

# INDICE

## INTRODUZIONE - BASE DELLA RICERCA

### Capitolo I

Ricerca di NF- $\kappa$ B su mucosa orale di paziente affetto da BMS

- 1.1 Burning Mouth Syndrome
- 1.2 NF- $\kappa$ B come Target di Trattamento Farmacologico
- 1.2 Materiali e Metodi
- 1.3 Risultati

### Capitolo II

I Polimorfismi genici su prelievo ematico di paziente affetto da Burning Mouth Syndrome - studio preliminare

- 2.1 I Polimorfismi Genici
- 2.2 Materiali e Metodi
- 2.3 Risultati

### Capitolo III

Prospettive Terapeutiche alternative "BMS e Agopuntura"

- 3.1 Agopuntura nel soggetto sano
- 2.2 Effetti terapeutici dell'Agopuntura sulla BMS

CONCLUSIONI

BIBLIOGRAFIA

# INTRODUZIONE

## BASE DELLA RICERCA

Sono presenti in letteratura innumerevoli studi che descrivono la Burning Mouth Syndrome (BMS), la sintomatologia, il menage diagnostico, i dati statisticamente significativi e le terapie utilizzate per il trattamento ma la sua eziologia e la patogenesi sono, sconosciute.

Secondo una recente definizione pubblicata su Pain Practice, il termine BMS si riferisce ad un disturbo dolorifico cronico del distretto oro-facciale non accompagnato da lesioni della mucosa orale o da alcun altro segno clinico di patologia organica. Secondo la medesima fonte, è possibile distinguere due tipi di BMS, quella di tipo I – idiopatica - e quella di tipo II, riconducibile ad alterazioni locali o sistemiche quali la menopausa, cambiamenti ormonali, infezioni locali, deficienze nutrizionali, xerostomia, utilizzo di farmaci e diabete mellito (1). I dati statistici riscontrabili sono emblematici i valori di incidenza aumentano e, ad oggi, sono stimati in un range tra 0.7 e 4.5% della popolazione generale ed è ormai assodata una maggiore incidenza nelle donne rispetto gli uomini, specie nel post-menopausa. Da lungo tempo, gli studi condotti sulla Burning Mouth Syndrome volgono il loro interesse su un possibile meccanismo neuropatico, per cui delle alterazioni del sistema nervoso centrale o periferico determinerebbero l'insorgere della sindrome. Considerando che il sintomo principale è il bruciore e che il dolore oro-facciale si cronicizza come se alimentato in maniera continua è plausibile

pensare ad un meccanismo patogenetico infiammatorio derivante da un disordine endogeno (ciò spiegherebbe l'assenza di lesioni della mucosa), che innesci una cascata di neuro-mediatori pro-infiammatori responsabili della sintomatologia. Per ciò che concerne il disordine di base, inoltre, è un dato riconosciuto che nella BMS si registrino alterazioni sensorie riconducibili ad un danno del sistema nervoso centrale o periferico in cui alcuni fattori quali ansia, depressione, il sesso femminile, il climaterio e l'anzianità giocherebbero da co-fattori inducendo un'alterazione dei recettori di membrana dislocati nella mucosa orale o una loro alterata capacità di reazione rendendo il soggetto particolarmente predisposto alla patologia (2). Il trait d'union di tali affermazioni potrebbe essere il meccanismo dell'infiammazione neurogena che funge da anello di congiunzione tra entrambe le teorie senza escludere il coinvolgimento di più sistemi e di più fattori. L'etiologia neurogena prevede il coinvolgimento del sistema nervoso centrale responsabile della cascata dei peptici pro-infiammatori determinanti il processo infiammatorio, da cui deriverebbero i sintomi bruciore e dolore. Molti studi hanno dimostrato il ruolo che i neuroni sensoriali rivestono rispetto ai vari aspetti dell'infiammazione vascolare, e il termine "Infiammazione Neurogena" (NI) è stato coniato proprio al fine di definire in modo soddisfacente il contributo del sistema nervoso nell'ambito della risposta all'infiammazione locale. Si presume, ad oggi, che la risposta neurogena sia la conseguenza dell'attivazione dei neuroni sensitivi in seguito al rilascio di neuropeptidi quali la Sostanza P (SP) e il peptide correlato al gene della calcitonina (CGPR) dalle terminazioni nervose periferiche. Alla base degli studi in trattazione vi sono due considerazioni fondamentali: la

prima, per cui NI può essere indotta sperimentalmente mediante stimolazione locale con Capsaicina, un alcaloide capace di attivare i neuroni sensitivi primari tramite legame con il transient receptor potential Vanilloid type 1 (TRPV1), recettore che è stato riscontrato anche nelle terminazioni Trigeminali, cui segue il rilascio dei neuropeptidi responsabili della risposta infiammatoria. La seconda si basa su studi effettuati sui ratti che evidenziano che la denervazione di un'area previene lo sviluppo di reazioni infiammatorie e su ricerche che evidenziano che alcune specie di mammifero che non producono SP non avvertono dolore (3). Il recettore vanilloide è un canale non selettivo per cationi di natura eccitatoria, altamente espresso nei neuroni primari delle fibre afferenti a conduzione lenta C ed Ad, che agisce come integratore molecolare degli stimoli nocicettivi. Il canale può essere attivato da diversi stimoli, quali il calore, protoni e agonisti vanilloidi, come la capsaicina. Come regola generale, i vanilloidi esercitano un'azione bifasica sui nervi sensoriali, cioè una iniziale eccitazione seguita da un durevole periodo refrattario. La liberazione della sostanza P gioca un ruolo fondamentale nella sensitizzazione e nel mantenimento dello stimolo doloroso da parte dei nocicettori e delle fibre C. Queste ultime divengono capaci di aumentare la frequenza di scarica, ricevendo stimolazioni di natura ortosimpatica per la neoformazione di recettori  $\alpha$  e  $\beta$  noradrenergici nelle terminazioni assoniche. L'alterata situazione distrettuale viene trasmessa (attività antidromica) fino ai segmenti metamericici nel midollo spinale. Il persistere delle modificazioni locali, le risposte accentuate riflesse, il coinvolgimento del sistema simpatico, la massima inibizione del parasimpatico con conseguente vasodilatazione estrema a livello

del microcircolo, le alterazioni metaboliche locali indotte dall'aumento di CO<sub>2</sub> favoriscono il quadro del dolore cronico. Per ciò che concerne l'esposizione alla capsaicina, essa porta dapprima ad una sensazione di bruciore dovuta all'eccitazione neuronale seguita da un periodo di analgesia, in cui il neurone mostra desensibilizzazione funzionale e non riesce a rispondere a stimoli nocicettivi di diversa natura. Il coinvolgimento del recettore vanilloide nella sensazione dolorifica e l'evidenza che durante le condizioni infiammatorie l'espressione di TRPV1 aumenta, ha stimolato la ricerca di nuovi antagonisti TRPV1 che potrebbero dimostrarne il potenziale terapeutico negli stati di dolore cronico ed iperalgesia. Una ricerca del 2007, effettuata tramite biopsia della lingua, ha correlato direttamente i recettori vanilloidi alla BMS e al danno neuropatico delle piccole fibre nervose periferiche. E' stato, infatti, registrato un aumento di calore dei recettori per la capsaicina TRPV1 e del fattore di crescita nervosa (NGF) che regola l'espressione del recettore. Ciò sarebbe correlabile in maniera diretta ad una diminuzione della densità delle fibre nervose periferiche penetranti nell'epitelio nei pazienti BMS (4). Questo studio appare in accordo con una ricerca precedente pubblicata su Pain del 2005 in cui esami effettuati su prelievi bioptici linguali avevano dimostrato lo stessa diminuzione della densità di fibre e delle modificazioni morfologiche delle stesse che si riflettevano in una degenerazione assonica correlata direttamente con il dolore. Osservato ciò, si era giunti all'affermazione che la BMS producesse una neuropatia delle piccole fibre sensoriali trigeminali (5). Il nodo unanime della questione, tuttavia, anche dinanzi a tali ricerche,, resta stabilire se sia la sindrome a determinare il danno neuropatico o l'inverso. Ad oggi,

sono stati condotti presso l'Università degli Studi di Palermo studi specifici basati sull'utilizzo della capsaicina al fine di verificarne l'effetto sulla mucosa orale. Tali studi sono stati condotti grazie all'ausilio di una tecnica innovativa, la videocapillaroscopia orale, che permette, a mezzo di una sonda e di un software specifico, lo studio del microcircolo in vivo e di evidenziarne eventuali modificazioni. Tali studi sono stati condotti applicando la capsaicina ad un dosaggio di 5 mg, con una concentrazione dello 0,1%, per 5 minuti sulla mucosa parodontale e su quella linguale; a ciò è seguito un esame capillaroscopico dopo 1 minuto dall'applicazione e dopo 45 minuti, al termine dell'effetto della capsaicina (6). È stato rinvenuto in entrambe le mucose una vasodilatazione pressoché immediata che cessava al termine dell'effetto dell'alcaloide. Nel caso della mucosa linguale, il risultato è apparso anche più significativo poiché, effettuata l'anestesia del tronco nervoso di uno dei margini della lingua, la capsaicina ha dimostrato efficacia solo sul margine non anestetizzato, e ciò comprova ulteriormente l'ipotesi del meccanismo neurogeno dell'infiammazione indotta (7). Studi più recenti sono stati condotti al fine di evidenziare il ruolo delle citochine pro-infiammatorie nella patogenesi della BMS. Le ricerche sono state condotte su saliva e su siero con il metodo enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) al fine di evidenziare eventuali variazioni dell'IL-2 e, in particolare, dell'IL-6 nel paziente BMS e confrontarlo con i valori del controllo sano. I risultati sono stati in alcuni casi contraddittori, ma comunque significativi.

Nei campioni sierici è stato evidenziato un abbassamento dei valori di IL-6, che è stato correlato all'iperalgisia. Ciò è stato ricondotto al valore

neurotrofico e neuroprotettivo attribuito all'IL-6, per cui la sua diminuzione avrebbe determinato una mancata protezione delle fibre trigeminali con conseguente neuropatia (8). A livello salivare sono stati evidenziati valori significativamente elevati di IL-2 e di IL-6 rispetto i controlli (il valore più alto dei controlli era il valore più basso dei pazienti BMS) e correlato alla patologia (9). Un altro studio condotto su campioni salivari e rivolto anche alla ricerca di TNF- $\alpha$  ha riportato, invece, differenze non significative tra i casi e i controlli. Alla luce di tali dati appare evidente l'esigenza di ulteriori ricerche che chiariscano il coinvolgimento delle citochine pro-infiammatorie nella BMS. La letteratura, attualmente, non riporta ancora dati sull'associazione di un sistema enzimatico che, negli ultimi anni, è stato centro di interesse su innumerevoli fronti per la sua natura ubiquitaria, il sistema Nf $\kappa$ -b. Il Nuclear Factor-  $\kappa$ B (Nf $\kappa$ -B) è un fattore di trascrizione ubiquitario conservato nelle cellule eucariotiche. Nf- $\kappa$ -B è attivato da numerosi stimoli compresi prodotti virali e batterici, radiazioni ultraviolette, radicali ossidanti, citochine, sostanze chimiche varie. Una volta attivato, Nf- $\kappa$ -B controlla direttamente, o con la cooperazione di altri fattori di trascrizione, l'attività di oltre 100 geni che generano citochine, fattori di crescita, chemochine, molecole di adesione, proteine della fase acuta ed è direttamente implicato nei processi pro-apoptotici. La prolungata attivazione di NF $\kappa$ -B può causare gravi condizioni infiammatorie e persino la morte da eccessiva produzione di citochine; pertanto è essenziale non solo che NF $\kappa$ -B sia rapidamente attivato ma anche che la sua attivazione abbia rapidamente termine subito dopo che lo stimolo infiammatorio/infettivo sia stato allontanato. All'interno delle cellule vi sono, pertanto, meccanismi di controllo

che ne limitano l'attivazione. Esempi di geni regolati da NFκ-B sono: IL-1; TNF-α; IL-6; IL-8; Interferone β. E' stato evidenziato come il fattore trascrizionale NFκ-B sia implicato nelle patogenesi di malattie infiammatorie croniche del sistema vascolare e nel processo di formazione di lesioni aterosclerotiche nonché in molti meccanismi oncologici per la sua influenza sulle citochine, la crescita tumorale e le proteine apoptotiche tanto da farne farmaco di elezione per il trattamento del mieloma multiplo. Ulteriori studi sulla correlazione NFκ-B- BMS potrebbero spiegare fasi del meccanismo patogenico oggi incerti e l'utilizzo di farmaci che inibiscono NFκ-B potrebbe rappresentare un target per il trattamento che potrebbe avere dei risvolti positivi considerando che l'inibizione del sistema ha provocato effetti positivi in molte patologie infiammatorie croniche.(10-12)

In ultimo, riteniamo che una visione di insieme che non precluda l'utilizzo di alcun tipo di mezzo terapeutico sia d'obbligo in una patologia complessa e multifattoriale come la BMS per cui, considerando la natura neuropatica della sindrome, pensiamo possa avere un effetto terapeutico positivo anche l'utilizzo di medicina "alternativa" come l'agopuntura che prevede il blocco di centri nervosi e che ha determinato buoni esiti in patologie dall'eziologia non ancora accertata data la variabilità delle possibili concause come la stomatite afosa ricorrente e nel trattamento del dolore del distretto oro-faciale.



# Capitolo I

## Ricerca di Nf- $\kappa$ B su mucosa orale di paziente affetto da BMS

### 1.1 Burning Mouth Syndrome

La Burning Mouth Syndrome (BMS) è un disturbo sensoriale orale che viene diagnosticato sulla base della storia clinica e l'assenza di una causa organica identificabile come parafunzioni orali, disfunzioni delle ghiandole salivari, traumi nervosi locali, disturbi della menopausa, diabete, carenza delle vitamine del Gruppo B e di ferro (13). L'elemento essenziale per effettuare diagnosi di BMS è l'assenza di segni clinici o di dati di laboratorio che possano giustificare la sensazione urente riferita dal paziente.

L'International Association for the study of the Pain definisce questa sindrome come un dolore con una durata di almeno 4-6 mesi localizzato prevalentemente sulla lingua. La zona più colpita è la lingua (punta e bordi laterali), e in tal caso viene denominata come 'glossodinia' (lingua dolorante) o glossopyrosis (lingua urente) o glossalgia; altri termini utilizzati sono stomatodinia, stomatopirosi, disestesia orale e sindrome della bocca urente.

A causa della frequente associazione con altri sintomi (xerostomia, alterazioni del gusto) e della complessità dei disordini, alcuni autori preferiscono usare

l'espressione "Burning Mouth Syndrome (BMS) ovvero 'sindrome della bocca che brucia' per fare riferimento a questa entità.

La Sindrome è caratterizzata da un bruciore continuo, spontaneo ed intenso.

I pazienti, in genere, descrivono il disturbo come sensazione di bruciore, formicolio o insensibilità di alcune aree della cavità orale, un dolore simile a quello provato quando ci si ustiona la bocca bevendo thé o caffè bollente.

### **Classificazione e sottotipi:**

Sono stati proposti nel tempo diversi tipi di classificazione, sulla base delle variazioni giornaliere dei sintomi (14-16).

**a) di Tipo 1:** caratterizzata da dolore progressivo. I pazienti non presentano dolore al risveglio, che aumenta poi durante tutto il giorno. Questa variante colpisce circa il 35% dei pazienti e può essere associata a malattie sistemiche, come le carenze nutrizionali.

**b) Tipo 2:** i sintomi sono costanti durante tutto l'arco della giornata ed i pazienti hanno difficoltà a prendere sonno. Questo tipo rappresenta il 55% dei pazienti ed è solitamente presente associata a disturbi psicologici.

**c) Tipo 3:** i sintomi sono intermittenti, con atipie rispetto la localizzazione e l'intensità del dolore. Costituisce il 10% dei pazienti. Sembra che il contatto con gli allergeni orali potrebbe svolgere un importante ruolo eziologico in questo gruppo.

Un approccio più pragmatico è stato proposto da Scala et al. (17), che organizzano la BMS in due forme cliniche: quella di tipo I – idiopatica e quella di tipo II, riconducibile ad alterazioni locali o sistemiche

quali la menopausa, cambiamenti ormonali, infezioni locali, deficienze nutrizionali, xerostomia, utilizzo di farmaci e diabete mellito.

### **Epidemiologia**

La BMS interessa una quota piuttosto significativa della popolazione e gli studi epidemiologici più accurati danno una prevalenza generale che varia da 0,7% a 4,5%. Si riscontra più frequentemente tra la V-VI decade (range: 36-84anni). Non esiste segnalazione di casi in età pediatrica o adolescenziale. (18)

Il sesso femminile è notevolmente più colpito rispetto a quello maschile, con un rapporto stimato mediamente intorno a 3:1. Colpisce prevalentemente le donne in età peri e post-menopausale con una percentuale del 14% secondo Ferguson et al. e del 26% secondo Van der Wall. Wardrop et al.

La prevalenza dei sintomi orali è più alta nelle donne in peri- e post-menopausa (43%) piuttosto che nelle donne in pre-menopausa (6%). (19)

### **Ipotesi Etiopatogenetiche e Nuovi Approcci in Letteratura**

Allo stato dell'arte, la letteratura internazionale considera principalmente tre ipotesi sull'etiopatogenesi della BMS: disordini psicologici; alterazioni ormonali e disordini del sistema nervoso.

1. **Disordini Psicologici** come ad esempio la depressione e l'ansietà possono avere un ruolo importante nella modulazione della percezione del dolore in quanto in grado di incrementare o diminuire la trasmissione nervosa dai recettori dolorifici periferici e modificare la percezione dolorifica riducendo la soglia del dolore o causando un'alterazione significativa della sensazione dell'intensità del dolore. E'ragionevole associare la BMS con i

disordini psicologici in quanto riconoscono caratteri comuni come le sensazioni spiacevoli, il dolore cronico e l'assenza di disordini organici manifesti in grado di giustificare il quadro sintomatologico. La descrizione classica dei quadri di depressione e ansietà sono concomitanti con il quadro di BMS per cui è deducibile un'associazione tra di essi. In aggiunta e comprova a ciò, è stato evidenziato che i pazienti affetti da BMS hanno avuto risultati positivi e miglioramento della sintomatologia urente in seguito ad una terapia cognitivo-comportamentale e all'assunzione di farmaci antidepressivi.

2. **Alterazioni Ormonali:** La prevalenza della BMS è maggiore in donne in climaterio o in menopausa, fasi della vita per cui si assiste ad un forte cambiamento ormonale determinato dalla diminuzione del livello di estrogeni e progestinici che determinano, tra i tanti effetti, secchezza delle membrane mucosali e considerevoli disturbi psicologici. Inoltre, è stata evidenziata una predisposizione di donne in menopausa a sviluppare la BMS. Tale ipotesi sembrerebbe giustificare i buoni risultati ottenuti da donne affette da BMS in seguito a terapia ormonale a base di estrogeni che hanno riscontrato una diminuzione netta della xerostomia e del sintomo bruciore. Recentemente, è stata proposta un'ipotesi molto interessante che ipotizza che BMS sia associata ad un'alterazione dei livelli di steroidi gonadici neuroattivi del surrene. Woda et al. hanno suggerito che l'ansia cronica possa risultare in una disregolazione degli steroidi surrenali, da cui si evince una riduzione di steroidi surrenali, che, a sua volta, conduce a una alterata produzione di steroidi neuroattivi su pelle, mucose e sistema

nervoso (20,21) . Il rapporto con la menopausa sarebbe ulteriormente suggerito poiché la drastica riduzione degli steroidi gonadici che si verifica in menopausa determinerebbe un'ulteriore alterazione nella produzione di steroidi neuroattivi. Questa "perfect storm" produrrebbe alterazioni neurodegenerative nelle piccole fibre nervose e nelle aree del cervello legate alla sensazione somatica. Così si spiegherebbero i cambiamenti periferici e centrali già dimostrato in questa condizione. (23-26).

**3. Disordini del Sistema Nervoso:** La presenza di alterazioni sensoriali, come cambiamenti nella tolleranza al calore, riduzione o alterazione del gusto aumento del blink reflex in pazienti con BMS pongono attenzione sulla possibilità che esista di una base biologica associata ad alterazioni sia della sistema nervoso centrale che periferico. Allo stato attuale, la BMS è considerata come una condizione dolorosa determinata da meccanismi neuropatici. I pazienti con diagnosi di BMS presentano sintomi che sono caratteristici dei disturbi del nervo trigemino (Alterazioni nella percezione del dolore e nella trasmissione neuronale, e una maggiore eccitabilità del sistema vascolare trigeminale), suggerendo la possibilità che, mentre la BMS presenti una eziologia multifattoriale con una base patogenetica di tipo neuropatico. Studi Immunoistochimici hanno mostrato la presenza di alterazioni nelle fibre nervose di piccolo diametro (fibre C) nei pazienti con BMS. Tuttavia, altri studi hanno evidenziato altre alterazioni anatomiche. In effetti, alcuni pazienti mostrano segni di neuropatia che colpisce sia fibre nervose di piccolo e grande calibro. Pertanto, può essere postulato che la BMS possa

essere una conseguenza sia di alterazioni che disturbi generalizzati a diversi livelli del sistema trigeminale. L'esistenza di un aumento del blink reflex in alcuni pazienti affetti da BMS suggerisce una alterazione del sistema nervoso centrale correlato ad una disfunzione del sistema dopaminergico.

La diminuita inibizione presinaptica dopaminergica dovrebbe aumentare il rilascio di dopamina nello spazio interneuronali, con una maggiore eccitabilità dei neuroni che si manifesta come un aumento del blink reflex. La disfunzione dopaminergica del sistema è stata confermata nei pazienti con BMS sulla valutazione della funzione dopaminergica nel tronco cerebrale di questi pazienti, ove è stato osservata una diminuzione dei livelli di dopamina endogena nel putamen. Le alterazioni alla base sintomi di dolore cronico può derivare da cambiamenti nella funzione del sistema nervoso centrale. Iperstimolazione dell'acido N-metil-D-aspartico (NMDA) di i neuroni del tronco dorsale può portare a neuroplasticità e fenomeni secondari di ipereccitazione di questi neuroni. La neuroplasticità si verifica quando un neurone riceve continuamente segnali nocicettivi che producono l'attivazione del recettore NMDA dei neuroni contigui dando luogo a fenomeni di maggiore sensibilità delle cellule.

Come risultato di tale sensibilizzazione dei neuroni, comuni stimoli normalmente interpretati come innocui (come ad esempio l'irritazione prodotta dalla protesi) vengono reinterpretate da parte del sistema nervoso centrale in maniera errata e collocate ad un

livello alterato della soglia del dolore e quindi uno stimolo poco consistente viene percepito come uno stimolo di natura nociva. Allo stesso modo, lo stress prolungato nei portatori di protesi induce continui movimenti involontari della lingua, questo a sua volta generatrice costante di stimolazione sensoriale in grado di innescare sensazioni di dolore a seguito di iperstimolazione, come riscontrato in alcuni casi di BMS. È stato anche suggerito che la BMS possa derivare da alterazioni neurologiche a periferico di livello. Tali alterazioni periferiche potrebbe essere correlate alla densità e/o alla funzionalità dei recettori di membrana presente nella mucosa orale. (27)

Tale ipotesi è supportata dagli effetti osservati localmente sui recettori del clonazepam della mucosa orale che, fino ad oggi, è il trattamento più efficace per i sintomi di BMS.

Il ruolo dei neuropeptidi è degno di menzione rispetto al loro ruolo sul trofismo dei tessuti periferici. Tale sistema presenterebbe un meccanismo tonico verso i normali stimoli sensoriali da cui deriva la produzione di un continuo deflusso di trasmettitori sensoriali la cui azione sarebbe il mantenimento dell'integrità del tessuto (28).

È importante rilevare come i segnali nocicettivi dalla periferia possano essere amplificati o diminuiti durante l'elaborazione spinale, con conseguente sensibilizzazione o desensibilizzazione centrale.

La stimolazione della capsaicina sulle fibre sensitive (SP, CGRP) induce, da un lato, un segnale ortodromico nocivo-sensoriale indirizzato verso aree corticali, e, dall'altro, un riflesso asso-assonico sulle fibre sensoriali

primaria che in maniera antidromica determina il rilascio di neurotrasmettitori dalle terminazioni periferiche che evocano una serie di modificazioni del substrato periferico (infiammazione neurogena, secrezione ghiandolare, contrazione della muscolatura liscia).

Alla luce di ciò, è stato affermato che i neurotrasmettitori sensibili alla capsaicina siano implicati nella fisiopatologia di reazioni locali che accompagnano condizioni algiche.

I neuropeptidi capsaicina-sensibili (SP, CGRP) hanno proprietà uniche per cui gli impulsi possono viaggiare sia in senso ortodromico che antidromico: pertanto i neuropeptidi possono essere rilasciati dalle terminazioni neuronali centrali e periferiche. Un certo numero di neuropeptidi esercitano un effetto biologico che può giocare un ruolo nella presentazione clinica della BMS. La sostanza P (SP), la neurochinina A (NKA) e il peptide correlato al gene della calcitonina (CGRP), per esempio hanno tutti effetti vasodilatatori e gli ultimi due hanno un ruolo diretto sul dolore. Inoltre, tali neuropeptidi hanno destato interesse per il loro ruolo nell'insorgenza del sintomo dolore nella fibromialgia e nei disturbi temporomandibolari (29).

Il loro ruolo nella manifestazione clinica della BMS è ancora da accertare.

### **Diagnosi**

L'approccio diagnostico nei confronti dei pazienti con BMS risulta complesso. La problematica diagnostica di tale patologia riguarda l'aspetto dell'assenza di obiettività. La diagnosi sarà pertanto una "diagnosi di esclusione". In tale incertezza diagnostica, purtroppo, si crea un aumento dello stato d'ansia del paziente che, in alcuni casi, determina un peggioramento della sintomatologia.



Il protocollo diagnostico comprende: indagine anamnestici, esame obiettivo locale, esame di laboratorio e valutazione degli aspetti psicologici.

Il primo step diagnostico è rappresentato da una scrupolosa anamnesi medica e familiare, con particolare riguardo ai farmaci assunti, al tipo di alimentazione, all'abitudine al fumo e all'assunzione di sostanze alcoliche, e un'anamnesi patologica prossima e remota, con particolare riferimento alle patologie carenziali dismetaboliche, neurologiche e alle possibili cause di polineuropatia ma anche un'indagine volta con estrema delicatezza che indaghi lo stato d'animo del paziente e se si sono verificati eventi infausti o l'insorgere di depressione a causa di forti stress emotivi poco prima dell'insorgenza del sintomo bruciore. Approntare una corretta anamnesi familiare, patologica prossima e remota risulta di fondamentale importanza per individuare eventuali patologie sistemiche che possono causare i sintomi della BMS.

E' necessario conoscere la natura e le caratteristiche del disturbo: la storia clinica del sintomo bruciore deve essere indagata con particolare attenzione riguardo a epoca di comparsa, durata, sede, andamento nel corso della giornata, associazione con altri sintomi orali, intensità, fattori esacerbanti e attenuanti la sintomatologia, associazione temporale con possibili fattori causali quali assunzione di determinati cibi o farmaci, trattamenti odontoiatrici.

In sede di anamnesi è necessario sempre accertarsi che il paziente non stia assumendo medicinali capaci di indurre xerostomia e/o bruciore orale, e non sia sottoposto a pregresse terapie radianti. Il bruciore del cavo orale e la secchezza delle fauci rappresentano effetti collaterali abbastanza frequenti dopo l'assunzione prolungata di farmaci quali: anticolinergici, antistaminici,

sedativi, ipnotici, antipertensivi e antidepressivi triciclici. All'anamnesi segue l'esame obiettivo intra- ed extraorale, che deve essere estremamente accurato e volto a escludere la presenza di alterazioni o lesioni patologiche a carico delle mucose, correlabili o meno a patologie sistemiche; deve, inoltre, comprendere l'osservazione di eventuali abitudini parafunzionali o di movimenti ripetitivi della lingua, alterata postura della lingua (tongue thrusting), delle labbra e della fonasi, morsicatio buccarum o la presenza di protesi incongrue; esaminare l'eventuale presenza di alterazioni occlusali, ristretto spazio per la lingua, difetti di polimerizzazione della resina, non corretta rifinitura dei bordi e delle basi mucose di appoggio. L' esame obiettivo del cavo orale verrà eventualmente completato da esami di laboratorio quali: esame microbiologico colturale (per la ricerca della Candida), test allergologici cutanei in pazienti con anamnesi positiva (per valutare eventuali fenomeni di intolleranza/allergia), biopsia (per una valutazione istologica del tessuto, come per esempio nel caso di sospetto di lichen planus) e infine analisi della saliva. Tutto ciò al fine di escludere eventuali manifestazioni patologiche locali responsabili della sintomatologia urente. E' importante indagare anche la funzionalità delle ghiandole salivare a tale scopo bisogna valutare la saliva totale basale e stimolata, la saliva parotidea basale e stimolata, l'analisi chimica della saliva (elettroliti, Ig.proteine) e la biopsia della mucosa labiale; gli studi clinici hanno dimostrato che due domande possono essere molto utili per la determinazione della differenza tra la presenza di senso di secchezza o di bruciore. Dapprima si chiede al paziente se sente la bocca secca, in seguito si chiede se la secchezza ed il bruciore sono la stessa cosa. Se il paziente risponde di sì ad entrambe le

domande, allora facilmente si può chiedere se il semplice bere dell'acqua toglie entrambe le sensazioni di secchezza e di bruciore. Se le mucose orali sono clinicamente normali, pur considerando le modificazioni età-dipendenti, si può sospettare che il sintomo bruciore sia dovuto a stati carenziali oppure a patologie sistemiche misconosciute dal paziente. E' indispensabile, a questo punto, fare una valutazione medica generale del paziente attraverso gli esami di laboratorio e/o strumentali.

Gli esami di laboratorio comprendono:emocromo con formula leucocitaria Glicemia,azotemia,VES,Sideremia,Ferritina, indice di saturazione della transferrina,transaminasi,ricerca sierologia per anticorpi dell' epatite B e C, dosaggio della vitamina B12,folati sierici,immunoglobuline sieriche, frazioni del complemento C3 e C4.

Gli esami di laboratorio rappresentano un dato clinico fondamentale per poter ricercare eventuali patologie organiche (diabete, anemie, epatopatie, deficit vitaminici ecc.) in grado di causare una sintomatologia urente al cavo orale.

La raccolta dei dati anamnestici, associata a esami ematologici e immunologici, il più possibile completi, dovrà escludere l' esistenza di patologie sistemiche o stati carenziali responsabili del bruciore orale. Nel caso di dubbio diagnostico circa l' eventuale origine odontogena della sintomatologia orale possono essere effettuate ortopantomografia o radiografie endorali, oppure si possono effettuare consulenze neurologiche per escludere forme nevralgiche o lesioni a carico dei nervi cranici. L'assenza di dati anamnestici significativi, di lesioni morfologiche e strutturali delle mucose, di alterazioni ematochimiche e di positività nei valori degli esami di laboratorio e

strumentali, nonché la persistenza della sintomatologia dopo il trattamento o la correzione delle condizioni locali e/o sistemiche predisponenti, depone per la diagnosi di BMS. Il passo successivo sarà l'informazione del paziente circa la natura del proprio disturbo, indagando allo stesso tempo sulla presenza di possibili fattori predisponenti di tipo psicologico. Quando non sia possibile stabilire una causa organica locale e/o sistemica, deve essere considerata la possibilità di un'origine psicosomatica della sindrome. L'analisi psicologica del soggetto non va mai sottovalutata e occorre pertanto inviare il paziente a uno specialista quando se ne ravvisi la necessità. Poiché la BMS, come già ribadito, presenta una notevole componente psicologica (ansietà, cancerofobia), un appropriato approccio con il paziente rappresenta talvolta la terapia migliore al fine di rassicurare il paziente stesso sulla natura assolutamente benigna del problema e di eliminare lo stato di paura che un disturbo di questo tipo comporta. L'assenza di lesioni e/o alterazioni strutturali a carico delle mucose orali è una caratteristica importante, in quanto il bruciore orale può essere sintomo di altre patologie stomatologiche, ma anche sistemiche, nelle quali, tuttavia, coesiste un quadro clinico ed eziologico ben definito. E', quindi, indispensabile porre una corretta diagnosi differenziale al fine di escludere che la sintomatologia bruciante riferita dal paziente non sia attribuibile a una patologia o causa di diversa origine. La corretta raccolta anamnestica associata ad un esame critico delle mucose, sono sufficienti per la diagnosi. Devono essere presi in considerazione dettagli come: qualità, intensità, inizio, persistenza eventuale evoluzione e siti di insorgenza. Da quanto sopra esposto

si può concludere che i passaggi fondamentali per la diagnosi di BMS sono così schematizzati:

- 1) Esame obiettivo del cavo orale
- 2) Valutazione della capacità gustativa
- 3) Analisi scialochimica/an. Scialometrica:
- 5) Livelli ematici di glucosio
- 6) Livelli estro-progestinici
- 7) Disturbi psicologici

L'esame clinico intraorale serve per valutare se sono presenti parafunzioni o abitudini viziate: se sono presenti si può parlare di sintomi da parafunzione. Poi si fa l'analisi scialochimica e scialometrica: se ci sono delle modificazioni salivari si parla di sintomi da modificazioni salivari. Si può affermare che l'analisi della saliva e del gusto possono essere dei criteri che permettono di distinguere i soggetti sani da quelli con BMS. Poi si analizza lo stato nutrizionale attraverso gli esami ematici e se ci sono deficit nutrizionali si può parlare di lesioni sintomatiche da esiti carenziali. Dai livelli di glucosio ematico si può evincere se siamo di fronte a sintomi in presenza di diabete. Dai livelli di estro-progestinici possiamo evincere se il soggetto è in menopausa o no. Alla fine di tale percorso se non si evince nulla di rilevante possiamo arrivare alla diagnosi di BMS per esclusione di tutta quella serie di fattori locali e sistemici che possono portare bruciore orale. (30-34)

### **Terapia**

Le vie terapeutiche finora battute sono di tipo diverso e investono una vasta scala di farmaci. L'acido alfa lipoico è dato buoni risultati nella riduzione del

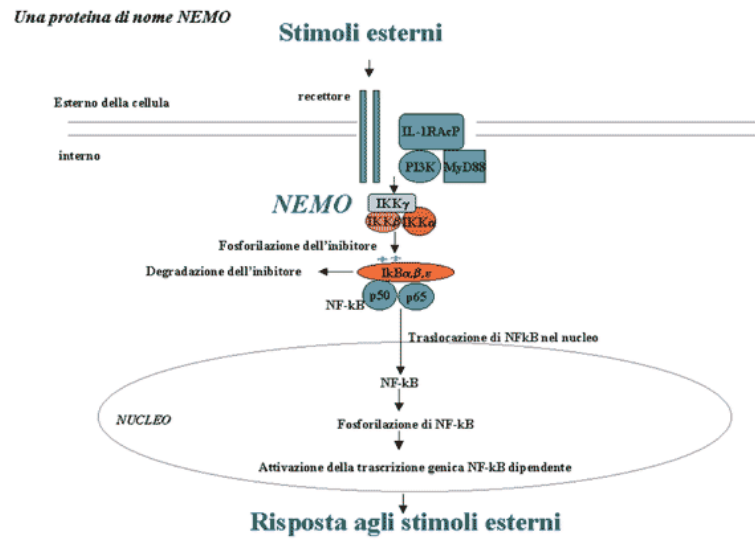
sintomo bruciore in particolare se combinato a terapia cognitivo-comportamentale. (35,36). Recentemente questo acido è stato utilizzato insieme al Gabapentin con risultati assai positivi. (37). L'utilizzo di anticonvulsivanti è largamente utilizzato nei disordini neuropatici ed ha avuto risultati positivi nella BMS (38).L'utilizzo di clonazepam e oxcarbamazepine sembra essere promettente e in questo tipo di terapie il baclofen può essere un buon adiuvante ma vanno tenuti in considerazione gli effetti avversi di questo tipo di farmaci (39) La somministrazione di capsaicina sistemica diminuisce il dolore presenta un'elevata incidenza di effetti avversi in particolare dolore gastrico intenso.

L'utilizzo topico di ormoni steroidei e antinfiammatori in forma di collutori ha effetti ridotti ma nel tempo sembrano eliminare completamente o sintomi della BMS e necessitano di una maggiore sperimentazione.

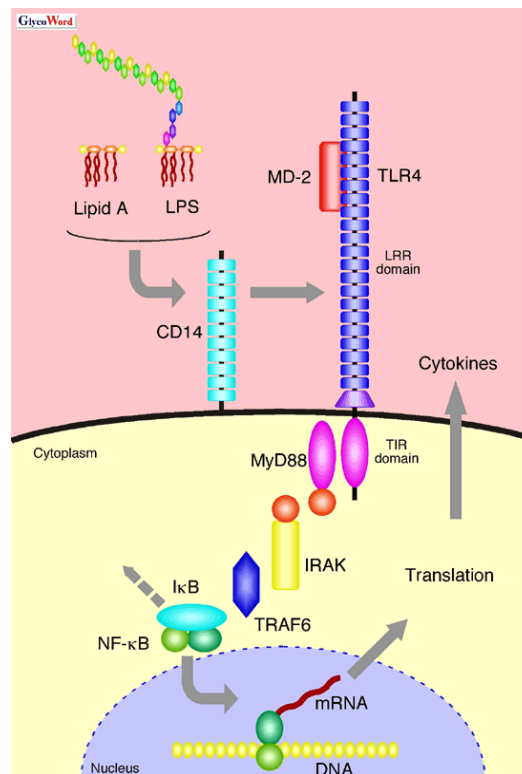
Di ultima sperimentazione, è l'utilizzo di amine tricicliche ed inibitori selettivi del reuptake della serotonina ma questa terapia è poco supportata da controlli sperimentali. La terapia di riequilibrio ormonale ha dato buoni risultati su pazienti in menopausa ma non sarebbe una terapia utile in soggetti di sesso maschile che seppure in misura maggiore presentano comunque i sintomi della BMS.(40-43)

## **1.2 NF- $\kappa$ B come Target di Trattamento Farmacologico**

Il Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) è un fattore di trascrizione ubiquitario conservato nelle cellule eucariotiche. NF- $\kappa$ B è attivato da numerosi stimoli compresi prodotti virali e batterici, radiazioni ultraviolette, radicali ossidanti, citochine, sostanze chimiche varie. Una volta attivato, NF- $\kappa$ B controlla direttamente, o con la cooperazione di altri fattori di trascrizione, l'attività di oltre 100 geni che generano citochine, fattori di crescita, chemochine, molecole di adesione, proteine della fase acuta. Tali stimoli cattivano il complesso chinasi I $\kappa$ k che in genere rende inefficace NF- $\kappa$ B. Tale complesso funziona legando un gruppo fosfato all'inibitore I $\kappa$ B, che di conseguenza viene prontamente degradato dalla cellula liberando quindi NF- $\kappa$ B. Il fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B, svincolato dal controllo negativo, è libero di trasferirsi nel nucleo dove va ad attivare i geni necessari alla cellula per la risposta allo stimolo infiammatorio



**Fig.1** Schema riassuntivo processo infiammatorio NF- $\kappa$ B mediato<sup>1</sup>



**Fig. 2** Schema riassuntivo processo infiammatorio NF- $\kappa$ B mediato<sup>2</sup>

<sup>1</sup> M. D'URSO, T. BARDARO : "UNA DIAGNOSI MOLECOLARE PER L'INCONTINENTIA PIGMENTI" - [HTTP://WWW.FI.CNR.IT/R&F/N20/D'URSO.HTM](http://www.fi.cnr.it/R&F/N20/D'URSO.HTM)



La prolungata attivazione di NF-κB può causare gravi condizioni infiammatorie e persino la morte da eccessiva produzione di citochine, pertanto è essenziale non solo che NF-κB sia rapidamente attivato nel corso delle infezioni, ma anche che la sua attivazione abbia rapidamente termine subito dopo che lo stimolo infiammatorio/infettivo sia stato allontanato. All'interno delle cellule vi sono, per tale ragione, meccanismi di controllo che ne limitano l'attivazione.

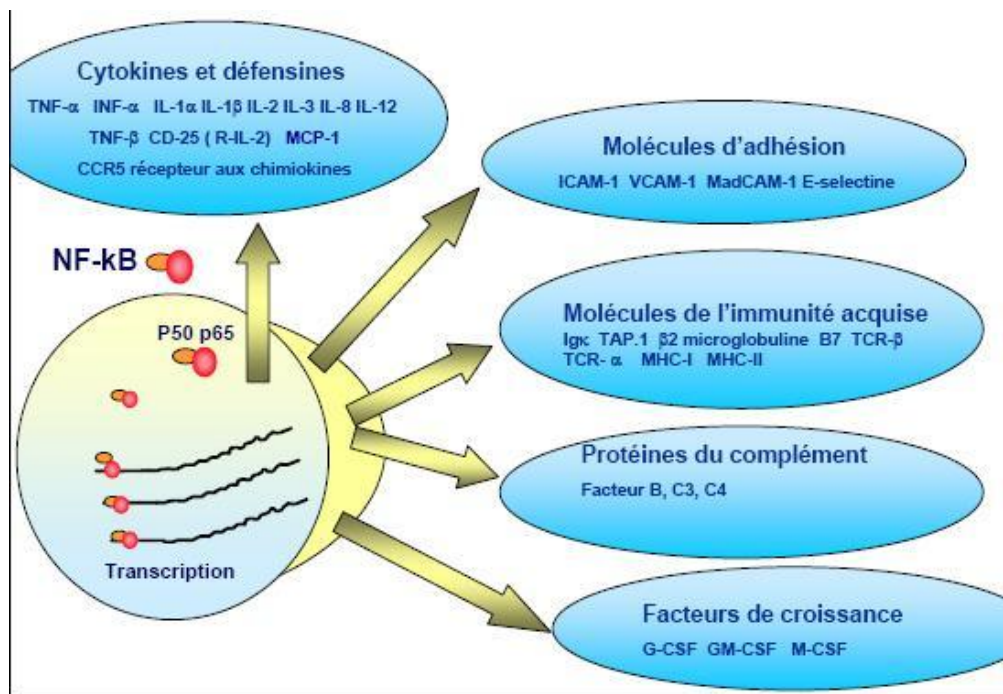


Fig.3 Schema riassuntivo processo infiammatorio NF-κB mediato<sup>3</sup>

Esempi di molecole regolate da NF-κB: **IL-1**; **TNF-α**; **IL-6**; **IL-8**;

**Interferone β**.

<sup>2</sup> [www.vialattea.net](http://www.vialattea.net)

<sup>3</sup> [www.vialattea.net](http://www.vialattea.net)

E' stata valutata la capacità di alcuni farmaci anti-infiammatori (quale il **desametasone** come prototipo degli anti-infiammatori steroidei, l'**indometacina** come COX-inibitore non selettivo, e il **rofecoxib** come inibitore selettivo di COX2), di modulare l'attivazione del fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B e la liberazione di TNF- $\alpha$  da monociti umani stimolati con LPS o PMA.

Valutando l'attivazione di NF- $\kappa$ B (metodica EMSA e kit ELISA per le differenti subunità del fattore di trascrizione), è stato dimostrato che il desametasone e il rofecoxib inibiscono potentemente l'attivazione di NF- $\kappa$ B indotta sia da PMA che da LPS, mentre l'indometacina è molto meno attiva e non modifica l'attivazione indotta da LPS. Queste osservazioni contribuiscono a determinare meglio l'efficacia terapeutica di farmaci anti-infiammatori

Il fattore trascrizionale NF- $\kappa$ B è stato implicato nelle patogenesi di malattie infiammatorie croniche del sistema vascolare e nel processo di formazione di lesioni aterosclerotiche. NF- $\kappa$ B nello stato attivato è stato identificato in situ in placche aterosclerotiche umane, mentre è assente in vasi esenti da lesioni aterosclerotiche. Inoltre, molti geni i cui prodotti sono coinvolti nella patogenesi del processo aterosclerotico sono regolati da NF- $\kappa$ B. Tra questi, quelli di maggiore rilevanza sono le molecole di adesione VCAM-1, ICAM-1 e E-selectine, e le chemochine MCP-1 e IL-8, che hanno un ruolo importante nel reclutare monociti circolanti sull'endotelio dei vasi.

Altri prodotti di geni target di NF- $\kappa$ B, tra cui la ciclina D1 e le proteine anti-apoptotiche cIAP-1, cIAP-2, XIAP e cFLIP, possono stimolare la

proliferazione cellulare o indurre sopravvivenza in cellule nel sito di formazione della lesione.

E' interessante notare che in condizioni di stimolazione normale NF- $\kappa$ B attiva anche la trascrizione del gene per la sua proteina inibitoria, I $\kappa$ B $\alpha$ , aumentando quindi i livelli intracellulari di questa proteina ed instaurando un "loop" autoregolatorio che inibisce la trascrizione dei geni NF- $\kappa$ B -dipendenti.

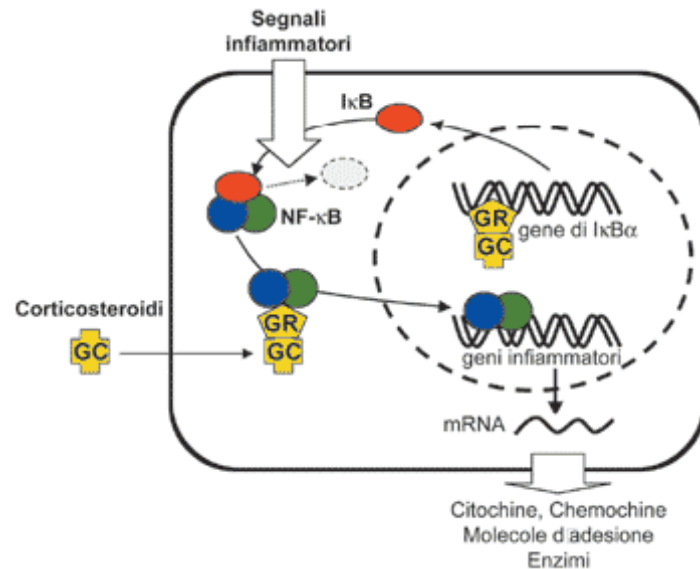
Il sistema di autoregolazione NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  garantisce quindi l'attivazione transiente di NF- $\kappa$ B in una situazione fisiologica. E' stato recentemente suggerito che un'attivazione non regolata di NF- $\kappa$ B contribuisca al cambiamento del pattern di espressione genica che si evidenzia in situazioni patologiche e durante l'aterogenesi. Recentemente è stato dimostrato che l' **infezione da HSV-1** è in grado di attivare NF- $\kappa$ B in maniera persistente ed a livelli più elevati di quelli ottenuti in seguito ad esposizione a citochine infiammatorie in vari tipi di cellule umane. La permanenza di NF- $\kappa$ B in uno stato attivato legante il DNA per oltre 24 ore dopo l'infezione suggerisce che il virus interferisca con il sistema autoregolatorio di NF- $\kappa$ B, con conseguente esacerbazione dello stato infiammatorio.

Il virus HSV-1 e' in grado di stimolare la chinasi IKK ed indurre l'attivazione di NF- $\kappa$ B a livelli elevati anche in cellule endoteliali umane.

Risultati analoghi sono stati ottenuti in seguito ad infezione di cellule endoteliali con i virus erpetici HHV-6 e HHV-8.

Nel caso di HSV-1, l'attivazione di NF- $\kappa$ B appare essere associata ad un aumento dei livelli di trascritti per le citochine pro-infiammatorie IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ , e per alcune molecole di adesione. Questi risultati preliminari

suggeriscono la possibilità che l'induzione di NF- $\kappa$ B sia coinvolta nell'attivazione di processi infiammatori associati all'infezione da Herpesvirus. NF- $\kappa$ B potrebbe quindi rappresentare un interessante bersaglio per nuovi chemioterapici con azione antivirale ed anti-infiammatoria nelle infezioni erpetiche.



**Fig.4** Meccanismi attraverso i quali i Glucocorticoidi bloccano l'attivazione di NF- $\kappa$ B.<sup>4</sup>

La maggior parte delle azioni antinfiammatorie dei glucocorticoidi (GC) dipendono dalla capacità di interferire con le funzioni di fattori di trascrizione, tra i quali è rilevante NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B è normalmente presente nel citoplasma inattivo, in quanto legato ad un inibitore (I $\kappa$ B). Diversi stimoli pro-infiammatori inducono attivazione di enzimi (I $\kappa$ B chinasi) che fosforilano I $\kappa$ B. I $\kappa$ B fosforilato lega residui di ubiquitina che lo indirizzano verso i proteosomi dove viene degradato, e quindi libera NF- $\kappa$ B, il quale può traslocare nel nucleo

<sup>4</sup> [www.eczematopico.it](http://www.eczematopico.it)

e legarsi alle regioni consenso di una varietà di geni implicati nelle risposte infiammatorie e immunitarie. I GC penetrano liberamente nel citoplasma dove legano un recettore (GR) attivandolo. Il complesso GC-GR interagisce con NF- $\kappa$ B trattenendolo nel citoplasma. Inoltre, GC-GR induce la sintesi di I $\kappa$ B, che prodotto in eccesso inattiva NF- $\kappa$ B. Infine GR attivato compete con NF- $\kappa$ B per la disponibilità di coattivatori.

Il GR attivato può legare le sequenze GRE presenti nelle regioni promotrici di alcuni geni infiammatori, e quindi regolare direttamente la trascrizione genica. Questo è stato dimostrato tuttavia per un numero limitato di geni, per esempio per quello dell'IL-1 $\beta$ , in cui il legame di GC/GR con GRE inibisce direttamente la trascrizione della citochina. Tuttavia la maggior parte dell'azione anti-infiammatoria dei GC sembra essere dovuta alla loro capacità di interferire con le funzioni di altri fattori di trascrizione implicati nella trasduzione dei segnali infiammatori. Quando una cellula riceve un segnale pro-flogistico quali citochine (IL-1, TNF- $\alpha$ ), fattori batterici, prodotti dello stress ossidativo e radiazioni ultraviolette, vengono attivate una serie complessa di vie intracellulari di trasduzione del segnale che in ultima istanza conducono all'attivazione di fattori di trascrizione che a loro volta regolano l'espressione dei geni implicati nelle risposte infiammatorie e immunitarie.

Due famiglie di fattori di trascrizione hanno ricevuto particolare attenzione: AP-1 (activator protein 1) e NF- $\kappa$ B. AP-1 comprende una famiglia di eterodimeri di proteine Fos e Jun che vengono attivate per neosintesi o fosforilazione da una cascata di attività enzimatiche chinasiche.

NF- $\kappa$ B è un eterodimero o omodimero di proteine della famiglia Rel (la forma classica è formata da p65/RelA e p50), ed è normalmente inattivo nel citoplasma in quanto trattenuto da inibitori naturali noti come I $\kappa$ B (inhibitor of  $\kappa$ B), di cui si conoscono al momento tre membri (I $\kappa$ Ba, I $\kappa$ Bb, I $\kappa$ Be).

NF- $\kappa$ B divincolato da I $\kappa$ B è pertanto in grado di traslocare nel nucleo e legarsi alle regioni consenso dei geni. I GC bloccano l'attivazione di entrambi questi fattori di trascrizione. In particolare, GR attivato può legare AP-1 nel citoplasma, e quindi prevenirne la traslocazione nel nucleo e le funzioni transattivanti. I GC inibiscono pure l'attivazione della c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) un enzima chiave nell'attivazione per fosforilazione di c-Jun.

Un altro livello di interazione tra GR e AP-1 è nella disponibilità di co-attivatori, quali CBP (CREB-binding protein)/p300. Infatti, la sovraespressione di quest'ultimo previene l'antagonismo tra GR e AP-1.

I meccanismi attraverso i quali GR blocca le funzioni di NF- $\kappa$ B sono multipli e studiati più in dettaglio: in primo luogo, GR induce la trascrizione e sintesi di I $\kappa$ Ba, che a sua volta trattiene NF- $\kappa$ B nel citoplasma. Inoltre, il GR attivato lega direttamente NF- $\kappa$ B attivato imprigionandolo nel citoplasma. Infine, GR compete con NF- $\kappa$ B per la disponibilità dei co-attivatori CPB e SRC-1 (steroid receptor coactivator-1). Infine GR può anche modificare l'attività delle molecole STAT (signal transducer and activator of transcription), una serie di fattori di trascrizione implicati nella trasduzione dei segnali innescati da alcune citochine quali IFN-g, IL-4, IL-5 e IL-10.

È interessante ricordare che l'attività di questi fattori di trascrizione sembra essere alterata nei pazienti affetti da malattie atopiche. In particolare, i

cheratinociti di pazienti con dermatite atopica mostrano una maggiore attivazione di AP-1, un fenomeno che potrebbe rendere ragione dell'ipereattività flogistica della cute atopica.

I GC sono a tutt'oggi tra i più efficaci farmaci anti-infiammatori ed immunosoppressivi. I meccanismi attraverso i quali esercitano queste attività sono complessi e solo parzialmente conosciuti. È verosimile che una più completa delucidazione di questi meccanismi potrà permettere la preparazione di GC più efficaci e con minori effetti collaterali, cioè con un miglior indice terapeutico.

La scoperta, nel 1988, dell'esistenza di due forme distinte dell'enzima ciclo-ossigenasi ha cambiato drasticamente l'approccio allo sviluppo di nuovi FANS. La COX1 è stata identificata quale l'isoforma responsabile del mantenimento dell'omeostasi, mentre la COX2 l'isoforma inducibile principalmente coinvolta nella produzione di grandi quantità di prostaglandine in risposta a stimoli infiammatori e patologici. Danni tissutali, citochine, radicali liberi e danni ossidativi inducono l'attivazione del NF-κB, la cui azione determina aumento della sintesi di COX2 e quindi della produzione di alcune prostaglandine, con funzione proinfiammatoria. L'espressione della COX2 è stata legata, in alcuni stati infiammatori cronici (ad esempio dell'intestino, nell'uomo), alla mutazione del fenotipo e del genotipo cellulare, mediante l'attivazione di geni normalmente silenti e la repressione di geni normalmente espressi, predisponendo all'insorgenza di neoplasie. L'inibizione della COX2 e di NF-κB operata dai FANS ha dimostrato, in alcuni casi, benefici effetti antitumorali; è questo il caso di alcune neoplasie intestinali e della vescica.

Il risultato di queste recenti scoperte sulla COX2 è stato la sintesi di composti con azione prevalentemente COX2 inibitrice, teoricamente in grado di eliminare gli effetti negativi delle prostaglandine senza influenzarne la funzione di mantenimento dell'omeostasi. In realtà la COX2 contribuisce in modo significativo al controllo della perfusione renale e anche della secrezione gastrica, oltre che modulare la coagulazione.

La COX1, d'altra parte, è coinvolta nella sensibilizzazione periferica e nella percezione del dolore a livello centrale, oltre che nel mantenimento dell'omeostasi. Farmaci COX2 selettivi hanno il vantaggio, almeno dal punto di vista teorico, di non diminuire l'aggregazione piastrinica e di causare minori effetti collaterali gastroenterici in caso di somministrazione cronica. In realtà, i dati disponibili dal loro uso in medicina umana e veterinaria hanno ridimensionato il profilo degli effetti collaterali di questi farmaci, rendendolo sostanzialmente simile a quello di altri FANS disponibili per quanto riguarda la gastrolesività. Mentre gli inibitori della COX1 causano una maggiore incidenza di ulcere, gli inibitori selettivi della COX2 sembrano rallentare il processo di guarigione della mucosa gastrica. Significativamente differente è, invece, il loro effetto sulla coagulazione in corso di terapia cronica, almeno negli esseri umani. È ben noto il significativo aumento di fenomeni ischemici su base tromboembolica in pazienti in terapia cronica con COX2 inibitori che ha portato al ritiro dal commercio di almeno un farmaco registrato per l'uso cronico negli esseri umani. Gli effetti renali delle due classi di farmaci sono sovrapponibili ed entrambi possono alterare la risposta autoregolatrice renale all'ipotensione.



Sulla base della letteratura disponibile in medicina veterinaria è difficile, pertanto, valutare la direzione in cui si muoverà il mercato negli anni futuri. Dal momento che non sempre è possibile traslare gli effetti desiderati ed indesiderati da una specie all'altra, è possibile che gli inibitori selettivi della COX2 possano riscuotere un notevole successo, soprattutto considerando l'ottimo profilo farmacologico e gli effetti analgesici di alcuni FANS già presenti in commercio. (44)

### **1.3 Materiali e Metodi**

Nella parte sperimentale della ricerca sono stati reclutati 20 pazienti. Il gruppo dei casi comprendeva 10 pazienti ( 2 maschi e 8 femmine,età compresa tra 40-63 anni; Mean±SD: 53.5±7.98) con diagnosi di BMS da più di un anno. Tutti pazienti reclutati nello studio erano non fumatori e non assumevano alcolici. All'esame obiettivo le mucose non presentavano alcuna lesione o alterazione. L'ultimo tampone orale è risultato negativo per cui vi era assenza di sovrainfezioni. Le valutazioni sulla scala di VAS oscillavano tra 1 e 2 mentre la valutazione sulla scala di Scoville tra 6 e 9. Diversi pazienti presentavano oscillazioni notevoli del sintomo bruciore nell'arco della giornata come discusso nella classificazione della BMS. Tutte le donne che si sono sottoposte al prelievo erano in menopausa e alcune avevano iniziato ad avere i sintomi della BMS in seguito a tale evento. Altri pazienti, invece, presentavano stati di ansietà e depressione in seguito ad eventi infausti o forte stress.

Per il gruppo controllo sono stati reclutati 10 soggetti (2 maschi e 8 femmine; età compresa tra 31-59 età; Mean±SD: 50±10.49). Tutti i soggetti erano non fumatori e non presentavano abitudini viziate. Non assumevano farmaci al momento del prelievo biotico e non presentavano alcuna patologia sistemica o lesione orale ed è stato appurato non presentassero sovrainfezioni.

Il sito prescelto per il prelievo biotico è stato il margine linguale, sito ove i pazienti riferivano maggiormente il bruciore.

Lo studio è stato effettuato in conformità rispetto la Dichiarazione di Helsinki ed è stato approvato dal Comitato Etico del Policlinico Paolo Giaccone di Palermo.

I pazienti ed i soggetti arruolati hanno firmato i consensi informati previsti dal protocollo.

### **Prelievo Bioptico**

I prelievi bioptici sono stati effettuati seguendo il protocollo standard della metodica Punch.

Dopo premedicazione del sito con lidocaina crema, è stata effettuata anestesia del sito con mepivacaina con vasocostrittore. Il prelievo è stato effettuato con bisturi punch con diametro di 4 mm. In seguito, considerando la vascolarizzazione del sito, sono stati applicati i punti di sutura e tranex.

Secondo quanto richiesto dal Biologo che ha effettuato i test sul frammento istologico, la mucosa orale prelevata è stata ridotta in frammenti più piccoli, subito dopo l'intervento e posta entro delle capsule NUNC da 0.5 ml a secco e immediatamente poste alla temperatura di -80°.

Durante il controllo a 7 giorni del sito, per la rimozione dei punti, non è stato riferito alcun effetto avverso nel post-operatorio.

## Sperimentazione

Per ricercare l'attività di Nfκ-b nei prelievi di mucosa orale linguale sono stati selezionati, in accordo con il biologo che si è occupato di effettuare i test, due kit di anticorpi:

- **NF-κB P65 (C22B4) Rabbit mAb**, prodotto da Cell Signaling Technology-Euroclone, un cross reactivity associato a metodica western blot.

**Background:** I fattori di trascrizione nel fattore nucleare κB (Nf- κB)/Rel family giocano un ruolo fondamentale nella risposta immune ed infiammatoria. Ci sono 5 famiglie nei mammiferi di questo tipo di fattori: RelA, c-Rel, RelB, Nf- κB1 (p105/p50) e Nf-κB2 (p100/p52). Sia p105 che p100 vengono proteoliticamente processate dai proteosomi per produrre rispettivamente p50 e p52. I prodotti p50 e p52 formano dimeri complessi con le proteine Rel che sono in grado di legare il DNA e regolarne la trascrizione. In cellule non stimolate, Nf-κB viene sequestrato nel citoplasma da proteine inibitorie, IκBs. Gli agenti attivanti Nf-κB possono indurre la fosforilazione di IκBs, indicandole per una rapida degradazione attraverso il pathway del proteosoma ubiquitario, rilasciando Nf-κB il quale entra nel nucleo, dove regola l'espressione genica. L'elaborazione di Nf-κB p100 è regolata da NIK e IKK1 (IKKα) che innesca la fosforilazione e elaborazione di p52, la quale può essere sottoposta a traslocazione nucleare.

**Specificità/Sensibilità:** Nf-κB p65 (C22B4) Rabbit mAb può identificare i livelli endogeni totali della proteina Nf-κB. **Fonte/Purificazione:** L'anticorpo monoclonale di coniglio è stato preparato da milza immunizzata di coniglio con un peptide sintetico (KLH-accoppiato)

corrispondenti ai residui prossimi alla terminazione amminica di Nf-κB umana.

- **Phototope-HRP Western Blot Detection System – Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody** prodotto da Cell Signaling Technology – Euroclone.

**Background:** Il sistema di rilevazione a mezzo di chemiluminescenza è emerso come il migliore tra i metodi di identificazione associate a Western Blot. Esso elimina i rischi nell'utilizzare materiali radioattivi e substrati cromogeni tossici. La velocità e la sensibilità di questi metodi sono senza eguali rispetto le alternative presenti in commercio. L'Horseradish peroxidase (HRP) coniugato ad anticorpo secondario sono utilizzati per coniugarsi con specifici substrati chemoluminescenti per generare segnali luminosi. Il Phototope-HRP Western Blot Detection System è stato designato come sistema di identificazione in chemoluminescenza applicata a Western Blot. Le proteine e i markers molecolari pesanti biotinilati vengono separate da SDS-PAGE e trasferite in membrane. In seguito a incubazione con anti-siero primario, HRP marca l'anticorpo secondario e HRP marcato con anticorpo anti.biotina vengono legate in modo da permettere la reazione con reagente LumiGLO. La luce emessa da reagente LumiGLO destabilizzato viene successivamente catturato con pellicola X-ray. Method Overview: Ci sono sei fasi basilari nella procedure di Western Blot associata a Phototope-HRP Western Blot Detection System: 1. *Elettroforesi proteica su gel di poliacrilamide:* Separare i campioni di proteine e standardizzare il peso molecolare mediante l'elettroforesi in gel di poliacrilamide; 2. *Transfer:* Trasferire le proteine in membrane mediante

l'elettroblotting; 3. *Bloccare la Membrana*: Bloccare i siti saturi non specifici sulla membrana; 4. *1°Anticorpo*: Incubare le membrane con l'anticorpo primario; 5. *2°Anticorpo*: Incubare la membrana con HRP-linked anti-rabbit IgG e HRP marcato con anticorpi anti-biotina.

6. *Chemoluminescenza*: Aggiungere il reagent LumiGLO e catturare le emissioni luminose su pellicola X-RAY.

Entrambi i Kit necessitavano di uno stoccaggio a -20°.

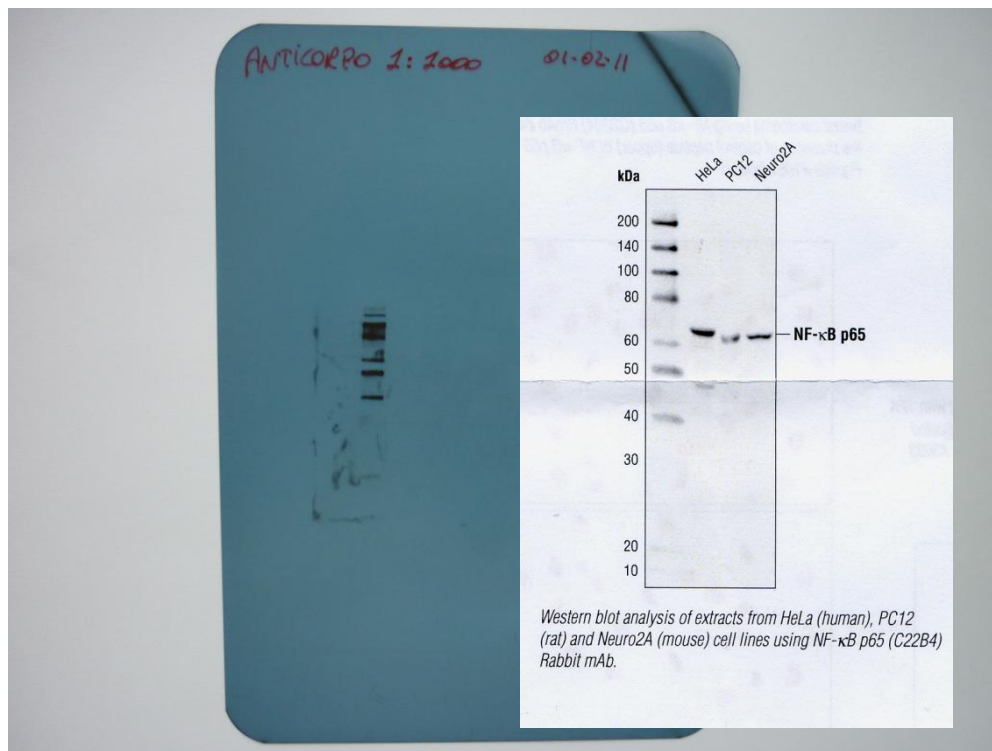
Gli esperti biologi che si sono incaricati della parte di laboratorio, dopo aver effettuato la curva proteica e le procedure previste dai kit, hanno effettuato una colorazione di Ponceau su membrana di Nitrocellulosa (60 Kda).

## **Risultati**

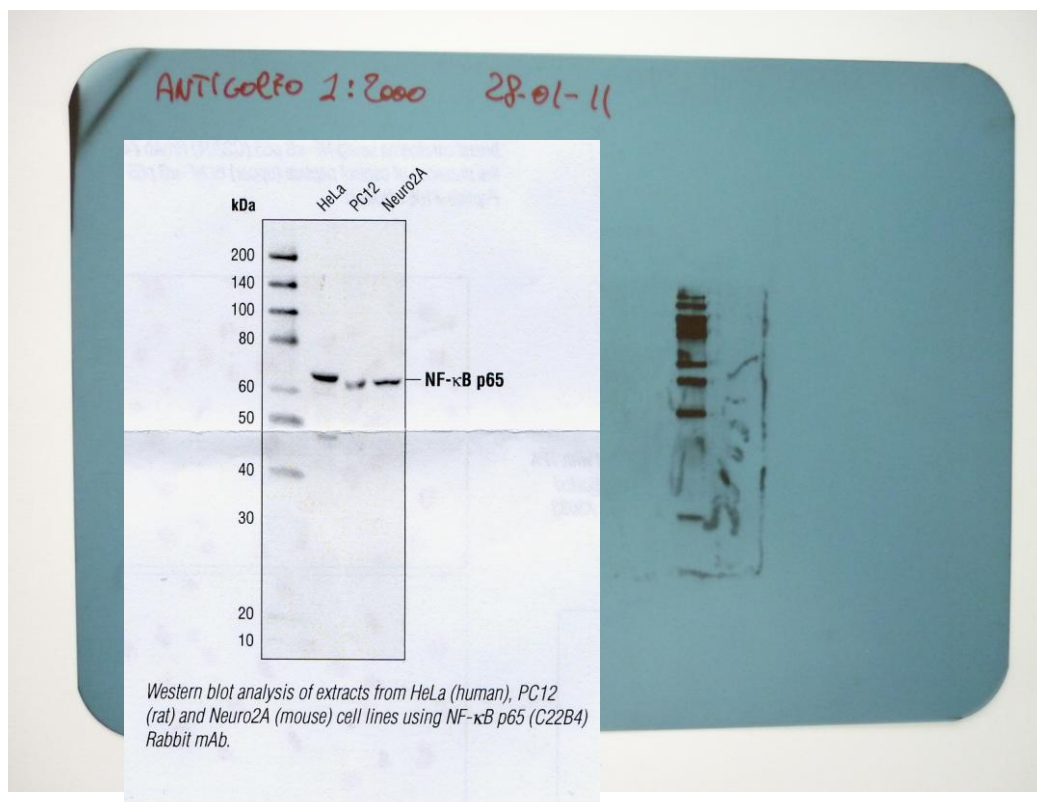
Gli esami di laboratorio effettuati non hanno mostrato alcuna attività di NF- $\kappa$ B su prelievi biotici di mucosa linguale umana. Dalla comparazione delle lastre non sono stati ottenuti i risultati previsti dal Kit adoperato per cui a destra del risultato dell'attività proteica visionabile nella lastra avremmo dovuto avere, qualora il complesso fosse stato attivo, bande dello stesso peso molecolare, che non sono state rilevate.

Per verificare l'analisi il test è stato ripetuto con anticorpo 1:1000, 1:2000, 1:2000 con proteina caricata a 50  $\mu$ g ed una prova con anticorpo  $\beta$ -actina.

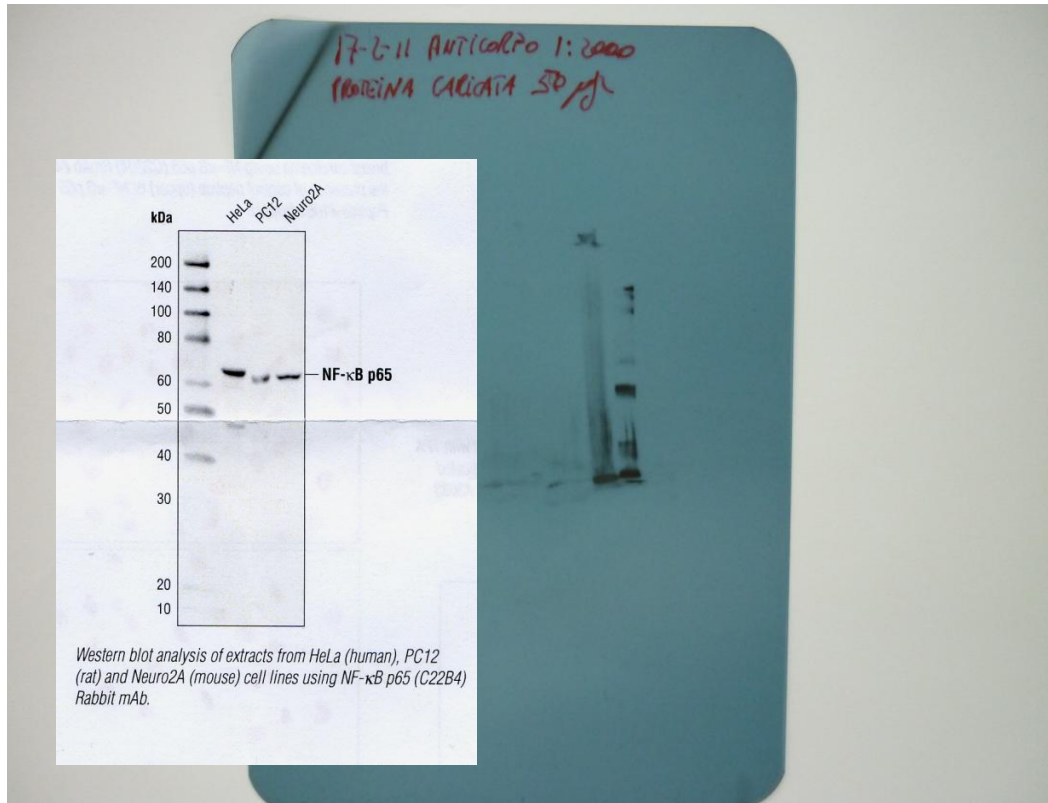
In tutti i casi il risultato è stato il medesimo per cui non è stato necessario procedere con ulteriori esami



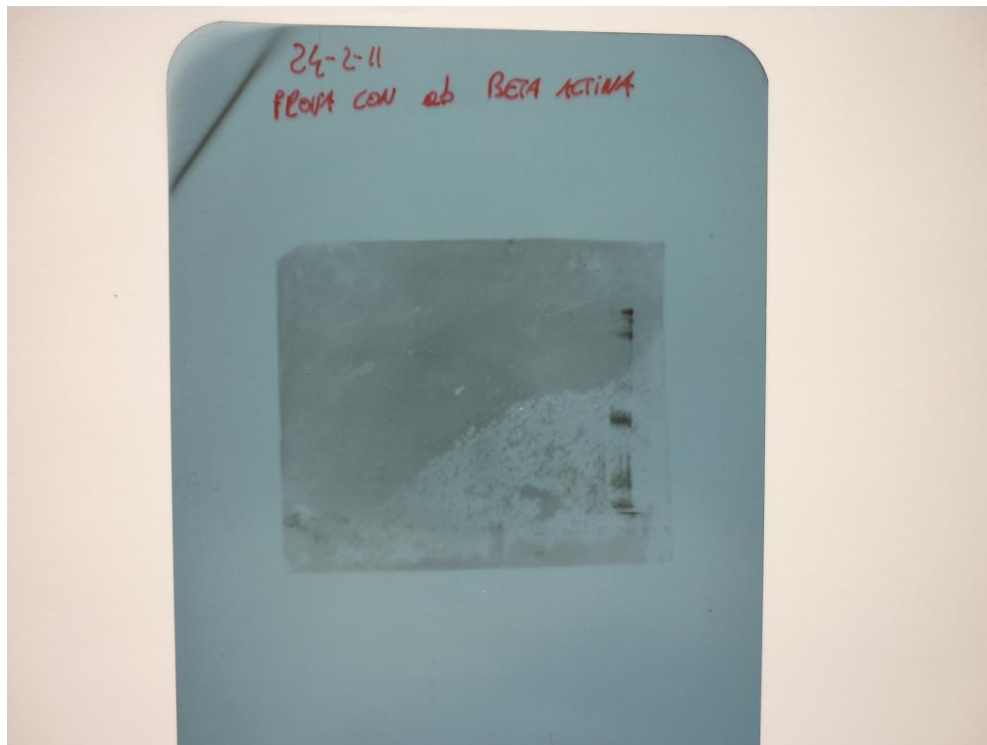
**Fig 5. Comparazione tra i risultati ottenuti (lastre) e test previsto dal Kit. Anticorpo 1:1000**



**Fig 6. Comparazione tra i risultati ottenuti (lastre) e test previsto dal Kit. Anticorpo 1:2000**



**Fig 7. Comparazione tra i risultati ottenuti (lastre) e test previsto dal Kit. Anticorpo 1:2000 e anticorpo caricato 50 µg.**



**Fig. Prova con ab  $\beta$ -actina.**



## Capitolo II

### **I Polimorfismi genici su prelievo ematico di paziente affetto da Burning Mouth Syndrome - studio preliminare**

#### **2.1 Polimorfismi genici**

Quando si parla di malattie complesse, da un punto di vista genetico si passa dal concetto di mutazione a quello di polimorfismo genico. La mutazione è un evento raro che causa la malattia anche se con possibili variazioni nell'espressione del fenotipo, con frequenze nelle popolazioni inferiori allo 0,05%. Si definisce polimorfismo genico, invece, una variazione genetica con una frequenza superiore all'1% nella popolazione. I polimorfismi genetici possono essere presenti all'interno di regioni codificanti (esoni) o non codificanti (introni) e possono essere determinati da sostituzioni, delezioni o inserzioni di singole basi o di sequenze di DNA. Viene stimato che ogni 300 nucleotidi si manifesti un polimorfismo, il più comune dei quali è associato alla mutazione di un singolo nucleotide (SNP) e circa l'1% di questi non sia silente, ma si traduca in variazioni fenotipiche. In particolare, gli SNPs possono essere responsabili di una modificazione (qualitativa o quantitativa) di proteine con una funzione nota che, se alterata, può spiegare la suscettibilità individuale verso lo sviluppo di una data patologia. Nel corso degli ultimi anni, la conoscenza del genoma umano ha ampliato enormemente le informazioni sul corredo genetico individuale. Abbiamo appreso come ogni persona dimostri il 99.9% di identità genetica rispetto ad una qualsiasi altra. Il restante 0.1% del

nostro DNA rappresenta la variabilità individuale, che è sostanzialmente dovuta alla presenza dei polimorfismi genetici.

Ad oggi, sono stati identificati circa 3 milioni di SNPs, ma si calcola che ve ne siano almeno 10 milioni. E' ormai riconosciuto che gruppi di queste piccole variazioni conferiscono una predisposizione o suscettibilità allo sviluppo della patologia, che, soprattutto, può manifestarsi in età precoce quando profili genetici a rischio "elevato" interagiscono con fattori ambientali o stili di vita considerati ad alto rischio.

Comunque, ancora oggi non sono completamente conosciuti i geni che determinano un aumentato rischio di malattia cardiaca ed è ancora indispensabile acquisire ulteriori informazioni prima di ottenere strumenti utilizzabili nella prassi clinica. Tuttavia, alcuni test genetici di rischio cardiovascolare sono già disponibili in molti laboratori di analisi. In questo campo, di particolare interesse sono le recenti conoscenze acquisite relative alle mutazioni pro trombotiche del Fattore V, del fattore II della coagulazione o protrombina, del gene della metilenetetraidrofolato reduttasi (MTHFR), ACE, PAI I, APO E, APO B, fattore XIII, HPA 1 e Beta Fibrinogeno.

Negli ultimi decenni, l'avvento di metodologie sempre più innovative nell'ambito della biologia molecolare, ha dato ai ricercatori la possibilità di manipolare in modo specifico il patrimonio genetico dell'uomo ai fini diagnostici ma anche per ricerca.

Lo sviluppo di nuove metodiche ha consentito l'isolamento di specifici frammenti di DNA mediante l'impiego di opportuni enzimi di restrizione, la loro replicazione in cellule batteriche, l'identificazione di sequenze geniche

con ibridazione molecolare e l'amplificazione di regioni di DNA con la reazione a catena della DNA polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR).

Inoltre, si è diffuso l'impiego di metodiche applicate all'analisi dei polimorfismi, dato il ruolo rilevante che il loro studio ha assunto in quest'ultimi anni nella valutazione della predisposizione a svariati stati patologici e la loro correlazione con i processi di variabilità genetica.

Ricordiamo che con il termine "polimorfismo", si fa riferimento ad una variazione del genoma rivelabile tra gli individui di una popolazione.

Si distinguono:

-SNP (single nucleotide polymorphism), in cui si ha la variazione di una singola base nella sequenza del DNA di alcuni individui della stessa specie.

-Regioni polimorfiche la cui variabilità è invece associata a corte sequenze ripetute in tandem:

- STR (short tandem repeat) o microsatellite se l'unità ripetuta è costituita da 1 a 4 paia basi (bp).
- VNTR (variable number of tandem repeat) o minisatellite se l'unità ripetuta è lunga qualche decina di bp.

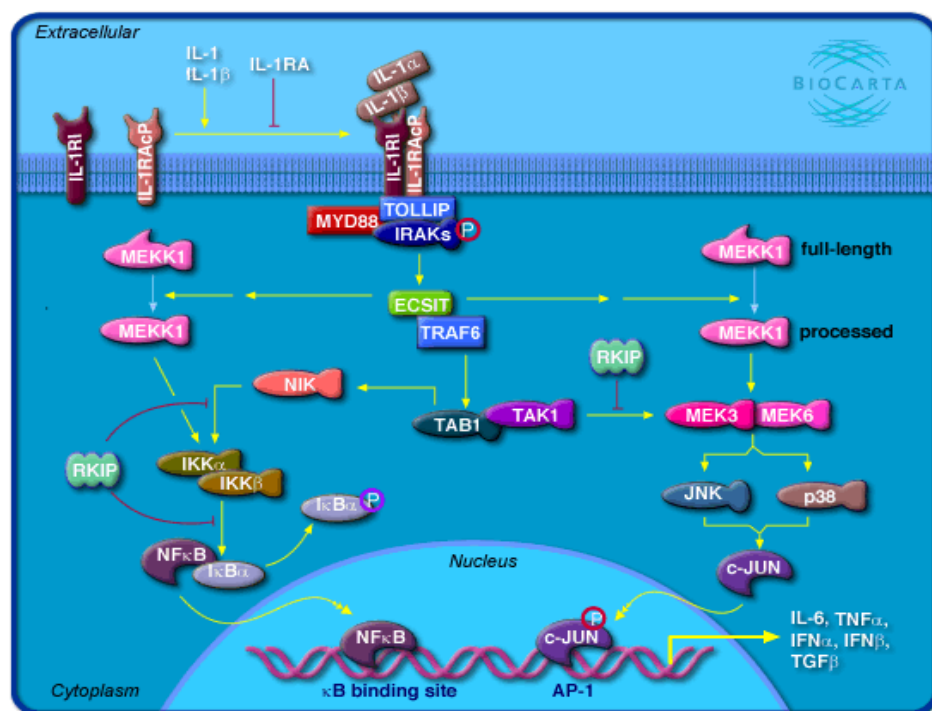
-RFLP (restriction fragment length polymorphism), cioè polimorfismo di lunghezza dei frammenti di DNA, ottenuto per taglio con enzimi di restrizione (Russell, Genetica 2004).

I prodotti del cluster genico IL-1, come tutte le altre citochine, sono fattori solubili, elaborati dalle cellule dell'immunità sia innata che acquisita. Le loro principali funzioni sono relative alla maturazione ed al funzionamento delle cellule effettrici del sistema immune, svolgono quindi le loro attività legando

specifici recettori sulle cellule bersaglio. Sono stati individuati due recettori di membrana per IL-1, entrambi appartenenti alla superfamiglia delle Immunoglobuline (Ig). Il recettore di tipo1 (IL-1R1) è espresso sulla quasi totalità delle cellule, e rappresenta il principale responsabile degli effetti biologici della IL-1.

Il recettore di tipo2 (IL-1R2) è presente sui linfociti B, ma non traduce segnali di attivazione all'interno delle cellule (manca dell'apparato di trasduzione): si tratta dunque di un recettore "fasullo".

Il legame di IL-1 ad IL-1R1 porta all'associazione con i domini citoplasmatici del recettore di alcune proteine appartenenti alla famiglia TRAF (TNF Receptor-Associated Factors); a questo fenomeno fa seguito l'attivazione di fattori di trascrizione, tra cui NF- $\kappa$ B ed AP-1 (vedi Fig. 3).



**Fig. 8 (Pathway delle IL-1)**

Gli effetti biologici di IL-1 sono simili a quelli del TNF e dipendono dalla quantità di citochine prodotte.

- Quando viene secreta in piccole quantità, IL-1 agisce come mediatore locale della infiammazione, inducendo nelle cellule endoteliali l'espressione di molecole di membrana in grado di mediare l'adesione dei leucociti.
- Quando viene secreta in maggiori quantità, IL-1 provoca febbre e induce la sintesi di proteine di fase acuta.

Esistono due distinte forme strutturali di IL-1:

-IL1-A( $\alpha$ ):è la forma acida con pI=5

-IL1-B( $\beta$ ):è la forma neutra con pI=7

Anche se l'omologia tra le due forme non è superiore al 30%, entrambe si legano ad uno stesso recettore di membrana ed esplicano più o meno le stesse attività (45,46).

Il gene che codifica per IL1-A mappa sul cromosoma 2 nella regione 2q14, possiede 10.206 bp con 7 esoni e 6 introni. IL1-A è una citochina pleiotropica (agisce su diversi tipi cellulari), coinvolta nelle risposte infiammatorie e nell'ematopoiesi, viene prodotta da monociti e macrofagi come pro-proteina, successivamente processata nella forma attiva, in risposta a stimoli, generati da antigeni estranei. Tuttavia l'IL-1A, può svolgere la propria azione sia come precursore che come prodotto di clivaggio (OMIM, National center for biotechnology information).

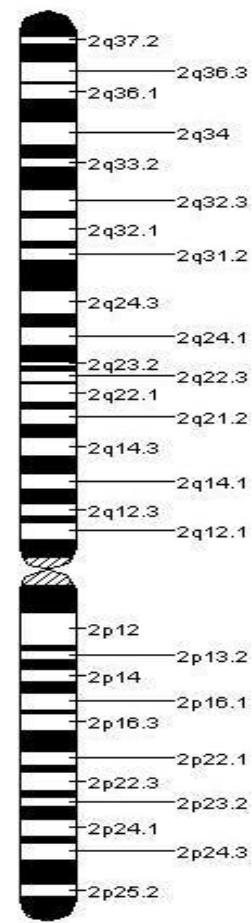
Anche il gene che codifica per IL1-B mappa sul cromosoma 2 nello stesso cluster dell'IL1-A nella regione 2q. La proteina codificata ha un peso molecolare di 15-18 KD, ed è prodotta da macrofagi attivati nella forma di pro-proteina (30-35 KD), successivamente ridotta nella forma attiva dal complesso CASP1/ICE (IL1-B Converting Enzyme), identificato come primo componente di una famiglia di proteasi cisteiniche dette caspasi.

Questa citochina è un importante mediatore della risposta infiammatoria, è coinvolta in una varietà di attività, incluso la proliferazione, la differenziazione e l'apoptosi cellulare.

Il terzo componente del cluster IL-1 della regione 2q14.2 è

il gene del recettore antagonista IL1 (IL1-RN o IL1-RA) il quale codifica per una proteina che lega il recettore per l'IL-1, inibendo così il legame di IL1-A ed IL1-B. Come conseguenza si ha una neutralizzazione dell'attività biologica delle due citochine: IL1-A ed IL1-B. IL-1 recettore antagonista (IL1-RN) codifica a sua volta due polipeptidi, generati dallo splicing alternativo dei primi due esoni, un'isoforma (17 KD) è secreta, mentre l'altra isoforma (18 KD) rimane nel citoplasma.

Nella popolazione normale sono presenti cinque varianti alleliche per IL1-RN, ma tra questi l'allele IL1-RN\*1 (quattro ripetizioni) e IL1-RN\*2 (due ripetizioni), sono i più comuni.



## 2.2 Materiali e Metodi

Nella parte sperimentale della ricerca sono stati reclutati 20 pazienti. Il gruppo dei casi comprendeva 10 pazienti ( 2 maschi e 8 femmine,età compresa tra 40-63 anni; Mean±SD: 53.5±7.98) con diagnosi di BMS da più di un anno.

Tutti pazienti reclutati nello studio erano non fumatori e non assumevano alcolici. Per il gruppo controllo sono stati reclutati 10 soggetti (2 maschi e 8 femmine; età compresa tra 31-59 età; Mean±SD: 50±10.49). Tutti i soggetti erano non fumatori e non presentavano abitudini viziate. Non assumevano farmaci al momento del prelievo ematico e non presentavano alcuna patologia sistemica o lesione orale.

Una volta effettuato il prelievo ematico, questo è stato conservato in provette con anticoagulante EDTA vacutainer con tappo viola alla temperatura di -20°.

Lo studio è stato effettuato in conformità rispetto la Dichiarazione di Helsinki ed è stato approvato dal Comitato Etico del Policlinico Paolo Giaccone di Palermo.

I pazienti ed i soggetti arruolati hanno firmato i consensi informati previsti dal protocollo.

### *Estrazione del DNA genomico*

Nel nostro studio il DNA genomico è stato estratto da sangue intero periferico trattato con anticoagulante (citrato di sodio).

L'estrazione del DNA consiste in una serie di passaggi successivi, il primo dei quali prevede l'uso di TRITON X-100, per lisare la membrana dei globuli rossi

e la successiva eliminazione delle proteine fuoriuscite mediante centrifugazione (2000 rpm).

Successivamente si procede alla lisi dei globuli bianchi, fonte di DNA, con Lisis Buffer ed alla degradazione delle proteine con SDS (detergente che stacca le proteine dal DNA) e proteinasi K.

Dopo si aggiunge il fenolo che fa precipitare le proteine sull'interfaccia tra la fase organica e quella acquosa.

In seguito si raccoglie la fase acquosa, che contiene l'acido nucleico.

Il DNA, che rimane intatto, si precipita aggiungendo etanolo ed apparirà nella forma di una medusa che potrà essere risospesa in un appropriato volume di tampone TE 1X.

### ***Reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR)***

Le procedure per l'analisi dei polimorfismi degli alleli IL1-A, IL1-B e IL1-RN si basano sull'amplificazione con PCR, sul clivaggio con enzimi di restrizione e sulla separazione dei frammenti di DNA attraverso l'elettroforesi.

I siti polimorfici indagati riguardano: IL1-A C(-889)T, IL1-B C(-511)T, localizzati entrambi nella regione del promotore ed il numero di ripetizioni in tandem ossia il VNTR dell'IL1-RN (4 ripetizioni per l'allele IL1-RN\*1e 2 ripetizioni per l'allele IL1-RN\*2).

I frammenti di interesse sono stati amplificati mediante PCR.

La tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR) è una metodica in vitro in grado di sintetizzare e di amplificare un frammento di DNA specifico, grazie all'utilizzo di una DNA-polimerasi termostabile (Taq polimerasi), di due



inneschi detti primers, ossia un filamento di DNA più o meno breve complementare allo stampo da cui far partire la sintesi.

La PCR consiste di 3 fasi:

- Una fase di denaturazione del DNA (da 92 °C a 95°C)
- Una fase di annealing (da 50 a 70°C), durante la quale i primers specifici si attaccano ai frammenti complementari del DNA stampo.
- Una fase di estensione (a 72°C) in cui avviene l'allungamento del frammento specifico.

Limiti di questa metodica sono la mancanza di "correzione di bozze" della polimerasi e la necessità di conoscere, almeno in parte, la sequenza della molecola di DNA che si vuole amplificare.

I cicli di PCR variano, di solito, da 20 a 35 e la reazione avviene all'interno di un termociclatore in grado di variare la temperatura.

Si noti che, completato il primo ciclo di PCR, si ottengono due molecole di DNA a doppio filamento per ciascuna delle molecole originarie.

Ciascuna di queste molecole è costituita da un filamento dello stampo originario e da un nuovo filamento che ad un'estremità risulta delimitato, in modo specifico dal primer oligonucleotidico e all'altra terminerà in modo aspecifico, dipendente dalla durata della fase di estensione (47).

Specificamente per l'analisi dei seguenti alleli, l'amplificazione è stata effettuata utilizzando i seguenti primers:

-IL1-B 5'TGGCATTGATCTGGTTCATC 3' Forward

5'GTTTAGGAATCTTCCCACTT 3' Reverse

***RFLP ( Restriction fragment lenght polymorphism)***

L'analisi per l'identificazione di un eventuale polimorfismo, si effettua mediante l'impiego di endonucleasi di restrizione.

Questi sono enzimi utilizzati per tagliare molecole di DNA in posizioni specifiche, prendono il loro nome dal fenomeno della restrizione-modificazione controllato dalla cellula ospite.

Gli enzimi usati comunemente, sono noti come endonucleasi di classe II<sup>a</sup>, tagliano all'interno delle specifiche sequenze bersaglio ed originano perciò frammenti specifici, generalmente riconoscono una sequenza di 4 o 6 paia di basi.

In particolare, gli enzimi usati nel nostro studio sono:

-NCO I: è un enzima estratto da *Nocardia Corallina* che si inattiva alla temperatura di 65°C.

Taglia tra la prima e la seconda citosina della seguente sequenza C/CATGG, presente nel prodotto di amplificazione dell'IL1-A.

-AVA I: è estratto da *Anabaena Variabilis* e si inattiva a 80 °C.

Riconosce la sequenza C/YCGRG e taglia tra la prima (C) e la seconda (Y) base, dove la lettera Y indica la possibilità di trovare qualsiasi delle 4 basi azotate.

Nello specifico, l'enzima AVA I è stato utilizzato per la digestione dei prodotti di amplificazione delle IL1-B.

In entrambi i casi la reazione di digestione è stata eseguita usando i seguenti reagenti:

-H<sub>2</sub>O = 2µl

-Buffer 10x = 2µl

-PCR = 15 $\mu$ l

- NCO I (10U/ $\mu$ l) = 1  $\mu$ l per IL-1A oppure

- AVA I (10U/ $\mu$ l) = 1  $\mu$ l per IL-1B

successivamente la mix è stata posta over-night in un bagnetto termostatico a 37°C.

La tipizzazione degli RFLP precedentemente veniva effettuata mediante Southern Blot, oggi invece i risultati vengono rilevati con PCR. Cioè, una sequenza con sito di restrizione variabile viene amplificata, successivamente il prodotto si incuba con l'enzima di restrizione appropriato e gli eventuali frammenti ottenuti vengono separati su gel di agarosio o meglio acrilammide.

L'informatività degli RFLP è limitata, poiché identificano 2 alleli, cioè la presenza o l'assenza del sito di restrizione.

Esiste un'ampia varietà di cambiamenti che possono dare origine a questo polimorfismo, il più ovvio è una mutazione puntiforme che causa la scomparsa (o la comparsa) di uno specifico sito di restrizione.

Altri cambiamenti potrebbero essere dovuti all'inserzione di elementi genetici mobili, rendendo così il frammento più lungo (o addirittura, più corto se l'elemento inserito contiene un sito di taglio per l'enzima usato).

Nel nostro caso il polimorfismo è dovuto ad una mutazione puntiforme, cioè alla sostituzione di una C in T (sia nell'amplificato dell'IL1-A che IL1-B) che determina la scomparsa del sito di restrizione.

I frammenti risultanti possono essere separati con elettroforesi su gel e visualizzati agli UV, colorando il gel con etidio di bromuro.

Il principio di tale metodica consiste nel separare i frammenti in base al loro peso molecolare, sottoponendoli ad un campo elettrico.

Quindi, quando una molecola carica viene posta in un campo elettrico, essa migrerà verso l'elettrodo di carica opposta.

Le molecole di DNA, essendo cariche negativamente, si muoveranno verso il polo positivo (anodo).

I gel impiegati per la separazione, sono costituiti da una complessa rete di pori, le cui dimensioni determinano la velocità alla quale si muovono i frammenti.

La capacità di risoluzione di un gel dipende dalla sua composizione, è possibile usare gel di agarosio per separare molecole di acido nucleico di grandi dimensioni o frammenti di piccole dimensioni se si aumenta la concentrazione di agarosio.

Solitamente per la separazione di molecole di poche decine di paia di basi è preferibile usare gel di poliacrilammide.

I prodotti derivati dalla digestione della PCR di IL1-A, sono stati separati impiegando gel di poliacrilammide, usando per la preparazione dei vetrini la seguente mix di reagenti:

-H<sub>2</sub>O = 5.5ml

-TBE 5X (tampone di scorrimento) = 2ml

-30% Acrilammide = 2.5 ml

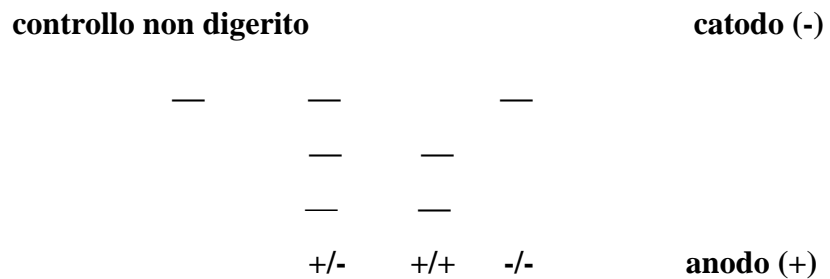
-Ammonio persolfato (APS) = 80µl

-TEMED (catalizzatore per la polimerizzazione del gel) = 30µl

Successivamente dopo aver posto i vetrini con il gel solidificato in una camera elettroforetica verticale, si caricano i pozzetti con 20µl di digestione e 4µl di blu di bromofenolo (tracciante) e si applica un voltaggio di 120-150 Volt.

Invece per la separazione dei frammenti di IL1-B, è stato impiegato un corsa elettroforetica orizzontale con gel di agarosio al 4% (2 gr di agarosio in 50ml di TAE 1X) ed applicata una differenza di potenziale di 32 Volt.

Controllando la risoluzione del gel agli UV, si ottiene la seguente immagine:



+/- = il sito di restrizione è presente su uno dei cromosomi ed assente sull'altro.

+/+ = il sito di restrizione è presente su entrambi i cromosomi.

-/- = il sito di restrizione è assente in entrambi i cromosomi, la banda sul gel solitamente ha lo stesso peso molecolare del controllo

(PCR non digerita di un campione già analizzato).

### ***VNTR (Variable Number Tandem Repeats)***

I polimorfismi più utili hanno origine dalla duplicazione o dalla trasposizione di sequenze ripetute.

La duplicazione è solitamente associata alla presenza di sequenze ripetute in tandem, rappresentate da una corta sequenza di basi che si ripete due (o più) volte in successione.

Quando questa regione è replicata, si possono verificare degli errori: l'apparato di replicazione può slittare indietro dalla seconda copia alla prima, generando così una copia aggiuntiva della ripetizione oppure slittare in direzione opposta, causando una riduzione del numero di ripetizioni.

L'analisi delle sequenze ripetute in tandem, si basa sull'amplificazione della regione che contiene le sequenze, usando primers che ibridano a ciascun lato di tali sequenze.

Se si separano i prodotti dell'amplificazione su gel di agarosio, si potrà osservare che le dimensioni dei prodotti variano in modo scalare, in relazione al numero di copie delle sequenze ripetute.

E' per questo motivo che il polimorfismo viene definito VNTR cioè numero variabile di ripetizioni in tandem.

Nel nostro studio l'analisi dei VNTR è stata utilizzata per l'identificazione di polimorfismi nella sequenza del recettore antagonista delle IL-1 (IL1-RN).

Come già citato in precedenza, il recettore antagonista IL-1 (IL1-RN) strutturalmente omologo alle due citochine IL1- $\alpha$  e IL1- $\beta$ , è capace di legarsi allo stesso recettore e quindi in grado di fungere da inibitore competitivo.

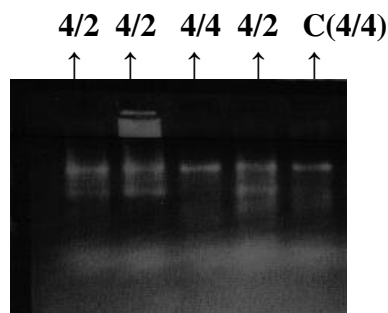
Oltretutto, è stato anche osservato che, delle cinque forme alleliche presenti nella popolazione Siciliana, l'allele IL1- RN\*1 (4 ripetizioni) con una frequenza di 0,74, e l'allele IL1-RN\*2 (2 ripetizioni) con una frequenza di 0,21, sono le due forme alleliche con una più elevata distribuzione.

In particolare, da altri studi è stato riportato che, l'allele IL1-RN\*2 svolga un ruolo protettivo nei processi neurodegenerativi, indipendentemente dall'età.

Questo può essere spiegato dall'influenza del polimorfismo sui livelli di espressione del IL1-RN. Infatti i portatori dell'allele IL1-RN\*2 hanno livelli ematici di IL1-RN più elevati rispetto ai non portatori (Hurme and Santtila,1998).

Per l'analisi dei VNTR dell'IL-1RN il controllo dei prodotti di PCR è stato effettuato su gel di agarosio al 2%, applicando una differenza di potenziale di 32 Volt.

Controllando il gel, preparato come sopra ed applicando luce UV si ottiene la seguente immagine:

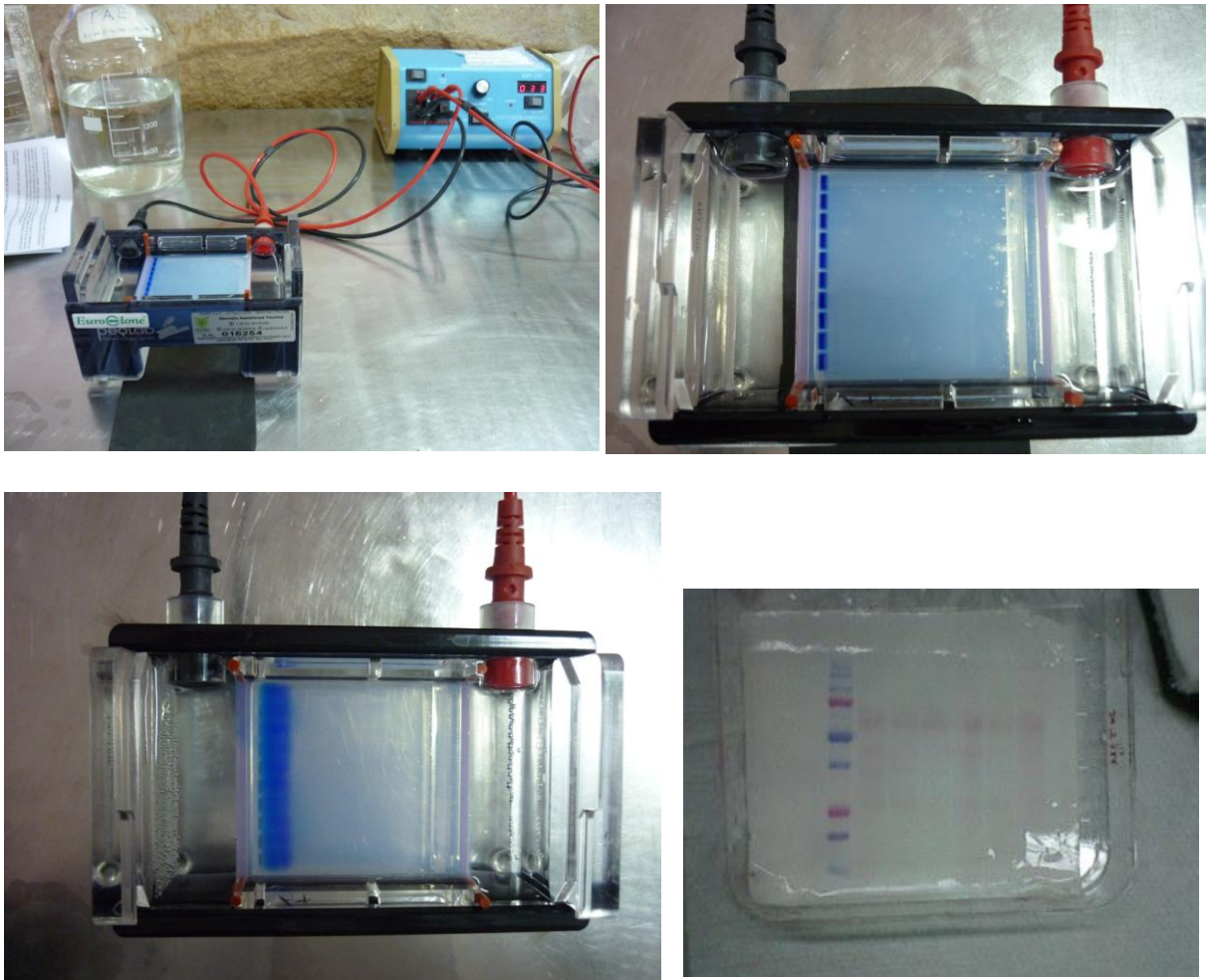


**Fig. 9 (Visualizzazione agli UV dei VNTR dell'IL1-RN).**

## Risultati

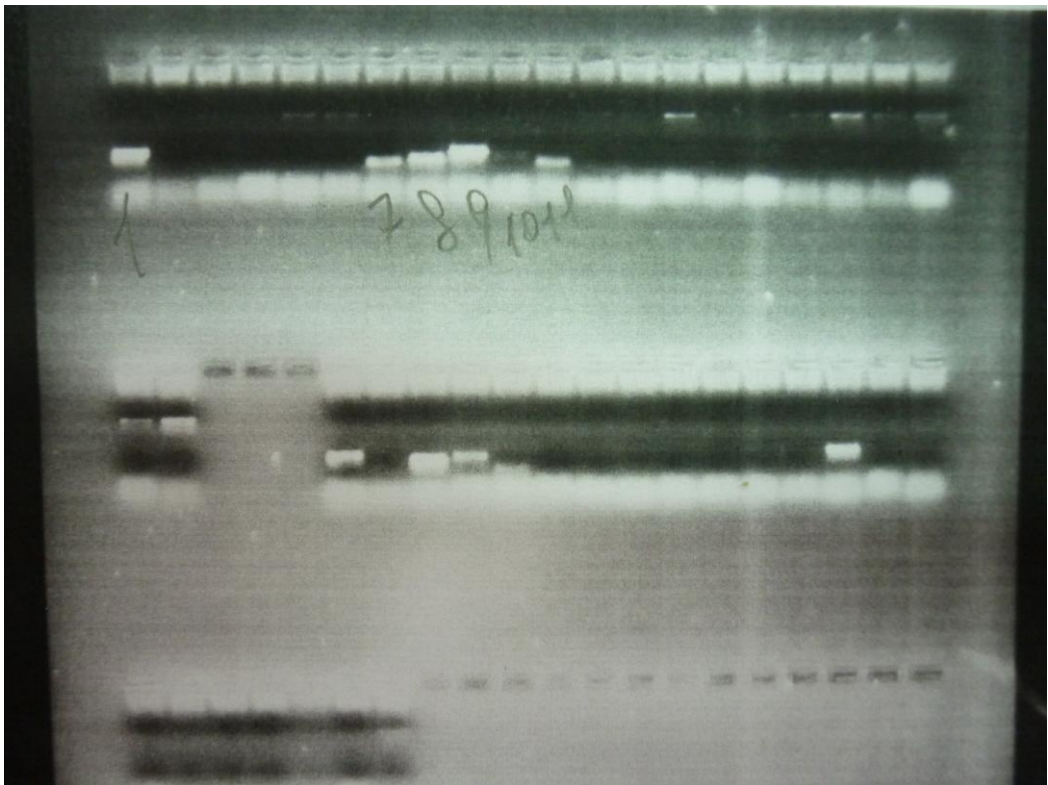
Una volta effettuati tutti i passaggi di laboratorio è emerso che tutti i componenti di entrambi i gruppi erano eterozigote.

I risultati di questo studio pilota rivelano polimorfismi genici in pazienti affetti da BMS nel 20% dei casi. Per ottenere risultati certi dovrebbe essere ampliato maggiormente il trial clinico. Il risultato ottenuto può e deve essere proseguito in futuro perché potrebbe portare a risultati interessanti e a nuovi piani di intervento in soggetti che potrebbero essere predisposti geneticamente alla BMS.

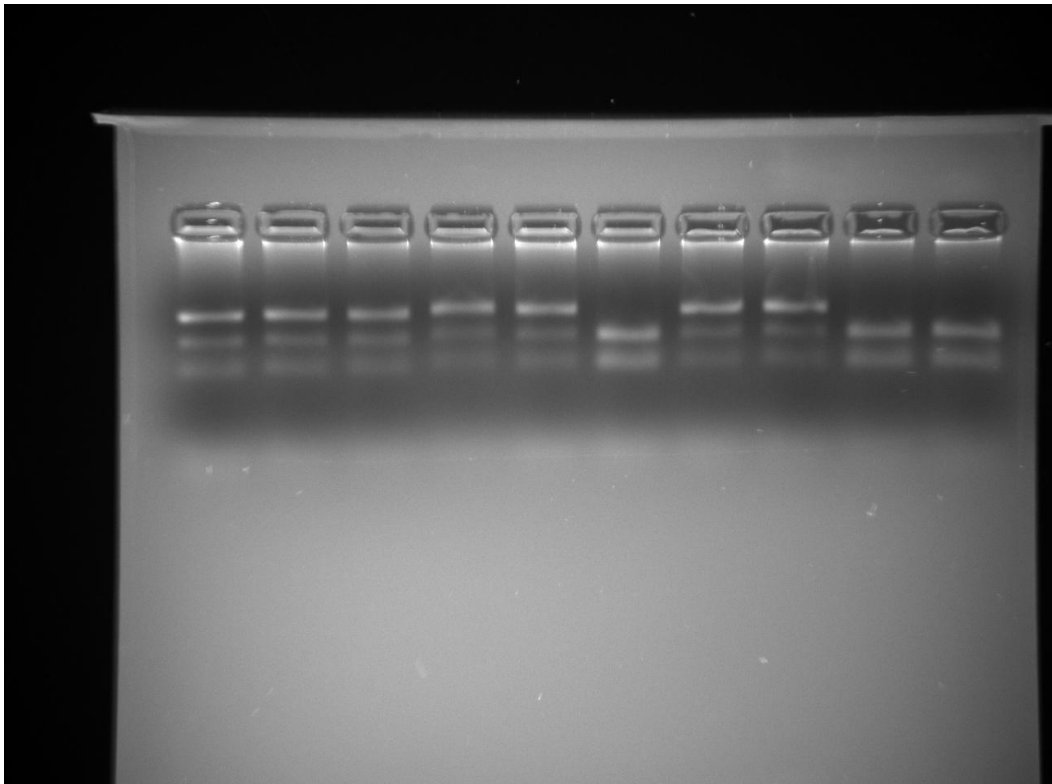


**Fig.10 Corsa Elettroforesica del DNA estratto**





**Fig. 11** Immagini agli ultravioletti del DNA estratto dopo la corsa elettroforetica



**Fig 12** TGF- $\beta$

## Capitolo III

### Prospettive Terapeutiche alternative “BMS e Agopuntura”

#### 3.1 Agopuntura nel soggetto sano

##### Introduzione

La Medicina Tradizionale Cinese (MTC) è un'arte medica sviluppatasi in Cina circa 5000 anni fa. Ha rappresentato per millenni, per il popolo cinese, la principale, se non l'unica forma di prevenzione e di trattamento della malattia. La scoperta originale della MTC è rappresentata dall'esistenza, sulla superficie del corpo, di canali o meridiani all'interno dei quali scorre l'energia vitale, che in cinese viene chiamata Qi. L'obiettivo della MTC, una volta effettuata la diagnosi, è quello di riportare il soggetto a uno stato di armonico equilibrio nella circolazione energetica. Questo si ottiene con l'agopuntura mediante l'introduzione di aghi monouso infissi sottocute in specifici punti situati lungo i vari meridiani che permettono di riequilibrare tutte le alterazioni energetiche. Un sempre maggior numero di pazienti fa ricorso a questa terapia che, a fronte di una provata efficacia in molte patologie, non comporta alcun effetto collaterale. L'organizzazione mondiale della sanità consiglia l'utilizzo dell'agopuntura in patologie di diversa natura quali quelle osteoarticolari, ginecologiche, neurologiche ed allergiche. Gli effetti dell'agopuntura comprovati dalla comunità scientifica sono: l'azione sedativa sul sistema nervoso centrale e modulatoria sul sistema cardiocircolatorio, l'effetto

antinfiammatorio, analgesico con innalzamento della soglia del dolore e riequilibrante su varie funzioni organiche (48-52).

Sin dalla sua introduzione in occidente nel 1800, questa pratica millenaria è stata oggetto di accesi dibattiti originati dalla diffidenza con cui i medici occidentali guardavano alle metodiche orientali alla luce dell'enorme differenza nel concepire i sistemi base della medicina.

I medici occidentali fondano le loro pratiche mediche sull'obiettività delle leggi anatomo-fisiologiche ed il centro del loro studio è il comprendere l'etiologia della patologia e la cura di essa fino alla restitutio ad integrum. L'antica arte della medicina cinese, invece, è volta al raggiungimento dello stato di benessere ripristinando l'equilibrio tra le forze che governano ogni organismo, elemento o fenomeno: yin e yang. Queste due forze possono essere considerate come i due opposti che in equilibrio tra loro e in reciproca interdipendenza determinano lo stato di salute. Qualora l'equilibrio tra queste due forze decada, si determina la perdita di salute e dunque la malattia, che può essere curata ripristinando il flusso di energia lungo i canali (meridiani) di yin e yang mediante la stimolazione di punti specifici.

E' evidente come l'approccio occidentale possa essere considerato "materialista" e quello orientale "filosofico", ma entrambe risultano essere efficaci dal punto di vista terapeutico. Superata la fase di integrazione del metodo orientale nella medicina occidentale e sancita l'effettiva efficacia della tecnica agopuntiva, il centro di dibattito nel mondo scientifico si è spostato sulle indicazioni e sulle prospettive terapeutiche dell'agopuntura.

La letteratura, recentemente, presenta innumerevoli contributi in cui viene evidenziato l'interazione di metodiche quali il laser doppler e l'immunoistochimica e le pratiche millenarie della medicina orientale. Dall'assenza di studi sulle patologie odontostomatologiche e dall'ampia diffusione dell'agopuntura in odontoiatria nasce l'idea di questo studio, che dimostra l'effettiva variazione del microcircolo della mucosa labiale nel soggetto sano ed apre prospettive nuove all'impiego dell'agopuntura nelle patologie della mucosa orale.

## Materiali e Metodi

Lo studio è stato condotto su 40 soggetti che non riferivano alcuna patologia sistemica, non assumevano farmaci,, né alcolici e non erano fumatori: alla luce di ciò, sono stati definiti soggetti sani.

Venti volontari sono stati reclutati per essere sottoposti ad agopuntura e venti soggetti come controlli. Il gruppo dei casi era composto da nove maschi e undici femmine, con un range di età compreso tra 25 e 67 anni (Mean  $\pm$ SD: 55.9 $\pm$ 16.04). Il gruppo contro era costituito da nove maschi e undici femmine, con un range di età compreso tra 27 e 65 anni (Mean  $\pm$ SD:51 $\pm$ 11.91).

	<b>Gruppo dei Casi</b>	<b>Gruppo dei Controlli</b>
<b>M/F</b>	<b>9/11</b>	<b>9/11</b>
<b>Range di Età</b>	<b>25-67</b>	<b>27-65</b>
<b>Età (Mean<math>\pm</math>SD)</b>	<b>55.90<math>\pm</math>16.04</b>	<b>51<math>\pm</math>11.91</b>

**Tabella 1. Dati Demografici dei volontari arruolati nello studio**

Lo studio è stato condotto in maniera conforme a quanto prescritto dalla Dichiarazione di Helsinki ed è stato approvato dal Comitato Etico del Policlinico “P. Giaccone” di Palermo.

La ricerca è stata articolata in tre fasi:

**t<sub>0</sub>**) Studio capillaroscopico del microcircolo orale in assenza di agopuntura (ciò rappresenta la base di controllo per registrare ogni effettiva variazione del sistema microcircolatorio);

**t<sub>1</sub>**) Studio capillaroscopico in seguito all'introduzione degli aghi nei punti prestabiliti dopo circa 1 minuto dall'inserimento e stimolazione degli aghi;

**t<sub>2</sub>**) Studio capillaroscopico dopo una seconda stimolazione a 5 minuti dall'inserimento degli aghi.

### **Agopuntura**

La tecnica di agopuntura impiegata nello studio è basata sulla Medicina Tradizionale Cinese (MTC). Sono stati applicati dieci aghi di tipo "filiforme", monouso e sterili con tubo guida, corpo in acciaio e manico in rame. La dimensioni degli aghi prescelta è stata di 0.26 mm di diametro e 25 mm di lunghezza, con un tempo di posa variabile tra i 15 e i 20 minuti. I punti di agopuntura stimolati sono stati: **SI1**, **TE1** e **LI4** unilateralmente; **TE21**, **ST5** e **ST6** bilateralmente; **CV 24** sulla linea mediana.

L'angolo e la profondità di inserzione sono state:

**SI1:** infissione perpendicolare per 2 mm;

**TE1:** infissione perpendicolare per 2 mm;

**LI4:** infissione perpendicolare per 1-2 cm;

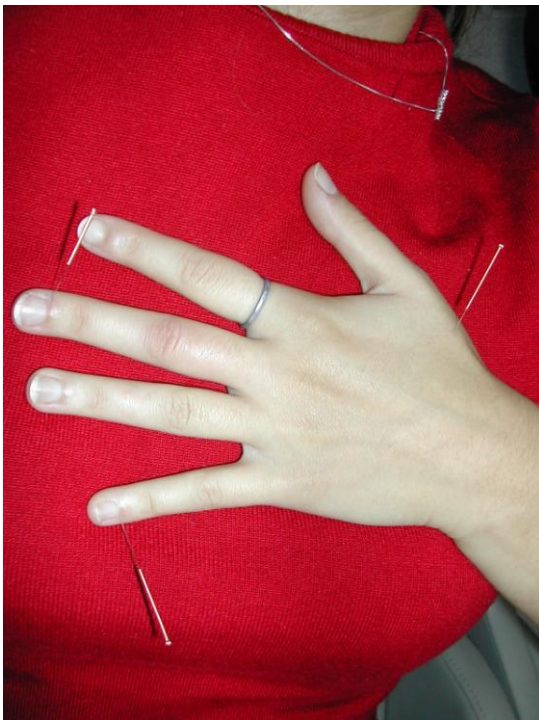
**TE21:** infissione perpendicolare per 1-2 cm;

**ST5:** infissione perpendicolare per 0.5-1 cm;

**ST6:** infissione perpendicolare per 0.5/1 cm;

**CV24:** infissione obliqua 0.5-1 cm.

La risposta elicitata è stata di tipo “de qi” accompagnata da arrossamento e sensazione di intorpidimento attorno agli aghi. L’agopuntore che si è occupato dell’agopuntura ha un’esperienza clinica di 5 anni ed ha cominciato la pratica agopuntiva in seguito ad un corso triennale post-laurea in MTC e Agopuntura. L’operatore ha un’esperienza specifica nell’applicazione clinica dell’agopuntura in campo odontoiatrico ed in particolare nella terapia integrata delle disfunzioni temporo-mandibolari e nel dolore facciale atipico<sup>6</sup>.



**Fig. 13-14** Soggetto sano sottoposto ad agopuntura.

## **Videocapillaroscopia**

La videocapillaroscopia orale è una tecnica panoramica che si effettua in vivo, non invasiva, semplice, ripetibile e ben tollerata dal paziente. Questa tecnica computerizzata è associata ad uno specifico software (DS Medigroup, Milano Italia), che consente l'acquisizione e l'elaborazione dei dati. Il Videocapillaroscopio è costituito da un'unità centrale, una sonda a fibre ottiche con terminale video-ottico ed un monitor a colori ad alta risoluzione. Il corpo centrale comprende una sorgente luminosa a luce alogena fredda emessa da una lampada di 100 W dotata di un dispositivo di controllo automatico o manuale dell'intensità luminosa. La sonda è costituita da un cavo flessibile racchiudente un fascio di fibre ottiche, da un cavo di connessione tra unità di elaborazione del segnale video contenuta nel corpo centrale ed il terminale video-ottico. Il terminale è, a sua volta, costituito da una microtelecamera a colori e da un supporto per l'alloggiamento di differenti obiettivi. L'ottica ha una macchia focale di 1.811 mm e presenta ingrandimenti variabili da 10 a 1000X. Per lo studio in analisi è stato utilizzato l'ingrandimento a 200x. La valutazione morfofunzionale della microcircolazione si basa su parametri specifici quali: Lunghezza dell'ansa capillare, Diametro ansa, Diametro ansa afferente ed efferente, Tortuosità e Densità capillare. L'indagine videocapillaroscopica è stata eseguita sempre con la stessa fonte di luce, alla stessa temperatura di stanza (23 °C), di mattina, con lo stesso operatore e ripetuta più volte per ogni area sotto investigazione.



## **Analisi Statistica**

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il Mann–Whitney  $U$  test. Il valore di significatività è di  $P < 0.05$ . I dati raccolti sono stati analizzati con StatView 5.0.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC). I dati acquisiti si riferiscono al valore medio tra quelli acquisiti nelle misurazioni per ogni parametro prestabilito. I valori sono stati messi a confronto tra le fasi dello studio  $t_0$ -  $t_1$ ;  $t_0$ - $t_2$ ;  $t_1$ - $t_2$ .

## **Risultati**

In tutti i casi e durante tutte le fasi dello studio, la visibilità del microcircolo durante l'esame capillaroscopico è stata chiara e la messa a fuoco semplice ed immediata. L'orientamento dei capillari della mucosa labiale nel soggetto sano è parallelo rispetto la superficie ove viene posta la sonda durante l'esame e non sono state registrate variazioni dell'orientamento durante le fasi in cui è stata praticata l'agopuntura.

L'analisi statistica condotta mettendo a confronto i valori medi delle misurazioni ha evidenziato parametri significativi ( $P < 0.05$ ) per i seguenti parametri:

**Diametro ansa afferente** nelle fasi  $t_0$  (Mean±SD:  $0.024 \pm 0.010$ ) –  $t_1$  (Mean±SD:  $t_1: 0.010 \pm 0.001$ );  $P < 0.05$  – valore significativo.

**Diametro ansa afferente** nelle fasi  $t_0$  (Mean±SD:  $0.024 \pm 0.010$ ) –  $t_2$  (Mean±SD:  $0.040 \pm 0.07$ );  $P < 0.05$  – valore significativo.

**Tortuosità capillare** (numero di incroci nei capillari) nelle fasi  $t_0$  (Mean±SD: 1.78±1.80) –  $t_1$  (Mean±SD: 4.78±1.80); : P<0.05 – valore significativo.

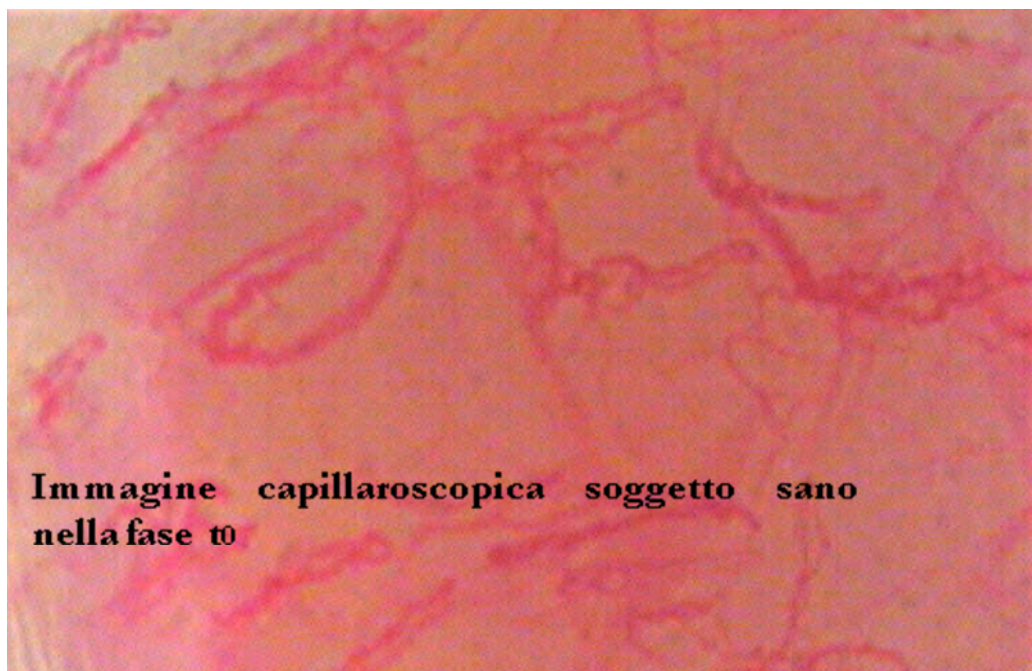
**Tortuosità capillare** (numero di incroci nei capillari) nelle fasi  $t_0$  ( Mean±SD: 1.78±1.80) –  $t_2$  ( Mean±SD: 4.43±1.58); : P<0.05 – valore significativo.

<b>Parametri Capillaroscopici</b>	<b>Gruppo Controllo</b>	<b>S</b>	<b>Gruppo Casi</b>	<b>S</b>
<b>Tortuosità t<sub>0</sub> – t<sub>1</sub></b>	t <sub>0</sub> : 1.58±0.040 t <sub>1</sub> : 1.91±0.38	NS	t <sub>0</sub> : 1.78±1.20 t <sub>1</sub> : 4.78±1.80	P=0.021
<b>Tortuosità t<sub>0</sub> – t<sub>2</sub></b>	t <sub>0</sub> : 1.58±0.040 t <sub>2</sub> : 1.81±0.91	NS	t <sub>0</sub> : 1.78±1.20 t <sub>2</sub> : 4.43±1.58	P=0.032
<b>Diametro ansa afferente t<sub>0</sub> – t<sub>1</sub></b>	t <sub>0</sub> : 0.0160±0.001 t <sub>1</sub> : 0.0160±0.001	NS	t <sub>0</sub> : 0.024±0.010 t <sub>1</sub> : 0.010±0.001	P=0.037
<b>Diametro ansa afferente t<sub>0</sub> – t<sub>2</sub></b>	t <sub>0</sub> : 0.0160±0.001 t <sub>2</sub> : 0.015±0.005	NS	t <sub>0</sub> : 0.024±0.010 t <sub>2</sub> : 0.040±0.07	P=0.034
<b>Diametro ansa efferente t<sub>0</sub> – t<sub>1</sub></b>	t <sub>0</sub> : 0.011±0.003 t <sub>1</sub> : 0.009±0.002	NS	t <sub>0</sub> : 0.022±0.001 t <sub>1</sub> : 0.0220±0.001	NS
<b>Diametro ansa efferente t<sub>0</sub> – t<sub>2</sub></b>	t <sub>0</sub> : 0.011±0.003 t <sub>2</sub> : 0.013±0.020	NS	t <sub>0</sub> : 0.022±0.001 t <sub>2</sub> : 0.0210±0.001	NS
<b>Diametro capillare t<sub>0</sub> – t<sub>1</sub></b>	t <sub>0</sub> : 0.035±0.010 t <sub>1</sub> : 0.034±0.010	NS	t <sub>0</sub> : 0.0480±0.001 t <sub>1</sub> : 0.0410±0.001	NS
<b>Diametro capillare t<sub>0</sub> – t<sub>2</sub></b>	t <sub>0</sub> : 0.035±0.010 t <sub>2</sub> : 0.037±0.009	NS	t <sub>0</sub> : 0.048±0.001 t <sub>2</sub> : 0.053±0.001	NS
<b>Lunghezza capillare t<sub>0</sub> – t<sub>1</sub></b>	t <sub>0</sub> : 0.22±0.004 t <sub>1</sub> : 0.22±0.059	NS	t <sub>0</sub> : 0.25±0.06 t <sub>1</sub> : 0.31±0.09	NS
<b>Lunghezza capillare t<sub>0</sub> – t<sub>2</sub></b>	t <sub>0</sub> : 0.220±0.059 t <sub>2</sub> : 0.230±0.051	NS	t <sub>0</sub> : 0.25±0.06 t <sub>2</sub> : 0.28±0.05	NS
<b>Densità capillare t<sub>0</sub> – t<sub>1</sub></b>	t <sub>0</sub> : 29.10±6.56 t <sub>1</sub> : 26.37±5.54	NS	t <sub>0</sub> : 32±10.6 t <sub>1</sub> : 33.20±12.03	NS
<b>Densità capillare t<sub>0</sub> – t<sub>2</sub></b>	t <sub>0</sub> : 29.10±6.56 t <sub>2</sub> : 27.75±4.78	NS	t <sub>0</sub> : 32±10.6 t <sub>2</sub> : 29.20±8.23	NS

**Tabella 2 . Risultati. NS per valori P>0.05**

Nel gruppo sottoposto ad agopuntura sono state osservate modificazioni statisticamente significative tra il tempo di partenza t1 e t2 rispetto l'ansa afferente e la tortuosità capillare (numero di incroci). Modificazioni della lunghezza, del diametro totale, del diametro dell'ansa efferente e della densità capillari non hanno mostrato valori statisticamente significativi.

La tecnica agopuntrice si è dimostrata capace di influenzare i capillari della mucosa orale in soggetti sani.



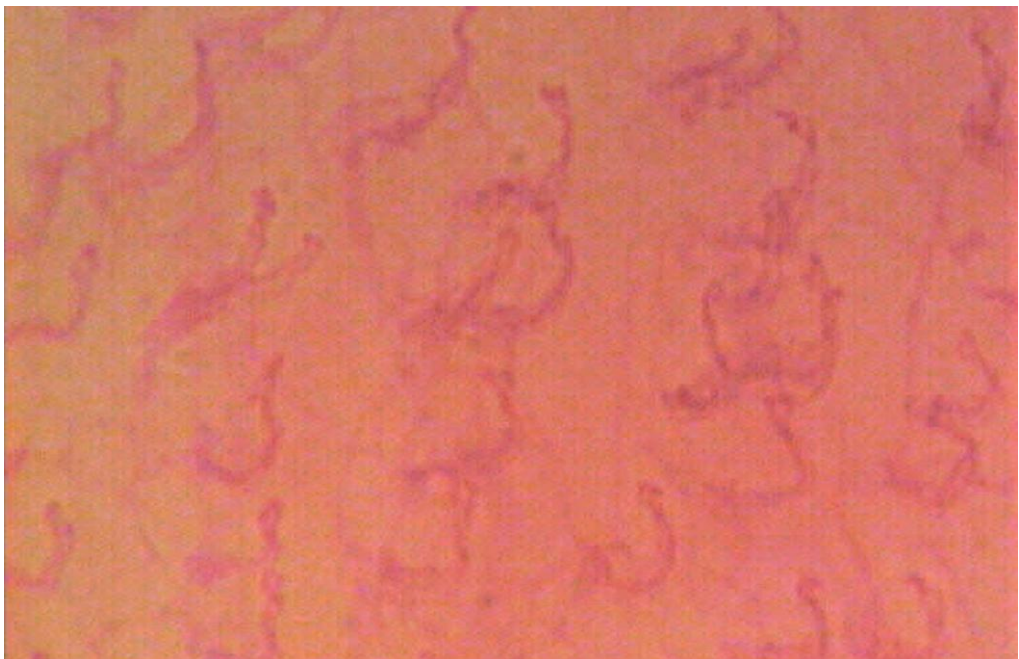
**Fig 15. Immagine capillaroscopica soggetto sano nella fase t<sub>0</sub>.**

**Ingrandimento 200X.**



**Fig 16. Immagine capillaroscopica soggetto sano nella fase  $t_1$ .**

**Ingrandimento 200X.**



**Fig 17. Immagine capillaroscopica soggetto sano nella fase  $t_1$ .**

**Ingrandimento 200X.**

## Discussione

Da quando l'agopuntura è stata dichiarata efficace dall'OMS, si è aperto un nuovo terreno di ricerca in cui trovare risposte sul meccanismo d'azione della tecnica, ad oggi ancora non del tutto spiegato, per comprendere i campi di applicazione, testare gli effetti terapeutici su patologie a carico di diversi apparati e le possibilità di influenzare in maniera cospicua e duratura la sfera percettiva. Gli interrogativi precedentemente elencati hanno stimolato i settori scientifici di un po' tutte le branche mediche, le quali impiegano l'agopuntura sia sfruttandone gli effetti accertati, quali la diminuzione della sensazione algica, la pratica anestesiológica, la diminuzione di stimoli quali l'emese post-chemioterapia o in gravidanza, oppure studiando nuovi effetti non ancora comprovati come la variazione di ormoni quali l'angiotensina e l'impiego nelle complicanze di patologie dismetaboliche come il diabete. Ciò appare logico quando una terapia possiede campi di applicazioni tanto vasti e in buona parte ancora ignoti come nel caso dell'agopuntura e lo stimolo alla ricerca appare comprensibile. Negli ultimi anni, i maggiori studi sono stati effettuati sul sistema cardiocircolatorio, in particolare sulla modulazione dei valori pressori, sull'utilizzo dell'agopuntura come adiuvante a terapie farmacologiche, sulla diminuzione del dolore oncologico, sulle neuropatie e sull'indagine degli effetti dell'agopuntura su macro e microcircolo specie a livello ungueale, della pelle e delle fasce muscolari (53-60). L'effetto vasomodulatorio è stato comprovato attraverso eleganti metodiche termografiche, che indicano come l'agopuntura sia in grado di operare una vasodilatazione cutanea e muscolare.

E' documentato, inoltre, che l'azione dell'agopuntura sul microcircolo non si esplica solo a livello cutaneo ma anche in distretti più profondi come quello encefalico. Esami condotti per mezzo della spettroscopia e della flussometria con laser doppler hanno fornito prove su come l'agopuntura possa incrementare la velocità del flusso sanguigno e modulare la perfusione nel microcircolo. In campo odontoiatrico, gli studi più recenti sull'impiego dell'agopuntura nelle patologie orali riguardano il trattamento della patologia parodontale, del dolore oro-faciale e delle variazioni del flusso salivare sia sulla scialorrea che, soprattutto, sulla xerostomia specie, se postuma a terapia radiante (61-73) .

Attualmente non esistono studi specifici sulle possibili influenze dell'agopuntura sul microcircolo orale - specie a livello mucosale - e sul paziente odontostomatologico. Questo studio rappresenta l'analisi prima e basilare del comportamento della microcircolazione modulata a mezzo di agopuntura ed è parso fondamentale avere come punto di partenza il paziente sano, privo di qualsiasi disordine locale o sistemico o fattore farmacologico che possa falsare a priori la microcircolazione orale. I risultati hanno confermato la modulazione del microcircolo, che può essere basilare in disordini in cui la perfusione sanguigna e la microcircolazione giocano un ruolo importante nell'insorgenza e nel perpetuarsi dello stato patologico come nelle patologie a base infiammatoria o accompagnate da angiogenesi. Avendo ottenuto risultati favorevoli ed avendo testato l'efficacia modulatrice dell'agopuntura sulla microcircolazione nel soggetto sano, sarà possibile applicare la tecnica agopuntiva in pazienti affetti da malattie odontostomatologiche specie ove

esse si accompagnano anche ad un'alterazione della sfera emotiva come nella Burning Mouth Syndrome. Non bisogna, infatti, sottovalutare il duplice effetto che una tecnica alternativa ma efficace come l'agopuntura può avere sia a livello microcircolatorio ma anche a livello percettivo specie alla luce del forte impatto emotivo determinato dall'applicazione di una tecnica innovativa e largamente diffusa, come nel caso dell'agopuntura.

Le aspettative di questo studio totalmente originale sono state pienamente esaurite dalla produzione di dati ed effetti che avvalorano l'efficacia modulatrice sul microcircolo orale della tecnica agopuntiva. Il presente lavoro, condotto come uno studio pilota a partire dal soggetto sano, apre al campo odontostomatologico l'applicazione dell'agopuntura in un disordine di questa branca medica ed arricchisce ulteriormente la letteratura scientifica di dati e risultati importanti su effetti, meccanismi ed efficacia dell'agopuntura stessa.(74)



## **2.2 Effetti terapeutici dell'Agopuntura sulla BMS**

### **Introduzione**

La Burning Mouth Syndrome (BMS) è una condizione cronica ad etiopatogenesi ignota, caratterizzata da dolore urente clinicamente non riconducibile ad alcun disordine delle mucose del cavo orale. L'ipotesi etiopatogenetica maggiormente accreditata è l'infiammazione neurogena.

Tale meccanismo prevede che il sistema nervoso determini il rilascio di peptidi pro-infiammatori che scatenano la cascata infiammatoria responsabile del sintomo del dolore urente. E' stata accertata una modificazione del microcircolo orale in pazienti BMS che favorirebbe l'instaurarsi e la cronicizzazione della condizione flogistica ed un proporzionale aumento del dolore urente.

Lo scopo dello studio è di influenzare il microcircolo orale stimolando, con tecniche di medicina alternativa - agopunti specifici - in modo da determinare una variazione significativa dei capillari da cui deriverebbe un minor apporto e transito dei fattori flogistici ed una conseguente diminuzione della sintomatologia urente.

La modulazione microcircolatoria è stata indotta utilizzando l'agopuntura. Le modificazioni dei capillari sono state monitorizzate mediante l'utilizzo della videocapillaroscopia orale, che permette uno studio immediato e non invasivo dei capillari. I dati sono stati analizzati utilizzando il Mann-Whitney test. L'analisi statistica ha evidenziato un aumento della tortuosità, un aumento

della densità, una diminuzione del diametro dell'ansa efferente ed una diminuzione delle anse arborescenti. Lo studio ha dimostrato che l'agopuntura influenza il microcircolo orale determinando una variazione significativa del quadro capillaroscopico. I pazienti reclutati per lo studio hanno riferito un'imponente diminuzione della sensazione urente dopo tre settimane di terapia. L'agopuntura appare, alla luce di questi dati, una valida alternativa terapeutica.

La BMS è una patologia ad eziologia sconosciuta ma è stata accertata la presenza di un disordine di base a carico del sistema nervoso che si accompagna ad una diminuzione delle fibre nervose e la presenza di prodotti infiammatori a livello serico e salivare, che sostengono la tesi dell'infiammazione neurogenica. Inoltre, questa patologia presenta un coinvolgimento considerevole dell'aspetto psicologico, che spesso sfocia in stati depressivi. E' ancora da accertare se la depressione sia un sintomo postumo l'insorgenza della sindrome o sia alla base dell'instaurarsi della patologia. Alla luce degli effetti dell'agopuntura sul sistema nervoso e dell'effetto antinfiammatorio e vasomodulatore, è stato elaborato questo studio, che prevede un approccio alternativo e non farmacologico nella terapia della BMS, investendo tutte le componenti che caratterizzano questo disturbo (aspetto nervoso, infiammatorio e psicologico).

## Materiali e Metodi

Lo studio è stato condotto su sessanta pazienti, divisi in due gruppi: il gruppo dei casi includeva 30 pazienti con diagnosi BMS (10 maschi e 20 femmine con età compresa tra 57-77 anni; Mean±SD:65.4±2.17) e 30 soggetti sani (10 maschi e 20 femmine con età compresa tra 52-70 anni; Mean±SD:62.06±6.72)

	<b>Gruppo Controllo Soggetti Sani</b>	<b>Gruppo dei Casi PazientiBMS</b>
<b>Sesso (M/F)</b>	5/10	5/10
<b>Età (M±SD)</b>	62.06±6.72	65.4±2.17
<b>Range di Età (anni)</b>	52-70	57-77

**Tabella 3. Dati Demografici dei volontari arruolati nello studio**

La diagnosi è stata effettuata analizzando la storia clinica del paziente dal punto di vista medico, farmacologico, dentale e psicologico ed esaminando attentamente le mucose. Il criterio diagnostico prevede l'assenza di lesioni a carico delle mucose orali e l'esclusione di tutti i fattori che possono determinare bruciore orale, ovvero: l'uso di farmaci come antipertensivi; presenza di infezioni orali (candida) o gastrointestinali (*helicobacter pylori*); allergie a materiali dentali, metalli o cibi; manufatti protesici incongrui; alterazione seriche di vitamine o presenza di anticorpi tipici di patologie

autoimmuni come la sindrome di Sjogren. Lo studio è stato condotto in maniera conforme a quanto prescritto dalla Dichiarazione di Helsinki ed è stato approvato dal Comitato Etico del Policlinico “P.Giaccone” di Palermo.

Dopo aver sottoscritto il consenso informato a procedere con la tecnica agopuntiva, l'esame videocapillaroscopico e il trattamento dei dati personali, i pazienti sono stati sottoposti allo studio completo del microcircolo labiale e linguale in regime di agopuntura.

Lo studio è stato condotto in tre fasi:

- t<sub>0</sub>)** Studio capillaroscopico del microcircolo orale in assenza di agopuntura (ciò rappresenta la base di controllo per registrare ogni effettiva variazione del sistema microcircolatorio);
- t<sub>1</sub>)** Studio capillaroscopico in seguito all'introduzione degli aghi nei punti prestabiliti dopo circa 1 minuto dall'inserimento e stimolazione degli aghi;
- t<sub>2</sub>)** Studio capillaroscopico dopo una seconda stimolazione a 5 minuti dall'inserimento degli aghi.

## **Agopuntura**

La tecnica di agopuntura impiegata nello studio è basata sulla Medicina Tradizionale Cinese (MTC). Sono stati applicati dieci aghi di tipo “filiforme”, monouso e sterili con tubo guida, corpo in acciaio e manico in rame.

La dimensioni degli aghi prescelta è stata di 0.26 mm di diametro e 25 mm di lunghezza, con un tempo di posa variabile tra i 15 e i 20 minuti. I punti di agopuntura stimolati sono stati: **SI 1 (Shaoze)** unilaterale; **TE 1 (Guanchong)** unilaterale; **LI 4 (Hegu)** unilaterale; **TE 21 (Ermen)** bilaterale; **ST 5 (Daying)** bilaterale; **ST 6 (Jiache)** bilaterale; **CV 24 (Renmai chengjiang)**.

L'angolo e la profondità di inserzione scelte sono state:

**SI 1:** inserzione perpendicolare per 2 mm (0.1 CUN);

**TE 1:** inserzione perpendicolare per 2 mm (0.1 CUN);

**LI 4:** inserzione perpendicolare per 1-2 cm (0.5-1 CUN);

**TE 21:** inserzione perpendicolare per 1-2 cm (0.5-1 CUN);

**ST 5:** inserzione perpendicolare per 0.5-1 cm (0.3-0.5 CUN);

**ST 6:** inserzione perpendicolare per 0.5-1 cm (0.3-0.5 CUN);

**CV 24:** inserzione obliqua 0.5-1 cm (0.3-0.5 CUN).

La risposta elicitata è stata di tipo “de qi”, accompagnata da arrossamento e sensazione di intorpidimento attorno agli aghi.

## **Analisi Statistica**

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il Mann–Whitney  $U$  test. Il valore di significatività è di  $P < 0.05$ . I dati raccolti sono stati analizzati con StatView 5.0.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC). I dati acquisiti si riferiscono al valore medio tra quelli acquisiti nelle misurazioni per ogni parametro prestabilito. I valori sono stati messi a confronto tra le fasi dello studio  $t_0$ -  $t_1$ ;  $t_0$ - $t_2$ ;  $t_1$ - $t_2$ .

## **Risultati**

In tutti i casi e durante tutte le fasi dello studio la visibilità del microcircolo durante l'esame capillaroscopico è stata chiara e la messa a fuoco semplice ed immediata. L'orientamento dei capillari della mucosa labiale nel paziente affetto da BMS è parallelo rispetto la superficie ove viene posta la sonda durante l'esame e l'orientamento è rimasto tale in tutte le fasi dello studio. Il quadro capillaroscopico tipico nella BMS è caratterizzato dalla presenza di anse arborescenti, dilatazioni ed un'accentuata tortuosità [18]. L'analisi statistica è stata condotta mettendo a confronto i valori medi delle misurazioni ed ha evidenziato valori significativi ( $P < 0.05$ ) per i seguenti parametri:

**Aumento della Tortuosità** confrontando le fasi  $t_0$  (Mean±SD:  $1,98 \pm 0.017$ ) –  $t_1$  (Mean±SD:  $5.04 \pm 0.044$ ) –  $P < 0.05$  – valore significativo;

**Aumento della Tortuosità** confrontando le fasi  $t_0$  (Mean±SD:  $1,98 \pm 0.017$ ) –  $t_2$  (Mean±SD:  $3,9 \pm 0.030$ ) –  $P < 0.05$  – valore significativo;

**Aumento Densità** confrontando le fasi  $t_0$  (Mean±SD: 31.6±1.30) –  $t_1$  (Mean±SD: 43.5±1.73) –  $P<0.05$  – valore significativo;

**Diminuzione Diametro Ansa Efferente** confrontando le fasi  $t_1$  (Mean±SD: 0.025±0) –  $t_2$  (Mean±SD: 0.014±0) –  $P<0.05$  – valore significativo;

**Diminuzione Anse Arborescenti.**

<b>Parametri Capillaroscopici</b>	<b>Gruppo Controllo (Mean±SD)</b>	<b>S P&lt;0.05</b>	<b>Gruppo dei casi (Mean±SD)</b>	<b>S P&lt;0.05</b>
---------------------------------------	---------------------------------------	------------------------	--------------------------------------	------------------------



<b>Tortuosità</b> <b>t<sub>0</sub> - t<sub>1</sub></b>	t <sub>0</sub> : 1.58±0.40 t <sub>1</sub> : 1.91±0.38	<b>NS</b>	t <sub>0</sub> : 1.98±0.017 t <sub>1</sub> : 5.04±0.044	<b>S</b> <b>0.0001</b>
<b>Tortuosità</b> <b>t<sub>0</sub> - t<sub>2</sub></b>	t <sub>0</sub> : 1.58±0.40 t <sub>2</sub> : 1.81±0.91	<b>NS</b>	t <sub>0</sub> : 1.98±0.017 t <sub>2</sub> : 3.95±0.030	<b>S</b> <b>0.0001</b>
<b>Diametro ansa</b> <b>afferente</b> <b>t<sub>0</sub> - t<sub>1</sub></b>	t <sub>0</sub> : 0.0160±0.0003 t <sub>1</sub> : 0.0150±0.0003	<b>NS</b>	t <sub>0</sub> : 0.014±0.005 t <sub>1</sub> : 0.015±0.005	<b>NS</b>
<b>Diametro ansa</b> <b>afferente</b> <b>t<sub>0</sub> - t<sub>2</sub></b>	t <sub>0</sub> : 0.0160±0.0003 t <sub>2</sub> : 0.015±0.005	<b>NS</b>	t <sub>0</sub> : 0.014±0.005 t <sub>2</sub> : 0.011±0.004	<b>NS</b>
<b>Diametro ansa</b> <b>efferente</b> <b>t<sub>0</sub> - t<sub>1</sub></b>	t <sub>0</sub> : 0.011±0.003 t <sub>1</sub> : 0.009±0.002	<b>NS</b>	t <sub>0</sub> : 0.018±0.003 t <sub>1</sub> : 0.021±0.004	<b>NS</b>
<b>Diametro ansa</b> <b>efferente</b> <b>t<sub>0</sub> - t<sub>2</sub></b>	t <sub>0</sub> : 0.011±0.003 t <sub>2</sub> : 0.013±0.020	<b>NS</b>	t <sub>0</sub> : 0.018±0.003 t <sub>2</sub> : 0.015±0.001	<b>NS</b>
<b>Diametro Capillare</b> <b>t<sub>0</sub> - t<sub>1</sub></b>	t <sub>0</sub> : 0.035±0.010 t <sub>1</sub> : 0.034±0.010	<b>NS</b>	t <sub>0</sub> : 0.04±0.007 t <sub>1</sub> : 0.04±0.01	<b>NS</b>
<b>Diametro Capillare</b> <b>t<sub>0</sub> - t<sub>2</sub></b>	t <sub>0</sub> : 0.035±0.010 t <sub>2</sub> : 0.037±0.009	<b>NS</b>	t <sub>0</sub> : 0.04±0.007 t <sub>2</sub> : 0.04±0.004	<b>NS</b>
<b>Lunghezza Capillare</b> <b>t<sub>0</sub> - t<sub>1</sub></b>	t <sub>0</sub> : 0.22±0.004 t <sub>1</sub> : 0.22±0.059	<b>NS</b>	t <sub>0</sub> : 0.33±0.14 t <sub>1</sub> : 0.26±0.08	<b>NS</b>
<b>Lunghezza Capillare</b> <b>t<sub>0</sub> - t<sub>2</sub></b>	t <sub>0</sub> : 0.220±0.059 t <sub>2</sub> : 0.230±0.051	<b>NS</b>	t <sub>0</sub> : 0.33±0.14 t <sub>2</sub> : 0.30±0.24	<b>NS</b>
<b>Densità Capillare</b> <b>t<sub>0</sub> - t<sub>1</sub></b>	t <sub>0</sub> : 29.10±6.56 t <sub>1</sub> : 26.37±5.54	<b>NS</b>	t <sub>0</sub> : 31.6±1.30 t <sub>1</sub> : 43.5±1.73	<b>S</b> <b>0.0001</b>
<b>Densità Capillare</b> <b>t<sub>0</sub> - t<sub>2</sub></b>	t <sub>0</sub> : 29.10±6.56 t <sub>2</sub> : 27.75±4.78	<b>NS</b>	t <sub>0</sub> : 31.6±1.30 t <sub>2</sub> : 38.4±3.64	<b>NS</b>

**Tabella 4. Risultati sulla mucosa labiale. NS per valori P>0.05**

<b>Parametri Capillaroscopici</b>	<b>Pazienti BMS t<sub>0</sub> (Mean±SD)</b>	<b>Pazienti BMS t<sub>1</sub> (Mean±SD)</b>	<b>Pazienti BMS t<sub>2</sub> (Mean±SD)</b>	<b>Pazienti BMS P&lt;0.05</b>
<b>Incremento della Tortuosità</b>	1.87±0.019	4.98±0.039		<b>S</b>
<b>Incremento della Tortuosità</b>	1.87±0.019		3.9±0.030	<b>S</b>
<b>Incremento della Tortuosità</b>	19.28±14.96	33.13±11.48		<b>S</b>

**Tabella 5. Risultati sulla mucosa linguale. NS per valori P>0.05**

### **Discussione**

Diverse situazioni fisiopatologiche sono indicate come possibili fattori di rischio della BMS; in esse, i meccanismi circolatori sono coinvolti e assumono un ruolo importante nella genesi del dolore.<sup>14-16</sup> Si ritiene che un disturbo circolatorio locale delle aree affette da BMS possa contribuire alle sensazioni di bruciore descritte dai pazienti. Hechmann S.M. et al.<sup>17</sup> hanno esaminato il flusso di sangue delle mucose localizzate nelle aree in genere indicate dai pazienti come affette da BMS. Tra le loro più interessanti notazioni vanno senz'altro citate: la vasoreattività relativamente elevata che segue l'applicazione di ghiaccio secco nei pazienti affetti da BMS rispetto a pazienti sani e la reazione notevolmente più sensibile sul palato duro nei pazienti con BMS, rispetto ai pazienti del gruppo di controllo. Non sono state rilevate differenze significative, invece, in altre aree esaminate, quali il vestibolo e la lingua. La stimolazione con ghiaccio secco non ha alterato significativamente

la frequenza cardiaca, e la concentrazione di CO<sub>2</sub> non ha evidenziato sensibili differenze tra i due gruppi. Dato ciò, questi parametri possono essere esclusi quali cause dell'alterazione del flusso sanguigno, e di conseguenza, i cambiamenti rilevati sembrano essere legati ai sintomi della BMS, sottintendendo una vasoreattività "disturbata" in pazienti che presentano questo tipo di disordine.

Altri autori hanno ipotizzato una temperatura più bassa della lingua in soggetti affetti da BMS, dato che potrebbe indicare alterazione delle funzioni autonome. Infine, alcuni ricercatori hanno scoperto abitudini parafunzionali nei pazienti affetti da BMS, come digrignare i denti e/o bruxismo, o abituale pressione della lingua contro i denti, che potrebbe condurre a cambiamenti nel flusso sanguigno intra-orale.

Riassumendo, i risultati evidenziati sembrano dimostrare che una regolazione alterata della circolazione sanguigna nelle mucose giochi un ruolo importante nella sintomatologia della BMS; in altri termini, sembra che la BMS sia il risultato di un'affezione o affligga l'unità microcircolatoria neurovascolare (controllo circolatorio della innervazione autonoma e sensoriale).

Come si evince dai risultati, l'agopuntura contribuisce a influenzare la microcircolazione nei pazienti affetti da BMS, determinando una riduzione del dosaggio e dell'apporto di prodotti anti-infiammatori e, di conseguenza, un miglioramento del quadro sintomatologico. La BMS è stata esaminata secondo le teorie della Medicina Tradizionale Cinese in un unico studio, che ha osservato le risposte ad una terapia ad onde millimetriche in pazienti affetti da sindrome da burning mouth.

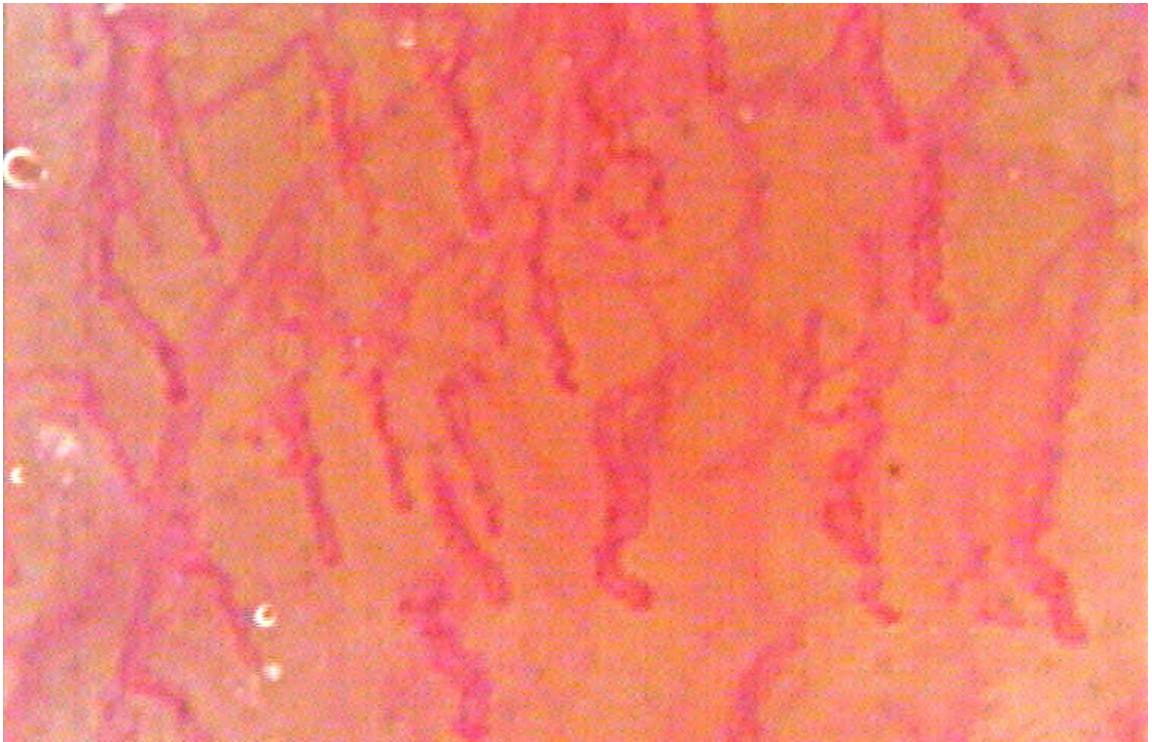
I risultati dello studio citato hanno dimostrato che l'irradiazione di un punto olografico con un'onda millimetrica può migliorare la percezione del dolore nel paziente, il livello di sangue extravasale e le condizioni del sistema nervoso autonomo.

In ambito odontostomatologico, è provata l'efficacia dell'agopuntura nella terapia del dolore oro-facciale derivante da disordini delle terminazioni trigeminali così come la marcata capacità anestesiológica. La nostra ricerca ha, pertanto, valutato la microcircolazione orale in pazienti affetti da BMS sotto agopuntura.

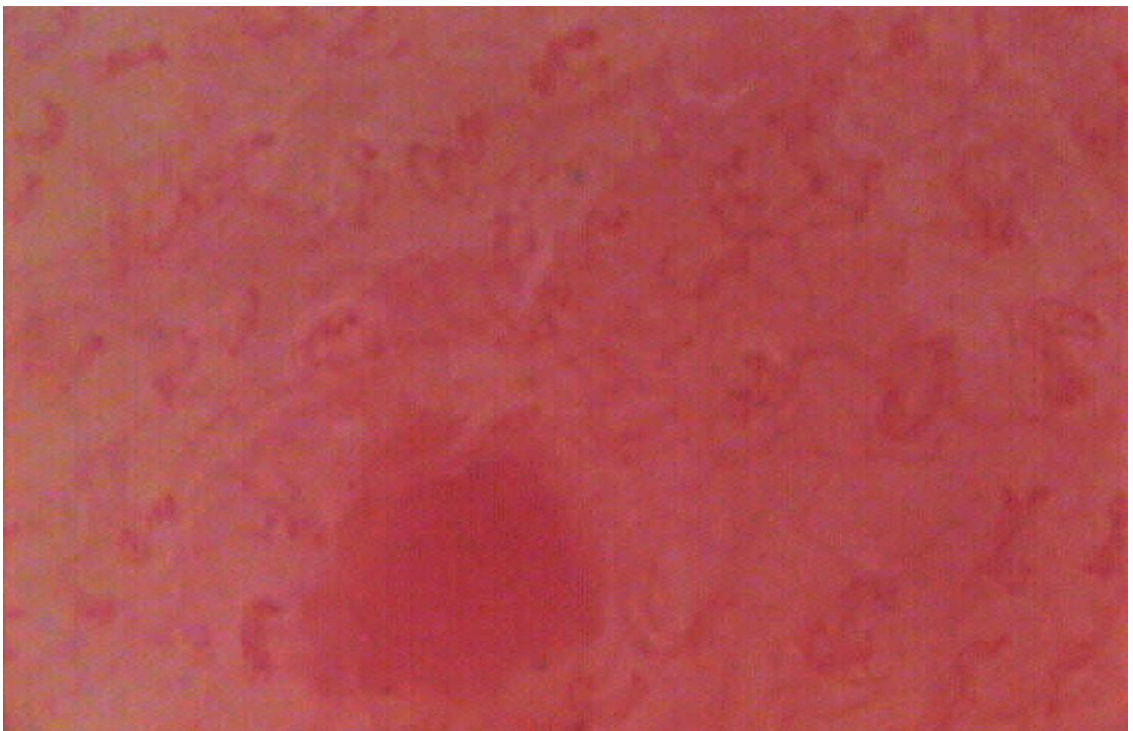
Da un punto di vista capillaroscopico, gli effetti della stimolazione di specifici punti è apparsa estemporaneamente and evidentemente durante l'esame della stessa. Invece, da un punto di vista sintomatico, i primi risultati sono stati evidenti a partire dalla terza sessione di agopuntura, in seguito alla quale i pazienti dichiaravano di avvertire una riduzione significativa del dolore e della sensazione di bruciore. Nei sei mesi successivi, i risultati erano invariati e il sintomo considerevolmente attenuato con una terapia mensile più forte. L'osservazione in vivo della microcircolazione ha rivelato che, attraverso la stimolazione di un cambiamento del pattern vascolare con una diminuzione dei loops arborescenti e l'aumento della densità vascolare, l'agopuntura può determinare un pattern vascolare compatibile con la fisiologia della microcircolazione ed una conseguente riduzione dei sintomi. La tendenza, in ogni caso, a ritornare ad un pattern vascolare che è caratteristico dei pazienti normali, rende essenziale prescrivere alcune sessioni mensili di agopuntura allo scopo di ristabilire i normali parametri micro circolatori. Tali risultati sono

chiaramente significativi, ma necessitano di essere riesaminati a distanza di tempo con l'obiettivo di capire se gli effetti incoraggianti osservati sono causati dal forte impatto psicologico della tecnica adoperata – quindi solamente temporanei – o da un effetto vaso-stabilizzante che potrebbe indurre un decremento dei metaboliti pro-infiammatori e interrompere il loop negativo alla base del processo di cronicizzazione della malattia.

Lo studio ha dimostrato come l'agopuntura influenzi la microcircolazione orale determinando, dopo tre settimane di terapia, variazioni del pattern vascolare a cui si associa la significativa riduzione della sensazione di bruciore. Tale riduzione del disturbo si è protratta per i diciotto mesi che sono seguiti alla pratica della terapia con agopuntura. Alla luce dei dati raccolti e osservati, l'agopuntura si configura, dunque, quale valida alternativa terapeutica nella gestione di questa tipologia di pazienti. (75)



**Fig 18. Immagine capillaroscopica paziente BMS nella fase  $t_0$ .  
Ingrandimento 200X**



**Fig.19 Immagine capillaroscopica paziente BMS nella fase t<sub>1</sub>.  
Ingrandimento 200X**



**Fig. 20 Immagine capillaroscopica paziente BMS nella fase t<sub>2</sub>.  
Ingrandimento 200X**

## CONCLUSIONI

In questi tre anni di dottorato, La Burning Mouth Syndrome è stata studiata sotto tutti i punti di vista, etiopatogenetico, diagnostico e terapeutico.

Le sperimentazioni portate avanti sono state tutte originali ed innovative. Infatti, non esistono studi in letteratura su studi di immunoistochimica su prelievo biotico, sull'analisi dei polimorfismi genici o su una alternativa terapeutica come l'agopuntura.

Purtroppo, l'indagine dell'espressione di Nf- $\kappa$ B non ha dato i risultati previsti e non si potuto procedere con la somministrazione di farmaci volti ad inibire il sistema enzimatico.

L'analisi polimorfismo genici non era previsto nel protocollo originale, ed è stato introdotto in corso d'opera perché era una prospettiva troppo interessante per non essere indagata. Questo studio pilota non ha dato risultati eclatanti perché necessita di numeri molto maggiori per dare risultati affidabili. Certamente, è uno studio che dovrà essere continuato specie perché avrebbe un risvolto importante dal punto di vista diagnostico.

Dal punto di vista terapeutico, sono stati prodotti risultati molto interessanti. L'agopuntura ha avuto sui pazienti affetti da BMS



ottimi risultati e sebbene considerata medicina “alternativa” si pone come un metodo utile nella terapie della BMS.

## **Bibliografia**

1. Maltzman-Tseikhin A, Moricca P, Niv D Burning mouth syndrome: will better understanding yield better management? *Pain Pract.* 2007;7(2):151-62.
2. Mínguez Serra MP, Salort Llorca C, Silvestre Donat FJ Pharmacological treatment of burning mouth syndrome: A review and update *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007; 1;12(4):E299-304.
3. Park TJ, Comer C, Carol A, Lu Y, Hong HS, Rice FL Somatosensory organization and behavior in naked mole-rats: II. Peripheral structures, innervation, and selective lack of neuropeptides associated with thermoregulation and pain. *J Comp Neurol.* 2003;6;465(1):104-20.
4. Yilmaz Z, Renton T, Yiangou Y, Zakrzewska J, Chessell IP, Bountra C, Anand P. Burning mouth syndrome as a trigeminal small fibre neuropathy: Increased heat and capsaicin receptor TRPV1 in nerve fibres correlates with pain score. *J Clin Neurosci.* 2007 Sep;14(9):864-871.
5. Lauria G, Majorana A, Borgna M, Lombardi R, Penza P, Padovani A, Sapelli P. Trigeminal small-fiber sensory neuropathy causes burning mouth syndrome *Pain.* 2005;115(3):332-7
6. Scardina GA, Carini F, Messina P Vasodilatation of human gingiva and neurogenic inflammation. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2005;32(4):279-85.
7. Scardina GA, Carini F, Valenza V, Messina P. Topical capsaicin application and axon reflex vasodilatation of the tongue: neurogenic involvement in burning mouth syndrome. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2006 Dec;28(10):707-11

8. Chen Q, Xia J, Lin M, Zhou H, Li B. Interleukin-6 in patients with burning mouth syndrome and relationship with depression and perceived pain."Mediators Inflamm. 2007;(1):45327
9. Simčić D, Pezelj-Ribarić S, Grzić R, Horvat J, Brumini G, Muhvić-Urek M Detection of salivary interleukin 2 and interleukin 6 in patients with burning mouth syndrome.Mediators Inflamm. 2006;(1):54632
10. Lee JC, Kundu JK, Hwang DM, Na HK, Surh YJ. Humulone inhibits phorbol ester-induced COX-2 expression in mouse skin by blocking activation of NF- $\kappa$ B and AP-1: I $\kappa$ B kinase and c-Jun-N-terminal kinase as respective potential upstream targets. Carcinogenesis. 2007;28(7):1491-8
11. Gilmore TD (2006) Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. Oncogene. 2006;25(51):6680-4.
12. Fionda C, Nappi F, Piccoli M, Frati L, Santoni A, Cippitelli M.: "15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-Prostaglandin J2 Negatively Regulates rankl Gene Expression in Activated T Lymphocytes: Role of NF- $\kappa$ B and Early Growth Response Transcription Factors. J Immunol. 2007;178(7):4039-50.
13. Boras VV, Savage NW, Brailo V, Lukac J, Lukac M, Alajbeg IZ Salivary and serum levels of substance P, neurokinin A and calcitonin gene related peptide in burning mouth syndrome. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2010;15(3):e427-31.
14. Klasser GD, Fischer DJ, Epstein JB. Burning mouth syndrome: recognition, understanding, and management. Oral Maxillofac Surg Clin North Am. 2008;20(2):255-71

15. Grushka M, Ching V, Epstein J. Burning mouth syndrome. *Adv Otorhinolaryngol.* 2006;63:278-87.
16. Brufau-Redondo C, Martín-Brufau R, Corbalán-Velez R, de Concepción-Salesa A. Burning mouth syndrome. *Actas Dermosifiliogr.* 2008 Jul-Aug;99(6):431-40
17. Scala A, Checchi L, Montevicchi M, Marini I, Giamberardino MA. Update on burning mouth syndrome: overview and patient management. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(4):275-91.
18. López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Andujar-Mateos P, Sánchez-Siles M, Gómez-García F. Burning mouth syndrome: an update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010 ;15(4):e562-8.
19. Messina P, Scardina GA. *Patologia delle Mucose Orali.* 2010. Aracne Editrice. Cap. VII La Sindrome della bocca che brucia.
20. Woda A. A "dysfunctional" pain group in addition to the "neuropathic" and "nociception/inflammatory" groups of orofacial pain entities? *J Orofac Pain.* 2009;23(2):89-90.
21. Grémeau-Richard C, Dubray C, Aublet-Cuvelier B, Ughetto S, Woda A. Effect of lingual nerve block on burning mouth syndrome (stomatodynia): a randomized crossover trial. *Pain.* 2010;149(1):27-32.
22. Zakrzewska JM. Critical commentary 1: steroid dysregulation and stomatodynia (burning mouth syndrome). *J Orofac Pain.* 2009;23(3):211-3
23. Zakrzewska JM, Forssell H, Glenny AM. Interventions for the treatment of burning mouth syndrome. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005;(1):CD002779.

24. Eliav E, Nasri-Heir C. Critical commentary 2: steroid dysregulation and stomatodynia (burning mouth syndrome). *J Orofac Pain*. 2009;23(3):214-5
25. El-Etr M. Critical commentary 3: steroid dysregulation and stomatodynia (burning mouth syndrome). *J Orofac Pain*. 2009;23(3):216-8
26. Mock D, Chugh D. Burning mouth syndrome. *Int J Oral Sci*. 2010;2(1):1-4.
27. Minguéz-Sanz MP, Salort-Llorca C, Silvestre-Donat FJ. Minguéz-Sanz MP, Salort-Llorca C, Silvestre-Donat FJ. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011;16(2):e144-8.
28. Lundy FT, Linden GJ. NEUROPEPTIDES AND NEUROGENIC MECHANISMS IN ORAL AND PERIODONTAL INFLAMMATION. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(2):82-98.
29. Staud R, Spaeth M. Psychophysical and neurochemical abnormalities of pain processing in fibromyalgia. *CNS Spectr*. 2008;13(3 Suppl 5):12-7.
30. Penza P, Majorana A, Lombardi R, Camozzi F, Bonadeo S, Sapelli P, Lauria G. "Burning tongue" and "burning tip": the diagnostic challenge of the burning mouth syndrome. *Clin J Pain*. 2010 Jul-Aug;26(6):528-32.
31. Torgerson RR. Burning mouth syndrome. *Dermatol Ther*. 2010;23(3):291-8.
32. Balasubramaniam R, Klasser GD, Delcanho R. Separating oral burning from burning mouth syndrome: unravelling a diagnostic enigma. *Aust Dent J*. 2009;54(4):293-9.

33. Rivinius C. Burning mouth syndrome: Identification, diagnosis, and treatment. *J Am Acad Nurse Pract.* 2009;21(8):423-9. *J Am Acad Nurse Pract.* 2009;21(8):423-9.
34. López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Lucero Berdugo M. Measuring the impact of oral mucosa disease on quality of life. *Eur J Dermatol.* 2009;19(6):603-6.
35. Femiano F, Gombos F, Scully C. Burning mouth syndrome: the efficacy of lipoic acid on subgroups. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2004;18(6):676-8.
36. Femiano F, Gombos F, Scully C. Burning Mouth Syndrome: open trial of psychotherapy alone, medication with alpha-lipoic acid (thioctic acid), and combination therapy. *Med Oral.* 2004;9(1):8-13.
37. López-D'alessandro E, Escovich L. Combination of alpha lipoic acid and gabapentin, its efficacy in the treatment of Burning Mouth Syndrome: A randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010 Aug 15.
38. Heckmann SM, Heckmann JG, Ungethüm A, Hujoel P, Hummel T. Gabapentin has little or no effect in the treatment of burning mouth syndrome - results of an open-label pilot study. *Eur J Neurol.* 2006;13(7):e6-7.
39. Zakrzewska JM. Medical management of trigeminal neuropathic pains. *Expert Opin Pharmacother.* 2010;11(8):1239-54.
40. Marino R, Torretta S, Capaccio P, Pignataro L, Spadari F. Different therapeutic strategies for burning mouth syndrome: preliminary data. *J Oral Pathol Med.* 2010;39(8):611-6. doi: 10.1111/j.1600-0714.2010.00922.x.

41. Barker KE, Batstone MD, Savage NW. Comparison of treatment modalities in burning mouth syndrome. *Aust Dent J.* 2009;54(4):300-5
42. López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Andujar-Mateos P. A prospective, randomized study on the efficacy of tongue protector in patients with burning mouth syndrome. *Oral Dis.* 2011;17(3):277-82. doi: 10.1111/j.1601-0825.2010.01737.x.
43. Mínguez Serra MP, Salort Llorca C, Silvestre Donat FJ. Pharmacological treatment of burning mouth syndrome: A review and update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007;12(4):E299-304.
44. Scardina GA, Ruggieri A, F. Carini, A. Cacioppo, V. Valenza and P. Messina Nf-k B as Target of Pharmacological Treatment Research *Journal of Biological Sciences.*2007; 2 (4): 403-407.
45. Russell PJ, *Genetica.* Ed. Edises, 2004.
46. Janeway CA, Tramer Jr, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiologia.* Ed Piccin,2007.
47. Dale JW, von Schantz M. *Dai Geni ai Genomi “principi e applicazioni del DNA ricombinante”.* Ed. Edises, 2006.
48. Park J, Linde K, Manheimer E, et al. The status and future of acupuncture clinical research. *J Altern Complement Med* 2008;14:871–81.
49. Litscher G. Bioengineering assessment of acupuncture, part 2: monitoring of microcirculation. *Crit Rev Biomed Eng* 2006;34:273–94.

50. Lundeberg T, Lund I, Na'slund J. Acupuncture-self-appraisal and the reward system. *Acupunct Med* 2007;25:87–99.
51. Hsiu H, Huang SM, Chao PT. Study on the microcirculatory blood velocity of acupoint monitored by laser Doppler signal. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2007:959–62.
52. Hsiu H, Huang SM, Chao PT. Microcirculatory characteristics of acupuncture points obtained by laser Doppler flowmetry. *Physiol Meas* 2007;28:77–86.
53. Bu'rklein M, Banzer W. Non-invasive blood flow measurement over acupuncture points (Gb21): a pilot study. *J Altern Complement Med* 2007;13:33–7.
54. Cui SY, Tang CZ. Progress in the research of neuroendocrine-immunological mechanism of acupuncture in regulating blood pressure and protecting target organs in hypertension. *Zhen Ci Yan Jiu* 2008;33:208–12.
55. MacPherson H, White A, Cummings M, et al. STRICTA Group. Standards for reporting interventions in controlled trials of acupuncture: the STRICTA recommendations. *J Altern Complement Med* 2002;8:85–9.
56. Scardina GA, Cacioppo A, Carini F, et al. Periodontal morphological microcirculation in oral lichen planus. *Ital J Anat Embryol* 2007;112:281–91
57. Scardina GA, Carini F, Messina P. [Oral capillaroscopy: a new diagnostic method.] *Reumatismo* 2005;57:295–304. (In Italian.)



60. Yang HY, Zhong XH, Liu TY, et al. Impact of different emulated acupuncture-needle manipulations on blood pressure and myocardial angiotensin II content in spontaneous hypertension rats. *Zhen Ci Yan Jiu* 2008;33:186–90.
61. Garrow D, Egede LE. National patterns and correlates of complementary and alternative medicine use in adults with diabetes. *J Altern Complement Med* 2006;12:895–902
62. Luo MF, Li CH, Zhang D, et al. Influence of Qingpeng plaster on blood vessels and mast cells in skin tissue of channel points of nude mice. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2008;33:816–18.
63. Komori M, Takada K, Tomizawa Y, et al. Microcirculatory responses to acupuncture stimulation and phototherapy. *Anesth Analg* 2009;108:635–40.
64. Banzer W, Hu'bscher M, Seib M, et al. Short-time effects of laser needle stimulation on the peripheral microcirculation assessed by laser Doppler spectroscopy and nearinfrared spectroscopy. *Photomed Laser Surg* 2006;24:575–80.
65. Hsieh CL, Chang YM, Tang NY, et al. Time course of changes in nailfold microcirculation induced by acupuncture stimulation at the waiguan acupoints. *Am J Chin Med* 2006;34:777–85.
66. Goddard G. Short term pain reduction with acupuncture treatment for chronic orofacial pain patients. *Med Sci Monit* 2005;11:71–4.
67. Wu YT, Liu LA. Advances of clinical studies on acupuncture and moxibustion for treatment of periodontitis. *Zhongguo Zhen Jiu* 2007;27:620–2

68. Braga FP, Sugaya NN, Hirota SK, et al. The effect of acupuncture on salivary flow rates in patients with radiation-induced xerostomia. *Minerva Stomatol* 2008;57:343–8.
69. Reiss M, Reiss G. Sialorrhoea—causes and treatment options. *Med Monatsschr Pharm* 2007;30:327–32.
70. Morganstein WM. Acupuncture in the treatment of xerostomia: clinical report. *Gen Dent* 2005;53:223–6
71. Jedel E. Acupuncture in xerostomia—a systematic review. *J Oral Rehabil* 2005;32:392–6.
72. Cho JH, Chung WK, Kang W, et al. Manual acupuncture improved quality of life in cancer patients with radiation-induced xerostomia. *J Altern Complement Med* 2008;14:523–6
73. Scardina GA, Pisano T, Carini F, et al. Burning mouth syndrome: an evaluation of in vivo microcirculation. *J Am Dent Assoc* 2008;139:940–6.
74. Scardina GA, Ruggieri A, Provenzano F, Messina P. The effect of acupuncture on oral microcirculation in healthy volunteers: an exploratory study. *Acupunct Med*. 2009 Sep;27(3):114-7.
75. Scardina GA, Ruggieri A, Provenzano F, Messina P. Burning mouth syndrome: is acupuncture a therapeutic possibility? *Br Dent J*. 2010 Jul 10;209(1):E2. Epub 2010 Jul 2.