

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Mediche generali e dei Servizi: progetto n.1

Medicina Materno-Infantile e dell' Età evolutiva e Fisiopatologia dello Sviluppo Sessuale.

Ciclo XXIII

PEDIATRIA GENERALE E SPECIALISTICA MED38

STUDIO DELLA FUNZIONALITA' RESPIRATORIA IN SOGGETTI CON SINDROME DI TURNER

Presentata da: Sara Forti

Coordinatore Dottorato

Prof. Luigi Bolondi

Relatore

Prof. Piero Pirazzoli
Dr. Salvatore Cazzato

INDICE DEI CONTENUTI

CAP 1.: GENERALITA' SULLA SINDROME DI TURNER.....	pag. 4
1.1 Definizione.....	4
1.2 Storia.....	4
1.3 Alterazioni cromosomiche.....	5
1.4 Clinica.....	6
1.5 Terapia.....	15
CAP. 2: VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITA' RESPIRATORIA	19
2.1 Misura della funzionalità respiratoria: la spirometria	19
2.2 Misura dei volumi polmonari.....	22
CAP. 3: IL NOSTRO STUDIO	24
3.1 Obiettivi dello studio.....	24
3.2 Disegno dello studio.....	25
3.3 Materiali e Metodi.....	25
3.4. Gestione dei dati ed analisi statistica	27
CAP.4: RISULTATI E CONCLUSIONI.....	29
4.1. Risultati	29
4.2. Conclusioni	30
Grafici.....	31
Bibliografia	34

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI UTILIZZATE NEL TESTO

CRF	Case Report Form-Scheda Raccolta Dati
TLC	Total Lung Capacity
FVC	Forced Vital Capacity
PEF	Peak Espiratory Flow
RV	Residual Volume
VC	Vital Capacity
FEV1 o VEMS	Forced Expiratory Volume in 1 second
FEF 25-75	Forced Expiratory Flow 25-75%
ENO	Exhaled Nitric Oxide
DLCO	Carbon Monoxide Diffusing Capacity
FSH	Follicle Stimulating Hormone
LH	Luteotrophin Hormone

CAP. 1: GENERALITÀ SULLA SINDROME DI TURNER

1.1 DEFINIZIONE

La sindrome di TURNER rappresenta una delle più frequenti anomalie cromosomiche, la cui eziologia si può ascrivere ad una monosomia parziale o totale del cromosoma X, completo o in mosaico. Caratteristiche di questa sindrome sono la bassa statura, la disgenesia gonadica, le stigmate malformative fenotipiche, le malformazioni cardiache e renali, l'osteopenia.

La frequenza della sindrome varia da 1:1500 a 1:2500 nate vive, ma è bene ricordare che il 99,9% dei concepimenti affetti da sindrome di Turner non sopravvivono oltre la 28^o settimana.

1.2 STORIA

Fu Morgagni, nel 1768, il primo a descrivere alcune delle caratteristiche cliniche della sindrome. Egli descrisse un caso di una donna che presentava bassa statura, amenorrea primaria, pterigio del collo, cubito valgo, nevi cutanei e all'esame anatomico patologico agenesia ovarica e malformazione renale. In seguito altri Autori pubblicarono casi analoghi, tra i quali il pediatra tedesco Ullrich, che nel 1930 descrisse una bambina di 8 anni con un analogo quadro malformativo.

Nel 1938 H. Turner descrisse, in 7 pazienti adulte, un quadro caratterizzato da bassa statura, accompagnata da alcuni caratteri fenotipici già descritti da Ullrich, a cui si associava infantilismo sessuale, da lui attribuito ad una insufficienza ipofisaria. Questo elemento non era invece presente nella paziente di Ullrich, in quanto era in età prepuberale.

Gli studi successivi mirarono soprattutto a chiarire l'aspetto endocrinologico della sindrome. Nel 1942 Albright et al. e Warney et al. misero in evidenza un'alta escrezione urinaria di gonadotropine ed un basso livello di estrogeni circolanti. Nel 1944 Wilkins e Fleischmann osservarono che le pazienti affette da sindrome di Turner classica presentavano in sostituzione delle ovaie, delle formazioni allungate, fibrotiche, bilaterali, parallele al decorso delle salpingi, del tutto prive di cellule germinali. Queste benderelle fibrotiche furono chiamate "streak", termine adottato dalla letteratura internazionale, e tali osservazioni permisero di inquadrare la sindrome come una "disgenesia gonadica".

Nel 1954, Decourt e Polani et al. scoprirono che il test cromatinico di BARR risultava positivo secondo la definizione "maschile" di allora e ciò portò erroneamente alla conclusione che le pazienti, sebbene fossero fenotipicamente femmine, avevano un corredo genetico maschile, tanto che la sindrome di Turner fu inquadrata nel gruppo delle intersessualità.

Nel 1959 Ford et al. chiarirono definitivamente l'origine genetica della sindrome, tramite la scoperta della sua vera causa, che consisteva nell'assenza di uno dei due cromosomi sessuali X.

In seguito furono rilevate numerose altre anomalie cromosomiche specifiche legate a questa sindrome, fra le quali diversi tipi di mosaicismo, la delezione delle braccia della X, l'isocromosoma X e il cromosoma X ad anello.

Oggi la determinazione del cariotipo ha raggiunto, con l'introduzione delle metodiche di bandeggiamento, un grado di accuratezza e precisione elevato.

Inoltre, essendo l'analisi del DNA una tecnica relativamente più rapida e sensibile rispetto all'analisi citogenetica, soprattutto per quanto riguarda i casi di mosaicismo, essa è stata proposta in alternativa a quest'ultima per lo screening della sindrome di Turner.

1.3 ALTERAZIONI CROMOSOMICHE

La monosomia completa del cromosoma X è l'anomalia più frequente della sindrome di Turner e compare con un'incidenza compresa fra il 42% e il 75% dei casi, secondo le varie statistiche. La caratteristica di questo cariotipo è quella di avere, in tutte le cellule esaminate, o solo in una parte di esse se si tratta di un mosaicismo, 45 autosomi e uno solo dei due cromosomi sessuali X. I meccanismi che possono determinare l'assetto genetico 45,X sono multipli, fra cui probabilmente:

- non disgiunzione di un cromosoma sessuale durante la meiosi di uno dei genitori o durante la prima mitosi dell'uovo fecondato. Questo secondo meccanismo spiega la presenza dei mosaicismi. Alcune ricerche hanno messo in evidenza che nel 60% dei casi è il cromosoma paterno X che viene perso durante la meiosi. Pare che non ci sia né correlazione con l'età materna, né una predisposizione familiare.
- traslocazione bilanciata: se un genitore ha un cromosoma X attaccato ad un altro cromosoma, il suo patrimonio genetico totale è normale, ma il numero totale dei suoi cromosomi risulta alterato. Se invece si ha una traslocazione parziale del cromosoma X, le caratteristiche della sindrome di Turner dipenderanno dal punto di attacco del cromosoma X traslocato.

È stimato che solo il 3% degli embrioni con sindrome di Turner con cariotipo 45,X arriva a termine di gravidanza e che il 5-10% degli aborti spontanei hanno questo cariotipo.

Proprio grazie a queste osservazioni si è fatta strada l'ipotesi che la maggior parte, se non tutte le pazienti con perdita totale di un cromosoma X, sono dei mosaici e hanno alcune cellule normali in alcuni tessuti o le abbiano nella loro placenta.

Più raramente la sindrome di Turner può essere il risultato di una perdita parziale del cromosoma X, dovuta a:

- divisione trasversa, con formazione di un isocromosoma, costituito dalle due braccia lunghe o, meno frequentemente dalle due corte, del segmento cromosomico. Dato che queste sezioni del cromosoma X contengono informazioni differenti, il fenotipo delle pazienti può variare: normalmente le pazienti con cariotipo 46,Xi(Xq) presentano le caratteristiche tipiche della sindrome di Turner, mentre quelle con cariotipo 46Xi(Xp) hanno una disgenesia ovarica meno importante ed un minore interessamento staturale;
- delezione maggiore o minore del braccio lungo o corto;

- formazione di un cromosoma ad anello con perdita più o meno ingente di materiale cromosomico nel punto di fusione delle due estremità.

Il fenotipo delle pazienti affette da sindrome di Turner dipende dai geni, presenti sul cromosoma X, che sfuggono all' inattivazione. Nella porzione autosomica di questo cromosoma X, esiste una regione, chiamata PAR1, nella quale è contenuto il gene SHOX, che sembra essere di importanza fondamentale per il controllo della crescita staturale sia nelle bambine con sindrome di Turner che nei pazienti con bassa statura idiopatica.

Un altro importante rilievo è la presenza, talvolta, di materiale del cromosoma Y in una linea cellulare in un mosaicismo, perchè può portare alla insorgenza di un gonadoblastoma. Il rischio per tale complicanza è, in alcuni studi, maggiore del 30%, mentre in altri studi si aggira intorno al 7-10%. La gonadectomia rimane comunque la procedura di scelta per escludere con assoluta certezza la presenza di malignità.

1.4 CLINICA

I numerosi studi fino ad oggi condotti su soggetti con sindrome di Turner hanno permesso di definire alcune sue caratteristiche di base;

le più rilevanti sono:

- i segni fenotipici;
- la bassa statura;
- la disgenesia gonadica.

1.4.1 Segni fenotipici

La sindrome di Turner è caratterizzata da numerose ed eterogenee alterazioni del fenotipo, non sempre però presenti contemporaneamente. Il fenotipo esterno ed interno delle pazienti sarà più o meno sfumato a seconda del diverso cariotipo presente nelle stesse.

Nel 1984 è stato condotto presso la nostra Clinica (Mazzanti et al., 1984) uno studio proprio sulla correlazione esistente fra il grado di alterazioni fenotipiche e il tipo di disordine cromosomico. Fu ritrovato che i soggetti con monosomia completa ed omogenea della X presentano, rispetto agli altri soggetti a diverso cariotipo, un'incidenza maggiore di stigmati malformative soprattutto a carico del collo, che più spesso è corto e tozzo, e delle orecchie, che sono più spesso grandi e malformate. Al contrario, tali segni sono stati riscontrati in misura molto minore, nei soggetti con isocromosoma della X totale o in mosaico. In particolare, nelle pazienti con isocromosoma della X, se confrontate con quelle con monosomia completa della X, non c'è mai pterigio, le orecchie grandi sono presenti in una percentuale significativamente più bassa dei casi, ed è meno frequente sia la presenza di un collo corto e tozzo sia il basso impianto dei capelli; inoltre in un solo soggetto era presente linfedema congenito delle mani e dei piedi. Il cariotipo 45X/46Xr(X), pur essendo anch'esso una anomalia strutturale della X, comporta sul piano fenotipico un quadro malformativo più rassomigliante a quello dei soggetti 45,X rispetto a quello degli isocromosomi stessi.

Le anomalie fenotipiche, più specificatamente, riguardano:

- Occhi: spesso mostrano una leggera alterazione nella posizione e nella forma della rima palpebrale (ipertelorismo ed epicanto), con orientamento spesso antimongoloide.

I disturbi visivi più tipici sembrano essere lo strabismo e la discromatopsia.

- Orecchie: sono caratterizzate da un basso impianto dei padiglioni auricolari con un bordo meno sviluppato del normale.

La ventilazione a livello dell'orecchio medio sembra essere ridotta per cause anatomiche e questo aumenta il rischio di otiti medie; infatti l'otite media bilaterale compare nel 75% delle pazienti.

Difetti uditivi neurosensoriali sono comuni e aumentano con l'età.

- Bocca: il palato mostra una tipica forma ad arco acuto (palato "gotico"). Può essere presente uno scarso sviluppo della mandibola (micrognatia) e spesso la bocca è a "carpa".

- Cute e annessi: in epoca neonatale i segni orientativi sono rappresentati dal linfedema del dorso delle mani e dei piedi, da "cutix laxa" e pterigio. Queste alterazioni sono presenti precocemente nel feto e sarebbero in rapporto con un insufficiente sviluppo del sistema linfatico.

Anche la presenza di nevi pigmentati in numero maggiore rispetto al normale costituisce una peculiarità della sindrome; questi solitamente sono benigni ma tendono ad accrescersi durante la pubertà.

Può essere anche presente una irregolare perdita del pigmento cutaneo (vitiligo).

A volte è possibile riscontrare sia un aumentato sviluppo dei peli corporei, soprattutto a livello dell'avambraccio, sia alopecia del cuoio capelluto. Inoltre l'attaccatura posteriore dei capelli può essere bassa.

È di solito presente iperconvessità delle unghie delle dita delle mani e dei piedi.

- Collo: tipica caratteristica della sindrome è il collo che appare corto e tozzo. Nei diversi casi di pterigio marcato, il contorno del collo può essere completamente perso quando visto di fronte (aspetto "a sfinge").

- Regione toracica : il torace è, in genere, più largo del normale (torace "a scudo") e, occasionalmente può essere presente un pectus excavatum, associato o meno a teletelia, cioè ipoplasia ed eccessiva distanza tra le areole mammarie.

- Apparato scheletrico: le dita possono essere corte, con falangi distali piuttosto allargate. Spesso è presente una riduzione di lunghezza del quarto osso metacarpale (segno di Archibald positivo alla radiografia).

Le stesse alterazioni possono essere riscontrate a livello dei piedi.

Uno dei classici segni descritti da Turner è il cubito valgo, cioè un aumento della deviazione dell'avambraccio sul braccio, nella direzione del radio, quando l'arto è completamente esteso.

Può anche essere presente un'agenesia del condilo mediale della tibia (segno di Kosowicz positivo alla radiografia).

La maturazione ossea è in genere ritardata rispetto all'età cronologica, almeno durante i primi tre anni di vita. Successivamente la maturazione ossea progredisce normalmente fino ai dieci anni, per poi rallentare nuovamente.

Per quanto riguarda il contenuto minerale dell'osso, numerosi studi hanno evidenziato una sua significativa riduzione rispetto all'età cronologica.

La ritardata maturazione dell'osso e le sue ridotte dimensioni possono, però, determinare una sottostima della componente minerale ossea nelle pazienti Turner. Infatti, quando viene confrontata la massa ossea nelle pazienti con quella di persone della stessa età ossea, invece che cronologica, le differenze risultano meno pronunciate. Non è stata trovata una correlazione tra il cariotipo e la severità dell'osteopenia.

- Apparato cardiovascolare: la patologia malformativa cardiovascolare nella sindrome di Turner ha una prevalenza significativamente più elevata rispetto alla restante popolazione femminile (2%). L'unico studio non cardiologicamente preselezionato e condotto su un numero molto elevato di pazienti (circa 600) riporta una prevalenza del 23 % (Mazzanti et al., 1998).

Le malformazioni che ricorrono più frequentemente sono :

- valvola aortica bicuspidale (12,5 %)
- coartazione aortica (6,9 %)
- valvulopatia aortica (3,2%)
- ritorno venoso anomalo parziale delle vene polmonari (2,9%)

Le anomalie cardiovascolari sono la prima causa di morte nelle pazienti con sindrome di Turner.

L'ipertensione è frequente nelle pazienti con sindrome di Turner anche in assenza di malformazioni renali e cardiache, per questo dovrebbe essere misurata ad ogni controllo.

Una ricerca, condotta da Sybert nel 1998 su 156 pazienti, mostra che le anomalie cardiovascolari, strutturali o funzionali, compaiono nel 56% dei soggetti ed includono il prolasso della valvola mitrale, l'ipertensione e alcuni difetti di conduzione, oltre a quelli già citati. In particolare la coartazione dell'aorta associata alla valvola aortica bicuspidale comprende più del 50% di tutte le malformazioni.

Nella sindrome di Turner sono inoltre riportate alterazioni nel profilo lipidico e glucidico, ipertensione arteriosa ed anomalie dei fattori della coagulazione.

In particolare, alcuni studi mostrano come queste pazienti presentino un significativo incremento nei livelli sierici del colesterolo totale rispetto ai soggetti con normale cariotipo e tale incremento è maggiormente evidenziabile a partire dall'età di 11 anni. È stimato che il 50% dei soggetti con sindrome di Turner sia affetto da ipercolesterolemia (Garden et al., 1999) e da ipertrigliceridemia, forse quest'ultima come diretta conseguenza di obesità e iperinsulinemia, due anomalie frequentemente associate alla sindrome.

È anche possibile un'associazione fra ipotiroidismo, compensato o insufficientemente trattato, con elevati livelli di colesterolo LDL, apolipoproteina B e malattia aterosclerotica.

L'aumento di morbilità e mortalità correlato a questo modificato assetto lipidico è indipendente dalle cardiopatie malformative così frequenti in questa patologia. Il deficit estrogenico cronico, comune nelle Turner adulte, è invece implicato.

Anche un aumento di apolipoproteina A1 (ApoA1), o per diminuita degradazione o per un aumento della sua sintesi, è stato riscontrato in alcuni soggetti e probabilmente è legato ad una minore degradazione di lipoproteine ad alta densità (HDL). Ciò è sorprendente se si pensa che HDL e

ApoA1 sono correlate con un minor rischio aterosclerotico e comunque questo dato enfatizza l'ipotesi che molti altri fattori influiscano sull'elevato rischio cardiovascolare che affligge le pazienti con sindrome di Turner.

Studi sulla lipoproteina A (Lp(a)), che risulta essere presente in maggior concentrazione nelle donne in post-menopausa e che ha un certo peso sulla cardiopatia coronarica, mostrano come anche questo fattore sia frequente in questi soggetti.

Gravholt et al., 1999, hanno rilevato l'impatto della terapia con 17- β -estradiolo e noretisterone sui lipidi e i risultati sono stati i seguenti: la terapia sostitutiva con ormoni steroidei in donne adulte con sindrome di Turner diminuisce i livelli di Lp(a) ed esercita minimi effetti negativi sugli altri markers lipidici.

Anche Elsheikh, Bird ed al., 1999, hanno effettuato simili ricerche evidenziando il ruolo della resistenza all'insulina e della compliance aortica sul rischio cardiovascolare. Partendo dal dato che sulla muscolatura liscia arteriolare e sulle cellule endoteliali sono presenti recettori per gli estrogeni, hanno dimostrato che l'ormono-terapia sostitutiva ha un effetto favorevole in queste pazienti, aumentando la compliance aortica e migliorando la funzionalità endoteliale, tramite il rilascio di ossido nitrico e l'inibizione della proliferazione della muscolatura liscia vascolare.

Per quanto riguarda la pressione arteriosa, numerosi lavori indicano una maggiore incidenza di ipertensione nelle pazienti Turner (Sybert, 1995), con o senza malformazioni renali o cardiache.

Secondo Landin-Wilhelmsen e Bryman la pressione sistolica e non la diastolica risulta essere più elevata, indipendentemente dal cariotipo.

L'ipertensione si manifesta nel 40% circa dei soggetti e si sviluppa durante l'infanzia, prima dell'inizio della terapia con estrogeni.

Invece, secondo altri Autori, il 17% delle pazienti presenta valori della PA diastolica e il 21% della sistolica superiori al 95° percentile per età e sesso e il 57% dei soggetti esaminati mostra un'alterazione nel normale ritmo circadiano, con caduta pressoria notturna inferiore al 10% (Natwhani et al., 2001).

C'è da dire, però, che la coartazione aortica e le anomalie renali possono essere alla base di un'ipertensione secondaria.

Gli studi riguardanti gli effetti delle terapie sono numerosi e vari. Alcuni dimostrano un decremento significativo della PA diastolica nelle pazienti in terapia con estrogeni, mentre altri non trovano una relazione chiara fra PA e terapie ormonali.

- Apparato escretore: circa il 30% dei soggetti con sindrome di Turner presenta all'esame ecografico malformazioni renali con una prevalenza maggiore rispetto alla popolazione generale (3,2%). Tale dato è stato confermato in uno studio condotto presso la nostra Clinica, nel quale si è visto anche che la malformazione con il più alto rischio relativo rispetto alla popolazione generale è l'anomalia di fusione, il rene a ferro di cavallo. Altre malformazioni meno frequenti sono il rene multicistico, la presenza di una cisti renale singola e l'agenesia renale monolaterale.

Le alterazioni della pelvi e degli ureteri, quali dilatazioni dei calici, doppio distretto ureterale completo o incompleto ed idronefrosi, sono presenti nel 13,1% delle pazienti studiate. Bisogna

sottolineare che dallo stesso studio è emerso che le pazienti con cariotipo 45,X hanno una più alta prevalenza di malformazioni renali, soprattutto rene a ferro di cavallo, rispetto alle pazienti con mosaicismo.

- Sviluppo mentale e psichico: le bambine con sindrome di Turner hanno un profilo neurocognitivo caratteristico. Le abilità verbali sono, in genere, normali, ma possono essere presenti specifici deficit nelle abilità visuo-spaziali e visuo-percettive, nella funzionalità motoria (sono infatti incapaci di camminare prima dei quindici mesi di età), nella memoria non verbale e nella capacità di attenzione. Queste caratteristiche sollevano dei dubbi circa il ritardo dello sviluppo, tuttavia l'intelligenza è normale.

Anche durante l'età adulta, così come nell'infanzia e nell'adolescenza, il quoziente intellettivo è normale, ma sono presenti difficoltà nell'integrazione sensitivo-motoria sia grossolana che fine.

La terapia con estrogeni non sembra avere un peso nell'eventuale miglioramento dei deficit cognitivi nelle donne con sindrome di Turner.

Per ciò che riguarda la sfera psichica, dall'esperienza clinica si può concludere che le pazienti con sindrome di Turner sono ben integrate nella società a tutti i livelli, sebbene siano stati osservati alcuni problemi: sono difatti accomunate da specifici tratti della personalità. Queste pazienti hanno un'alta soglia di tolleranza allo stress, rivelano una tendenza all'autocompiacimento e necessitano di una forte dipendenza dagli altri, presentando dei disturbi nella sfera emotiva (Stabler 1999, Skuse 1997, McCauley 1986, Haverkamp 2000).

Lo studio condotto nella nostra Clinica nel 2000 ha confermato questi dati, oltre ad aver messo in risalto un migliore rapporto con la propria immagine nelle pazienti che avevano raggiunto una statura maggiore grazie alla terapia con l'ormone dell'accrescimento, rispetto al gruppo di pazienti trattate solo con estrogeni. Le pazienti con cariotipo 45,X/46,Xr(X) presentavano un severo ritardo mentale, perché il cromosoma ad anello non viene inattivato e dà luogo a due cromosomi funzionali X. Nelle Turner i deficit delle capacità percettive sono più frequenti di quanto non lo siano nella popolazione generale.

1.4.2 Bassa statura

È sicuramente il carattere più costante e che caratterizza la sindrome stessa. Le pazienti con sindrome di Turner si trovano una deviazione standard (DS) sotto la media, alla nascita, sia per il peso che per la lunghezza, presentando quindi un moderato ritardo di crescita intrauterino.

Numerosi studi condotti su un numero rilevante di soggetti hanno dimostrato che i dati sull'andamento della statura in questa sindrome durante l'infanzia sono simili.

Nel 1985 Lyon ha preparato una carta di crescita utilizzando i dati provenienti da quattro studi europei su soggetti non trattati (366 soggetti di cui: 101 Pelz et al., 1982; 150 Ranke et al., 1983; 55 Lenko et al., 1979; 60 Rosenberg et al., 1972); l'accrescimento medio si mantiene sempre sotto al terzo percentile, discostandosi man mano da esso con l'aumento dell'età. Dopo i tredici anni si

raggiunge la massima distanza dalla curva di normalità in quanto non si ha lo spurt accrescitivo puberale. Dopo tale età, però, l'accrescimento continua, anche se lentamente.

È stato inoltre condotto uno studio dal Gruppo Italiano di Studio per la Sindrome di Turner nel 1994 su 772 soggetti non trattati che ha portato agli stessi risultati.

Tale andamento può essere facilmente dedotto osservando le curve di velocità di crescita di questi soggetti. Sino ai tre anni la velocità di crescita si mantiene sul 50° percentile e durante questa fase è presente un ritardo di maturazione ossea. Tra i tre e i dodici anni si ha una successiva fase nella quale la velocità di crescita decresce progressivamente fino a raggiungere il 10° percentile, mentre l'età ossea ha una progressione normale. Dai dodici anni in poi la curva della velocità di crescita si discosta sempre più dal range di normalità. Dopo tale età, non avendo presentato lo spurt accrescitivo puberale, questi soggetti rientrano nel range di normalità, superando il 97° percentile, mentre l'età ossea decelera progressivamente.

L'andamento dell'età ossea di queste pazienti rispetto all'età cronologica è normale alla nascita, decelera fino al terzo anno, dal terzo al dodicesimo ha una progressione e dopo tale età diminuisce più lentamente con una chiusura delle epifisi che non viene raggiunta prima dei 18-20 anni.

A questa età viene quindi raggiunta la statura finale, che è di tre deviazioni standard sotto la media normale. Brook et al. nel 1974 hanno dimostrato una correlazione tra statura finale e statura dei genitori, suggerendo anche che l'altezza della madre possa avere una maggiore influenza rispetto a quella del padre.

I dati della letteratura riguardanti la statura finale delle donne adulte con sindrome di Turner, mostrano che la statura finale di queste pazienti è di circa 20 cm inferiore alla statura media della popolazione femminile normale della stessa razza di riferimento.

Sono comunque da considerare le differenze ambientali e i problemi di metodologia.

La statura media adulta dei soggetti con sindrome di Turner seguiti presso la nostra Clinica, è risultata $140,4 \pm 4,7$ cm. Con l'analisi della varianza si è evidenziata una differenza nella statura finale tra i diversi cariotipi. Infatti i soggetti con cariotipo 45,X sono più alti e questo si accorda con quanto da noi riscontrato in un precedente lavoro, in cui si è rilevato che, durante le varie fasi della crescita, i soggetti con questo cariotipo presentano una statura superiore a quelli con anomalie strutturali della X (Mazzanti et al., 1986).

La causa del ritardo di crescita nella sindrome di Turner non è nota, ma una possibile spiegazione potrebbe risiedere in una anomalia di secrezione o di azione dell'ormone della crescita, anche se il reale ruolo di questo ormone nel difetto di crescita nella sindrome di Turner è ancora incerto.

1.4.3 Disgenesia gonadica

La disgenesia gonadica rappresenta uno dei caratteri peculiari della sindrome di Turner (Turner, 1938).

Le teorie sulla eziopatogenesi di tale alterazione sono state numerose e confutate o avvalorate poi da studi in vivo o post-mortem.

Nel 1963 Jones ed altri ipotizzarono che il ridotto numero di cellule germinali, nelle pazienti con cariotipo 45,X fosse imputabile ad una difettosa migrazione delle cellule germinali delle creste genitali durante la vita fetale (Jonson et al., 1963).

Gli studi di Atria et al. del 1948 hanno descritto post-mortem una donna di venti anni affetta da sindrome di Turner. Le sue ovaie presentavano una struttura con numerosi follicoli primari tendenti alla degenerazione cistica.

Altri studi invece affermano che le cellule germinali dell'ovaio di soggetti 45,X sono simili a quelle delle ovaie normali fino al terzo mese di gestazione; dopo tale periodo degenerano, arrestano precocemente la loro maturazione e vanno incontro ad atresia durante le divisioni mitotiche e meiotiche tra il secondo e il terzo mese di gestazione. Gli oociti sono così rapidamente persi e sostituiti da tessuto connettivo, così alla fine, al posto delle ovaie residuano elementi connettivali di circa un centimetro per tre, chiamati "streaks". Un simile processo si osserva anche nella donna normale adulta, ma nei soggetti con sindrome di Turner è già avanzato alla nascita e, normalmente risulta completato alla fine del primo anno di vita.

L'ipogonadismo così determinato si manifesta alla pubertà con la mancata comparsa dei caratteri sessuali secondari ed amenorrea primaria.

Nelle pazienti Turner è presente un'ampia variabilità di comportamento della funzionalità ovarica: nel 5-10 % dei casi, infatti, essa si mantiene a livelli sufficienti per far cominciare spontaneamente la pubertà, anche se in modo incompleto.

Solo in pochi casi si ha l'insorgenza spontanea del menarca (circa 1%) che può avvenire ad una età assai variabile, precedendo talvolta la comparsa degli altri segni puberali.

Il carattere delle mestruazioni è polimorfo per quanto riguarda la presenza e la persistenza nel tempo, in relazione ad una riduzione più o meno rapida del capitale follicolare ovarico.

In un recente studio condotto presso la nostra Clinica è stata eseguita ecografia pelvica in 142 pazienti con sindrome di Turner di età compresa tra 6 mesi e 21 anni e con differenti cariotipi. Le pazienti sono state suddivise in due gruppi a seconda della presenza o meno di ovaie visibili ecograficamente. Le pazienti con ovaie visibili hanno mostrato il primo aumento di volume ovarico a circa 9 anni di età ossea; questo aumento risultava continuo e maggiormente evidente solo dopo i 14 anni di età, e comunque più tardivo rispetto al gruppo di controllo. In alcuni casi le ovaie presentavano una certa funzionalità ormonale. Le pazienti con mosaicismo della X avevano una percentuale più alta di ovaie visibili ecograficamente bilateralmente (76%) ed un maggior volume ovarico totale; circa la metà di loro ha presentato uno sviluppo mammario spontaneo. Queste pazienti, quando le ovaie erano presenti bilateralmente mostravano anche il più basso livello di gonadotropine durante la pubertà. Al contrario, le pazienti con cariotipo 45,X e con anomalie strutturali della X avevano la più bassa percentuale di ovaie visibili ecograficamente (rispettivamente il 26% e il 39%), di volume ovarico e di sviluppo mammario spontaneo.

Le dimensioni uterine aumentavano significativamente con l'età e questo è risultato più evidente nei soggetti con ovaie presenti, dopo i 13 anni di età ossea.

La struttura dell'utero, della vagina e dei genitali esterni è invece normale. Ovviamente le loro dimensioni dipenderanno dalle influenze ormonali.

Finché la funzione ovarica nelle pazienti con sindrome di Turner rimarrà inadeguata o inesistente, con riferimento alla produzione di ormoni sessuali femminili, le strutture genitali rimarranno poco sviluppate, come nelle bambine prepuberi.

Tuttavia, con una appropriata terapia ormonale sostitutiva, le pazienti con sindrome di Turner potranno avere un adeguato sviluppo, compatibile con una normale vita sessuale.

Generalmente le ghiandole mammarie sono ipoplasiche e il loro mancato sviluppo è sostituito frequentemente da tessuto adiposo.

In alcune pazienti il clitoride risulta leggermente iperplastico.

In rari casi i segni puberali si manifestano spontaneamente e la data d'inizio può essere normale o ritardata. I risultati di uno studio multicentrico retrospettivo italiano su 522 pazienti affette da sindrome di Turner indicano che 84 pazienti (61,1%) hanno presentato uno sviluppo puberale spontaneo con menarca ad una età cronologica di $13,2 \pm 1,5$ anni e ad una età ossea di $12,9 \pm 1,9$ anni. Le pazienti con mosaicismo della X hanno uno spurt accrescitivo puberale tra gli 8 e i 12 anni, ma tale spurt non può essere giustificato solo dalla presenza di maggiori residui ovarici in attività, in quanto si osserva anche in pazienti senza ovaie. Ciò conferma la influenza di un fattore genetico del cromosoma X. Nonostante questo spurt, la statura finale maggiore si osserva nei soggetti con cariotipo 45,X.

Le ragazze con mosaicismo della X hanno più spesso uno sviluppo mammario spontaneo associato ad una percentuale maggiore di ovaie visibili ecograficamente. In questo gruppo, l'età dei primi segni puberali è risultata simile a quella dei soggetti normali e avviene prima che nelle altre pazienti Turner.

È bene precisare che alcune pazienti con sindrome di Turner presentano lo sviluppo di peli pubici e/o ascellari, in quanto la produzione di ormoni androgeni surrenalici è normale, almeno per i primi dieci anni di vita. Pirazzoli et al. nel 1984 hanno condotto uno studio sui rapporti fra funzione surrenalica e gonadi nella sindrome di Turner. La valutazione, in queste bambine, dello sviluppo pilifero pubico in rapporto ai livelli di deidroepiandrosterone (DHA), deidroepiandrosterone-solfato (DHA-S), androstenedione ($\Delta 4$) e testosterone (T), induce a ritenere che il normale sviluppo di questo carattere sessuale non dipenda soltanto dagli androgeni, ma sia il risultato di un'azione multifattoriale di origine sia surrenalica che gonadica.

1.4.4 Alterazioni ormonali

Le alterazioni ormonali presenti nella sindrome di Turner derivano principalmente dall'anomala funzione ovarica. Il deficit di ormoni ovarici può anche avere ripercussioni su altri sistemi ormonali. Inoltre possono svilupparsi, con una maggiore frequenza rispetto alla popolazione normale, altre anomalie ormonali.

- Ormoni sessuali: è presente una riduzione della secrezione estrogenica dovuta all'alterata funzionalità ovarica. Il mancato incremento secretivo estrogenico alla pubertà determina una inadeguata crescita e sviluppo dell'utero, della vagina e delle mammelle.

Le gonadotropine ipofisarie che controllano la funzionalità ovarica, l'ormone luteinizzante (LH), e in particolare l'ormone follicolo stimolante (FSH), sono aumentate in quanto il feedback tra ipotalamo-ipofisi-gonadi è intatto.

L'aumentata secrezione di queste gonadotropine è già osservabile nei primi mesi di vita. Durante l'infanzia, in genere dai 3 ai 7 anni, i livelli basali di LH e di FSH sono normali. Superati gli 8 anni, i livelli sierici di questi ormoni aumentano al di sopra della norma, perciò in questo periodo la valutazione può avere un significato diagnostico. Nello studio precedentemente menzionato [32] si è visto che esistono differenze nella secrezione di questi ormoni in relazione ai diversi cariotipi: le pazienti Turner con mosaicismo della X avevano livelli più bassi di gonadotropine e livelli più alti di estradiolo, rispetto a quelle con altri cariotipi.

- *Ormone della crescita*: lo studio dei livelli sierici e della secrezione dell'ormone della crescita (GH) e degli ormoni da esso mediati, chiamati insulin-like growth factors (IGFs o somatomedine) è sempre stato considerato importante nell'individuare la natura dello scarso accrescimento delle pazienti con sindrome di Turner.

I primi studi dimostrarono un deficit di GH in pochi casi, mentre la maggior parte delle pazienti presentavano normali livelli sierici di GH durante i vari test.

Nel 1985 Ross et al., hanno mostrato che i livelli sierici di GH misurati nelle 24 ore sono sotto la norma dopo circa l'ottavo anno di età. Le IGFs di queste pazienti possono trovarsi sia al di sopra che al di sotto del range di normalità.

Normalmente durante la pubertà l'innalzamento dei livelli di estrogeni porta ad un aumento del GH e delle IGFs.

Nelle pazienti con sindrome di Turner non si ha lo spurt accrescitivo puberale, si può quindi presupporre che la riduzione di crescita dopo i nove anni sia parzialmente causata dal deficit relativo e funzionale del GH.

Altri autori sostengono che le pazienti con sindrome di Turner abbiano una secrezione di GH deficitaria indipendentemente dall'età, con una frequenza più elevata rispetto ai soggetti normali.

Uno studio su 81 pazienti, presso la nostra clinica (Pirazzoli et al., 1999) ha dimostrato che la secrezione spontanea di GH è più bassa nelle pazienti Turner, nei vari gruppi di età, rispetto a soggetti normali prepuberi con bassa statura, ma non differisce da quella dei pazienti con deficit di GH.

Per quanto riguarda i livelli delle somatomedine, i risultati sono stati estremamente variabili: lievemente alti o bassi. Altri autori hanno invece documentato una mancanza del normale incremento delle IGFs nel periodo puberale. Nelle nostre pazienti abbiamo riscontrato bassi livelli di somatomedine indipendentemente dall'età.

Wit et al., 1992 hanno effettuato uno studio su 26 pazienti con sindrome di Turner valutando l'andamento della concentrazione del GH nelle 24 ore. Da questa ricerca è emerso che le pazienti prepuberi di età inferiori ai 12 anni mostrano un profilo sierico della concentrazione di GH nelle 24 ore che è simile a quello osservato in un gruppo di 26 bambini normali, ma di bassa statura.

Malgrado ciò, le pazienti con sindrome di Turner crescono molto meno in altezza rispetto alla popolazione normale.

È chiaro perciò che un'alterazione nella secrezione del GH non può spiegare la scarsa crescita staturale durante l'infanzia.

In conclusione questi dati suggeriscono un errore nella traslazione del segnale del GH che, probabilmente, si trova oltre il punto di produzione delle IGFs.

- **Androgeni**: nella sindrome di Turner la concentrazione della maggior parte degli androgeni si mostra ridotta, anche se il deidroepiandrosterone presenta una tendenza all'aumento. La funzione biologica di questo ormone è sconosciuta anche se è possibile che nelle bambine, come nei maschi, gli androgeni abbiano un significato nella crescita durante la pubertà.

- **Funzionalità tiroidea**: esiste in queste pazienti un aumento dell'incidenza di alterazioni della ghiandola tiroide quali la tiroidite di Hashimoto, l'ipertiroidismo e l'ipotiroidismo [38]. La tiroidite di Hashimoto compare in circa il 10% delle pazienti esaminate: rara nei primi anni di vita, aumenta con l'aumentare dell'età.

La prevalenza degli anticorpi anti-tiroide, quali gli anticorpi anti-tireoglobulina, anti-tireoperossidasi e anti-microsomiali, si osserva in circa il 20% delle pazienti con sindrome di Turner (22,2% secondo Radetti et al., 1995 [39]; 14% secondo Massa et al., 1993 [40]), valore questo molto più elevato rispetto a quello osservato nella popolazione normale (1,3-2,6%). German e Plotnick nel 1986 mostrarono che la frequenza di anticorpi anti-tiroide aumenta con l'età fino a raggiungere un plateau del 45% circa a 18 anni nelle pazienti con cariotipo 45,X e di circa il 55% a 11 anni nelle pazienti con altri cariotipi.

La causa dell'aumentata incidenza di disordini autoimmuni nelle pazienti con sindrome di Turner, è sconosciuta: non è ancora chiaro se l'anomalia cromosomica possa predisporre all'autoimmunità o sia la conseguenza di un disordine autoimmune.

- **Diabete mellito**: una ridotta tolleranza al glucosio è di frequente riscontro nelle pazienti con sindrome di Turner. Il metabolismo glicidico è migliore nelle pazienti in età puberale rispetto a quelle in età prepubere, tuttavia la secrezione di insulina è minore rispetto alla popolazione normale. La migliore tolleranza ai carboidrati nella età puberale potrebbe essere dovuta alla quasi totale assenza di secrezione estrogenica-progestinica in queste pazienti. È stata inoltre accertata una differenza nella tolleranza ai carboidrati in base al cariotipo, come evidenziato soprattutto nelle pazienti con alterazioni strutturali della X.

1.5 Terapia

I cardini fondamentali del trattamento sono essenzialmente tre:

- fornire un trattamento ormonale per il ritardo dell'accrescimento
- fornire un trattamento sostitutivo con ormoni sessuali
- fornire un corretto appoggio psicologico

Fornire un trattamento del ritardo dell'accrescimento

La bassa statura è il carattere fenotipico più costante e che in un certo senso caratterizza la sindrome di Turner, manifestandosi già in età pediatrica come ritardo progressivo dell'accrescimento. In tale

età può rappresentare l'unico segno clinico indicativo della sindrome, in pazienti con stimate malformative sfumate. In seguito, durante l'età puberale, la statura di questi soggetti si pone ulteriormente al di sotto della curva di normalità, non verificandosi lo spurt accrescitivo puberale. La statura adulta di queste pazienti è significativamente al di sotto dei valori di normalità, circa 20 cm inferiore rispetto a quella della popolazione femminile di controllo della stessa etnia.

Numerosi tentativi terapeutici sono stati effettuati nell'intento di accelerare la velocità di crescita di questi soggetti e di migliorarne la statura definitiva, quali:

- ormone dell'accrescimento
- estrogeni, androgeni e steroidi anabolizzanti

Il trattamento della bassa statura influisce su molti altri aspetti della gestione delle pazienti con sindrome di Turner, come la terapia estrogenica, l'adattamento psicologico, la socializzazione e il rendimento scolastico (Saenger et al., 2001).

- Ormone dell'accrescimento: il GH ottenuto con la tecnica del DNA ricombinante è ormai largamente disponibile e ciò ha reso possibile una valutazione critica della efficacia del GH nei soggetti trattati per lunghi periodi di tempo.

Oggi il GH è diventato il principale trattamento della bassa statura nelle pazienti con sindrome di Turner e l'effetto positivo di tale terapia è stato dimostrato da numerosi autori.

Rosenfeld (1998) ha condotto uno studio multicentrico, prospettico e randomizzato del trattamento con GH da solo o in combinazione con oxandrolone, nelle pazienti con sindrome di Turner. 17 pazienti sono state trattate con solo GH e hanno raggiunto una statura finale di 150.4 ± 5.5 cm, che è di 8.4 ± 4.5 cm superiore alla statura prevista prima della terapia. Altre 43 sono state invece trattate con GH ed oxandrolone, raggiungendo una statura di 152.1 ± 5.9 cm, 10.3 ± 4.7 cm superiore a quella prevista prima della terapia. Le conclusioni di questo studio furono che il GH, sia da solo che in associazione con oxandrolone, è in grado di aumentare la velocità di crescita e la statura finale nelle pazienti con sindrome di Turner.

I risultati di uno studio condotto da Sas (1999) hanno confermato questi dati sul miglioramento della statura finale nelle pazienti trattate con alte dosi di GH. La dose di GH utilizzata nello studio di Hochberg e Zadik (1999) era di circa 0.8 UI/Kg/settimana, quella di Rosenfeld era di 1UI/Kg/settimana; recenti studi hanno dimostrato l'importanza delle alte dosi per ottenere un maggior risultato (Van Teunenbroek, 1996; Carel, 1998)

Chernausek (2000) [45] ha rilevato che il numero di anni di trattamento con l'ormone dell'accrescimento prima dell'inizio della terapia estrogenica sono un importante fattore predittivo per il valore di statura finale.

Oggi la terapia col GH è utilizzata routinariamente in soggetti con sindrome di Turner, con o senza deficit dell'ormone dell'accrescimento, ma solo a dosi elevate (0.9-1 UI /Kg/settimana) sembrano avere un effetto positivo, sia a breve termine che sulla statura definitiva.

Cacciari et al., 1999, in uno studio condotto su 135 pazienti Turner che hanno raggiunto la statura definitiva con diversi regimi terapeutici hanno dimostrato che la terapia con GH ad alte dosi e per lunghi periodi dà risultati più soddisfacenti rispetto al GH a basse dosi o associato ad oxandrolone.

In particolare i migliori risultati sono stati ottenuti in un gruppo di 74 pazienti trattate con GH ad alte dosi (1UI/Kg/settimana) per almeno 4 anni (4 anni, 143.3 ± 6.4 cm; 6 anni, 153.8 ± 4.0 cm). La risposta delle pazienti alla terapia non è apparsa essere influenzata dalla presenza di deficit nella secrezione del GH, mentre i fattori che sembrano influenzare positivamente la statura finale sono la target height e l'assenza di attività ovarica spontanea e di menarca.

Altri importanti fattori genetici influenzano la crescita, quali il peso per l'età gestazionale.

La risposta iniziale individuale di trattamento sembra essere un importante parametro predittivo dell'esito finale.

Ancora oggi non si conosce quale sia l'età ideale di inizio della terapia con GH e forse, solo uno studio multicentrico preposto a questo, potrà darci forse una risposta.

Tutti questi dati rappresentano una indubbia conferma alla validità della terapia con ormone dell'accrescimento nei pazienti con sindrome di Turner.

È stato inoltre dimostrato che la terapia con ormone della crescita non presenta particolari effetti negativi sul metabolismo dei carboidrati, infatti i livelli di emoglobina glicosilata rimangono compresi nel range di normalità. I livelli di insulina a digiuno e post prandiali aumentano durante la terapia, ma ritornano ai livelli normali dopo la sua sospensione.

Saenger et al., 1996, hanno dimostrato che dopo 7 anni di terapia con GH, non si hanno alterazioni delle dimensioni del ventricolo sinistro cardiaco, delle dimensioni del setto o della pressione sanguigna.

I nostri studi in accordo con quelli riportati da Saenger non mostrano alcun effetto negativo della terapia con GH sulla funzionalità cardiaca e sulle dimensioni dell'aorta.

- Estrogeni, androgeni e steroidi anabolizzanti: durante il normale sviluppo, la produzione endogena di estrogeni non solo porta allo spurt accrescitivo puberale, ma accelera anche la saldatura delle cartilagini epifisarie, la cui fusione impedisce ogni ulteriore sviluppo in altezza. Circa 80-90 % delle pazienti con sindrome di Turner presenta "ovarian failure" per cui deve ricorrere alla terapia estro-progestinica per l'induzione della pubertà. Prima di iniziare la terapia estro-progestinica bisogna valutare i livelli di gonadotropine sieriche per escludere la possibilità di uno sviluppo sessuale spontaneo tardivo.

In passato veniva posticipato il più possibile l'inizio della terapia estrogenica (dopo i 15 anni); ma in realtà si è visto che questo non va a ridurre il potenziale accrescitivo di queste pazienti; anzi va solo a peggiorare il grado di mineralizzazione ossea e l'aspetto psico-sociale legato all'ipogonadismo. La terapia estrogenica può essere iniziata a 12 anni di età con basse dosi (0,2-0,4 mg/mese per via intramuscolo; 6,25 micron/die per via transdermica; 0,25 mg/die per via orale) per un periodo di 2-4 anni; solo successivamente inserire la terapia progestinica (200 mg/die per 10 gg al mese) per consentire un normale sviluppo del seno e dell'utero. Dopo circa 2 anni si può passare alla dose da adulte (10-200 microg per via transdermica; 2-4 mg/die per via orale), cercando di preferire la via transdermica che risulta più fisiologica rispetto a quella orale (Bondy et al. 2007).

Fornire un trattamento sostitutivo con ormoni sessuali

nei casi con disgenesia o insufficienza gonadica, la terapia sostitutiva va intrapresa all'età in cui fisiologicamente inizia la pubertà.

Nei soggetti normali l'estradiolo comincia ad aumentare a circa 9 anni e continua per altri 2-4 anni fino a che non raggiunge i livelli riscontrabili nelle giovani donne. Il menarca normalmente compare sui 13 anni e lo sviluppo sessuale completo si raggiunge a 14-15 anni, con un range di normalità ± 2 anni.

Dato che, con una certa frequenza, la terapia con estrogeni accelera l'età ossea compromettendo la statura finale, è preferibile iniziare la terapia solo quando l'età ossea è maggiore degli 11 anni e l'età cronologica sia di circa 15 anni.

Gli ultimi studi suggeriscono comunque di posticipare il più possibile la somministrazione di estrogeni tenendo conto della situazione psicologica delle pazienti.

Il principio fondamentale della terapia è quello di simulare il più possibile una situazione fisiologica normale: gli estrogeni vengono somministrati inizialmente a basse dosi, cioè circa 1/6-1/4 della dose adulta (5-10 mcg/die di etinilestradiolo) per raggiungere lo sviluppo mammario ed uterino.

Gradualmente la dose deve essere aumentata della stessa quantità ad intervalli di 6 mesi, fino a raggiungere, dopo 2-3 anni, la dose adulta (30 mcg/die di etinilestradiolo).

All'inizio non è necessario somministrare anche progesterone, che verrà iniziato quando la dose di estrogeni raggiunge più della metà della dose adulta.

Si somministra etinilestradiolo per 21 giorni, aggiungendo anche, dal 11° al 21° giorno, medrossiprogesterone acetato alla dose di 5-10 mg/die. Dal 22° al 28° giorno non si somministra alcun farmaco: durante questo periodo si ha la mestruazione.

Con un appropriato trattamento ormonale, lo sviluppo uterino risulta nella norma.

La mestruazione oltre a rappresentare un fattore di autostima, gioca un ruolo importante nella prevenzione dei cambiamenti patologici della mucosa uterina. Questo è importante perché è presente un leggero aumento del rischio di sviluppare endometriosi e adenocarcinoma uterino nell'uso incontrastato di estrogeni nelle pazienti con disgenesia gonadica. Comunque gli estrogeni coniugati sembrano essere più sicuri, soprattutto se usati ciclicamente in associazione al progesterone. Il trattamento con ormoni sessuali è anche importante per prevenire la riduzione del contenuto minerale osseo.

Fornire un corretto appoggio psicologico

La diagnosi e le sue implicazioni devono essere spiegate accuratamente sia alla famiglia che alla paziente, quando questa raggiunge un'età appropriata. In particolare si deve insistere sul fatto che le bambine affette da sindrome di Turner sono femmine non ambigue e che con terapia adeguata sono in grado di avere una normale maturazione sessuale, con mestruazioni regolari e anche con rapporti sessuali normali.

CAPITOLO 2: VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITA' RESPIRATORIA

2.1: MISURA DELLA FUNZIONALITA' RESPIRATORIA: LA SPIROMETRIA

La spirometria rappresenta il primo step della diagnostica funzionale polmonare ed è la misura del movimento dell'aria che entra ed esce dai polmoni durante varie manovre respiratorie. Tale valutazione dovrebbe essere facilmente disponibile e usata di routine negli ambulatori medici e negli ospedali quando ci si prende cura di pazienti affetti da malattie respiratorie. La spirometria è facilmente eseguibile dall'età di 5 anni quando un bambino è in grado di collaborare per effettuare una manovra espiratoria forzata.

PARAMETRI FONDAMENTALI MISURATI

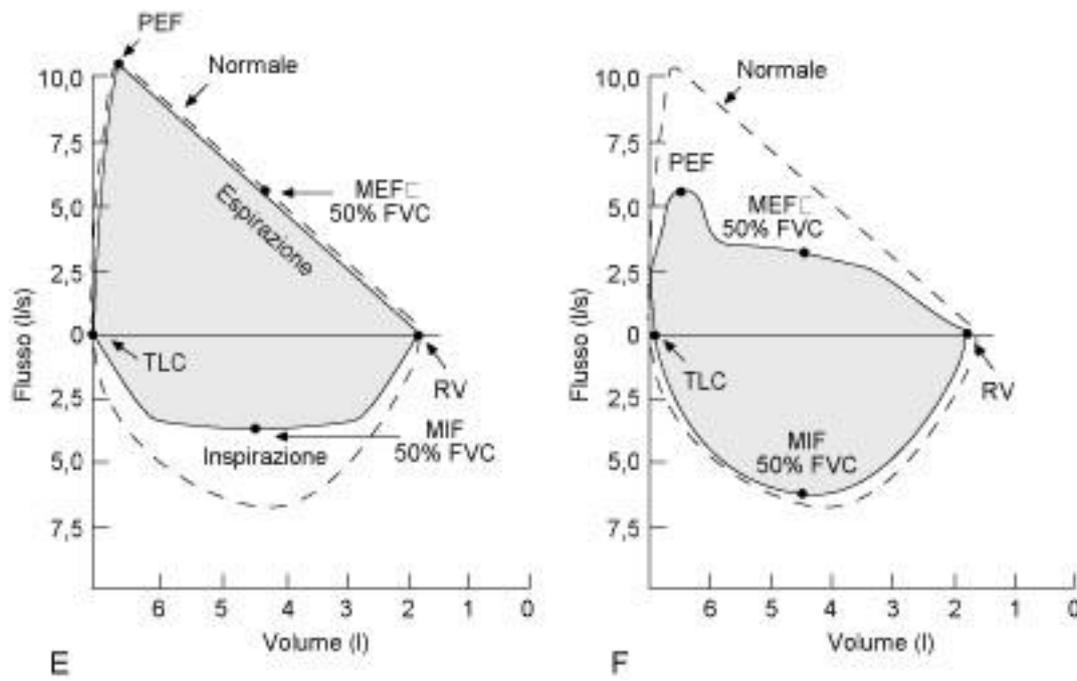
- **CVF** =Capacità Vitale Forzata (FVC in lingua anglosassone): volume totale di aria espulsa in un'espirazione forzata partendo da un'inspirazione completa.
- **CV** =Capacità vitale (VC in lingua anglosassone): volume totale di aria espulsa in una espirazione lenta e massimale, partendo da una inspirazione completa.
- **VEMS** =Volume Espiratorio Massimo nel 1° secondo (FEV 1 nella terminologia anglosassone): volume di aria espulsa nel primo secondo di un'espirazione forzata, partendo da un'inspirazione completa.
- **FEV1/CVF** = rapporto tra FEV1(oVEMS) e CVF è fondamentale per discriminare un deficit ostruttivo da uno restrittivo. Normalmente il 70-75% dell'FVC viene espirata nel primo secondo.
- **PEF** =Picco di Flusso Espiratorio: è il più alto flusso sostenuto per almeno 10 msec con un'espirazione forzata partendo da un'inspirazione completa.

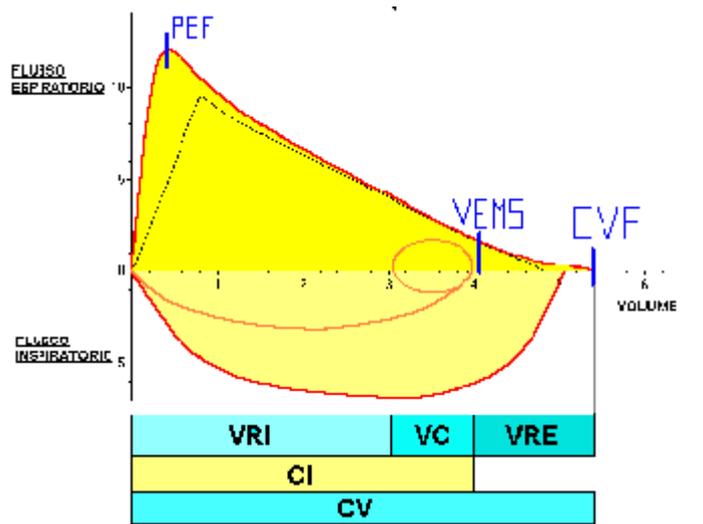
2.1.1: ESECUZIONE DELLA SPIROMETRIA

La spirometria consiste nell'esecuzione di un'inspirazione massimale fino alla capacità polmonare totale (TLC) seguita da una espirazione rapida e forzata (almeno tre secondi) che va continuata fino al completo svuotamento dei polmoni, che corrisponde al raggiungimento del volume residuo (RV). Prima di iniziare la manovra, che va eseguita con il bambino in piedi (o seduto), è utile applicare uno stringinaso. I dati di funzionalità vengono ottenuti dall'analisi del rapporto flusso-tempo-volume di tale atto espiratorio.

La spirometria viene tradizionalmente effettuata con spirometri convenzionali a campana (in grado di analizzare i volumi polmonari statici e dinamici) e, a livello ambulatoriale, consente di avere la rappresentazione grafica in tempo reale della curva flusso-volume, fondamentale per la verifica immediata dell'appropriatezza della manovra espiratoria e per le preziose informazioni che possono essere desunte dall'analisi della morfologia della curva. La manovra espiratoria forzata va mostrata direttamente al paziente/bambino, incentivandolo a eseguirla a sua volta e permettendo prove ripetute. I criteri di accettabilità comprendono l'analisi delle caratteristiche morfologiche della curva flusso-volume, l'assenza di artefatti (tosse, inizio ritardato dell'atto espiratorio, sforzo espiratorio insufficiente, interruzione precoce dell'espirazione), una durata dell'espirazione attiva di almeno tre secondi, e l'impressione, riportata dall'operatore, di una collaborazione soddisfacente. Vanno ottenuti almeno tre test in cui il valore di capacità vitale forzata (FVC) sia contenuto entro un range di variabilità inferiore al 10%. Vengono dunque espressi i dati derivati dalla curva che presenta il maggior valore della somma di FEV₁ e FVC. I pazienti asmatici, in seguito a sforzi ripetuti, possono presentare un progressivo declino dei valori spirometrici.

Curva flusso volume:





come detto la spirometria si basa essenzialmente sull'analisi della curva flusso-volume espiratoria, la cui morfologia normale è mostrata sopra. Sull'asse delle ascisse sono riportati i valori di volume, mentre su quello delle ordinate si trovano quelli di flusso. La ventilazione a volume corrente è seguita da uno sforzo inspiratorio e quindi da uno espiratorio massimale, che presenta morfologia triangolare, con picco di flusso precoce. L'espirazione comincia, come detto, a livello della capacità polmonare totale (TLC) e termina a livello del volume residuo (RV) che è la quantità d'aria che resta sempre nei polmoni e non è possibile espirare. La capacità funzionale residua (FRC) è invece il volume d'aria che resta nei polmoni alla fine di ogni atto espiratorio effettuato a volume corrente.

La differenza tra TLC e RV rappresenta la capacità vitale forzata (FVC o CVF). I flussi a diversi volumi polmonari sono rappresentati come PEF (picco di flusso espiratorio), $V_{max75\%}$, $V_{max50\%}$, $V_{max25\%}$ (flusso espiratorio forzato o FEF al 75%, 50% e 25%, rispettivamente, della capacità vitale). Il picco di flusso (PEFR) che può essere misurato anche con strumenti economici e portatili, rappresenta il flusso massimo dei primi 10-20 millisecondi dell'espirazione forzata e da quindi informazioni solo sulla prima parte della curva flusso-volume. Il volume espiratorio forzato in 1 secondo (VEMS o FEV_1) è un parametro che si ottiene dall'analisi del volume in rapporto al tempo. Il FEF_{25-75} rappresenta la misura del flusso espiratorio forzato tra il 25% e il 75% della capacità vitale e viene calcolato determinando la pendenza della linea che connette i punti corrispondenti al 25% e al 75% della capacità vitale forzata.

Il rapporto FEV_1/FVC (*indice di Tiffaneau*) è un parametro molto sensibile che si riduce nelle forme ostruttive. Ha il vantaggio di offrire una autocorrelazione con le dimensioni del polmone ed è utile nel distinguere le condizioni restrittive da quelle ostruttive. Va ricordato che una interruzione precoce dell'espirazione può "falsamente" aumentare il Tiffaneau e il FEF_{25-75} .

Alcuni di questi parametri sono strettamente dipendenti da una buona collaborazione: i parametri ottenuti dall'analisi ad alti volumi (cioè entro il primo 25% della FVC) sono considerati sforzo-

dependenti (tra essi in particolare il PEFR, il $V_{max75\%}$), mentre altri ($V_{max50\%}$, $V_{max25\%}$, FEF_{25-75}), misurati a volumi minori, non mostrano incrementi se l'entità dello sforzo espiratorio aumenta al di sopra di un livello moderato. I parametri sforzo-dipendenti, invece, riflettono soprattutto il grado di pervietà delle vie aeree di calibro maggiore. Anche il **FEV₁** è un parametro sforzo-dipendente ed è il parametro più riproducibile (coefficiente di variazione 3-5%) e rappresentativo della spirometria. Il FEV₁ occupa il 75-85% della capacità vitale ed è quindi un buon indice integrato di pervietà delle vie aeree e varia inversamente e linearmente con il grado di ostruzione bronchiale.

2.1.2: INTERPRETARE I PARAMETRI SPIROMETRICI

La spirometria non conduce ad una diagnosi specifica, ma permette di collocare la condizione respiratoria del paziente entro una delle due grandi categorie fisiopatologiche: 1) ostruzione al flusso di aria lungo le vie aeree e 2) restrizione dei volumi polmonari. E' fondamentale considerare che le informazioni che si ottengono dalla spirometria vanno sempre compendiate con quelle relative alla storia del paziente e alla valutazione clinica.

I risultati ottenuti dalla spirometria possono essere interpretati in due modi: 1) in rapporto a valori di riferimento (predetti) ottenuti su una popolazione sana o 2) per confronto con i valori ottenuti dallo stesso paziente durante controlli precedenti (valutazione longitudinale).

Il primo metodo (% rispetto al predetto), che richiede l'uso di valori predetti ottenuti in popolazioni pediatriche, è quello meno discriminante; per rapidità e praticità di impiego, comunque, si usa considerare come distinzione tra normale e patologico il valore dell'80% rispetto al valore previsto (predetto) per FVC e FEV₁, e del 70% per il FEF₂₅₋₇₅ (Tabella 2). I valori massimi arrivano al 120% per FEV₁ e FVC e al 140% per FEF₂₅₋₇₅. L'altezza dei soggetti è la variabile più importante dalla quale viene estrapolato il valore teorico dei vari parametri ed è quindi importante inserire con precisione questo dato nel calcolatore dello spirometro. La modalità di interpretazione dei dati rispetto ai valori di riferimento comporta il rischio di sottostimare la presenza di alterazioni in soggetti con valori individuali di base superiori alla media, e che dunque possono presentare valori ancora compresi nei limiti di norma anche in presenza di disfunzione significativa.

Per tale motivo, valutazioni longitudinali, ripetute nel tempo sono in grado di fornire un indice più attendibile di normalità nel singolo individuo, dal momento che ogni paziente funge in tal maniera come riferimento di se stesso. E' evidente che nel bambino, questo tipo di analisi longitudinale va comunque sempre effettuato tenendo presente la variabilità insita nel processo di crescita somatica e, quindi, polmonare. I valori spirometrici possono essere alterati per anomalie a carico del parenchima polmonare, dei muscoli respiratori, della parete toracica o delle vie aeree. Tutte queste

condizioni possono essere classificate nelle già citate due categorie fisiopatologiche: malattie ostruttive e malattie restrittive.

Tabella 1 Range di normalità dei principali parametri spirometrici

Parametro	Valore normale (% del predetto)
FVC	> 80%
FEV ₁	> 80%
FEF ₂₅₋₇₅	> 70%
FEV ₁ /FVC	> 83-85%
Test di broncodilatazione	
risposta positiva se:	FEV ₁ + 12%
	FEF ₂₅₋₇₅ + 45%

2.2 MISURA DEI VOLUMI POLMONARI: PLETISMOGRAFIA.

La capacità funzionale residua (FRC) e il volume residuo (RV) si possono misurare usando il metodo della diluizione dell'elio, il metodo del washout dell'azoto o con il pletismografo corporeo. Queste tecniche richiedono apparecchiature sofisticate e l'esperienza di un laboratorio di fisiopatologia respiratoria. Una volta conosciuta la FRC il volume residuo (RV) è calcolato sottraendo il volume di riserva espiratorio dalla FRC. La capacità polmonare totale viene invece calcolata sommando la capacità inspiratoria e FRC. Una sindrome disventilatoria di tipo restrittivo è caratterizzata da una ridotta TLC con riduzione armonica dei volumi statici e dinamici.

➤ Pletismografia corporea e respiratoria: come si esegue:

il test viene eseguito posizionando il soggetto all'interno di una cabina pletismografica chiusa in posizione seduta e con stringinaso secondo le normative internazionali vigenti (American Thoracic Society ed European Respiratory Society) riguardo la sicurezza del paziente (boccagli con filtro antibatterico monouso) e la corretta esecuzione delle manovre. Tale cabina pletismografica che consente di valutare lo spostamento di tutti i volumi polmonari compresi nella gabbia toracica derivandoli dalle variazioni di volume o di pressione della cabina stessa (legge di Boyle) mentre il soggetto, collegato ad uno spirometro mediante boccaglio all'interno della cabina, esegue un respiro rapido e superficiale (panting) contro una valvola chiusa. Allo stesso modo misurando le variazioni di pressione alla bocca e nella cabina mediante trasduttori e valutando lo spostamento dei flussi respiratori con lo spirometro, è possibile risalire alla misura delle resistenze che si oppongono al flusso nelle vie aeree.

CAPITOLO 3: IL NOSTRO STUDIO

3.1: Obiettivi dello studio

Il nostro progetto ha lo scopo di valutare la funzionalità respiratoria, nelle pazienti affette da sindrome di Turner, dati sui quali vi sono pochi lavori disponibili in letteratura ¹⁰.

Data la particolare conformazione brachimetacarpia, del torace “a scudo” o a “triangolo rovesciato” di tale gruppo di pazienti, si può ipotizzare la presenza di caratteristiche di meccanica respiratoria peculiari di questi pazienti.

Pertanto l’attenzione sarà in tal senso focalizzata sulle pazienti con nuova diagnosi senza però trascurare pazienti già seguite da tempo, distinguendo quelle in terapia estrogenica da quelle non ancora sottoposte a trattamento, con lo scopo di indagare anche l’influenza a lungo termine della terapia con ormoni sessuali sulla funzionalità respiratoria.

Pertanto gli obiettivi dello studio sono:

- 1) determinare le eventuali alterazioni della funzionalità respiratoria nelle pazienti affette da sindrome di Turner alla diagnosi;
 - 2) stabilire l’influenza della terapia sostitutiva ormonale sulla funzionalità respiratoria;
 - 3) correlare la funzionalità respiratoria al grado di maturazione sessuale;
 - 4) correlare la funzionalità respiratoria alle disfunzioni gonadiche tipiche della sindrome di Turner.
-

3.2 Disegno dello studio

Studio in aperto, monocentrico, in pazienti affetti da sindrome di Turner.

Lo studio si è articolato in una fase di selezione in cui i pazienti con diagnosi di sindrome di Turner, che regolarmente afferiscono all’Ambulatorio di Auxologia e Sindromologia della U.O. di Pediatria_Prof. Cicognani di questa Azienda Ospedaliera, sono stati attribuiti al “gruppo attivo” suddiviso poi in base alla terapia ormonale sostitutiva che già questi pazienti eseguono per la loro patologia di fondo.

Il gruppo attivo sarà pertanto suddiviso in:

- Gruppo pz con sindrome di Turner in terapia estrogenica.
- Gruppo pz con sindrome di Turner non in terapia estrogenica.

I pazienti di età superiore a 5 anni ed in grado di eseguire i test di funzionalità respiratoria dopo acquisizione del consenso informato, sono stati arruolati e valutati sia clinicamente che dal punto di vista respiratorio, dello sviluppo sessuale, della crescita staturale, e rilevati: peso, altezza, diametri anteroposteriore e trasverso del torace in inspirium ed in espirium, (in piedi).

3.3: MATERIALE E METODI.

3.3.1.: Popolazione in studio.

La popolazione in studio è costituita da 48 pazienti consecutivi *ambulatoriali* affetti da *Sindrome di Turner* .

Criteri di inclusione.

- Pazienti con diagnosi di sindrome di Turner
- Età > 5 anni

Criteri di esclusione

- Pazienti con gravi condizioni cliniche che, a giudizio dello sperimentatore, controindicano la partecipazione del paziente allo studio;
- Patologia cardiorespiratoria acuta in atto
- Pazienti non in grado di seguire le procedure di funzionalità respiratoria previste dal protocollo
- Pazienti non in grado di firmare il consenso informato. Nel caso di minori o di pazienti incapaci di fornire il consenso informato allo studio, quest'ultimo dovrà essere fornito e firmato anche dai genitori/tutore o dal rappresentante legale. I minori o i pazienti incapaci dovranno anch'essi firmare il consenso nella misura in cui sono in grado di farlo.

3.3.2.: Trattamenti.

Tale studio non ha previsto alcuna somministrazione di farmaco ma si propone solo di studiare la funzionalità respiratoria nei soggetti con diagnosi di sindrome di Turner, che effettuano o meno terapia ormonale sostitutiva secondo i secondo i protocolli già in uso nella pratica assistenziale routinaria di questa Azienda Ospedaliero-Universitaria.

Lo scopo principale dello studio è quello di valutare la crescita polmonare e secondariamente anche gli eventuali effetti della terapia ormonale sostitutiva sulla funzionalità respiratoria.

Terapie concomitanti. Le pazienti affette da sindrome di Turner possono essere in terapia ormonale sostitutiva a base di Estro-progestinici e/o con Ormone dell'Accrescimento, secondo i protocolli già in uso nella pratica assistenziale di questa Azienda Ospedaliero-Universitaria.

3.3.3.: Visite e valutazioni.

Visita di selezione (V0)

Alla prima visita (visita di selezione: Visita al tempo 0: V0) sono stati registrati tutti i dati anagrafici del paziente, i dati clinici compreso il momento della diagnosi di sindrome di Turner. Inoltre sono state valutate le condizioni cliniche generali, le misure antropometriche, il grado di sviluppo sessuale e la presenza o meno di terapia ormonale sostitutiva a base di estro progestinici e/o ormone dell'accrescimento.

La funzionalità respiratoria è stata valutata come segue:

-Spirometria semplice, con misurazione dei parametri ventilatori: FEV1, FVC, FEF25-75, FEV1/FVC, PEF;

-Nelle pazienti collaboranti è stata eseguita Pletismografia per lo studio dei volumi polmonari in particolare la capacità polmonare totale (TLC) e misurazione della DLCO.

Alla prima visita (al momento dell'arruolamento) è stata valutata anche la presenza di atopia mediante esecuzione di Skin Prick Test (principali allergeni inalanti).

Successivamente sono stati eseguiranno controlli clinici e di funzionalità respiratoria ogni 6 mesi per almeno 2 anni (V1,V2, V3, V4).

Schema delle visite e delle valutazioni

Numero della visita	V0 Selezione/ basale (giorni -7/0)	V1 A 6 mesi	V2 A 12 mesi	V3 A 18 mesi	V4 A 24 mesi
Consenso informato	x				
Storia clinica	x	x	x	x	x
Criteri di incl./escl.	x				
Obiettività clinica generale	x	x	x	x	x
Misure antropometriche	x	x	x	x	x
Grado di sviluppo sessuale	x	x	x	x	x
Crescita staturale	x	x	x	x	x
Skin prick test	x				
Valutazione della funzionalità Respiratoria	x	X	X	X	X
Terapie concomitanti	x	x	x	X	X
Valutazione del grado di soddisfazione	x	x	x	X	
Compilazione CRF	X	X	X	X	X

3.3.4.: Esami di laboratorio

Lo studio non ha previsto l'esecuzione di esami di laboratorio. Inoltre, la valutazione della funzionalità ormonale-dismetabolica è parte integrante del protocollo assistenziale di routine già in uso e già codificato per queste pazienti.

3.4 GESTIONE DEI DATI ED ANALISI STATISTICA

3.5.1 Gestione dei dati

Il personale designato dallo Sperimentatore dovrà riportare le informazioni richieste dal protocollo sulla Scheda Raccolta Dati (CRF).

3.5.2 Metodi statistici

I dati raccolti saranno utilizzati per descrivere le caratteristiche demografiche e cliniche della popolazione in studio ed analizzati per verificare la normalità della distribuzione (il test di Shapiro-Wilks e di Lilliefors) ed omogeneità della varianza (test di Levene). I valori campionari saranno riportati con intervalli di confidenza al 95%.

Gli indici di funzionalità respiratoria saranno espressi in valore assoluto e corretti per i valori normali di riferimento mediante le equazioni disponibili in letteratura.

Differenze tra i gruppi saranno testate mediante il T-test per dati indipendenti e all'interno dei gruppi mediante T-test per dati appaiati, in alternativa per dati non distribuiti normalmente, il Test di Mann-Whitney e il Test di Wilcoxon rispettivamente.

Per studiare la dipendenza tra variabili nominali verrà applicato il test del Chi quadrato. L'effetto delle variabili indipendenti sulla variazione degli indici funzionali respiratori verrà studiato tramite la tecnica della regressione multipla.

CAPITOLO 4.: RISULTATI E CONCLUSIONI

4.1: RISULTATI

Sono state arruolate 48 pazienti da Gennaio 2008 a Giugno 2010 con diagnosi di Sindrome di Turner seguite c/ Ambulatorio di Auxo-sindromologia della Clinica Pediatrica S.Orsola. Tutte le pazienti hanno partecipato volontariamente e con entusiasmo allo studio.

- Il **genotipo/cariotipo** delle pazienti studiate è:
 - XO: 34 pazienti;
 - mosaicismo vero: 9 pazienti;
 - mosaicismo con isomerismo di un X: 2 pazienti
 - mosaicismi nascosti: 1 paziente;
 - 46,XX con un isocromosoma X: 1 paziente
 - XO + trisomia 21 per 1 pazienti

- **Razza:** caucasica per tutte 48 pazienti.
- **Età cronologica** media della popolazione studiata: 24 anni (minimo: 8 anni; massimo: 44 anni)
- **Età staturale** (media): 11,5 anni
- **Età ossea** (media): 15.8 anni
- **Età media della diagnosi:** 3 anni.
- **Misure antropometriche:**
 - Peso (media): 54 kg
 - altezza reale (media): 148 cm
 - altezza ideale (media) per età cronologica: 158,4 cm
 - Circonferenza toracica anteroposteriore basale (media):84,3 cm
 - Circonferenza toracica anteroposteriore in inspirium (media): 86,5 cm
 - Diametro trasverso basale (media): 27,7 cm.
 - Diametro trasverso in inspirium (media): 28.6 cm
 - Sviluppo sessuale: pH (media): 4,4; B: 3,4.
- **Conformazione fisica/fenotipo:**
 - “Pterigium collii” : presente in 17 pazienti.
 - Brachimetacarpia: presente in 40 pazienti.
 - Impianto basso delle orecchie: presente in 30 pazienti.
 - Torace “ a scudo “: presente in 41 pazienti.
 - Torace a “triangolo rovesciato”: presente in 4 pazienti.
 - Amenorrea: presente in 31 pazienti.

- **Terapia sostitutiva con GH:** 43 pazienti hanno eseguito o eseguono al momento dello studio, terapia sostitutiva con GH di cui viene riportata la durata (in anni) del trattamento: durata media è di 7,4 anni.
- **Terapia estro progestinica sostitutiva:** 38 pazienti sono in terapia estro progestinica sostitutiva.
- **Prove di funzionalità respiratoria:**
 - tutte le pazienti hanno eseguito la **spirometria** in tutte le visite e verranno riportati valori singoli per ciascun soggetto (poichè tutte le valutazioni successive hanno dato valori di funzionalità respiratoria clinici sovrapponibili a quelli della visita al tempo 0).
 - 20 pazienti hanno eseguito anche pletismografia e DLCO.
- **Atopia:** skin prick test positivo in 7 pazienti.

4.2.2: CONCLUSIONI

Possiamo concludere che, nelle pazienti con sindrome di Turner:

A) i parametri di funzionalità respiratoria risultano essere lievemente superiori rispetto ai valori medi attesi per la popolazione normale per l'età cronologica, ma sono lievemente inferiori alla media attesa se tali parametri vengono riportati ai valori di riferimento corretti per altezza e peso ideali (vedi grafico A): pertanto possiamo concludere che nelle pazienti con sindrome di Turner i parametri di funzionalità respiratoria sono normali.

B) non vi è alcuna differenza statisticamente significativa nei valori dei parametri di funzionalità respiratoria dei pazienti in terapia sostitutiva con GH rispetto a quelli non in terapia con GH ((vedi grafico B1 e B2);

C) non vi è alcuna correlazione statisticamente significativa tra parametri di funzionalità respiratoria e durata della terapia con GH (vedi grafico B1 e B2) fatta eccezione che per la CAPACITÀ POLMONARE TOTALE che è l'unico parametro di funzionalità respiratoria che si correla in maniera significativa con la durata della terapia con GH;

D) non vi è correlazione statisticamente significativa tra terapia sostitutiva estro progestinica e parametri di funzionalità respiratoria (vedi grafico D).

E) non vi è correlazione statisticamente significativa tra parametri di funzionalità respiratoria e cariotipo(XO) (vedi grafico E).

Grafico A: valore predetto di FEV1 per età in femmine di razza caucasica.

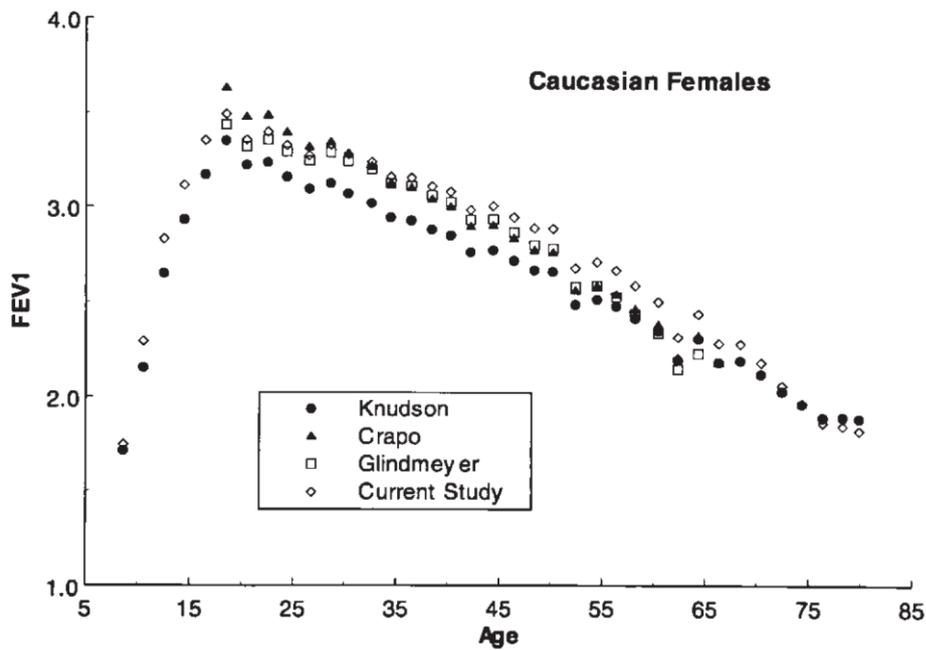


Grafico B2: correlazione tra FEV1% e durata (anni) terapia con GH.

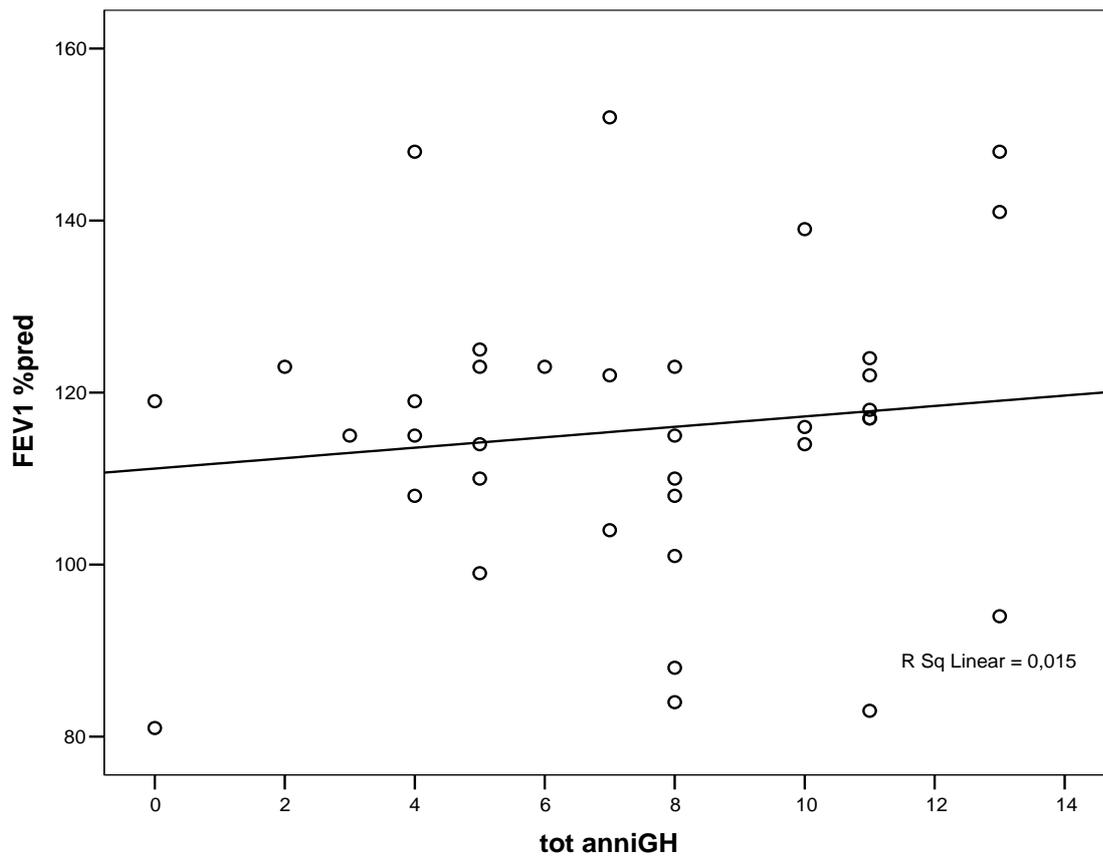


Grafico D: correlazione tra funzionalità respiratoria e terapia estro-progestinica sostitutiva

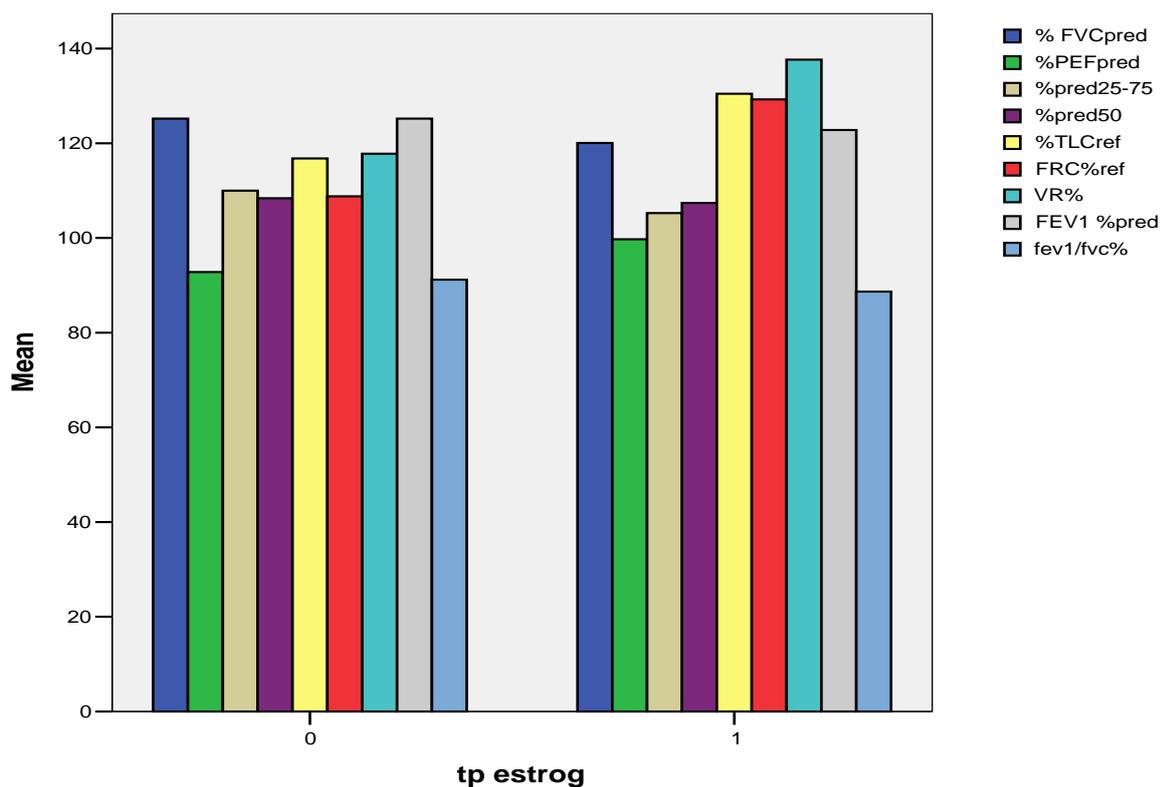
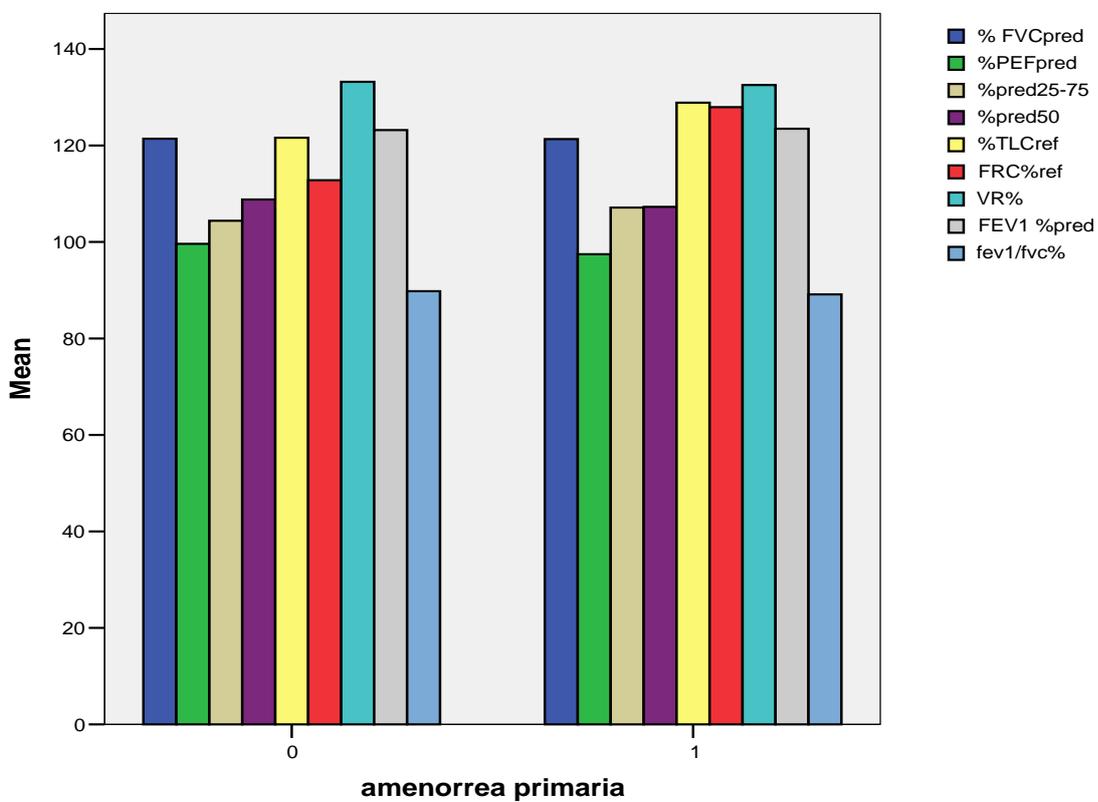


Grafico E: correlazione tra funzionalità respiratoria e cariotipo (amenorrea primaria:XO).



BIBLIOGRAFIA

1. Turner HH. *A syndrome of infantilism, congenital webbed neck, and cubitus valgus* Endocrinology. 1938;23:566-574.
2. Bondy CA. *Care of girls and women with Turner syndrome: A guideline of the Turner Syndrome Study Group.* J Clin Endocrinol Metab. Jan 2007;92(1):10-25.
3. Bender B, Puck M, Salbenblatt J, Robinson A. *Cognitive development of unselected girls with complete and partial X monosomy.* Pediatrics. Feb 1984;73(2):175-82.
4. Soriano-Guillen L, Coste J, Ecosse E, Léger J, Tauber M, Cabrol S, et al. *Adult height and pubertal growth in Turner syndrome after treatment with recombinant growth hormone.* J Clin Endocrinol Metab. Sep 2005;90(9):5197-204
5. Sas TC, de Muinck Keizer-Schrama SM, Stijnen T, van Teunenbroek A, Hokken-Koelega AC, Waelkens JJ, et al. *Final height in girls with Turner's syndrome treated with once or twice daily growth hormone injections.* Dutch Advisory Group on Growth Hormone. Arch Dis Child. Jan 1999;80(1):36-41
6. Hovatta O. *Pregnancies in women with Turner's syndrome.* Ann Med. 1999 Apr;31(2):106-10
7. Matsubara S et al.; *Esthrogen determines gender differences in airway responsiveness after allergen exposure.* Am J Res Cell Dec 2007.
8. Lim RH; *Sexual tension in the airways: the puzzling duality of esthrogen in asthma.* Am J Resp Cell Mol Biol. May 2008.
9. Jenser-Jarolin E.: *Gender-medicine aspects in allergology.* Allergy, May 2008;63(5):610-615.
10. Villa MP, Bernardi F. *Bronchial reactivity and sex hormone: study in a Turner's population.* Pediatr Pulmonol. 1990;9(4):199-205.