 7- Castro-Alf rez, María & Polo-L pez, María & Fernandez-Ibanez, Pilar. (2016). Intracellular mechanisms of solar water disinfection. *Scientific Reports*. 6. 38145. 10.1038/srep38145.
- 8- Chandrasekharan, N. and Simmons, D. L. (2001) 'Protein family review The Smads', *Genome Biology*, 5(9), p. 241.
- 9- Castillo C, Hernandez J, Bravo A, Lopez-Alonso M, Pereira V, Benedito JL, 2005. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *The veterinary Journal*. 169: 286-292.
- 10- Carmelina Gemma, Jennifer Vila, Adam Bachstetter, and Paula C. Bickford. Oxidative Stress and the Aging Brain: From Theory to Prevention. 2007. *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms*. Boca Raton, chapter 15.
- 11- Daley WP, Peters SB, Larsen M. 2008. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J Cell Sci* 121: 255 –264
- 12- De Marco, F., Perluigi, M., Foppoli, C., Blarzino, C., Cini, C., Coccia, R., Venuti, A., 2007. UVB irradiation down-regulates HPV-16 RNA expression: Implications for malignant progression of transformed cells. *Virus Res*. 130, 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.06.018>
- 13- Dong, C.; Davis, R.J.; Flavell, R.A. MAP kinases in the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 2002, 20, 55–72
- 14- DRĄG-ZALESIŃSKA, M. *et al.* (2019) 'A New Betulin Derivative Stimulates the Synthesis of Collagen in Human Fibroblasts Stronger than its Precursor', *In Vivo*, 33(4), pp. 1087–1093. doi: 10.21873/invivo.11577.
- 15- Fisher, G. J. *et al.* (1999) 'Molecular Mechanisms of Photoaging in Human Skin in Vivo and Their Prevention by All-Trans Retinoic Acid', *Photochemistry and Photobiology*, 69(2), pp. 154–157. doi: 10.1111/j.1751-1097.1999.tb03268.x. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*, 40th edition.
- 16- Fulle S, Protasi F, Di Tano G, Pietrangelo T, Beltramin A, Boncompagni S, Vecchiet L, Fan  G. The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing. *Exp. Gerontol.* 2004. 39(1):17-24.
- 17- Garret R.H, [Charles M. Grisham](#) (*Biochimica*, V edizione, 2014).
- 18- GERSCHMAN R, GILBERT DL, NYE SW, DWYER P, FENN WO. Oxygen poisoning and X- irradiation - A mechanism in common. *Science*; 119, 3097 (1954) 623-626
- 19- Guzik TJ, Korbout R, Adamek-Guzik T, 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of physiology and pharmacology*. 54(4): 469-487

- 20- Hooks, J. "Cytokines, chemokines and adhesion molecules." *Manual of Clinical Immunology*, (2002): 319-375.
- 21- Hussein MR (2005). Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. *J Cutan Pathol*, 32; 191-205.
- 22- Johnson, Gary L., and Razvan Lapadat. "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases." *Science* 298.5600 (2002): 1911-1912.
- 23- Kim, E.K.; Choi, E.J. Compromised MAPK signaling in human diseases: An update. *Arch. Toxicol.* 2015, 89, 867–882.
- 24- Kimura T, Iwase M, Kondo G, Watanabe H, Ohashi M, Ito D, Nagumo M, 2003. Suppressive effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on cytokine release in human neutrophils. *International immunopharmacology*. 3: 1519-1528.
- 25- Kovacs KJ c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int* 33: 287,1998
- 26- Kyoo-Ri Kwon, Md Badrul Alam, Ji-Hyun Park, Tae-Ho Kim, Sang-Han Lee, 2019. Attenuation of UVB-Induced Photo-Aging by Polyphenolic-Rich *Spatholobus Suberectus* Stem Extract Via Modulation of MAPK/AP-1/MMPs Signaling in Human Keratinocytes. *Nutrients*;11(6). pii: E1341. doi: 10.3390/nu11061341.
- 27- Le basi dell'immunologia; fisiopatologia del sistema immunitario, Abul K. Abbas, IV ed.
- 28- Liao, Z. *et al.* (2019) 'Angiopoietin-like protein 8 expression and association with extracellular matrix metabolism and inflammation during intervertebral disc degeneration', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(8), pp. 5737–5750. doi: 10.1111/jcmm.14488.
- 29- Liu, Y. and Shanley, T. P. (2009) 'Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and septic shock', *Journal of Organ Dysfunction*, 5(2), pp. 66–78. doi: 10.1080/17471060701200444.
- 30- Li, Xuechang, Tao, Y. and Li, Xuezhong (2015) 'Expression of MMP-9/TIMP-2 in nasal polyps and its functional implications', *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(11), pp. 14556–14561.
- 31- Medzhitov R. (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* Jul 24;454(7203):428-35. doi: 10.1038/nature07201.
- 32- Natsuga, K. (2014) 'Epidermal barriers', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(4), pp. 1–18. doi: 10.1101/cshperspect.a018218.
- 33- Nissinen, L. and Kähäri, V. (2014) 'Biochimica et Biophysica Acta Matrix metalloproteinases in inflammation ☆', 1840, pp. 2571–2580. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.03.007.
- 34- Palungwachira, P. *et al.* (2019) 'Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Anthocyanins Extracted from *Oryza sativa* L. in Primary Dermal Fibroblasts', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, pp. 1–18. doi: 10.1155/2019/2089817.
- 35- Parks, W. C., Wilson, C. L. and López-Boado, Y. S. (2004) 'Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity', *Nature Reviews Immunology*, 4(8), pp. 617–629. doi: 10.1038/nri1418.
- 36- Poon, F., Kang, S. and Chien, A. L. (2015) 'Mechanisms and treatments of photoaging', *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*, 31(2), pp. 65–74. doi: 10.1111/phpp.12145.
- 37- Recherche, C. De *et al.* (2015) '1,2,3', doi: 10.1111/exd.12874.
- 38- Rosenkranz, A.R., Schmaldienst, S., Stuhlmeier, K.M., Chen, W., Knapp, W., and
- 39- Zlabinger, G.J. (1992). A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate. *J Immunol Methods*. 156, 39-45.
- 40- Savoia, P. *et al.* (2019) 'Targeting the ERK signaling pathway in melanoma', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), pp. 1–37. doi: 10.3390/ijms20061483.
- 41- Scotto d'Abusco, A., Calamia, V., Cicione, C., Grigolo, B., Politi, L., & Scandurra, R. (2007a). Glucosamine affects intracellular signalling through inhibition of mitogen-activated protein kinase phosphorylation in human chondrocytes.

- 42- Scotto d'Abusco, A., Cicione, C., Calamia, V., Negri, R., Giordano, C., Grigolo, B., Politi, L. Scandurra, R., 2007b. Glucosamine and its N-acetyl-phenylalanine derivative prevent TNF- α - induced transcriptional activation in human chondrocytes. *Clin. Exp. Rheumatol.* 25, 847–852.
- 43- Scotto d'Abusco, A., Politi, L., Giordano, C., & Scandurra, R. (2010). A peptidyl-glucosamine derivative affects IKK α kinase activity in human chondrocytes. *Arthritis Research and Therapy*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/ar2920>.
- 44- Sen, R., & Baltimore, D. (1986). Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90807-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90807-X)
- 45- Segre, J. A. (2006) 'Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders', *Journal of Clinical Investigation*, 116(5), pp. 1150–1158. doi: 10.1172/JCI28521.
- 46- Seehra, J. S. (1997) 'Cause Bone Loss or a Change in the Rate of Remodeling', *The EMBO Journal*, 16(5), pp. 989–997.
- 47- Sies H, 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free radical biology and medicine.* 27: 916-921.
- 48- Shin, J. W. *et al.* (2019) 'Molecular mechanisms of dermal aging and antiaging approaches', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9). doi: 10.3390/ijms20092126.
- 49- Sun, Z., Park, S.Y., Hwang, E., Zhang, M., Jin, F., Zhang, B., Yi, T.H., 2015. Salvianolic Acid B Protects Normal Human Dermal Fibroblasts Against Ultraviolet B Irradiation-Induced Photoaging Through Mitogen-Activated Protein Kinase and Activator Protein-1 Pathways. *Photochem. Photobiol.* 91, 879–886. <https://doi.org/10.1111/php.12427>
- 50- Tada, D. B. and Baptista, M. S. (2015) 'Photosensitizing nanoparticles and the modulation of ROS generation', *Frontiers in Chemistry*, 3(May), pp. 1–14. doi: 10.3389/fchem.2015.00033.
- 51- Taga, T. *et al.* (1992) Functional inhibition of hematopoietic and neurotrophic cytokines by blocking the interleukin 6 signal transducer gp130. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89, 10998–11001.
- 52- Taga T, Kishimoto T. gp130 and the interleukin-6 family of cytokines, *Annu. Rev. Immunol.* 15 (1997) 797–819
- 53- Taglietti, V., Casella, C., 2006. *Principi di fisiologia volume I*, La Goliardica Pavese.
- 54- Tanabe, T. and Tohno, N. (2002) 'Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression', *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 68–69, pp. 95–114. doi: 10.1016/S0090-6980(02)00024-2
- 55- Theocharis A.D, Skandalis S.S, Gialeli C, Karamanos N.K. (2016). Extracellular matrix structure. *Feb 1;97:4-27.* doi: 10.1016/j.addr.2015.11.001. *Avd Drug Deliv Rev.*
- 56- Valavanidis, A., Vlachogianni, T. and Fiotakis, K. (2009) 'Tobacco smoke: Involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(2), pp. 445–462. doi: 10.3390/ijerph6020445.
- 57- Valko, M, Rhodes, CJ, Moncol. J, Izanovic, M, Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *10;160(1):1-40.* Epub 2006 Jan 23.
- 58- Van Straaten, F Muller, R Curran, T Van Beveren, C Verma; Complete nucleotide sequence of a human c- onc gene: deduced amino acid sequence of the human c-fos protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3183-3187, 1983.
- 59- Vandercappellen, Jo, Jo Van Damme, and Sofie Struyf. "The role of CXC chemokines and their receptors in cancer." *Cancer letters* 267.2 (2008): 226-244.
- 60- *Fondamenti di biochimica* Donald Voet, Judith G. Voet, Charlotte W. Pratt, S. Belgeri, M. Chicca, 2007.
- 61- William Somers *et al.*, *EMBO J.*, 1.9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling 16:989, 1997
- 62- Zhang, K. *et al.* (2019) 'Mechanical loading mediates human nucleus pulposus cell viability and extracellular matrix metabolism by activating of NF- κ B', *Experimental and Therapeutic Medicine*, pp. 1587–1594. doi: 10.3892/etm.2019.7744.

FLUORESCENCE ADVANCED VIDEODERMOSCOPY (FAV): UNA NUOVA METODICA DIAGNOSTICA NON INVASIVA IN TRICOLOGIA A CONFRONTO CON LE TECNICHE GOLD STANDARD

INDICE

- Introduzione	p.112
- Tecniche diagnostiche non invasive in ambito tricologico	p.113
- Dermoscopia e Tricoscopia del cuoio capelluto	p.113
- FAV	p.115
- Scopo della speculazione	p.124
- Materiali e metodi	p.124
- Risultati	p.128
- Cuoio capelluto normale	p.128
- Lesioni cutanee del cuoio capelluto	p.137
- Lesioni dell'ostio follicolare	p.146
- Lesioni del fusto del capello	p.158
- Discussione	p.165
- Conclusioni	p.168
- Bibliografia	

INTRODUZIONE

In campo dermatologico, la tecnica diagnostica non invasiva per eccellenza è rappresentata dalla dermatoscopia. Tale metodica, essendo avvantaggiata dalla non invasività e rapidità di esecuzione, è ben tollerata e accettata. Ciò risulta inoltre estremamente utile soprattutto per specifiche tipologie di pazienti, come ad esempio quelli pediatrici. La videodermatoscopia è ad oggi il gold standard tra le metodiche diagnostiche non invasive ed ha permesso una notevole riduzione di quei casi in cui era necessario ricorrere a tecniche invasive come la biopsia cutanea per l'esecuzione dell'esame istologico. Nei decenni, sono stati descritti e delineati numerosi markers dermoscopic ben precisi e definiti per la diagnosi delle lesioni cutanee, sia pigmentate che non pigmentate. Tale metodica è estremamente utile e ampiamente utilizzata anche a livello del cuoio capelluto, ove prende il nome di tricoscopia. Difatti, in questa sede anatomica, l'esecuzione di esami invasivi come la biopsia può risultare particolarmente fastidiosa e dolorosa e, quindi, spesso non accettata dal paziente. Inoltre, bisogna considerare che i campioni biotipici del cuoio capelluto spesso risultano troppo superficiali, poiché incisioni più profonde possono causare sanguinamenti profusi, data la ricca vascolarizzazione di tale area anatomica. Di conseguenza, metodiche non invasive come la tricoscopia, rappresentano un'alternativa eccellente per lo studio delle patologie del cuoio capelluto. Come per il resto della superficie cutanea, anche a livello dello scalpo sono stati descritti e codificati numerosi markers tricoscopic di patologia, i quali hanno ampiamente facilitato le possibilità diagnostiche delle alopecie cicatriziali e non cicatriziali. Inoltre, la tricoscopia, così come la dermatoscopia in senso più ampio, non è utile solamente per rendere agevole la diagnosi delle patologie cutanee, ma anche per potersi orientare sulla più corretta scelta terapeutica, personalizzandola in base ai criteri dermoscopic osservati in quella determinata fase di malattia. Infine, tale tecnica non invasiva può essere estremamente efficace anche per il follow-up clinico-strumentale di pazienti sottoposti a trattamenti specifici. Data l'utilità e dato l'impiego diffuso delle tecniche diagnostiche non invasive in ambito dermatologico, negli ultimi anni, a fianco alla videodermatoscopia, sono state sviluppate e proposte ulteriori metodiche diagnostiche non invasive in grado di aggiungere informazioni ancor più dettagliate rispetto a quelle ottenibili con l'impiego della dermatoscopia, al fine di incrementare le possibilità diagnostiche della dermatoscopia e di ridurre ulteriormente la necessità

di ricorrere ad esami invasivi come la biopsia cutanea. Le tecniche non invasive che sono state sviluppate e maggiormente studiate negli anni sono la microscopia confocale (RCM) e la tomografia ottica computerizzata (OCT). Recentemente è stato sviluppato un ulteriore strumento non invasivo per la valutazione della cute, ossia la Fluorescence Advanced Videodermoscopy (FAV). Tale tecnica, attualmente poco descritta in Letteratura, permette una valutazione non invasiva e microscopica della cute in vivo e in real time, con una risoluzione d'immagine che si avvicina all'incirca a quella osservabile in un'immagine istologica. La FAV potrebbe rappresentare una valida alternativa alle altre metodiche diagnostiche non invasive attualmente studiate e un valido strumento da affiancare alla dermoscopia, in grado di aggiungere informazioni ancora più dettagliate a quelle già ottenibili attraverso la valutazione dermoscopica. Obiettivo è stato quello di eseguire uno studio morfo-funzionale delle lesioni elementari della cute del cuoio capelluto e dei capelli mediante l'impiego di questa nuova metodica non invasiva, al fine di individuare markers microscopici specifici delle principali lesioni in corso di patologie del cuoio capelluto, nonché di mettere a confronto i pattern microscopici evidenziati tramite FAV con gli aspetti tricoscopici ben codificati e osservati in tricoscopia, valutandone pertanto le potenzialità.

TECNICHE DIAGNOSTICHE NON INVASIVE IN AMBITO TRICOLOGICO

Dermoscopia e Tricoscopia del cuoio capelluto

La dermoscopia è una tecnica semplice, indolore e non invasiva utilizzata da decenni in ambito dermatologico per l'osservazione in vivo della cute, mediante la quale è possibile visualizzare strutture, pattern e colori delle lesioni cutanee altrimenti non visibili ad occhio nudo. Tale sistema ottico utilizza una lente di ingrandimento, illuminata con luce incidente LED (tra 3500 e 4500 K) in grado di permettere l'osservazione di strutture morfologiche cutanee altrimenti non visibili ad occhio nudo. Negli anni sono stati descritti e codificati numerosi pattern dermoscopici specifici, i quali hanno agevolato enormemente le possibilità diagnostiche delle principali patologie cutanee, specialmente per quanto riguarda la diagnosi precoce di melanoma e dei non melanoma skin cancers (NSMC), e più in generale delle lesioni pigmentarie e non pigmentarie della cute nonché delle dermatosi infiammatorie. Con il termine tricoscopia ci si riferisce alla valutazione dermoscopica del capello e della cute del cuoio capelluto. Come già menzionato per la dermoscopia in generale, anche la tricoscopia è una tecnica diagnostica

semplice, riproducibile, non invasiva, indolore, rapida e largamente utilizzata nella pratica clinica poiché in grado di facilitare la diagnosi e il follow-up terapeutico delle diverse patologie del cuoio capelluto (Panchaprateep et al., 2015). Oltre alla dermatoscopia e tricoscopia manuali, tale tecnica può articolarsi nella videodermatoscopia e videotricoscopia, le quali sono supportate da sistemi digitali che permettono l'acquisizione di immagini ad alto ingrandimento (Figura 5).



Figura 5. Work-station Ambulatorio Tricologico

La tricoscopia è ampiamente utilizzata ed estremamente utile al fine di agevolare le possibilità diagnostiche delle principali patologie del cuoio capelluto. Difatti, in tale sede anatomica, l'esecuzione di esami invasivi come la biopsia cutanea può risultare particolarmente fastidiosa e dolorosa e di conseguenza spesso non è tollerata dal paziente. Inoltre, spesso i campioni bioptici del cuoio capelluto risultano troppo superficiali e quindi inadeguati, dal momento che incisioni più profonde possono causare sanguinamenti profusi, in considerazione della ricca vascolarizzazione di tale sede. Di conseguenza, metodiche non invasive come la tricoscopia rappresentano un'alternativa eccellente per lo studio delle patologie del cuoio capelluto. Come per il resto della superficie cutanea, anche in tale sede sono stati descritti e codificati numerosi pattern tricoscopici, i quali possono essere suddivisi in tre categorie:

- *lesioni cutanee del cuoio capelluto*
- *lesioni a livello dell'ostio follicolare*
- *lesioni a livello del fusto del capello*

Fluorescence-Advanced Videodermatology (FAV)

La dermatoscopia è attualmente lo strumento diagnostico non invasivo più utilizzato per la diagnosi in vivo delle lesioni cutanee pigmentate, caratterizzato da una sensibilità del 18% in più rispetto all'esame eseguito a occhio nudo nell'individuazione precoce dei tumori cutanei.

Da diversi anni si è diffusa anche l'RCM, strumento non invasivo, attualmente considerato la metodica complementare alla dermatoscopia più importante, utile per la valutazione di lesioni melanocitarie, non melanoma skin cancers (NMSC) e patologie infiammatorie. Tuttavia, a causa degli alti costi dello strumento e della necessità di un periodo di training intenso, tale metodica non è molto diffusa (Scarfi et al., 2019). Negli ultimi anni è stata sviluppata e proposta un nuovo strumento videodermoscopico chiamato *Fluorescence Advanced-Videodermatology* (FAV) per l'esame cutaneo in vivo in real time ad alta risoluzione (Figura 24). Tale tecnica di imaging permette un esame rapido, non invasivo e dinamico delle strutture cutanee superficiali, con risoluzione a livello cellulare.



Figura 24: *Fluorescence Advanced-Videodermatology (FAV)*

La FAV è un sistema ottico-elettronico costituito da una sonda palmare (HORUS1000VMF) in grado di emettere una fonte di luce monocromatica, caratterizzata da un λ di 405 nm (± 5 nm) e con angolo fisso di incidenza (Sanlorenzo et al., 2017). Lo strumento ottico della FAV ha una capacità di ingrandimento di 12 volte e presenta un focus manuale applicabile su strati sequenziali, ciascuno con una profondità di 35/50 μm . Il campo di visione è di 340 μm . Il dispositivo di accoppiamento di carica ha sensori di immagini ad alta sensibilità ($>50\%$ per $\lambda=400-810$ nm), alto frame rate (1 frame/8.33 ms) e un sistema di controllo automatico con

firmware dedicato. La lente di contatto ha un indice di rifrazione di $n=1.53$ e un τ_{UVA} dell'84%. La risoluzione ottica è di $1 \mu\text{m}$ (Sanlorenzo et al., 2017). In generale, la FAV si basa sulla capacità di alcune molecole endogene (cromofori come ad esempio i citocromi e l'emoglobina) di assorbire specifiche lunghezze d'onda ed emettere a loro volta fluorescenza. L'esame è eseguito in vivo e il device ottico (la sonda) è applicato direttamente sulla cute. Regolando la messa a fuoco del device, si possono scansionare livelli diversi di profondità della cute. Le immagini vengono quindi visualizzate su uno schermo in real-time, con una scala di grigi basata sul livello di assorbimento delle lunghezze d'onda. Il colore nero corrisponde all'assenza di fluorescenza, mentre il colore bianco corrisponde ad un alto grado di emissione di fluorescenza. Per evitare dispersione di energia provocata dallo strato corneo, sulla superficie cutanea viene applicato un gel contenente glicerolo.

In condizioni normali, la capacità di penetrazione del raggio luminoso varia da 200 a $400 \mu\text{m}$, permettendo così la visualizzazione delle strutture cutanee fino a quelle presenti al di sotto del derma papillare. Grazie alla FAV è possibile visualizzare in più scansioni trasversali i diversi strati dell'epidermide e il derma superficiale, in particolare lo strato corneo, lo strato granuloso e spinoso, lo strato basale intorno alle papille dermiche, il derma papillare più in profondità e parte del derma reticolare. Come descritto in letteratura, nella cute normale, a livello dello **strato corneo**, la FAV (senza applicazione di gel contenente glicerolo) permette la visualizzazione dei bordi brillanti dei singoli corneociti piatti ed anucleati di forma esagonale (Figura 25).



Figura 25: immagine FAV senza applicazione di gel: strato corneo

Subito al di sotto dello strato corneo si osservano lo **strato granuloso** e lo **strato spinoso**, caratterizzati da cellule il cui citoplasma appare bianco, mentre gli scudi perinucleari di melanina appaiono neri. Lo strato granuloso si trova ad una

profondità di 10- 20 μm dalla superficie cutanea ed ha uno spessore variabile da 1-3 cellule fino a 5-7 cellule in sedi ipercheratizzate. È costituito da cheratinociti poligonali, con citoplasma bianco e grandi nuclei ovalari, bordi demarcati e strutturalmente disposti in un pattern a nido d'ape (*honeycomb pattern*). Il sottostante strato spinoso è formato da cheratinociti con nuclei più piccoli, situato a circa 20-100 μm di profondità a partire dalla superficie cutanea. Anche in questo caso i cheratinociti hanno citoplasma bianco, bordi ben demarcati e sono disposti in un pattern a nido d'ape.

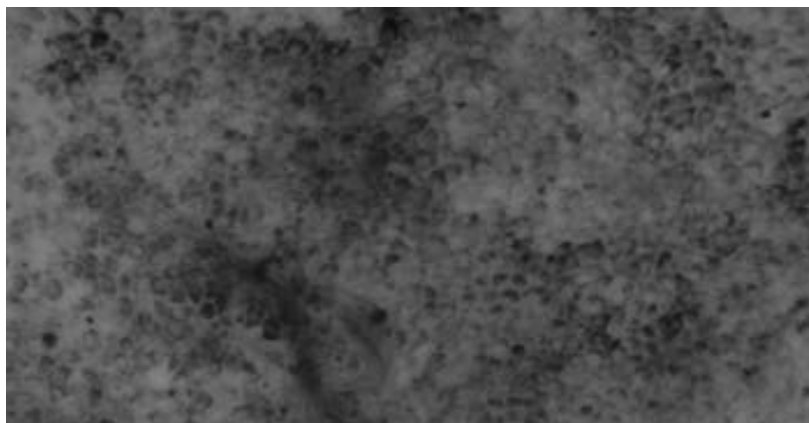


Figura 26: strato spinoso con aspetto a nido d'ape

Aggiustando la messa a fuoco del device e procedendo più in profondità nella cute, si possono visualizzare delle strutture corrispondenti allo **strato basale** e alle proiezioni intraepidermiche del **derma superficiale papillare**. Istologicamente, lo strato basale corrisponde ad un singolo strato di cellule cheratinocitarie fittamente stipate tra loro e di forma parallelepipedi, situato a 40-130 μm di profondità dalla superficie cutanea e dal profilo ondulato per l'alternanza di creste epidermiche e papille dermiche. I cheratinociti dello strato basale sono omogenei per forma e dimensione (circa 7-12 μm) e intervallati con rapporto 1:10 ai melanociti, piccole cellule rotondeggianti o stellate. I cheratinociti in attiva proliferazione contengono spesso melanina sopra nucleare. Per quanto riguarda il derma papillare, questo, istologicamente, è formato dalla papilla dermica e dal sottile strato di derma interposto tra la base delle creste interpapillari e il plesso vascolare superficiale. È composto da una fine rete di collagene, elastina, fibroblasti, vasi sanguigni e linfatici, terminazioni nervose e cellule infiammatorie situata approssimativamente ad una profondità di 50-150 μm dalla superficie cutanea. Alla FAV, le cime delle papille dermiche appaiono come proiezioni rotondeggianti di colorito più chiaro rispetto all'epidermide e circondate da un anello di cellule rotondeggianti più o

meno pigmentate, corrispondenti ai cheratinociti basali (Figura 27). L'anello di cheratinociti basali che circonda le papille dermiche ha un colorito più o meno scuro a seconda del fototipo del paziente (Scarfi et al., 2019). Andando più in profondità con la sonda della FAV, si possono osservare a livello delle singole papille dermiche i loop capillari, sia da un punto di vista morfologico che funzionale (Figura 28).

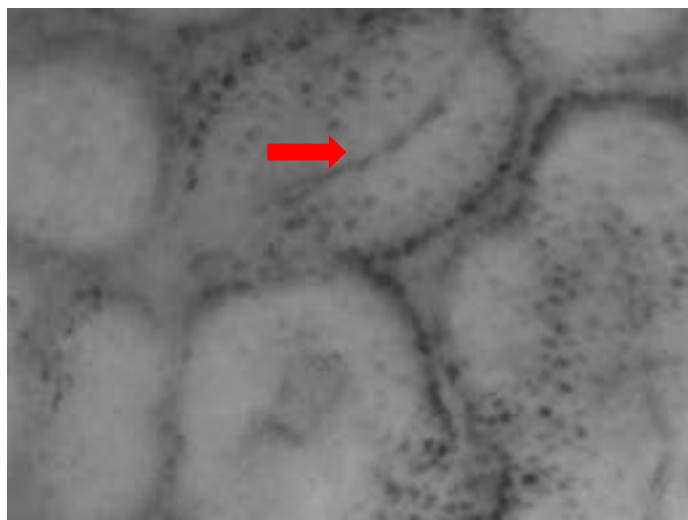


Figura 27: proiezioni superficiali delle papille dermiche circondate da cellule rotondeggianti corrispondenti ai cheratinociti basali. Nel riquadro blu è contenuta una singola papilla dermica; centralmente è parzialmente visibile il loop capillare della papilla (freccia)

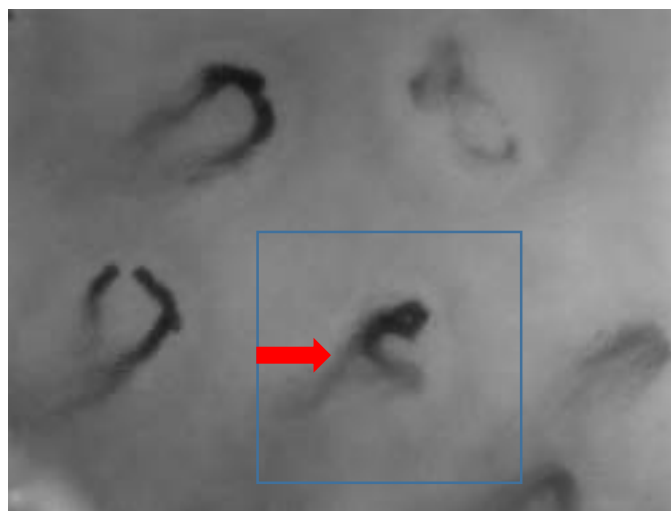


Figura 28: porzione più profonda delle papille dermiche (riquadro). Non si apprezzano più i cheratinociti basali e il loop capillare è ora più evidenti (freccia)

La FAV è uno strumento particolarmente indicato per lo studio di strutture contenenti emoglobina, essendo quest'ultima la più importante molecola cromofora presente nel sangue. I vasi possono essere visualizzati con buona risoluzione e appaiono come strutture lineari e scure, di forma ed andamento variabile, nel cui contesto sono apprezzabili i singoli eritrociti (Figura 29). Con la FAV è possibile

osservare il flusso sanguigno dei vasi in real-time, con i singoli eritrociti in movimento all'interno dei vasi. Ciò permette quindi uno studio della vascolarizzazione cutanea non solo a livello morfologico, ma anche funzionale.

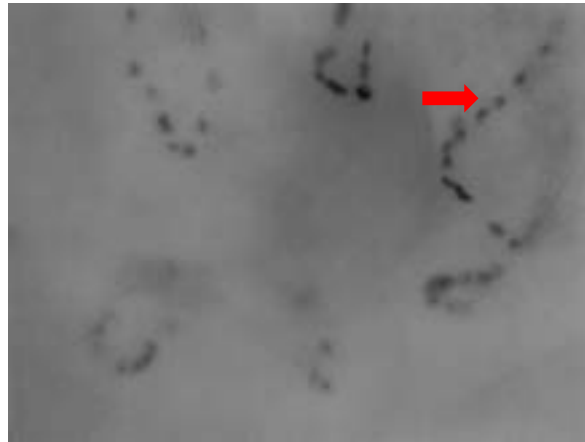


Figura 29: vasi di aspetto reticolare, con dettaglio eritrocitario (freccia)

La FAV, ancora poco diffusa come tecnica, è stata introdotta negli ultimi tre anni per lo studio di diverse patologie cutanee. Attualmente, in letteratura, sono presenti solamente sei articoli inerenti l'utilizzo di tale metodica a livello della cute. La FAV è stata adoperata per la prima volta da Sanlorenzo et al. nel 2017, i quali hanno eseguito uno studio morfologico descrittivo della cute, individuando e descrivendo le caratteristiche microscopiche visibili a livello dei diversi strati cutanei (Sanlorenzo et al., 2017). Dopodiché, la FAV è stata impiegata per l'osservazione e il follow up di diverse patologie cutanee. Nel 2019, Scarfi et al. (Scarfi et al, 2019) hanno adoperato la FAV per descrivere e caratterizzare microscopicamente le lesioni pigmentate cutanee, al fine di individuare criteri microscopici di benignità e malignità. In una serie di 6 lesioni pigmentarie melanocitarie piane, che includeva 3 melanomi e 3 nevi melanocitari, gli autori hanno descritto i pattern microscopici osservati con la FAV. Nel loro studio, la FAV ha permesso la corretta caratterizzazione delle 6 lesioni melanocitarie indagate, permettendo la distinzione microscopica di tali lesioni in maligne e benigne. Nella lesione pigmentata benigna, la FAV mostrava la presenza di cellule iperpigmentate di forma regolare e arrangiate in uno strato piano, come solitamente riscontrato nell'honeycomb pattern dello strato spinoso. Nel melanoma, invece, la FAV mostrava cellule pleomorfe, con importanti atipie in numero, forma e dimensioni, senza ordine strutturale; tale pattern non permetteva la distinzione tra strutture dello strato corneo e dello strato spinoso. Nel loro articolo, gli autori concludono dunque che la FAV potrebbe rappresentare una

nuova metodica non invasiva utile per lo studio a risoluzione cellulare delle lesioni melanocitarie pigmentate (Scarfi et al, 2019).

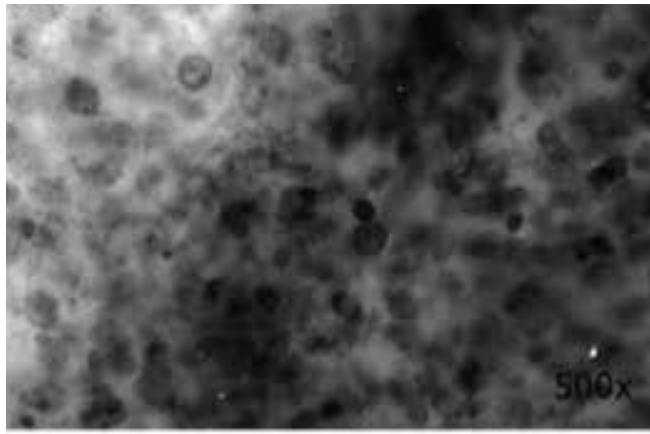


Figura 28: immagine tratta dall'articolo di Scarfi et al. (2019): nel melanoma, la FAV mostrava cellule pleomorfe, con importanti atipie in numero, forma e dimensioni, senza ordine strutturale

In un altro studio di Cinotti et al. (Cinotti et al. 2019), la FAV è stata adoperata ed è risultata utile per l'inquadramento microscopico di due casi di melanoma amelanotico e ipomelanotico. Nei due casi descritti, la tecnica mostrava vasi irregolari e polimorfi all'interno di papille dermiche di forma irregolare, circonscritte da cheratinociti basali pigmentati. La FAV mostrava inoltre cellule scure di forma, dimensioni e pigmentazione eterogenee, corrispondenti ai melanociti maligni. I cheratinociti basali e i melanociti maligni osservati alla FAV risultavano strutturalmente molto simili a quelli visibili con la RCM, con la differenza però che in FAV la melanina e l'emoglobina appaiono scure, mentre alla RCM appaiono brillanti (Figure 29 e 30) (Cinotti et al., 2019).

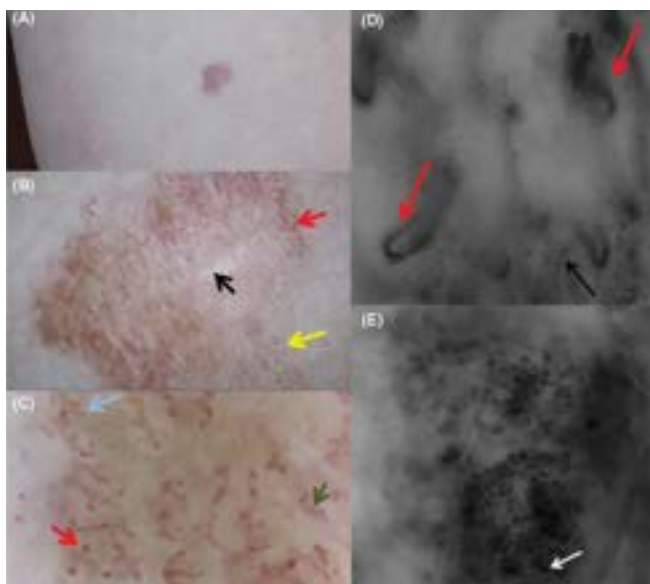


Figura 29: tratta dall'articolo di Cinotti et al (2019): aspetto clinico (a), dermoscopic 30x (b) e 150x (c) e alla FAV (d-e) di un melanoma ipomelanotico. Alla videodermoscopia 30x si evidenziano vasi puntiformi e lineari su un background roseo con fini strie biancastre. A un ingrandimento 150x (c) si osservano vasi glomerulari, vasi a forcina e vasi a caturacciolo. La FAV mostra vasi irregolari dentro papille irregolari circondate da cellule grigiastre corrispondenti a cheratinociti basali pigmentati e cellule irregolari in forma e dimensioni corrispondenti ai melanociti maligni.

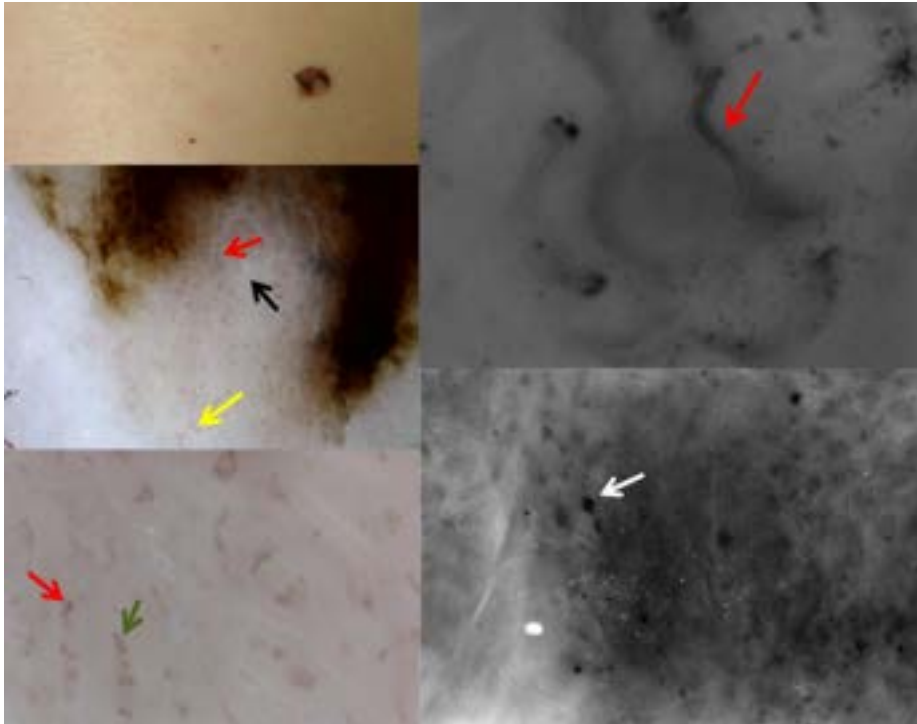


Figura 30 tratta dall'articolo di Cinotti et al: aspetto clinico (a), dermoscopic 30x (b) e 150x (c) e FAV (d-e) di un melanoma pigmentato con aree ipomelanotiche. La videodermoscopia 30x (a) mostrava vasi puntiformi e lineari su un background roseo e con strie biancastre (freccia nera). L'ingrandimento 150x (c) mostrava vasi glomerulari e a caturacciolo. La FAV mostrava vasi irregolari e cellule pigmentate irregolari in forma e dimensioni) corrispondenti ai melanociti maligni.

Scarfi et al. hanno impiegato la FAV per il follow up terapeutico della vitiligine (Scarfi et al, 2019). Gli autori hanno indagato mediante dermatoscopia e FAV sei pazienti con vitiligine non segmentale in fase attiva. Tutti e sei i pazienti stavano eseguendo un trattamento fototerapico con UVB a banda stretta, con parziale repigmentazione cutanea. Innanzitutto gli autori, partendo dal presupposto che la FAV permette una buona osservazione della morfologia e della distribuzione delle cellule pigmentate, hanno esaminato la cute sana dei loro pazienti con vitiligine. Nello specifico, hanno studiato l'aspetto della cute normale in pazienti con fototipo II e III, che erano i due tipi di fototipo più comuni del loro campione. Gli autori hanno osservato che più il fototipo è scuro, più il cluster di cellule basali che circonda le papille dermiche appare pigmentato. Dopo due mesi di terapia, utilizzando la FAV a livello delle lesioni vitiligoidee repigmentate si evidenziava la presenza di una proliferazione di cellule pigmentate situate alla giunzione dermo-

epidermica e che circondava le papille dermiche (Figura 31). Gli autori non hanno osservato differenze nel quantitativo di pigmento in base al fototipo del paziente. Inoltre hanno visto che l'area stabile, centrale, non pigmentata (acromica) della lesione vitiligioidea era priva di cellule pigmentate. Questo dato ovviamente rifletteva il riscontro istopatologico di una perdita completa di pigmentazione epidermica e l'assenza di melanociti a livello basale. Nelle lesioni vitiligioidee esaminate alla FAV, gli eritrociti presenti all'interno dei capillari dermici erano le uniche strutture visibili. Al contrario, la cute non lesionale presentava papille dermiche con loops di capillari al centro circondati da clusters di cellule pigmentate nello strato basale, tutti regolari in forma e distribuzione (Scarfi et al., 2019).

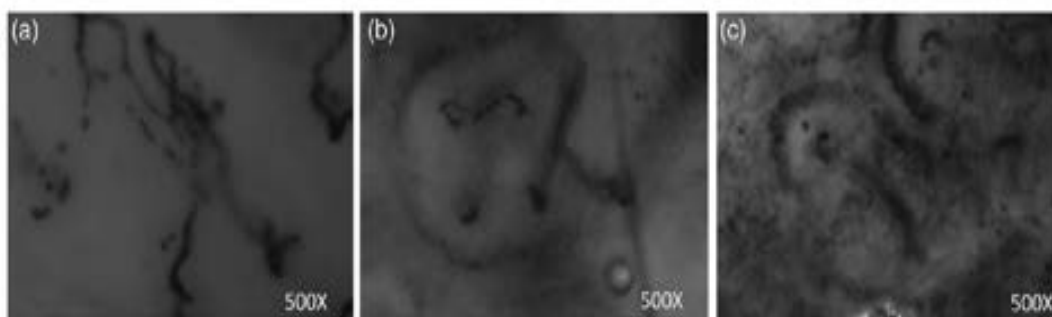


Figura 31: tratta dall'articolo di Cinotti et al. (2019): FAV 500x a) capillari dermici come unica struttura visibile nella lesione vitiligioidea; b) area di cute repigmentata dopo terapia, con proliferazione di cellule pigmentate alla giunzione dermo-epidermica; c) cute sana del paziente che mostra papille dermiche normali circondate da cluster di cellule pigmentate basali

Tra le utilità della FAV, si ha anche la possibilità di impiegare quest'ultima per la visualizzazione diretta di patogeni in corso di infezioni cutanee, come la demodicosi, la scabbia, la larva migrans (Sanlorenzo et al., 2017; Fernandez-Nieto et al., 2020), nonché la trombiculosi (Ramondetta et al., 2020) (Figura 32).

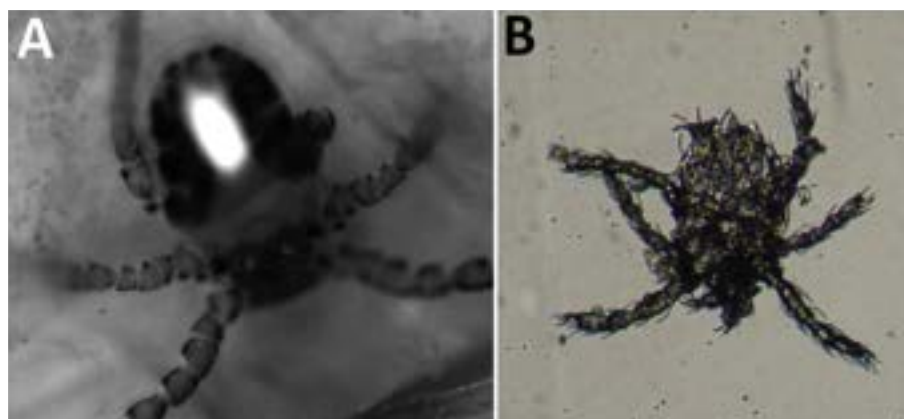


Figura 32: tratta dall'articolo di Ramondetta et al.(2020): immagini di acaro della famiglia Trombiculidae in una donna di 48 anni. A) Immagine FAV 500x che mostra il corpo ovale

dell'acaro con tre paia di zampe; B) Immagine al microscopio ottico 100x dell'acaro, prelevato mediante raschiatura di una delle lesioni cutanee

Ovviamente, essendo la FAV una buona metodica per la valutazione dei vasi e del flusso sanguigno, tale tecnica può essere utile per l'osservazione di lesioni vascolari, come ad esempio gli angiomi superficiali. In quest'ultimi osserveremo vasi sanguigni dilatati e tortuosi, separati da linee biancastre corrispondenti a fasci di collagene, come descritto da Sanlorenzo et al. (Sanlorenzo et al., 2017) (Figura 33). Tali autori hanno anche descritto l'aspetto dei follicoli piliferi alla FAV, i quali appaiono come strutture rotondeggianti demarcate da margini chiari brillanti, ripieni di materiale scuro nel lume e con il fusto del pelo che invece appare chiaro (Sanlorenzo et al., 2017) (Figura 33).

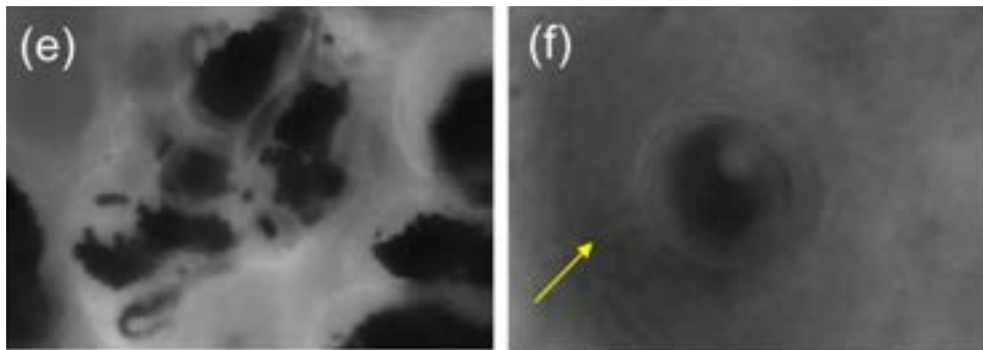


Figura 33: immagine tratta dall'articolo di Sanlorenzo et al (2017).: e) angioma; f) follicolo pilifero (la freccia indica il fusto)

Attualmente non sono presenti in Letteratura studi che abbiano applicato questa nuova metodica diagnostica non invasiva a livello del cuoio capelluto.

SCOPO DELLO STUDIO

Obiettivo dello studio è stato quello di identificare e di descrivere con la nuova metodica diagnostica non invasiva Fluorescence Advanced Videodermatoscopy (FAV) le principali lesioni elementari osservabili a livello della cute del cuoio capelluto, degli osti follicolari e dei capelli, al fine di descrivere microscopicamente quanto già osservabile attraverso l'impiego della tricoscopia ed eseguire uno studio comparativo tra le due tecniche diagnostiche non invasive.

MATERIALI E METODI

In una prima fase abbiamo arruolato 90 soggetti sani, privi di patologie del cuoio capelluto (56 di sesso femminile e 34 di sesso maschile) al fine di individuare e descrivere l'aspetto del cuoio capelluto normale, fino ad ora mai descritto con la nuova tecnica FAV. In una seconda fase sono stati reclutati 53 pazienti affetti dalle principali patologie alopeciche cicatriziali e non cicatriziali del cuoio capelluto e visitati da novembre 2019 a ottobre 2020 presso l'Ambulatorio di Tricologia della Clinica Dermatologica, Università La Sapienza di Roma, Policlinico Umberto I, Roma. I 53 pazienti arruolati includevano 16 soggetti di sesso maschile e 37 di sesso femminile. Criteri di inclusione e di esclusione per l'arruolamento sono riportati in Tabella 1.

Criteri di inclusione:

- Sesso maschile e femminile
- Assenza di patologie del cuoio capelluto (gruppo sani) oppure diagnosi clinica e tricoscopica e/o istologica di patologie alopeciche cicatriziali e non cicatriziali
- Assenza di terapia specifica in atto al momento della visita
- Riscontro di tipiche lesioni elementari alla dermoscopia

Criteri di esclusione:

- Terapia specifica in atto al momento della visita

I 53 pazienti arruolati erano affetti dalle seguenti patologie:

- 5 pazienti con Alopecia Fibrosante Frontale (AFF)
- 8 pazienti con Lichen Plano Pilare (LPP)
- 6 pazienti con Follicolite Decalvante (FD)
- 10 pazienti con Alopecia Androgenetica (AGA) maschile e femminile
- 4 pazienti con Lupus Eritematoso Discoide (LED)
- 3 pazienti con Alopecia Indotta da Chemioterapici (CIA)
- 1 paziente con Tricotillomania
- 9 pazienti con Alopecia Areata (AA)
- 2 pazienti con Fibrosing Alopecia
- 2 paziente con Alopecia Cicatriziale di ndd
- 3 pazienti con psoriasi del cuoio capelluto

Nei pazienti arruolati in cui non era già presente una pregressa diagnosi istologica mediante biopsia cutanea, la diagnosi di tali patologie è stata posta sulla base della valutazione clinica del paziente in associazione all'esame tricoscopico effettuato con dermoscopia digitale. Per ciascun paziente arruolato abbiamo eseguito una valutazione clinica, una valutazione dermoscopica e infine una valutazione microscopica mediante Fluorescence Advanced Videodermatology (FAV). La valutazione dermoscopica è stata eseguita con lo strumento FotoFinder medicam 1000. La valutazione FAV è stata condotta con lo strumento Horus, modello HS600. Per ciascun paziente arruolato, abbiamo raccolto le immagini macroscopiche e tricoscopiche con lo strumento FotoFinder, in maniera sistematica a livello della regione frontale e del vertice. Lo strumento utilizzato per la raccolta delle immagini era posizionato sul braccio rotante di un device costituito anche da una struttura specifica dedicata al posizionamento della testa (Canfield Scientific), permettendo così una collezione di fotografie standardizzate (Figura 34).



Figura 34: *Dispositivo Canfield Scientific (sx) e telecamera del FotoFinder medicam*

In caso di lesioni alopeciche localizzate limitatamente ad altre regioni del cuoio capelluto, per esempio a livello parietale od occipitale, le immagini macro- e tricoscopiche sono state raccolte senza impiego del device Canfield Scientific, ma mantenendo il paziente in posizione seduta, posizionando la telecamera lungo una linea parallela alla regione cutanea e scattando la fotografia a 1 metro di distanza. In caso di riscontro di lesioni elementari tricoscopiche a livello delle aree del cuoio capelluto sistematicamente indagate, le medesime aree, includenti le lesioni elementari, sono state valutate in FAV con lo strumento Horus HS600, mediante posizionamento della sonda direttamente sull'area cutanea e previa applicazione di un gel a base di glicerolo. Le immagini ottenute sono state visualizzate in real time sullo schermo del dispositivo Horus e raccolte (Figura 35).



Figura 35: FAV Horus HS600 (sx) e sonda dello strumento (dx)

Nel gruppo di 90 sani (privi di patologie del cuoio capelluto), abbiamo raccolto 300 immagini in FAV per valutare e descrivere l'aspetto normale della cute del cuoio capelluto (strati epidermici e derma papillare), dell'ostio follicolare e del fusto del capello. Nel gruppo di 53 pazienti, un totale di 389 immagini tricoscopiche e FAV delle lesioni elementari del cuoio capelluto sono state valutate e raccolte.

Le lesioni tricoscopiche individuate ed analizzate sono state così suddivise:

- **Lesioni cutanee del cuoio capelluto:**

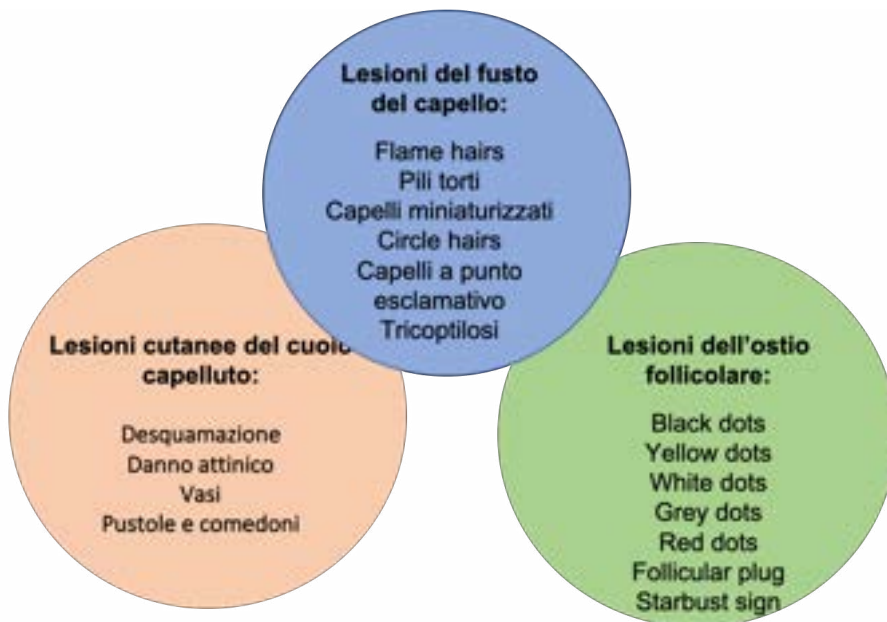
- Desquamazione / ipercheratosi perifollicolare (n°46 immagini)
- Pattern vascolare (n°43)
- Danno attinico (n°15)
- Pustole e comedoni (n°5)

- **Lesioni a livello dell'ostio follicolare:**

- Black dots (n° 53)
- Yellow dots (n° 71)
- White dots (n° 17)
- Grey dots (n° 8)
- Red dots (n°1)
- Follicular plug (n°16)
- Starbust sign (n°1)

- **Lesioni del fusto del capello:**

- Flame hairs (n° 8)
- Pili torti (n° 11)
- Capelli miniaturizzati (n° 65)
- Circle hairs (n° 9)
- Capelli a punto esclamativo (n° 9)
- Tricoptilosi (n° 11)



RISULTATI

1. Cute del cuoio capelluto e capelli nel soggetto sano

Per riconoscere le lesioni elementari e le caratteristiche dei processi patologici così come appaiono in FAV è essenziale conoscere prima l'aspetto del cuoio capelluto normale. Nel gruppo di 90 individui sani, da noi arruolato al fine di identificare il profilo microscopico del cuoio capelluto normale, abbiamo raccolto con la FAV un totale di 300 immagini della cute interfollicolare, dell'ostio follicolare e del fusto del capello. A livello della *cute interfollicolare del cuoio capelluto*, grazie alla FAV abbiamo potuto osservare le caratteristiche microscopiche ed architetturali dei diversi strati epidermici (strato corneo, granuloso, spinoso, basale) e del derma papillare (Tabella 2). Lo *strato corneo* è formato da cheratinociti appiattiti, anucleati, disposti a circa 0-15 μm di profondità dalla superficie cutanea. Alla FAV, lo strato corneo era più visibile posizionando la sonda dello strumento senza applicazione di gel a base di glicerolo sulla superficie cutanea. Nei 90 soggetti sani, lo strato corneo del cuoio capelluto si presentava come una superficie ad indice di rifrazione variabile. I corneociti erano ben visibili come strutture di forma poligonale e colorito grigiastro, circoscritti esternamente da avvallamenti scuri di forma pseudo-losangica. Si osservavano variabili strutture altamente riflettenti, di colorito bianco brillante, corrispondenti alla cheratina superficiale (Figure 36-38).

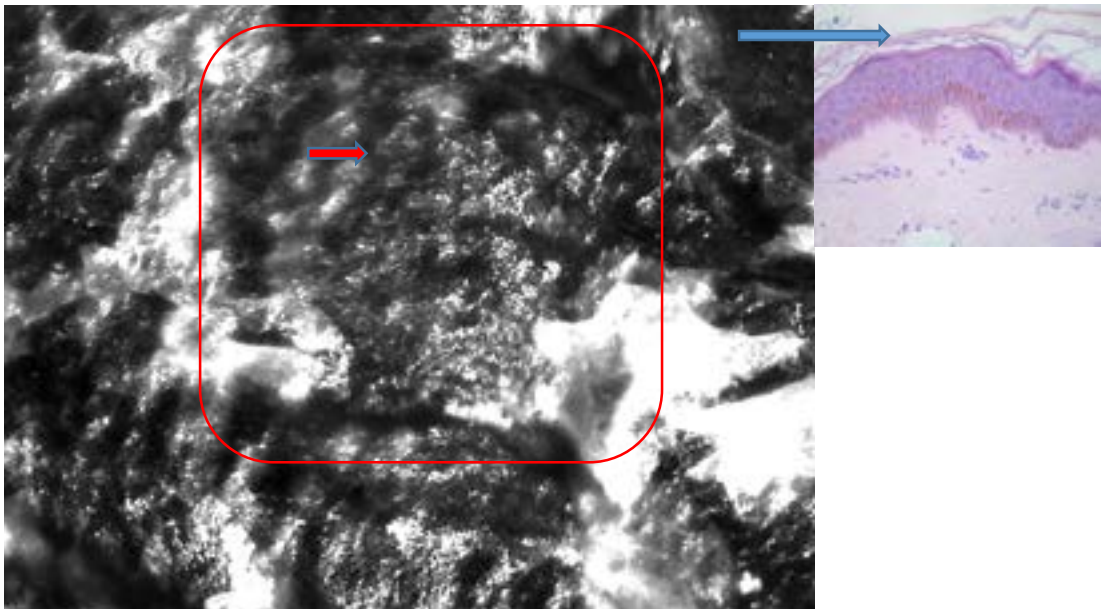


Figura 36: strato corneo con cellule cornee ben evidenti (freccia) e circondate da avvallamenti cutanei scuri di forma pseudo-losangica (riquadro)

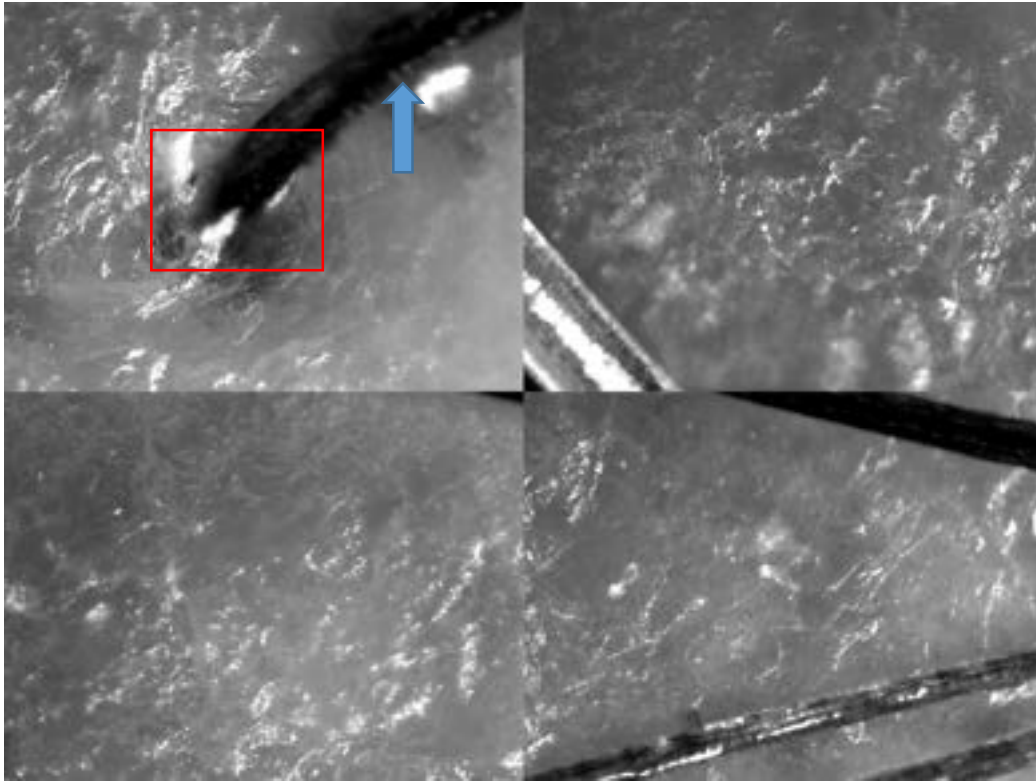


Figura 37: immagini FAI 500x di strato corneo del cuoio capelluto normale senza sovrapposizione di gel. Si osserva l'aspetto brillante e altamente riflettente della cheratina superficiale. Freccia: capello; riquadro: ostio follicolare.

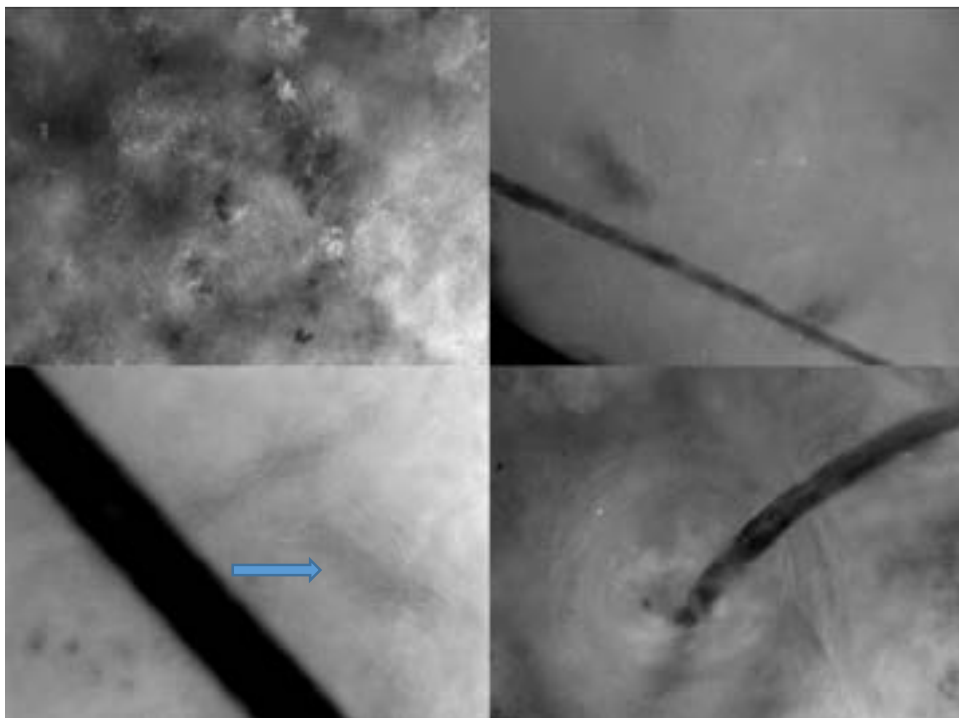


Figura 38: immagine FAI 500x di strato corneo in un soggetto sano, con applicazione di gel. Lo strato corneo è meno visibile, si intravede il profilo ondulato di corneociti desquamanti (freccia).

Modificando la messa a fuoco del device, abbiamo identificato le caratteristiche microscopiche presenti più in profondità, a livello epidermico subcorneo (Figura 39

e 40). Nei nostri individui sani, lo strato epidermico subcorneo (*strato granuloso e spinoso*) della cute del cuoio capelluto presentava cellule cheratinocitarie di forma poligonale, fittamente stipate tra loro, di colorito grigio più o meno scuro, le quali in alcuni punti si configuravano con il tipico aspetto a nido d'ape (o honeycomb pattern) già descritto a livello della cute di altre sedi corporee. La componente melanica intracheratinocitaria determinava il colorito grigio più scuro della cellula.

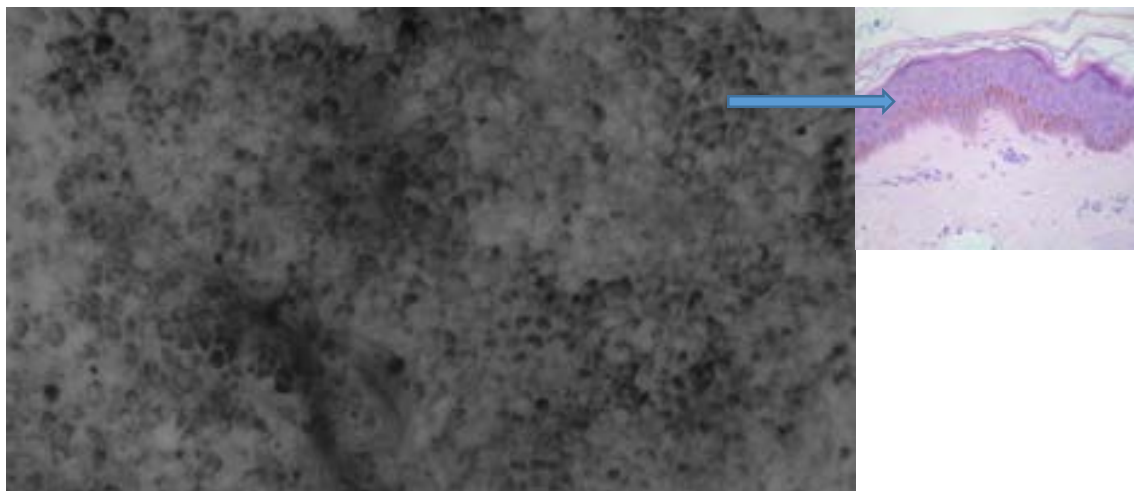


Figura 39: cellule poligonali fittamente stipate tra loro, configuranti un pattern a nido d'ape; i citoplasmici appaiono chiari mentre gli scudi di melanina perinucleari sono scuri

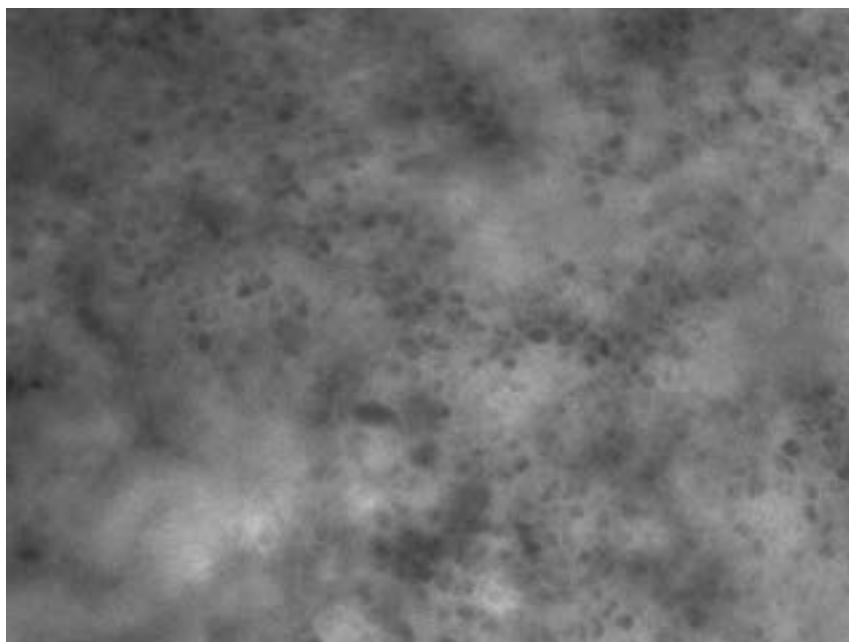


Figura 40: strato spinoso con aspetto a nido d'ape

Ancora più in profondità abbiamo osservato lo *strato basale dell'epidermide insieme alla porzione più superficiale del derma papillare*. In questa sezione abbiamo identificato delle strutture rotondeggianti, di colorito grigio chiaro, coincidenti con le proiezioni delle papille dermiche in sezione trasversale. Tali formazioni

rotondeggianti erano circoscritte omogeneamente da cellule rotondeggianti e pigmentate, corrispondenti alle cellule cheratinocitarie dello strato basale, con aspetto più o meno scuro in base al quantitativo melanico intracitoplasmatico. Gli spazi interpapillari risultavano invece scarsamente popolati (Figura 40, 41).

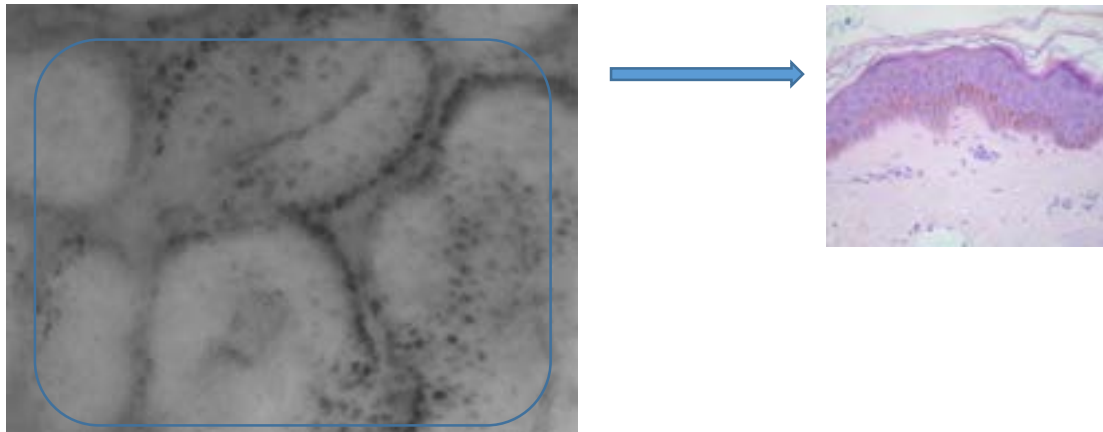


Figura 40: papille dermiche rotondeggianti chiare, circondate da cheratinociti basali di forma rotondeggianti e più o meno scuri; nel riquadro: singola papilla dermica

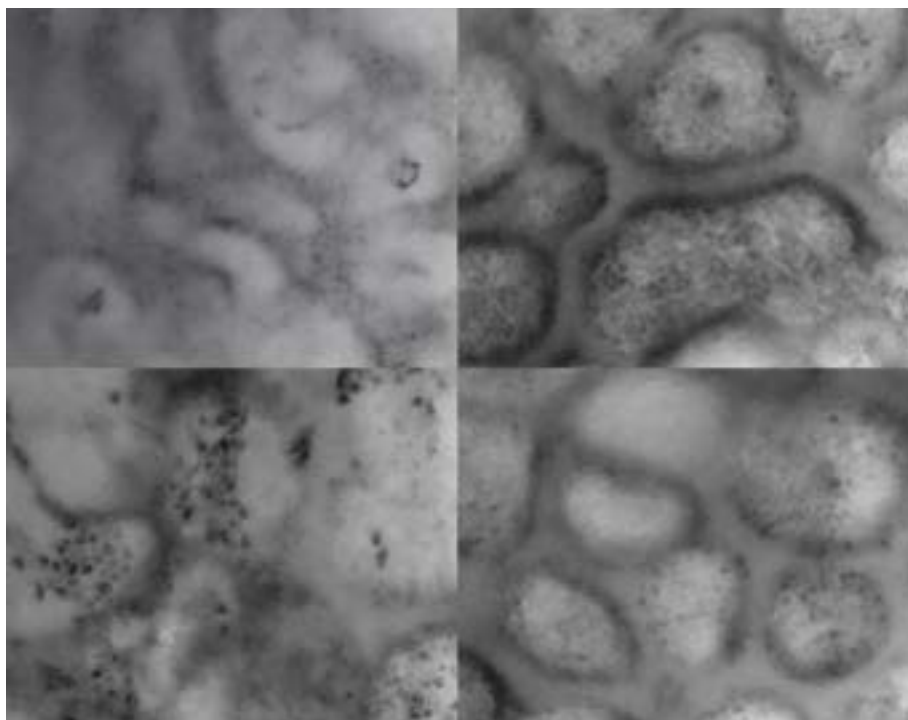


Figura 41: immagini FAV 500x di papille dermiche di individui sani; il colorito più o meno scuro del profilo rotondeggiante delle papille dipende dall'intensità della pigmentazione dei cheratinociti basali e quindi dal fototipo del soggetto

Regolando ulteriormente la messa a fuoco del device, abbiamo osservato ancora più in profondità il derma papillare. A questo livello più profondo della papilla, i cheratinociti basali che circondano le singole papille non erano più visibili, mentre

si rendevano ben evidenti i loops capillari presenti all'interno delle singole papille dermiche, con dettaglio cellulare, eritrocitario (Figura 42) e possibilità di osservare il flusso di eritrociti all'interno dei vasi in real time.

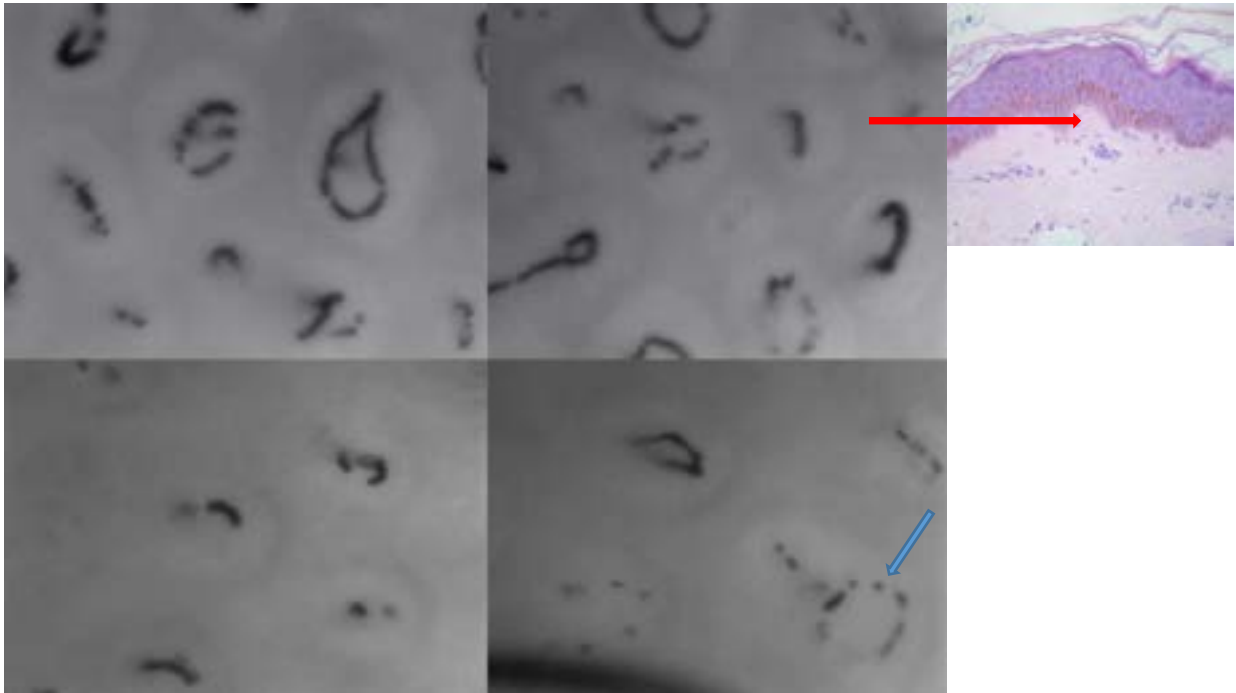


Figura 42: immagini FAV (500x) di papille dermiche di individui sani. A questo livello di profondità della papilla (freccia) lo strato di cheratinociti basali che circonda le singole papille non è più visibile, mentre i loop capillari si rendono ben evidenti, con dettaglio eritrocitario (freccia).

Nei 90 soggetti sani del campione, oltre all'aspetto della cute del cuoio capelluto, abbiamo analizzato anche le caratteristiche presenti a livello dell'ostio follicolare e del capello normale. L'ostio follicolare dell'individuo sano si presentava come una struttura rotondeggiante di colorito grigio scuro, occupata centralmente dal fusto del pelo. Tutt'intorno era ben individuabile l'epitelio follicolare delimitante l'ostio, grigio chiaro, pluristratificato e di forma tondeggiate, formato da cellule cheratinocitarie (Figura 43).

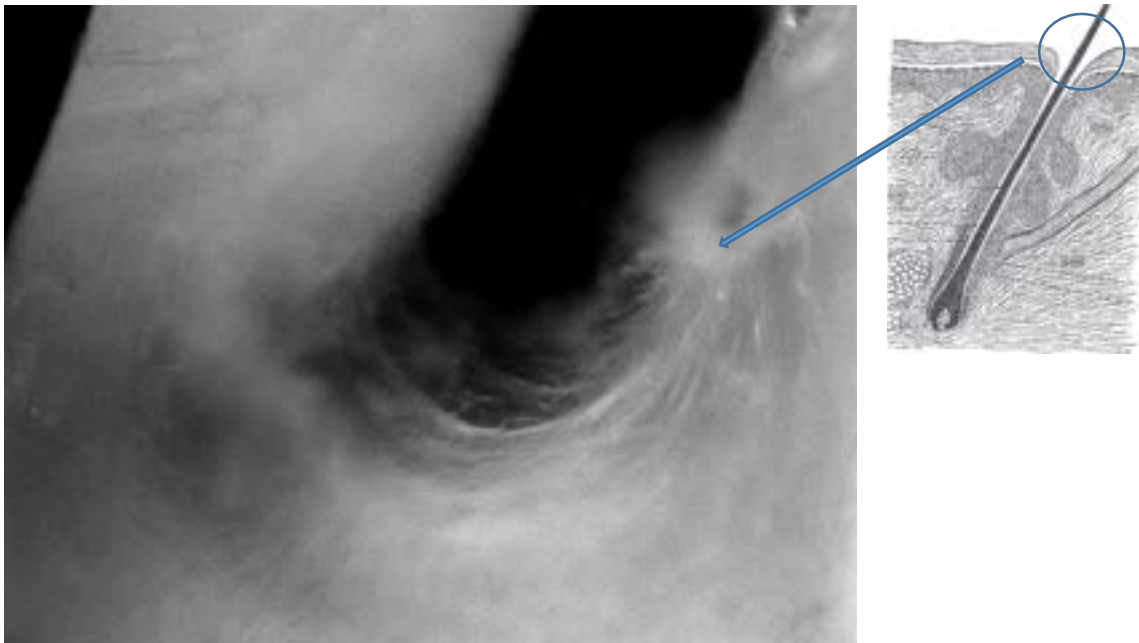


Figura 43: *acrotrichio, visibile come formazione rotondeggiante pluristratificata intorno al fusto del pelo*

Alla FAV, i capelli terminali dei soggetti sani apparivano come strutture cilindriche di lunghezza variabile, acellulate, scure e ben pigmentate: la midollare a livello centrale appariva di struttura filiforme e di colorito bianco e brillante, mentre la componente corticale e cuticolare risultavano intensamente scure (Figura 44). Superficialmente, a livello della cuticola, le cellule cuticolari si rendevano ben evidenti, mostrandosi imbricate tra loro con una tipica disposizione in scaglie, simile alle immagini ottenibili in microscopia elettronica (Figura 45, 46, 47).

I capelli intermedi dei soggetti sani apparivano come strutture cilindriche di calibro ridotto, di colorito grigio mazzato, dovuto alla presenza di cluster di melanociti scuri disomogeneamente distribuiti a livello della corticale; la midollare bianca centrale era sempre visibile ma di forma più grossolana.

Nel capello vello-like, di calibro e lunghezza ancor più ridotti, la componente pigmentata scura in chiazze determinata dai melanociti poteva essere del tutto assente, a dimostrazione di una totale depigmentazione del fusto (Figura 48).

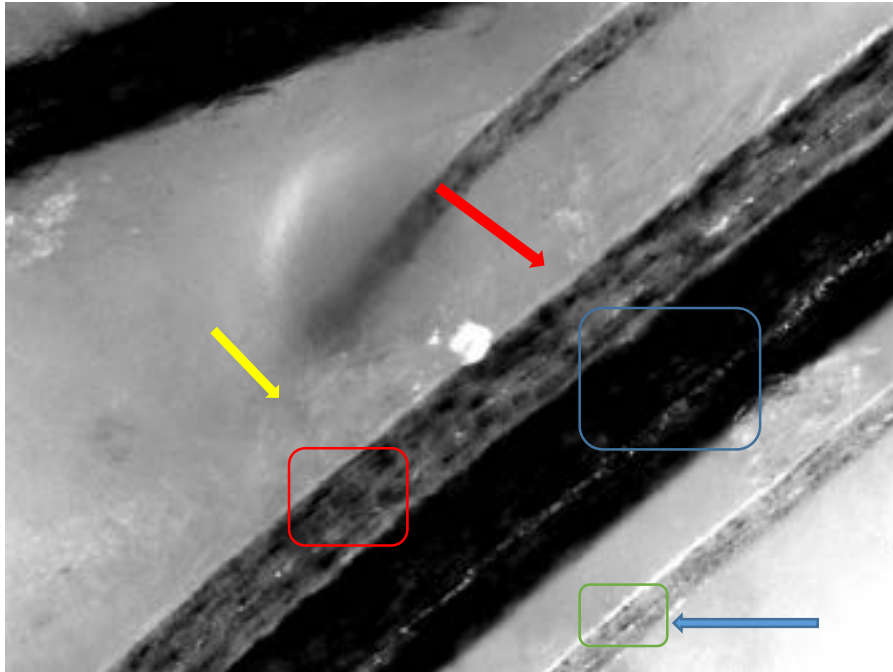


Figura 44: capello terminale scuro, ben pigmentato, con midollare centrale di struttura filiforme e colorito bianco brillante. Subito dietro è presente un capello intermedio depigmentato, con midollare centrale bianco brillante grossolana e clusters melanocitari scuri di pigmentazione a livello corticale; in basso a destra, capello vello depigmentato con ampie aree di cellule midollari, rare cellule corticali, cuticola conservata.

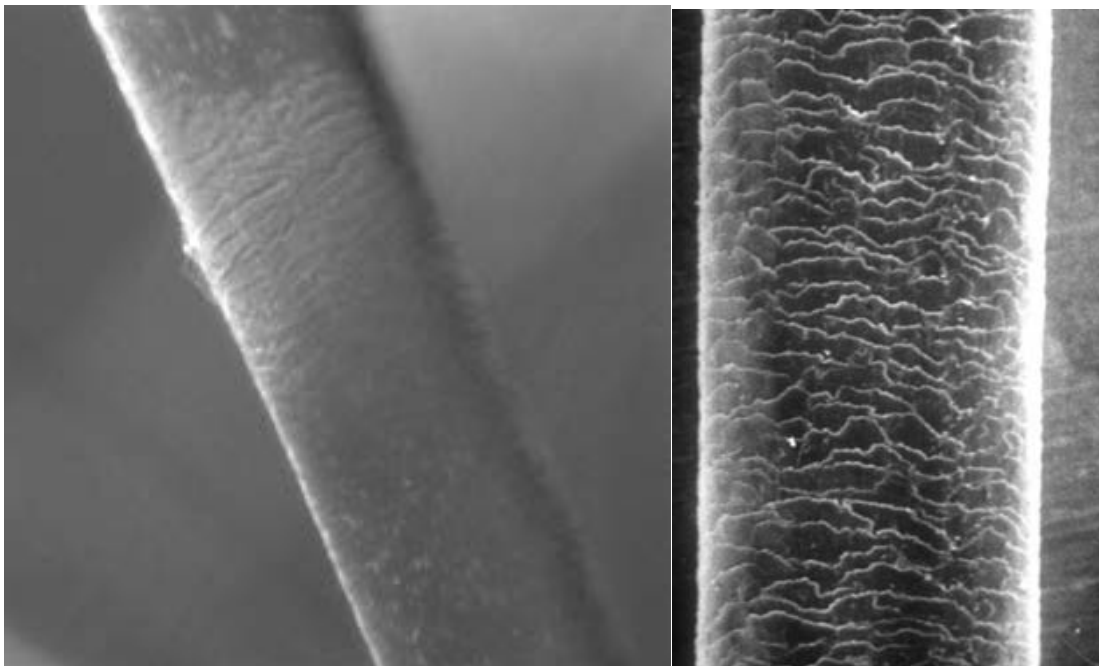


Figura 45: confronto tra il fusto del capello alla FAV (sx) e alla microscopia elettronica a scansione (dx)

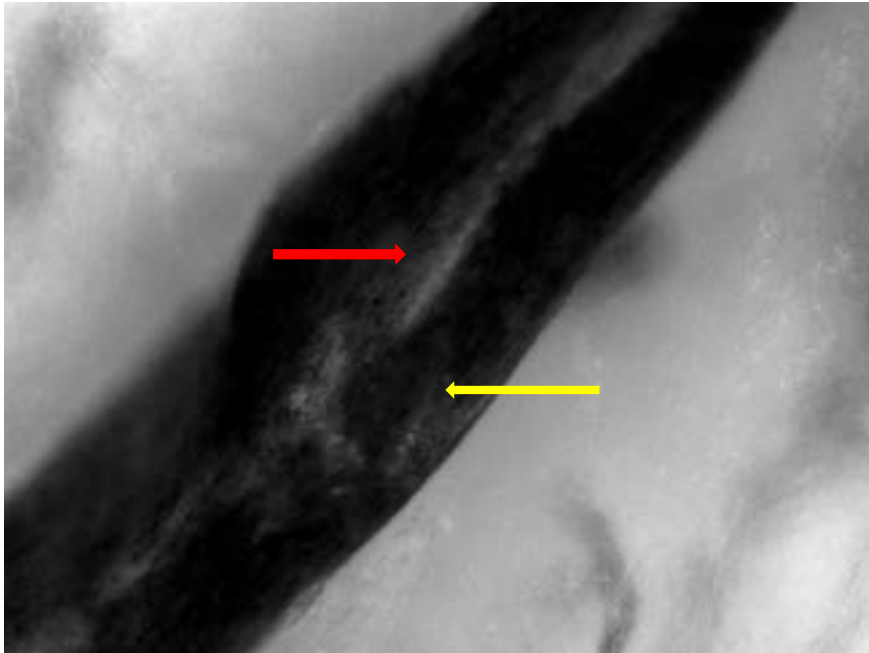


Figura 46: fusto di capello terminale normale con midollare centrale biancastra e fibrille intrecciate a livello corticale.



Figura 47: fusto del capello in cui le cellule cuticolari sono ben evidenti, brillanti e imbricate tra loro (freccia)

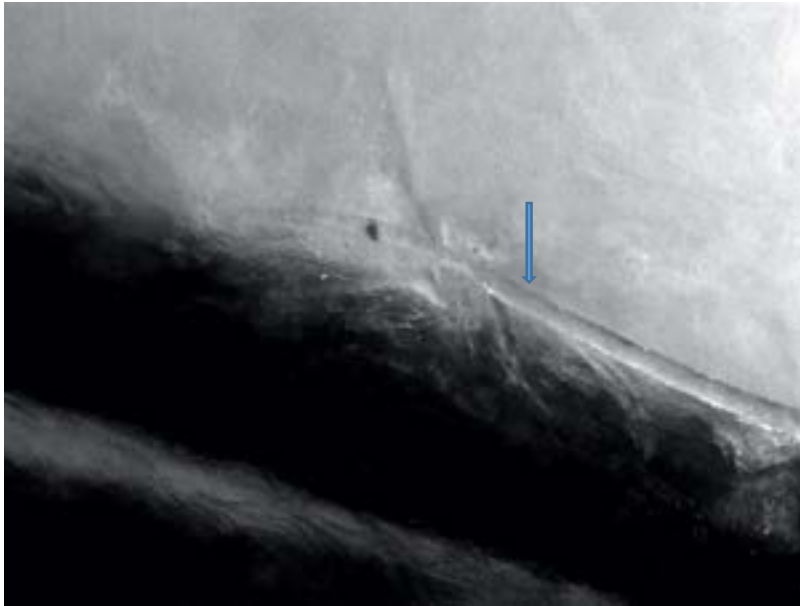


Figura 48: capello terminale ben pigmentato e pelo-vello sottile, chiaro e depigmentato (freccia)

Nella cute del cuoio capelluto sano erano ben evidenti anche i pori sudoripari, ossia gli sbocchi epidermici degli acrosiringi delle ghiandole sudoripare eccrine. Tali strutture si presentavano di colorito grigio chiaro, di dimensioni inferiori rispetto a quella dei follicoli piliferi e di forma rotondeggiante o elicoidale (Figura 49).

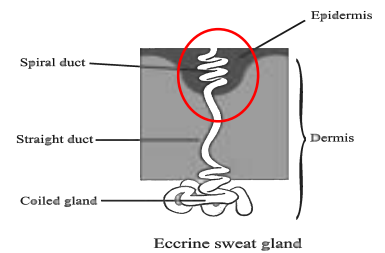
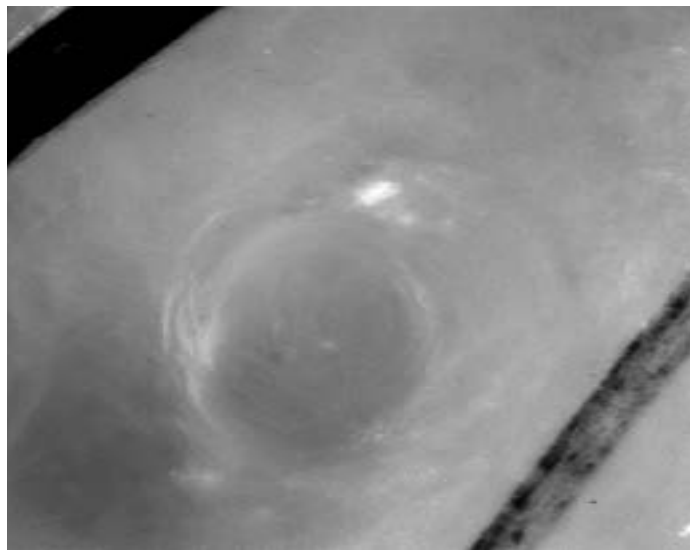


Figura 49: sbocco di ghiandola sudoripara eccrina

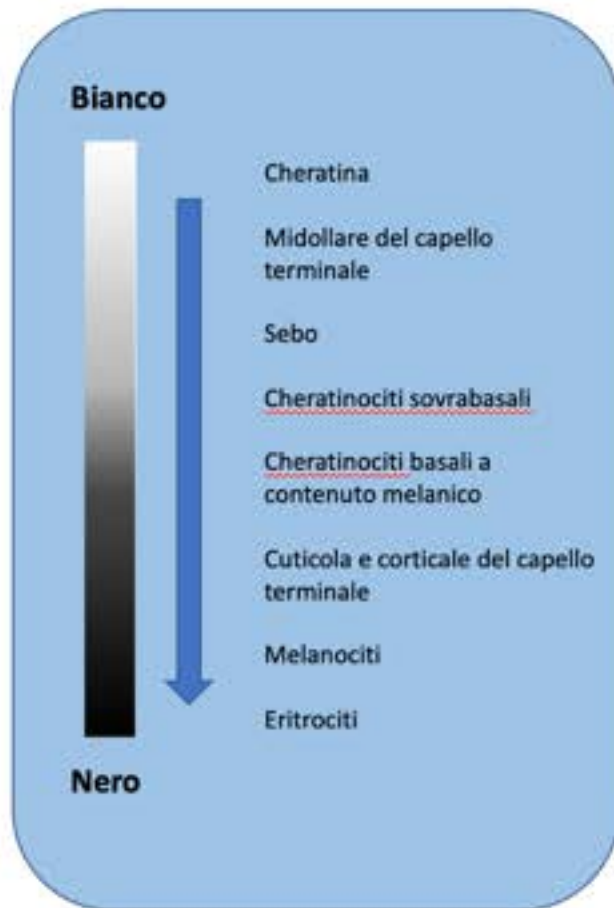


Tabella 2: colorazione delle principali strutture osservabili in FAV a livello del cuoio capelluto sano

Lesioni cutanee del cuoio capelluto

Nel campione di 53 soggetti arruolati nello studio, abbiamo individuato prima tricoscopicamente e poi in FAV le lesioni elementari della cute del cuoio capelluto. Tali lesioni corrispondevano a:

- *Desquamazione e ipercheratosi*
- *Danno attinico*
- *Pattern vascolare*
- *Pustole e comedoni*

Desquamazione e ipercheratosi

46 immagini di squame e ipercheratosi perifollicolare sono state raccolte tricoscopicamente e mediante FAV in 10 pazienti affetti da LPP, psoriasi e LED.

Alla FAV, le squame erano ben visibili e si presentavano come strutture irregolari, di forma variabile e di colorito bianco brillante, solamente utilizzando la sonda senza interposizione di gel a base di glicerolo. L'applicazione del gel, invece, necessaria per valutare gli strati cutanei profondi, non permetteva una buona visualizzazione delle squame. Queste ultime, bagnate dal gel, diventavano infatti meno riflettenti

e dunque meno visibili. L'ipercheratosi perifollicolare e l'ipercheratosi a manicotto a livello del fusto risultavano invece più visibili anche con la sovrapposizione del gel, grazie al contrasto della cheratina biancastra rispetto alla pigmentazione scura nerastra del fusto del capello (Figure 50-57).

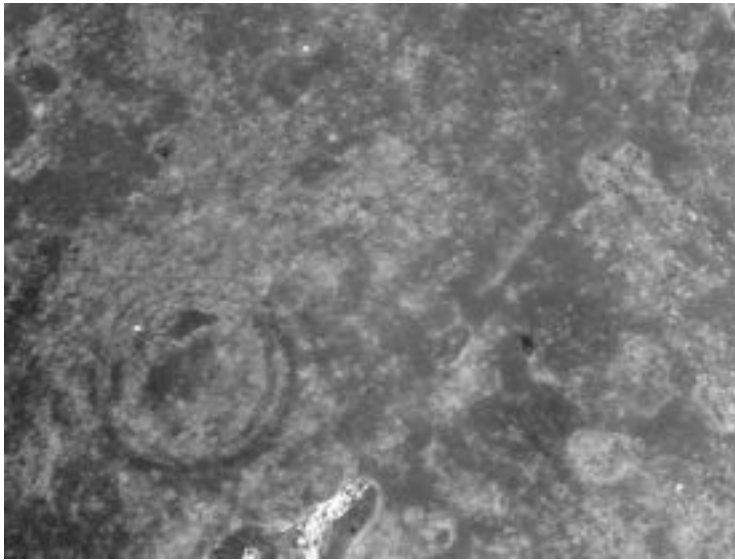


Figura 50: estesa desquamazione di colorito chiaro in pz con psoriasi, visibile senza applicazione del gel

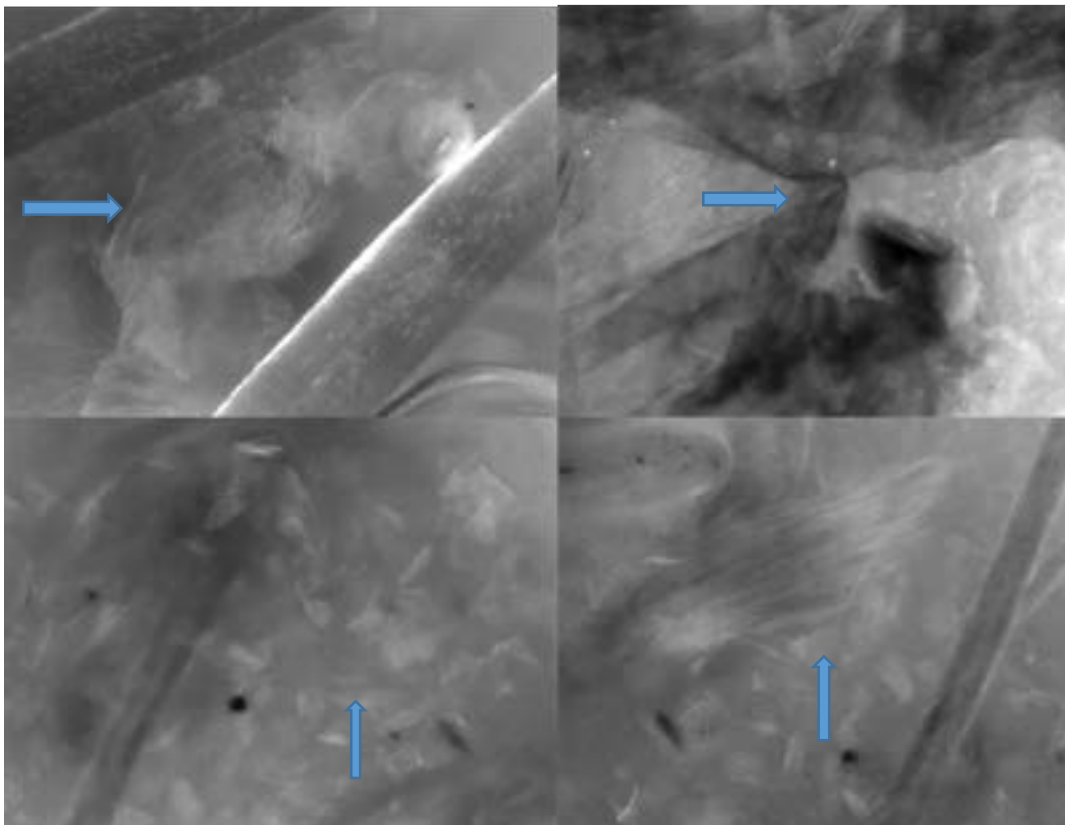


Figura 51: immagini di squame (frecces) parzialmente visibili in FAV dopo applicazione del gel

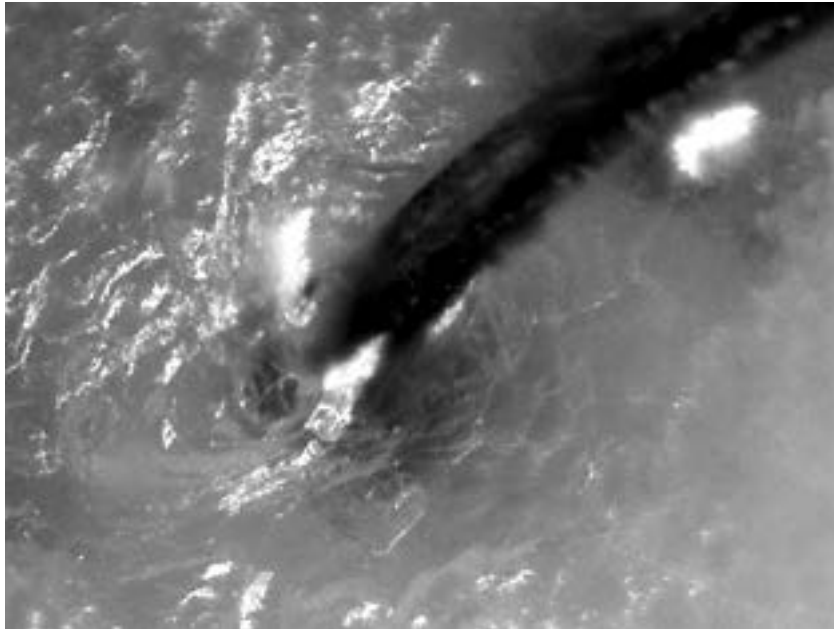


Figura 52: *squame. La componente cheratinica è intensamente riflettente e di colorito bianco brillante*

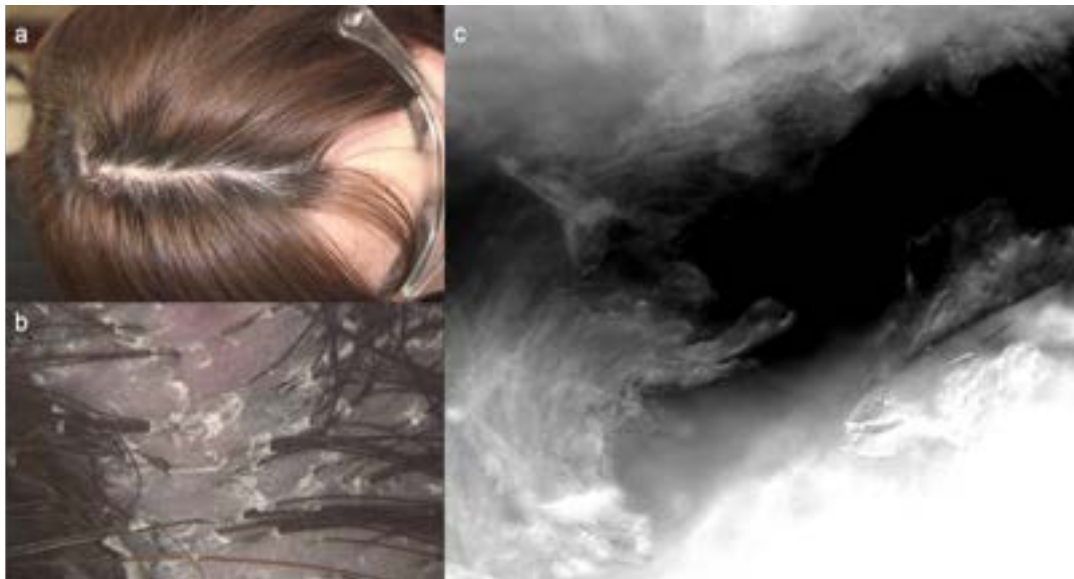


Figura 53: *paziente affetta da LPP. Immagine macroscopica (a), tricoscopica 30x (b) e FAV 500X (c). In FAV, l'ipercheratosi è ben visibile nell'area perifollicolare e intorno al fusto, con numerose componenti cheratosiche di sfaldamento, irregolari, di colorito grigio chiaro e bianco*

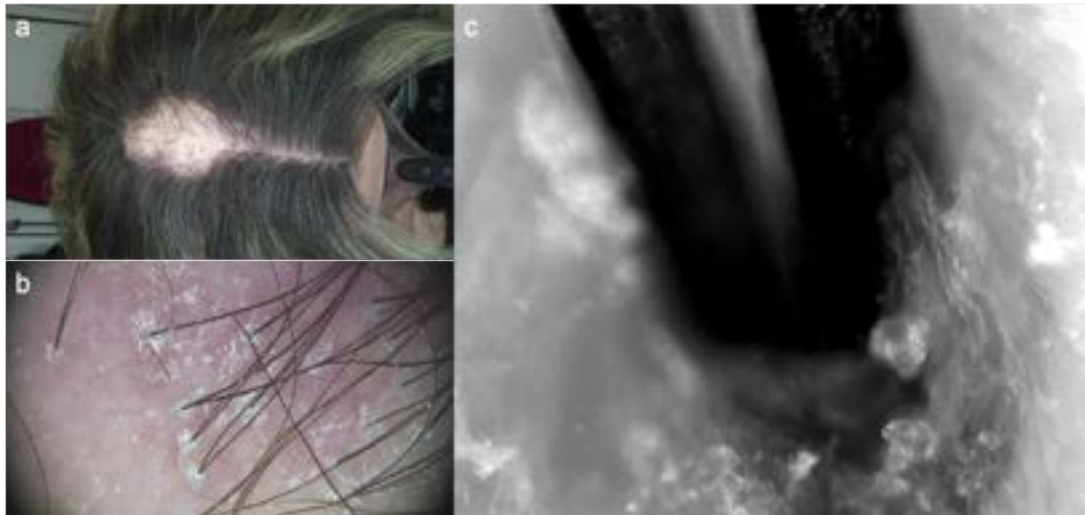


Figura 54: paziente affetta da LPP. Immagine macroscopica (a), tricoscopica 30x (b) e FAV 500X (C). Ipercheratosi perifollicolare visibile come strutture cheratosiche striate ed ondulate di colorito grigio chiaro presenti intorno all'ostio follicolare

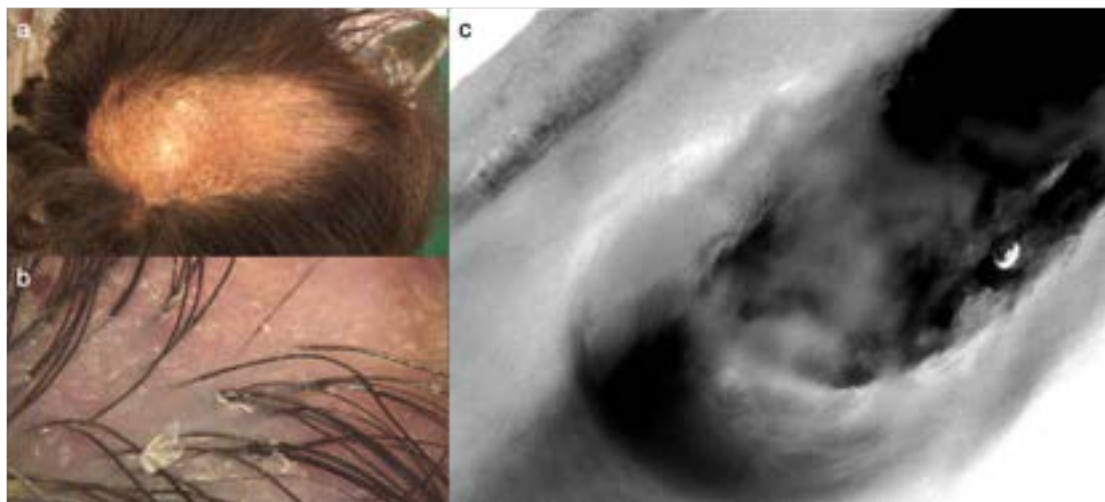


Figura 55: paziente affetta da LPP. Immagine macroscopica (a), tricoscopica 40x (b) e FAV 500X (C). Presenza di ipercheratosi follicolare con atteggiamento a manicotto intorno al fusto del capello: masse cheratosiche pseudo-cilindriche, irregolari e disordinate di colorito grigio chiaro.

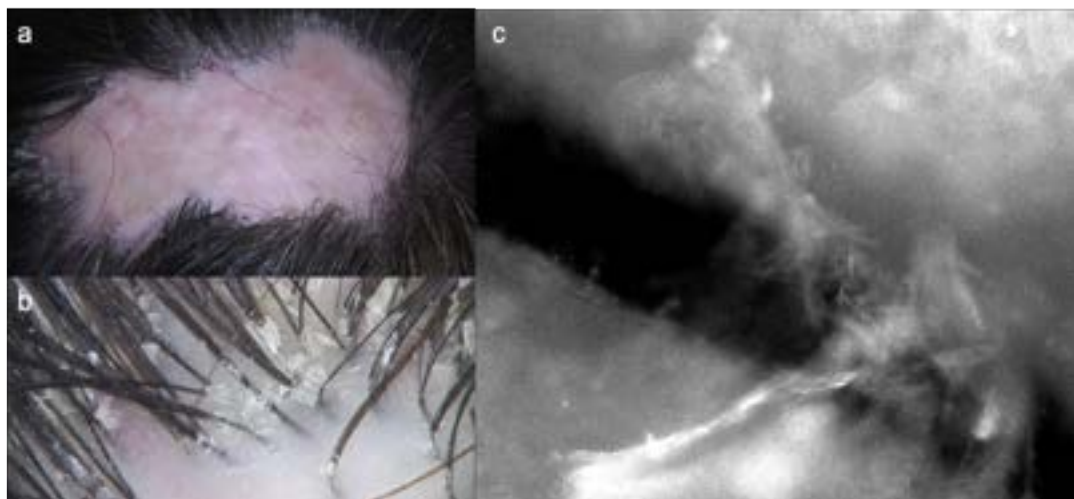


Figura 56: paziente affetta da LPP. Immagine macroscopica (a), tricoscopica 40x (b) e FAV 500X (C). Ipercheratosi perifollicolare: concrezioni irregolari e disordinate non aderenti situate attorno all'ostio follicolare e al fusto del capello, di colorito grigio chiaro e biancastro.

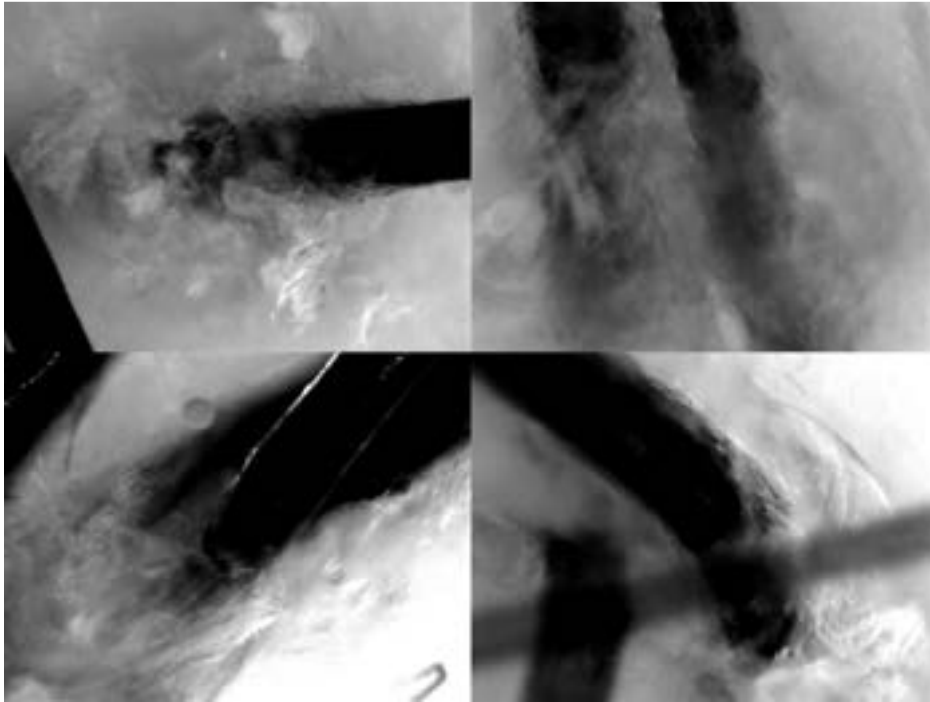


Figura 57: immagini di ipercheratosi follicolare

Danno attinico (honeycomb pattern)

L'honeycomb pattern è stato riscontrato in tutti i pazienti con alopecie di lunga durata a livello del vertice, della zona parietale o della regione frontale, come espressione di danno attinico. Nella nostra casistica è stato possibile osservare un'iperpigmentazione del cuoio capelluto in corso di diverse patologie prese in esame con danno cronico, ossia LPP, LED, AFF, FD e AGA; abbiamo così raccolto 15 immagini tricoscopiche e in FAV di danno attinico. Alla FAV, le acquisizioni ottenute mostravano la presenza di papille dermiche "rimmate", ovvero circondate da cellule tonde, monomorfe e più scure rispetto ad aree di cute senza honeycomb pattern, corrispondenti ai cheratinociti intensamente pigmentati. L'estensione della iperpigmentazione era variabile e poteva coinvolgere piccole zone o vaste aree, a seconda della gravità del danno solare (Figura 58).

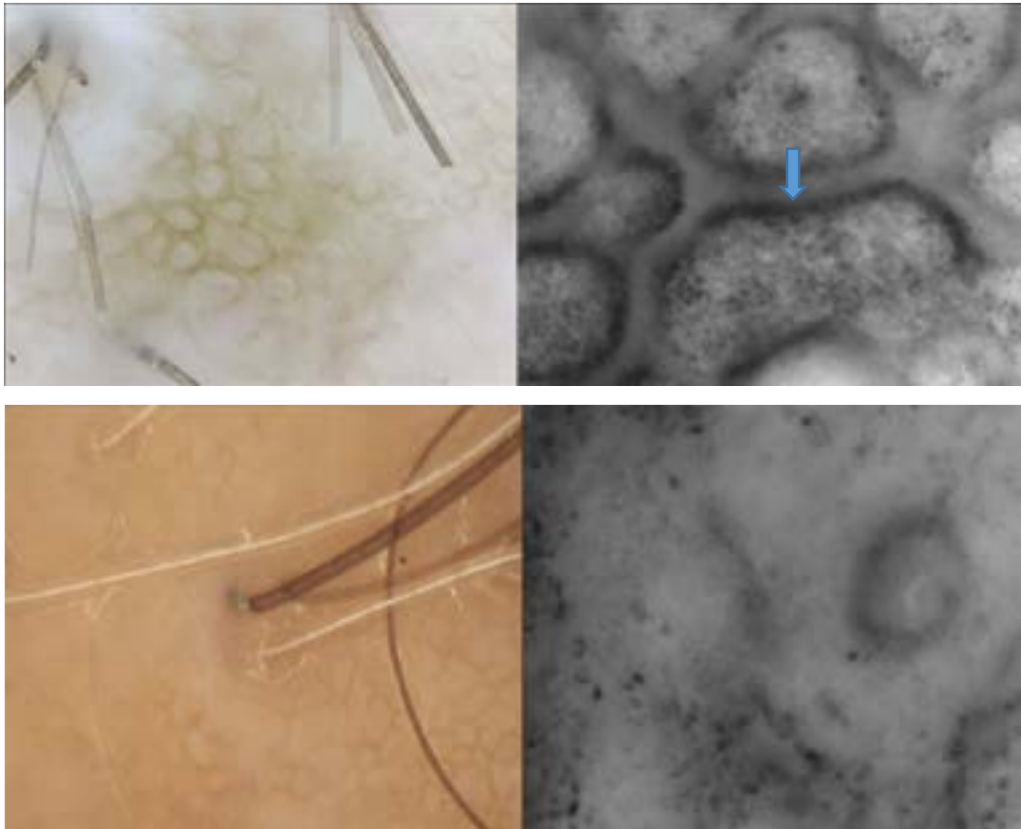


Figura 58: immagine tricoscopica 50x (sx) e in FAV 500x (dx) del danno attinico. Alla FAV presenza di papille dermiche “rimmate” (freccia), circondate da cellule tonde, monomorfe e intensamente scure, corrispondenti ai cheratinociti pigmentati

Pustole e comedoni

Nel campione, abbiamo raccolto 3 immagini di lesioni pustolose e 2 immagini di comedoni. I due pazienti da cui abbiamo preso le immagini tricoscopiche e microscopiche in FAV erano rispettivamente affetti da FD e LED.

In FAV, le lesioni pustolose apparivano come ampie aree a contenuto corpuscolato, omogeneo, con un'intensa componente cellulare verosimilmente compatibile con l'infiltrato infiammatorio alla base della patologia (Figura 59).

I comedoni apparivano invece come formazioni rotondeggianti dai bordi scuri e netti e ripiene di un abbondante materiale grigio amorfo corrispondente all'accumulo infundibolare di materiale cheratinico e materiale sebaceo, con alcune componenti più brillanti dovute alla presenza di cheratina (Figura 60).

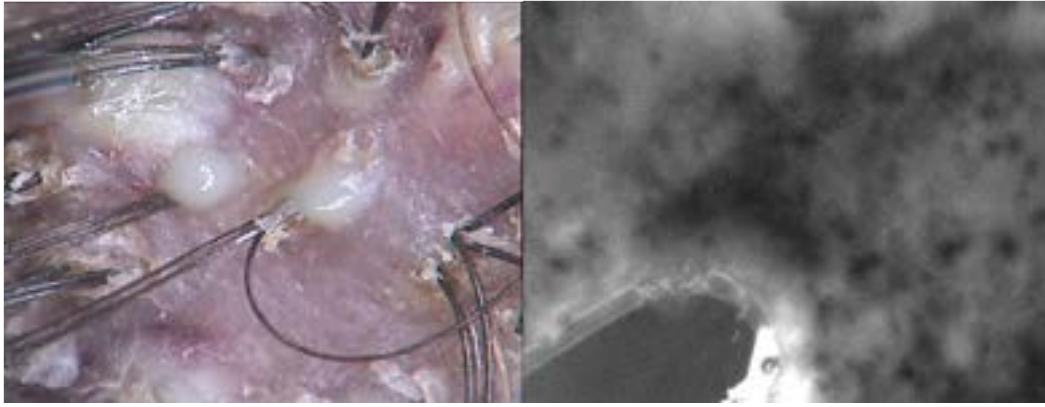


Figura 59: Immagine tricoscopica 40x (sx) e FAV 500x (dx) di lesione pustolosa. In FAV presenza di area a contenuto corpuscolato ed omogeneo, con un'intensa componente cellulare verosimilmente compatibile con l'infiltrato infiammatorio

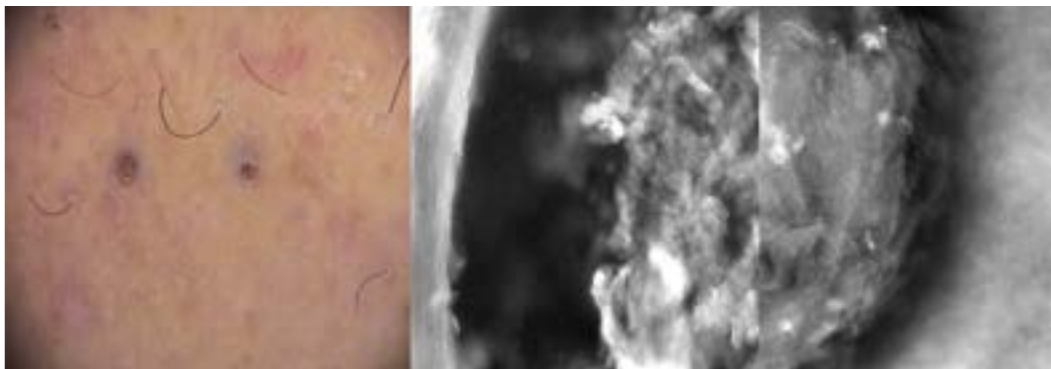


Figura 60: immagine tricoscopica 20x (sx) e FAV 500x (dx) di comedone. In FAV, formazione rotondeggiante con bordi scuri e netti, ripiena di materiale grigio amorfo (accumulo di cheratina e sebo)

Pattern vascolare

Nel campione di pazienti, la FAV permetteva una visualizzazione ad alta risoluzione delle strutture vascolari. Già nella cute del cuoio capelluto del soggetto sano, i loops capillari situati a livello delle papille dermiche erano nettamente visibili e si presentavano come strutture fini ad andatura curva o ad anello, di colorito intensamente scuro, all'interno delle quali erano ben visibili i singoli eritrociti rotondeggianti e nerastri, il cui movimento era osservabile in vivo in real time (Figura 42).

Nel campione di pazienti affetti da patologie del cuoio capelluto, grazie alla FAV abbiamo osservato i diversi pattern vascolari con risoluzione maggiore rispetto alla tricoscopia (Figura 61-67): i tipici vasi lineari irregolari tipici del LPP, i vasi arboriformi del LED, i vasi a forcina, nonché stravasi ematici in cui erano evidenti i singoli eritrociti stravasati.

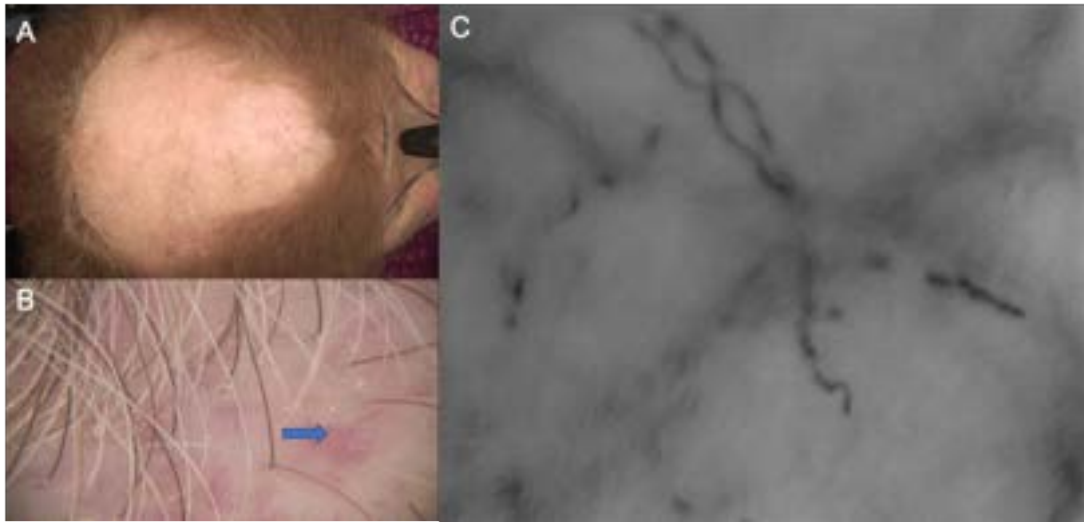


Figura 61: Paziente con LPP. Immagine macroscopica (a), tricoscopica 30x (b) e FAV 500X (C). In FAV, è ben visibile il vaso lineare irregolare ad andamento elicoidale.

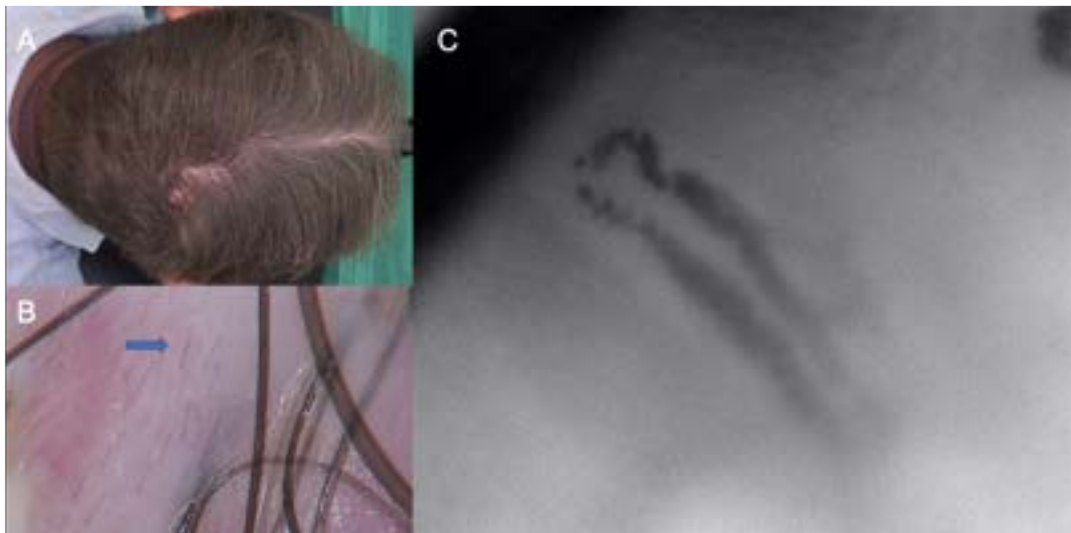


Figura 62: Paziente affetto da LPP. Immagine macroscopica (a), tricoscopica 40x (b) e FAV 500X (C) di vaso a forcina

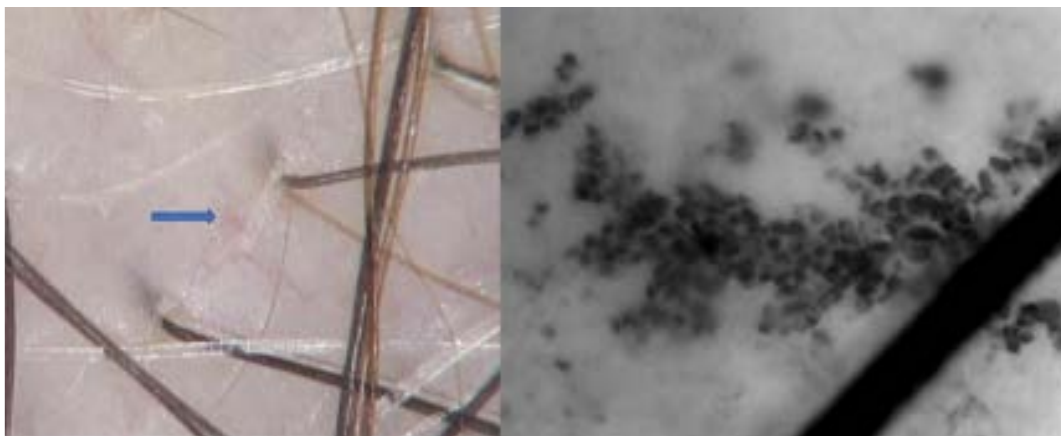


Figura 63: stravaso ematico in pz con AA. Rispetto all'immagine tricoscopica (sx), alla FAV si apprezzano i singoli eritrociti stravasati, di forma rotondeggiante e colorito nero (dx)

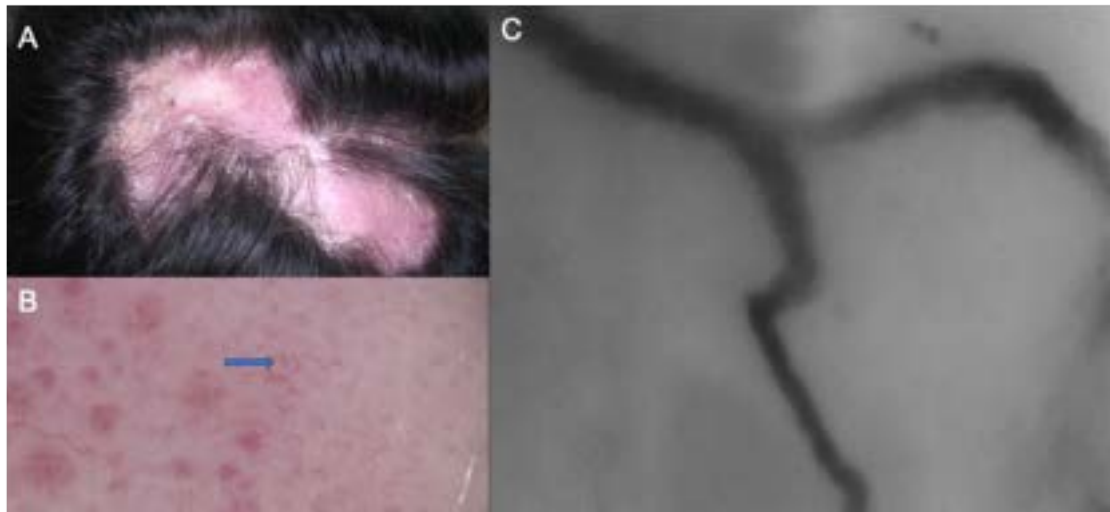


Figura 64: Paziente con LED. Immagine macroscopica (a), tricoscopica 30x (b) e FAV 500X (C). Tipico vaso arboriforme

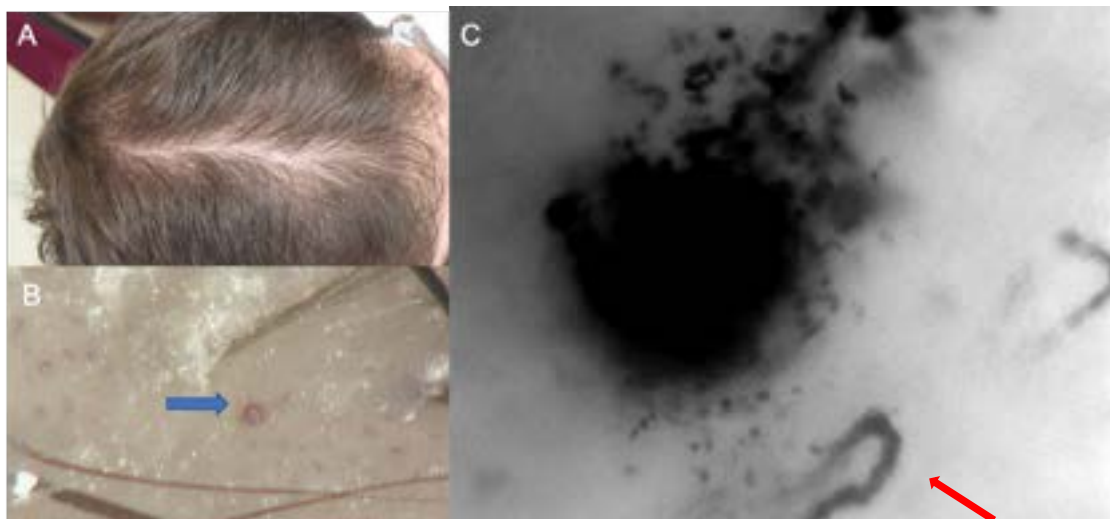


Figura 65: pz con AGA. Immagine macroscopica (a), tricoscopica 30x (b) e FAV 500X (C) Glomerulo stravasato con eritrociti rotondeggianti e nerastri periferici; vasi a forcina in basso (freccia rossa)



Figura 66: ostio follicolare con vaso ondulato perifollicolare, non visibile tricoscopicamente, in pz affetta da CIA

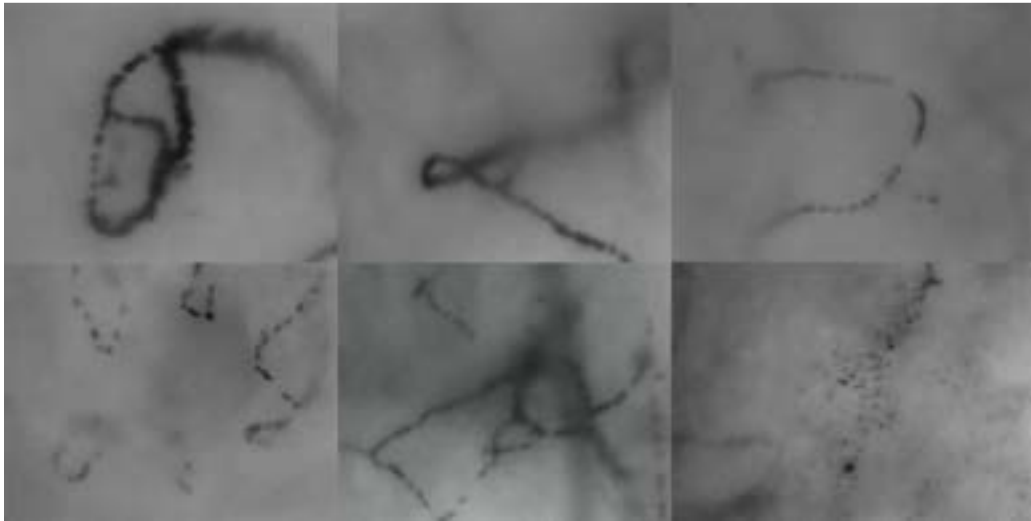


Figura 67: immagini di vasi osservati mediante FAV

2. Lesioni a livello degli osti follicolari

Nel campione di pazienti arruolato, abbiamo individuato e raccolto prima tricoscopicamente e poi in FAV le seguenti lesioni a livello dell'ostio follicolare:

- *Black dots (n° 53)*
- *Yellow dots (n° 71)*
- *White dots (n° 17)*
- *Grey dots (n°8)*
- *Red dots (n°1)*
- *Follicular plug (n°16)*
- *Starbust sign (n°1)*

Yellow dots

Mediante l'impiego della FAV abbiamo raccolto e analizzato 71 yellow dots (YD) presenti nel campione di pazienti e precedentemente osservati tricoscopicamente con l'utilizzo del FotoFinder. I 73 YD analizzati erano presenti nei pazienti affetti da AA, AGA, AAI, LPP del campione.

Alla FAV, gli YD rispettavano la tipica forma rotondeggiante identificabile anche in tricoscopia. Ovviamente, trattandosi di una metodica basata su una scala di grigi, alla FAV non era visibile il classico colorito giallastro degli YD descritto tricoscopicamente. Con la FAV si apprezzava distintamente all'interno dello YD la presenza di un materiale grigiastro amorfo, di colorito variabile

ma omogeneo, corrispondente all'accumulo di cheratina frammista a sebo, configurante un aspetto "ovattato", "imbottito" della lesione (Figure 68-74).

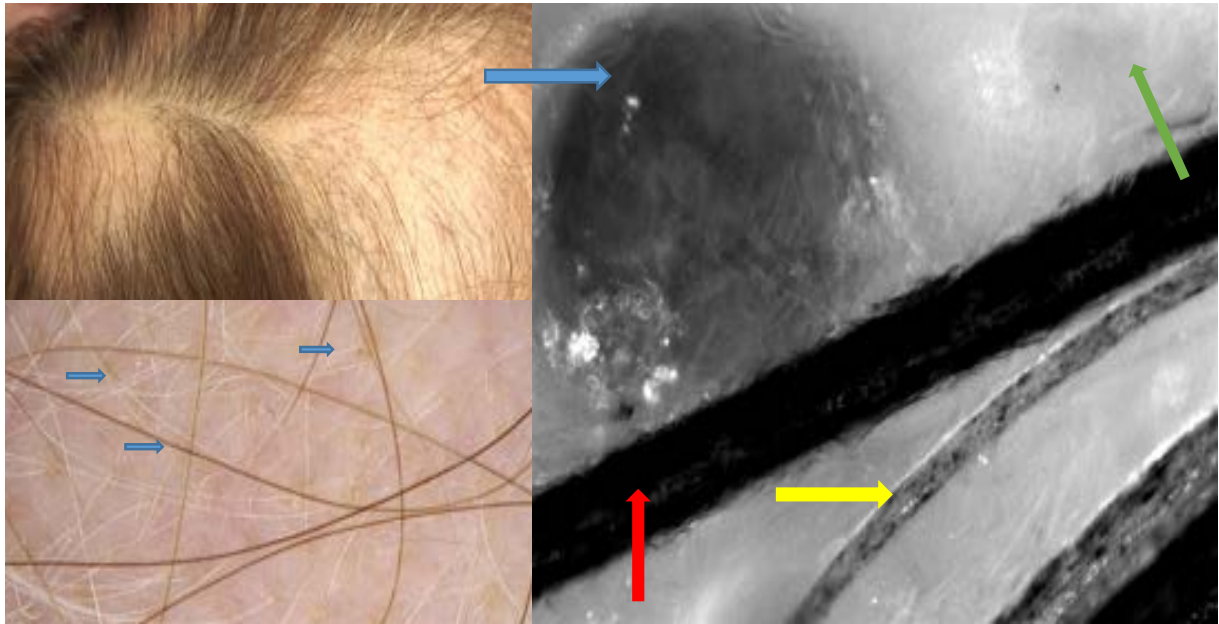


Figura 68: paziente affetta da AA. Immagine macroscopica (in alto a sx), tricoscopica 30x (in basso a sx) e FAV 500X (a dx). Alla FAV si osserva uno YD (freccia azzurra) con fusto di capello terminale (freccia rossa), capello miniaturizzato (freccia gialla) e sbocco ghiandolare (freccia verde)



Figura 69: paziente affetta da AA. Immagine macroscopica (in alto a sx), tricoscopica 30x (in basso a sx) e FAV 500X (a dx). YD di forma rotondeggiante centrato da un fusto di capello.

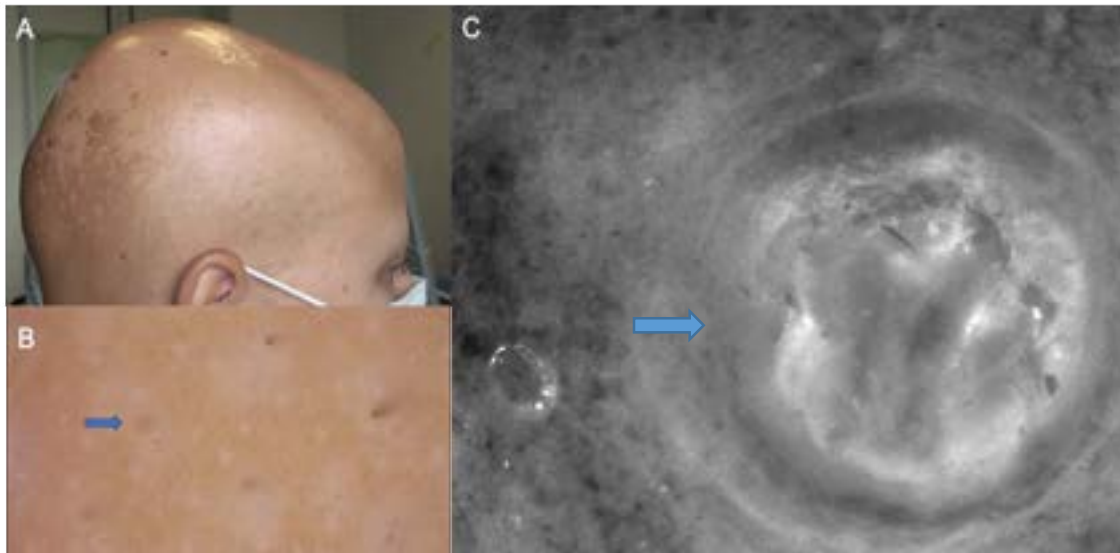


Figura 70: paziente con AA. Immagine macroscopica (a), tricoscopica 30x (b) e FAV 500x (c). Alla FAV lo YD (indicato con le frecce blu) appare come una struttura rotondeggiante ben delineata, a contenuto amorfo, bianco brillante e di aspetto ovattato.



Figura 71: YD in pz con AA. Lesione rotondeggiante grigia con contorno periferico più chiaro, corrispondente all'invaginazione cutanea dell'acrotrichio. Da non confondere con gli sbocchi ghiandolari (freccia) che sono di dimensioni più piccole e più spiraliformi.

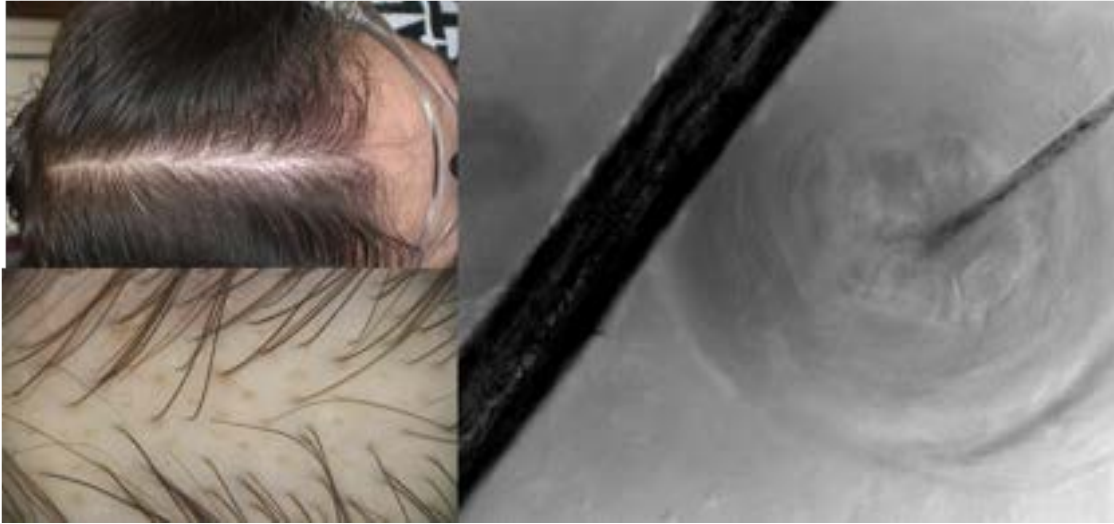


Figura 72: Immagine macroscopica (in alto a sx), tricoscopica 30x (in basso a sx) e FAV 500X (a dx). YD in paziente affetto da AGA. Lesione di forma rotondeggiante in cui l'accumulo di cheratina mista al sebo si rende ben evidente, determinando un aspetto ovattato della lesione. Rispetto alla tricoscopia, la FAV permette una visione tridimensionale "3D" dello YD, come quella che si osserva nei pz affetti da cellulite dissecante. Centralmente, sbocca un capello miniaturizzato.

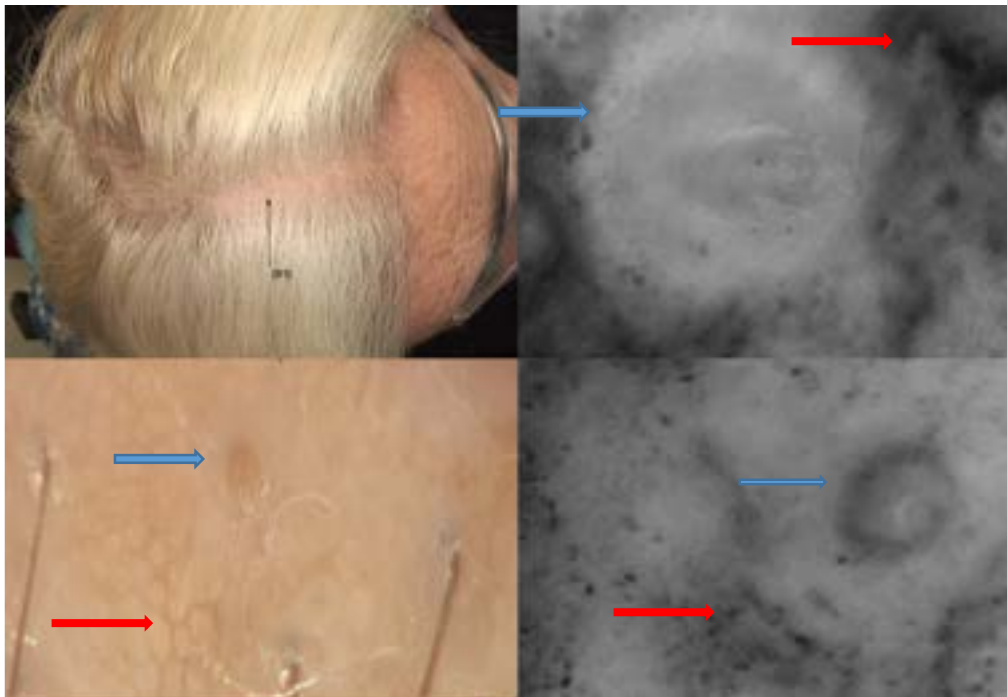


Figura 73: Paziente affetta da AG. Immagine macroscopica (in alto a sx), tricoscopica 50x (in basso a sx) e FAV 500X (a dx). YD (freccie) con honeycomb pattern visibile tutto intorno (freccie)

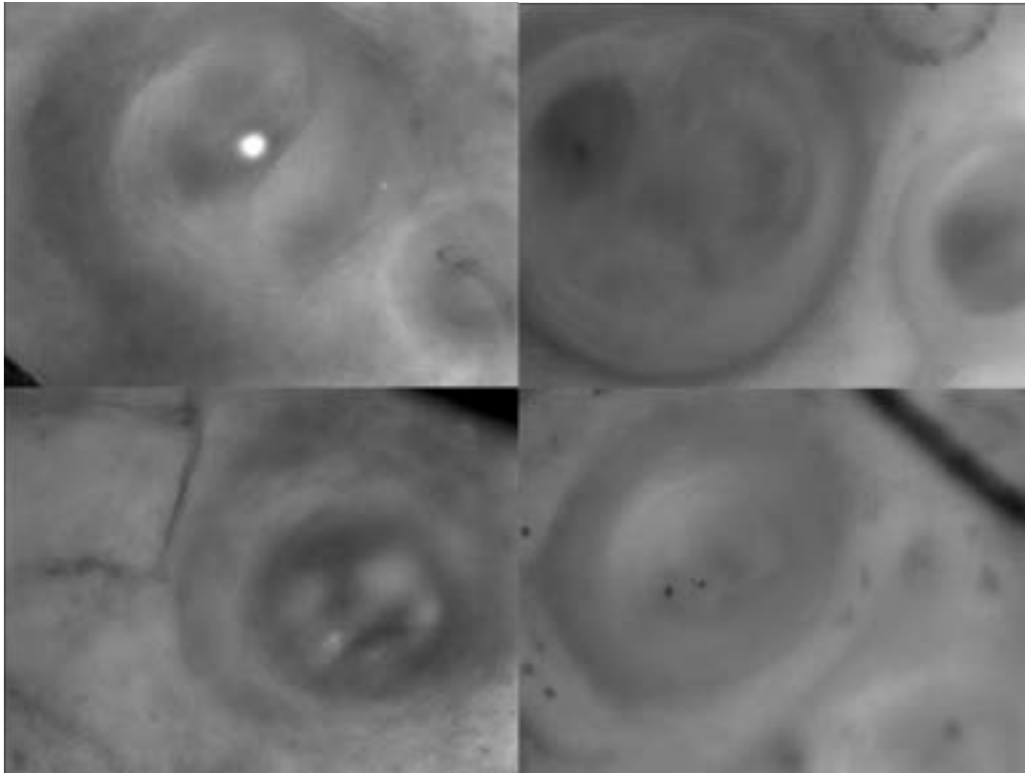


Figura 74: immagini di YD

Black dots

Con la FAV abbiamo raccolto ed analizzato 53 black dots (BD) precedentemente individuati mediante tricoscopia. I pazienti con BD erano affetti da AA, tricotillomania e CIA. In FAV, i BD apparivano come strutture rotondeggianti, ben delimitate e nette, di colorito grigio chiaro omogeneo, con un ammasso centrale nerastro, ben pigmentato e di dimensioni variabili, corrispondente allo scompaginamento delle fibre cuticolari con disorganizzazione della distribuzione melanica. Rispetto alla tricoscopia, in FAV l'entità e le dimensioni dell'ammasso centrale nerastro risultavano più dettagliate ed evidenti (Figure 75-82).



Figura 75: BD in pz con AA. Immagine macroscopica (in alto a sx), tricoscopica 30x (in basso a sx) e FAV 500X (a dx). Lesione di forma rotondeggiante, caratterizzato da un contorno periferico nerastro corrispondente alla guaina epiteliale esterna e centralmente dal fusto del capello, ben visibile come un ammasso pigmentato nerastro



Figura 76: In FAV (dx) è presente un BD con vasi capillari visibili tutto intorno a livello perifollicolare, non evidenti in tricoscopia (sx)

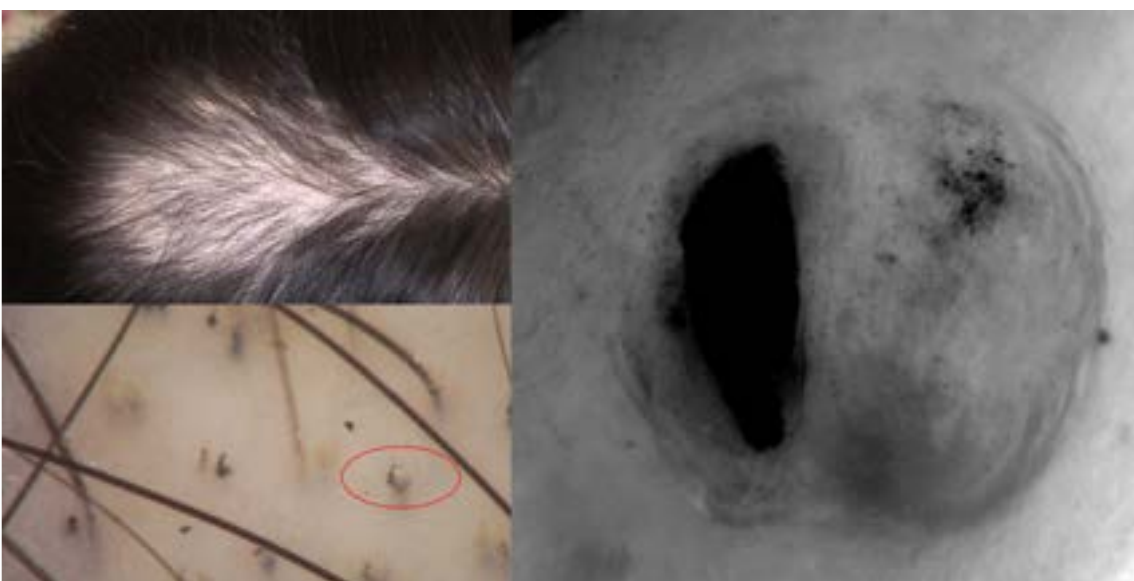


Figura 77: BD in pz affetta da tricotillomania. Immagine macroscopica (in alto a sx), tricoscopica 30x (in basso a sx) e FAV 500X (a dx). In alto a dx del BD in FAV si apprezzano singoli cheratinociti iperpigmentati con aspetto a “polvere di capello”

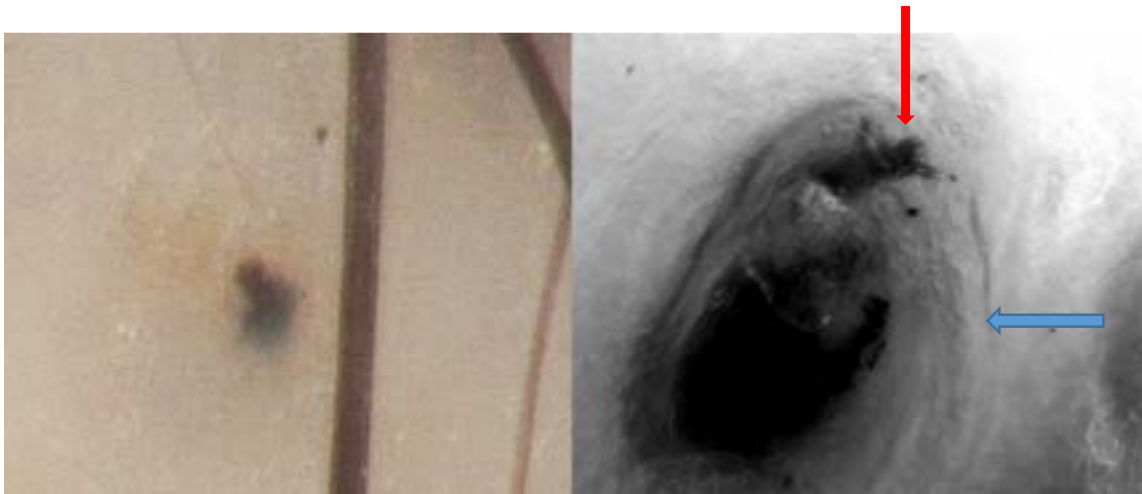


Figura 78: BD in pz con tricotillomania. Immagine tricoscopica 30x (a sx) e FAV 500X (a dx). La stratificazione e l'invaginazione dell'acrotrichio sono ben evidenti tutto intorno perifericamente (freccia); l'ammasso centrale di cheratina che forma il fusto è abbondante e superiormente assume un aspetto sfilacciato (freccia)



Figura 79: BD in pz con AA. Immagine macroscopica (in alto a sx), tricoscopica 30x (in basso a sx) e FAV 500X (a dx). Alla FAV è ben visibile l'accumulo abbondante di cheratina che forma il fusto, con parziale aspetto sfilacciato (freccia)

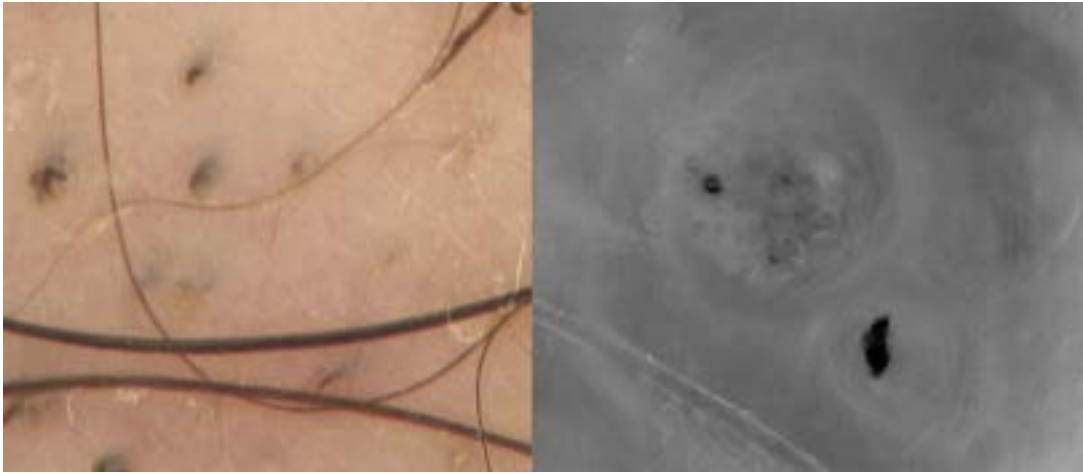


Figura 80: immagine tricoscopia 40x (sx) e FAV 500x (dx). Due BD in pz con AA: nel BD superiore è evidente un aspetto a nuvola dato dall'accumulo di sebo e di cheratinociti di sfaldamento

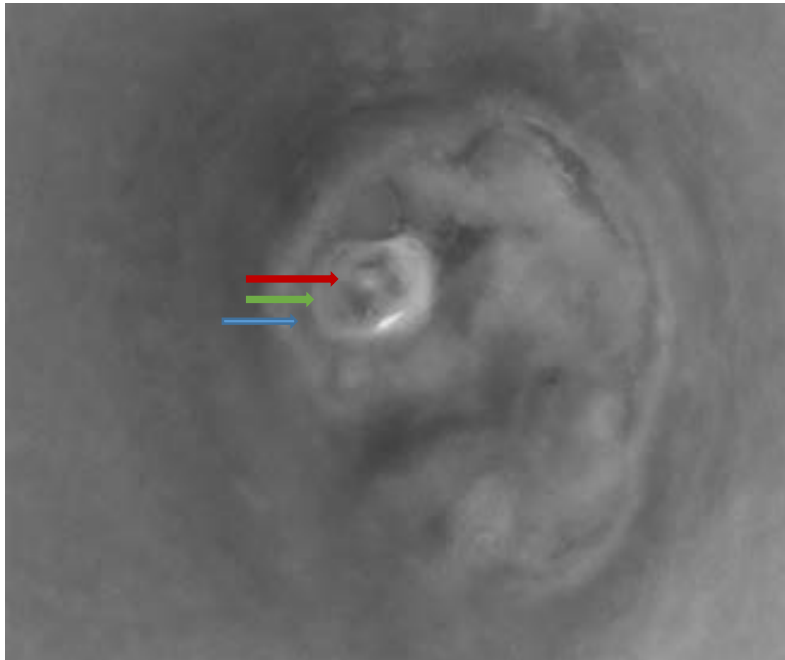


Figura 81: BD con presenza in alto e a sinistra di fusto di capello bianco, in cui si vedono dettagliatamente cuticola, corticale e midollare (frecce); nel resto della lesione rotondeggiante si osserva la presenza di materiale amorfo con aspetto imbottito

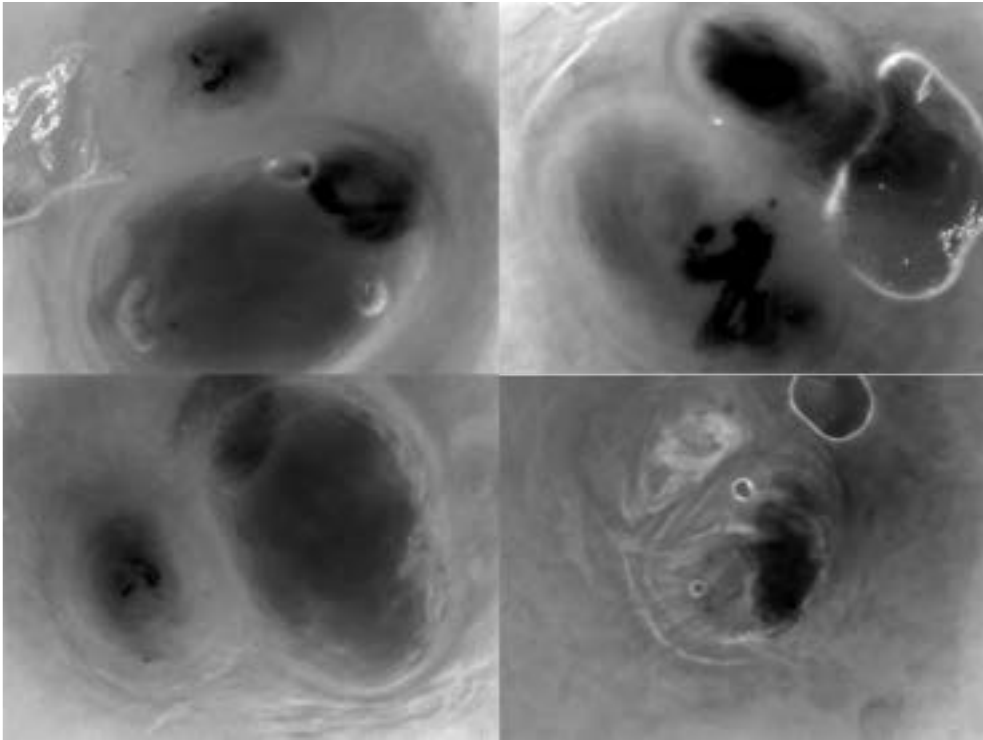


Figura 82: Immagini FAV 500X di BD

Grey dots

Nel campione di pazienti, abbiamo raccolto 8 immagini di grey dots (GD), i quali però non erano distinguibili dagli YD e WD, essendo la FAV basata su una scala di grigi. I GD si osservano soprattutto nei bambini affetti da AA e a livello delle sopracciglia di pazienti affetti da AFF, come indice di fibrosi. In una paziente affetta da AFF del campione, abbiamo individuato a livello sopracciliare delle lesioni compatibili tricoscopicamente con i GD. Alla valutazione più dettagliata in FAV, però, tali lesioni apparivano come lesioni rotondeggianti ben demarcate centrate da un pelo, criterio quest'ultimo che per definizione non si presenta nei GD. La lesione osservata in FAV era dunque compatibile in realtà con uno YD (Figura 83).

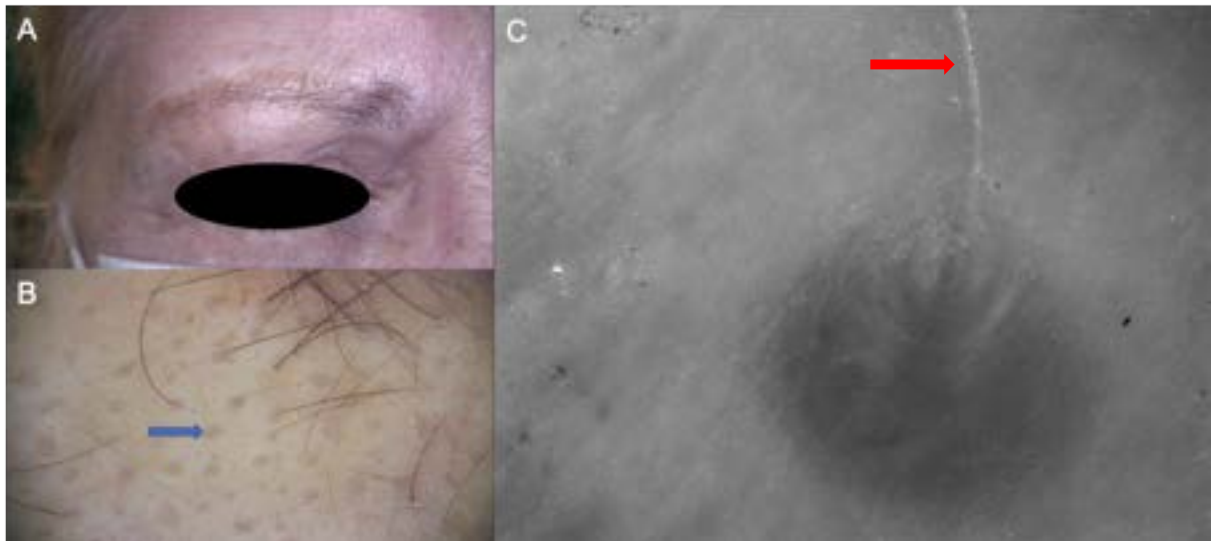


Figura 83: Immagine macroscopica (a), tricoscopica 30x (b) e FAV 500x (c) di sopracciglio in pz affetta da AFF. Tricoscopicamente, presenza di lesioni rotondeggianti verosimilmente compatibili con grey dots (freccia). Alla FAV la lesione appariva rotondeggiante, ben delimitata, grigiastra e centrata da un pelo (freccia), identificabile, per quest'ultima caratteristica, come uno YD anziché un grey dots

White dots

Nel campione abbiamo analizzato 17 white dots (WD) e raccolto le loro immagini sia tricoscopicamente che microscopicamente mediante FAV. I WD osservati e raccolti erano presenti in forma multipla in 4 pazienti affetti da FD, LPP e LED. In tutti i casi, i WD si presentavano come lesioni ben delimitate, di forma rotondeggiante, a contenuto variabilmente bianco brillante, il cui colore è determinato dall'entità della fibrosi. In nessun caso, si osservava il fusto del capello all'interno della lesione (Figure 84, 85).

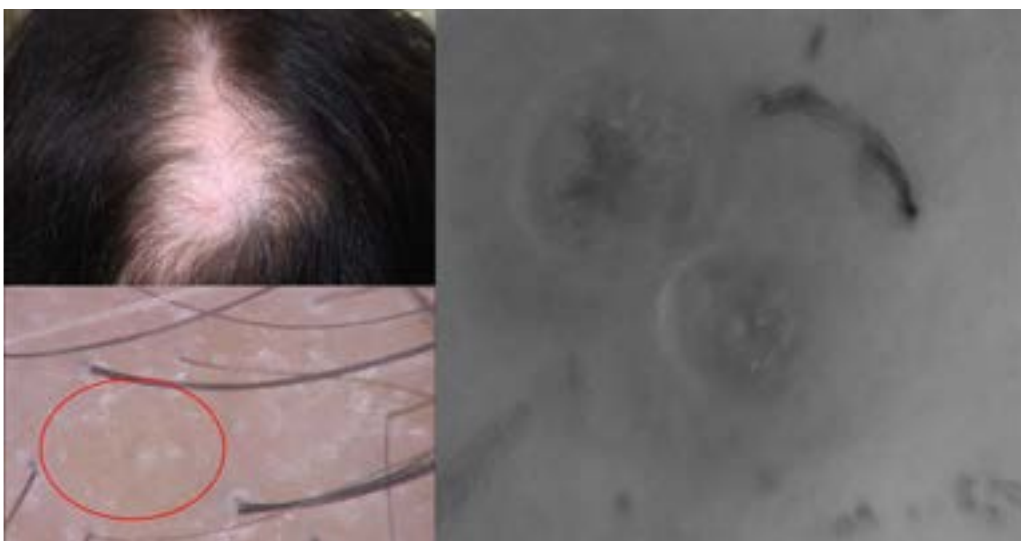


Figura 84: immagine macroscopica (in alto a sx), tricoscopica 40x (in basso a sx) e FAV 500X (a dx). WD in paziente affetta da LED. Si evidenziano due lesioni rotondeggianti costituite centralmente da cellule di colorito grigiastro e in parte bianco brillante, corrispondenti a cellule fibrotiche

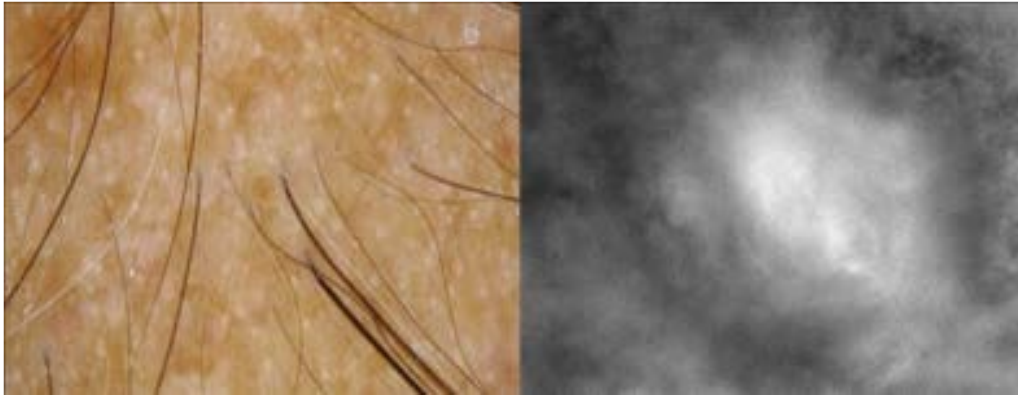


Figura 85: immagine tricoscopica 40x (sx) e FAV 500x (dx). WD in pz con FD: qui la componente brillante fibrotica è ancora più evidente

Red dots

Nel campione abbiamo raccolto un'immagine tricoscopica e in FAV di un singolo red dots, raro segno presente in corso di LED e da noi individuato in una paziente affetta da tale patologie.

In FAV, il red dots era ben visibile come una struttura rotondeggiante a bordi netti centrale, corrispondente all'infundibulo allargato, caratterizzata tutt'intorno da vasi dilatati e stravasato ematico di globuli rossi (Figura 86).



Figura 86: immagine macroscopica (in alto a sx), tricoscopica 30x (in basso a sx) e in FAV 500x (dx) di red dots. In FAV si evidenzia una struttura rotondeggiante a bordi netti circondata da vasi dilatati (freccia)

Keratotic follicular plugs

In due pazienti affetti da LED, abbiamo individuato e raccolto le immagini tricoscopiche e FAV di 16 keratotic follicular plugs. Tali lesioni corrispondono all'ipercheratosi e all'accumulo di materiale

cheratinico a livello del follicolo. Alla FAV, i follicular plugs si presentavano come un'area di forma rotondeggiante, con bordi irregolari iperriflettenti, di colorito bianco brillante; centralmente, la lesione era formata da materiale amorfo grigiastro di colorito variabile bianco e grigio chiaro (Figura 87).

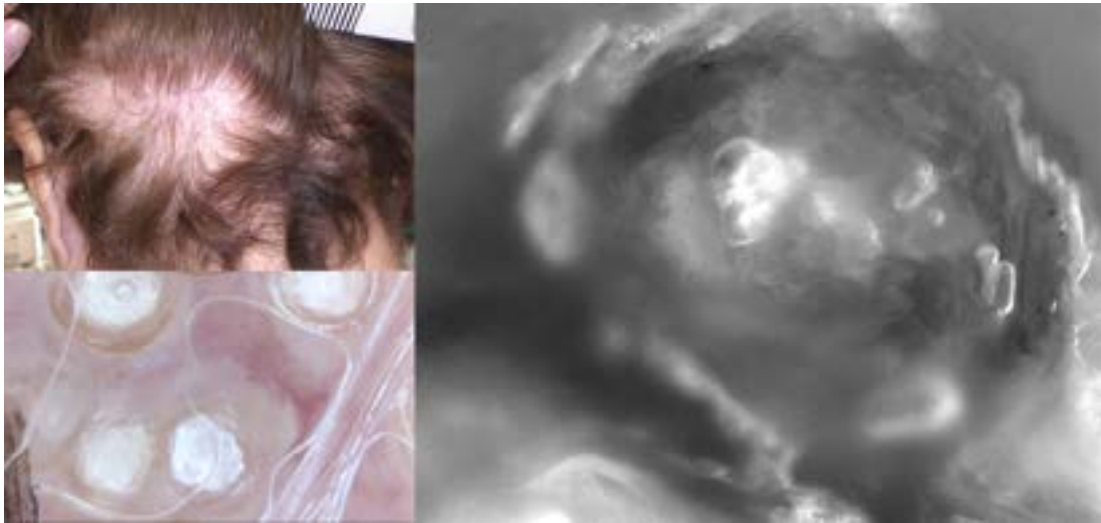


Figura 87: pz affetta da LED. Immagine macroscopica (in alto a sx), tricoscopica 50x (in basso a sx) e FAV 500x (a dx) di follicular plugs. Area di forma rotondeggiante, con bordi irregolari iperriflettenti, di colorito bianco brillante; centralmente, materiale amorfo di colorito variabile bianco e grigio chiaro

Starbust sign

Nel campione abbiamo raccolto una singola immagine tricoscopica e in FAV di starbust sign (tipico ma raro segno di FD) in un paziente affetto da FD.

Alla FAV, lo starbust sign appariva come una struttura perifollicolare formata da striature grigiastre disposte a raggiera (Figura 88).



Figura 88: paziente affetto da FD. Starbust sign. Immagine macroscopica (in alto a sx), tricoscopica 50x (in basso a sx) e FAV 500x (a dx). In FAV presenza di striature grigiastre disposte a raggiera intorno al follicolo

3. Lesioni del fusto del capello

Nei soggetti arruolati nel campione, abbiamo individuato e raccolto le immagini tricoscopiche e in FAV delle seguenti alterazioni a carico del fusto del capello:

- Capelli miniaturizzati (n° 65)
- Pili torti (n° 11)
- Flame hairs (n° 8)
- Circle hairs (n° 9)
- Capelli a punto esclamativo (n° 12)
- Tricoptilosi (n° 8)

Capelli miniaturizzati

Negli 8 pazienti del campione affetti da AGA, abbiamo raccolto le immagini tricoscopiche e microscopiche mediante FAV di 65 capelli miniaturizzati (Figure 89-92).

In tricoscopia, i capelli miniaturizzati analizzati apparivano sottili e depigmentati rispetto ai capelli terminali, non più lunghi di 3 cm.

Mediante FAV è stato possibile osservare con maggior risoluzione la struttura e il contenuto dei capelli miniaturizzati, nei quali il fusto del pelo, anziché intensamente pigmentato come nei capelli terminali, appariva fine e depigmentato, di colorito chiaro con variabili spots nerastri presenti lungo il fusto, corrispondenti alla presenza di clusters più o meno estesi di cellule pigmentate.

I capelli intermedi apparivano invece come strutture cilindriche di calibro ridotto, ma maggiore rispetto a quello dei capelli miniaturizzati, di colorito grigio marezzato, dovuto alla presenza di cluster di melanociti scuri disomogeneamente distribuiti a livello della corticale; la midollare bianca centrale era visibile ma di forma grossolana.

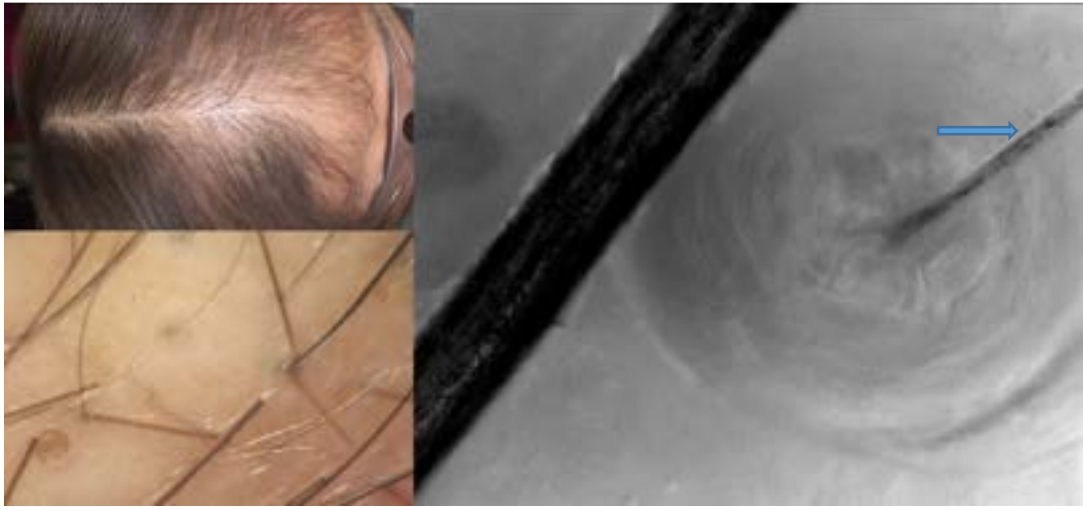


Figura 89: pz affetto da AGA. Immagine macroscopica (in alto a sx), tricoscopica 40x (in basso a sx) e FAV 500x (a dx). Alla FAV si osserva un capello miniaturizzato, fino, depigmentato, con rare cellule corticali e cuticolari pigmentate (freccia)

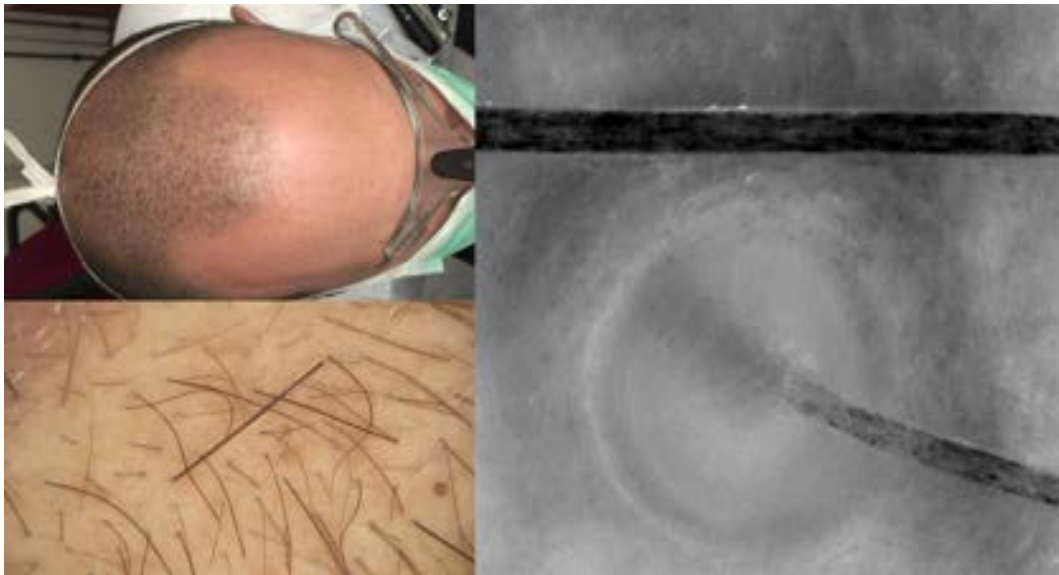


Figura 90: pz affetto da AGA. Immagine macroscopica (in alto a sx), tricoscopica 30x (in basso a sx) e FAV 500x (a dx). Capelli intermedio che sbocca da un follicolo miniaturizzato



Figura 91: paziente con AGA. Immagine macroscopica (in alto a sx), tricoscopica 30x (in basso a sx) e FAV (a dx). Capelli miniaturizzati e papille dermiche iperpigmentate espressione di danno attinico (freccia)

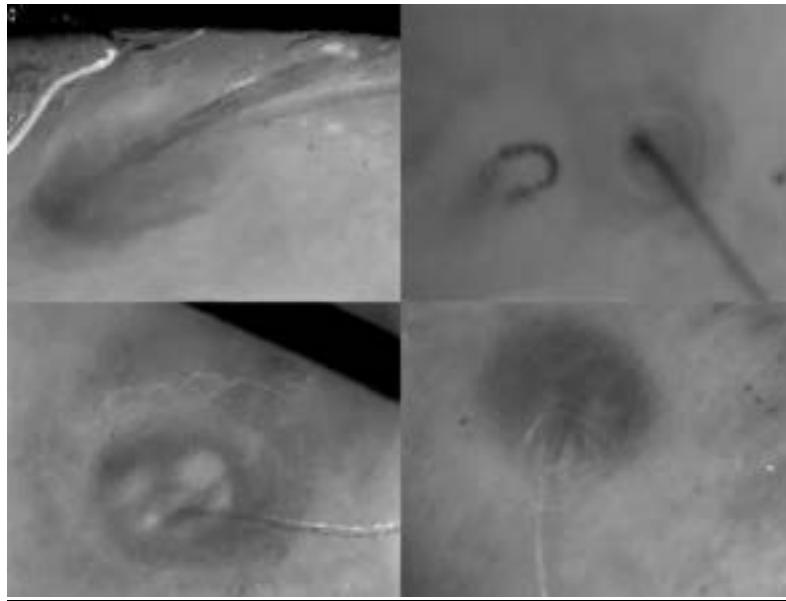


Figura 92: immagini FAV di follicoli miniaturizzati

Pili torti

Abbiamo raccolto le immagini tricoscopiche e in FAV di 11 pili torti, osservati in 3 pazienti con LPP e in 2 pazienti con AA. Alla FAV, l'aspetto dei pili torti variava in base alle dimensioni originarie del capello (se intermedio, terminale o miniaturizzato).

Nel punto di torsione di 180° del capello abbiamo riscontrato una perdita della normale birifrangenza del fusto, che quindi appariva più disomogeneo, con iperpigmentazione a livello dell'incurvatura (Figura 93-95).

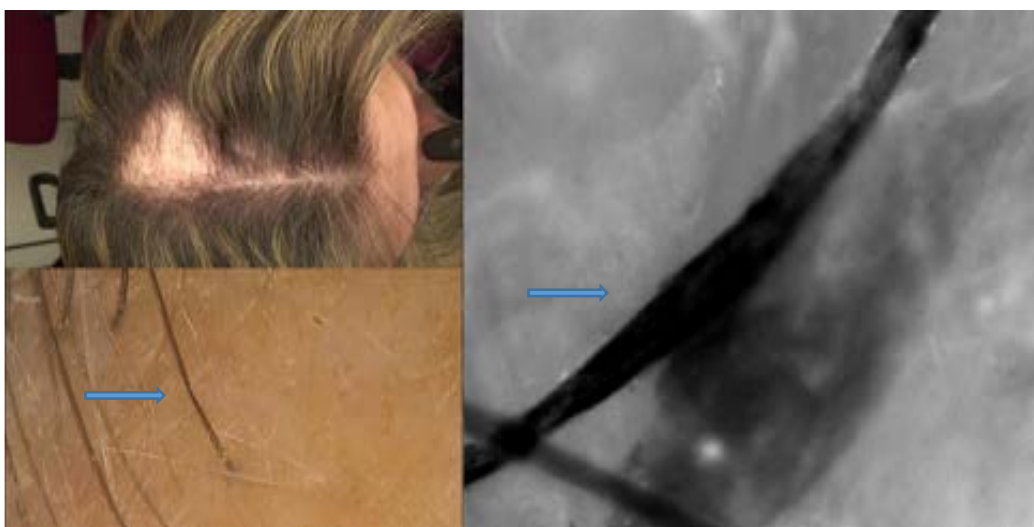


Figura 93: LPP. Immagine macroscopica (in alto a sx), tricoscopica 40x (in basso a sx) e FAV (a dx). Capello terminale altamente pigmentato di colorito nerastro e di forma appiattita, con torsione



Figura 94: paziente con LPP. Immagine macroscopica (in alto a sx), tricoscopica 430x (in basso a sx) e FAV (a dx). Capello depigmentato, di colorito grigiastro, inginocchiato e con presenza di torsione sul proprio asse. Nel punto più esterno dell'incurvatura si osserva una maggior iperpigmentazione (freccia rossa)

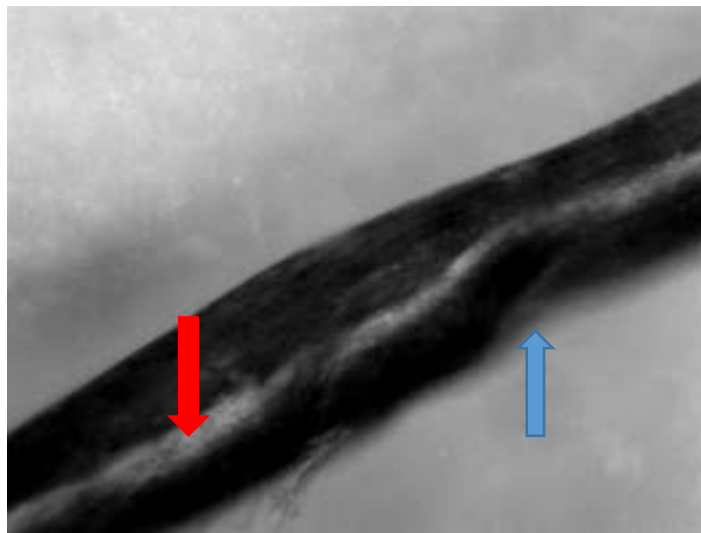


Figura 95: Immagine FAV di pili torti. Capello terminale con torsione sul proprio asse quasi di 180° (freccia blu). Midollare centrale ben visibile di colorito biancastro (freccia rossa)

Flame hair

8 immagini di flame hairs sono state identificate e raccolte nella paziente del campione affetta da tricotillomania. In tricoscopia, il flame hair appariva come un fusto spezzato e ondulato, di piccole dimensioni, con tipica forma a fiamma.

Alla FAV si osservavano ampie alterazioni della cuticola e della corticale del fusto, con fibre strutturalmente disorganizzate. Tali alterazioni facevano apparire il fusto del capello ondulato e determinavano una riduzione del calibro del capello in senso prossimo-distale. Rispetto alla tricoscopia, l'immagine della FAV permetteva l'osservazione ad alta risoluzione delle fibre cuticolari e corticali, con residui di pigmento evidenti nella parte più prossimale (Figura 96).

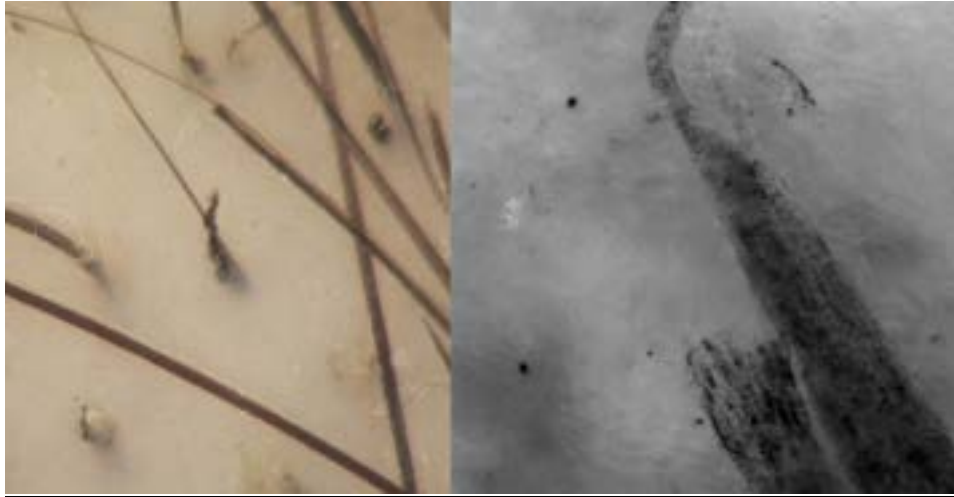


Figura 96: immagine tricoscopica (sx) e FAV (dx) di flame hair in pz con tricotillomania. Rispetto alla tricoscopia, in FAV si apprezzano singolarmente le fibre cuticolari e corticali strutturalmente disorganizzate, con profilo sfrangiato e ondulato del fusto del capello.

Circle hairs

Nel campione di soggetti abbiamo individuato e raccolto 9 immagini di circle hairs, osservati in 5 pazienti affetti da AA ed AGA. In FAV, il circle hair appariva come un capello terminale, altamente pigmentato, di colorito scuro, con tipico arrangiamento circolare (da cui la definizione tricoscopica di circle hair) (Figura 97).

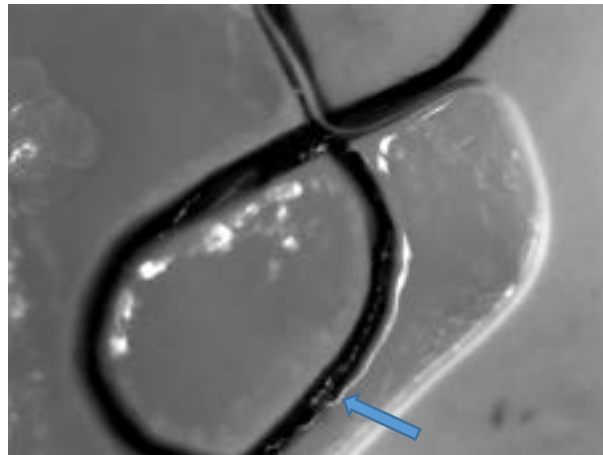


Figura 97: capello terminale intensamente pigmentato, di colorito nerastro e con tipico arrangiamento circolare. Si intravede la midollare a livello centrale.

Capelli a punto esclamativo

Nel campione abbiamo raccolto 12 immagini tricoscopiche e FAV di capelli a punto esclamativo, individuate in 5 pazienti con AA.

Rispetto alla tricoscopia, la FAV permetteva una visualizzazione ad alta risoluzione del capello a punto esclamativo. Mediante tale strumento era ben evidente la progressiva riduzione di calibro e di pigmentazione in senso disto-proximale (Figura 98).

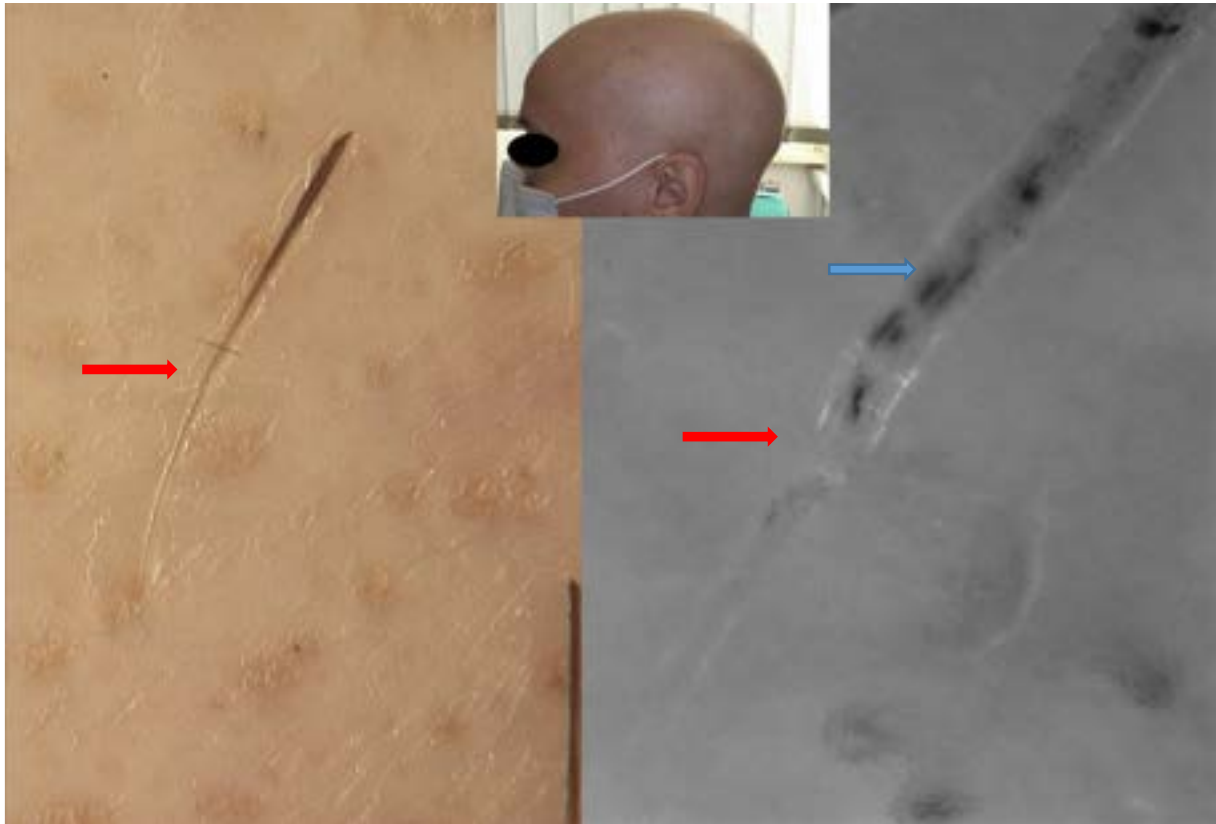


Figura 98: Immagine tricoscopica 40x (sx) e FAV 500x (dx) di capello a punto esclamativo. Progressiva depigmentazione e riduzione del calibro del capello in senso disto-proximale (freccia); in FAV sono ben evidenti i clusters di melanociti nerastri a livello distale (freccia), non più visibili andando in senso proximale verso l'ostio follicolare.

Tricoptilosi

Abbiamo raccolto 8 immagini di tricoptilosi, presente in 2 pazienti del campione affette da AA in fase acuta.

In FAV, la tricoptilosi, comunemente denominata doppie punte, determinava un aspetto biforcuto del capello (di colorito e pigmentazione variabile), con evidente splitting centrale che suddivideva il fusto in due parti approssimativamente delle medesime dimensioni (Figura 99).

In Figura 100, prossimalmente allo split della tricoptilosi si osservava un rigonfiamento biancastro del fusto, con aspetto sfrangiato e sfilacciato, corrispondente ad un quadro di tricoressi nodosa associato a tricoptilosi.

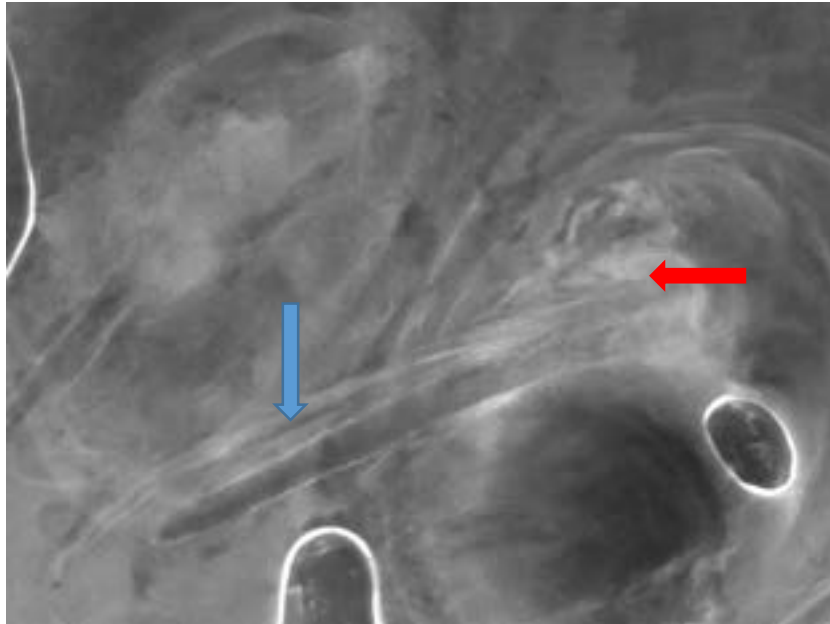


Figura 99: pz affetta da AA. Immagine FAV di tricoptilosi. Il fusto del capello depigmentato, di colorito grigio-biancastro, appare sfrangiato e biforcuto, con evidente split centrale che suddivide il fusto in due parti approssimativamente delle medesime dimensioni (freccia). In prossimità dell'ostio follicolare si osserva un accumulo di materiale biancastro amorfo corrispondente a cheratina (freccia)



Figura 100: Immagine FAV di tricoptilosi in pz con AA. Fusto di capello depigmentato, di colorito grigio-biancastro, con aspetto sfrangiato e biforcuto. Netto split centrale che suddivide il fusto in due. Prossimalmente allo split si evidenzia un rigonfiamento biancastro del fusto, sempre di aspetto sfrangiato, corrispondente a tricoressi nodosa (freccia)

DISCUSSIONE

La FAV è una tecnica diagnostica non invasiva, basata su una sorgente di luce monocromatica, che permette la visualizzazione della cute in vivo in real time, con risoluzione cellulare (Sanlorenzo et al., 2017). E' una metodica di recente sviluppo e ancora poco diffusa: fino ad ora sono stati pubblicati solamente sei lavori riguardo l'utilizzo della FAV in ambito dermatologico. Negli articoli attualmente presenti in letteratura, la FAV ha dimostrato un'ampia utilità soprattutto per quanto concerne lo studio dei melanociti e degli eritrociti (strutture vascolari): emoglobina e melanina sono infatti cromofori cutanei, in grado di assorbire diverse lunghezze d'onda e di emettere a loro volta fluorescenza. Sia Scarfi et al. che Cinotti et al. hanno utilizzato la FAV per lo studio di lesioni melanocitarie maligne. In particolare la FAV permetteva l'osservazione dettagliata di cellule melanocitarie atipiche, di forma e pigmentazione irregolari (Scarfi et al. 2019); lo strumento permetteva il riconoscimento di melanociti atipici anche a livello delle aree di regressione di un melanoma amelanotico (Cinotti et al., 2020). Inoltre, tale metodica è utile per la diagnosi di parassitosi quali trombiculosi, scabbia e larva migrans, permettendo una visualizzazione in vivo in real time dell'acaro, non visibile ad occhio nudo e difficilmente osservabile mediante dermatoscopia (Sanlorenzo et al., 2017; Fernandez-Nieto et al., 2020, Ramondetta et al., 2020). Dato lo sviluppo recente e la diffusione ancora limitata della FAV, attualmente non sono presenti studi riguardo l'impiego di tale tecnica a livello del cuoio capelluto. Abbiamo raccolto 300 immagini microscopiche del cuoio capelluto normale, in un gruppo di 90 soggetti sani, privi di patologie del cuoio capelluto, nonché 389 immagini, sia tricoscopiche che microscopiche in FAV, delle principali lesioni elementari del cuoio capelluto, individuate in un campione di 53 soggetti affetti da patologie alopeciche cicatriziali e non cicatriziali e visitati presso l'Ambulatorio di Tricologia della Clinica Dermatologica del Policlinico Umberto I di Roma da novembre 2019 ad ottobre 2020. L'obiettivo era quello di analizzare e descrivere per la prima volta le caratteristiche morfologiche della cute del cuoio capelluto e delle sue principali lesioni elementari con questa nuova tecnica non invasiva. Per quanto riguarda l'aspetto del cuoio capelluto normale, dai nostri risultati è emerso come la FAV, se confrontata alla normale valutazione tricoscopica, permetta una visualizzazione molto più dettagliata e completa della cute. La FAV consente infatti l'osservazione della cute con una risoluzione cellulare e soprattutto in profondità, in diversi strati ben distinguibili tra loro, fino a raggiungere le papille dermiche nella loro porzione inferiore (Figure 36-41). In linea con quanto già riportato in letteratura per le altre sedi corporee, anche a livello della cute del cuoio capelluto abbiamo osservato con buona risoluzione sia melanociti che cheratinociti (in particolare a contenuto melanico). La cheratina appariva bianco brillante, mentre la melanina appariva nera (in maniera opposta all'RCM dove la melanina è di colorito bianco). La FAV ha permesso anche un'ottima valutazione dei vasi dermici, consentendo inoltre la visualizzazione in real time del movimento dei

singoli eritrociti all'interno dei vasi (Figura 42). Oltre alla cute interfollicolare, abbiamo adoperato la FAV per la caratterizzazione dell'ostio follicolare e del fusto del capello dei soggetti normali, finora mai descritta con questa nuova tecnica. Gli osti follicolari dell'individuo sano erano ben visibili e si presentavano come una struttura rotondeggiante di colorito grigio scuro, occupata centralmente dal fusto del pelo. Tutt'intorno era ben individuabile l'epitelio follicolare delimitante l'ostio, di colorito grigio chiaro, pluristratificato e di forma tondeggianta, formato da cellule cheratinocitarie (Figura 43). La FAV ha permesso anche una osservazione dettagliata del fusto del capello, con risoluzione sovrapponibile a quella presente in microscopia elettronica (Figura 45). Nel capello terminale, la midollare appariva come una struttura filamentosa di colorito intensamente bianco brillante, mentre la componente corticale e cuticolare apparivano intensamente pigmentate (e quindi nere), con fibre strettamente embricate tra loro ben visibili (Figure 44-47). Nel capello intermedio e vello-like l'aspetto del fusto era nettamente più depigmentato; in particolare, la FAV permetteva la visualizzazione di cluster di melanociti disomogeneamente localizzati all'interno del fusto, non identificabili in tricoscopia (Figura 48). Infine, sempre nella cute normale, la FAV permetteva una buona osservazione degli sbocchi ghiandolari, difficilmente distinguibili mediante tricoscopia e qui visibili come strutture grigiastre, di forma rotondeggiante o ellittica e di dimensioni inferiori rispetto ai follicoli (Figura 49). Nel campione di 53 pazienti arruolato abbiamo raccolto 389 immagini di lesioni elementari del cuoio capelluto, le quali abbiamo suddiviso in *“lesioni della cute del cuoio capelluto”*, *“lesioni dell'ostio follicolare”* e *“lesioni a carico del fusto del capello”*. Per quanto riguarda la cute del cuoio capelluto, grazie alla FAV abbiamo potuto visualizzare ad alta risoluzione alterazioni cutanee quali il danno attinico (honeycomb pattern), le lesioni pustolose e l'ipercheratosi perifollicolare. La desquamazione, invece, è risultata più difficilmente visibile poiché l'applicazione del gel a base di glicerolo (necessaria per la visualizzazione degli strati cutanei più profondi), bagnando le squame, ne riduceva la riflettanza e quindi la visibilità, caratteristica comune peraltro al dermoscopio ad immersione (Figure 50-52). In ogni caso, la FAV permetteva una buona osservazione dell'ipercheratosi perifollicolare, così come dell'*hair cast*, anche previa applicazione del gel, grazie al contrasto della cheratina biancastra rispetto alla pigmentazione scura nerastra del fusto del capello (Figure 53-57). Il danno attinico è un'alterazione cutanea frequente in caso di alopecie severe e soprattutto di lunga durata, ed è legato ad una cronica esposizione solare con conseguente fotodanneggiamento. Tale alterazione è visibile in tricoscopia, ove si presenta con il classico quadro di iperpigmentazione a nido d'ape. La FAV, in aggiunta alla dermoscopia, ha permesso la visualizzazione di tale quadro a livello cellulare, caratterizzato da un *“rimming”* delle papille dermiche, ossia circondate da cellule tonde, monomorfe e intensamente nerastre, corrispondente a cheratinociti basali intensamente iperpigmentati (Figura 58). Anche per quanto riguarda le lesioni pustolose e i comedoni (visibili già mediante tricoscopia), la FAV ha permesso una migliore caratterizzazione del loro aspetto microscopico e soprattutto del loro contenuto (Figure 59, 60). A livello della lesione pustolosa la FAV ha mostrato un aspetto

corpuscolato, verosimilmente compatibile con l'infiltrato di cellule infiammatorie che caratterizza tali lesioni (Figura 59). Infine, per quanto riguarda le lesioni della cute del cuoio capelluto, la FAV si è dimostrata particolarmente utile per lo studio delle strutture vascolari e del loro contenuto eritrocitario, grazie all'emoglobina che come già anticipato è un importante cromoforo cutaneo.

Con la FAV è stato possibile distinguere dettagliatamente i diversi pattern vascolari del cuoio capelluto (Figure 61-67). Questo utile aspetto della FAV andrebbe approfondito con ulteriori studi su campioni più ampi di pazienti e soprattutto valutandoli in base al quadro alopecico di base, al fine di definire e codificare dei criteri vascolari specifici basati sulla patologia, che potenzialmente potrebbero quindi affiancarsi alla tricoscopia aumentandone le possibilità diagnostiche e riducendo ulteriormente la necessità di ricorrere ad esami invasivi come la biopsia, aspetto utile soprattutto per condizioni ad esito cicatriziale come l'LPP e il LED. Oltre alle lesioni riscontrate a livello della cute interfollicolare, abbiamo adoperato la FAV per l'osservazione e la descrizione delle lesioni a carico dell'ostio follicolare, identificando e descrivendo quanto osservato a livello degli yellow dots, black dots, white dots, red dots, grey dots. Per quanto riguarda gli yellow dots, rispetto alla tricoscopia, la FAV ha permesso una visualizzazione più dettagliata del contenuto della lesione, visibile come un ammasso di materiale amorfo di aspetto tipicamente ovattato, corrispondente all'accumulo di materiale cheratinico e sebaceo (Figure 68-74). In alcuni casi, la FAV permetteva una visualizzazione tridimensionale (3D) dello yellow dots, non apprezzabile in tricoscopia (Figura 72). Inoltre, data l'alta risoluzione dello strumento, in certe immagini è stato possibile individuare la presenza di fini capelli (talvolta presenti all'interno degli yellow dots) non sempre visibili mediante tricoscopia. Anche i black dots sono stati descritti con maggior risoluzione rispetto alla tricoscopia. Mentre in tricoscopia tali lesioni sono spesso visibili solamente come un punto nerastro, la FAV ha permesso la visualizzazione diretta dello scompaginamento delle fibre cuticolari del fusto, talvolta evidente come un ammasso nero di cheratina, altre volte visibile con aspetto sfilacciato nerastro (Figura 75-82). Per quanto concerne i grey dots, essi erano indistinguibili dagli yellow dots e white dots in FAV. Essi si osservano a livello delle sopracciglia dei soggetti affetti da AFF, indice di fibrosi e che, per definizione, non presentano peli. Nel campione abbiamo individuato tricoscopicamente la presenza di grey dots a livello del sopracciglio di una paziente affetta da AFF. Queste lesioni però, mediante FAV, grazie all'alta risoluzione dello strumento, si presentavano come lesioni rotondeggianti centrate da un pelo, e dunque corrispondenti a yellow dots anziché grey dots (Figura 83). La FAV in questo caso ha quindi permesso di riconoscere la vera natura della lesione, con implicazioni clinico-terapeutiche ovviamente diverse, dal momento che nel caso di grey dots la ricrescita del pelo non è più possibile. Con la FAV abbiamo identificato anche i white dots, la cui componente fibrotica appariva bianco brillante (Figura 84-85) e un'immagine di red dots (Figura 86), rara lesione tricoscopica presente in corso di LED e corrispondente ad un ostio follicolare circondato da vasi dilatati, i quali, proprio per le capacità della FAV, possono essere visualizzate in maniera precisa e dettagliata grazie al loro contenuto emoglobinico. Sempre a livello

dell'ostio follicolare abbiamo descritto le caratteristiche microscopiche dei keratotic follicular plugs, tipici del LED, e che in FAV risultavano ampiamente visibili come strutture rotonde a contenuto amorfo biancastro, corrispondente all'accumulo di materiale cheratinico (Figura 87), nonché lo startbust sign, raro segno presente in corso di FD (Figura 88). Come già descritto nel gruppo di soggetti sani, la FAV permette una buona osservazione del fusto del capello normale, con una risoluzione quasi sovrapponibile a quella ottenibile in microscopia elettronica. Anche per quanto riguarda le lesioni elementari a carico del fusto del capello, la FAV ha permesso una visualizzazione più minuziosa delle alterazioni già individuate mediante tricoscopia, ossia circle hairs (Figura 97), tricoptilosi e tricoressi nodosa (Figura 99-100), flame hair (Figura 96), pili torti (Figura 93-95) e capelli miniaturizzati (Figure 89-92). Nei capelli intermedi e miniaturizzati, rispetto alla tricoscopia, dove si osserva un quadro più o meno diffuso di depigmentazione, la FAV ha permesso l'osservazione di spots nerastri all'interno del fusto, corrispondenti a singoli clusters di melanociti. Anche i flame hairs erano visibili con maggior dettaglio: questi in tricoscopia si presentano come un fusto di capello corto, nero e dal profilo ondulato; in FAV, invece, erano visibili ad alta risoluzione le alterazioni cuticolari e corticali del fusto, con evidenti fibre disorganizzate, a disposizione ondulata.

In conclusione, l'obiettivo è stato quello di identificare e di descrivere microscopicamente le principali lesioni elementari del cuoio capelluto mediante l'impiego di questa nuova tecnica non invasiva e, dai risultati ottenuti nel campione, la FAV ha dimostrato una buona capacità di visualizzazione e descrizione delle lesioni presenti in tale sede anatomica. Grazie all'alta risoluzione dello strumento, è stato possibile osservare le lesioni elementari indagate con dettaglio cellulare, nella maggior parte dei casi aggiungendo informazioni in più rispetto a quanto già visibile in tricoscopia, e in alcuni casi aiutando ad individuare lesioni non riconoscibili a livello tricoscopico.

CONCLUSIONI

In conclusione, sono state identificate e descritte microscopicamente le principali lesioni elementari del cuoio capelluto mediante l'impiego di questa nuova tecnica non invasiva denominata FAV e confrontando quest'ultima con le corrispettive immagini tricoscopiche.

Riteniamo che tale metodica, attualmente assolutamente embrionale nel suo utilizzo, possa rappresentare un utile strumento non invasivo da affiancare alla valutazione dermoscopica del cuoio capelluto, in grado di raccogliere informazioni aggiuntive e ancor più dettagliate circa le caratteristiche morfo-funzionali delle lesioni della cute del cuoio capelluto e dei capelli.

Sicuramente, ulteriori studi riguardanti tale tecnica sono necessari per poter codificare criteri specifici delle principali patologie alopeciche e per poter avvalorare l'utilizzo della FAV nella pratica clinica quotidiana.

BIBLIOGRAFIA

Abraham LS, Pieiro-Maceira J, Duque-Estrada B, Barcaui CB, Sodr. CT: Pinpoint white dots in the scalp: dermoscopic and histopathologic correlation. *J Am Acad Dermatol* 2010; 63: 721–722.

Alessandrini A, Starace M, Bruni F, et al. Alopecia Areata Incognita and Diffuse Alopecia Areata: Clinical, Trichoscopic, Histopathological, and Therapeutic Features of a 5-Year Study [published correction appears in *Dermatol Pract Concept*. 2019 Dec 31;10(1):e2020027]. *Dermatol Pract Concept*. 2019;9(4):272-277. Published 2019 Oct 31. doi:10.5826/dpc.0904a05

Ankad BS, Beergouder SL, Moodalgiri VM: Lichen planopilaris versus discoid lupus erythematosus: a trichoscopic perspective. *Int J Trichology* 2013; 5: 204–207

Ardigò M, Tosti A, Cameli N, Vincenzi C, Misciali C, Berardesca E. Reflectance confocal microscopy of the yellow dot pattern in alopecia areata. *Arch Dermatol*. 2011 Jan;147(1):61-4

Ardigò M, Torres F, Abraham LS, et al. Reflectance confocal microscopy can differentiate dermoscopic white dots of the scalp between sweat gland ducts or follicular infundibulum. *Br J Dermatol*. 2011 May;164(5):1122-4.

Ardigo` M, El Shabrawi-Caelen L, Tosti A. In vivo reflectance confocal microscopy assessment of the therapeutic follow-up of cutaneous T-cell lymphomas causing scalp alopecia. *Dermatol Ther*. 2014, 27:248–251

Ardigò M, Agozzino M, Franceschini C, Donadio C, Abraham LS, Barbieri L, Sperduti I, Berardesca E, González S. Reflectance confocal microscopy for scarring and non-scarring alopecia real-time assessment. *Arch Dermatol Res*. 2016 Jul;308(5):309-18

Arisi M, Gelmetti A, Zanca A, et al. Clinical, Dermoscopic and In-Vivo Reflectance Confocal Microscopy Evaluation of a Case of Graham Little-Piccardi-Lassueur Syndrome Successfully Treated with Narrowband-UVB Phototherapy. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2020 Aug;10(4):887-892

Garcia Bartels N, Jahnke I, Patzelt A, Richter H, Lademann J, Blume-Peytavi U. Hair shaft abnormalities in alopecia areata evaluated by optical coherence tomography. *Skin Res Technol*. 2011 May;17(2):201-5

Benati E, Longhitano S, Pampena R, et al. Digital follow-up by means of dermatoscopy and reflectance confocal microscopy of actinic keratosis treated with Imiquimod 3.75% cream. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020

Cinotti, E., Cortonesi, G. and Rubegni, P. (2020), High magnification and fluorescence advanced videodermoscopy for hypomelanotic melanoma. *Skin Res Technol*. doi:[10.1111/srt.12855](https://doi.org/10.1111/srt.12855)

Conti A, Ciardo S, Mandel VD, Bigi L, Pellacani G. Speckled variance optical coherence tomography for the assessment of nail involvement in acrodermatitis continua of Hallopeau: A case study. *J Int Med Res*. 2016;44(1 suppl):119-123

De Lacharrere O, Deloche C, Misciali C, Piraccini BM, Vincenzi C, Bastien P, Tardy I, Bernard BA, Tosti A: Hair diversity: a clinical sign reflecting the follicle miniaturization. *Arch Dermatol* 2001; 137: 641–646

Duque-Estrada B1, Tamler C, Sodr. CT, Barcaui CB, Pereira FB: Dermoscopy patterns of cicatricial alopecia resulting from discoid lupus erythematosus and lichen planopilaris. *An Bras Dermatol* 2010; 85: 179–183

Ekelem C, Feil N, Csuka E, Juhasz M, Lin J, Choi F, Asghari A, Heydarlou D, Mesinkovska NA. Optical Coherence Tomography in the Evaluation of the Scalp and Hair: Common Features and Clinical Utility. *Lasers Surg Med*. 2020 Apr 6. doi: 10.1002/lsm.23243

Esteves ALV, Serafini NB, Lemes LR, Melo DF. Circular hairs: nomenclature and meanings. *An Bras Dermatol*. 2017;92(6):874-876. doi:10.1590/abd1806-4841.20176487

Fabris MR, Melo CP, Melo DF: Folliculitis decalvans: the use of dermatoscopy as an auxiliary tool in clinical diagnosis. *An Bras Dermatol* 2013; 88: 814–816.

Fernandez-Nieto D, Segurado-Miravalles G, Gonzalez-Cantero A, Ortega-Quijano D, Jimenez-Cauhe J, Boixeda P. Fluorescence-advanced videodermoscopy characterization of demodex mites: a comparison with reflectance confocal microscopy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020 Sep 14. doi: 10.1111/jdv.16938

Franceschini C, Garelli V, Persechino F, Sperduti I, Caro G, Rossi A, Ardigò M. Dermoscopy and confocal microscopy for different chemotherapy-induced alopecia (CIA) phases characterization: Preliminary study. *Skin Res Technol*. 2020 Mar;26(2):269-276.

Ilie MA, Caruntu C, Lupu M. Current and future applications of confocal laser scanning microscopy imaging in skin oncology. Review. *Oncol Lett* 2019 17:4102-4111

Jain N, Doshi B, Khopkar U. Trichoscopy in alopecias: diagnosis simplified. *Int J Trichology*. 2013;5(4):170-178. doi:10.4103/0974-7753.130385

Karadağ Köse Ö1, Güleç AT. Clinical evaluation of alopecias using a handheld dermatoscope. *J Am Acad Dermatol*. 2012 Aug;67(2):206-14

Kim GW, Jung HJ, Ko HC, Kim MB, Lee WJ, Lee SJ, Kim DW, Kim BS: Dermoscopy can be useful in differentiating scalp psoriasis from seborrhoeic dermatitis. *Br J Dermatol* 2011; 164: 652–656

Kossard S, Zagarella S: Spotted cicatricial alopecia in dark skin. A dermoscopic clue to fibrous tracts. *Australas J Dermatol* 1993; 34: 49–51

Krause K, Foitzik K. Biology of the hair follicle: the basics. *Semin Cutan Med Surg*. 2006 Mar;25(1):2-10

Mandel VD, Manfredini M, Giusti F, et al. The importance of reflectance confocal microscopy for the diagnosis and the follow-up of tinea capitis. *G Ital Dermatol Venereol*. 2019 Oct;154(5):591-593. doi: 10.23736/S0392-0488.16.05245-7. PMID: 31638354

Mandel VD, Cinotti E, Benati E, et al. Reflectance confocal microscopy and optical coherence tomography for the diagnosis of bullous pemphigoid and pemphigus and surrounding subclinical lesions. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018 Sep;32(9):1562-1569.

Mandel VD, Farnetani F, Vaschieri C, et al. Pemphigus with features of both vulgaris and foliaceus variants localized to the nose. *J Dermatol*. 2016 Aug;43(8):940-3

Manfredini M, Greco M, Farnetani F, Ciardo S, De Carvalho N, Mandel VD, Starace M, Pellacani G. Acne: morphologic and vascular study of lesions and surrounding skin by means of optical coherence tomography. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017 Sep;31(9):1541-1546

Mazzilli S, Vollono L, Cosio T, Donati M, Piccolo A, Di Raimondo C, Campione E, Bianchi L. Reflectance Confocal Microscopy Applied to Linear (en Coup de Sabre) Morphea. *Skin Appendage Disord.* 2020 Jun;6(3):171-174

Mazzilli S, Vollono L, Tassone F, Cappilli S, Peris K, Bianchi L. Reflectance Confocal Microscopy Applied to Folliculitis Decalvans: Preliminary Results of a Multicenter Study. *Skin Appendage Disord.* 2020 Jul;6(4):202-206.

Melo DF, De Carvalho N, Ardigò M. et al. Concordance among in vivo reflectance confocal microscopy, trichoscopy, and histopathology in the evaluation of scalp discoid lupus. *Skin Res Technol.* 2020 Mar 20. doi: 10.1111/srt.12852. Online ahead of print. PMID: 32196776

Melo DF, Slaibi EB, Siqueira TMFM, Tortelly VD. Trichoscopy findings in dissecting cellulitis. *An Bras Dermatol.* 2019;94(5):608-611. doi:10.1016/j.abd.2019.09.006

Miteva M, Tosti A: Hair and scalp dermatoscopy. *J Am Acad Dermatol* 2012; 67: 1040–1048

Otberg N, Kang H, Alzolibani AA, Shapiro J: Folliculitis decalvans. *Dermatol Ther* 2008; 238–244

Pampena R, Condorelli A, Cornacchia L, et al. Treatment monitoring of 5-fluorouracil 0.5%/salicylic acid 10% lesion-directed therapy for actinic keratosis using dermoscopy and in-vivo reflectance confocal microscopy. *Dermatol Ther.* 2020 Jun 1:e13744. doi: 10.1111/dth.13744

Panchaprateep R, Tanus A, Tosti A. Clinical, dermoscopic, and histopathologic features of body hair disorders. *J Am Acad Dermatol.* 2015 May;72(5):890-900

Peccerillo F, Mandel VD, Greco M, Ciardo S, Pellacani G. A headstrong case of folliculitis decalvans: Treatment options and evaluation with dermoscopy, reflectance confocal microscopy and optical coherence tomography. *Dermatol Ther.* 2020 Jul 23:e14049. doi: 10.1111/dth.14049.

Piraccini BM, Alessandrini A: Androgenetic alopecia. *G Ital Dermatol Venereol* 2014; 149:15–24

Rajabi-Estarabadi A, Vasquez-Herrera NE, Martinez-Velasco MA, Tsatalis J, Verne SH, Nouri K, Tosti A. Optical coherence tomography in diagnosis of inflammatory scalp disorders. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2020 Feb 20. doi: 10.1111/jdv.16304

Rakowska A1, Slowinska M, Kowalska-Oledzka E, Warszawik O, Czuwara J, Olszewska M, Rudnicka L. Trichoscopy of cicatricial alopecia. *J Drugs Dermatol.* 2012 Jun;11(6):753-8

Ramondetta, Alice et al. "In Vivo Observation of Trombiculosis with Fluorescence-Advanced Videodermatoscopy." *Emerging infectious diseases* vol. 26,8 (2020): 1904-1905. doi:10.3201/eid2608.200077

Rudnicka L, Olszewska M, Rakowska A et al. *Atlas of Trichoscopy: Dermoscopy in Hair and Scalp Disease.* Springer, ed. 2012.

Rudnicka L, Olszewska M, Rakowska A, Slowinska M: Trichoscopy update 2011. *J Dermatol Case Rep* 2011; 5: 82–98

Ruini C, Hartmann D, Bastian M, et al. Non-invasive monitoring of subclinical and clinical actinic keratosis of face and scalp under topical treatment with ingenol mebutate gel 150 mcg/g by means of reflectance confocal microscopy and optical coherence tomography: New perspectives and comparison of diagnostic techniques. *J Biophotonics.* 2019 Jul;12(7):e201800391. doi: 10.1002/jbio.201800391

Rossi A et al. Clinical, Histological and Trichoscopic Correlations in Scalp Disorders, *Dermatology.* 2015;231(3):201-8.

Sanlorenzo M, Vujic I, De Giorgi V, et al. Fluorescence-advanced videodermatoscopy: a new method for in vivo skin evaluation. *Br J Dermatol.* 2017;177(5):e209-e210

Scarfi, F, Gori, A, Silvestri, F, et al. Fluorescence-advanced videodermatoscopy: A promising and potential technique for the in vivo evaluation of vitiligo. *Dermatologic Therapy.* 2019; 32:e12863. <https://doi.org/10.1111/dth.12863>

Scarfi F, Gori A, Topa A, et al. Image Gallery: In vivo fluorescence-advanced videodermatoscopy for the characterization of skin melanocytic pigmented lesions. *Br J Dermatol.* 2019;180(4):e104:

Tosti A, Torres F, Misciali C, et al.: Follicular red dots: a novel dermoscopic pattern observed in scalp discoid lupus erythematosus. *Arch Dermatol* 2009; 145: 1406–1409

Vazquez-Herrera NE, Eber AE, Martinez-Velasco MA, Perper M, Cervantes J, Verne SH, Magno RJ, Nouri K, Tosti A. Optical coherence tomography for the investigation of frontal fibrosing alopecia. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018 Feb;32(2):318-322

Veasey JV, Meneses OMS, da Silva FO. Reflectance confocal microscopy of tinea capitis: comparing images with results of dermoscopy and mycological exams. *Int J Dermatol*. 2019 Jul;58(7):849-851

**INNOVAZIONE IN DERMATOLOGIA:
MESOSCOPIA OPTOACUSTICA (RSOM) PER LA DIAGNOSI NON INVASIVA
(PROGETTO INNODERM)**

Introduzione	p.176
Metodi di imaging dermatologico basati esclusivamente su eccitazione ottica o ultrasonica	p.177
- Metodi di microscopia	p.177
- Metodi di mesoscopia	p.178
- Microscopia confocale ed OCT in tricoscopia.	p.180
Imaging dermatologico mediante scansione raster	p.183
- Mesoscopia optoacustica	
Popolazione e criteri di selezione dei pazienti in studio	p.187
- Disegno e durata dello studio	
- Descrizione della procedura	
- Obiettivi	
- Considerazioni etiche	
Imaging funzionale RSOM nelle malattie della pelle	p.188
- Psoriasi	
- Eczema	
- Sclerodermia	
- Lesioni cutanee maligne	
Limiti attuali	p.190
Conclusioni	p.193
Bibliografia	

Introduzione

Negli ultimi anni sono stati introdotti diversi metodi di imaging non invasivo per facilitare la diagnostica e il monitoraggio della terapia in dermatologia. I metodi di imaging microscopico sono limitati nella loro profondità di penetrazione, mentre i metodi mesoscopici raggiungono profondità maggiori, ma forniscono solo informazioni morfologiche, non funzionali. La "mesoscopia optoacustica a scansione raster" (RSOM), una nuova tecnica di imaging emergente, combina maggior profondità e contrasto basandosi sull'assorbimento della luce e fornendo informazioni morfologiche, molecolari e funzionali.

Esiste un'ampia gamma di malattie dermatologiche che non possono essere diagnosticate o valutate sufficientemente con la sola ispezione visiva. La valutazione istopatologica delle biopsie cutanee è, quindi, uno strumento molto importante e resta, al momento, il gold standard diagnostico in dermatologia. Quest'ultima tuttavia non è solo dispendiosa in termini di tempo e scomoda per il paziente, ma comporta anche rischio di sanguinamento prolungato, infezione della ferita e formazione di cicatrici [1]. Pertanto, le tecniche di imaging cutaneo ad alta risoluzione e non invasive hanno il potenziale di rendere la diagnostica dermatologica più sicura, più veloce e potenzialmente più economica [2]. Inoltre, poiché le tecniche non invasive non alterano il tessuto esaminato, la stessa area può essere valutata ripetutamente nel tempo. Ciò consente un migliore monitoraggio della malattia e una valutazione più accurata delle terapie [3]. Negli ultimi decenni sono stati introdotti in dermatologia diversi metodi di imaging ad alta risoluzione e non invasivi (Tabella 1). Queste modalità possono essere classificate in microscopiche o mesoscopiche a seconda di quanto profondamente nella pelle riescono esaminare le caratteristiche clinicamente rilevanti. I metodi microscopici possono essere utilizzati per profondità di penetrazione inferiori a 0,5-1 mm, mentre i metodi mesoscopici possono penetrare più in profondità, fino a 10 mm [4].

	Microscopia confocale a riflettanza (RCM)	Microscopia multifotonica (MPM)	Tomografia a coerenza ottica (OCT)	Ecografia 20-MHz (HFUS)	Mesoscopia optoacustica raster-scan (RSOM)
Meccanismo di contrasto	Riflessione della luce	Assorbimento della luce	Riflessione di luce	Riflessione di ultrasuoni	Assorbimento di luce
Risoluzione assiale, μm	3-5	1	5-10, 3	30	5
Risoluzione laterale, μm	0.5-1	0.3	10-15.3	200	20
Spessore di penetrazione, μm	0.50x0.50	0.35x0.35	6x6 1.8x1.5	8x12	4x2
Campo visivo	0,50x0.50	0.35x0.35	6x6 1,8x1,5	8x12	4x2
Stato di sviluppo	Pratica clinica	Ricerca clinica	Pratica clinica	Pratica clinica	Ricerca clinica

Metodi di imaging dermatologico basati esclusivamente su eccitazione ottica o ultrasonica

Metodi di microscopia

La microscopia confocale a riflettanza (RCM) è sempre più diffusamente utilizzata nella dermatologia clinica di routine [2,5]. Nella RCM, la pelle è scansionata da un raggio laser e i fotoni retrodiffusi vengono poi successivamente rilevati. Un foro stenopeico viene utilizzato per respingere i fotoni che arrivano da aree fuori fuoco [2,6]. L'RCM può fornire una risoluzione subcellulare, vicina a quella dell'istologia convenzionale (risoluzione assiale, 3-5 μm ; risoluzione laterale, 0,5-1 μm). Tipicamente, tuttavia, l'imaging è limitato a profondità di poche centinaia di micrometri (200-250 μm), corrispondenti al derma papillare o talvolta al derma reticolare superficiale, a causa della diminuzione del segnale confocale con l'aumentare della profondità, principalmente a causa della diffusione della luce [5- 7]. L'RCM può fornire preziose informazioni nella valutazione dei tumori cutanei melanocitici. L'aggiunta di RCM alla dermatoscopia durante lo studio di lesioni melanocitiche sospette può ridurre le escissioni non necessarie [2,8,9].

La microscopia multifotonica (MPM) costituisce un'altra promettente modalità microscopica, sebbene non faccia ancora parte della diagnostica dermatologica di routine. L'MPM utilizza l'eccitazione multifotone per generare fluorescenza dai fluorofori tissutali (principalmente NADH/NADPH, melanina, cheratina ed elastina) nonché segnali armonici, ad es. segnali di seconda armonica da biomolecole non centrosimmetriche, principalmente collagene [1,10-13].

La MPM raggiunge una risoluzione laterale di circa 0,3 μm e una risoluzione assiale di circa 1 μm . Quando si esegue l'imaging della pelle, l'MPM è limitato a una profondità di penetrazione di 200 μm [1]. L'MPM mostra il potenziale per la diagnosi precoce del melanoma perché può identificare le caratteristiche istologiche associate alla malignità, come l'architettura disordinata dei tessuti e delle cellule e la presenza di cellule pleomorfe o dendritiche nell'epidermide superficiale. Inoltre, MPM può rilevare segni distintivi di malattia invisibili alla microscopia ottica. Uno studio ha rilevato che l'MPM è altamente sensibile e specifica nel differenziare le lesioni melanocitiche benigne e maligne [14,15]. La capacità dell'MPM di visualizzare e misurare il contenuto di collagene nella pelle [16] può facilitare la valutazione dell'invecchiamento cutaneo [17] e della sclerodermia [18]. Sia l'RCM che l'MPM sono adatti solo per lesioni sottili e superficiali perché la luce è fortemente dispersa mentre passa attraverso i tessuti. Strutture situate o che si estendono più in profondità del derma papillare, come molti melanomi nodulari, o che presentano una distinta ipercheratosi, spesso riscontrata nei melanomi acrali lentiginosi e i tumori della pelle non melanocitari, non possono essere valutati in modo completo [19-21]. Inoltre, offrono piccoli campi visivi, di soli 0,5 x 0,5 mm² circa, e quindi spesso non possono visualizzare intere lesioni contemporaneamente. Ciò può complicare la valutazione dell'architettura strutturale, che è spesso un criterio diagnostico cruciale, ad es. nelle lesioni melanocitiche [1]. L'unione di immagini più piccole in una più grande può superare questa limitazione, ma richiede molto più tempo rispetto all'acquisizione di immagini singole [5].

Metodi di mesoscopia

Le modalità di imaging mesoscopico compensano la dispersione della luce, fornendo una penetrazione più profonda. Inoltre, in genere forniscono campi visivi più ampi fino a diversi mm². Questi metodi rilevano il contrasto in base alla riflessione o all'assorbimento di energia. L'imaging basato sulla riflessione tende a fornire principalmente informazioni morfologiche, mentre l'imaging basato sull'assorbimento da informazioni sulla distribuzione di biomolecole specifiche e in alcuni casi può persino indicarne le concentrazioni [22]. Le due tecniche di imaging mesoscopico più importanti, la tomografia a coerenza ottica (OCT) e l'ecografia ad alta frequenza (HFUS) [23] sono basate sulla riflessione: l'OCT rileva la luce riflessa, mentre l'HFUS rileva gli ultrasuoni [22].

La tomografia a coerenza ottica è sempre più utilizzata nella pratica clinica dermatologica. Nell'OCT, il tessuto cutaneo è illuminato con luce a bassa coerenza e i fotoni riflessi vengono rilevati dall'interferometria, che consente l'abbinamento di coerenza tra la luce riflessa e un raggio di riferimento. Questo processo è chiamato gating di coerenza e fa sì che i fotoni diffusi in modo multiplo vengano rifiutati, raggiungendo una penetrazione fino a 1–2 mm [24,25]. L'imaging OCT convenzionale offre una risoluzione assiale di 5–10 μm e una risoluzione laterale di 10-15 μm . L'OCT ad alta definizione, recentemente

descritto, può raggiungere una risoluzione di 3 μm lungo tutti gli assi, ma la profondità di penetrazione è limitata a circa 570 μm [24]. L'OCT viene utilizzato per valutare se una lesione sospetta non-melanocitica è maligna e per valutare i margini di escissione; in questi contesti, l'OCT serve solitamente come strumento complementare quando l'ispezione clinica e la dermatoscopia sono inconcludenti [26,27]. Come metodo basato sulla riflessione, l'OCT fornisce principalmente informazioni morfologiche [22], poiché il massimo contrasto si ottiene all'interfaccia dei tessuti. Nuovi metodi angiografici OCT sensibili al flusso come il Dynamic OCT (D-OCT) possono rilevare parti della microcircolazione cutanea e creare immagini sovrapposte con immagini OCT morfologiche convenzionali, consentendo una valutazione simultanea. Finora hanno mostrato il potenziale per fornire un monitoraggio oggettivo durante la terapia topica vasocostrittiva della rosacea e potrebbero aiutare nella differenziazione dei tumori cutanei non-melanoma e dei loro precursori, basandosi su modelli microvascolari [3,28-31]. Lo svantaggio principale consiste nel fatto che il loro utilizzo è limitato a profondità di circa 500 μm e le immagini risultanti offrono informazioni di profondità relativamente scarse a causa di forti artefatti nella direzione assiale. Di conseguenza, le informazioni rilevanti sono per lo più limitate alla superficie [24,28,32,33].

Come l'OCT, l'ecografia dipende dal contrasto generato all'interfaccia, in questo tra mezzi di diversa impedenza acustica [34]. Le onde ultrasoniche sono significativamente meno influenzate dalla dispersione nei tessuti rispetto alla luce impiegata dall'OCT e da altre modalità di imaging ottico. Pertanto, i metodi di imaging basati sugli ultrasuoni possono generalmente penetrare più in profondità preservando una buona risoluzione [35,36]. Tuttavia, sia la profondità di penetrazione che la risoluzione dipendono dall'intervallo di frequenza in cui opera il trasduttore. L'HFUS offre una migliore risoluzione assiale, ma una penetrazione meno profonda, rispetto all'ecografia convenzionale. Ad esempio, l'HFUS che utilizza un trasduttore con una frequenza centrale di 100 MHz fornisce una risoluzione assiale di 16 μm a una profondità di 1,5 mm. L'HFUS a frequenze leggermente più basse, che è più ampiamente utilizzato, fornisce una risoluzione inferiore ma può fornire immagini più in profondità: HFUS utilizzando un trasduttore con una frequenza centrale di 20 MHz può fornire una risoluzione assiale di 30 μm a una profondità di 10 mm [34]. La risoluzione laterale di sistemi di ecografia clinica con trasduttori da 20 MHz è di circa 200 μm [37]. Una delle principali applicazioni cliniche dell'HFUS è la valutazione preoperatoria dello spessore del melanoma, che è importante per la pianificazione dell'intervento chirurgico e la stadiazione del tumore [34,38-40]. A causa delle difficoltà nel distinguere il tumore maligno dal tessuto melanocitario o linfocitario benigno adiacente, l'HFUS tende a sovrastimare lo spessore del melanoma [41-43]. Inoltre, la qualità dell'imaging HFUS è generalmente influenzata negativamente da forti effetti "speckle" e, come modalità di imaging basata sulla riflessione, è relativamente insensibile alle proprietà fisiopatologiche dell'infiammazione o dell'angiogenesi [44]. Il Doppler HFUS può visualizzare il flusso sanguigno cutaneo senza utilizzare agenti di contrasto esogeni,

tuttavia tali agenti sono necessari per visualizzare la microvascolarizzazione con diametri inferiori a 100 μm [45].

Microscopia confocale ed OCT in tricoscopia.

Come già anticipato, la dermoscopia è attualmente la tecnica diagnostica non invasiva d'eccellenza per lo studio delle lesioni cutanee e del cuoio capelluto. Ciò nonostante, ulteriori metodiche non invasive sono state sviluppate e studiate nel corso degli anni, con l'obiettivo di affiancare alla dermoscopia ulteriori tecniche in grado di fornire valutazioni ancora più dettagliate della cute, sia da un punto di vista morfologico che funzionale. Tra le metodiche di maggior rilievo spiccano la microscopia confocale e la tomografia a coerenza ottica (OCT).

La microscopia laser confocale è uno strumento non invasivo dotato di un raggio laser a bassa potenza (830 nm) in grado di riprodurre immagini tissutali in real time, con una risoluzione d'immagine quasi comparabile ad un'immagine istologica.

Si distinguono la microscopia laser confocale a fluoerescenza e la microscopia laser confocale a riflettanza (Reflectance-mode Confocal scanning laser Microscopy - RCM). Mentre la prima richiede l'amministrazione di un agente fluorescente per generare contrasto, ed è stata impiegata soprattutto in studi sperimentali, la seconda si basa su differenti indici di rifrazioni delle strutture cellulari ed è ad oggi ampiamente utilizzata.

L'RCM è costituita da una sorgente di luce puntiforme (sorgente laser), da un obiettivo, da una lente condensatrice e da un detector della radiazione luminosa (foto detector). Gli strumenti in commercio utilizzano una sorgente laser a diodi con lunghezza d'onda di 830 nm e una potenza di 5-10 mW come fonte di luce coerente e monocromatica. Tale metodica sfrutta dunque le variazioni naturali dell'indice di rifrazione di organuli e microstrutture della cute per creare un'immagine dettagliata dell'epidermide fino al derma su un piano orizzontale (en face), esattamente come la dermatoscopia.

Nelle immagini in scala di grigio del confocale, gli elementi che appaiono molto luminosi (bianchi) sono costituiti da componenti con un indice di rifrazione molto più alto di quello delle strutture vicine; le caratteristiche chimiche, ad esempio, della melanina, del collagene idratato e della cheratina li fanno apparire più "brillanti" del contesto in cui sono inseriti. Gli elementi più scuri, invece, sono quelli meno riflettenti; aria e acqua al confocale appaiono neri e costituiscono una sorta di ostacolo alla penetrazione del laser nella cute. Il sistema permette di raggiungere una profondità di 200-250 μm , permettendo la visualizzazione dell'epidermide, del derma papillare e di parte del derma reticolare.

L'RCM è attualmente considerata la metodica complementare alla dermoscopia più importante e potente per quanto concerne la dermatologia oncologica, utile per la valutazione di lesioni melanocitarie, non melanoma skin cancers (NMSC) e patologie infiammatorie. L'RCM viene impiegata per la diagnosi di lesioni cutanee, quali il melanoma (soprattutto la lentigo maligna) e i NMSC; inoltre, viene utilizzata per il monitoraggio di trattamenti (per esempio terapie a base di Imiquimod 5% crema su

cheratosi attiniche) o per la valutazione dei margini ex vivo in corso di chirurgia di Mohs. L'RCM ha come sue principali indicazioni lo studio di lesioni localizzate a livello del testa-collo, lo studio di lesioni dermoscopicamente caratterizzate da regressione e lo studio di tumori amelanotici. Inoltre, può essere impiegata per lo studio di condizioni infiammatorie, come ad esempio la psoriasi e l'eczema, e per patologie infettive come la scabbia.

In ambito tricologico la RCM non è molto utilizzata.

L'RCM è stata adoperata per descrivere gli YD in sei pazienti affetti da AA. Con tale tecnica, gli YD apparivano come strutture luminali rotondeggianti, circondate da epitelio follicolare e ripiene di materiale altamente brillante corrispondente alla cheratina, ben distinguibili dagli sbocchi ghiandolari che invece apparivano scuri. Alcuni YD presentavano fusti di capelli residui e a livello perifollicolare erano visibili cellule infiammatorie sparse (Ardigò et al., 2011). L'RCM permette anche di distinguere i WD dagli sbocchi ghiandolari e dagli infundiboli follicolari (Ardigò et al., 2011).

Uno dei principali studi sull'utilizzo dell'RCM a livello del cuoio capelluto è stato effettuato nel 2016 da Ardigò et al. (Ardigò et al., 2016). Su un campione di 86 pazienti, gli autori hanno raccolto e descritto le principali caratteristiche microscopiche delle alopecie cicatriziali (28 pazienti con LPP e 9 con LED) e non cicatriziali (30 pazienti con AGA e 19 con AA) visibili all'RCM, identificando criteri microscopici utili per la diagnosi differenziale tra questi due tipi di alopecia. In dettaglio, criteri quali l'infiltrazione di cellule infiammatorie a livello intraepidermico e perianessiale, la presenza di melanofagi e quadri di degenerazione sclerotica dermica sono stati associati in maniera statisticamente significativa al gruppo di alopecie cicatriziali, mentre miniaturizzazione e rimming delle papille dermiche erano più frequenti nelle forme di alopecia non cicatriziale (Ardigò et al., 2016). In un recente studio di Franceschini et al. (Franceschini et al., 2020), l'RCM è stata utilizzata per la caratterizzazione di 16 casi di CIA, consentendo la suddivisione di tale condizione in diverse fasi di malattia. Inoltre, l'RCM ha permesso l'identificazione dei cosiddetti "CIA dots" (non identificabili in dermoscopia), lesioni presenti in fase iniziale e corrispondenti ad osti follicolari dilatati e ripieni di materiale amorfo non omogeneo, contenente frammenti di capelli o capelli normali (Franceschini et al., 2020)

egli ultimi anni, l'RCM è stata utilizzata anche per lo studio di condizioni patologiche del cuoio capelluto quali FD (Mazzilli et al., 2020; Peccerillo et al., 2020), linfomi (Ardigò et al., 2020), LED (Melo et al., 2020), morfea en coup de sabre (Mazzilli et al., 2020), Tinea Capitis (Mandel et al., 2019; Veasey et al., 2019), sindrome di Graham-Little-Piccardi-Lassueur (Arisi et al., 2020), nonché come strumento per il monitoraggio terapeutico di trattamenti topici delle cheratosi attiniche del cuoio capelluto (Pampena et al., 2020; Benati et al., 2020). L'RCM presenta però delle limitazioni, tra cui la profondità dell'immagine, che non supera i 200-300 µm e che a livello del cuoio capelluto non permette la visualizzazione della porzione inferiore del follicolo; inoltre, i tessuti devono essere appiattiti e a livello dello scalpo questo può essere un ostacolo. Una grande

limitazione dell'RCM è rappresentata dall'alto costo dei microscopi, che ne riduce enormemente la diffusione; in più, è necessario un training intenso dell'osservatore per la corretta interpretazione delle immagini (Ilie et al., 2019). OCT è l'acronimo di Optical Coherent Tomography (tomografia a coerenza ottica). È un esame che permette di analizzare la retina, soprattutto a livello della parte centrale (macula), fornendo immagini di sezioni tra loro perpendicolari che studiano lesioni non evidenziabili con la normale visita oculistica. Quindi, l'OCT dà informazioni sullo spessore della retina, sulla sua morfologia e sul rapporto tra i vari strati che la compongono.

Tale tecnica in vivo è stata impiegata anche in ambito dermatologico. L'OCT produce immagini ad alta risoluzione di sezioni di tessuto trasversali, e per questo motivo rappresenta un approccio ottimale in particolare per lo studio delle unghie. Raccoglie immagini di un'area di cute di 6x6 mm e di profondità fino a 2 mm, con una risoluzione laterale di 7.5 μm e una risoluzione assiale di 5 μm . L'OCT è molto utile anche per il rilevamento del flusso sanguigno (Conti et al., 2016).

Tale tecnica è stata adoperata per la visualizzazione delle lesioni bollose in corso di pemfigo e pemfigoide (Mandel et al., 2016; Mandel et al., 2018), per la valutazione morfologica e lo studio vascolare dell'acne (Manfredini et al., 2017), per lo studio del coinvolgimento ungueale in corso di acrodermatite continua di Hallopeau (Conti et al., 2016). Per quanto concerne il cuoio capelluto, l'OCT è stato impiegata in pochi studi (Ekelem et al., 2020). In letteratura è presente uno studio di Peccerillo et al. che tratta l'impiego dell'OCT per lo studio di un caso di follicolite decalvante (FD). Mediante OCT, gli autori hanno potuto osservare i classici aspetti dell'FD, come i tufted hairs, le lesioni pustolose nonché un intenso segnale vascolare con dilatazione del plesso vascolare profondo a livello dell'area perifollicolare (Peccerillo et al., 2020). Bartels et al. hanno utilizzato l'OCT per la valutazione delle alterazioni del fusto del capello in corso di AA, identificando una significativa riduzione della sezione trasversale del fusto a livello delle placche di AA in rapporto alle aree non affette (Bartels et al., 2011). Vazquez-Herrera et al. invece hanno adoperato l'OCT per lo studio dell'AFF, riscontrando una riduzione dello spessore epidermico a livello della banda fibrosa e un aumento a livello dell'attaccatura in fase infiammatoria, nonché alterazioni vascolari a livello della banda fibrosa, con riduzione del flusso negli strati superficiali e aumento del flusso a livello dei vasi inferiori (Vazquez-Herrera et al., 2018). Recentemente, l'OCT è stata utilizzata anche per lo studio della vascolarizzazione in corso di patologie infiammatorie del cuoio capelluto (Rajabi-Estarabadi et al., 2020) e per il monitoraggio terapeutico di cheratosi attiniche del cuoio capelluto (Ruini et al., 2019).

Imaging dermatologico mediante scansione raster

Mesoscopia optoacustica

L'imaging optoacustico si basa sul rilevamento delle onde ultrasoniche generate all'interno della pelle in risposta all'illuminazione a luce pulsata. Le biomolecole che assorbono la luce assorbono l'energia fotonica depositando calore nel tessuto che porta all'espansione termo-elastica. Questa espansione produce onde ultrasoniche, che vengono rilevate dai trasduttori. Il software viene utilizzato per convertire le informazioni del fronte d'onda in una ricostruzione di immagini 3D. Le immagini risultanti mostrano la distribuzione delle biomolecole che assorbono la luce nei tessuti. La lunghezza d'onda dell'illuminazione viene scelta per rilevare il contrasto dalla biomolecola desiderata: ad esempio, le lunghezze d'onda nella gamma del visibile o del vicino infrarosso dello spettro luminoso possono essere utilizzate per rilevare l'emoglobina, consentendo l'imaging dei vasi [4,46].

Negli ultimi anni sono stati testati diversi approcci optoacustici per l'imaging cutaneo. Mentre i metodi optoacustici macroscopici che utilizzano ampi schemi di illuminazione e array di rivelatori a ultrasuoni penetrano fino a 3 cm di profondità e sono stati utilizzati per l'imaging di vasi più grandi e stime dello spessore del melanoma, la loro risoluzione (tipicamente 100-300 μm) non è sufficiente per l'imaging della piccola vascolarizzazione dermica [47-49]. I dispositivi optoacustici microscopici, d'altra parte, utilizzano luce focalizzata per generare segnali a ultrasuoni da un'area molto ristretta. Ciò consente l'imaging ad alta risoluzione che riesce a rappresentare la microvascolarizzazione superficiale. La profondità di penetrazione di tali sistemi è però fondamentalmente limitata dalla diffusione della luce e, quindi, simile a quella di RCM o MPM. I metodi di mesoscopia optoacustica utilizzano schemi di illuminazione non focalizzati in combinazione con un rivelatore di ultrasuoni focalizzati, che consente l'imaging a profondità di diversi millimetri mantenendo alta risoluzione [54-58]. Un limite fondamentale dei sistemi precedenti è, tuttavia, la stretta larghezza di banda dei rivelatori a ultrasuoni applicati. L'intervallo delle frequenze ultrasoniche emesse dai microvasi è molto ampio e dipende dalla loro dimensione e profondità. Pertanto, è necessario un rivelatore acustico a banda ultra larga per risolvere contemporaneamente piccoli capillari e vasi dermici più grandi attraverso l'intera profondità della pelle. Ad oggi, solo la mesoscopia optoacustica a scansione raster (RSOM), che utilizza nuovi trasduttori a ultrasuoni a base di niobato di litio con una larghezza di banda estesa da 10 a 180 MHz, ha dimostrato questa capacità, rendendola adatta alla ricerca dermatologica clinica [33,59,60].



In RSOM, l'area di interesse viene scansionata riga per riga in modalità raster utilizzando un singolo rilevatore a ultrasuoni combinato con la sorgente di illuminazione.

In genere il campo visivo misura $4 \times 2 \text{ mm}^2$, che supera significativamente quello dei metodi al microscopio ottico come RCM e MPM. Il tempo necessario per scansionare un'area di queste dimensioni è di circa 70 secondi [33]. Campi visivi più grandi (fino a $8 \times 8 \text{ mm}^2$) sono possibili ma richiedono una scansione più lunga. In linea di principio, la risoluzione RSOM dipende dalla profondità allo stesso modo di HFUS; in entrambi i casi, le immagini sono derivanti da onde ultrasoniche. Una differenza importante è che mentre l'HFUS impiega segnali a banda stretta (ad es. 5-20 MHz), le onde optoacustiche indotte nel tessuto da RSOM mostrano uno spettro di frequenza a banda ultra larga.

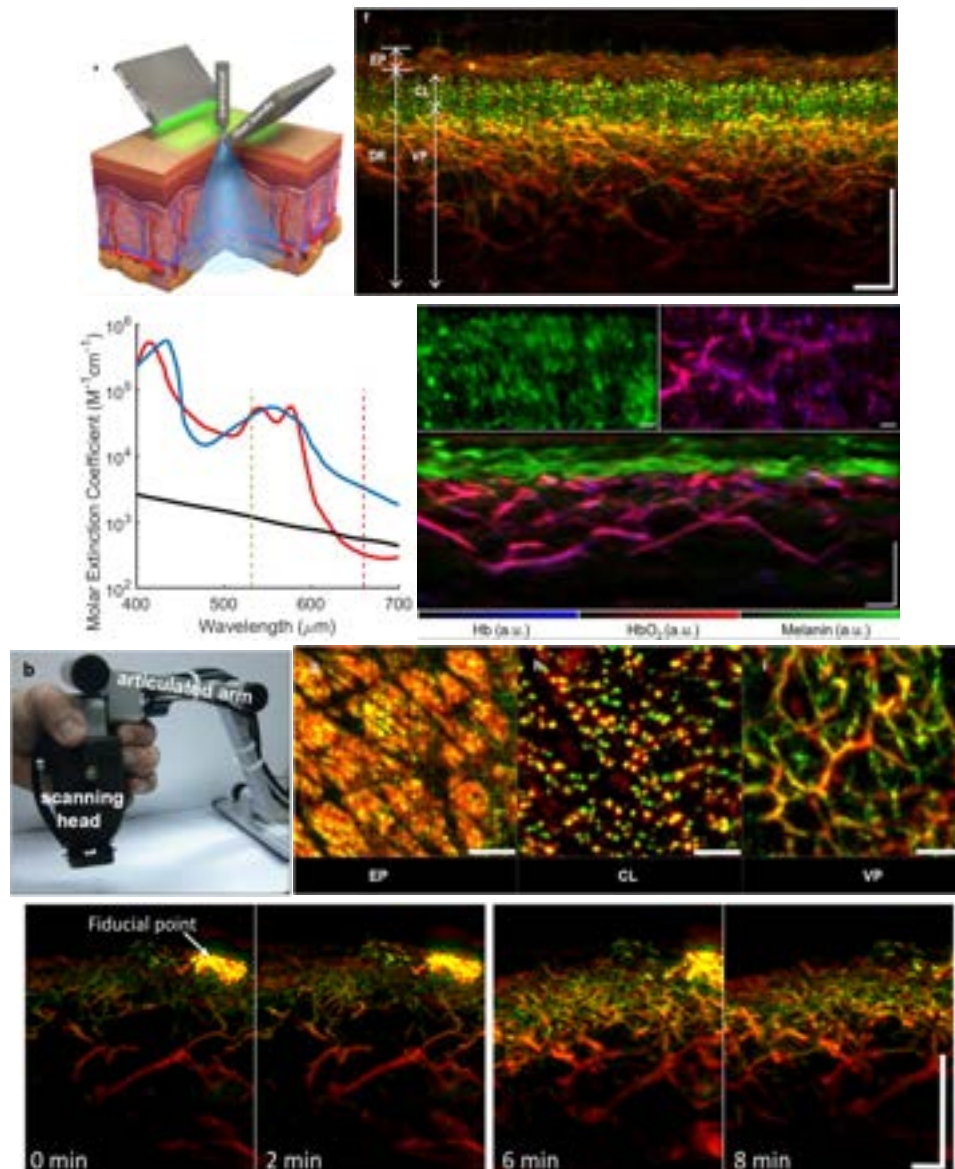
Utilizzando trasduttori a base di niobato di litio [33] RSOM raggiunge una risoluzione di $20 \mu\text{m}$ nella dimensione laterale e $5 \mu\text{m}$ nella dimensione assiale attraverso l'intera profondità della pelle. Questa performance senza precedenti ha fornito le prime elaborate immagini dell'architettura microvascolare della pelle, in cui sono visibili i più piccoli capillari vicini all'epidermide insieme alle più grandi arteriole e venule del plesso vascolare profondo. Inoltre, piccole caratteristiche delle immagini RSOM possono essere migliorate ricostruendo separatamente i segnali a ultrasuoni a bassa e alta frequenza, seguiti dall'equalizzazione del contenuto in frequenza [33].

In effetti, RSOM può fornire un rapporto più elevato tra risoluzione e profondità per l'imaging del derma rispetto a qualsiasi altro metodo di imaging dermatologico [33].

Quando la pelle è illuminata a una singola lunghezza d'onda nella gamma visibile o nel vicino infrarosso dello spettro luminoso, il segnale ultrasonico risultante proviene quasi esclusivamente dall'emoglobina e dalla melanina, che hanno coefficienti di assorbimento

ottico ordini di grandezza maggiori di quelli di altre biomolecole. La mesoscopia optoacustica può, quindi, visualizzare l'albero vascolare e la distribuzione della melanina praticamente senza segnale di fondo, fornendo un contrasto eccellente senza la necessità di alcun contrasto esogeno. La segmentazione delle immagini per isolare l'albero vascolare è spesso semplice, poiché le strutture ricche di melanina di solito non si sovrappongono morfologicamente alle strutture vascolari (Fig. 1) [33,59]. Quando la pelle è illuminata a più di una lunghezza d'onda (modalità multispettrale) [61,62] è possibile risolvere la distribuzione e la concentrazione relativa di diverse biomolecole fotoassorbenti. I cosiddetti algoritmi di unmixing spettrale vengono utilizzati per identificare i contributi delle diverse biomolecole alle onde ultrasoniche rilevate complessivamente dal trasduttore. Ciò consente di valutare la posizione di ossiemoglobina, deossiemoglobina e melanina all'interno della pelle (Fig. 1) [61,62]. La profondità di penetrazione della mesoscopia optoacustica a scansione raster dipende dalla lunghezza d'onda della luce laser. Nella gamma di lunghezze d'onda più frequentemente applicate di 420-570 nm, la tecnica può fornire immagini attraverso l'intero spessore della cute, penetrando di circa 1,5 mm. Lo spostamento delle lunghezze d'onda nella regione del rosso e del vicino infrarosso dello spettro luminoso (570-900 nm) aumenta la penetrazione del sistema fino a 5 mm [33,36] perché il tessuto assorbe la luce più debolmente a queste lunghezze d'onda.

Nella pelle sana, le immagini RSOM consentono di valutare lo strato di melanina epidermica, le anse dei capillari dermici, il plesso orizzontale sottostante del derma e i vasi dermici più profondi (Fig. 1). Lo spessore epidermico misurato si correla abbastanza bene con l'istologia [33]. Unica tra le tecniche di imaging dermatologico, la RSOM può, quindi, monitorare in modo completo la reattività del microcircolo dermico al riscaldamento locale fino alla visualizzazione di un singolo vaso (Fig. 1) [63]. La struttura e la funzione della vascolarizzazione cutanea possono rivelare informazioni sui disturbi sistemici come le malattie cardiovascolari e il diabete mellito [64], quindi RSOM può eventualmente migliorare la valutazione del rischio in queste epidemiche condizioni mediche. La capacità di RSOM di visualizzare la morfologia e la vascolarizzazione dell'epidermide fino al livello capillare ha già dimostrato di fornire informazioni preziose nel contesto di diverse malattie dermatologiche.



Mesoscopia optoacustica a scansione raster (RSOM): illustrazione del sistema e imaging della pelle sana. (a) Illustrazione schematica di un sistema RSOM, raffigurante la configurazione del rilevatore a ultrasuoni (trasduttore) e dei fasci di illuminazione. (b) Immagini RSOM di pelle sana in sezione trasversale. Strutture più piccole (es. piccoli vasi) emettono segnali ultrasonici ricchi di componenti ad alta frequenza (raffigurati in verde); strutture più grandi (es. vasi più grandi) emettono segnali ricchi di componenti a bassa frequenza (raffigurati in rosso). Scala, 500 μm . (c) Fotografia della testa di scansione Rsom attaccata a un braccio articolato. (d) Immagini RSOM di strati di pelle nelle sezioni frontali. CL, anse capillari; RD, derma; EP, epidermide; VP, plesso vascolare. Scala, 500 μm . (e) Spettri di assorbimento di melanina, ossi- e deossiemoglobina in funzione della lunghezza d'onda della luce applicata. A 532 nm, i tre cromofori assorbono ugualmente fortemente ed emettono quindi segnali optoacustici ugualmente intensi. A 660 nm, l'assorbimento più debole da parte dell'ossi- e deossiemoglobina consente un'immagine ampiamente selettiva della distribuzione della melanina della pelle. F B, sezione trasversale attraverso lo strato dermico; e C, sezione trasversale attraverso l'intera pelle. Scala, 250 μm . (g) Sezione trasversale della pelle dell'avambraccio prima del riscaldamento locale (minuti 0 e 2) e dopo il riscaldamento locale (minuti 6 e 8) da 25 a 44°C. Il riscaldamento provoca vasodilatazione reattiva. Scala, 500 μm . Pannelli modificati da Aguirre et al. (2017)33; <https://omlc.org/spectra/hemoglobin/>; Schwarz et al. (2016)61; Berezhnoi et al. (2018).63

Popolazione e criteri di selezione dei pazienti in studio

Lo studio osservazionale include 25 pazienti adulti (età > 18 anni) con diverse malattie della pelle. In questi, la tecnica RSOM2 non invasiva è stata utilizzata sulla pelle lesionata e clinicamente sana. Le donne incinte/ o in allattamento non sono state incluse.

Disegno e durata dello studio

Studio prospettico, di coorte della durata di 36 mesi

Descrizione della procedura

La tecnologia optoacustica si basa sulla rilevazione di onde acustiche indotte dalla luce laser. Sia la tecnica di irradiazione con diversi laser che l'ecografia sono già ampiamente utilizzati nella diagnosi e nel trattamento delle malattie della pelle. Pertanto, il loro effetto collaterale è molto prevedibile e trascurabile o addirittura inesistente per dosi di energia scelte appropriatamente.

La testa di scansione del dispositivo RSOM2 verrà posizionata su circa 1 cm² di cute lesionale e non lesionale. Le aree da esaminare saranno irraggiate con impulsi ultracorti di luce lunghezza d'onda variabile. I segnali acquisiti saranno divisi in due bande di frequenza e ricostruiti in modo indipendente attraverso un algoritmo per ottenere immagini tridimensionali.

Obiettivi

Obiettivo primario del progetto INNODERM è generare immagini optoacustiche di varie patologie cutanee mediante la tecnologia RSOM2, al fine di validare un nuovo prototipo di dispositivo RSOM2 e la fattibilità delle nuove funzionalità di imaging per consentire progressi misurabili nella diagnosi e nel monitoraggio del trattamento della malattia della pelle.

Al fine di confermare la fedeltà di RSOM2 rispetto allo standard diagnostico nella pratica clinica attuale, le immagini optoacustiche saranno confrontate con sezioni istologiche di campioni biotici di cute in un sottogruppo di pazienti.

Considerazioni etiche

INNODERM è uno studio osservazionale sulla tecnologia RSOM2 per la diagnosi non invasiva delle malattie della pelle. Precedenti studi hanno confermato l'assenza di effetti della temperatura indotti da RSOM2 sulla fisiologia della pelle. L'investigatore responsabile assicura che questo studio verrà condotto in accordo sia con la Dichiarazione di Helsinki (emendamenti di Tokyo, Venezia, Hong Kong e Somerset West) sia con la legge e i regolamenti italiani. Il protocollo e i suoi allegati sono soggetti a revisione e approvazione da parte del competente comitato etico indipendente.

Imaging funzionale RSOM nelle malattie della pelle

L'RSOM multispettrale può visualizzare la distribuzione e le concentrazioni relative di diverse biomolecole che assorbono la luce, le migliori delle quali sono la melanina e l'ossie deossiemoglobina [36]. La capacità di quantificare i livelli di ossi- e deossiemoglobina consente di determinare lo stato di ossigenazione dei singoli microvasi. Ad esempio, uno studio ha misurato la saturazione media di ossigeno dell'85% nei vasi dermici superficiali e del 54% nelle vene dermiche più profonde [61]. Questa capacità può rendere la RSOM adatta alla diagnosi o al monitoraggio di malattie cutanee associate all'ipossia come la sclerosi sistemica, [81] così come la maggior parte dei tipi di ferite croniche [82,83]. Inoltre, l'identificazione delle aree ipossiche può facilitare la diagnosi precoce di molti tumori maligni, inclusi i melanomi, poiché l'ipossia svolge un ruolo importante nella progressione e nell'invasività [84,85]. Anche l'ipossia può essere importante nella resistenza del melanoma alla chemioterapia [86].

Sono in corso ricerche per estendere l'RSOM multispettrale ad altri componenti della pelle come i lipidi illuminando la pelle con luce infrarossa. L'imaging lipidico potrebbe essere utile per monitorare i risultati del trattamento nell'eczema atopico, in cui la pelle è depauperata dai lipidi [87].

Psoriasi

Aguirre et al. [33] hanno dimostrato il potenziale dell'RSOM nell'incrementare l'obiettività nella valutazione della gravità della psoriasi. La psoriasi è una malattia autoimmune cronica che più comunemente coinvolge la pelle con placche eritemato-desquamanti. A causa del suo caratteristico aspetto microscopico, l'istologia costituisce uno strumento importante per la diagnosi. Attualmente, la valutazione quantitativa della psoriasi si basa principalmente su caratteristiche cliniche soggettive: l'ampiamente utilizzato Psoriasis Area and Severity Index (PASI) è calcolato in base a eritema, infiltrazione, desquamazione ed estensione delle placche [65]. Questi parametri mancano di precisione e il punteggio è influenzato da una notevole variabilità inter-osservatore [66,67]. Inoltre, tiene conto solo delle caratteristiche superficiali e ignora la morfologia e la vascolarizzazione della placca, sebbene l'angiogenesi sia stata identificata come uno dei principali segni di progressione della malattia [68 ,69]. La mesoscopia optoacustica a scansione raster delle placche psoriasiche ha rilevato caratteristiche patologiche sottostanti, vale a dire acantosi cutanea, anse capillari dilatate e allungate e un aumento del diametro dei vasi dermici (Fig. 2). Questi risultati, inclusi i diametri dei vasi, erano in accordo con quanto rilevato all'istologia e all'immunoistochimica (Fig. 2). Al fine di misurare oggettivamente la gravità della malattia, gli autori hanno suggerito un indice optoacustico basato sulla RSOM (OPIND) calcolato da caratteristiche quantitative nelle immagini RSOM che riflettono il grado di infiammazione e angiogenesi. Queste caratteristiche includono lo spessore dell'epidermide, il volume totale di sangue nel derma, il numero frattale della struttura vascolare, nonché la densità e il diametro medio

delle anse capillari. Il lavoro preliminare ha suggerito una buona correlazione tra OPIND e il punteggio PASI locale nell'analisi della placca singola (Fig. 2). Gli autori hanno concluso che l'imaging RSOM non invasivo della psoriasi può aiutare a chiarire alcuni aspetti della malattia e monitorarne la progressione e gli esiti conseguenti alle terapie [33].

Eczema

L'eczema è un diverso tipo di infiammazione cutanea in gran parte di origine atopica, tossica o allergica caratterizzato da eritema, papule e prurito, talvolta anche vescicole, bolle o lichenificazione. Nella pelle affetta da eczema atopico, l'imaging RSO ha rilevato meno acantosi e allungamento delle anse capillari rispetto alla pelle psoriasica [33]. Al contrario, RSOM ha rilevato un allungamento e una dilatazione prominenti delle anse capillari nell'eczema allergico da contatto indotto da dibromodicianobutano (classificato clinicamente come ++ positivo), ma queste anse erano distribuite diversamente e in maniera più irregolare nell'eczema da contatto rispetto alla psoriasi. Entrambi i tipi di eczema presentavano cambiamenti correlati all'infiammazione del sistema vascolare dermico, in particolare dilatazione e aumento della densità dei vasi.

Potrebbe essere possibile derivare un punteggio basato su RSOM analogo all'OPIND per quantificare le caratteristiche e la gravità dei diversi tipi di dermatite. È notoriamente difficile distinguere forme lievi di reazione allergica di tipo IV da reazioni irritative nei test allergologici epicutanei [70,71]. La capacità della RSOM di valutare le strutture microvascolari in diversi strati della pelle [33] può facilitare tale differenziazione perché la dermatite allergica e quella irritativa sembrano coinvolgere vasi superficiali e vasi dermici profondi con differenti gravità [72,73].

Sclerodermia

La capillaroscopia è uno strumento consolidato per la valutazione dei capillari delle pieghe ungueali nella diagnosi della sclerodermia, una malattia cronica del tessuto connettivo che porta all'indurimento della pelle e colpisce frequentemente gli organi interni. Questo approccio diagnostico è, tuttavia, limitato agli strati superficiali della struttura microvascolare della piega ungueale e l'epidermide secca o ispessita può compromettere gravemente la qualità dell'immagine [74-76]. La RSOM, al contrario, consente una valutazione tridimensionale dell'intero albero microvascolare della piega ungueale, compresi i capillari in profondità nella piega ungueale, senza essere influenzata dalle condizioni dell'epidermide (Fig. 2).

L'imaging RSOM della vascolarizzazione superficiale della plica ungueale ha fornito stime della densità dei vasi e del diametro dei capillari che concordavano molto bene con le stime ottenute con la microscopia convenzionale. Questi due parametri sono biomarcatori ampiamente utilizzati della progressione della sclerodermia [77]. La capacità di Rsom di rappresentare l'intera microvascolarizzazione della piega ungueale ha il potenziale per una valutazione della sclerodermia più completa e affidabile.

Lesioni cutanee maligne

L'alta risoluzione della RSOM può renderla efficace nell'identificare melanomi in situ o invasivi precoci. I nevi appaiono come sezioni dell'epidermide ricche di melanina e la vascolarizzazione sottostante e circostante non differisce sostanzialmente dalla vascolarizzazione della pelle sana basata sulla valutazione istologica convenzionale o sull'imaging RSOM. Quest'ultima è capace di rilevare la neovascolarizzazione patologica che si verifica nel microambiente dei tumori cutanei maligni. Infatti, può fornire immagini ad alta risoluzione dell'angiogenesi associata alla crescita del melanoma nei topi per diversi giorni [36] (Fig. 2). Questa capacità può consentire a RSOM di facilitare la diagnosi di lesioni cutanee maligne e stabilire i margini di escissione del tumore. Utilizzando l'angiografia OCT è stato dimostrato che l'analisi mesoscopica dei pattern vascolari può aiutare nel rilevare in maniera non invasiva lesioni cutanee maligne [3,28,30,80]. Questo metodo beneficia della generazione simultanea di immagini OCT morfologiche convenzionali, che possono fornire ulteriori indizi per la diagnosi, ma non hanno la capacità di visualizzare parti più profonde del microcircolo cutaneo. Inoltre, gli artefatti nella direzione assiale compromettono fortemente le informazioni sulla profondità nell'angiografia basata su OCT. Infine, i metodi di imaging ottico microscopico come RCM e MPM possono visualizzare il sistema vascolare solo in tumori sottili con diametri inferiori a 250 μm . [1,5]

Limiti attuali

Sebbene gli attuali dispositivi RSOM dimostrino il potenziale della tecnica, esistono ancora alcune limitazioni. Una lacuna attuale di RSOM, se confrontata, ad es. a OCT, è il lungo tempo di scansione di circa un minuto per un'area di 2 x 4 mm². L'OCT esegue la scansione di un'area di 6 x 6 mm in circa 30 secondi [3,77]. Tempi di scansione più lunghi aumentano il rischio di artefatti da movimento, che possono verificarsi in particolare durante l'imaging di aree del corpo fortemente interessate dal movimento respiratorio, come il torace [88]. Algoritmi di correzione del movimento sono stati tuttavia sviluppati di recente. La loro implementazione, insieme a tempi di scansione ridotti grazie a tecnologie di rilevamento innovative, dovrebbe migliorare la qualità dell'immagine in tali esami.

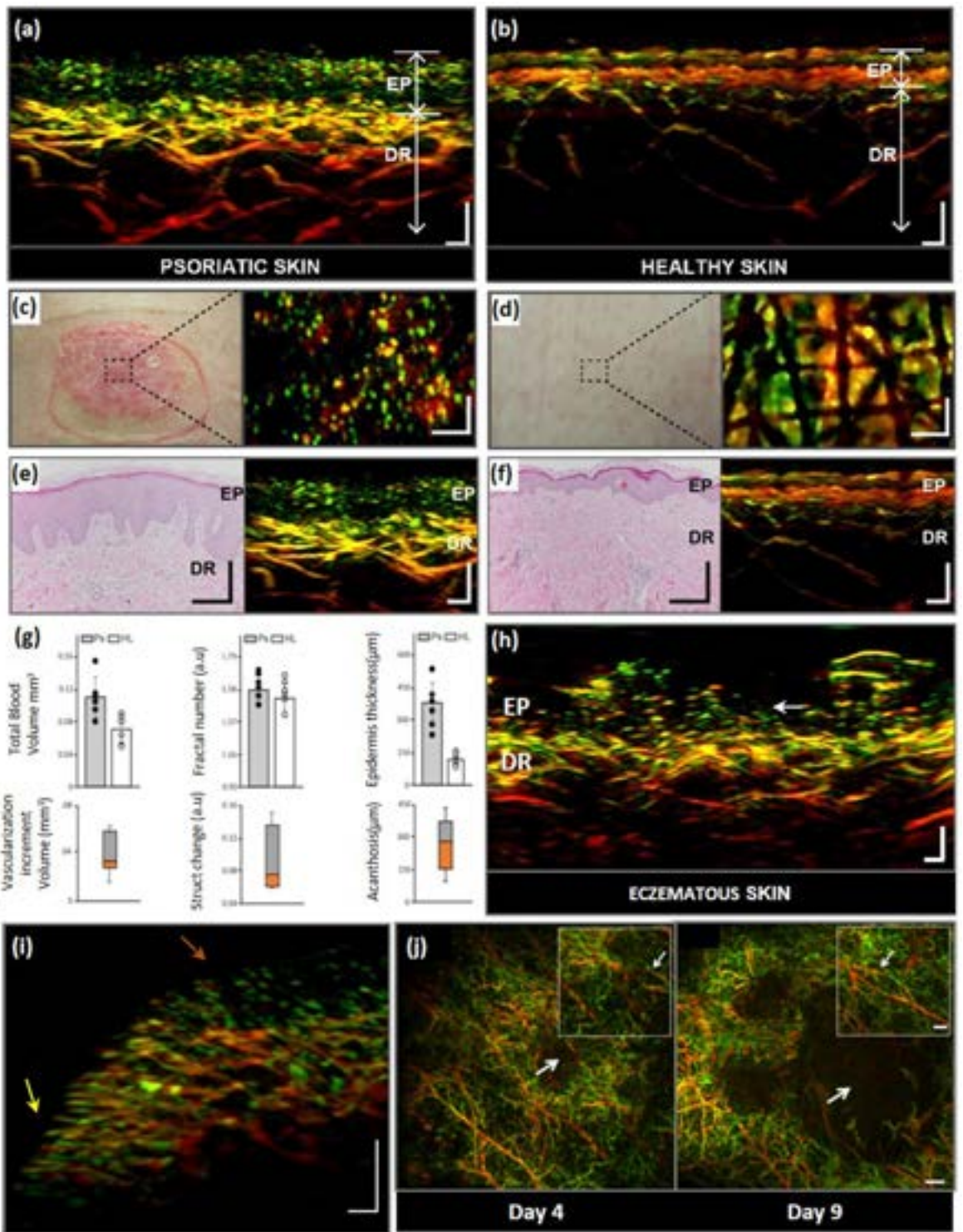


Figura 2 Imaging di malattie della pelle mediante mesoscopia optoacustica a scansione raster (RSOM). (a-f) Imaging RSOM che confronta la placca psoriasica e la pelle sana adiacente, insieme alle corrispondenti sezioni istologiche. Le strutture che emettono segnali a ultrasuoni ad alta frequenza (ad es. vasi più piccoli) sono rappresentate in verde; quelli che emettono segnali a bassa frequenza (es. vasi più grandi) sono rappresentati in rosso. (a) Immagine in sezione trasversale RSOM della placca psoriasica. Le anse capillari allungate (verdi) raggiungono quasi la superficie cutanea e appaiono intrecciate con l'epidermide depigmentata e acantotica (rosso a basso contrasto, EP). Nello strato dermico sottostante (DR), i vasi del plesso dermico appaiono dilatati e organizzati in maniera densa. Barra della scala, 200 μm . (b) La sezione trasversale di RSOM attraverso la pelle sana adiacente raffigura l'epidermide contenente melanina nella parte superiore e le anse capillari e i vasi dermici sotto. Barra della scala, 200 μm . (c) Fotografia (a sinistra) e immagine RSO faccia a faccia (a destra) della placca psoriasica. Le punte delle anse capillari appaiono come punti verdi. Barra della scala, 300 μm . (d) Fotografia (a sinistra) e immagine Rsom en face (a destra) della vicina pelle sana. Lo strato superiore dell'immagine RSOM mostra l'epidermide contenente melanina e segni fisiologici sulla superficie della pelle. Barra della scala, 300 μm . (e) Sezione trasversale istologica (sinistra) e corrispondente sezione trasversale RSOM (destra) della pelle psoriasica dalla posizione illustrata nel pannello (c). L'istologia mostra un aumento della vascolarizzazione dermica, papillomatosi e anse capillari allungate. (f) Sezione trasversale istologica (sinistra) e corrispondente sezione trasversale RSOM trasversale (destra) di pelle sana dalla posizione illustrata nel pannello (d). (g) Riga superiore: Confronti quantitativi del volume del sangue e dello spessore dell'epidermide nella pelle psoriasica (Ps) e nella pelle sana (HL). Riga in basso: differenze tra le misurazioni nella pelle psoriasica rispetto a quella sana. (h) Sezione trasversale della pelle affetta da eczema da contatto indotto da test allergologici epicutaneo (risultato «++ positivo»). Le anse capillari (freccia bianca) sono più lunghe e più dilatate rispetto alla pelle sana, ma appaiono più irregolarmente e scarsamente distribuite rispetto alla pelle psoriasica [vedi pannelli (a) e (b)]. I vasi del plesso dermico sono dilatati. Barra della scala, 200 μm . (i) Sezione trasversale di una regione cutanea in prossimità della piega ungueale del quarto dito di un volontario sano (unghia situata a sinistra della regione mostrata). La freccia gialla indica i capillari che si trovano vicino alla base dell'unghia e sono orientati parallelamente alla superficie della pelle. La freccia marrone evidenzia i capillari più lontani dall'unghia, orientati perpendicolarmente alla cute. Pertanto, sono visibili solo le punte dei capillari. Barra della scala, 250 μm . (j) Immagini Rsom della crescita del melanoma e dell'angiogenesi tumorale nel tessuto sottocutaneo di topo acquisite nei giorni 4 e 9 dopo l'iniezione di cellule di melanoma. I riquadri in ciascuna immagine raffigurano una regione identica nelle immediate vicinanze del tumore: nel tempo è visibile la crescita di vasi più piccoli tra due grandi vasi (freccia più piccola). Barra della scala, 1 mm (immagine principale), 0,5 mm (riquadro). Pannelli modificati da Aguirre et al. (2017)33, Hindelang et al. (2018); Omar et al. (2015).36

Conclusioni

Le modalità di imaging dermatologico microscopico penetrano fino a poche centinaia di micrometri. I metodi mesoscopici ad alta risoluzione, che si basano sul contrasto dovuto alla riflessione dell'energia, possono penetrare più in profondità, ma forniscono principalmente informazioni morfologiche sulla pelle senza molte informazioni funzionali o molecolari. Inoltre, questi metodi mesoscopici nel migliore dei casi risolvono solo parzialmente la struttura microvascolare della pelle. Unico tra i metodi di imaging dermatologico, RSOM combina il contrasto basato sull'assorbimento della luce con una profonda penetrazione mesoscopica e un campo visivo esteso. Grazie al trasduttore a ultrasuoni a banda ultra larga, può risolvere l'intero albero microvascolare della pelle e ha dimostrato le sue potenzialità in campo clinico in diversi piccoli studi su psoriasi, lesioni pigmentate, patologie infiammatorie e tumori della cute. Oltre alle immagini morfologiche, la RSOM può fornire immagini dettagliate della distribuzione di ossi- e deossiemoglobina e potenzialmente di altre biomolecole, consentendo l'imaging molecolare e funzionale di malattie della pelle e di altro tipo. Nel complesso, Rsom riduce il divario di capacità nell'imaging dermatologico non invasivo con alta risoluzione e potenziale utilizzo di biomarcatori per la medicina di precisione.

Bibliografia

- 1 Koehler MJ, Speicher M, Lange-Asschenfeldt S et al. Clinical application of multiphoton tomography in combination with confocal laser scanning microscopy for in vivo evaluation of skin diseases. *Exp Dermatol* 2011; 20: 589–594.
- 2 Ulrich M. Konfokale laserscanmikroskopie. *Der Hautarzt* 2015; 66: 504–510.
- 3 Themstrup L, de Carvalho N, Nielsen SM et al. In vivo differentiation of common basal cell carcinoma subtypes by microvascular and structural imaging using dynamic optical coherence tomography. *Exp Dermatol* 2018; 27: 156–165.
- 4 Ntziachristos V. Going deeper than microscopy: the optical imaging frontier in biology. *Nat Methods* 2010; 7: 603–614.
- 5 Rajadhyaksha M, Marghoob A, Rossi A et al. Reflectance confocal microscopy of skin in vivo: from bench to bedside. *Lasers Surg Med* 2017; 49:
- 6 Kollias N, Stamatias GN. Optical non-invasive approaches to diagnosis of skin diseases. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2002; 7: 64–75.
- 7 Agozzino M, Gonzalez S, Ardigo M. Reflectance confocal microscopy for inflammatory skin diseases. *Actas Dermosifiliogr* 2016; 107: 631–639.
- 8 Pellacani G, Pepe P, Casari A, Longo C. Reflectance confocal microscopy as a second-level examination in skin oncology improves diagnostic accuracy and saves unnecessary excisions: a longitudinal prospective study. *Br J Dermatol* 2014; 171: 1044–1051.
- 9 Alarcon I, Carrera C, Palou J et al. Impact of in vivo reflectance confocal microscopy on the number needed to treat melanoma in doubtful lesions. *Br J Dermatol* 2014; 170: 802–808.
- 10 Hellwarth R, Christensen P. Nonlinear optical microscopic examination of structure in polycrystalline ZnSe. *Opt Commun* 1974; 12: 318–322.
- 11 Koehler MJ, Hahn S, Preller A et al. Morphological skin ageing criteria by multiphoton laser scanning tomography: non-invasive in vivo scoring of the dermal fibre network. *Exp Dermatol* 2008; 17: 519–523.
- 12 Gannaway JN, Sheppard CJR. Second-harmonic imaging in the scanning optical microscope. *Opt Quant Electron* 1978; 10: 435–439.
- 13 Friedl P, Wolf K, von Andrian UH, Harms G. Biological second and third harmonic generation microscopy. *Curr Protoc Cell Biol* 2007; Chapter 4: Unit 4.15.
- 14 Cicchi R, Crisci A, Cosci A et al. Time- and spectral-resolved two-photon imaging of healthy bladder mucosa and carcinoma in situ. *Opt Express* 2010; 18: 3840–3849.
- 15 Dimitrow E, Ziemer M, Koehler MJ et al. Sensitivity and specificity of multiphoton laser tomography for in vivo and ex vivo diagnosis of malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 1752–1758.
- 16 Lin S-J, Wu R Jr, Tan H-Y et al. Evaluating cutaneous photoaging by use of multiphoton fluorescence and second-harmonic generation microscopy. *Opt Lett* 2005; 30: 2275–2277.
- 17 Koehler MJ, Preller A, Kindler N et al. Intrinsic, solar and sunbedinduced skin aging measured in vivo by multiphoton laser tomography and biophysical methods. *Skin Res Technol* 2009; 15: 357–363.
- 18 Hahn S. Prospektive klinische Studie zur Verlaufskontrolle der systemischen Sklerodermie und Graft – versus – Host – Erkrankung unter Therapie mit extrakorporaler Photopherese mittels 20-MHz- Sonografie und Multiphotonenlasertomografie. [Dissertation]. Univ. Jena, Jena, 2010.
- 19 Ulrich M, Lange-Asschenfeldt S, Gonzalez S. The use of reflectance confocal microscopy for monitoring response to therapy of skin malignancies. *Dermatol Pract Concept* 2012; 2: 202a10.
- 20 Calzavara-Pinton P, Longo C, Venturini M et al. Reflectance confocal microscopy for in vivo skin imaging. *Photochem Photobiol* 2008; 84: 1421–1430.
- 21 Hashemi P, Marghoob A, Rabinovitz H, Scope A. In-vivo confocal microscopy of congenital melanocytic nevi. In: Hofmann-Wellenhof R, Pellacani G, Malvehy J, Soyer HP, eds. *Reflectance Confocal Microscopy for Skin Diseases*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 2012: 115–132.
- 22 Omar M, Aguirre J, Ntziachristos V. Optoacoustic mesoscopy for biomedicine. *Nat Biomed Eng* 2018 (accepted).
- 23 von Braunmuhl T, Welzel J. Nichtinvasive bildgebende Diagnostik in der Dermatologie. *Der Hautarzt* 2015; 66: 492.
- 24 von Braunmuhl T. Optische Kohärenztomographie. *Der Hautarzt* 2015; 66: 499–503.
- 25 Mogensen M, Thrane L, Joergensen TM et al. Optical coherence tomography for imaging of skin and skin diseases. *Semin Cutan Med Surg* 2009; 28: 196–202.
- 26 Gambichler T, Pljatic A, Schmitz L. Recent advances in clinical application of optical coherence tomography of human skin. *Clin Cosmet Invest Dermatol* 2015; 8: 345–354.

- 27 Schmitz L, Reinhold U, Bierhoff E, Dirschka T. Optical coherence tomography: its role in daily dermatological practice. *J Dtsch Dermatol Ges* 2013; 11: 499–507.
- 28 Schuh S, Holmes J, Ulrich M et al. Imaging blood vessel morphology in skin: dynamic optical coherence tomography as a novel potential diagnostic tool in dermatology. *Dermatol Ther (Heidelb)* 2017; 7: 187–202.
- 29 Themstrup L, Ciardo S, Manfredi M et al. In vivo, micro-morphological vascular changes induced by topical brimonidine studied by dynamic optical coherence tomography. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2016; 30: 974–979.
- 30 Themstrup L, Pellacani G, Welzel J et al. In vivo microvascular imaging of cutaneous actinic keratosis, Bowen's disease and squamous cell carcinoma using dynamic optical coherence tomography. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2017; 31: 1655–1662.
- 31 Themstrup L, Welzel J, Ciardo S et al. Validation of dynamic optical coherence tomography for non-invasive, in vivo microcirculation imaging of the skin. *Microvasc Res* 2016; 107: 97–105.
- 32 Qin J, Jiang J, An L et al. In vivo volumetric imaging of microcirculation within human skin under psoriatic conditions using optical microangiography. *Lasers Surg Med* 2011; 43: 122–129.
- 33 Aguirre J, Schwarz M, Garzorz N et al. Precision assessment of label-free psoriasis biomarkers with ultra-broadband optoacoustic mesoscopy. *Nat Biomed Eng* 2017; 1: 68.
- 34 Jasaitiene D, Valiukeviciene S, Linkeviciute G et al. Principles of high-frequency ultrasonography for investigation of skin pathology. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011; 25: 375–382.
- 35 Vogt M, Knuttel A, Hoffmann K et al. Comparison of high frequency ultrasound and optical coherence tomography as modalities for high resolution and non invasive skin imaging. *Biomed Tech (Berl)* 2003; 48: 116– 121.
- 36 Omar M, Schwarz M, Soliman D et al. Pushing the optical imaging limits of cancer with multi-frequency-band raster-scan optoacoustic mesoscopy (RSOM). *Neoplasia* 2015; 17: 208–214.
- 37 Sattler E. Hochfrequente sonographie. *Der Hautarzt* 2015; 66: 493– 498.
- 38 Bobadilla F, Wortsman X, Munoz C et al. Pre-surgical high resolution ultrasound of facial basal cell carcinoma: correlation with histology. *Cancer Imaging* 2008; 8: 163–172.
- 39 Hayashi K, Koga H, Uhara H, Saida T. High-frequency 30-MHz sonography in preoperative assessment of tumor thickness of primary melanoma: usefulness in determination of surgical margin and indication for sentinel lymph node biopsy. *Int J Clin Oncol* 2009; 14: 426–430.
- 40 Vilana R, Puig S, Sanchez M et al. Preoperative assessment of cutaneous melanoma thickness using 10-MHz sonography. *AJR Am J Roentgenol* 2009; 193: 639–643.
- 41 Lassau N, Mercier S, Koscielny S et al. Prognostic value of high-frequency sonography and color Doppler sonography for the preoperative assessment of melanomas. *AJR Am J Roentgenol* 1999; 172: 457–461.
- 42 Tacke J, Haagen G, Hornstein OP et al. Clinical relevance of sonometry-derived tumour thickness in malignant melanoma—a statistical analysis. *Br J Dermatol* 1995; 132: 209–214.
- 43 Kaikaris V, Samsanavicius D, Kestutis M et al. Measurement of melanoma thickness – comparison of two methods: ultrasound versus morphology. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2011; 64: 796–802.
- 44 Gutierrez M, Wortsman X, Filippucci E et al. High-frequency sonography in the evaluation of psoriasis: nail and skin involvement. *J Ultrasound Med* 2009; 28: 1569–1574.
- 45 Errico C, Pierre J, Pezet S et al. Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging. *Nature* 2015; 527: 499–502.
- 46 Taruttis A, Ntziachristos V. Advances in real-time multispectral optoacoustic imaging and its applications. *Nat Photonics* 2015; 9: 219–227.
- 47 Matsumoto Y, Asao Y, Yoshikawa A et al. Label-free photoacoustic imaging of human palmar vessels: a structural morphological analysis. *Sci Rep* 2018; 8: 786.
- 48 Attia ABE, Chuah SY, Razansky D et al. Noninvasive real-time characterization of non-melanoma skin cancers with handheld optoacoustic probes. *Photoacoustics* 2017; 7: 20–26.
- 49 Taruttis A, Timmermans AC, Wouters PC et al. Optoacoustic imaging of human vasculature: feasibility by using a handheld probe. *Radiology* 2016; 281: 256–263.
- 50 Qin W, Chen Q, Xi L. A handheld microscope integrating photoacoustic microscopy and optical coherence tomography. *Biomed Opt Express* 2018; 9: 2205–2213.
- 51 Lin L, Zhang P, Xu S et al. Handheld optical-resolution photoacoustic microscopy. *J Biomed Opt* 2017; 22: 41002.
- 52 Park K, Kim JY, Lee C et al. Handheld photoacoustic microscopy probe. *Sci Rep* 2017; 7: 13359.
- 53 Liu W, Shcherbakova DM, Kurupassery N et al. Quad-mode functional and molecular photoacoustic microscopy. *Sci Rep* 2018; 8: 11123.
- 54 Chen J, Zhuo S, Chen G et al. Establishing diagnostic features for identifying the mucosa and submucosa of normal and cancerous gastric tissues by multiphoton microscopy. *Gastrointest Endosc* 2011; 73: 802–807.
- 55 Zabihian B, Weingast J, Liu M et al. In vivo dual-modality photoacoustic and optical coherence tomography imaging of

- human dermatological pathologies. *Biomed Opt Express* 2015; 6: 3163–3178.
- 56 Favazza CP, Jassim O, Cornelius LA, Wang LV. In vivo photoacoustic microscopy of human cutaneous microvasculature and a nevus. *J Biomed Opt* 2011; 16: 16015.
- 57 Ford SJ, Bigliardi PL, Sardella TCP et al. Structural and functional analysis of intact hair follicles and pilosebaceous units by volumetric multispectral optoacoustic tomography. *J Invest Dermatol* 2016; 136: 753–761.
- 58 Chen Z, Rank E, Meiburger KM et al. Non-invasive multimodal optical coherence and photoacoustic tomography for human skin imaging. *Sci Rep* 2017; 7: 17975.
- 59 Schwarz M, Omar M, Buehler A et al. Implications of ultrasound frequency in optoacoustic mesoscopy of the skin. *IEEE Trans Med Imaging* 2015; 34: 672–677.
- 60 Aguirre J, Schwarz M, Soliman D et al. Broadband mesoscopic optoacoustic tomography reveals skin layers. *Opt Lett* 2014; 39: 6297–6300.
- 61 Schwarz M, Buehler A, Aguirre J, Ntziachristos V. Three-dimensional multispectral optoacoustic mesoscopy reveals melanin and blood oxygenation in human skin in vivo. *J Biophotonics* 2016; 9: 55–60.
- 62 Ntziachristos V, Razansky D. Molecular imaging by means of multispectral optoacoustic tomography (MSOT). *Chem Rev* 2010; 110: 2783–2794.
- 63 Berezhnoi A, Schwarz M, Buehler A et al. Assessing hyperthermia-induced vasodilation in human skin in vivo using optoacoustic mesoscopy. *J Biophotonics* 2018; 11: e201700359.
- 64 Yvonne-Tee GB, Rasool AHG, Halim AS, Rahman ARA. Noninvasive assessment of cutaneous vascular function in vivo using capillaroscopy, plethysmography and laser-Doppler instruments: its strengths and weaknesses. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006; 34: 457–473.
- 65 Oji V, Luger TA. The skin in psoriasis: assessment and challenges. *Clin Exp Rheumatol* 2015; 33(5 Suppl 93): S14–S19.
- 66 Marks R. Assessment of disease progress in psoriasis. *Arch Dermatol* 1989; 125: 235.
- 67 Finlay AY, Khan GK, Luscombe DK, Salek MS. Validation of sickness impact profile and psoriasis disability index in psoriasis. *Br J Dermatol* 1990; 123: 751–756.
- 68 Griffiths CEM, Barker JN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *The Lancet* 2007; 370: 263–271.
- 69 Ryan C, Korman NJ, Gelfand JM et al. Research gaps in psoriasis: opportunities for future studies. *J Am Acad Dermatol* 2014; 70: 146–167.
- 70 Johansen JD, Frosch PJ, Lepoittevin J-P, eds. *Contact Dermatitis*, 5th edn. Springer, Berlin, 2011.
- 71 Fisher A, Rietschel RL, Fowler JF. *Fisher's Contact Dermatitis*, 6th edn. BC Decker, Hamilton, 2008.
- 72 Baillie AJ, Biagioni PA, Forsyth A et al. Thermographic assessment of patch-test responses. *Br J Dermatol* 1990; 122: 351–360.
- 73 Gawkrödger DJ, McDonagh AJ, Wright AL. Quantification of allergic and irritant patch test reactions using laser-Doppler flowmetry and erythema index. *Contact Derm* 1991; 24: 172–177.
- 74 Shenavandeh S, Haghighi MY, Nazarinia MA. Nailfold digital capillaroscopic findings in patients with diffuse and limited cutaneous systemic sclerosis. *Reumatologia* 2017; 55: 15–23.
- 75 Hofstee HMA, Sern_e EH, Roberts C et al. A multicentre study on the reliability of qualitative and quantitative nail-fold videocapillaroscopy assessment. *Rheumatology (Oxford)* 2012; 51: 749–755.
- 76 Barth Z, Witczak BN, Flatø B et al. Assessment of microvascular abnormalities by nailfold capillaroscopy in juvenile dermatomyositis after medium-to long-term followup. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2018; 70: 768–776.
- 77 Aguirre J, Hindelang B, Berezhnoi A et al. Assessing nailfold microvascular structure with ultra-wideband raster-scan optoacoustic mesoscopy. *Photoacoustics* 2018; 10: 31–37.
- 78 Mahabeleshwar GH, Byzova TV. Angiogenesis in melanoma. *Semin Oncol* 2007; 34: 555–565.
- 79 Pastushenko I, Gracia-Caza~na T, Vicente-Arregui S et al. Squamous cell carcinomas of the skin explore angiogenesis-independent mechanisms of tumour vascularization. *J Skin Cancer* 2014; 2014: 651501.
- 80 de Carvalho N, Ciardo S, Cesinero AM et al. In vivo micro-angiography by means of speckle-variance optical coherence tomography (SV-OCT) is able to detect microscopic vascular changes in naevus to melanoma transition. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2016; 30: e67–e68.
- 81 Silverstein JL, Steen VD, Medsger TA Jr, Falanga V. Cutaneous hypoxia in patients with systemic sclerosis (scleroderma). *Arch Dermatol* 1988; 124:1379–1382.
- 82 Modarressi A, Pietramaggiore G, Godbout C et al. Hypoxia impairs skin myofibroblast differentiation and function. *J Invest Dermatol* 2010; 130:2818–2827.
- 83 Schremel S, Szeimies RM, Prantl L et al. Oxygen in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol* 2010; 163: 257–268.
- 84 Melillo G. *Hypoxia and Cancer*. Springer, New York, New York, NY, 2014.
- 85 Huber R, Meier B, Otsuka A et al. Tumour hypoxia promotes melanoma growth and metastasis via High Mobility Group Box-

- 1 and M2-like macrophages. *Sci Rep* 2016; 6: 29914.
- 86 Speicher PJ, Beasley GM, Jiang B et al. Hypoxia in melanoma: using optical spectroscopy and EF5 to assess tumor oxygenation before and during regional chemotherapy for melanoma. *Ann Surg Oncol* 2014; 21: 1435–1440.
- 87 Elias PM. Lipid abnormalities and lipid-based repair strategies in atopic dermatitis. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1841: 323–330.
- 88 Schwarz M, Garzorz-Stark N, Eyerich K et al. Motion correction in optoacoustic mesoscopy. *Sci Rep* 2017; 7: 10386.
- 89 Rajadhyaksha M, Gonzalez S, Zavislan JM et al. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II: advances in instrumentation and comparison with histology. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 293–303.
- 90 Zieger M, Springer S, Koehler MJ, Kaatz M. Multiphoton tomographie. *Der Hautarzt* 2015; 66: 511–521.
- 91 König K, Speicher M, Bückle R et al. Clinical optical coherence tomography combined with multiphoton tomography of patients with skin diseases. *J Biophotonics* 2009; 2: 389–397.
- 92 Boone M, Jemec GBE, Del Marmol V. High-definition optical coherence tomography enables visualization of individual cells in healthy skin: comparison to reflectance confocal microscopy. *Exp Dermatol* 2012; 21: 740–744.
- 93 Wilhelm K-P. *Bioengineering of the Skin: Skin Imaging and Analysis*, 2nd edn. Informa Healthcare, New York, 2007. (Dermatology: clinical & basic science series; vol 31).
- 94 Omar M, Soliman D, Gateau J, Ntziachristos V. Ultrawideband reflection-mode optoacoustic mesoscopy. *Opt Lett* 2014; 39: 3911–3914.

APPENDICE

L'INTELLIGENZA ARTIFICIALE IN DERMATOLOGIA

L'intelligenza artificiale (AI) si riferisce alla capacità di una macchina di comunicare, ragionare e operare in modo indipendente. È necessario comprendere i progressi di questa tecnologia per renderla utilizzabile nelle future cure mediche. L'IA ha molte applicazioni nel campo della medicina, ma il suo utilizzo in dermatologia è relativamente nuovo. Sono disponibili applicazioni che analizzano e classificano comunemente immagini e strumenti come i calcolatori di valutazione del rischio. Anche se esistono molte applicazioni, importanti ostacoli all'implementazione includono la difficoltà di standardizzazione, interpretabilità e accettazione da parte del paziente e degli stessi medici.

L'AI è in continua evoluzione da:

- AI convenzionale (componente umana 100%)
- Machine learning (50% uomo, 50% macchina)
- Deep learning (10% uomo, 90% macchina)

PROCESSI DI MACHINE LEARNING

I processi di apprendimento più comunemente utilizzati sono:

1. Apprendimento supervisionato:
Addestriamo la macchina a far corrispondere un insieme di input (ad es. immagini) al loro output corretto (diagnosi).
2. Apprendimento non supervisionato:
Dopo aver addestrato la macchina tramite l'apprendimento supervisionato, la macchina è fatta per analizzare modelli nuovi/nuovi dai dati e per fornire output.

TIPI DI INTELLIGENZA ARTIFICIALE

1. Intelligenza artificiale ridotta: in grado di gestire un'attività particolare.
Ad esempio: Identificazione di un consolidamento polmonare.
2. Intelligenza artificiale generale: in grado di gestire un'ampia gamma di attività.
Ad esempio: Identificazione di un consolidamento/versamento pleurico/cardiomegalia.

Due metodi di apprendimento dell'IA sono:

1. Apprendimento superficiale: basato su funzionalità ingegnerizzate predefinite secondo le conoscenze degli esperti.
2. Apprendimento profondo: basato su funzionalità approfondite elaborate dalla rete neurale convoluzionale (CNN). Imita il funzionamento del cervello umano nell'elaborazione dei dati. L'algoritmo di deep learning non richiede la definizione esplicita delle funzionalità da parte di esperti umani.

CNN

È l'architettura di deep learning più diffusa. I modelli computazionali comprendono serie di livelli e abbinano successivamente gli input ai punti finali desiderati.

L'IA IN MEDICINA

Le principali applicazioni dell'IA sono in Dermatologia, Radiologia e Patologia. L'intelligenza artificiale spazia dai semplici monitor automatici della pressione sanguigna, alla chirurgia assistita da robot. Nel 2018, la FDA ha approvato lo strumento di intelligenza artificiale non guidato (IDx-DR) per la diagnosi della retinopatia diabetica, basato sulle immagini della retina. Inoltre, ci sono applicazioni mobili approvate dalla FDA che aiutano a trattare la dipendenza da oppioidi e per la contraccezione (2018), migliorando ulteriormente la partnership umana-digitale.

L'IA IN DERMATOLOGIA

La dermatologia è un campo con una crescente interazione tra digitalizzazione, tele-salute e informatica. Quindi, l'IA può essere utilizzata sicuramente anche per applicazioni dermatologiche.

DISTINGUERE LESIONI BENIGNE E MALIGNI

Il principio principale alla base di questa applicazione è che le immagini dermoscopiche o non dermoscopiche delle lesioni possono essere suddivise in singoli pixel per l'analisi. Queste applicazioni sono in genere convalidate confrontando la loro capacità di diagnosticare correttamente le lesioni con l'abilità di un dermatologo. Jafari et al. hanno descritto 60 funzioni basate su immagini per classificarle. [1] Nel 2017, l'università di Stanford ha pubblicato uno studio sul deep learning nella diagnosi dei tumori della pelle. Hanno addestrato la CNN, utilizzando più di 1 milione di immagini di circa 2000 diverse malattie e testato le sue prestazioni rispetto a quelle di 21 dermatologi specialisti su immagini cliniche comprovate da biopsie. È stato riscontrato che la macchina aveva una competenza, paragonabile a quella degli specialisti nell'identificazione e nella classificazione dei tumori della pelle. [2] Ad esempio: nevi benigni contro melanoma maligno, tumori della pelle non melanoma contro lesioni benigne e premaligne.

Sebbene la maggior parte della ricerca sull'IA sia basata su algoritmi di fotoriconoscimento, possono essere applicati anche valori numerici.

Ad esempio: prevedere la complessità della chirurgia micrografica di Mohs sulla base di variabili valutate alla visita di valutazione iniziale, come le dimensioni del tumore e l'età del paziente. Quindi, la valutazione dei fattori di rischio è possibile con l'IA. Queste applicazioni sono state descritte da Tan et al. [3]

Negli ultimi anni sono disponibili e facilmente accessibili applicazioni per smartphone per la diagnosi del melanoma. In realtà, offrono una valutazione istantanea del rischio di probabilità di malignità in modo che i pazienti possano consultare un medico in una fase iniziale. Lo svantaggio è la possibilità di perdere melanomi o di dare un falso senso di sicurezza all'utente. Le sensibilità e le specificità per queste applicazioni variano rispettivamente dal 7% al 73% e dal 37% al 94%. [4]

Inoltre, AI può aiutare nella diagnosi istopatologica delle neoplasie. La CNN può essere addestrata con un set di dati di immagini cliniche-istopatologiche per generare la diagnosi. Gli studi di Hekler et al. ha mostrato risultati promettenti sul ruolo della CNN nella diagnosi definitiva del melanoma ad esempio. [5]

VALUTAZIONE DELLE LESIONI ULCERATIVE

L'IA è attualmente impiegata principalmente per la valutazione del diabete e delle ulcere da pressione. Le applicazioni sono in grado di misurare contorni precisi della ferita e sono in grado di differenziare tra i tipi di tessuto coinvolti. Possono classificare il tessuto di granulazione, fibrina e necrosi. Mukerjee et al. ha descritto un'applicazione AI per la classificazione dei tessuti della ferita. [6] Esistono anche strumenti di previsione del rischio, ad esempio, per prevedere la tendenza allo sviluppo di ulcere da pressione.

PSORIASI E ALTRE MALATTIE INFIAMMATORIE DELLA PELLE

Nella psoriasi, l'IA si concentra principalmente sul miglioramento dei metodi di classificazione utilizzando il riconoscimento delle immagini. Emam et al. ha dimostrato la capacità dei sistemi di prevedere la risposta alla terapia biologica nei pazienti affetti da psoriasi, utilizzando parametri misurati alla visita iniziale, in modo da ottimizzare il trattamento. [7]

ALTRE APPLICAZIONI

Altre condizioni dermatologiche in cui l'IA ha trovato un ruolo sono l'acne, il lichen planus, la pitiriasi lichenoidale, la dermatomiosite e la dermatite seborroica.

Ad esempio: un'applicazione per smartphone classifica le lesioni acneiche.

Dermatite atopica

Esistono reti neurali artificiali per differenziare la dermatite atopica, dalla pelle sana utilizzando informazioni derivate direttamente dalle immagini. Questo è stato progettato da De Guzman et al. [8]

Onicomicosi

L'accuratezza diagnostica per l'onicomicosi è aumentata utilizzando l'IA di deep learning con un set di riferimento che comprende tutte le immagini possibili. Han et al. utilizzano più di 49.000 immagini nel loro set di dati. [9]

Predizione delle sostanze sensibilizzanti della pelle

Esistono applicazioni in grado di analizzare le proprietà fisico-chimiche delle sostanze. Possono determinare se la sostanza potrebbe essere un sensibilizzante o meno. Gli studi sono stati condotti da Zang et al. Hanno descritto un'applicazione, in grado di determinare il punto di fusione di una sostanza e di decidere se potrebbe essere un sensibilizzante o meno. [10]

Dermatopatologia

Sono state descritte applicazioni in grado di automatizzare l'elaborazione e la classificazione delle immagini istopatologiche (principalmente per neoplasie cutanee).

Teledermatologia

È uno dei campi in rapida crescita della dermatologia, soprattutto nelle aree in cui l'accesso a un dermatologo è difficile. L'intelligenza artificiale può essere integrata nelle applicazioni per smartphone per fotografare lesioni cutanee, raccogliere informazioni cliniche rilevanti e generare referti quando necessario. Attualmente, la teledermatologia è parte integrante della pratica clinica a causa dell'attuale pandemia di COVID.

Aumento della valutazione faccia a faccia

Piuttosto che funzionare in autonomia, l'IA e gli esseri umani (dermatologo) lavorando insieme possono ottenere performance migliori nel formulare diagnosi e nella gestione delle malattie della pelle.

L'IA come strumento educativo

L'intelligenza artificiale è un'eccellente risorsa educativa per la formazione di dermatologi, ricercatori, studenti e specialisti del cancro della pelle. Dopo aver esaminato immagini visivamente simili, gli esperti sono in grado di ottenere informazioni più approfondite sui loro casi aiutandoli a formulare una diagnosi più accurata.

L'IA nel campo della dermoscopia

Questa tecnologia utilizza algoritmi di intelligenza artificiale e recupero di immagini basato su archivi per fornire ai professionisti medici immagini dermoscopiche simili ai casi in esame.

LIMITAZIONI

Generalizzabilità

La maggior parte degli studi disponibili provengono dal mondo occidentale e dalle nazioni sviluppate. I risultati potrebbero non essere applicabili al resto del mondo. Ogni popolazione dovrebbe avere i propri dati basati sulla prevalenza locale delle malattie e dovrebbe sviluppare un algoritmo individuale. Sebbene attualmente difficile nei paesi in via di sviluppo, diventerà sicuramente una parte della pratica clinica in futuro.

Al momento, i dati delle immagini di diverse malattie della pelle sono insufficienti e la qualità delle immagini non è uniforme. [11] Ciò porta alla mancanza di standardizzazione e alla conseguente difficoltà di rendere questi dati utilizzabili ai fini sopra descritti.

Qualità dell'immagine

Variazioni tecniche, differenze nell'acquisizione dell'immagine e qualità dell'immagine possono influire sull'interpretazione.

Requisiti dei dati

Una grande barriera è il prerequisito di possedere una grande quantità di dati di qualità adeguata per elaborare gli algoritmi di intelligenza artificiale.

Interpretabilità

L'IA è flessibile, forma algoritmi, rivaluta e apporta costantemente cambiamenti senza l'input umano per mezzo di reti neurali. Pertanto, a volte, la logica alla base del processo decisionale potrebbe non essere interpretabile.

Accettazione da parte dei pazienti

Un'anamnesi corretta, seguita da un esame, che individua segni specifici integrati da ulteriori indagini o biopsie, è un metodo diagnostico standard in dermatologia. Questo approccio olistico non può essere completamente sostituito da alcun metodo, inclusa l'IA.

Responsabilità/questioni etiche

Qualora si verificasse un evento negativo o infausto in base alle risposte ottenute dall'IA, chi dovrebbe essere ritenuto responsabile è un'altra domanda a cui è difficile rispondere.

Approccio multidisciplinare

I ricercatori dell'IA provengono da diversi campi della scienza come l'informatica, la biomedicina e la scienza medica. Quindi, può risultare un compito difficile coordinare il gruppo.

CONCLUSIONI

Sebbene l'IA sia utile nella diagnosi delle malattie in ampie categorie, al momento saranno ancora necessarie competenze dermatologiche e correlazioni clinico-istologiche per una diagnosi accurata e per rendere valido il processo decisionale. Attualmente, la maggior parte dei dati si basa su studi occidentali; quindi, gli studi da questa parte del mondo sono essenziali. L'intelligenza artificiale è un campo in rapida evoluzione, quindi una conoscenza di base sui principi fondamentali, sui potenziali usi e sui limiti diventa ancora più importante.

BIBLIOGRAFIA

1. **Jafari MH , Nasr-Esfahani E , Karimi N , Soroushmehr SM , Samavi S , Najarian K .** Estrazione di lesioni cutanee da immagini non dermoscopiche per l'asportazione chirurgica del melanoma. *Int J Comput Assist Radiol Surg* . 2017; **12** : 1021 - 30 .
2. **Esteva A , Kuprel B , Novoa RA , Ko J , Swetter SM , Blau HM , et al.** Classificazione a livello dermatologico del cancro della pelle con reti neurali profonde. *Natura* . 2017; **542** : 115 - 8 .
3. **Tan E , Lin F , Sheck L , Salmon P , Ng S .** Un modello pratico di albero decisionale per prevedere la complessità della chirurgia ricostruttiva dopo l'escissione del carcinoma basocellulare perioculare. *J Eur Acad Dermatol Venereol* . 2017; **31** : 717 - 23 .
4. **Chichi N , Takwoingi Y , Dinnes J , Matin RN , Bassett O , Moreau JF , et al.** Applicazioni per smartphone per il triage di adulti con lesioni cutanee sospette di melanoma. *Cochrane Database Syst Rev* . 2018; **12** : CD O13192 .
5. **Hekler A , Utikal JS , Enk AH , Berking C , Klode J , Schadendorf D , et al.** Classificazione a livello di patologia delle immagini istopatologiche del melanoma con reti neurali profonde. *Eur J Cancro* . 2019; **115** : 79 - 83 .
6. **Mukherjee R , Manohar DD , Das DK , Achar A , Mitra A , Chakraborty C .** Quadro di classificazione dei tessuti automatizzato per la valutazione riproducibile delle ferite croniche. *Biomed Res Int* . 2014; **2014** : 851-582 .
7. **Emam SD , Du AX , Surmanowicz P , Thomsen SF , Greiner R , Gniadecki R .** Prevedere i risultati a lungo termine dei farmaci biologici nei pazienti affetti da psoriasi utilizzando l'apprendimento automatico. *Br J Dermatol* . 2020; **182** : 1305 - 7 .
8. **de Guzman LC , Maglaque RP , Torres VM , Zapido SP , Cordel MO .** Progettazione e valutazione di una rete neurale artificiale multimodello e multilivello per il rilevamento di lesioni cutanee da eczemi. 2015 3a Conferenza Internazionale su Intelligenza Artificiale, Modellazione e Simulazione (AIMS), Kota Kinabalu, Malesia 42 - 7 . Disponibile da: <https://www.ieeexplore.ieee.org/document/7604549> [Ultimo accesso il 18 dicembre 2019]
9. **Han SS , Park GH , Lim W , Kim MS , Na JI , Park I , et al.** Le reti neurali profonde mostrano prestazioni equivalenti e spesso superiori ai dermatologi nella diagnosi di onicomicosi: costruzione automatica di set di dati di onicomicosi mediante una rete neurale profonda convoluzionale basata sulla regione. *PLoS Uno* . 2018 ; **13** : e0191493 .
10. **Zang Q , Paris M , Lehman DM , Bell S , Kleinstreuer N , Allen D , et al.** Previsione della potenza di sensibilità cutanea mediante approcci di apprendimento automatico. *J Appl Tossico* . 2017; **37** : 792 - 805 .
11. **De A , Sarda A , Gupta S , Das S .** Uso dell'intelligenza artificiale in dermatologia. *Indiana J Dermatol* . 2020; **65** : 352 - 7 .



NILDE

Network Inter-Library Document Exchange

Il presente documento viene fornito attraverso il servizio NILDE dalla Biblioteca fornitrice, nel rispetto della vigente normativa sul Diritto d'Autore (Legge n.633 del 22/4/1941 e successive modifiche e integrazioni) e delle clausole contrattuali in essere con il titolare dei diritti di proprietà intellettuale.

La Biblioteca fornitrice garantisce di aver effettuato copia del presente documento assolvendo direttamente ogni e qualsiasi onere correlato alla realizzazione di detta copia.

La Biblioteca richiedente garantisce che il documento richiesto è destinato ad un suo utente, che ne farà uso esclusivamente personale per scopi di studio o di ricerca, ed è tenuta ad informare adeguatamente i propri utenti circa i limiti di utilizzazione dei documenti forniti mediante il servizio NILDE.

La Biblioteca richiedente è tenuta al rispetto della vigente normativa sul Diritto d'Autore e in particolare, ma non solo, a consegnare al richiedente un'unica copia cartacea del presente documento, distruggendo ogni eventuale copia digitale ricevuta.

Biblioteca richiedente: Biblioteca di Neuroscienze Umane
Data richiesta: 02/11/2021 08:36:17
Biblioteca fornitrice: Biblioteca Area Biomedica-Università di Roma 'Tor Vergata'
Data evasione: 02/11/2021 08:52:57

Titolo rivista/libro: Italian journal of dermatology and venereology Online
Titolo articolo/sezione: Capillaroscopy: a new application for the evaluation of vascular side-effects induced by chemotherapy
Autore/i: Cardone M , Caro G , Amorosi B , Cristaudo A , Morrone A , Calvieri S , Carlesimo M , Fortuna MC , Rossi A
ISSN: 2784-8450
DOI: 10.23736/S0392-0488.20.06401-9
Anno: 2021
Volume: 156
Fascicolo: 1
Editore:
Pag. iniziale: 84
Pag. finale: 88

ORIGINAL ARTICLE

Capillaroscopy: a new application for the evaluation of vascular side-effects induced by chemotherapy

Michele CARDONE ¹, Gemma CARO ¹*, Beatrice AMOROSI ², Antonio CRISTAUDDO ², Aldo MORRONE ², Stefano CALVIERI ¹, Marta CARLESIMO ¹, Maria C. FORTUNA ¹, Alfredo ROSSI ¹

¹Section of Dermatology, Department of Internal Medicine and Medical Specialties, Sapienza University, Rome, Italy; ²Department of Clinical Dermatology, IRCCS S. Gallicano Dermatological Institute, Rome, Italy

*Corresponding author: Gemma Caro, Section of Dermatology, Department of Internal Medicine and Medical Specialties, Sapienza University, Viale del Policlinico 155, 00161 Rome, Italy. E-mail: gemma Caro90@gmail.com

ABSTRACT

BACKGROUND: Cancer survivors are rising up, but this better survival is accompanied by possible treatments side-effects. In particular, cardiovascular effects are commonly reported, even if vascular damage is not necessarily connected to clinical manifestations. Periungual micro-circle evaluation through capillaroscopy could identify asymptomatic patients with high risk of cerebro-cardio-vascular disease. The aim of this pivotal study was to evaluate videocapillaroscopy in patients who undergo chemotherapy, in order to understand if it could represent in future a prognostic tool to predict the risk of cardio-cerebro-vascular events.

METHODS: We conducted an open-label, uncontrolled study. Patients affected by solid tumors were enrolled. Each subject underwent a clinical evaluation and a videocapillaroscopic examination.

RESULTS: We selected 25 patients. Mean age was 55.48 years. Time interval between the start of chemotherapy and capillaroscopy: average 41 months. From our analysis it emerges that ectasia and hemorrhages could be a possible marker of capillary insult caused by chemotherapy.

CONCLUSIONS: Our study showed the presence of capillaroscopic features that may be peculiar in chemotherapy-induced endothelial damage. The individuation of capillaroscopic alteration specific for chemotherapy-induced endothelial injury could be an important tool to identify patients with high cardiovascular risk.

(Cite this article as: Cardone M, Caro G, Amorosi B, Cristaudo A, Morrone A, Calvieri S, *et al.* Capillaroscopy: a new application for the evaluation of vascular side-effects induced by chemotherapy. *Ital J Dermatol Venereol* 2021;156:84-8. DOI: 10.23736/S2784-8671.20.06401-9)

KEY WORDS: Microscopic angiopathy; Chemotherapy, cancer, regional perfusion; Blood vessels; Adverse effects.

Cancer survivors are rising up in the last decades, and they are destined to increase.^{1, 2} This evidence is the result of a prompt diagnosis and treatments.^{1, 3, 4} Anyway, this better survival is accompanied by the possibility of cancer relapse and treatments side-effects. In particular, cardiovascular effects are commonly reported,^{5, 6} being associated to an increase of morbidity and mortality.^{7, 8} For this reason, their early diagnosis and treatment is vital for these patients, so that a new discipline called “cardio-oncology” has been created.

Most reported cardio-vascular diseases are: 1) cardiomyopathy or heart failure (HF); 2) ischemic cardiopathy or coronary disease (CAD); 3) hypertension; 4) thromboembolism; and 5) pulmonary hypertension. Although car-

diotoxicity has been well studied and its management and treatment are established, vascular toxicity is still barely known. For this reason, currently, it is not available a consensus for its prevention, management and treatment.

Moreover, it is important to underline that vascular damage caused by chemotherapy is not necessarily associated with clinical manifestations.^{9, 10}

The exact mechanisms are unknown and it is probable that also individual risk factors are involved, whereas drugs act directly or indirectly on the endothelial and smooth muscular vessel cells. Anyway, the mechanisms through which this damage takes place seem to be different for each drug (Supplementary Digital Material 1: Supplementary Table I).¹¹⁻¹³

Currently, it is known that endothelium plays a crucial role in vascular homeostasis, and it is not a simple inert monolayer of epithelial cells. It can produce vasoactive substances such as endothelin-1 (ET-1), angiotensin II (Ang II), tromboxan A2, reactive oxygen species, nitrous oxide (NO) e prostacyclin.¹⁴ Endothelium integrity is crucial for the whole cardio-vascular system, together with vessel tone, intima permeability and trickiness, vascular remodeling and angiogenesis, coagulation and fibrinolysis.^{15, 16} As stated by Knisely *et al.*¹⁷ a single district microcircle condition is comparable to the one of all the other districts and a single district integrity is dependent on its own microcircle. According to this study it is possible that periungual microcircle evaluation could represent a useful tool for the identification of asymptomatic patients with high risk of cerebro-cardio-vascular disease, and for the stratification of patients with a previously diagnosed cardiovascular disease.

Capillaroscopy is a simple, non-invasive and rapid method for the *in-vivo* study of microcirculation.

It is usually employed for the study of several diseases of the connective tissue. In 1990 capillary damages of patients treated with bleomycin, were visualized by capillary microscopy performed at nail fold level, even in asymptomatic patients.¹⁸ Recently it has been used to quantify vascular damage caused by chemotherapy.¹⁹

Capillaroscopic evidence of specific patterns could be connected to the severity of the damage and could be used in a multidisciplinary evaluation of oncologic patients with the aim of preventing and minimizing the incidence of cardiovascular diseases.

The aim of this pivotal study is the evaluation of video-capillaroscopy in patients who undergo chemotherapy, to understand if it could represent in future a prognostic tool to predict the risk of cardio-cerebro-vascular events.

Materials and methods

Patients affected by solid tumors, afferent to our clinic for dermatological side effects of chemotherapy were enrolled.

Including criteria were: 1) age major than 18 years old; 2) oncological diagnosis; previous, in course or further chemotherapeutic treatment; and 3) no previous diagnosis of vascular acrosyndromes and/or connective tissue disease.

Patients with documented exposure to toxic substances (*e.g.* vinyl chloride) or microtraumatism resulting from the use of percussive or vibrating instruments, and patients with significant upper limb lymphedema, pre-existing or following treatment of the neoplasm were excluded.

No control group was designated, considering the fact that capillaroscopic abnormalities in the healthy population are absent or present in small numbers in the form of minor morphological abnormalities.²⁰

Each subject underwent a clinical evaluation (history and physical examination, highlighting the presence of acral dystrophic lesions and/or onychopathies), with a particular attention to the presence of main cardiovascular risk factors (diabetes, hypertension, hypercholesterolemia, smoking and BMI) and blood exams were conducted in order to exclude rheumatological diseases (ANA, ENA, Reuma test).

Videocapillaroscopic examination

Patients were recommended not to take any stimulating substances (such as caffeine and nicotine) for at least 4 hours before the examination. They were placed in an environment with constant temperature (20-22 ° C) for 15 minutes, to balance the skin temperature with the environmental temperature (thermal acclimatization phase).²¹

The examination was performed using a VCSCO - DERMASCOPE with 200X lens, connected to an image analyzer software. The evaluation was conducted on each hand finger: the patients were sitting with their palm laying on the observation plane. Particular attention was paid to the fourth and fifth finger of the non-dominant hand, since at this level the skin is less thick and usually less subject to trauma, allowing a better capillary evaluation. With the aim of ensuring the best visibility conditions an appropriate amount of diaphanizing oil (usually cedar or paraffin) was applied on periungual skin.²² The detected parameters are shown in Table I.

Results

We selected 25 women suffering from breast carcinoma. Mean age was 55.48 years. Time interval between the start of chemotherapy and capillaroscopy: average 41 months, median 12 months. Chemotherapeutic drugs received by patients were: 5-fluorouracil, cyclophosphamide, epirubicin, docetaxel, taxol, paclitaxel, carboplatin, pertuzumab, doxorubicina, capecitabine, trastuzumab. Patients characteristics are showed in Supplementary Digital Material 2 (Supplementary Table II).

None of them had previously performed capillaroscopy, nor reported having ever suffered from vascular acrosyndromes and/or connective tissue disease. Blood exams for the evaluation of rheumatological diseases were negative in all patients.

TABLE I.—*Detected parameters.*

Detected parameters	Findings		
Cutaneous transparency and visibility	Normal	Altered	
Edema	Present	ABSENT	
PVSP (sub papillary venous plexus)	Visible	Not visible	
Capillary architecture	Preserved	Altered	
Capillary density (NR° loops/MM)*	Normal (9-13/MM)	Slight reduction (6 <X<9/MM)	Severe reduction (<6/MM)
Tortuosity	Present	Absent	
Length of the loops	Elongated	Shortened	Normo-conformed
Ectasias of the loops**	Present	Absent	
Microaneurysms	Present	Absent	
Capillary hemorrhages	Present	Numerous	Absent
Avascular areas	Present	Absent	
Neo-angiogenesis	Present	Absent	
Blood flow	Normal	Altered (intermittent, granular, static)	

*The average score was obtained from the analysis of the last 4 fingers of each hand, evaluating in each finger 4 adjacent areas; **a diameter <25µ was considered normal; a diameter between 3 and 10 times the normal diameter was considered dilated; a diameter greater than 10 times the normal diameter was considered megapillary.

The analysis of capillaroscopic parameters obtained from the images was facilitated by a good visibility of the examined fields, with poor edema and preserved cutaneous transparency in most of the subjects examined. Capillaroscopic characteristics are shown in Supplementary Digital Material 3 (Supplementary Table III).

Discussion

From our evaluation some interesting data emerged. The PVSP was not visible in the 60% of patients, as expected considering patients mean age. The architecture of the capillary comb (heterogeneity of form, alignment and distribution of the loops) was altered in the totality of the patients. Such alterations can be usually observed both in the “scleroderma-spectrum” disorders and in the context of a “senile microangiopathy.” As far as capillary density is concerned, this has been maintained in the normal range (9-13/mm) in the vast majority, with just rare cases of mild age-related reduction and absence of desertification areas. However, capillary loops tortuosity was frequent. Tortuosity is detected in various pathological conditions (diabetes mellitus, Raynaud, acrocyanosis, systemic sclerosis, rheumatoid arthritis and arthropathic psoriasis), even if it could also be present in healthy subjects. Concerning the length of the loops, an objective evaluation is difficult to achieve because it depends on the transparency of the skin, visibility and the ability of the machine to take measurements (not possible with the instrumentation at our disposal).

Ectasias were found virtually in all patients, suggesting that these could be one of the markers of the chemotherapy-induced injury. However, there is no universally accepted

definition that describes this aspect. A marked and homogeneous distribution of capillary ectasia is a characteristic of the scleroderma spectrum disorders. Their origin is uncertain. Probably they are caused by a non-specific endothelial damage or they constitute a protective mechanism allowing a greater endothelial surface and, consequently, a greater exchange. Real micro-aneurysms, however, were absent. Surprisingly, capillary hemorrhages were present in 20% of patients (5 of 25 patients) and were numerous in 16% (4 of 25 patients). These features are usually found in sclerodermiform disorders and other rheumatological diseases, and they are associated with dilated capillaries that are easily subject to rupture. Anyway, in absence of connective tissue disease it is therefore reasonable to associate their origin to the insult induced by chemotherapeutic agents. Blood flow was not regular even if dynamic, and only in few cases sludge was present.

An important fact emerges by comparing patients with longer interval chemotherapy-capillaroscopy: the more time passes from the chemotherapeutic treatment, the more numerous and severe the anomalies are (Figure 1). This suggests an evolution of the damage caused by chemotherapeutic agents, which is non-strictly age-related, rather directly proportional to the time elapsed since the end of chemotherapy.

From our analysis, it emerges that ectasia and hemorrhages could be possible markers of capillary insult induced by chemotherapy.

Our study wants just to observe capillaroscopic features in patients receiving chemotherapy. It has some limitations: population is too small and heterogeneous.

We think that starting from our observations further

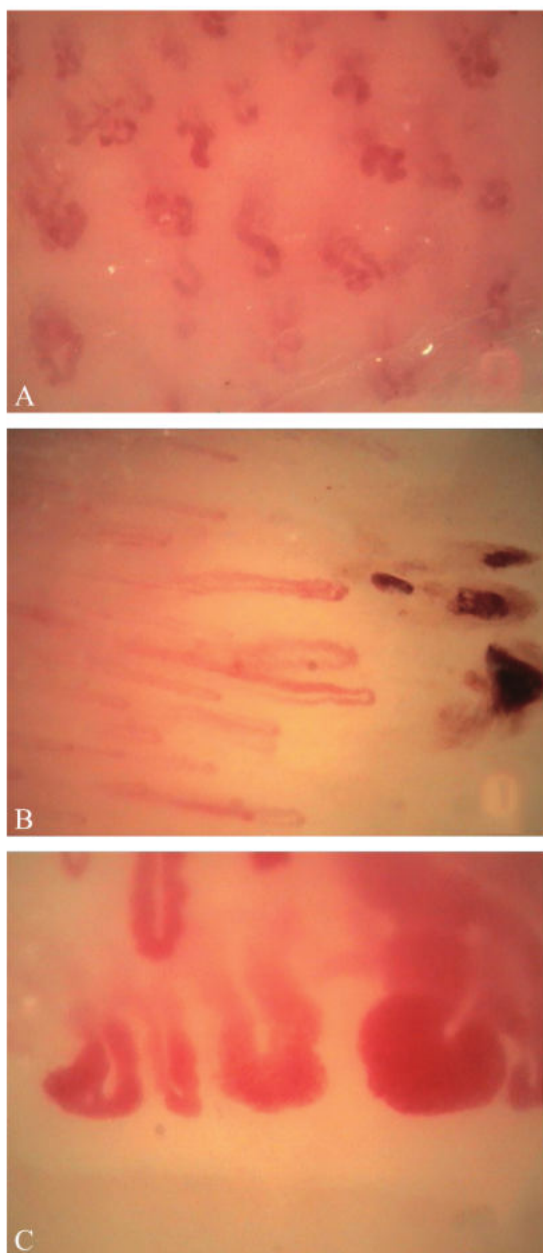


Figure 1.—Vascular damage pattern evolution: A) early vascular damage pattern, within the first 2 months after chemotherapy treatment it is possible to appreciate capillary loop of bizarre morphology. This aspect is the result of the shortening of the loop, the tortuosity and the increase of the A-V crossings. All together these changes give a “crumpled” appearance; B) medium-term vascular damage pattern. After 3-8 months from the chemotherapeutic treatment microhemorrhages with hemosiderin deposition are appreciable, in variable numbers. They are the result of the breakage of the capillary walls made vulnerable by the toxic effects of drugs; C) long-term vascular damage pattern. Years later, asymmetrical capillary dilations prevail. Giant aneurysmal dilations are detachable after about 5-10 years. This effect is probably due to the structural alteration of the capillaries and the alteration of endothelium and pericitis, with consequent loss of “vascular tone.”

studies could be conducted, with a more numerous populations, a better stratification and an adequate follow-up.

Therefore, if studied from a better perspective with an adequate follow-up, these parameters could provide important information on the microcirculatory health status of the subject under examination, allowing the implementation of effective preventive measures.

Conclusions

Cardiovascular late effects of chemotherapeutic agents are emerging, and endothelium alterations are considered important in their pathogenesis.

The analysis of cardiovascular morbidity and mortality in patients with previous risk factors shows that they benefit from early treatment.^{23, 24} Currently, the most used primary prevention models to assess cardiovascular risk are the Framingham Risk Score (FRS) and the European SCORE model.^{25, 26} However, these models have been criticized for their shortcomings;^{27, 28} in addition, they do not consider previous antineoplastic treatment. From these considerations it arises the need for broader models of prediction, which will be able to appropriately estimate the possibility of cardiovascular complications, in order to establish early treatments.

Currently, there are no specific guidelines or studies regarding the management of cardiovascular risk factors in cancer survivors;²⁹⁻³¹ in addition, assessment of risk factors or CV (subclinical) damage is not yet an integral part of long-term care of cancer patients. Capillaroscopy, could be effective to identify microcirculatory and rheological changes induced by the therapies.

From our analysis it emerges that capillaroscopy could be a possible marker of capillary insult caused by chemotherapy.

Our study showed that the presence of ectasia and hemorrhages could be associated with endothelial damage induced by chemotherapy, even if some limitations are present and further studies are needed.

It is possible that the same abnormalities are present, at the same time, also in other districts (kidney, endocardium, retina), and their early detection could let us treat them and prevent their worsening.

The individuation of capillaroscopic alteration specific for chemotherapy-induced endothelial injury could be an important tool to identify cancer survivors who suffer from a vascular insult before they develop clinical symptoms, with the aim of establishing an adequate treatment and/or a strict cardiovascular surveillance.

References

- DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014;64:252–71.
- National Cancer Control. Cancer control; 2020 [Internet]. Available from: <http://cancercontrol.cancer.gov/ocs/statistics/graphs.html> [cited 2021, Feb 3].
- De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, *et al.*; EUROCARE-5 Working Group. Cancer survival in Europe 1999–2007 by country and age: results of EUROCARE—5—a population-based study. *Lancet Oncol* 2014;15:23–34.
- Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014;64:83–103.
- Oeffinger KC, Mertens AC, Sklar CA, Kawashima T, Hudson MM, Meadows AT, *et al.*; Childhood Cancer Survivor Study. Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med* 2006;355:1572–82.
- Mertens AC, Liu Q, Neglia JP, Wasilewski K, Leisenring W, Armstrong GT, *et al.* Cause-specific late mortality among 5-year survivors of childhood cancer: the Childhood Cancer Survivor Study. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:1368–79.
- de Haas EC, Oosting SF, Lefrandt JD, Wolfenbuttel BH, Sleijfer DT, Gietema JA. The metabolic syndrome in cancer survivors. *Lancet Oncol* 2010;11:193–203.
- Altena R, Perik PJ, van Veldhuisen DJ, de Vries EG, Gietema JA. Cardiovascular toxicity caused by cancer treatment: strategies for early detection. *Lancet Oncol* 2009;10:391–9.
- Nuver J, Smit AJ, Sleijfer DT, van Gessel AI, van Roon AM, van der Meer J, *et al.* Microalbuminuria, decreased fibrinolysis, and inflammation as early signs of atherosclerosis in long-term survivors of disseminated testicular cancer. *Eur J Cancer* 2004;40:701–6.
- Lennernas B, Albertsson P, Lennernas H, Norrby K. Chemotherapy and antiangiogenesis drug-specific, dose-related effects. *Acta Oncol* 2003;42:294–303.
- Di Lisi D, Madonna R, Zito C, Bronte E, Badalamenti G, Parrella P, *et al.* Anticancer therapy-induced vascular toxicity: VEGF inhibition and beyond. *Int J Cardiol* 2017;227:11–7.
- Svilaas T, Lefrandt JD, Gietema JA, Kamphuisen PW. Long-term arterial complications of chemotherapy in patients with cancer. *Thromb Res* 2016;140:S109–18.
- Soultati A, Mountzios G, Avgerinou C, Papaxoinis G, Pectasides D, Dimopoulos MA, *et al.* Endothelial vascular toxicity from chemotherapeutic agents: preclinical evidence and clinical implications. *Cancer Treat Rev* 2012;38:473–83.
- Schiffirin EL. A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;38:S3–6.
- Green DJ, Jones H, Thijssen D, Cable NT, Atkinson G. Flow-mediated dilation and cardiovascular event prediction: does nitric oxide matter? *Hypertension* 2011;57:363–9.
- Park KH, Park WJ. Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches. *J Korean Med Sci* 2015;30:1213–25.
- Bloch EH. Microscopic observations of the circulating blood in the bulbar conjunctiva in man in health and disease. *Ergeb Anat Entwicklungsgesch* 1956;35:1–98.
- Bellmunt J, Navarro M, Morales S, Jolis L, Carulla J, Knobel H, *et al.* Capillary microscopy is a potentially useful method for detecting bleomycin vascular toxicity. *Cancer* 1990;65:303–9.
- Scardina GA, Cacioppo A, Messina P. Changes of oral microcirculation in chemotherapy patients: A possible correlation with mucositis? *Clin Anat* 2014;27:417–22.
- Cutolo M. Atlas of capillaroscopy in rheumatic disease. Amsterdam: Elsevier; 2011.
- Pizzorni C, Sulli A, Craviotto C, Tuccio M, Serio B, Cutolo M. Diagnostic perspectives in the rheumatologic vasculitis: the role of video-capillaroscopy. *Reumatismo* 2002;54:99–104. [Italian].
- G. Guzzo, M. Senesi, N. Giordano, M. Montagnani: La capillaroscopia in medicina. Milan: Edra - Collana medico scientifica; 1996.
- Berry JD, Dyer A, Cai X, Garside DB, Ning H, Thomas A, *et al.* Lifetime risks of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 2012;366:321–9.
- Wilkins JT, Ning H, Berry J, Zhao L, Dyer AR, Lloyd-Jones DM. Lifetime risk and years lived free of total cardiovascular disease. *JAMA* 2012;308:1795–801.
- Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998;97:1837–47.
- Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, *et al.*; SCORE project group. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J* 2003;24:987–1003.
- Lloyd-Jones DM. Cardiovascular risk prediction: basic concepts, current status, and future directions. *Circulation* 2010;121:1768–77.
- Cooney MT, Dudina A, D'Agostino R, Graham IM. Cardiovascular risk-estimation systems in primary prevention: do they differ? Do they make a difference? Can we see the future? *Circulation* 2010;122:300–10.
- Cardinale D, Bacchiani G, Beggiano M, Colombo A, Cipolla CM. Strategies to prevent and treat cardiovascular risk in cancer patients. *Semin Oncol* 2013;40:186–98.
- Lancellotti P, Nkomo VT, Badano LP, Bergler-Klein J, Bogaert J, Davin L, *et al.*; European Society of Cardiology Working Groups on Nuclear Cardiology and Cardiac Computed Tomography and Cardiovascular Magnetic Resonance; American Society of Nuclear Cardiology; Society for Cardiovascular Magnetic Resonance; Society of Cardiovascular Computed Tomography. Expert consensus for multi-modality imaging evaluation of cardiovascular complications of radiotherapy in adults: a report from the European Association of Cardiovascular Imaging and the American Society of Echocardiography. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2013;14:721–40.
- Albini A, Pennesi G, Donatelli F, Cammarota R, De Flora S, Noonan DM. Cardiotoxicity of anticancer drugs: the need for cardio-oncology and cardio-oncological prevention. *J Natl Cancer Inst* 2010;102:14–25.

Conflicts of interest.—The authors certify that there is no conflict of interest with any financial organization regarding the material discussed in the manuscript.

Authors' contributions. All authors read and approved the final version of the manuscript.

History.—Article first published online: April 29, 2020. - Manuscript accepted: April 23, 2020. - Manuscript revised: April 15, 2020. - Manuscript received: May 12, 2019.

Supplementary data.—For supplementary materials, please see the HTML version of this article at www.minervamedica.it

SUPPLEMENTARY DIGITAL MATERIAL 1

Supplementary Table I.—Effects of chemotherapeutic drugs on cells and their supposed effects on endothelium and mycro-cyrclle.

CHEMOTHERAPEUTIC AGENT	EFFECTS ON THE CELL	EFFECTS ON ENDOTHELIUM AND MYCRO-CYRCLE
Antracyclines (Doxorubicin)	DNA damage Caspase activation mediated apoptosis ↑ROS and oxidative stress Topoisomerase-2β inhibition	Inhibition of endothelial cell propagation ↓ ET-1 levels ↓ endothelium dependent relaxation
Bleomycin	DNA strand breaks induction ↑ ROS ↑ Fas Ligand upregulation	Induction of endothelial cell apoptosis ↑ IL-1b, TNF-a, TGF-b, IL-8, TNF-a, TF ↑ ICAM – 1, E-selectin, VEGF and VCAM-1 ↓ NO levels (↓ antiinflammatory effect) ↓ thrombomodulin Impaired NMD
Taxanes	Tubulin binding→ no mitotic spindle formation →mitotic arrest and apotosis ↑ c-jun chinasi (JNK) ↑ proteic nitration	Direct endothelial injury ↑ TF ↓ trombomodulin ↑ cytokines Shift to prothrombotic state Direct inhibition of VEGF NO synthase inhibition→↓endothelium independent vasoconstriction
Cyclophosphamide	Direct interaction with DNA→ apoptosis	Apoptosis of endothelial cell ↑ Platelet aggregation ↑ VEGF levels ↓ACE levels
Platinum derivates	DNA cross-linkage→ apoptosis ↑ROS	Inhibit endothelial cell proliferation ↑procoagulant endothelial microparticles ↑ PAI-1 and vWF Activate mononuclear cells, leukocyte/ endothelial cell interaction

5-Fluorouracil	Interferation with DNA and RNA synthesis and function ↑ ROS	Direct cytotoxic effect on endothelial cells ↓ VEGF, angiogenesis thrombogenic effect NO synthase inhibition → ↓ endothelium independent vasoconstriction
Methotrexate (MTX)	Direct cytotoxic effect ↑ ROS	Pro-thrombotic effect Hyper-homocystinemia

VEGF: Vascular endothelial growth factor; NO: Nitrogen suboxide; TNF-a: Tumour necrosis alpha; NMD: Nitrate-mediated vasodilation; ICAM-1:

Intercellular adhesion molecule-1; VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule 1; ET-1: Endothelin 1; ACE: Angiotensin-converting enzyme; PAI:

Plasminogen activation inhibitor; ROS: Reactive oxygen species; TGF-a and b: Transforming growth factor alpha and beta; TF: Tissutal factor.

SUPPLEMENTARY DIGITAL MATERIAL 3

Supplementary Table III.—Capillaroscopic characteristics of patients.

Patient	CHEMOTHERAPY	Cutaneous transparency	EDEMA	SPVP	Architecture	Density	Tortuosity	Loops length	Vessels ectasia	Micro-aneurisms	Hemorrhages	Avascular areas	Neoangiogenesis	Blood flow
1	T, C	1	2	1	2	1	1	2	1	1	3	2	2	1
2	T	1	2	1	2	1	1	3	1	1	3	2	2	2
3	FEC, T, CBP	1	2	1	2	1	1	1	1	1	3	2	2	2
4	T	1	2	2	2	1	1	1	1	1	3	2	2	2
5	FEC, T	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2
6	FEC, T	2	2	2	2	1	1	1	1	1	3	2	2	2
7	EC, T	1	2	2	2	1	1	3	1	1	3	2	2	1
8	FEC,P, T + P	1	2	2	2	1	1	1	1	1	3	2	1	2
9	E, C; T	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	2	2	2
10	FEC T, CBP	1	2	2	2	1	1	2	1	1	3	2	2	1
11	C, D, T	1	1	2	2	1	1	3	1	1	3	2	1	1
12	FEC, T	1	2	2	2	1	1	3	1	1	3	2	2	1
13	FEC, T	1	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2
14	FEC	1	2	2	2	1	1	2	1	1	1	2	2	1
15	FEC	1	2	2	2	1	1	2	1	1	1	2	2	2
16	FEC	1	2	1	2	1	1	2	1	1	3	2	2	2
17	T	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2
18	FEC, T,CBP, TRZ	1	2	1	2	1	1	2	1	1	3	2	2	2
19	T, CBP,CA, TRZ , P	2	2	1	2	1	1	3	1	1	3	2	2	2
20	TRZ,CBP, T	1	2	2	2	1	1	3	1	1	1	2	2	2
21	T, TRZ	1	2	1	2	1	1	2	1	1	3	2	2	2
22	FEC,T,MTX, 5FU, C	1	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	1	2
23	FEC ; T	1	2	1	2	1	1	3	1	1	3	2	2	2

24	FEC; CBP, T	1	2	2	2	2	1	1	1	1	3	2	2	2
25	5-FU, E, C - T	1	2	2	2	1	1	3	1	1	3	2	2	2

Chemotherapy: T: Taxanes; C: Ciclophosphamide; FEC : 5-fluorouracil, Epyrubicin, Ciclophosphamide; P: Pertuzumab; EC: Epyrubicin, Ciclophosphamide; TRZ: trastuzumab; CBP: Carboplatinum; CA: capecitabine; D: Doxorubicin. Cutaneous trasparency: 1 : normal, 2: altered; Edema: 1 : present, 2 : absent ; SPVP: 1 : normal, 2=altered; Architecture : 1 : preserved, 2 : altered; Density : 1: normal, 2 : slight reduction , 3 : severe reduction; Tortuosity : 1 : present, 2 : absent; Loops lenght: 1 : elongated, 2 : shortened, 3 : normoconformate; Vessels ectasia : 1 : present, 2 : absent; Micro-aneurisms: 1 : present, 2 : absent; Hemorrhages :1 : present, 2 : several, 3 : absent; Avascular areas : 1 : present, 2 : absent; Neoangiogenesis : 1 : present, 2 : absent; Blood Flow :1 : normal, 2 : altered.

SUPPLEMENTARY DIGITAL MATERIAL 2

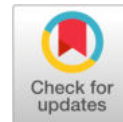
Supplementary Table II.—Clinical characteristic of patients.

PATIENT	AGE	TYPE OF NEOPLASM	HORMONAL TREATMENT	CHEMOTHERAPY	SMOKE	DIABETES	HYPERTENSION	HYPERCHOLESTEROLEMIA	RENAL FUNCTION	BM I	PERSONAL OR FAMILY HISTORY FOR CARDIO-CEREBRO-VASCULAR DISORDERS
1	71	M	YES	T, C	YES	NO	YES	NO	NORMAL	31.02	YES
2	53	M	YES	T	NO	NO	YES	SI	NORMAL	26.22	YES
3	44	M	NO	FEC, T, CBP	YES	NO	YES	NO	NORMAL	24	YES
4	56	M	NO	T	NO	NO	NO	NO	NORMAL	21.48	YES
5	32	M	YES	FEC, T	NO	NO	NO	NO	NORMAL	23.66	YES



6	41	M	NO	FEC, T	NO	NO	NO	SI	NORMAL	19.88	NO
7	45	M	NO	EC, T	NO	no	NO	NO	NORMAL	20.07	NO
8	77	M	YES	FEC,P, T + P	NO	NO	NO	NO	NORMAL	21.72	NO
9	48	M	YES	E, C; T	NO	NO	NO	SI	NORMAL	24.98	YES
10	37	M	YES	FEC T, CBP	NO	NO	NO	NO	NORMAL	18.43	YES
11	45	M	NO	C, D, T	NO	NO	YES	NO	NORMAL	26	NO
12	36	M	NO	FEC, T	YES	NO	NO	NO	NORMAL	24.49	NO
13	77	M	YES	FEC, T	NO	NO	YES	NO	NORMAL	19.36	NO
14	70	M	NO	FEC	NO	YES	YES	SI	NORMAL	23.44	NO
15	70	M	YES	FEC	YES	YES	YES	NO	NORMAL	28.04	NO
16	59	M	YES	FEC	YES	NO	NO	NO	NORMAL	39.13	YES
17	71	M,E	YES	T	EX	NO	YES	NO	NORMAL	25	NO

18	30	M	YES	FEC, T,CBP, TRZ	YES	NO	NO	NO	NORM AL	23. 88	NO
19	63	M	YES	T, CBP,CA, TRZ , P	YES	NO	YES	SI	NORM AL	22. 77	YES
20	54	M	YES	TRZ,CBP, T	YES	NO	NO	NO	NORM AL	28	NO
21	71	M	NO	T, TRZ	NO	NO	NO	NO	NORM AL	24. 61	NO
22	60	M	YES	FEC,T,MTX, 5FU, C	NO	NO	NO	SI	NORM AL	24. 91	NO
23	60	M	YES	FEC ; T	YES	NO	NO	NO	NORM AL	28. 33	NO
24	63	M	NO	FEC; CBP, T	NO	YES	NO	NO	NORM AL	26	NO
25	54	M	YES	5-FU, E, C - T	NO	NO	NO	NO	NORM AL	22. 94	YES

M: breast cancer; E: endometrial cancer. Chemotherapy: T: taxanes; C: cyclophosphamide; FEC: 5-fluorouracil, epirubicin, cyclophosphamide; P: pertuzumab; EC: epirubicin, cyclophosphamide; TRZ: trastuzumab; CBP: carboplatinum; CA: capecitabine; D: doxorubicin.



The Glucosamine-derivative NAPA Suppresses MAPK Activation and Restores Collagen Deposition in Human Diploid Fibroblasts Challenged with Environmental Levels of UVB

Mariangela Lopreiato¹, Rossana Cocchiola¹, Susanna Falcucci², Martina Leopizzi³, Michele Cardone⁴, Valeria Di Maio³, Umberto Brocco², Valerio D'Orazi⁵, Stefano Calvieri⁴, Roberto Scandurra¹, Federico De Marco²  and Anna Scotto d'Abusco*¹ 

¹Department of Biochemical Sciences, Sapienza University of Roma, Roma, Italy

²Department of Research, Advanced Diagnostics and Technological Innovation, IRCCS-Regina Elena National Cancer Institute, Roma, Italy

³Department of Medico-Surgical Sciences and Biotechnologies, Polo Pontino-Sapienza University, Latina, Italy

⁴Department of Dermatology and Venereology, Sapienza University of Roma, Policlinico Umberto I, Roma, Italy

⁵Department of Surgical Sciences, Sapienza University of Roma, Roma, Italy

Received 5 August 2019, revised 30 October 2019, accepted 31 October 2019, DOI: 10.1111/php.13185

ABSTRACT

The ultraviolet (UV) component of solar radiation is the driving force of life on earth, but it can cause photoaging and skin cancer. In this study, we investigated the effects of the glucosamine-derivative 2-(N-Acetyl)-L-phenylalanylamido-2-deoxy- β -D-glucose (NAPA) on human primary fibroblasts (FBs) stimulated *in vitro* with environmental levels of UVB radiation. FBs were irradiated with 0.04 J cm^{-2} UVB dose, which resulted a mild dosage as shown by the cell viability and ROS production measurement. This environmental UVB dose induced activation of MAP kinase ERK 1/2, the stimulation of c-fos and at lower extent of c-jun, and in turn AP-1-dependent up-regulation of pro-inflammatory factors IL-6 and IL-8 and suppression of collagen type I expression. On the contrary, 0.04 J cm^{-2} UVB dose was not able to stimulate metalloprotease production. NAPA treatment was able to suppress the up-regulation of IL-6 and IL-8 via the inhibition of MAP kinase ERK phosphorylation and the following AP-1 activation, and was able to attenuate the collagen type I down-regulation induced by the UVBs. Taken together, our results show that NAPA, considering its dual action on suppression of inflammation and stimulation of collagen type I production, represents an interesting candidate as a new photoprotective and photorepairing agents.

INTRODUCTION

Solar radiation is the ultimate driving force of life on earth and, through the ultraviolet (UV)-dependent role in vitamin D synthesis, critically contributes to human wellness. Nonetheless, UV components are also the driving forces of photoaging and photocarcinogenesis (1,2). Skin photodamage concerns both epidermal and dermal compartments leading to a wide range of conditions such as wrinkling, epithelial thickening, keratosis, dermal atrophy

and elastosis, hypo- or hyperpigmentation, loose of tone, dryness, and finally skin cancer and melanoma (3,4).

These morphological alterations are the endpoint of a wide range of molecular damages generated by both direct and indirect mechanisms. The direct damage depends on interaction between UV and DNA and other macromolecules (5). The indirect damages are caused by UV-induced reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS, respectively), which in turn chemically attack the biological macromolecules (6). As a consequence, several cellular modifications take place, including the activation of pro-inflammatory response and damage repair, metabolic adaptation and phenotype changes (4,7,8). A number of changes occurs also in the extracellular matrix (ECM), as reduction of collagen fibrils, elastin fragmentation and persistently elevated pro-inflammatory cytokine production (9). The collagen decrease is due to both reduced collagen bio-synthesis, depending on the activation of activator protein (AP)-1, which in turn down-regulates TGF- β 1, a profibrotic cytokine, controlling the growth of dermal fibroblasts (10), and increased collagen fibril fragmentation caused by an increased expression and activity of matrix metalloproteases (MMPs), which drive the degradation of collagens (11–13).

The major part of the studies regarding UV-related pathologies traditionally focused on transformation of the proliferating epithelial cells and on their aberrant effects on the surrounding tissue. Conversely, the impact of normal cells, blood vessels, molecules and extracellular components surrounding the tumor cells, collectively known as the “tumor microenvironment” or “stroma,” have been poorly considered so far. In recent years however, the stroma has gained increasing attention and now it is thought to be a key regulator of tumor initiation and progression (14,15).

Within this frame, most attention has been paid to the role of macrophages, lymphocytes, and endothelial cells (15). Macrophages have been reported to support neoplastic cell invasion, migration and intravasation through their ability to shift from the killing M1 phenotype to the permissive M2 phenotype (16,17). Lymphocytes are major determinants of cancer fate, and

*Corresponding author email: anna.scottodabusco@uniroma1.it (Anna Scotto d'Abusco)

accordingly, a number of mechanisms are exploited by cancer cells to modulate lymphocyte activity including down-regulation of antigen presentation and up-regulation of inhibitory molecules (18). Moreover, blood and lymphatic endothelial cells, in addition to their obvious role in nutrients supplying and tumor dissemination, contribute, via secreted molecules called angiocrine and lymphangiocrine factors, to orchestrate and sustain the neoplastic progression (19).

Conversely, the fibroblasts (FBs), which represent the major cell type within the microenvironment of most carcinomas and are the cells producing and controlling the composition of ECM, have been so far underexplored being regarded as rather passive by-standers of neoplastic growth. However, due to their inherent heterogeneity, plasticity and function, fibroblasts are ideal modulators of normal and cancer epithelium. Recently, their contribution to tumor stroma has elicited new attention (14), and many new functions have been proposed for these cells (20).

In the last years, we studied the effects of a peptidyl derivative of glucosamine, 2-(N-Acetyl)-L-phenylalanyl-amido-2-deoxy- β -D-glucose (NAPA) (21), in human chondrocytes, finding that NAPA was able to interfere with inflammatory pathways. In particular, NAPA affected AP-1 pathway by inhibiting p38 and JNK kinases (22) and consequently down-regulated MMP-1, -3 and -13 production. Next, we analyzed the ability of NAPA to inhibit NF- κ B pathway, finding that it was able to inhibit IKK α nuclear translocation and its kinase activity (23). NAPA also stimulated the production of extracellular matrix components, such as collagens, proteoglycan, and hyaluronic acid in chondrocytes (24), thus facilitating the tissue repair. Considering that chondrocytes and FBs share same function, deposition and maintenance of ECM, we decided to study the effects of NAPA on FBs. Here, we report about experimental results on NAPA as a potential photoprotective/photorepairing compound for human diploid FBs and dermal matrix exposed to environmental level of UVB radiation.

MATERIALS AND METHODS

Human primary fibroblast isolation. Human diploid fibroblasts (FB) were obtained from three young adult male patients underwent to circumcision surgery for phimosis, full ethical consent was obtained from all donors and the Research Ethics Committee, Sapienza University of Roma, approved the study. FB were isolated as previously described, briefly, after scraping away excess fat and subcutaneous tissue, the foreskins were floated in 0.25% trypsin solution (Thermo Fisher Scientific) at room temperature for 1 h under gentle agitation. Trypsin was neutralized by soybean trypsin inhibitor, the cell suspension was pelleted for 10 min at 200 g, washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and cultivated in High Glucose Dulbecco's MEM (Thermo Fisher Scientific), supplemented with penicillin/streptomycin plus 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, Co. Saint Louis, MO). To avoid the bias of senescence modification in cell metabolism, mycoplasma-free FB clones between the 5th and 20th *in vitro* passage were used for the reported experiments.

UV irradiation. Cells were plated at a density of 30 000 cells cm⁻² (roughly 50% confluency) and cultured overnight. Immediately before irradiation, the medium was substituted with PBS and then the monolayers were exposed to UVB (312 nm) in a Bio-Sun Vilber Lourmat irradiation system for 10 s (Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Germany). Delivered radiation was expressed in Joule per cm² (J cm⁻²).

Immediately after UV exposure, fresh medium was added and the cultures were incubated for subsequent assays. For negative control, culture cell medium was substituted with PBS; cells were moved to the irradiation system, then refilled with fresh medium, and returned to the incubator without the exposure to UVB irradiation.

ROS determination. FB cells were plated in 96-well plates and irradiated as above outlined. Ten minutes before each ROS measure, cells were washed with PBS and 100 μ L of medium, containing 10 mM 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich) was added (25). At indicated times, the fluorescence of DCFH-DA-loaded cultures was evaluated by a DTX Multimode Detector plate reader (Beckman Coulter s.r.l. Cassina De' Pecchi, Milano, Italia) with excitation/emission filters at 485/535 nm, respectively.

Eight replicas per condition were simultaneously assayed in each experimental session, and each experiment was independently replicated at least three times.

NAPA treatment. For NAPA treatment, 1 h before UVB irradiation, cells in monolayer were pretreated with 0.5 mM NAPA and then exposed to UVB as above described. After irradiation, cells were added with fresh medium containing 0.5 mM NAPA, final concentration, for the required time, as indicated in Results section and in Figure legends.

Spheroid preparation and treatment. 3D spheroid cultures were prepared as previously described (24). Briefly, 300 000 fibroblasts per condition were pelleted by centrifugation for 6 min, at 37°C, at 250 g in 15-mL tubes and then cultured in 10% serum medium in standard oxygen tension, in the presence of 50 μ g mL⁻¹ ascorbic acid. After three days, culture spheroids were gently moved in a 24-well plate in a 100 μ L volume of no Phenol red medium. For NAPA treatment, 1 h before UVB irradiation, spheroids were moved in a 1.0 mL volume of fresh complete medium without phenol red containing 0.5 mM NAPA and then exposed to UVB as above described. Nonirradiated spheroids were used as control (CTL). Spheroids were assayed 7 days since UVB treated. Each experiment was independently repeated at least three times.

Cell viability. To determine the cell viability of UVB-treated cells, monolayer FB were seeded in 96-well microplates at 5000 cells well⁻¹ and incubated overnight. Following the UV challenge, the monolayers were stained with Crystal Violet (Sigma-Aldrich) at indicated intervals and the cell number estimated by the A₅₄₀, as previously described (26).

For the viability of 3D cultures, spheroids were first stained with MTT as above, and after washing, mounted in OCT embedding matrix (Kaltex S.r.l Padua, Italy), and then, they were cut in a cryostat and the comparative MTT reducing activity of the central area versus the coronal area evaluated by visual scoring under 20 \times magnification.

RNA extraction and reverse transcription. Total RNA was extracted and purified from monolayers tissue culture with the TRIzol reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc), used according to the manufacturer's indications. RNA quantity and quality were assessed by the A₂₆₀/A₂₈₀ ratio as evaluated in a Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc). Reverse transcription was performed starting from 1 μ g of total RNAs using the Improm II enzyme, (Promega Corporation, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions.

Quantitative real-time PCR. Quantitative Real-time PCR analysis was performed using an ABI Prism 7300 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Inc). Amplification was carried out using SensimixPlus SYBR Master mix (Bioline, London, UK). Primers were designed using Primer Express software (Applied Biosystems) and were synthesized by Biofab Research S.r.l. (Rome, Italy), and their sequence is reported in Table 1.

Relative expression levels were normalized with 18S as housekeeping gene. Data were analyzed by 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method (27) and expressed as fold change compared to CTL.

Western blot analyses. To analyze the effect of UVB irradiation and NAPA treatment on kinase activation, we performed Western blot experiments. Cytosolic and nuclear proteins were obtained from treated and untreated cell monolayers by Nuclear Extract kit (Active Motif, Carlsbad, CA), used according to the manufacturer's instructions. Extracted protein concentration was measured in the supernatant by Bradford assay. After SDS-PAGE, proteins were transferred to PVDF membranes (Biorad) and analyzed with one of the following primary antibodies: anti-ERK 1/2, anti-pERK1/2 (1 μ g mL⁻¹) supplied by BioSource International (Camarillo, CA), anti-p38, anti-pp38, anti-JNK and anti-p-JNK (4 μ g mL⁻¹) were all obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA). The anti-cyclooxygenase (Cox)-2 was from Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Inc). Anti-mouse and anti-rabbit IgG secondary antibodies were from Santa Cruz Biotechnology. The blots were revealed by ECL detection system (GE Healthcare). Image acquisition and densitometric analysis were performed by ChemiDoc Instrument (Biorad).

Table 1. Sequences of the primers used in RT-PCR analysis.

Gene	Primer sequences
<i>IL-6</i>	(Forward) 5'-GATGGATGCTTCCAATCTG-3'; (Reverse) 5'-CTCTAGGTATACCTCAAATCC-3';
<i>IL8</i>	(Forward) 5'- AGATATTGCACGGGAGAATATACAAA -3'; (Reverse) 5'-GCAAACCCATTCAATTCCTGAA -3';
<i>c-fos</i>	(Forward) 5'-CGAGCCCTTTGATGACTTCCT-3'; (Reverse) 5'-GGAGCGGGCTGTCTCAGA-3';
<i>c-jun</i>	(Forward) 5'-TCACGTGAAGTGACGGACTGTT-3'; (Reverse) 5'-GGAGGAACGAGGCGTTGAG-3';
<i>Cox-2</i>	(Forward) 5'-TGTTGAATCATTACCAGGC-3' (Reverse) 5'-GTACTGCGGGTGAACATTC-3'
<i>Col I</i>	(Forward) 5'-AAGGGTGAGACAGGCGAACA-3'; (Reverse) 5'-GACCCTGGAGCCAGAGAA-3';
<i>18S</i>	(Forward) 5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTC-3'; (Reverse) 5'-CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG-3'

ELISA. Concentration of IL-6 and IL-8 in culture medium was measured by Human Interleukin-6 ELISA kit and IL-8 Human ELISA kit Fine Test (Fine Biotech Co., Ltd, Wuhan, China), respectively, according to the manufacturers' instructions.

Immunocytochemistry. One-week postirradiation 3D spheroid cultures were fixed with 4% paraformaldehyde and paraffin embedded according to standard procedures. For immunocytochemical evaluation of collagen production, the spheroids were cut in 3 mm slices and stained with mouse monoclonal anti-collagen I (Coll I) antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc). After incubation, specimens were washed and incubated with the secondary biotinylated antibody and subsequently with the streptavidin-biotin-peroxidase (DAKOLSAB Kit peroxidase; DAKO, CA). The signals were developed by incubating with freshly prepared 3,3'-diaminobenzidine (DAB) substrate-chromogen buffer.

Statistical analysis. Experiments for UVB irradiation and ROS detection were replicated at least four times. Each data point, within any single experiment, is the mean (\pm SD) of eight independent replicas.

Data for RT-PCR, WB and ELISA were obtained from at least three independent experiments, each performed either in duplicate or in triplicate. Data were statistically analyzed with two-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's multiple comparison test, using Prism 6.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA). *P* value < 0.05 was considered significant.

RESULTS

UVB irradiation affected cell viability

In order to set the irradiation conditions within the biologically relevant range of sub lethal toxic stress, we tested the effect of cumulative doses ranging from 0.01 to 0.08 J cm⁻². This range was chosen based on preliminary results from transformed human keratinocytes (28) and on theoretical consideration. This range covered the entire span of cytotoxicity (as measured by the reduction of cell viability), ranging from the almost negligible viability inhibition in the case of the lowest dose (0.01 J cm⁻²) up to a complete, persistent suppression of the viability induced by the highest 0.08 J cm⁻² dose (Fig. 1). Notably, such a reduction in cell viability persisted unmodified until 96 h postirradiation. Interestingly, the growth curve associated with the 0.04 J cm⁻² dose had a roughly intermediate profile between that of control untreated cells and the complete suppression of the viability induced by the 0.08 J cm⁻² dose (Fig. 1); for this reason, 0.04 J cm⁻² was used in any subsequent experiment.

UVB induced ROS generation

UVB irradiation induced a triple wave-shaped elevation of ROS (Fig. 2). Immediately after irradiation, a very sharp increase of

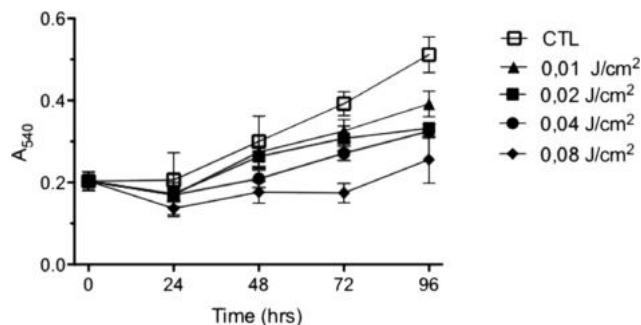


Figure 1. Effects of UVB radiation on human primary dermal fibroblasts cell viability. Cells were left untreated (CTL) or stimulated with UVB irradiation ($\lambda = 312$ nm) with doses ranging between 0.01 and 0.08 J cm⁻². The cell viability was measured by crystal violet staining at time points reported in abscissa. Each point represents the mean of eight independent replicas, and bars indicate the Standard Deviation.

ROS generation took place. This immediate peak was followed by two other "secondary" peaks, both characterized by a considerably lower height and a rather larger base compared with the first one. The time of occurrence of these secondary metabolic peaks appeared to be somewhat erratic in different experimental sessions and with different FB clones occurring in the interval between 1 h 30' and 3-h postirradiation for the second one and from 4 to 6 h for the third one (data not shown). In any case within the first 6 h, three distinct peaks were consistently seen in any experiments. NAPA pretreatment was not able to inhibit the UVB-induced ROS production (data not shown).

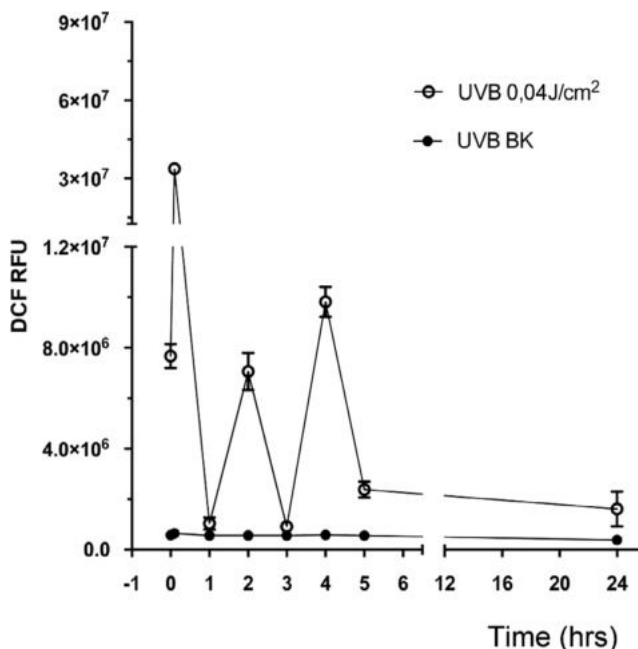


Figure 2. Effects of UVB radiation on ROS production in human primary dermal fibroblasts. Cells were either treated with UVB or left untreated. The ROS production was measured by DCFH-DA method, and the measures were made at postirradiation time intervals reported in abscissa (Time hours). On the ordinate axis, the ROS level is reported and expressed as relative fluorescence units (RFU). Untreated control cells (UVB BK) are represented by solid circles. Irradiated cells (0.04 J cm⁻²) are represented by empty circles. Each point is the mean of 8 replicas; bars indicate the standard deviation.

NAPA suppresses the UVB-mediated increase IL-6, IL-8 and Cox-2 up-regulation

The sharp ROS up-regulation following UVB irradiation triggers a rapid inflammatory response in human dermal fibroblasts, believed to be responsible of most of *in vivo* skin photoaging features such as, wrinkling, thickening, dermal atrophy and elastosis, pathological pigmentation, or depigmentation. To evaluate the impact of NAPA administration on the UVB-dependent inflammatory response, the expression level of IL-6, IL-8 and Cox-2 mRNAs were measured. As expected, the UVB irradiation induced a clear up-regulation of these pro-inflammatory

mediators. Interestingly, in the cells pretreated with NAPA and then exposed to UVBs a significant decrease in the levels of IL-6 and IL-8 mRNAs expression was noticed (Fig. 3A and row data in Table 2). In order to ascertain whether such a reduction of the inflammatory response was actually reflected in the proteins levels the IL-6 and IL-8 concentrations were measured in cell supernatants. NAPA pretreatment completely inhibited the IL-6 up-regulation and significantly although not completely, reduced the level of IL-8 (Fig. 3B). Consistently, NAPA treatment also suppressed the COX-2 mRNA increase (Fig. 3C, left side and row data in Table 2). On the contrary, the COX-2 protein level induced by UVB irradiation was only minimally

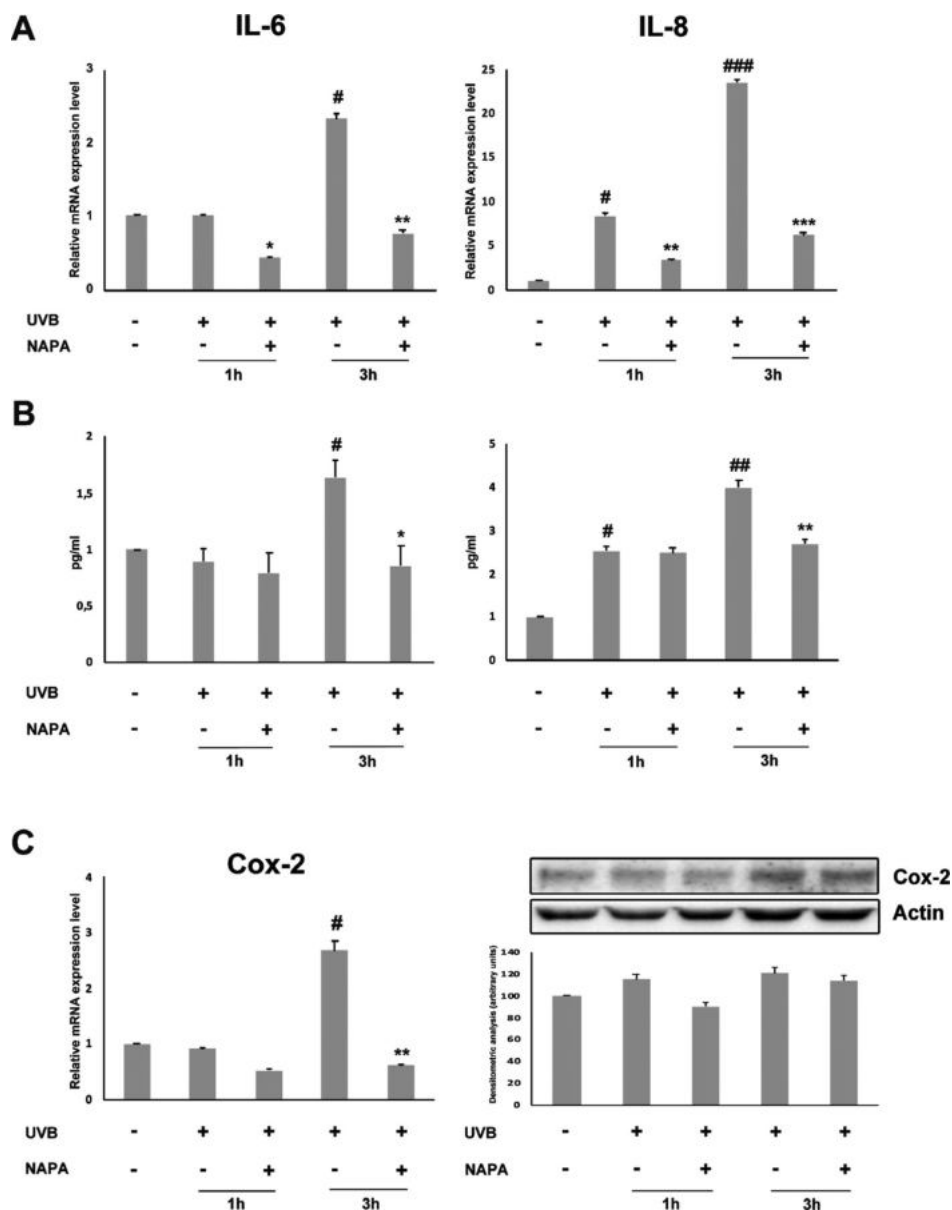


Figure 3. Effects of NAPA on inflammatory pathways stimulated by UVB irradiation in human fibroblasts. Cells were left untreated (control) or stimulated with 0.04 J cm^{-2} UVB or pretreated for 1 h with NAPA and then stimulated with 0.04 J cm^{-2} UVB. (A) IL-6 and IL-8 mRNA levels were analyzed by real-time PCR and expressed as relative mRNA expression level; (B) IL-6 and IL-8 protein levels were analyzed by ELISA assay and expressed as pg mL^{-1} ; (C) Cox-2 mRNA expression level (left side) was analyzed by real-time PCR and expressed as relative mRNA expression level, and Cox-2 protein level (right side) was analyzed by Western blot assay and measured by densitometric analysis performed by ImageJ. Results are expressed as mean \pm SEM of data obtained by three independent experiments. Statistical significance was $\#P < 0.05$ UVB vs untreated; $\#\#\#P < 0.01$ UVB vs untreated; $*P < 0.05$ UVB + NAPA vs UVB; $**P < 0.01$ UVB + NAPA vs UVB; $***P < 0.001$ UVB + NAPA vs UVB.

Table 2. Real-time PCR data reported as average of delta Ct [Ct(GOI)-Ct(18S)]. Standard deviation is reported in parentheses.

Treatment	1 h	3 h
	IL-6	
CTL	6.85 (0.02)	6.93 (0.02)
UVB	8.85 (0.03)	5.64 (0.13) [#]
UVB + NAPA	8.04 (0.01) [*]	7.23 (0.08) ^{**}
	IL-8	
CTL	8.82 (0.01)	9.03 (0.02)
UVB	5.77 (0.53) [#]	4.27 (0.52) ^{###}
UVB + NAPA	7.10 (0.18) ^{**}	6.19 (0.49) ^{***}
	Cox-2	
CTL	10.35 (0.01)	10.25 (0.01)
UVB	11.07 (0.04)	8.94 (0.31) [#]
UVB + NAPA	11.95 (0.04)	11.09 (0.06) ^{**}
	c-fos	
CTL	13.18 (0.01)	12.31 (0.01)
UVB	5.19 (8.46) ^{###}	8.73 (5.41) [#]
UVB + NAPA	7.62 (8.29) ^{***}	11.99 (0.47) ^{**}
	c-jun	
CTL	8.96 (0.01)	9.41 (0.01)
UVB	6.55 (0.82) [#]	6.81 (0.83) [#]
UVB + NAPA	7.30 (0.85) [*]	7.96 (0.41) [*]

[#]*P* < 0.05 UVB vs untreated; ^{##}*P* < 0.01 UVB vs untreated; ^{###}*P* < 0.001 UVB vs untreated; ^{*}*P* < 0.05 UVB + NAPA vs UVB; ^{**}*P* < 0.01 UVB + NAPA vs UVB; ^{***}*P* < 0.001 UVB + NAPA vs UVB.

reduced by NAPA administration and this modulation was below the statistically significant threshold (Fig. 3C, right side).

NAPA suppresses MAPK signaling pathway by interfering with UVB-induced p-ERK activation

Considering that UVB-dependent ROS production activates MAPK signaling proteins, which in turn induce the transcription of inflammatory proteins, IL-6, IL-8 and Cox-2, we analyzed whether NAPA was able to counteract the activation of MAPK signaling members. To this purpose, total cell proteins were extracted from UVB-exposed samples either treated or untreated with NAPA. UVB irradiation induced an increase of phosphorylated ERK (p-ERK), a slight increase of p-JNK, and no activation of p-p38. NAPA pretreatment almost completely inhibited ERK phosphorylation and inhibited also the slight, not statistically significant JNK phosphorylation (Fig. 4A). Moreover, UVB stimulation induced an up-regulation of c-fos that was almost completely suppressed by NAPA (Fig. 4B and row data in Table 2). In agreement with the low activation of JNK, c-jun mRNA expression was increased at very low extent. Nonetheless, NAPA treatment was able to decrease also such a low up-regulation (Fig. 4B).

NAPA attenuates the UVB-mediated collagen decrease and stimulates its accumulation in ECM by human fibroblasts

Inflammatory mediators induce collagen degradation hastening the skin aging process. To investigate whether UVB dose that we administered to cells affected collagen production and whether NAPA could have a protective role against such an injury and/or stimulate collagen production, we analyzed treated cells by Western blot. The findings showed that NAPA *per se* stimulated Coll I production, UVB treatment inhibited the Coll I accumulation and that cells pretreated with NAPA and then

exposed to UVB attenuates this inhibition, showing a statistically significant more intense band compared with band in UVB-treated sample (Fig. 5A).

In order to mimic fibroblast physiological conditions, we cultured FBs in tridimensional model by performing spheroid culture. FBs were left untreated, treated with NAPA and exposed to a UVB dose (0.04 J cm⁻²) in the presence or absence of NAPA. After 10 days postirradiation, collagen type I (Coll I) production was analyzed by immunocytochemistry. These results confirmed that NAPA *per se* stimulated Coll I production, that UVB treatment inhibited the Coll I accumulation and that cells pretreated with NAPA had a protective effect against the collagen decrease (Fig. 5B).

Finally, we analyzed the effects of NAPA treatment in an *in vivo* experiment, finding that it was able to reduce the peri-ocular wrinkles in two volunteer subjects treated with basis face cream containing the molecule. See Supporting materials and Figure S1.

DISCUSSION

The sunlight is the main source of UV radiations and the major causative agent of skin photoaging, skin cancer and melanoma. UV radiation is divided into three components namely UVC, UVB and UVA bands. The most dangerous UVCs (λ 100–280 nm) are completely quenched by the ozone and oxygen of upper atmospheric strata and do not represent a hazard to human health. Conversely, a fraction of UVB, that is, the *near* UVB component (λ 295–320 nm) and the whole UVA (λ 320–400 nm) bands reaches the sea level and account for most of beneficial and detrimental effects of solar radiation. The most energetic UVB component, having their wavelengths closed to the maximum absorbance peak of nucleic acids, shows a high direct genotoxic activity. The UVA band, although much less energetic, accounts for almost 95% of solar UV fluence, and due to the longer wavelengths of UVA, they have the potential to penetrate much deeper into the skin. Both UVB and UVA induce a similar spectrum of genetic lesions (4) although with different mechanisms (2,29). Consequently, a warning was issued by WHO-IARC to classify both of them as class I carcinogenic agents to humans (30).

A very large body of data, about UV-related pathology, are presently available, but their impact is however unsatisfactory, considering that they often are not directly comparable due to the high variability in experimental conditions, for example, human vs murine systems, primary vs immortalized/transformed cells, *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* experiments, the use of different source of radiation with different emission spectra *etc.* Here, we report about the activity of NAPA on human diploid fibroblasts exposed to environmental UVB doses.

In order to avoid any possible bias connected to the extensive genetic deregulation of continuous cell lines, we used human adult diploid FB derived from non-photo-exposed skin area; thus, our results can be directly related to the physiological cell response to UV radiations. In this study, we used a UVB dose of 0.04 J cm⁻² chosen among an array of doses ranging between 0.01 almost ineffective, and 0.08 able to completely inhibit the cell viability. Interestingly, the dose of 0.04 proved to be roughly the 50% cell inhibiting dose (ID₅₀) as measured by the inhibition of cell growth. Considering that the cell growth impairment persisted up to 72-h postirradiation and that such an impairment

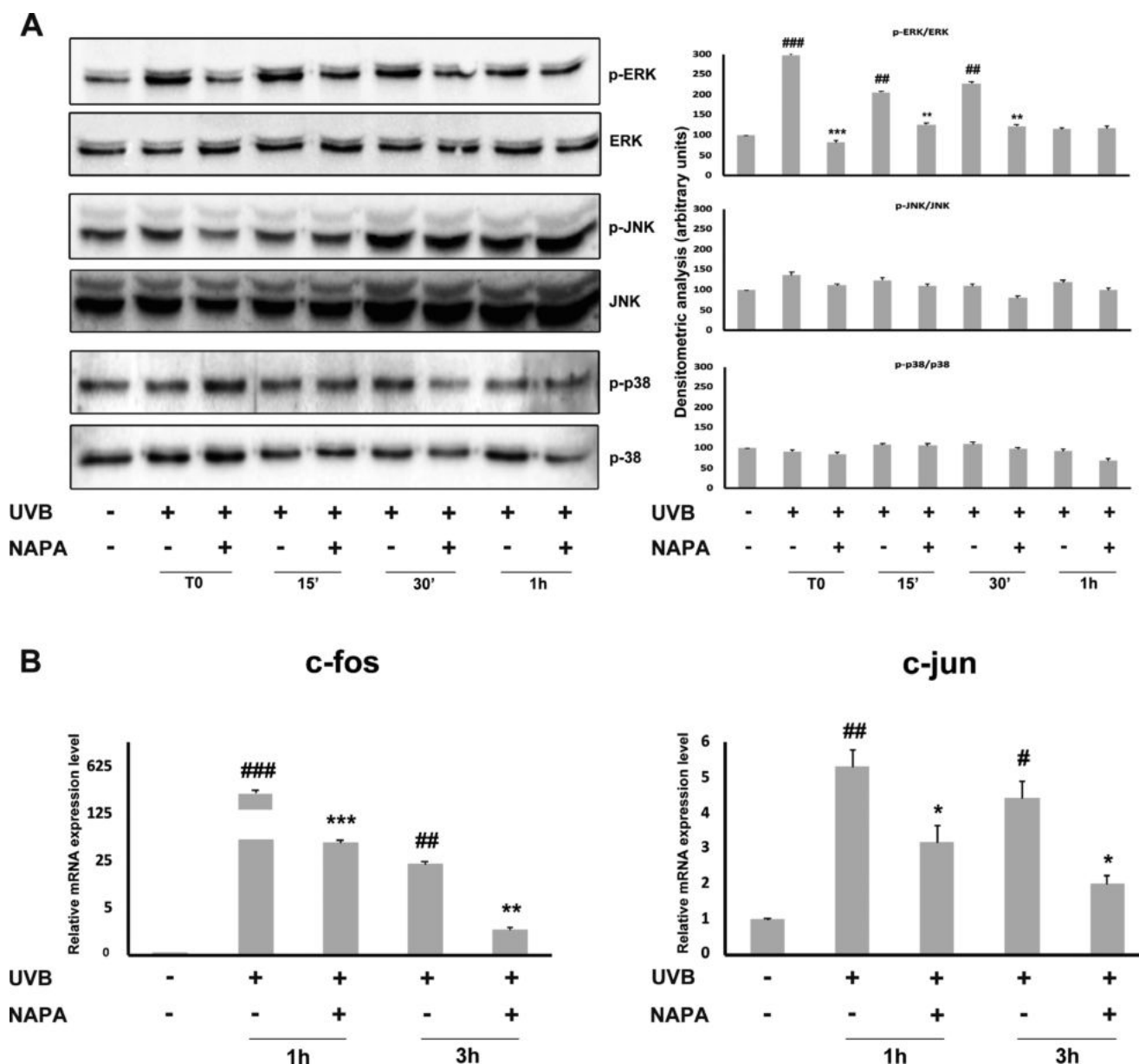


Figure 4. Effects of NAPA on MAP kinase phosphorylation induced by UVB in human fibroblasts. Cells were left untreated (control) or stimulated with 0.04 J cm^{-2} UVB or pretreated for 1 h with NAPA and then stimulated with 0.04 J cm^{-2} UVB. (A) Cell extracts were analyzed at 15', 30' and 1 h after treatment by Western blot, using anti-ERK/p-ERK, JNK/p-JNK and p38/p-p38 antibodies (left side). The densitometric analysis (left side) was performed by ImageJ. Representative data from three different experiments are shown. (B) c-fos and c-jun mRNA level, analyzed by RT-PCR, and expressed as relative mRNA expression level. Results are expressed as mean \pm SEM of data obtained by three independent experiments. Statistical significance was $^{##}P < 0.01$ UVB vs untreated; $^{###}P < 0.001$ UVB vs untreated; $^{**}P < 0.01$ UVB + NAPA vs UVB; $^{***}P < 0.001$ UVB + NAPA vs UVB.

was not associated to apoptosis or toxic effects (31), we can conclude that this mild dose fairly approximates a non-toxic exposition to solar radiation and it falls within the range of UVB minimal erythral doses for European people with skin types I–III (32).

Interestingly, such an environmental UVB dose is associated with a strong induction of ROS, measured after UVB stress. Based on its height and rapidity of both onset and decay, it can be reasonably attributed to the direct UV effect. Two more late peaks were observed at 2 and 4 h after stimulation; these secondary peaks showed a considerably lower height and based on

the kinetic of appearance and their larger basis, and they can be accounted for the activation of membrane bound oxidases induced by primary ROS burst.

The pathogenesis of photoaging is driven by ROS generation, which in turn activates the IKK complex and MAPKs, the most important of which are ERK 1/2, JNK and p38 (5,33). ERK and JNK induce production and migration into the nucleus of c-fos and c-jun, where they activate AP-1 transcription factor. On the other hand, the activation of p38 and IKK complex stimulates the activation of NF- κ B pathway. AP-1 and NF- κ B regulate the expression of gene array involved in several intracellular

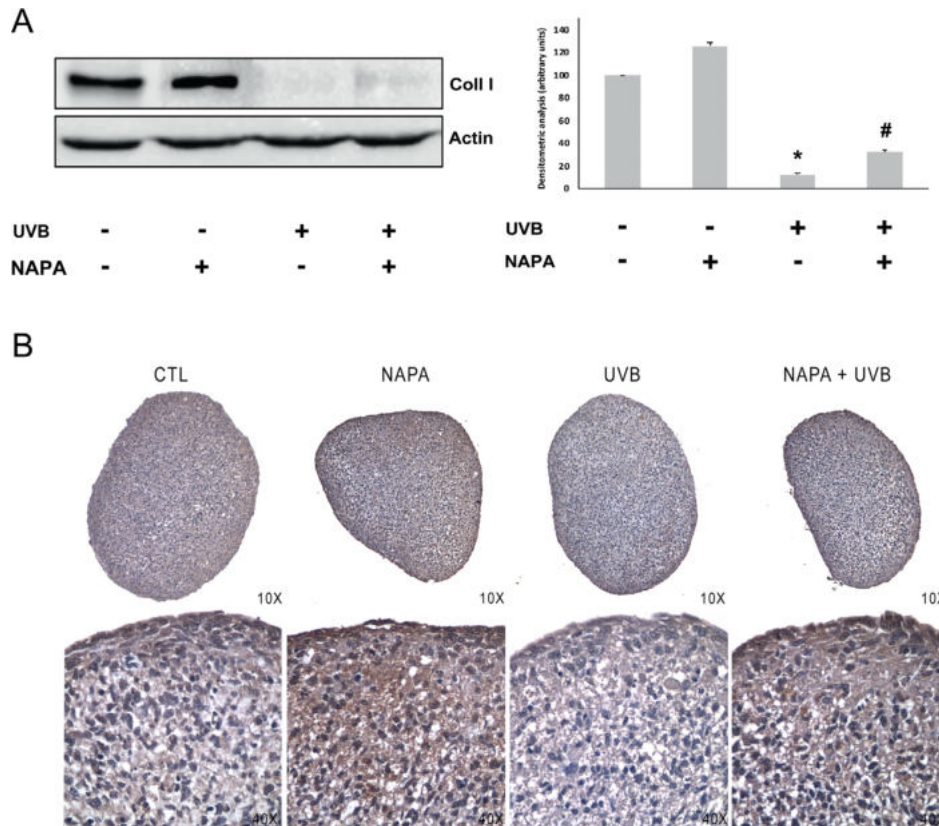


Figure 5. Effects of NAPA on collagen type I production after stimulation by UVB in human fibroblasts. Cells were left untreated or treated with NAPA, or stimulated with 0.04 J cm^{-2} UVB or pretreated for 1 h with NAPA and then stimulated with 0.04 J cm^{-2} UVB. (A) Cell extracts were analyzed 24 h after treatment by Western blot, using antibody anti-collagen type I, left side. The densitometric analysis performed by ImageJ was reported in the right side. Statistical significance was $^*P < 0.001$ UVB-treated cells compared to untreated cells; $^{\#}P < 0.05$ UVB + NAPA-treated cells compared to UVB-treated cells. (B) Results of immunocytochemistry analyses of collagen type I in paraffin-embedded spheroids cultured for 7 days after UVB stimulation. 10x and 40x magnification, as indicated. CTL = untreated spheroids; NAPA = NAPA-treated spheroids; UVB = UVB-irradiated spheroids; NAPA + UVB = spheroids pretreated with NAPA and then irradiated with UVB. In this figure, representative images are reported from three different experiments.

pathways such as inflammation and cell cycle regulation, proliferation and apoptosis (5). Both keratinocytes and fibroblasts have been shown that AP-1 and NF- κ B, among several pro-inflammatory genes, stimulate the production of chemokines and cytokines as IL-8 and IL-6 (20,34).

Considering that NAPA pretreatment was not able to counteract the UVB-mediated ROS production (data not shown), and that in our previous studies, the glucosamine-derivative NAPA has been proved to be effective in counteracting the inflammatory mechanisms in other cells and in other pathologies, (22,35), we decided to analyze its effects also on fibroblasts challenged with UVB. The UVB stimulation induced the IL-8 increase, early after 1-h treatment and at more extent after 3 h, whereas IL-6 was increased after 3-h treatment, according to what observed *in vivo* diseases, such as in Intervertebral Disc inflammation and in Febrile Neutropenic Children (36,37). In those diseases, it has been observed an early up-regulation of IL-8 and a slightly delayed up-regulation of IL-6, likely due to the different role of these molecules. IL-8 is a chemokine with a chemoattractant role, whereas IL-6 is a cytokine, the rapid increase of IL-8 is needed to attract immune cells into the pathological district. We can conclude that our *in vitro* experimental system resembles the *in vivo* disease models. Interestingly, NAPA was able to decrease the IL-8, IL-6

production stimulated by UVB treatment, both at mRNA and protein level.

As above reported, the 0.04 J cm^{-2} UVB dose induced an early phosphorylation of ERK 1/2, and at considerably lower extent a definite phosphorylation of JNK, not statistically significant. Conversely, no phosphorylation of p38 was ever noticed at any experimental time, although Kuo et al reported that 0.04 J cm^{-2} could stimulate a mild activation of p38 in human FBs (38). This inconsistent finding is likely due to different experimental conditions, considering that Kuo et al. used a radiation source (a membrane cross-linking chamber) with an emission peak at 302 nm, and we used a controlled emission at 312 nm, which simulates the solar radiation (39). Pretreatment with NAPA greatly decreased the phosphorylation of ERK and was also able to inhibit the slight, not statistically significant JNK phosphorylation, indicating that it acts through physiologically relevant mechanisms and suggesting that the decrease of pro-inflammatory cytokine production is a consequence of the kinase inhibition. The activation of p-ERK induces the production and activation of c-fos and c-jun (5,40). In our experiments, both molecules were induced by UVB radiation, and in accordance with the much stronger activation of p-ERK versus p-JNK, c-fos was induced at considerably higher extent than c-jun. Once again, NAPA administration was able to down-regulate the

expression of these transcription factors, thus indicating the physiological relevance of the suppression of p-ERK.

A further consequence of fibroblast UVB irradiation is the up-regulation of Cox-2, the inducible form of Cox. It catalyzes the first and rate-limiting step in the conversion of arachidonic acid into prostaglandins, prostacyclins and thromboxanes, key factors in inducing and maintaining inflammation, and due to its inherent oxidative nature, it concurs to ROS generation and to related oxidative damage (41). Therefore, Cox-2 participates to chronic inflammation and concurs to realize a pro-oxidant endocellular state, two driving elements of UV-induced photoaging and skin cancer.

The up-regulation of Cox-2 both in FBs and in keratinocytes, after stimulation with some external agents such as UV radiation and urban particulate, has been reported (42,43). Moreover, Cox-2 expression as consequence of MAPK/ERK activation in FBs and keratinocytes has been described (33,44). Our results confirm that UVB radiations, administered at environmental dose, lead to ERK-dependent Cox-2 production. In agreement with early ERK activation, the Cox-2 mRNA expression level was up-regulated after 3-h stimulation with UVB, whereas the protein level was increased at lesser extent in this time lapse. According with the inhibition of ERK phosphorylation, NAPA was able to counteract the up-regulation of Cox-2 mainly at mRNA level.

Exposition to UV radiation leads to alteration of ECM structure, implying reduction and fragmentation of Coll I (45). Our results indicate that despite of the mild/environmental UVB dose here used, the radiation caused a dramatic reduction of Coll I, 24 h after UVB stimulation. This reduction is due to the decrease of Coll I mRNA synthesis and not to the up-regulation of metalloproteases, whose expression was not affected by the fairly limited UVB dose we used (data not shown). Conventional monolayer cell cultures are not a suitable system to study ECM composition, considering that in monolayer no stereotactic accumulation of extracellular components may occur and because cells are maintained in a highly oxygenated state and with optimal nutrient supply. These conditions are far from those actually experienced by cells in typical compact tissues. To address this point, 3D primary fibroblasts spheroid cultures were set up to allow the cells to sterically organize themselves and develop specialized metabolic phenotypes according to their relative position and nutrients supply. Recently, other authors used spheroids to study the fibroblasts in some applications, as myofibroblast, which are involved in tissue repair, and human dermal fibroblasts for the tendon formation (46,47) In both cases, the fibroblasts cultivated in spheroids showed to be a suitable system to study the behavior of those cells. Moreover, the spheroids were never associated to apoptotic or necrotic programmed cell death (46).

The amount of Coll I in 3D spheroids stimulated with UVB and treated with NAPA was comparable to untreated cells, whereas spheroids undergoing only UVB stimulation showed a distinct reduction of this ECM component. This result completely agrees with what we previously found in another experimental context. Cartilage cells, chondrocytes, from patients with osteoarthritis when treated with NAPA showed an increased production of hyaluronic acid and collagen type II, which is typical of that tissue. The finding that also in dermal fibroblasts NAPA is able to stimulate collagen production suggests that this molecule can be used in those pathologies where the extracellular matrix degradation is involved, such as osteoarthritis and photoaging. The findings obtained in *in vitro* experiments are

corroborated by the pilot experiment, conducted *in vivo* on two female subjects (see Supporting materials and Figure S1). Considering that the subjects applied 50 µl of the cream containing 1% NAPA only once a day and only for 4 weeks, the results are very encouraging.

In summary, we analyzed human primary fibroblasts challenged with a mild exposition to UVB, corresponding to a short exposition to solar irradiation at Rome latitude. Under these conditions, a pro-inflammatory response, including IL-6, IL-8 and Cox-2 expression, was obtained. This response was mainly due to ERK and c-fos activation. Very interestingly, our molecule NAPA, even devoid of any inhibitory effect on UVB-mediated ROS production, was able to contrast the activation of these pathways, inhibiting the ERK phosphorylation, underscoring its potential role in photoprotection as further supported by the pilot study conducted on the peri-ocular wrinkles of two female subjects.

Acknowledgements—This research was supported by grant “Progetto di Facoltà 2017,” prot n. Rm11715c7e7ac924.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article:

Figure S1. NAPA stimulates the reduction of wrinkles in subjects treated with basis face cream containing the molecule.

REFERENCES

- Holick, M. F. (2008) Sunlight, UV-radiation, vitamin D and skin cancer: How much sunlight do we need? *Adv. Exp. Med. Biol.* **624**, 1–15.
- Pandel, R., B. Poljšak, A. Godic and R. Dahmane (2013) Skin photoaging and the role of antioxidants in its prevention. *ISRN Dermatol.* **2013**, 1–11.
- Yaar, M. and B. A. Gilchrist (2001) Ageing and photoaging of keratinocytes and melanocytes. *Clin. Exp. Dermatol.* **26**, 583–591.
- Nishigori, C. (2015) Current concept of photocarcinogenesis. *Photochem. Photobiol. Sci.* **14**, 1713–1721.
- Bickers, D. R. and M. Athar (2006) Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 2565–2575.
- Pattison, D. I. and M. J. Davies (2006) Actions of ultraviolet light on cellular structures. In *Cancer: Cell Structures, Carcinogens and Genomic Instability*, (Edited by L. P. Bignold), pp. 131–157. Birkhäuser-Verlag, Basel, Switzerland. https://doi.org/10.1007/3-7643-7378-4_6
- Seo, S. A., B. Park, E. Hwang, S. Y. Park and T. H. Yi (2018) *Borago officinalis* L. attenuates UVB-induced skin photodamage via regulation of AP-1 and Nrf2/ARE pathway in normal human dermal fibroblasts and promotion of collagen synthesis in hairless mice. *Exp. Gerontol.* **107**, 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.02.017>.
- Park, E. K., H. J. Lee, H. Lee, J. H. Kim, J. Hwang, J. Il Koo and S. H. Kim (2018) The anti-wrinkle mechanism of melatonin in UVB treated HaCaT keratinocytes and hairless mice via inhibition of ROS and sonic hedgehog mediated inflammatory proteins. *Int. J. Mol. Sci.* **19**.
- Cavinato, M. and P. Jansen-Dürr (2017) Molecular mechanisms of UVB-induced senescence of dermal fibroblasts and its relevance for photoaging of the human skin. *Exp. Gerontol.* **94**, 78–82.
- Sun, Z., S. Y. Park, E. Hwang, M. Zhang, F. Jin, B. Zhang and T. H. Yi (2015) Salvianolic acid b protects normal human dermal fibroblasts against ultraviolet B irradiation-induced photoaging through mitogen-activated protein kinase and activator protein-1 pathways. *Photochem. Photobiol.* **91**, 879–886.

11. Bosch, R., N. Philips, J. Suárez-Pérez, A. Juarraz, A. Devmurari, J. Chalensouk-Khaosaat and S. González (2015) Mechanisms of photoaging and cutaneous photocarcinogenesis, and photoprotective strategies with phytochemicals. *Antioxidants* **4**, 248–268.
12. Quan, T. and G. J. Fisher (2015) Role of age-associated alterations of the dermal extracellular matrix microenvironment in human skin aging: A mini-review. *Gerontology* **61**, 427–434.
13. Kim, E., D. Kim, S. Yoo, Y. H. Hong, S. Y. Han, S. Jeong, D. Jeong, J. H. Kim, J. Y. Cho and J. Park (2018) The skin protective effects of compound K, a metabolite of ginsenoside Rb1 from *Panax ginseng*. *J. Ginseng Res.* **42**, 218–224.
14. Marsh, T., K. Pietras and S. S. McAllister (2013) Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Basis Dis.* **1832**, 1070–1078.
15. Dotto, G. P. (2014) Multifocal epithelial tumors and field cancerization: Stroma as a primary determinant. *J. Clin. Invest.* **124**, 1446–1453.
16. Na, Y. R., S. Je and S. H. Seok (2018) Metabolic features of macrophages in inflammatory diseases and cancer. *Cancer Lett.* **413**, 46–58.
17. Pollard, J. W. (2004) Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 71–78.
18. Weinberg, R. A. (2014) Biology of the cancer. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-72>
19. Lee, E., N. B. Pandey and A. S. Popel (2015) Crosstalk between cancer cells and blood endothelial and lymphatic endothelial cells in tumour and organ microenvironment. *Expert Rev. Mol. Med.* **17**.
20. Kuzet, S. E. and C. Gaggioli (2016) Fibroblast activation in cancer: when seed fertilizes soil. *Cell Tissue Res.* **365**, 607–619.
21. Giordano, C., C. Gallina, V. Consalvi and R. Scandurra (1991) Synthesis and properties of d-glucosamine N-peptidyl derivatives as substrate analog inhibitors of papain and cathepsin B. *Eur. J. Med. Chem.* **26**, 753–762.
22. Scotto d'Abusco, A., V. Calamia, C. Cicione, B. Grigolo, L. Politi and R. Scandurra (2007) Glucosamine affects intracellular signalling through inhibition of mitogen-activated protein kinase phosphorylation in human chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* **9**, R104.
23. Scotto d'Abusco, A., L. Politi, C. Giordano and R. Scandurra (2010) A peptidyl-glucosamine derivative affects IKK α kinase activity in human chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* **12**, R18.
24. Stoppoloni, D., L. Politi, M. Leopizzi, S. Gaetani, R. Guazzo, S. Basciani, O. Moreschini, M. De Santi, R. Scandurra and A. Scotto d'Abusco (2015) Effect of glucosamine and its peptidyl-derivative on the production of extracellular matrix components by human primary chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* **23**, 103–113.
25. Wang, H. and J. A. Joseph (1999) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 612–616.
26. Di Domenico, F., C. Foppoli, C. Blarzino, M. Perluigi, F. Paolini, S. Morici, R. Coccia, C. Cini and F. De Marco (2009) Expression of human papilloma virus type 16 E5 protein in amelanotic melanoma cells regulates endo-cellular pH and restores tyrosinase activity. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **28**, 4. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-28-4>
27. Schmittgen, T. D. and K. J. Livak (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* **3**, 1101–1108.
28. De Marco, F., M. Perluigi, C. Foppoli, C. Blarzino, C. Cini, R. Coccia and A. Venuti (2007) UVB irradiation down-regulates HPV-16 RNA expression: Implications for malignant progression of transformed cells. *Virus Res.* **130**, 249–259.
29. Nunes, A. R., Í. G. P. Vieira, D. B. Queiroz, A. L. A. B. Leal, S. Maia Morais, D. F. Muniz, J. T. Calixto-Junior and H. D. M. Coutinho (2018) Use of flavonoids and cinnamates, the main photoprotectors with natural origin. *Adv. Pharmacol. Sci.* **2018**, 1–9.
30. El Ghissassi, F., R. Baan, K. Straif, Y. Grosse, B. Secretan, V. Bouvard, L. Benbrahim-Tallaa, N. Guha, C. Freeman, L. Galichet and V. Cogliano (2009) A review of human carcinogens—Part D: radiation. *Lancet Oncol.* **10**, 751–752.
31. Rüniger, T. M., B. Farahvash, Z. Hatvani and A. Rees (2012) Comparison of DNA damage responses following equimutagenic doses of UVA and UVB: A less effective cell cycle arrest with UVA may render UVA-induced pyrimidine dimers more mutagenic than UVB-induced ones. *Photochem. Photobiol. Sci.* **11**, 207–215.
32. Moseley, H., H. Naasan, R. S. Dawe, J. Woods and J. Ferguson (2009) Population reference intervals for minimal erythral doses in monochromator phototesting. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **25**, 8–11.
33. Khan, N., D. N. Syed, H. C. Pal, H. Mukhtar and F. Afaq (2012) Pomegranate fruit extract inhibits UVB-induced inflammation and proliferation by modulating NF- κ B and MAPK signaling pathways in mouse skin. *Photochem. Photobiol.* **88**, 1126–1134.
34. Imokawa, G. (2018) Intracellular signaling mechanisms involved in the biological effects of the xanthophyll carotenoid astaxanthin to prevent the photo-aging of the skin in a reactive oxygen species depletion-independent manner: the key role of mitogen and stress-activated. *Photobiol. Photochem.* **95**, 480–489.
35. Scotto d'Abusco, A., C. Cicione, V. Calamia, R. Negri, C. Giordano, B. Grigolo, L. Politi and R. Scandurra (2007) Glucosamine and its N-acetyl-phenylalanine derivative prevent TNF- α -induced transcriptional activation in human chondrocytes. *Clin. Exp. Rheumatol.* **25**, 847–852.
36. Walter, B. A., D. Purmessur, M. Likhitanichkul, A. Weinberg, S. K. Cho, S. A. Qureshi, A. C. Hecht and J. C. Iatridis. (2015) Inflammatory kinetics and efficacy of anti-inflammatory treatments on human nucleus pulposus cells. *Spine* **40**(13), 955–963.
37. De Araujo, O. R., R. Salomão, M. K. C. Brunialti, D. C. B. Da Silva, A. A. Senerchia, F. A. De Moraes Costa Carlesse and A. S. Petrilli (2017) Cytokine kinetics in febrile neutropenic children: insights on the usefulness as sepsis biomarkers, influence of filgrastim, and behavior of the IL-23/IL-17 pathway. *Mediators Inflamm.* **2017**, 1–10.
38. Kuo, Y. H., P. Y. Wu, C. W. Chen, P. Lin, K. C. Wen, C. Y. Lin and H. M. Chiang (2017) N-(4-bromophenethyl) caffeamide protects skin from UVB-induced inflammation through MAPK/IL-6/NF- κ B-dependent signaling in human skin fibroblasts and hairless mouse skin. *Molecules* **22**, 1639.
39. Parrish, J. A., K. F. Jaenicke and R. R. Anderson (1982) Erythema and melanogenesis action spectra of normal human skin. *Photochem. Photobiol.* **36**, 187–191.
40. Subedi, L., T. H. Lee, H. M. Wahedi, S. H. Baek and S. Y. Kim (2018) Corrigendum to 'Resveratrol-enriched rice attenuates UVB-ROS-induced skin aging via downregulation of inflammatory cascades'. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, 1.
41. Wilgus, T. A., A. T. Koki, B. S. Zweifel, D. F. Kusewitt, P. A. Rubal and T. M. Oberyszyn (2003) Inhibition of cutaneous ultraviolet light B-mediated inflammation and tumor formation with topical celecoxib treatment. *Mol. Carcinog.* **38**, 49–58.
42. Park, B., E. Hwang, S. A. Seo, J. G. Cho, J. E. Yang and T. H. Yi (2018) Eucalyptus globulus extract protects against UVB-induced photoaging by enhancing collagen synthesis via regulation of TGF- β /Smad signals and attenuation of AP-1. *Arch. Biochem. Biophys.* **637**, 31–39.
43. Lee, C. W., Z. C. Lin, S. C. S. Hu, Y. C. Chiang, L. F. Hsu, Y. C. Lin, I. T. Lee, M. H. Tsai and J. Y. Fang (2016) Urban particulate matter down-regulates filaggrin via COX2 expression/PGE2 production leading to skin barrier dysfunction. *Sci. Rep.* **6**.
44. He, G., Y. M. Sung and S. M. Fischer (2006) Troglitazone induction of COX-2 expression is dependent on ERK activation in keratinocytes. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **74**, 193–197.
45. Watson, R. E. B., N. K. Gibbs, C. E. M. Griffiths and M. J. Sherratt (2013) Damage to skin extracellular matrix induced by UV exposure. *Antioxid. Redox Signal.* **21**, 1063–1077.
46. Granato, G., M. R. Ruocco, A. Iaccarino, S. Masone, G. Cali, A. Avagliano, V. Russo, C. Bellevicine, G. Di Spigna, G. Fiume, S. Montagnani and A. Arcucci (2017) Generation and analysis of spheroids from human primary skin myofibroblasts: An experimental system to study myofibroblasts deactivation. *Cell Death Discov.* **3**. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.38>
47. Nakanishi, Y., T. Okada, N. Takeuchi, N. Kozono, T. Senju, K. Nakayama and Y. Nakashima (2019) Histological evaluation of tendon formation using a scaffold-free three-dimensional-bioprinted construct of human dermal fibroblasts under in vitro static tensile culture. *Regen. Ther.* **11**, 47–55.

SUPPORTING INFORMATION

**The Glucosamine-derivative NAPA Suppresses MAPK Activation and Restores
Collagen Deposition in Human Diploid Fibroblasts Challenged with
Environmental Levels of UVB**

Mariangela Lopreiato, Rossana Cocchiola, Susanna Falcucci, Martina Leopizzi, Michele Cardone,
Valeria Di Maio, Umberto Brocco, Valerio D'Orazi, Stefano Calvieri, Roberto Scandurra, Federico
De Marco, Anna Scotto d'Abusco

SUPPLEMENTAL MATERIALS AND METHODS

In vivo pilot study. Two female patients, aged 59 and 70 y, respectively, released a full consent and entered the study. 50 μ l of base moisturizing face cream added with 1% NAPA (500 μ g), were self-applied once a day on one peri-ocular region of the two women. An equal amount of the same cream devoid of NAPA, was self-applied on the contra-lateral peri-ocular region. Cream packages were indistinguishable apart for the labels reading either “right side” or “left side”. The skin features, especially wrinkles, on both left and right peri-ocular zones, were evaluated by Antera 3D Camera Miravex (<http://miravex.com/antera-3d/>) at weeks 0 (T0) and 4 (4w). Measurements obtained at T0 were compared to measurements obtained at 4w.

SUPPLEMENTAL RESULTS

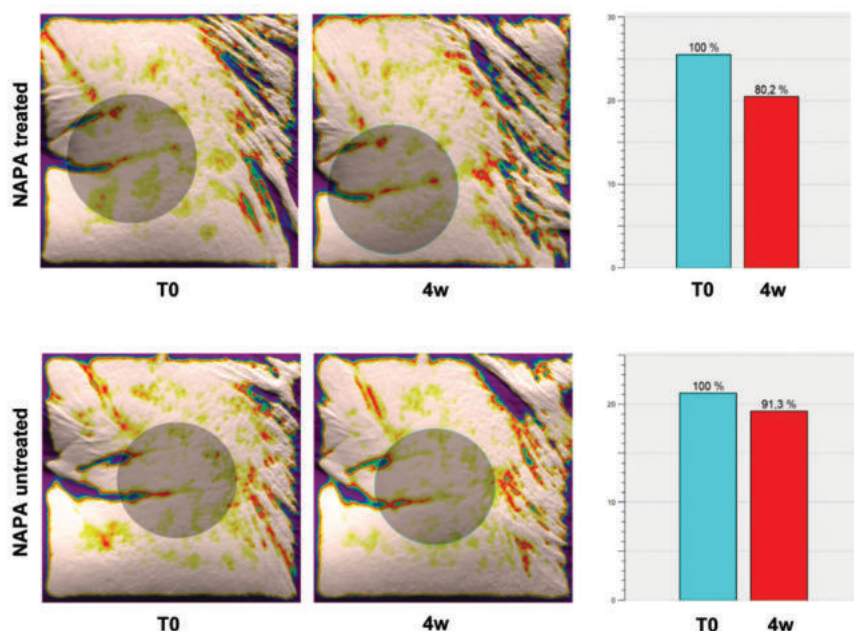


Figure S1. NAPA stimulates the reduction of wrinkles in subjects treated with basis face cream containing the molecule.

The wrinkles, in the peri-ocular regions of two female subjects were evaluated before and after 4 weeks treatment with base moisturizing face cream containing either 1% NAPA or placebo. In Figure S1 is reported the image of wrinkles on NAPA treated peri-ocular zone at time 0 (T0, before treatment) and after 4 weeks treatment compared with the NAPA untreated peri-ocular zone. The deep wrinkles are blue, medium wrinkles are green and thin wrinkles are red stained. The wrinkles in the NAPA-treated peri-ocular region (circle) were decreased from 100% to 80 % as shown by the staining, the wrinkles stained in blue at T0 became green after four-week treatment and the red ones became light red. In comparison the wrinkles in untreated peri-ocular region decreased only from 100% to 91.4 % (Fig. S1).



NILDE

Network Inter-Library Document Exchange

Il presente documento viene fornito attraverso il servizio NILDE dalla Biblioteca fornitrice, nel rispetto della vigente normativa sul Diritto d'Autore (Legge n.633 del 22/4/1941 e successive modifiche e integrazioni) e delle clausole contrattuali in essere con il titolare dei diritti di proprietà intellettuale.

La Biblioteca fornitrice garantisce di aver effettuato copia del presente documento assolvendo direttamente ogni e qualsiasi onere correlato alla realizzazione di detta copia.

La Biblioteca richiedente garantisce che il documento richiesto è destinato ad un suo utente, che ne farà uso esclusivamente personale per scopi di studio o di ricerca, ed è tenuta ad informare adeguatamente i propri utenti circa i limiti di utilizzazione dei documenti forniti mediante il servizio NILDE.

La Biblioteca richiedente è tenuta al rispetto della vigente normativa sul Diritto d'Autore e in particolare, ma non solo, a consegnare al richiedente un'unica copia cartacea del presente documento, distruggendo ogni eventuale copia digitale ricevuta.

Biblioteca richiedente: Biblioteca di Neuroscienze Umane
Data richiesta: 07/01/2022 09:31:48
Biblioteca fornitrice: Biblioteca del Polo Centrale di Medicina e Chirurgia - Università degli Studi di Milano
Data evasione: 10/01/2022 10:41:17

Titolo rivista/libro: Giornale italiano di dermatologia e venereologia
Titolo articolo/sezione: Prognostic factors in head and neck melanoma according to facial aesthetics units
Autore/i: Paolino G
ISSN: 0392-0488
DOI:
Anno: 2020
Volume: 155
Fascicolo: 1
Editore:
Pag. iniziale: 41
Pag. finale: 45

ORIGINAL ARTICLE

Prognostic factors in head and neck melanoma according to facial aesthetic units

Giovanni PAOLINO¹, Michele CARDONE¹, Dario DIDONA^{2*}, Elisa MOLITERNI¹, Luigi LOSCO³, Paola CORSETTI¹, Giusy SCHIPANI⁴, Teresa LOPEZ¹, Stefano CALVIERI¹, Ugo BOTTONI⁴

¹Dermatological Clinic, Sapienza University, Rome, Italy; ²First Division of Dermatology, Istituto Dermatologico dell'Immacolata, IRCCS, Rome, Italy; ³Department of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery, Sapienza University, Rome, Italy; ⁴Department of Dermatology, Magna Graecia University, Catanzaro, Italy

*Corresponding author: Dario Didona, First Division of Dermatology, Istituto Dermatologico dell'Immacolata, IRCCS, Via dei Monti di Creta 104, 00167, Rome, Italy. E-mail: didona.dermatology@gmail.com

ABSTRACT

BACKGROUND: Head and neck melanoma is a clinical challenge. Indeed, cutaneous head and neck melanoma shows a worse prognosis in comparison to melanomas of other body sites. Although the emphasis on facial cosmetic preservation plays a pivotal role in comparison to other body areas, specific Facial Aesthetic Units (FAU) could also play a key role in the prognostic evaluation of the malignancy.

METHODS: The aim of the current study was to evaluate the general outcome and clinicopathological features of head and neck melanoma and to detect prognostic differences according to each FAU. The Kaplan-Meier product was used to calculate survival curves, while Cox proportional-hazard regression was performed to evaluate the predictive value of each FAU.

RESULTS: A total of 221 head and neck melanoma patients was included in our analysis. In the nasal FAU, we found a high rate of local recurrence, which affected significantly disease-free survival. The worse prognosis was observed in melanoma of the scalp, which showed a greater tendency to skip metastases in internal organs. Moreover, we found that scalp showed a low incidence of non-melanoma skin cancers, if compared to other FAU, highlighting that the scalp local milieu might play a more prominent role in melanoma biology than chronic UV exposition.

CONCLUSIONS: Although FAUs have an aesthetic function, they could also play a role in the evaluation and follow-up of melanoma.

(Cite this article as: Paolino G, Cardone M, Didona D, Moliterni E, Losco L, Corsetti P, et al. Prognostic factors in head and neck melanoma according to facial aesthetic units. G Ital Dermatol Venereol 2020;155:41-5. DOI: 10.23736/S0392-0488.17.05685-1)

KEY WORDS: Facial neoplasms; Surgery; Melanoma; Prognosis; Retrospective studies.

About 20% of all cutaneous melanomas (MM) occur in the head and neck region (HN) and show a greater risk of disease progression with a poorer prognosis.¹⁻⁶ However, not all Authors confirm this finding.⁷ Indeed, the reported survival rate in HNMM patients seems to be directly related only to scalp MM, which is usually associated to a higher mortality rate.⁷

The biology of melanoma shows important differences according to the anatomical area. Indeed, acral-lentiginous MM and mucosal MM show a more aggressive course if compared to trunk MM.⁸ Although a delay in the diagnosis may play a pivotal role in increasing the aggressivity of MM of the HNMM, the different biology of local melanocytes could also play a role in the prognosis. In addition, the fast progression rate of HNMM could be also ex-

plained by other factors, such as limited excision margin, lower accuracy of sentinel lymph node biopsy, and higher vascularity.⁹⁻¹³

Considering the invasiveness of surgery on the face, the aesthetic involvement and the MM biology, it may be intriguing and useful correlate HNMM features to the single Facial Aesthetic Units (FAU).

A FAU is an anatomical site that is classified as an area of similar facial characteristics that can be distinguished from other areas. Gonzales-Ulloa first described FAU to emphasize the need for restoring facial anatomy after an oncologic surgery.¹⁴ Nowadays, the goal of facial oncologic-reconstructive is to obtain a reliable aesthetic outcome with the lowest local recurrence rate.

The aim of the current study was to evaluate the general

outcome and clinicopathological features of HNMM and to evaluate survival and prognostic differences according to each FAU.

Materials and methods

We computer-searched the clinical records of our patients registered into MM database from June 1998 to April 2016, to identify patients with MM of the head and neck. The current study was performed in two different medical centers: Sapienza University of Rome and Magna Graecia University (Italy). The study was approved by the committee on research ethics at the institution in which the research was conducted and any informed consent from human subjects was obtained as required.

Patients with a positive history of a previous MM located in non-head/neck regions were excluded from the survival analysis. To avoid clinical biases, we included in the study only patients treated in our Institutes within 5 months from the excision of the primary tumor.

The following parameters were collected and analyzed: sex (female or male), age (≤ 60 or ≥ 61 years), Breslow thickness (≤ 1.0 mm or ≥ 1.01 mm), ulceration (presence or absence), mitotic rate (if ≥ 1 mm²), presence and localization of the first metastasis. These parameters are the same used by Balch *et al.* to establish AJCC melanoma staging seventh edition.¹⁵

We followed all patients from the date of the first visit to date of death or last follow-up.

After the diagnosis of MM, a re-excision of the scar has been performed. A diameter of 0.5 cm was made in situ MM, a diameter of 1 cm for MM with a Breslow thickness between 0.1 mm and 2.0 mm, while a re-excision of 2 cm has been performed for MM ≥ 2.01 mm.

Patients underwent regular follow-up with periodical exams, and instrumental assessment through radiography, sonography, computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI), bone scintigraphy and positron emission tomography (PET).

At first, we examined the total number of patients included in the analysis. Subsequently patients have been studied according to FAU.

The face consists of 6 major aesthetic units comprised of: forehead, eye/eyebrow, nose, lips, chin, and cheek. These aesthetic units have been further divided into the following subunits: front (FAU1), cheeks/cheekbone (FAU2), eyelids (FAU3), nose (FAU4), lips (FAU5), ears (FAU6), scalp (FAU7), neck (FAU8) and mental region (FAU9) (Figure 1) We have evaluated for each FAU the

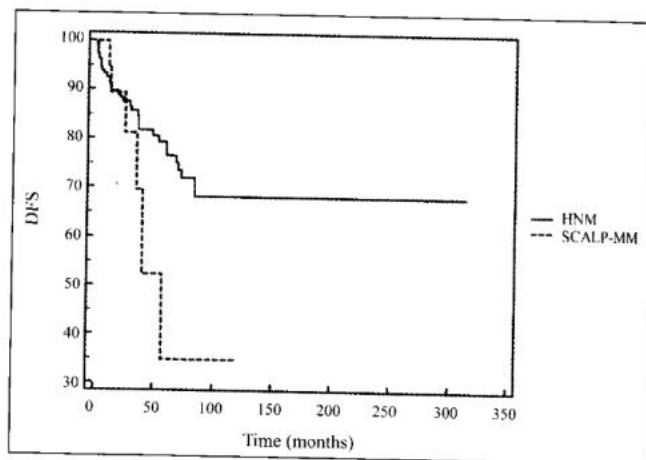


Figure 1.—Disease free survival (DFS) of scalp MM and head/neck melanoma (HNMM).

respective clinico-pathological features and their impact on the prognosis. Regarding exclusively MM of the scalp we have also evaluated the presence or absence of androgenic alopecia at time of diagnosis. Subsequently, for each FAU we evaluated photo-types, the incidence of non-melanoma skin cancers, as well of other genetic or acquired cutaneous disorders. Finally, for MM of the scalp, when possible, we have evaluated the presence of androgenic alopecia and the relative grade according to the Norwood-Hamilton's scale (I-VII).

Statistical analysis

Disease free survival (DFS) was calculated from diagnosis of the primary tumor to the date of the first local or distant recurrence. Overall survival (OS) was calculated from the diagnosis of the primary tumor to date of death and/or last follow-up. The Kaplan-Meier product was used to estimate survival curves for DFS and OS. The log-rank test was used to evaluate differences between the survival curves. Patients who were lost at follow-up or who were alive at the time of the last follow-up were censored at the date of their last follow-up. Performing a multivariate analysis, each FAU has been analyzed, using Cox proportional-hazard regression.

In all statistical methods, a P value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

A total of 221 patients with a HNMM have been included in our analysis. The incidence rate was equal to 1 HNMM: 11 general MM patients, that is composed of 2.010 MM

TABLE I.—Clinical-pathological baselines.

	N.
Sex	
Male	125
Female	96
Age	
≤60	133
≥61	88
FAU	
Front	43
Cheeks/cheekbone	66
Eyelids	8
Nose	17
Lips	0
Ears	21
Scalp	21
Neck	36
Mental region	3
Breslow	
≤1.0 mm	132
≥1.1 mm	89
Ulceration	
Presence	29
Absence	190

FAU: Facial Aesthetic Unit.

patients. Patient characteristics are shown in Table I. They were 125 males (56.5%) and 96 females (43.4%). Median age at time of diagnosis of HNMM was 64 years (ranging between 14 years and 92). 88 patients were ≥61 years while 133 ≤60 years. Breslow thickness ≤1.0 mm was in 132 patients, ≥1.1 mm in 89. General median Breslow thickness was 0.6 mm (ranging between 0-11), the ulceration was present in 29 lesions (13%) and absent in 190, the mitotic rate was >1/mm² in 23 lesions (10.4%). Median DFS was 26 months (ranging between 1 and 315 months), including 10 patients that developed a local recurrence. These patients had removed a lentigo maligna (LM), that had developed a local recurrence due to impaired and/or not well

completed removal of the margins of the lesion after the surgical re-excision of MM scar. Finally, median OS was 31 months (ranging between 1 and 408 months).

Subsequently, we divided patients according to 9 FAU. We found 43 MM of the front (FAU 1), 67 MM of the cheeks/ cheekbone (FAU 2), 9 of the eyelids (FAU 3), 17 of the nose (FAU 4), 0 MM of the lips (FAU 5), 22 MM of the ears (FAU 6), 25 of the scalp (FAU 7), 39 MM of the neck (FAU 8) and 3 of the mental region (FAU 9). Median age was 67 years for unit 1, 67 years for unit 2, 66 years for unit 3, 60 years for unit 4, 45 years for unit 6, 55 years for unit 7, 56 years for unit 8 and 68 for unit 9.

Median Breslow value for each category was: 0.4 mm for the front, 0.6 mm for cheeks, 0.3 mm for eyelids, in situ for the nose, 0.5 mm for the ears, 2.5 mm for the scalp, 0.6 mm for the neck and in situ for the mental region. The remaining clinic-pathological features are reported on Table II.

Median DFS was 30 months in front MM, 22 months in MM of the cheeks, 34.5 months in MM of the eyelids, 18 months for MM of the nose, 33 months for MM of the ears, 24 months for the scalp, 36 months for the neck and 45 for the mental region. Regarding the nose, the lower DFS was mainly because after the primary surgical excision of the tumor, a local recurrence has been observed in 8 cases, that is 48%, and in 2 cases of front MM (9.5%).

Regarding OS, median OS was 42 months in MM of the front, 48 for cheeks MM, 45 months for MM of the eyelids, 44 for MM of the nose, 49 months for MM of the ears, 33 for scalp MM, 46 months for MM of the neck and 47 for MM of the mental region.

Performing Cox-proportional hazard regression, we found that nose (P=0.03) and scalp MM (P=0.04) were the main independent variables that significantly affected DFS in our cohort. However, in the OS only the variable scalp maintained the statistical significance (P=0.04).

A positive sentinel lymph node biopsy (SLNB) was

TABLE II.—Clinico-pathological features of FAUs.

FAU	Gender	Age	Breslow	Ulceration	MR	SLNB	NMSC/OT	DFS	P ^a	OS	P ^b
Front	18F:25M	67	0.4	6	4	0	7	30	NS	42	NS
Cheeks / heekbone	30F:37M	67	0.6	7	10	1	7	22	NS	48	NS
Eyelids	5F:4M	66	0.3	2	0	0	4	34.5	NS	45	NS
Nose	6F:11M	60	<i>In situ</i>	2	1	1	10	18	0.03 *	44	NS
Lips	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Ears	8F:14M	45	0.5	4	2	1	4	33	NS	49	NS
Scalp	6F:19M	55	2.5	7	3	1	2	24	0.04 *	33	0.04 *
Neck	12F:27M	56	0.6	1	3	1	5	36	NS	46	NS
Mental region	1F:2M	68	<i>In situ</i>	0	0	0	0	45	NS	47	NS

MR: mitotic rate; SLNB: positive sentinel lymph node biopsy; NMSC/OT: non-melanoma skin cancers/other tumors; NF: not found; NS: not significative.

^aSignificant values; ^bCox proportional hazard regression between disease free survival (DFS) and single FAU; ^cCox proportional hazard regression between overall survival (OS) and single FAU.

found only in 5 cases (5.7%), out of 87 patients that performed a SLNB. Subsequently, for patients with positive SLNB, a positive complete nodal dissection was present in 2 cases.

During the follow-up, as first site of recurrence, we found that scalp MM showed lung (N.=3), brain (N.=2), liver (N.=1) and lymph-nodes (N.=2). Contrariwise HNMM showed a preference for local recurrence due to impaired removal of surgical margins (N.=10), lymph-nodes (N.=8), satellite cutaneous metastases (N.=3), distant cutaneous metastases (N.=3), lung metastases (N.=4) and liver metastases (N.=1).

The lower incidence of non-melanoma skin cancers has been found in scalp MM. In fact, a diagnosis of non-melanoma skin cancer has been found in 35 HNMM patients (18.5%) *versus* only 2 cases of basal cell carcinoma in scalp MM (Table II). Mean Fitzpatrick's phototypes were comparable in the two populations, as follows: in scalp MM Fitzpatrick's photo type I (N.=3), Fitzpatrick's phototype II (N.=7), Fitzpatrick's phototype III (N.=11). While in HNM Fitzpatrick's phototype I (N.=23), Fitzpatrick's phototype II (N.=79), Fitzpatrick's phototype III (N.=98). These phototypes correlated with the latitude of patients belonging (Middle-South Italy, between 41°54'39"24-38°53'30"48 latitudes North) in which the study has been performed.

Finally, in HNMM (excluding the scalp), we found also 2 cases of Xeroderma Pigmentosum, 1 case of Neurofibromatosis type I and 2 cases of multiple MM.

Performing Kaplan-Meier product between patients with a MM of the scalp and HNMM, we found a worse behavior in scalp MM with a median DFS of 24.5 months *versus* HNMM, that showed a DFS of 33 months (P=0.02). Also in the long-term, regarding OS, HNMM showed a better prognosis, with a median OS of 46 months *versus* 33 months in MM of the scalp (P=0.05) (Figure 1).

Discussion

HNMM is a clinical challenge. Indeed, cutaneous HNMM shows a worse prognosis in comparison to melanomas of other body sites, although not all Authors confirm this behavior.¹ The inclusion of MM of the scalp in HNMM could explain these discordant findings. Indeed, in our cohort, excluding MM of the scalp from the analysis, median DFS of HNM increased from 26 months to 33 months and general OS increased from 31 months to 46 months.

It is easier to attend guidelines for wide local excision in low-risk regions, such as the trunk and proximal limbs,

but it is more difficult for the face,¹⁶ where margins for wide local excisions are often reduced because of the presence of important anatomical structures. Indeed, clinical and microscopic margins are often poorly defined in sun-damaged skin. A combination of these factors may contribute to higher local recurrence of facial MM (5-15%) in comparison to MM of the trunk and extremities (1-4%).¹⁷

In our sample, we found that 48% of nose MM showed a local recurrence. The nose is one of the aesthetic units of the face and is subdivided in nine aesthetic units, more specifically dorsum, nasal tip, columella, paired sidewalls, paired alae, paired soft tissue facets. If most of surface area of a subunit is excised, reconstructing the whole unit is usually preferable, while if more than 50% of a subunit is removed, the rest of the subunit should be excised and the whole subunit replaced.¹⁶ An inadequate resection determine consequences on both recurrence rate and aesthetic outcome. HN is characterized by a complex lymphatic drainage, which could lead to a low accuracy of SLN.^{18,19} Indeed, in our cohort, among 87 patients that performed a SNLB biopsy, a positivity was found only in 5 cases (5.7%).

Regarding the scalp, we found that MM of the scalp showed a high percentage of skip metastases, involving directly internal organs, rather than regional nodal chains. According to the literature, this is related to the high number of blood vessel on the scalp, which is more elevated than the lymphatic ones, promoting vascular invasion, as well as early metastases.^{18,19} In our cohort, we found that MM of the scalp showed a deeper Breslow thickness. In addition, our median Breslow thickness (2.5 mm) was comparable with the one observed in another larger study, consisting in 258 patients with scalp MM (2.3 mm).²⁰ Furthermore, a similar ulceration rate was observed (Table II). According to the literature, MM of the scalp is associated with older age.^{15,18} However, we did not confirm this finding, because we found that median age of scalp MM was lower than the median age of other HNMM (Table II). In addition, we found that in patients with scalp MM there was a lower incidence of non-melanoma skin cancers, if compared with other HNMM. These observations highlighted that the chronic photo-aging did not seem to play a pivotal role in scalp MM. Furthermore, our general data about scalp MM correlate also with the lower incidence of androgenic alopecia, that we found only in 4 cases (19%), with a Hamilton's scale ranging between IV and VII. Besides, according to a recent report, scalp MM is highly related to local milieu.²¹ Indeed recently, Schulman *et al.* found that the HN region was characterized by a higher

predisposition to metastases, related to higher presence of T regulatory (T-reg) cells and lower proportion of CD8+ cells.²¹ Furthermore, because T-reg preferentially localize to hair follicles, areas of increased hair follicle density are more permissive to tumor growth because of increased T-reg density.²¹

Conclusions

In nose FAU, we found a high rate of local recurrence, most likely due to inadequate surgical excision of the cutaneous lesions. This feature affected significantly DFS. The behavior of scalp MM is different than the other aesthetic units, showing a worse prognosis. Our data highlight that scalp MM show a Breslow higher than other anatomical sites of head/neck, confirming the data of the literature. We found that scalp MM has a greater tendency to metastasize directly to internal organs, not involving local lymph-nodes. Interestingly, HNMM (excluding scalp MM) showed a higher number of non-melanoma skin cancers, highlighting a probable direct correlation with UV, contrariwise to scalp MM where local milieu may play a pivotal role in its biology.

References

- de Giorgi V, Rossari S, Gori A, Grazzini M, Savarese I, Crocetti E, *et al.* The prognostic impact of the anatomical sites in the 'head and neck melanoma': scalp versus face and neck. *Melanoma Res* 2012;22:402-5.
- Fadaki N, Li R, Parrett B, Sanders G, Thummala S, Martineau L, *et al.* Is head and neck melanoma different from trunk and extremity melanomas with respect to sentinel lymph node status and clinical outcome? *Ann Surg Oncol* 2013;20:3089-97.
- Garbe C, Büttner P, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, *et al.* Primary cutaneous melanoma. Prognostic classification of anatomic location. *Cancer* 1995;75:2492-8.
- Kienstra MA, Padhya TA. Head and neck melanoma. *Cancer Contr* 2005;12:242-7.
- Lachiewicz AM, Berwick M, Wiggins CL, Thomas NE. Survival differences between patients with scalp or neck melanoma and those with melanoma of other sites in the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program. *Arch Dermatol* 2008;144:515-21.
- Tejera-Vaquero A, Nagore E, Puig S, Robert C, Saiag P, Martín-Cuevas P, *et al.* Effect of time to sentinel-node biopsy on the prognosis of cutaneous melanoma. *Eur J Cancer* 2015;51:1780-93.
- Terakedis BE, Anker CJ, Leachman SA, Andtbacka RH, Bowen GM, Sause WT, *et al.* Patterns of failure and predictors of outcome in cutaneous malignant melanoma of the scalp. *J Am Acad Dermatol* 2014;70:435-42.
- Paolino G, Bekkenk MW, Didona D, Eibenschutz L, Richetta AG, Cantisani C, *et al.* Is the prognosis and course of acral melanoma related to site-specific clinicopathological features? *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016;20:842-8.
- Moncrieff MD, Thompson JF, Quinn MJ, Stretch JR. Reconstruction after wide excision of primary cutaneous melanomas: part I-the head and neck. *Lancet Oncol* 2009;10:700-8.
- Reynolds HM, Dunbar PR, Uren RF, Blackett SA, Thompson JF, Smith NP. Three-dimensional visualisation of lymphatic drainage patterns in patients with cutaneous melanoma. *Lancet Oncol* 2007;8:806-12.
- Dadras SS, Paul T, Bertocini J, Brown LF, Muzikansky A, Jackson DG, *et al.* Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol* 2003;162:1951-60.
- Shields JD, Borsetti M, Rigby H, Harper SJ, Mortimer PS, Levick JR, *et al.* Lymphatic density and metastatic spread in human malignant melanoma. *Br J Cancer* 2004;90:693-700.
- Janssen KJ, Donders AR, Harrell FE Jr, Vergouwe Y, Chen Q, Grobbee DE, *et al.* Missing covariate data in medical research: to impute is better than to ignore. *J Clin Epidemiol* 2010;63:721-7.
- González-Ulloa M. Regional aesthetic units of the face. *Plast Reconstr Surg* 1987;79:489-90.
- Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, *et al.* Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009;27:6199-206.
- Hoersch B, Leiter U, Garbe C. Is head and neck melanoma a distinct entity? A clinical registry-based comparative study in 5702 patients with melanoma. *Br J Dermatol* 2006;155:771-7.
- Burget GC, Menick FJ. The subunit principle in nasal reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 1985;76:239-47.
- Xie C, Pan Y, McLean C, Mar V, Wolfe R, Kelly JW. Scalp melanoma: distinctive high risk clinical and histological features. *Australas J Dermatol* 2017;58:181-8.
- Pasquali S, Montesco MC, Ginanneschi C, Baroni G, Miracco C, Urso C, *et al.* Lymphatic and blood vasculature in primary cutaneous melanomas of the scalp and neck. *Head Neck* 2015;37:1596-602.
- Huismans AM, Haydu LE, Shannon KF, Quinn MJ, Saw RP, Spillane AJ, *et al.* Primary melanoma location on the scalp is an important risk factor for brain metastasis: a study of 1,687 patients with cutaneous head and neck melanomas. *Ann Surg Oncol* 2014;21:3985-91.
- Schulman JM, Pauli ML, Neuhaus IM, Sanchez Rodriguez R, Taravati K, Shin US, *et al.* The distribution of cutaneous metastases correlates with local immunologic milieu. *J Am Acad Dermatol* 2016;74:470-6.

Conflicts of interest.—The authors certify that there is no conflict of interest with any financial organization regarding the material discussed in the manuscript.

Acknowledgments.—Thanks to Valerio Barletta and Monica Di Iorio for their help in the subdivision of Facial Aesthetic Units in the subgroups.

Article first published online: July 26, 2017. - Manuscript accepted: July 24, 2017. - Manuscript received: May 11, 2017.

GUIDELINES

Italian Guidelines in diagnosis and treatment of alopecia areata

Alfredo ROSSI ¹ *, Marta MUSCIANESE ¹, Bianca M. PIRACCINI ², Michela STARACE ², Marta CARLESIMO ¹, Victor D. MANDEL ³, Aurora ALESSANDRINI ², Stefano CALVIERI ¹, Gemma CARO ¹, Andrea D'ARINO ¹, Alessandro FEDERICO ¹, Francesca MAGRI ¹, Flavia PIGLIACELLI ¹, Graziana AMENDOLAGINE ⁴, Maria C. ANNUNZIATA ⁵, Maria C. ARISI ⁶, Stefano ASTORINO ⁷, Graziella BABINO ⁸, Federico BARDAZZI ², Stefania BARRUSCOTTI ⁹, Anna BELLONI FORTINA ¹⁰, Alessandro BORGHI ⁴, Francesca BRUNI ², Stefano CACCAVALE ⁸, Piergiacomo CALZAVARA-PINTON ⁶, Norma CAMELI ¹¹, Michele CARDONE ¹, Andrea CARUGNO ⁹, Rosa COPPOLA ¹², Annunziata DATTOLA ¹³, Maria B. DE FELICI DEL GIUDICE ¹⁴, Antonella DI CESARE ¹⁵, Emi DIKA ², Donato DI NUNNO ⁷, Roberto D'OVIDIO ¹⁶, Gabriella FABBROCINI ⁵, Claudio FELICIANI ¹⁴, Elisabetta FULGIONE ⁸, Marco GALLUZZO ¹³, Simone GARCOVICH ¹⁷, Valentina GARELLI ¹, Cristina GUERRIERO ¹⁷, Katharina HANSEL ¹⁸, Michelangelo LA PLACA ², Francesco LACARRUBBA ¹⁹, Viviana LORA ¹⁷, Elena MARINELLO ¹⁰, Matteo MEGNA ⁵, Giuseppe MICALI ¹⁹, Cosimo MISCIALI ², Paola MONARI ⁶, Giuseppe MONFRECOLA ⁵, Iria NERI ², Annamaria OFFIDANI ²⁰, Gloria ORLANDO ¹⁰, Manuela PAPINI ¹⁸, Annalisa PATRIZI ², Stefano PIASERICO ¹⁰, Niccolò RIVETTI ⁹, Oriana SIMONETTI ²⁰, Teodora R. STAN ¹⁰, Luca STINGENI ¹⁸, Marina TALAMONTI ¹³, Francesco TASSONE ¹⁷, Lucia VILLA ¹⁶, Colombina VINCENZI ², Maria C. FORTUNA ¹

¹Division of Dermatology, Department of Internal Medicine and Medical Specialties, Sapienza University, Rome, Italy; ²Division of Dermatology, Department of Experimental, Diagnostic and Specialty Medicine, University of Bologna, Bologna, Italy; ³Unit of Dermatology, Surgical, Medical and Dental Department of Morphological Sciences Related to Transplant, Oncology and Regenerative Medicine, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy; ⁴Section of Dermatology and Infectious Diseases, Department of Medical Sciences, University of Ferrara, Ferrara, Italy; ⁵Section of Dermatology, Department of Clinical Medicine and Surgery, Federico II University, Naples, Italy; ⁶Department of Dermatology, ASST Spedali Civili of Brescia, University of Brescia, Brescia, Italy; ⁷Unit of Dermatology and Venereology, Celio Military Hospital, Rome, Italy; ⁸Unit of Dermatology, Nuovo Policlinico, Luigi Vanvitelli University of Campania, Naples, Italy; ⁹Unit of Dermatology, S. Matteo University Polyclinic, IRCCS and Foundation, Pavia, Italy; ¹⁰Unit of Dermatology, Department of Medicine - DIMED, University of Padua, Padua, Italy; ¹¹San Gallicano Dermatological Institute (IRCCS), Rome, Italy; ¹²Campus Bio-Medico University (Hospital), Rome, Italy; ¹³Department of Dermatology, Tor Vergata Polyclinic and University, Rome, Italy; ¹⁴Section of Dermatology, Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Parma, Parma, Italy; ¹⁵Section of Dermatology, Department of Surgery and Translational Medicine, University of Florence, Florence, Italy; ¹⁶Private practitioner, Bari, Italy; ¹⁷Institute of Dermatology, A. Gemelli University Polyclinic, IRCCS and Foundation, Sacred Heart Catholic University, Rome, Italy; ¹⁸Section of Dermatology, Department of Medicine, University of Perugia, Perugia, Italy; ¹⁹Department of Dermatology, University of Catania, Catania, Italy; ²⁰Unit of Dermatology, Department of Clinical and Molecular Sciences, Polytechnic Marche University, Ancona, Italy

*Corresponding author: Alfredo Rossi, Division of Dermatology, Department of Internal Medicine and Medical Specialties, Sapienza University, Viale del Policlinico 155, 00100 Rome, Italy. E-mail: alfredo.rossi@uniroma1.it

ABSTRACT

Alopecia areata (AA) is an organ-specific autoimmune disorder that targets anagen phase hair follicles. The course is unpredictable and current available treatments have variable efficacy. Nowadays, there is relatively little evidence on treatment of AA from well-designed clinical trials. Moreover, none of the treatments or devices commonly used to treat AA are specifically approved by the Food and Drug Administration. The Italian Study Group for Cutaneous Annexial Disease of the Italian Society of dermatology proposes these Italian guidelines for diagnosis and

treatment of Alopecia Areata deemed useful for the daily management of the disease. This article summarizes evidence-based treatment associated with expert-based recommendations.

(Cite this article as: Rossi A, Muscianese M, Piraccini BM, Starace M, Carlesimo M, Mandel VD, *et al.* Italian Guidelines in diagnosis and treatment of alopecia areata. *G Ital Dermatol Venereol* 2019;154:609-23. DOI: 10.23736/S0392-0488.19.06458-7)

KEY WORDS: Alopecia areata; Guideline; Autoimmunity.

Introduction

Alopecia areata (AA) is an organ-specific autoimmune disorder that targets anagen phase hair follicles. It has an unpredictable chronic-relapsing course, leading to transient non-scarring hair loss. Clinically, presentations vary considerably between individuals, ranging from small patches of alopecia to the loss of all body hair: alopecia universalis.¹

Prevalence of AA has been estimated to about 0,2% of the general population and approximately 1.7-2.1% of the population experiences an episode of AA during their lifetime.² AA can start at any age, however in the majority of patients, the onset is within the first three decades of life. There is none race or sex predilection. AA is often associated with other autoimmune diseases that must be investigated.

In most patients, disease severity is closely correlated with psychologic distress, and management of AA should include psychological support. The course of AA is not predictable, as spontaneous remission is possible, as well as a chronic course not responding to therapy. Up to 50 percent of patients with patchy AA experience spontaneous hair regrowth within one year, however, most will relapse months or years after remission.³

Due to the variable course of AA and the different degree of severity of hair loss, only a few well-designed reliable clinical trials are available in AA, which are limited by the low numbers of patients studied.⁴ The primary objective of the Italian guidelines is to make recommendations on the best treatment of AA to the Italian dermatological community, in collaboration with the expert in the field.

Methodology of guideline preparation

These guidelines are designed under the guidance of Italian Study Group on Cutaneous Annexial Disease of the Italian Society of Dermatology (SIDeMaST), taking in mind Italian regulations and treatments available.

This article summarizes evidence-based treatment associated with expert-based recommendations.

Diagnosis

The initial clinical examination should seek basic evidence for the diagnosis of AA, as well as screening for associated autoimmune diseases.

Major objectives

- to confirm the clinical diagnosis of AA, differentiating from other causes of hair loss;
- to specify the extent and location of hair loss involvement;
- to assess the activity of the disease by trichoscopy;
- to evaluate the prognosis depending on prognostic factors;
- to evaluate other associated conditions (Hashimoto thyroiditis, coeliac disease, etc.);
- to start treatment.

Clinical examination and differentials

Medical history

- it should specify the age of the first onset of hair loss and duration of the current episode;
- it should specify any associated symptoms (pain, pruritus);
- it should include a detailed medical history and drug intake (including response to therapy for AA);
- it should include a complete family medical history investigating autoimmune disorders;
- it should seek to evaluate the disease impact on patient's quality of life (DLQI).

Physical examination

AA typically presents with single or multiple round or oval patches of hair loss configuring (1) patchy alopecia. Other presentations include (2) alopecia totalis characterized by complete loss of scalp hair and (3) alopecia universalis characterized by loss of all body and scalp terminal hair; rarely various pattern of hair loss can be detected such as (4) ophiasis pattern: band-like pattern of hair loss along the periphery of occipital and temporal scalp, (5) ophiasis inversus-sisaipho pattern: band-like hair loss in the fronto-

parietal area sparing the temporal and occipital areas; (6) a diffuse pattern of hair loss and severe hair thinning that simulates androgenetic alopecia and telogen effluvium is typical of AA incognita; Finally a rare variant is (7) perinevoid AA. In some patients, AA may be localized to single hairy areas, such as the beard, eyebrows and eyelashes.

Usually, patients do not refer any symptoms, but occasionally some cutaneous dysesthesia may precede or be associated with hair loss. The skin of the affected patches is usually normal and smooth, rarely a pinkish coloration can be detected. White hairs initially may be spared, leading to the appearance of sudden graying of the hair in extensive AA (*canities subita*, Maria Antonietta Phenomenon, sudden hair whitening); regrowth may begin with the appearance of fine white vellus hairs.

In addition, nails may be affected in AA, with geometric pitting being the most common sign, but also trachyonychia, mottled lunulae, and rarely onychomadesis may occur.¹

Trichoscopy

Hair and scalp dermoscopy (trichoscopy) represents a fast and non-invasive technique for the evaluation of hair loss that allows magnified visualization of the hair and of the scalp skin.⁵ Nowadays, trichoscopy is the most important tool for diagnosis of AA; moreover it is essential in the assessment of disease activity and severity as well as therapeutic monitoring of AA.

In general, for AA diagnosis, short vellus hairs and yellow dots are the most sensitive markers, and black dots, broken hairs and tapering hairs are the most characteristic but not pathognomonic markers.⁶

TRICHOSCOPICAL SIGNS OF ACTIVE AA⁷

- Broken hairs: they result from irregular transverse fracture of the terminal hair of few millimeters from the scalp. The short length relates to the time between the latest event of disease activity and the examination moment;
- black dots: black dots or cadaverized hairs represent fragments of hair within the follicular ostium due to acute hair matrix damage: they indicate active hair loss;
- flame hair: they are a residue of hair caused by a rapid and severe trauma of anagen hairs detectable in 21% of patients affected by AA;⁸
- exclamations mark hairs: mainly presents at the periphery of areas of hair loss, they are short, broken, dystrophic hairs whose distal ends are broader than the proximal ends. In our experience, they indicate a not recent mild damage to the follicle;
- tapered hairs: represent elongated exclamation mark

hairs, corresponding to rapid catagen induction in AA. This category includes both “coudability hairs” and normal hairs with proximal tapered shape; they are usually detected in the perilesional area;

- Pohl-Pinkus constrictions: hairs characterized by zones of reduced hair thickness within the hair shaft. In AA the incidence rate of this feature ranges from 2 to 10% of patients;
- hair powder: fine pulverization of hair.

TRICHOSCOPICAL SIGNS OF LONG-LASTING INACTIVE AA⁷

- Yellow dots: correspond to follicular ostium filled with keratin and/or sebum. They are seen as rounded or polycyclic dots of different sizes, with color ranging from whitish to brownish-yellow, usually lacking hair or less common short, thin hair shaft. When numerous, they are distributed in a regular matter; due to the underdevelopment of sebaceous glands before puberty, yellow dots are not seen in children assuming a greyish color;
- exclamation mark hairs: can be present also in stable disease;
- short vellus hairs: short (less than 10 mm) and hypopigmented hairs.

TRICHOSCOPICAL SIGNS THAT INDICATE HAIR REGROWTH⁷

- Upright regrowing hairs: they are healthy regrowing hairs that have a straight-up position and they can be confused with short vellus hairs;
- pigtail hairs (circle hairs): short re-growing coiled hairs with tapered ends.

Reflectance confocal microscopy (RCM)⁹⁻¹²

RCM is a non-invasive imaging technique for in vivo evaluation of the skin and the observation of cell morphology with a nearly histological resolution. Hair shaft thickness, medulla, cortex and cuticle can be evaluated with RCM and the hair shaft structure abnormalities could be visualized, as in trichoscopy, but with greater detail.

RCM features that can be observed in AA are:

- yellow dots: round luminal structures surrounded by follicular epithelium and filled by highly bright material corresponding to keratotic material and/or sebum;
- broken hairs: absence of follicular openings and presence of dysmorphic hairs that appear less bright than healthy hairs;
- exclamations mark hairs: short hyporeflexive dysmorphic hairs whose distal ends are broader than the proximal ends;

- black dots: round luminal structures with inside the remnant of dysmorphic hairs that look less reflective than healthy hairs;
- short vellus hairs: short hairs with a reduction of the caliber of the hair shaft in comparison to normal hairs;
- pigtail hairs (circle hairs): short coiled hairs with a reduction of the caliber of the hair shaft (< of 20 µm in diameter) and tapered ends;
- upright regrowing hairs: straight-up hairs with a reduction of the caliber of the hair shaft (< of 20 µm in diameter);
- Pohl-Pinkus constrictions: hairs of normal thickness with irregularly placed thinner areas of the hair shaft (< of 20 µm in diameter);
- inflammatory cells infiltration of epidermis, adnexal structure and upper dermis: small, single to aggregate and bright round cellular structure visible in the epidermis between keratinocytes, and/or within the adnexal epithelium, and/or in the upper dermis;
- rimmed dermal papillae: bright rimming of the dermal papillae that correspond on histology to the integrity and pigmentation of the dermoepidermal junction;
- melanophages: pumped, polygonal to stellate bright cellular structure in the upper dermis;
- dermal fibers degeneration: Coarse and thick dermal bundles of the upper dermis. This feature can be seen as diffused in the upper dermis or located around adnexal structures.

Dilated vessels: horizontally oriented “canalicular” structures in the upper dermis.

In conclusion RCM is fundamental in the estimation of dermal fibrosis and inflammation measures, which are not assessable with tricoscopy, but are important parameters in the follow-up evaluation.

Scale of severity and prognosis

AA is a non-scarring alopecia and the regrowth capacity of hairs is preserved.

The severity of AA is assessed by the Severity of Alopecia Tool (SALT) and graded according to the guidelines of the National Alopecia Areata Foundation¹³ as follows:

- S0: no hair loss;
- S1: less than 25% hair loss;
- S2: 26-50% hair loss;
- S3: 51-75% hair loss;
- S4: 76-99% hair loss;
- S5: 100% hair loss.

According to prognosis AA has been historically categorized into four types by Ikeda¹⁴ and after on this basis,



Figure 1.—Clinical types of alopecia areata. A) patchy alopecia; B) ophiasis pattern; C) alopecia totalis; D) alopecia universalis.

Rook identified three types: type I associated with atopy, starts in early life, and has a poor prognosis, type II that starts after the age of 20, no associations are described and usually has a favorable prognosis and type III, starts in adulthood has an intermediate prognosis and it is associated with autoimmune endocrine diseases (Figure 1).¹⁵

Disease severity at onset of the disease is the strongest predictor of long-term outcome, especially alopecia totalis or alopecia universalis. Other factors that are associated with a worse prognosis are onset in childhood, duration of more than one year, band-like involvement of the peripheral temporal and occipital scalp (ophiasis pattern), association with nail signs, association with atopy and family history of AA.

Trichoscopic markers of activity can also be useful in predicting the course of disease and the assessment of response to therapy. A large-scale study on the scalp of 300 Asian patients showed that black dots, yellow dots, and short vellus hairs correlated with the severity of disease, and black dots, tapering hairs, broken hairs, and short vellus hairs correlated with disease activity.⁶ In the author’s experience, also flame hairs and hair powder relates to disease activity.

Differential diagnosis

Several diseases need to be considered in the differential diagnosis of AA.

Patchy hair loss should be differentiated from:

- trichotillomania: this condition can be difficult to dis-

tinguish from AA and a coexistent of the 2 condition is possible, especially in children. The main differences are 2: the incomplete nature of the hair loss, that produce a bizarre shape of the alopecic areas and the fact that broken hairs are usually firmly anchored in the scalp, unlike exclamation mark hairs, rending the pull test negative;

- tinea capitis: inflammation, scaling, pustules on the patchy hair loss suggest tinea capitis but the signs may be vanished.

Diffuse forms of AA need differential diagnosis with:

- telogen effluvium and anagen effluvium (drug and chemotherapy-induced);
- loose anagen hair.

Associated diseases

AA may be associated to several autoimmune and auto-inflammatory disorders, such as thyroiditis and vitiligo, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, psoriasis, allergic rhinitis, type I diabetes, coeliac disease, myasthenia gravis, ulcerative colitis and scleroderma.¹ Furthermore, a high prevalence of other comorbid conditions has been found among patients affected by AA¹⁶ (Table I).

Similarly to other autoimmune diseases, AA is characterized by a strong genetic predisposition and several genes contribute to this risk. In AA three genome-wide association studies showed that twelve independent genetic loci, including loci encoding genes in both innate and adaptive immunity, are involved. In particular, among the HLA class II genes the DR4, DR5, DQ3, DQ7 and DPW4 alleles are strongly associated.^{17, 18}

Interestingly an increased risk for autoimmune type

I diabetes mellitus has also been reported in relatives of patients with AA.¹⁹ Iron deficiency was more common in women with AA than the general population in one small case serie.²⁰ The implication of genes located on chromosome 21 is suggested by the association between an increased risk for AA and genetic disorders such as Down's syndrome (trisomy 21) and polyglandular autoimmune syndrome type I, caused by a mutation in the autoimmune regulator (AIRE) gene on chromosome 21.²¹⁻²³ These relationships between a broad spectrum of autoimmune diseases imply a need for surveillance of patients for potential secondary autoimmune disease processes.

After diagnosis is made, a detailed personal and family history for atopy, thyroid disease, coeliac and other autoimmune disorders should be obtained.

In the author's opinion, all patients should be investigated at least for autoimmune thyroiditis and coeliac disease throw blood research of specific autoantibodies (anti-thyroid peroxidase antibodies and thyroglobulin antibodies and IgA and IgG antiendomysial antibodies and antitransglutaminase antibodies).

Investigations

In most cases of AA, diagnosis can be made through obtaining a sound history and an accurate clinical inspection, especially since trichoscopy is available. A trichogram usually is not necessary. A positive pull test with dystrophic anagen or telogen hairs at the margins of the patches suggests activity of the disease along with trichoscopic signs of activity. Sometimes other investigations can be useful to rule out other differentials when clinical and trichoscopic features are not indicative.

When the diagnosis is uncertain appropriate tests may include microscopic examination of hair shafts and fungal culture, serology for lupus erythematosus or syphilis and scalp biopsy.

Histopathologic findings in AA change depending on the disease phase in which the biopsy is performed. In the early acute stage, the main feature is a peribulbar and intrabulbar lymphocytic infiltrate surrounding the anagen and/or catagen follicles described as "a swarm of bees." The inflammatory infiltrate consists primarily of T cells (CD4+, CD8+) but Langerhans cells, eosinophils, mast cells, and plasma cells can also be detected. This lymphocytic attack causes apoptosis, necrosis, and microvesiculation of the follicular epithelium and anagen hairs cycle through catagen then into telogen.

In long-standing AA, inflammation is not constantly present. Horizontal sections are in these cases preferred

TABLE I.—Summary of comorbid conditions in alopecia areata.

Thyroid disease
Systemic lupus erythematosus
Type I diabetes
Diabetes mellitus
Rheumatoid arthritis
Vitiligo
Psoriasis
Myasthenia gravis
Coeliac disease
Ulcerative colitis
Atopy (allergic rhinitis, asthma, eczema)
Contact dermatitis
Mental health problems (depression or anxiety)
Hyperlipidemia
Hypertension
Anemia
Gastroesophageal reflux disease

to vertical section as they provide more details, showing a significant decrease in the number of terminal hairs and in the anagen/telogen ratio. A chronic peribulbar lymphocytic infiltrate around the miniaturized hairs may also be observable.²⁴

Therapeutic management

Counseling

An exhaustive explanation of the nature and course of the disease and the available treatments, discussing realistic expectations for treatment, is essential.

The quality of life should also be evaluated in patients with AA through DLQI questionnaire: hair loss can have significant effects on patients' quality of life and psychologic support is an important component of therapy. Although AA has few physically harmful effects, it may lead to psychological consequences, including high levels of anxiety and depression. Studies of adolescents suffering from AA have found increased rates of psychiatric symptoms.^{25, 26} Moreover, the failure treatment effects, not uncommon, may leave patients very distressed, particularly in children, adolescents, and young women. AA can also cause physical disability, such as when there is eyelash involvement, loss of nasal hairs, or marked nail dystrophy (twenty-nail dystrophy).

The problem with treatment AA is that its course is unpredictable. Treatment of AA is not mandatory, consequently the decision to treat is a shared decision with the patient; in view of the variable efficacy of currently available treatments and their respective side effects, the clinician has an important role in making conscious patients of the positive and negative aspects of active treatment.

Patients must be informed about risks and benefits of treatment and that spontaneous remission occurs in up to variable percentage of patients with limited disease and the disease often recurs once the treatment is discontinued. It must be clear that none of the available treatments can modify the long-term course of the disease and a treatment with a specific indication for AA is still missing.

Objectives

- Investigate and diagnose associated autoimmune diseases;
- choose the specific treatment based mainly on age activity and severity and of the disease;
- arrest the progression of the disease;
- induce of hair regrowth;
- limit side effects related to the therapy;
- improve the quality of life of patients.

Available therapies

Intralesional corticosteroids

Patients with isolated patches of hair loss or less than 25% of scalp hair loss are the best candidates of injections, due to the difficulty in tolerating a high number of injections in case of large areas. The affected area may be pretreated with a topical anesthetic cream under occlusion, or a frozen gauze can be applied for a few seconds on the scalp before the injection to decrease pain.

There are no randomized trials on the efficacy of intralesional corticosteroids in AA. However, two non-randomized comparative studies found both intralesional triamcinolone acetonide and its less soluble derivative triamcinolone hexacetonide effective in inducing re-growth of hair tufts with the effect of a single injection sometimes persisting for 9 months.^{27, 28}

Intralesional treatment with triamcinolone acetonide by a needleless device has also been studied and showed good results.²⁹

We recommend not to exceed the following concentrations of triamcinolone acetonide injected in the upper subcutis: 2.5 to 5 mg/mL on the face for eyebrow involvement and 5 to 10 mg/mL on the scalp. Multiple sites 1 cm apart are injected with small volumes of product. The total amount of triamcinolone administered should not exceed 40 mg per treatment session. Multiple treatment sessions can be planned after 30-45 days from each other. Intralesional steroid therapy should be discontinued if there is no response after six months.³⁰ The well-known rare adverse effects of intralesional corticosteroids include reversible skin atrophy, telangiectasias and hypopigmentation, particularly in patients with type III-VI of Fitzpatrick skin type classification and disturbance of the menstrual cycle. In some specific sites such as eyebrows, it has been documented that intralesional corticosteroids may cause cataract and elevation of intraocular pressure.³¹ Finally, two cases of anaphylaxis due to intralesional triamcinolone acetonide in literature are reported.^{32, 33} A signed informed consent should be asked before performing the procedure, which needs some experience.

Potent topical corticosteroids

They are considered first-line therapy in children and in adults with who refuse intralesional injections.³⁴⁻³⁶ While high potency topical corticosteroids are commonly used to treat AA, evidence for their effectiveness is limited, and data on efficacy are available only from two 12-week

randomized trials. In the first one, 70 patients with patchy hair loss were randomly assigned to apply either placebo or 0.25% desoximetasone cream twice daily.³⁷ After 12 weeks of therapy 58% of patients treated with desoximetasone experienced complete regrowth of hair compared with 39% of patients treated with placebo. These results failed to reach statistical significance. In the second study, 105 patients with localized AA were randomized to treatment with betamethasone valerate 0.1% foam applied twice daily, intralesional triamcinolone acetonide 10 mg/mL administered every three weeks, or topical tacrolimus 0.1% ointment applied twice daily. Results showed more than 75% hair regrowth in 54% of patients treated with betamethasone valerate, 60% of patients treated with triamcinolone acetonide, and 0% of patients treated with topical tacrolimus.³⁸ In a trial, 34 moderate to severe AA patients were randomly assigned to clobetasol propionate 0.05% application on one side of the scalp and a vehicle to the other side. After 12 weeks of treatment, more sites treated with clobetasol had at least 50% regrowth of hair.³⁹ Clobetasol propionate cream placed under an occlusive dressing was effective in 28,5% of the 28 patients of a study.⁴⁰

After hair regrowth, potent topical corticosteroids must be tapered. There is no univocal protocol for this operation, which therefore must be based on the patient's characteristics and on the physician's experience, individualizing the approach.

Similar to intralesional corticosteroids, side effects of topical therapy include folliculitis, local skin atrophy, telangiectasias, dyspigmentation, and rarely adrenal suppression. Patients should be instructed to wash the head after 12 hours from the application, in order to avoid steroid-induced scalp folliculitis.

Systemic glucocorticoids

Olsen *et al.* investigate in a prospective study of 32 patients with AA, including 16 patients with alopecia totalis or universalis, the efficacy of oral prednisone tapered from 40 mg to 0 mg over the course of six weeks. 30-47% of patients treated showed more than 25% hair regrowth.⁴¹

The only one controlled trial of 43 patients that were treated with pulse 200 mg oral prednisolone or placebo once weekly for 3 months. After six months of prednisolone treatment, patients showed better results than those treated with placebo, but this was not statistically significant.⁴²

Regimens that involve high-dose pulsed oral glucocorticoids or even intravenous regimens may also induce hair regrowth.⁴²⁻⁴⁸ Overall extensive patchy alopecia response

better than alopecia totalis, universalis and ophiasis variety to these treatments.

Although significant side-effects have not yet been reported with pulsed systemic corticosteroids, the well-known side effects associated with these agents and recurrence of the disease after their suspension limit duration of therapy.^{49, 50}

Topical immunotherapy

Topical immunotherapy is the preferred first-line treatment for patients with extensive chronic AA, assessed by trichoscopic signs. The precise mechanism of action of topical immunotherapy is not completely understood, but an immunomodulatory effect on the peribulbar infiltrate plays the key role. A potent contact allergen such as diphenylcyclopropenone (DPCP) or squaric acid dibutyl ester (SADBE) is weekly applied on the scalp to stimulate an allergic mild contact dermatitis that in the end results in hair regrowth.^{51, 52}

A recent systematic review and meta-analysis of forty-five studies evaluating contact immunotherapy with 1-chloro, 2, 4, dinitrobenzene (DNCB), diphenylcyclopropenone (DPCP) or squaric acid dibutyl ester (SADBE) for patchy AA, alopecia totalis, and alopecia universalis analyzed the results on 2227 patients. The overall rate of complete hair regrowth was 32.3% while the overall rate of any hair regrowth was 65.5%. Similarly, to other therapies, patchy AA had better response rates than alopecia totalis or universalis. Recurrences after treatment discontinuation were common (recurrence rates were 38.3% among patients receiving maintenance treatment and 49.0% among those not receiving maintenance treatment).⁵³

Topical immunotherapy can be performed with DPCP or SADBE, while DNCB was found mutagenic. DPCP is usually preferred over SADBE because it is less expensive and more stable in solution. It must be stored away from light to avoid its degradation.

Protocol for DPCP use was described by Happle in 1983;⁵⁴ first of all, patients have to be sensitized by the application of a 2% DPCP solution to a small area, usually 4x4 cm on the scalp, for 48 hours. After two weeks, treatment can be started with application of DPCP to the affected areas, in a concentration that elicits a mild dermatitis, washed off after 24 hours. During the contact between skin and allergen, sun exposure is interdicted. The protocol for sensitization and treatment with SADBE is similar.

In the majority of studies if there was no response after six months therapy has to be discontinued; however, as hair regrowth with topical immunotherapy can occur even

lately, a 12-18 months of therapy length are suggested before assessing efficacy. In a large case series, hair regrowth occurred in about 30% of patients after 6 months of treatment but this increased to 78% after 32 months of treatment, suggesting that extension of treatment is useful.⁵⁵

The main adverse effect of this treatment is the induction of a severe contact dermatitis characterized by vesicular or bullous lesions. In this case, the contact allergen should be washed from the skin and treatment with a topical corticosteroid should be initiated. Other possible side effects include occipital and or cervical lymphadenopathy (common), urticaria, dyschromia and vitiligo, especially in darker skin.⁵⁶⁻⁵⁹ The discontinuation of topical immunotherapy is recommended in pregnancy because until up today, no studies have defined its safety profile in this population.

Topical anthralin

Anthralin or Dithranol is a topical drug historically used for psoriasis therapy. Anthralin action is carried out by reducing inflammation. Evidence of its efficacy for AA is restricted to a small number of case series with inadequate controls.^{60, 61} Studies have suggested that anthralin may be effective high concentrations (0.5 or 1% cream) applied for short periods (20 to 30 minutes daily) on the alopecic scalp, in the so-called short-contact therapy. The time of contact is increased by 10 minutes every two weeks up to one hour or to the time required to produce a mild dermatitis. Otherwise, treatment can also be started with application of anthralin 0.1% to the scalp for 10 to 20 minutes and then gradually increasing this time of contact, reaching tolerance for leaving anthralin on overnight. Evidence shows that anthralin have to elicit a mild irritant reaction to be effective. Anthralin should be used for at least three months. In 2015 a retrospective study demonstrated that combination therapy with DPCP and anthralin is more effective than DPCP monotherapy.⁶²

Overall, a less percentage of patients with extensive AA achieved a good clinical response rate compared with intralesional corticosteroids and topical immunotherapy, and anthralin therapy is suggested in children who are too young to be treated with topical steroids.

Anthralin will stain hair, skin, and clothing brows, limiting its use in fair-haired patients.

Minoxidil

Data on effectiveness of topical minoxidil in AA resulting from randomized trials are contradictory, except for the evidence that minoxidil is not effective in alopecia totalis

and universalis.⁶³ In fact, a study that shows a significantly higher hair regrowth in patchy alopecia treated with topical 1% minoxidil compared with placebo,⁶⁴ while other data suggest the opposite results.^{65, 66}

However, a dose-response effect is documented, with a higher efficacy of 5% minoxidil compared to 1% minoxidil.⁶⁷

Indication for the use of topical minoxidil in AA is when hair regrowth has started, in order to increase length and thickness of the new hair.

Biologic drugs

In the last years, several biologic agents have been considered as possible treatments for AA, thanks to their effectiveness in several other autoimmune diseases. However, clinical trials on some antitumor necrosis factor (TNF)- α inhibitors such as infliximab and etanercept, or monoclonal antibody such efalizumab and alefacept did not show the expected results.⁶⁸⁻⁷⁰ Moreover, cases of acute AA occurring during treatment with biologic agents are reported in literature.⁷¹⁻⁷⁸

JANUS KINASE INHIBITORS

A relatively new class of biologic agents, Janus kinase (JAK) inhibitors appear to be effective in AA. Janus kinases are critical for a large family of proinflammatory cytokines signaling. The first JAK inhibitors have been approved by the FDA for the treatment of myelofibrosis, then rheumatoid arthritis.⁷⁹ The most studied JAK inhibitor for the treatment of AA is an oral selective JAK 1/3 inhibitor: tofacitinib administered 5 to 10 mg twice daily.⁸⁰⁻⁸⁶ The results of these studies support the effectiveness in both patchy alopecia and alopecia totalis/universalis after only 4 months of treatment. Lower efficacy was achieved in patients with a disease episode longer than 10 years (32% of clinical response rate).

Recently, two small case series were conducted to assess efficacy of oral tofacitinib in pediatric population. In the first study all of 8 children experienced partial hair regrowth;⁸⁷ in the other series, complete or partial hair regrowth occurred in 3 of 4 preadolescent children treated for refractory alopecia totalis or universalis; of note, the non-responder was treated with half dose compared to the other children (5 mg daily instead of 5 mg twice daily).⁸⁸ Although no significant adverse effects were reported in either study, in our opinion, further studies are needed to confirm the safety and efficacy of tofacitinib before its use for pediatric alopecia. Moreover, adverse effects reported

during treatment with oral tofacitinib for other diseases include severe infections, malignancy and laboratory abnormalities.^{89, 90}

In the open-label pilot study testing the effectiveness in AA of another JAK inhibitor, oral ruxolitinib at the dose of 20 mg, 75% of patients achieved at least 50% hair regrowth after three to six months of therapy.⁸⁹ Several other case series and case reports support the use of this drug in AA.⁹¹⁻⁹⁵

The topical formulations of these new drugs (tofacitinib 2% ointment, ruxolitinib 1% ointment) are very interesting in order to minimize the adverse effects without losing effectiveness; nowadays few data are available but they seem to be a promising treatment option in both adults and pediatric AA patients.⁹⁶⁻¹⁰¹

These drugs can be administered in both active and chronic phase of AA.

Systemic immunosuppressive agents

METHOTREXATE

Methotrexate (10-25 mg per week) can be useful in AA, particularly when used in association with systemic glucocorticoids (clinical response rate of 63%).¹⁰² However, in order to achieve these results, therapy should be continued for three to twelve months, with an increased risk of drug toxicity and disease-recurrence commonly appears after discontinuation of methotrexate.

SULFASALAZINE

Several uncontrolled studies reported that this immunosuppressive drug is an efficacious therapy in approximately 25% of patients with AA.¹⁰³⁻¹⁰⁶ The open-label study conducted on 22 patients, 68.2% of patients responded to therapy (27.3% achieved complete hair regrowth, and 40.9% achieved partial hair regrowth), concluding that sulfasalazine could be considered as a therapeutic alternative in the treatment of AA.¹⁰³ Side effects of sulfasalazine may occur during treatment. Thus, complete blood cell counts and liver function tests should be closely monitored.

AZATHIOPRINE

Azathioprine is an immunosuppressant agent that has been shown effective in stimulating hair regrowth in some patients with moderate to severe AA. However, the studies conducted are small and uncontrolled (almost 43% of the 14 recruited patients experienced a good clinical regrowth

on 75% or more of the scalp). Of note, the occurrence of side effects such as diarrhea, liver enzyme elevation, pancreatitis, and bone marrow suppression resulted in treatment interruption in four patients (28%).^{107, 108}

Miscellaneous treatment

In the decades a miscellaneous group of topical and oral drugs with less scientific valence have been tested with variable results.

Aromatherapy refers to the use of aromatic plant-based essential oils (thyme, rosemary, lavender, and cedarwood) for topical application onto the scalp. A randomized, double-blind, controlled trial of 7-month duration on 86 patients from almost 2 decades ago, showed benefit of aromatherapy concluding that is a safe and effective treatment for AA.¹⁰⁹ We do not recommend this therapy in AA.

Bexarotene is a selective retinoid that induces T-cell apoptosis. A phase I/II, randomized, single-blind trial, was conducted in 2010. Forty-two patients applied 1% bexarotene gel twice daily for 6 months, to one side of the scalp. Five out 42 (12%) had 50% or more partial hair regrowth on the treated side, and 6 of 42 (14%) on both sides including 3 complete responders.¹¹⁰ No further studies have been performed to suggest this drug a potential treatment for AA.

LASER THERAPY

The excimer laser is a form of ultraviolet laser that emits monochromatic ultraviolet B (UVB) light at a wavelength of 308 nm. It is supposed that its mechanism of action in AA is related to T cell apoptosis.¹¹¹ In the literature, some small studies and case reports showed an improvement of patchy AA after excimer laser treatment, also in children (60% response rate). However, alopecia totalis and alopecia universalis did not benefit from this treatment.¹¹¹⁻¹¹⁴

The Infrared diode laser showed a good rate of response leading to a complete or partial regrowth in 32 out of 34 treated patches.¹¹⁵

EZETIMIBE-SIMVASTATIN

The statin family, usually used for reducing atherogenesis, have immunomodulatory activities. In a prospective study, 19 patients assumed ezetimibe-simvastatin (10 mg/40 mg) once-daily for 24 weeks achieving 20% hair regrowth in 14 cases and 70% of hair regrowth in 9 cases.¹¹⁶ Subsequently, a second phase of the study was conducted and patients

were divided into responders who continued treatment for an additional 24 weeks and responders who stopped therapy. In different case reports, alopecia totalis and alopecia universalis were successfully treated with simvastatin/ezetimibe.^{117, 118} Recently, a prospective open study was performed in 14 patients with recalcitrant AA and authors concluded that the remission rate was unsatisfactory.¹¹⁹ In a prospective observational study on 12 patients treated with simvastatin/ezetimibe 40/10 mg over a period of 6 months, 67% had no hair regrowth, 24% transient diffuse or patchy hair regrowth, and 24% patchy regrowth of pigmented hair. Side effects included myalgia reported by 24% of patients and elevation of creatine phosphokinase in 1. Authors conclude that simvastatin/ezetimibe is not effective for treatment of AA.¹²⁰ We do not consider simvastatin/ezetimibe a suggested therapy for AA.

LOW-DOSE RECOMBINANT INTERLEUKIN-2

Interleukin (IL)-2, a cytokine involved in regulatory T cell homeostasis, is historically used for the treatment of advanced melanoma and renal cell carcinoma. A small pilot study on five patients with AA showed a partial response in 4 of 5.¹²¹ The possible toxicity of low-dose recombinant IL-2 therapy is, in our opinion, a limiting factor to suggest this therapy in AA.

PLATELET-RICH PLASMA (PRP)

In the pilot study to investigate the efficacy and safety of PRP on AA, 45 patients with chronic and recurring disease were randomized to receive intralesional injections of PRP, triamcinolone acetonide or placebo on one half of their scalp. Platelet-rich plasma injection was most effective in inducing hair regrowth and decreasing scalp burning or itching sensation.¹²² The main side effects of PRP are pain, edema, tenderness, and rarely scalp psoriasiform reaction and scarring. Further studies are needed to suggest this expensive therapy as a possible treatment for AA, based on its possible immunomodulatory action.

PHOTOCHEMOTHERAPY

Psoralen plus ultraviolet A (PUVA) photochemotherapy has been largely studied for treatment of AA.¹²³⁻¹²⁶ Some of these studies were uncontrolled and reported efficacy rates of 60 to 65% while others did not confirm these results, showing efficacy rates no better than the natural course of the disease without therapy. Moreover, cutaneous malignancy as long-term PUVA adverse effect cannot be ignored. We do not suggest PUVA as a therapy for AA.

CALCINEURIN INHIBITORS

Topical pimecrolimus and topical tacrolimus have not shown any result in AA treatment.¹²⁷⁻¹²⁹ Likewise, topical cyclosporine is not effective.^{130, 131} Data from case series and uncontrolled studies on oral cyclosporine at high doses documented a possible hair regrowth in AA.¹³²⁻¹³⁵ Similar to other immunosuppressive therapies, the potential serious adverse effects preclude a long-term therapy and must be considered.

FECAL MICROBIOTA TRANSPLANTATION

Two patients affected by alopecia universalis experienced hair regrowth after fecal microbiota transplantation.

Authors suggest that gut microbiota may have immunomodulatory effects in autoimmune conditions like AA and further studies may elucidate this event.¹³⁶

FUMARIC ACID ESTERS

Fumaric acid esters are commonly used for psoriasis treatment, thanks to their activities on cytokine networks.¹³⁷ For these immunomodulatory effects, Niculescu *et al.* has conducted a retrospective analysis of the application of fumaric acid esters in 13 patients with AA.¹³⁸ Six (46%) patients had a response; 3 of them experiencing full regrowth of hair. Similarly to other treatments, patchy AA responded better than alopecia totalis or universalis: All patients experienced a new episode of hair loss after cessation of treatment, which is not advisable in AA, also considering the risk of fumaric acid esters toxicity.

OTHERS

Photodynamic therapy, azelaic acid, garlic gel, triiodothyronine, isoprinosine and total glucosides of paeony are other treatment studied with no reported efficacy in AA.¹³⁹

Topical prostaglandin analogues

There are no conventional treatments for eyelash alopecia. Analogues of prostaglandin F2a, bimatoprost and latanoprost, have been studied for eyelash loss with conflicting results. In literature, a 2-16 week controlled study shows no benefit with either latanoprost or bimatoprost¹⁴⁰ and a partial regrowth in only one of 26 patients.¹⁴¹ Lengthening the duration of treatment with latanoprost 0.005% ophthalmic solution every night for two years in 40 patients, a complete regrowth was achieved in 17.5%, moderate regrowth in 27.5%, slight regrowth in 30% and no response

in 25%. In the control group, none of the patients treated with injections of 0.5 mg/cm² of triamcinolone acetonide, reached similar results.¹⁴²

Cosmetic options

Wigs, headscarves, hairpieces, shaving of the scalp, tattoos, tricopigmentation, protein powders, sprays, or pigmented lotions designed to make the hair appear more full are very helpful to decrease the patient's perception of AA and should be suggested, as well as the application of false eyelashes and eyebrows.

Treatment management

In the Authors' opinion, the treatment approach of patients with AA should differ based upon the age, the clinical extent and the activity of the disease.

In patients younger than 10-years, regardless of the clinical manifestation, topical high potency corticosteroids are the preferred treatment. Eventually, minoxidil 5% can be added.¹⁴³ Anthralin can be considered in very young children (1-3 years) (Figure 2).

Over 10-years old of age, the activity and extent of disease should be considered.

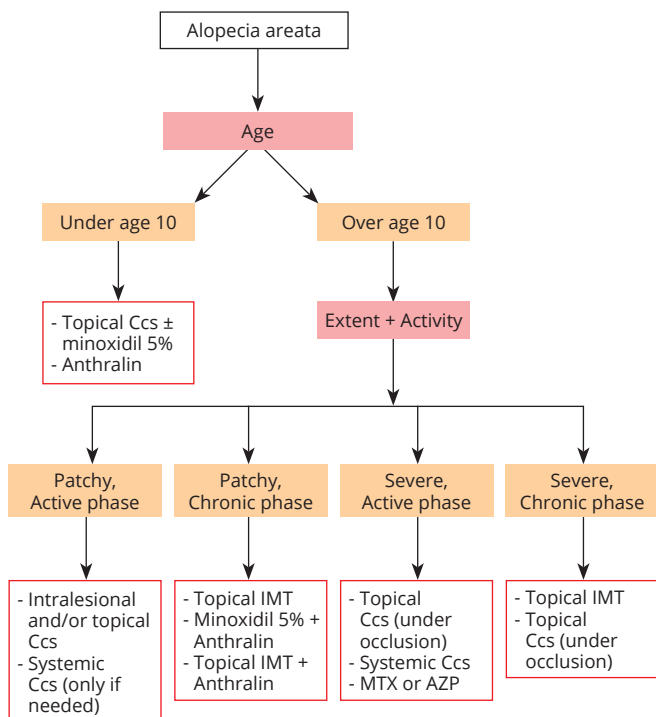


Figure 2.—Treatment algorithm for the management of alopecia areata. Ccs: corticosteroids; IMT: immunotherapy; MTX: methotrexate; AZP: azathioprine.

Patchy AA (less than 50% of scalp hair loss) in active phase

Intralesional and/or topical corticosteroids are definitely the first-line treatment when trichoscopic signs of activity are present in the patch of hair loss, such as black dots, broken hairs, flame hair, hair powder. In specific cases, a short courses of systemic glucocorticoid can be added in order to temporarily halt disease progression.

We recommend systemic glucocorticoids only as a temporary measure to contain rapidly progressing active disease, when several trichoscopic signs of activity can be detected, with a conspicuous loss of hair; after reaching this goal, these patients may be switched to alternative therapies. Common treatments course are 50 mg of prednisone per day in adults or 1 mg/kg per day in children tapered over four to six weeks or 40 mg triamcinolone acetonide intramuscular injection every 15 days tapered over 6-12 weeks.

As mentioned above, desoximetasone, betamethasone valerate and clobetasol propionate are the only potent topical corticosteroids evaluated in the studies and thus recommended.

However, based on the Author's experiences, even the association of four different potent topical corticosteroids in different formulations can be considered. In this therapeutic schedule, the patients are instructed to apply topical corticosteroids in pairs, daily on alternate evenings. Therefore, they apply triamcinolone acetonide solution and immediately after betamethasone cream on the first day. After one day off treatment, the association between salicylic acid and alcinonide lotion is administered immediately prior to halometasone cream; they must have care in applying the lotion followed by the cream in order to facilitate the absorption of halometasone. This protocol can be helpful to avoid a sudden decrease in response (tachyphylaxis).

High potency topical corticosteroids should be used for 3 to 6 months before judging its effectiveness, and can be extended also in the maintenance treatment with lengthening of time of application.

Patchy AA (less than 50% of scalp hair loss) in chronic phase

Patients with Patchy AA in chronic stage, or patients not responding to topical corticosteroids, can be treated with topical immunotherapy with the same regimen described for patients with more extensive disease. Another option in this category should be the association between topical minoxidil 5% and topical anthralin as well as the association between topical immunotherapy and topical anthralin.

Severe AA (more than 50% of scalp hair loss) in active phase

In patients with extensive AA that shows trichoscopic signs of activity (black dots, broken hairs, flame hair, hair powder), the first-line treatment should be systemic glucocorticoid, prescribed in short course as mentioned above.

In addition, high potency topical corticosteroids such as desoximetasone, betamethasone valerate and clobetasol propionate placed under an occlusive dressing to increase their effects, should be used. Even in these patients the authors have experiences with the association of four different potent topical corticosteroids in different formulations (triamcinolone acetonide, betamethasone, association between salicylic acid and alcinonide, halometasone).

If corticosteroids failed in to contain the disease, a second line choice could be a systemic immunosuppressant, among methotrexate and azathioprine. However, take into account all the possible adverse effects of these therapies, an accurate evaluation of the patient is essential before starting these treatments.

Severe AA (more than 50% of scalp hair loss) in chronic phase

Topical immunotherapy is the treatment of choice in these patients with by severe AA with trichoscopic signs of chronic phase (yellow dots, exclamation mark point hair, short vellus hair). Alternatively, high potency topical corticosteroids in occlusion can be proposed.

Conclusions

The main goals of treatment in AA are to block the immune system attack and to stimulate the regrowth of hair. This can be effective, especially for people with milder forms of the disease, while extensive forms often fail to respond to therapy.

Only a few treatments for AA have been evaluated in randomized clinical trials and the majority of them are characterized by few recruited patients, with several studies having major limitations that hinder the interpretation of the results. Therefore, there is relatively little evidence on treatment of AA from well-designed clinical trials.

Moreover, none of the treatments or devices commonly used to treat AA are specifically approved by the Food and Drug Administration (FDA) and are not refunded by the Italian National Health Service.

For all these reasons the Authors consider the Italian

Guidelines useful and needed for the daily management of the disease and for the future acknowledge of AA a real immunological disease by Italian National Health Service.

As the response to treatment of AA is variable, and some patients may choose do not undergo under treatment, a conscientious approach evaluating all the mentioned aspects is essential when dealing with patients with all types and severity of AA.

References

- Hordinsky MK. Overview of alopecia areata. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2013;16:S13–5.
- Darwin E, Arora H, Hirt PA, Wikramanayake TC, Jimenez JJ. A review of monochromatic light devices for the treatment of alopecia areata. *Lasers Med Sci* 2018;33:435–44.
- Messenger AG, McKillop J, Farrant P, McDonagh AJ, Sladden M. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of alopecia areata 2012. *Br J Dermatol* 2012;166:916–26.
- Delamere FM, Sladden MM, Dobbins HM, Leonardi-Bee J. Interventions for alopecia areata. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;(2):CD004413.
- Lacarrubba F, Micali G, Tosti A. Scalp dermoscopy or trichoscopy. *Curr Probl Dermatol* 2015;47:21–32.
- Inui S, Nakajima T, Nakagawa K, Itami S. Clinical significance of dermoscopy in alopecia areata: analysis of 300 cases. *Int J Dermatol* 2008;47:688–93.
- Wałkiel A, Rakowska A, Sikora M, Olszewska M, Rudnicka L. Trichoscopy of alopecia areata: an update. *J Dermatol* 2018;45:692–700.
- Miteva M, Tosti A. Flame Hair. *Skin Appendage Disord* 2015;1:105–9.
- Mandel VD, Cinotti E, Benati E, Labeille B, Ciardo S, Vaschieri C, et al. Reflectance confocal microscopy and optical coherence tomography for the diagnosis of bullous pemphigoid and pemphigus and surrounding subclinical lesions. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2018;32:1562–9.
- Ardigò M, Tosti A, Cameli N, Vincenzi C, Misciali C, Berardesca E. Reflectance confocal microscopy of the yellow dot pattern in alopecia areata. *Arch Dermatol* 2011;147:61–4.
- Rudnicka L, Olszewska M, Rakowska A. In vivo reflectance confocal microscopy: usefulness for diagnosing hair diseases. *J Dermatol Case Rep* 2008;2:55–9.
- Ardigò M, Agozzino M, Franceschini C, Donadio C, Abraham LS, Barbieri L, et al. Reflectance confocal microscopy for scarring and non-scarring alopecia real-time assessment. *Arch Dermatol Res* 2016;308:309–18.
- Olsen EA, Hordinsky MK, Price VH, Roberts JL, Shapiro J, Canfield D, et al.; National Alopecia Areata Foundation. Alopecia areata investigational assessment guidelines—part II. *J Am Acad Dermatol* 2004;51:440–7.
- Ikeda T. A new classification of alopecia areata. *Dermatologica* 1965;131:421–45.
- Rook AJ. Common baldness and alopecia areata. In: Rook AJ, ed. *Recent advances in dermatology*. Oxford: Blackwell; 1977. P. 236–28
- Huang KP, Mullangi S, Guo Y, Qureshi AA. Autoimmune, atopic, and mental health comorbid conditions associated with alopecia areata in the United States. *JAMA Dermatol* 2013;149:789–94.
- Tafazzoli A, Forstner AJ, Broadley D, Hofmann A, Redler S, Petukhova L, et al. Genome-Wide MicroRNA Analysis Implicates miR-30b/d in the Etiology of Alopecia Areata. *J Invest Dermatol* 2018;138:549–56.
- Megiorni F, Pizzuti A, Mora B, Rizzuti A, Garelli V, Maxia C, et al. Genetic association of HLA-DQB1 and HLA-DRB1 polymorphisms with alopecia areata in the Italian population. *Br J Dermatol* 2011;165:823–7.

19. Wang SJ, Shohat T, Vadheim C, Shellow W, Edwards J, Rotter JI. Increased risk for type I (insulin-dependent) diabetes in relatives of patients with alopecia areata (AA). *Am J Med Genet* 1994;51:234-9.
20. White MI, Currie J, Williams MP. A study of the tissue iron status of patients with alopecia areata. *Br J Dermatol* 1994;130:261-3.
21. Du Vivier A, Munro DD. Alopecia areata, autoimmunity, and Down's syndrome. *BMJ* 1975;1:191-2.
22. Schepis C, Barone C, Siragusa M, Pettinato R, Romano C. An updated survey on skin conditions in Down syndrome. *Dermatology* 2002;205:234-8.
23. Collins SM, Dominguez M, Ilmarinen T, Costigan C, Irvine AD. Dermatological manifestations of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy syndrome. *Br J Dermatol* 2006;154:1088-93.
24. Dy LC, Whiting DA. Histopathology of alopecia areata, acute and chronic: why is it important to the clinician? *Dermatol Ther (Heidelb)* 2011;24:369-74.
25. Madani S, Shapiro J. Alopecia areata update. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:549-66, quiz 567-70.
26. Gilhar A, Paus R, Kalish RS. Lymphocytes, neuropeptides, and genes involved in alopecia areata. *J Clin Invest* 2007;117:2019-27.
27. Porter D, Burton JL. A comparison of intra-lesional triamcinolone hexacetonide and triamcinolone acetonide in alopecia areata. *Br J Dermatol* 1971;85:272-3.
28. Kubeyinje EP. Intralesional triamcinolone acetonide in alopecia areata amongst 62 Saudi Arabs. *East Afr Med J* 1994;71:674-5.
29. Abell E, Munro DD. Intralesional treatment of alopecia areata with triamcinolone acetonide by jet injector. *Br J Dermatol* 1973;88:55-9.
30. Alkhalifah A, Alsantali A, Wang E, McElwee KJ, Shapiro J. Alopecia areata update: part II. Treatment. *J Am Acad Dermatol* 2010;62:191-202, quiz 203-4.
31. Carnahan MC, Goldstein DA. Ocular complications of topical, peri-ocular, and systemic corticosteroids. *Curr Opin Ophthalmol* 2000;11:478-83.
32. Downs AM, Lear JT, Kennedy CT. Anaphylaxis to intradermal triamcinolone acetonide. *Arch Dermatol* 1998;134:1163-4.
33. Laing ME, Fallis B, Murphy GM. Anaphylactic reaction to intral-lesional corticosteroid injection. *Contact Dermat* 2007;57:132-3.
34. Lenane P, Macarthur C, Parkin PC, Krafchik B, DeGroot J, Kham-balia A, et al. Clobetasol propionate, 0.05%, vs hydrocortisone, 1%, for alopecia areata in children: a randomized clinical trial. *JAMA Dermatol* 2014;150:47-50.
35. Harrison S, Sinclair R. Optimal management of hair loss (alopecia) in children. *Am J Clin Dermatol* 2003;4:757-70.
36. Hawit F, Silverberg NB. Alopecia areata in children. *Cutis* 2008;82:104-10.
37. Charuwichitratana S, Wattanakrai P, Tanrattanakorn S. Randomized double-blind placebo-controlled trial in the treatment of alopecia areata with 0.25% desoximetasone cream. *Arch Dermatol* 2000;136:1276-7.
38. Kuldeep C, Singhal H, Khare AK, Mittal A, Gupta LK, Garg A. Randomized comparison of topical betamethasone valerate foam, intra-lesional triamcinolone acetonide and tacrolimus ointment in management of localized alopecia areata. *Int J Trichology* 2011;3:20-4.
39. Tosti A, Iorizzo M, Botta GL, Milani M. Efficacy and safety of a new clobetasol propionate 0.05% foam in alopecia areata: a randomized, double-blind placebo-controlled trial. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2006;20:1243-7.
40. Tosti A, Piraccini BM, Pazzaglia M, Vincenzi C. Clobetasol propionate 0.05% under occlusion in the treatment of alopecia totalis/universalis. *J Am Acad Dermatol* 2003;49:96-8.
41. Olsen EA, Carson SC, Turney EA. Systemic steroids with or without 2% topical minoxidil in the treatment of alopecia areata. *Arch Dermatol* 1992;128:1467-73.
42. Kar BR, Handa S, Dogra S, Kumar B. Placebo-controlled oral pulse prednisolone therapy in alopecia areata. *J Am Acad Dermatol* 2005;52:287-90.
43. Vañó-Galván S, Hermosa-Gelbard Á, Sánchez-Neila N, Miguel-Gómez L, Saceda-Corralo D, Rodrigues-Barata R, et al. Pulse corticosteroid therapy with oral dexamethasone for the treatment of adult alopecia totalis and universalis. *J Am Acad Dermatol* 2016;74:1005-7.
44. Burton JL, Shuster S. Large doses of glucocorticoid in the treatment of alopecia areata. *Acta Derm Venereol* 1975;55:493-6.
45. Friedli A, Labarthe MP, Engelhardt E, Feldmann R, Salomon D, Saurat JH. Pulse methylprednisolone therapy for severe alopecia areata: an open prospective study of 45 patients. *J Am Acad Dermatol* 1998;39:597-602.
46. Perriard-Wolfensberger J, Pasche-Koo F, Mainetti C, Labarthe MP, Salomon D, Saurat JH. Pulse of methylprednisolone in alopecia areata. *Dermatology* 1993;187:282-5.
47. Sharma VK. Pulsed administration of corticosteroids in the treatment of alopecia areata. *Int J Dermatol* 1996;35:133-6.
48. Sharma VK, Gupta S. Twice weekly 5 mg dexamethasone oral pulse in the treatment of extensive alopecia areata. *J Dermatol* 1999;26:562-5.
49. Winter RJ, Kern F, Blizzard RM. Prednisone therapy for alopecia areata. A follow-up report. *Arch Dermatol* 1976;112:1549-52.
50. Alabdulkareem AS, Abahusseini AA, Okoro A. Severe alopecia areata treated with systemic corticosteroids. *Int J Dermatol* 1998;37:622-4.
51. Rokhsar CK, Shupack JL, Vafai JJ, Washenik K. Efficacy of topical sensitizers in the treatment of alopecia areata. *J Am Acad Dermatol* 1998;39:751-61.
52. van der Steen PH, van Baar HM, Perret CM, Happle R. Treatment of alopecia areata with diphenylcyclopropenone. *J Am Acad Dermatol* 1991;24:253-7.
53. Lee S, Kim BJ, Lee YB, Lee WS. Hair Regrowth Outcomes of Contact Immunotherapy for Patients With Alopecia Areata: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Dermatol* 2018;154:1145-51.
54. Happle R, Hausen BM, Wiesner-Menzel L. Diphenylcyclopropenone in the treatment of alopecia areata. *Acta Derm Venereol* 1983;63:49-52.
55. Wiseman MC, Shapiro J, MacDonald N, Lui H. Predictive model for immunotherapy of alopecia areata with diphenylcyclopropenone. *Arch Dermatol* 2001;137:1063-8.
56. Tosti A, Guerra L, Bardazzi F. Contact urticaria during topical immunotherapy. *Contact Dermat* 1989;21:196-7.
57. Alam M, Gross EA, Savin RC. Severe urticarial reaction to diphenylcyclopropenone therapy for alopecia areata. *J Am Acad Dermatol* 1999;40:110-2.
58. Henderson CA, Ilchysyn A. Vitiligo complicating diphenylcyclopropenone sensitization therapy for alopecia universalis. *Br J Dermatol* 1995;133:496-7.
59. MacDonald-Hull SP, Cotterill JA, Norris JF. Vitiligo following diphenylcyclopropenone dermatitis. *Br J Dermatol* 1989;120:323.
60. Wu SZ, Wang S, Ratnaparkhi R, Bergfeld WF. Treatment of pediatric alopecia areata with anthralin: A retrospective study of 37 patients. *Pediatr Dermatol* 2018;35:817-20.
61. Fiedler-Weiss VC, Buys CM. Evaluation of anthralin in the treatment of alopecia areata. *Arch Dermatol* 1987;123:1491-3.
62. Durdu M, Özcan D, Baba M, Seçkin D. Efficacy and safety of diphenylcyclopropenone alone or in combination with anthralin in the treatment of chronic extensive alopecia areata: a retrospective case series. *J Am Acad Dermatol* 2015;72:640-50.
63. Vestey JP, Savin JA. A trial of 1% minoxidil used topically for severe alopecia areata. *Acta Derm Venereol* 1986;66:179-80.
64. Fenton DA, Wilkinson JD. Topical minoxidil in the treatment of alopecia areata. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983;287:1015-7.
65. Price VH. Double-blind, placebo-controlled evaluation of topical minoxidil in extensive alopecia areata. *J Am Acad Dermatol* 1987;16:730-6.
66. Ranchoff RE, Bergfeld WF, Steck WD, Subichin SJ. Extensive alo-

- pecia areata. Results of treatment with 3% topical minoxidil. *Cleve Clin J Med* 1989;56:149–54.
67. Fiedler-Weiss VC. Topical minoxidil solution (1% and 5%) in the treatment of alopecia areata. *J Am Acad Dermatol* 1987;16:745–8.
68. Shin BS, Furuhashi T, Nakamura M, Torii K, Morita A. Impaired inhibitory function of circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in alopecia areata. *J Dermatol Sci* 2013;70:141–3.
69. Strober BE, Siu K, Alexis AF, Kim G, Washenik K, Sinha A, *et al.* Etanercept does not effectively treat moderate to severe alopecia areata: an open-label study. *J Am Acad Dermatol* 2005;52:1082–4.
70. Strober BE, Menon K, McMichael A, Hordinsky M, Krueger G, Panko J, *et al.* Alefacept for severe alopecia areata: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Arch Dermatol* 2009;145:1262–6.
71. Chaves Y, Duarte G, Ben-Said B, Tebib J, Berard F, Nicolas JF. Alopecia areata universalis during treatment of rheumatoid arthritis with anti-TNF-alpha antibody (adalimumab). *Dermatology* 2008;217:380.
72. Peliyani N, Hassan AS, Braathen LR, Hunger RE, Yawalkar N. Alopecia areata universalis elicited during treatment with adalimumab. *Dermatology* 2008;216:320–3.
73. Garcia Bartels N, Lee HH, Worm M, Burmester GR, Sterry W, Blume-Peytavi U. Development of alopecia areata universalis in a patient receiving adalimumab. *Arch Dermatol* 2006;142:1654–5.
74. Fabre C, Dereure O. Worsening alopecia areata and de novo occurrence of multiple halo nevi in a patient receiving infliximab. *Dermatology* 2008;216:185–6.
75. Etefagh L, Nedorost S, Mirmirani P. Alopecia areata in a patient using infliximab: new insights into the role of tumor necrosis factor on human hair follicles. *Arch Dermatol* 2004;140:1012.
76. Tosti A, Pazzaglia M, Starace M, Bellavista S, Vincenzi C, Tonelli G. Alopecia areata during treatment with biologic agents. *Arch Dermatol* 2006;142:1653–4.
77. Pan Y, Rao NA. Alopecia areata during etanercept therapy. *Ocul Immunol Inflamm* 2009;17:127–9.
78. Posten W, Swan J. Recurrence of alopecia areata in a patient receiving etanercept injections. *Arch Dermatol* 2005;141:759–60.
79. O'Shea JJ, Kontzias A, Yamaoka K, Tanaka Y, Laurence A. Janus kinase inhibitors in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 2013;72(Suppl 2):ii111–5.
80. Liu LY, Craiglow BG, Dai F, King BA. Tofacitinib for the treatment of severe alopecia areata and variants: A study of 90 patients. *J Am Acad Dermatol* 2017;76:22–8.
81. Craiglow BG, King BA. Killing two birds with one stone: oral tofacitinib reverses alopecia universalis in a patient with plaque psoriasis. *J Invest Dermatol* 2014;134:2988–90.
82. Dhayalan A, King BA. Tofacitinib Citrate for the Treatment of Nail Dystrophy Associated With Alopecia Universalis. *JAMA Dermatol* 2016;152:492–3.
83. Craiglow BG, Liu LY, King BA. Tofacitinib for the treatment of alopecia areata and variants in adolescents. *J Am Acad Dermatol* 2017;76:29–32.
84. Gupta AK, Carviel JL, Abramovits W. Efficacy of tofacitinib in treatment of alopecia universalis in two patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2016;30:1373–8.
85. Ibrahim O, Bayart CB, Hogan S, Piliang M, Bergfeld WF. Treatment of Alopecia Areata With Tofacitinib. *JAMA Dermatol* 2017;153:600–2.
86. Jabbari A, Sansariq F, Cerise J, Chen JC, Bitterman A, Ulerio G, *et al.* An Open-Label Pilot Study to Evaluate the Efficacy of Tofacitinib in Moderate to Severe Patch-Type Alopecia Areata, Totalis, and Universalis. *J Invest Dermatol* 2018;138:1539–45.
87. Castelo-Soccio L. Experience with oral tofacitinib in 8 adolescent patients with alopecia universalis. *J Am Acad Dermatol* 2017;76:754–5.
88. Craiglow BG, King BA. Tofacitinib for the treatment of alopecia areata in preadolescent children. *J Am Acad Dermatol* 2019;80:568–70.
89. Papp KA, Menter A, Strober B, Langley RG, Buonanno M, Wolk R, *et al.* Efficacy and safety of tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in the treatment of psoriasis: a Phase 2b randomized placebo-controlled dose-ranging study. *Br J Dermatol* 2012;167:668–77.
90. Wollenhaupt J, Silverfield J, Lee EB, Curtis JR, Wood SP, Soma K, *et al.* Safety and efficacy of tofacitinib, an oral janus kinase inhibitor, for the treatment of rheumatoid arthritis in open-label, longterm extension studies. *J Rheumatol* 2014;41:837–52.
91. Mackay-Wiggan J, Jabbari A, Nguyen N, Cerise JE, Clark C, Ulerio G, *et al.* Oral ruxolitinib induces hair regrowth in patients with moderate-to-severe alopecia areata. *JCI Insight* 2016;1:e89790.
92. Xing L, Dai Z, Jabbari A, Cerise JE, Higgins CA, Gong W, *et al.* Alopecia areata is driven by cytotoxic T lymphocytes and is reversed by JAK inhibition. *Nat Med* 2014;20:1043–9.
93. Harris JE, Rashighi M, Nguyen N, Jabbari A, Ulerio G, Clynes R, *et al.* Rapid skin repigmentation on oral ruxolitinib in a patient with coexistent vitiligo and alopecia areata (AA). *J Am Acad Dermatol* 2016;74:370–1.
94. Liu LY, King BA. Ruxolitinib for the treatment of severe alopecia areata. *J Am Acad Dermatol* 2019;80:566–8.
95. Pieri L, Guglielmelli P, Vannucchi AM. Ruxolitinib-induced reversal of alopecia universalis in a patient with essential thrombocythemia. *Am J Hematol* 2015;90:82–3.
96. Liu LY, Craiglow BG, King BA. Tofacitinib 2% ointment, a topical Janus kinase inhibitor, for the treatment of alopecia areata: A pilot study of 10 patients. *J Am Acad Dermatol* 2018;78:403–404.e1, e1.
97. Craiglow BG, Tavares D, King BA. Topical Ruxolitinib for the Treatment of Alopecia Universalis. *JAMA Dermatol* 2016;152:490–1.
98. Bokhari L, Sinclair R. Treatment of alopecia universalis with topical Janus kinase inhibitors - a double blind, placebo, and active controlled pilot study. *Int J Dermatol* 2018;57:1464–70.
99. Bayart CB, DeNiro KL, Brichta L, Craiglow BG, Sidbury R. Topical Janus kinase inhibitors for the treatment of pediatric alopecia areata. *J Am Acad Dermatol* 2017;77:167–70.
100. Putterman E, Castelo-Soccio L. Topical 2% tofacitinib for children with alopecia areata, alopecia totalis, and alopecia universalis. *J Am Acad Dermatol* 2018;78:1207–1209.e1, e1.
101. Cheng MW, Kehl A, Worswick S, Goh C. Successful Treatment of Severe Alopecia Areata With Oral or Topical Tofacitinib. *J Drugs Dermatol* 2018;17:800–3.
102. Phan K, Ramachandran V, Sebaratnam DF. Methotrexate for alopecia areata: A systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Dermatol* 2019;80:120–127.e2, e2.
103. Aghaei S. An uncontrolled, open label study of sulfasalazine in severe alopecia areata. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2008;74:611–3.
104. Ellis CN, Brown MF, Voorhees JJ. Sulfasalazine for alopecia areata. *J Am Acad Dermatol* 2002;46:541–4.
105. Bakar O, Gurbuz O. Is there a role for sulfasalazine in the treatment of alopecia areata? *J Am Acad Dermatol* 2007;57:703–6.
106. Rashidi T, Mahd AA. Treatment of persistent alopecia areata with sulfasalazine. *Int J Dermatol* 2008;47:850–2.
107. Vañó-Galván S, Hermosa-Gelbard Á, Sánchez-Neila N, Miguel-Gómez L, Saceda-Corralo D, Rodrigues-Barata R, *et al.* Treatment of recalcitrant adult alopecia areata universalis with oral azathioprine. *J Am Acad Dermatol* 2016;74:1007–8.
108. Farshi S, Mansouri P, Safar F, Khiabanloo SR. Could azathioprine be considered as a therapeutic alternative in the treatment of alopecia areata? A pilot study. *Int J Dermatol* 2010;49:1188–93.
109. Hay IC, Jamieson M, Ormerod AD. Randomized trial of aromatherapy. Successful treatment for alopecia areata. *Arch Dermatol* 1998;134:1349–52.
110. Talpur R, Vu J, Bassett R, Stevens V, Duvic M. Phase I/II randomized bilateral half-head comparison of topical bexarotene 1% gel for alopecia areata. *J Am Acad Dermatol* 2009;61:592.e1–9.

111. Zakaria W, Passeron T, Ostovari N, Lacour JP, Ortonne JP. 308-nm excimer laser therapy in alopecia areata. *J Am Acad Dermatol* 2004;51:837–8.
112. Al-Mutairi N. 308-nm excimer laser for the treatment of alopecia areata. *Dermatol Surg* 2007;33:1483–7.
113. Gundogan C, Greve B, Raulin C. Treatment of alopecia areata with the 308-nm xenon chloride excimer laser: case report of two successful treatments with the excimer laser. *Lasers Surg Med* 2004;34:86–90.
114. Al-Mutairi N. 308-nm excimer laser for the treatment of alopecia areata in children. *Pediatr Dermatol* 2009;26:547–50.
115. Waiz M, Saleh AZ, Hayani R, Jubory SO. Use of the pulsed infrared diode laser (904 nm) in the treatment of alopecia areata. *J Cosmet Laser Ther* 2006;8:27–30.
116. Lattouf C, Jimenez JJ, Tosti A, Miteva M, Wikramanayake TC, Kittles C, *et al.* Treatment of alopecia areata with simvastatin/ezetimibe. *J Am Acad Dermatol* 2015;72:359–61.
117. Ali A, Martin JM 4th. Hair growth in patients alopecia areata totalis after treatment with simvastatin and ezetimibe. *J Drugs Dermatol* 2010;9:62–4.
118. Robins DN. Case reports: alopecia universalis: hair growth following initiation of simvastatin and ezetimibe therapy. *J Drugs Dermatol* 2007;6:946–7.
119. Choi JW, Suh DW, Lew BL, Sim WY. Simvastatin/Ezetimibe Therapy for Recalcitrant Alopecia Areata: An Open Prospective Study of 14 Patients. *Ann Dermatol* 2017;29:755–60.
120. Freitas Gouveia M, Trüeb RM. Unsuccessful Treatment of Alopecia Areata with Simvastatin/Ezetimibe: experience in 12 Patients. *Skin Appendage Disord* 2017;3:156–60.
121. Castela E, Le Duff F, Butori C, Ticchioni M, Hofman P, Bahadoran P, *et al.* Effects of low-dose recombinant interleukin 2 to promote T-regulatory cells in alopecia areata. *JAMA Dermatol* 2014;150:748–51.
122. Trink A, Sorbellini E, Bezzola P, Rodella L, Rezzani R, Ramot Y, *et al.* A randomized, double-blind, placebo- and active-controlled, half-head study to evaluate the effects of platelet-rich plasma on alopecia areata. *Br J Dermatol* 2013;169:690–4.
123. Claudy AL, Gagnaire D. PUVA treatment of alopecia areata. *Arch Dermatol* 1983;119:975–8.
124. Lassus A, Eskelinen A, Johansson E. Treatment of alopecia areata with three different PUVA modalities. *Photodermatol* 1984;1:141–4.
125. van der Schaar WW, Sillevs Smith JH. An evaluation of PUVA-therapy for alopecia areata. *Dermatologica* 1984;168:250–2.
126. Mitchell AJ, Douglass MC. Topical photochemotherapy for alopecia areata. *J Am Acad Dermatol* 1985;12:644–9.
127. Rigopoulos D, Gregoriou S, Korfitis C, Gintzou C, Vergou T, Karinaki A, *et al.* Lack of response of alopecia areata to pimecrolimus cream. *Clin Exp Dermatol* 2007;32:456–7.
128. Price VH, Willey A, Chen BK. Topical tacrolimus in alopecia areata. *J Am Acad Dermatol* 2005;52:138–9.
129. Feldmann KA, Kunte C, Wollenberg A, Wolfe H. Is topical tacrolimus effective in alopecia areata universalis? *Br J Dermatol* 2002;147:1031–2.
130. Gilhar A, Pillar T, Etzioni A. Topical cyclosporin A in alopecia areata. *Acta Derm Venereol* 1989;69:252–3.
131. Mauduit G, Lenvers P, Barthélémy H, Thivolet J. [Treatment of severe alopecia areata with topical applications of cyclosporin A]. *Ann Dermatol Venereol* 1987;114:507–10. French.
132. Açıkgoz G, Calışkan E, Tunca M, Yeniay Y, Akar A. The effect of oral cyclosporine in the treatment of severe alopecia areata. *Cutan Ocul Toxicol* 2014;33:247–52.
133. Yeo IK, Ko EJ, No YA, Lim ES, Park KY, Li K, *et al.* Comparison of High-Dose Corticosteroid Pulse Therapy and Combination Therapy Using Oral Cyclosporine with Low-Dose Corticosteroid in Severe Alopecia Areata. *Ann Dermatol* 2015;27:676–81.
134. Jang YH, Kim SL, Lee KC, Kim MJ, Park KH, Lee WJ, *et al.* A Comparative Study of Oral Cyclosporine and Betamethasone Minipulse Therapy in the Treatment of Alopecia Areata. *Ann Dermatol* 2016;28:569–74.
135. Kim BJ, Min SU, Park KY, Choi JW, Park SW, Youn SW, *et al.* Combination therapy of cyclosporine and methylprednisolone on severe alopecia areata. *J Dermatolog Treat* 2008;19:216–20.
136. Rebello D, Wang E, Yen E, Lio PA, Kelly CR. Hair Growth in Two Alopecia Patients after Fecal Microbiota Transplant. *ACG Case Rep J* 2017;4:e107.
137. Wollina U. Fumaric acid esters in dermatology. *Indian Dermatol Online J* 2011;2:111–9.
138. Niculescu L, Heppt MV, Varga R, Steckmeier S, Wolff H, Tietze JK. Retrospective analysis of the application of fumaric acid esters in 13 patients with alopecia areata. *Eur J Dermatol* 2018;28:376–7.
139. Hordinsky M, Donati A. Alopecia areata: an evidence-based treatment update. *Am J Clin Dermatol* 2014;15:231–46.
140. Roseborough I, Lee H, Chwalek J, Stamper RL, Price VH. Lack of efficacy of topical latanoprost and bimatoprost ophthalmic solutions in promoting eyelash growth in patients with alopecia areata. *J Am Acad Dermatol* 2009;60:705–6.
141. Faghihi G, Andalib F, Asilian A. The efficacy of latanoprost in the treatment of alopecia areata of eyelashes and eyebrows. *Eur J Dermatol* 2009;19:586–7.
142. Coronel-Pérez IM, Rodríguez-Rey EM, Camacho-Martínez FM. Latanoprost in the treatment of eyelash alopecia in alopecia areata universalis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010;24:481–5.
143. Strazzulla LC, Wang EH, Avila L, Lo Sicco K, Brinster N, Cristiano AM, *et al.* Alopecia areata: an appraisal of new treatment approaches and overview of current therapies. *J Am Acad Dermatol* 2018;78:15–24.

Conflicts of interest.—The authors certify that there is no conflict of interest with any financial organization regarding the material discussed in the manuscript.

Authors' contributions.—Alfredo Rossi, Marta Muscianese and Maria C. Fortuna designed, wrote and edited the Italian guideline. Bianca M. Piraccini, Michela Starace, Luca Stingeni, Victor D. Mandel and Simone Garcovich reviewed the manuscript. All the others authors collaborate in editing the manuscript.

Acknowledgements.—The Authors acknowledge all the members of Italian Study Group on Cutaneous Annexial Disease of the Italian Society of Dermatology (SIDeMaST) for their contribution.

Article first published online: September 26, 2019. - Manuscript accepted: September 23, 2019. - Manuscript received: August 6, 2019.