

Punti di interesse di ASC005 Camerun et al. (1979) "Acido ascorbico e cancro: una revisione - Ascorbic Acid and Cancer: A Review"

Introduzione

È ben noto che i pazienti affetti da cancro hanno un fabbisogno maggiore di acido ascorbico. Questa molecola è implicata in molti meccanismi riguardanti la resistenza dell'ospite alla crescita maligna invasiva. Esistono rapporti clinici sperimentali e pilota che indicano che la somministrazione di ascorbato in quantità sostanzialmente superiore ai livelli raccomandati eserciti un beneficio terapeutico. L'interesse per gli effetti antitumorali dell'acido ascorbico nacque dal fatto che l'ascorbato è necessario per la sintesi del collagene ed è coinvolto in meccanismi di controlli di enzimi degradativi responsabili della invasività maligna. Da queste considerazioni è derivata la consapevolezza che l'acido ascorbico doveva essere implicato in molti aspetti della resistenza dell'ospite ed è derivata anche la proposta che la resistenza dell'ospite dipenda in definitiva dalla disponibilità di acido ascorbico. Di seguito sono riportati ulteriori approfondimenti a sostegno delle tesi presentate, iniziando dalle somiglianze tra lo scorbuto e il cancro.

Scorbuto e cancro: somiglianze

Lo scorbuto, una malattia ormai rara nella sua forma franca, è una sindrome di disintegrazione generalizzata dei tessuti a tutti i livelli, con dissoluzione della sostanza fondamentale intercellulare, rottura dei fasci di collagene, lisi dei cementi interepiteliali e interendoteliali, ulcerazione con colonizzazione batterica secondaria, disorganizzazione vascolare con edema ed emorragia interstiziale. Tipica dello scorbuto è anche la proliferazione cellulare indifferenziata generalizzata con cellule specializzate che ritornano a una forma primitiva.

La patologia dello scorbuto è stata riassunta come "una rottura strutturale generalizzata della matrice intercellulare associata a proliferazione cellulare indifferenziata, o in termini evolutivisti il graduale ritorno dalla condizione multicellulare ad un primitivo stato unicellulare.

Il dottor William McCormick sembra essere stato il primo a riconoscere che i cambiamenti stromali generalizzati dello scorbuto sono identici ai cambiamenti stromali locali osservati nelle immediate vicinanze delle cellule neoplastiche invasive. Egli ipotizzò che la sostanza nutritiva (vitamina C) nota per essere in grado di prevenire tali cambiamenti nello scorbuto poteva avere effetti simili nel cancro. La letteratura storica contiene molte allusioni all'aumento della frequenza di "cancri e tumori" nelle vittime dello scorbuto. Un tipico rapporto di autopsia di James Lind del 1700 contiene frasi come "...tutte le parti erano così mescolate e unite insieme per formare una massa o un grumo che i singoli organi non potevano essere identificati", una descrizione dell'infiltrazione neoplastica di un anatomista del XVIII secolo.

Infine, nel cancro umano avanzato, le caratteristiche premortali di anemia, cachessia, estrema stanchezza, emorragie, ulcerazioni, suscettibilità alle infezioni e livelli anormalmente bassi di ascorbato nei tessuti, nel plasma e nei leucociti, con insufficienza surrenalica terminale, sono virtualmente identici ai sintomi premortali. caratteristiche dello scorbuto umano avanzato.

Chimica dell'acido ascorbico e della matrice intercellulare

L'acido ascorbico è di enorme importanza biologica. È una delle sostanze riducenti più importanti che si conosca nei tessuti viventi. E due punti sono fondamentali:

- (a) sebbene la maggior parte degli animali possa sintetizzare l'acido ascorbico, un essere umano non può, e dipende totalmente dall'assunzione alimentare per soddisfare tutte le sue esigenze;
- (b) l'acido ascorbico, noto per essere essenziale per l'integrità strutturale della matrice intercellulare, è strettamente correlato all'acido glucuronico, un elemento essenziale delle principali strutture della matrice.

Le cellule non esistono in uno spazio "vuoto". Tutte le cellule dei tessuti del corpo sono saldamente

immerse in una sostanza fondamentale altamente viscosa. Questo materiale è ubiquitario, pervade ogni interspazio. Le variazioni nella composizione fisico-chimica dell'ambiente extracellulare (polimerizzazione-depolimerizzazione) esercitano una profonda influenza sul comportamento cellulare. A loro volta, le cellule possiedono un mezzo per modificare il loro microambiente immediato. Una cellula e il suo ambiente di contatto costituiscono un sistema, in cui ciascuna componente influenza l'altra in modo interdipendente. Questa interdipendenza è coinvolta in tutte le forme di divisione cellulare ed è di particolare importanza nel cancro.

La sostanza fondamentale della matrice intercellulare è un gel acquoso complesso contenente elettroliti, metaboliti, gas disciolti, oligoelementi, vitamine, ormoni, enzimi, carboidrati, grassi e proteine. La sua importante proprietà strutturale di estrema viscosità dipende dall'abbondanza di alcuni polimeri mucopolisaccaridici a catena lunga, i glicosaminoglicani e i relativi proteoglicani. Questi polimeri ad alto peso molecolare intrecciati formano una rete idrofila strutturalmente stabile, che è rinforzata da una rete tridimensionale di fibre di collagene. Questo è il vero *milieu interieur* di Claude Bernard, all'interno del quale si svolge tutta l'attività cellulare.

I glicosaminoglicani sono polimeri a catena lunga a filamento singolo. Le varietà comuni sono l'acido ialuronico (costituito da unità ripetitive alternate di N-acetilglucosamina e acido glucuronico), condroitina (costituita da N-acetil galattosamina e acido glucuronico) e esteri solfati (i condroitin solfati), di cui esistono diversi isomeri.

I proteoglicani sono macromolecole con una struttura multiramificata più complessa. Sono costituiti da un nucleo primario di glicosaminoglicani, al quale sono attaccati, tramite proteine di collegamento, nuclei proteici secondari a intervalli distanziati, ai quali sono attaccati polimeri di glicosaminoglicani terziari. I proteoglicani della matrice sono una famiglia di macromolecole simili che differiscono per complessità, peso molecolare, dimensione idrodinamica, composizione chimica e reattività. La matrice intercellulare è rinforzata da una rete tridimensionale di fibre di collagene. La quantità di collagene presente determina la forza del tessuto e anche la sua resistenza all'infiltrazione maligna.

Nei tessuti sani, la matrice intercellulare viene mantenuta in un equilibrio stazionario di cambiamento dinamico molto lento, con la formazione di nuove macromolecole (polimerizzazione) bilanciata dal ricambio e dal decadimento (depolimerizzazione). A livello locale, nel cancro, la depolimerizzazione della matrice e del collagene nelle immediate vicinanze delle cellule invasive in proliferazione è una caratteristica sorprendente; questo è esattamente il cambiamento osservato su scala generalizzata nello scorbutto.

Qualsiasi misura in grado di proteggere l'integrità della matrice intercellulare (a) ritarderà efficacemente l'infiltrazione maligna, (b) limiterà la nutrizione selettiva dei tumori, (c) proteggerà le barriere di collagene preesistenti dall'erosione neoplastica e (d) faciliterà l'incapsulamento protettivo del collagene. In tutti questi processi, l'acido ascorbico svolge un ruolo determinante.

La maggiore richiesta di acido ascorbico nel cancro. La tesi che l'ascorbato sia coinvolto nella resistenza alla neoplasia trova sostegno nei numerosi studi che dimostrano che i pazienti affetti da cancro hanno riserve di ascorbato anormalmente basse. Si tendeva a supporre che questo riflettesse lo scarso stato nutrizionale generale dei pazienti affetti da cancro in stadio avanzato, ma tale visione non è più sostenibile. Oggi è riconosciuto che bassi livelli di cancro indicano un maggiore utilizzo e fabbisogno di vitamina C. L'aumento dell'utilizzo dell'ascorbato, misurato dall'esaurimento delle riserve di ascorbato, è un aspetto caratteristico di molti altri disturbi "proliferativi cellulari", come l'infiammazione, e dei processi riparativi dopo trauma chirurgico, infarto miocardico e ustioni termiche. L'ascorbato viene rimosso dalle riserve circolanti e concentrato nel sito del processo riparativo. Questo spostamento dell'ascorbato dalle riserve allo stroma del tumore è stato dimostrato nel cancro, come sono state dimostrate gravi carenze di ascorbato nel sangue e nei

leucociti. Pertanto, indipendentemente dagli effetti terapeutici specifici suggeriti, la correzione di questo deficit dovrebbe far parte di tutti i regimi terapeutici completi contro il cancro.

Acido ascorbico e resistenza. Il metabolismo dell'ascorbato è implicato in una serie di meccanismi di resistenza dell'ospite funzionanti sia a livello locale nei tessuti (stromale) che a livello sistemico. La resistenza locale è legata a (1) resistenza della sostanza fondamentale intercellulare all'infiltrazione locale e (2) capacità di incapsulare le cellule neoplastiche in una barriera di tessuto fibroso (3) il grado di risposta linfocitaria. I linfociti sono più numerosi nello stroma dei tumori a crescita lenta e scarsi o praticamente assenti attorno alle lesioni a crescita rapida. Una risposta linfocitaria vivace indica una maggiore resistenza dell'ospite ed è associata a una prognosi più favorevole. I fattori sistemici sono meno chiaramente definiti. Si tratta di fattori costituzionali come l'efficienza relativa del sistema immunitario, meccanismi di feedback coinvolti nel contenimento degli enzimi "invasivi" e lo stato ormonale dell'individuo. L'acido ascorbico è implicato in tutti questi meccanismi di resistenza e l'ingestione di questa sostanza in quantità adeguate può aumentare la resistenza al cancro di un individuo.

a) **Matrice extracellulare e crescita cellulare.** L'invasività è uno degli attributi fondamentali e distintivi delle cellule tumorali maligne, e conferisce loro la capacità non solo di infiltrarsi localmente ma anche di ulcerarsi attraverso le barriere membranose e di penetrare nei vasi linfatici, nei vasi sanguigni, migrare distalmente e produrre metastasi. L'integrità strutturale della matrice è la prima barriera all'invasività.

La depolimerizzazione dei glicosaminoglicani della matrice è determinata dall'azione sequenziale di enzimi della famiglia delle "ialuronidasi", che in varie fasi scindono i polimeri della matrice. Affinché avvenga una crescita, le ialuronidasi devono essere attivate, la matrice degradata. Per regolare la crescita, le ialuronidasi devono essere inibite al momento opportuno. In condizioni normali, di salute, esistono dei fini meccanismi di regolazione tra la necessità di crescita e rinnovo dei tessuti e la necessità di contenere, regolare e bloccare questa crescita al momento adeguato. Nella patologia oncologica, questi fini controlli vengono meno e il costante rilascio di enzimi idrolitici da parte delle cellule neoplastiche è responsabile della loro capacità invasiva. Anche il collagene è suscettibile alla stessa attività enzimatica idrolitica, la cui produzione è inibita anche dalla dissoluzione enzimatica della matrice venendo meno la regolarità di glicosaminoglicani e proteoglicani necessaria per la precisa deposizione dei precursori del collagene. Con la degradazione della matrice vengono rilasciati nel flusso sanguigno un intero spettro di prodotti di degradazione dei glicosaminoglicani e delle glicoproteine, i cosiddetti "reattivi della fase acuta", la cui stima costituisce la base per la maggior parte dei processi test sierochimici per il cancro. Nel cancro, se potessimo stabilizzare la matrice cellulare, trovare un metodo per inibire in modo sicuro gli enzimi depolimerizzanti (ialuronidasi) prodotti delle cellule tumorali, dovremmo possedere un mezzo per limitare l'invasività.

b) Blocco della degradazione con meccanismo di controllo negativo.

"Tutte le cellule dei tessuti hanno una tendenza intrinseca a dividersi, ma questa tendenza è normalmente frenata dalla natura viscosa del loro intimo ambiente extracellulare di glicosaminoglicani, sostanze fondamentali ad alto peso molecolare. La proliferazione viene avviata dal rilascio cellulare di ialuronidasi, che consente alla cellula la libertà locale di dividersi e di migrare all'interno dei limiti del campo alterato. La proliferazione continuerà finché la ialuronidasi viene rilasciata. La proliferazione cesserà, e il normale contenimento e organizzazione dei tessuti verranno ripristinati quando la produzione di ialuronidasi tornerà alla normalità".
(Cameron nel 1966, elaborato da Cameron e Pauling nel 1973)

L'unica differenza tra la proliferazione cellulare “neoplastica” e quella “normale” è la persistenza del rilascio di ialuronidasi nella prima.

Una caratteristica comune delle reazioni enzima-substrato è quella che l'accumulo di sottoprodotti eserciti un effetto inibitorio di controllo (feedback negativo). Pertanto, non è una sorpresa scoprire che è stato dimostrato sperimentalmente che i residui di glicosaminoglicani fino alla D-glucosamina inibiscono la crescita tumorale, la biosintesi di proteine, RNA e DNA.

Nel siero di tutte le specie esistono delle macromolecole enzimatiche che sono inibitori fisiologici delle ialuronidasi indicati con la sigla PHI (dall'inglese Physiological Hyaluronidase Inhibitor). In condizione di salute, la concentrazione sierica di questi inibitori rimane entro un intervallo notevolmente ristretto. In caso di infezioni, guarigione di ferite, artrite reumatoide e cancro la concentrazione di PHI aumenta. Glucosamina e acidi uronici sono i principali costituenti di questi enzimi e sembra chiaro che la loro funzione inibitoria venga attivata con una modifica della loro struttura molecolare. Gli autori in una precedente pubblicazione suggerirono che questa modifica consistesse nella sostituzione di uno o più residui di acido glucuronico con l'acido ascorbico. L'ipotesi che l'acido ascorbico sia necessario per la sintesi e attivazione del PHI offre una spiegazione convincente per la funzione biologica della vitamina c di prevenire lo scorbuto, uno stato di depolimerizzazione generalizzata della matrice causato dall'esposizione alla ialuronidasi non inibita, prodotta durante il corso della normale divisione e sostituzione cellulare. Spiega anche, in parte, perché c'è un aumento del fabbisogno di ascorbato in tutti gli stati di proliferazione cellulare, compreso il cancro.

c) Promozione di crescita cellulare organizzata e vincolata. Poiché l'esperienza clinica quotidiana conferma che l'ascorbato è necessario per una guarigione e una riparazione soddisfacenti delle ferite, il presupposto naturale è stato che questa vitamina sia essenziale per la crescita. Offriamo l'ipotesi alternativa che la funzione primaria della vitamina C sia quella di frenare la crescita eccessiva attraverso la sua incorporazione nel sistema PHI, indirizzando la capacità proliferativa intrinseca di tutte le cellule in un modello di comportamento differenziato, organizzato e vincolato.

Così, nel semplice esempio della guarigione delle ferite, la fase iniziale di proliferazione cellulare produce la depolimerizzazione della matrice immediata e il rilascio di quantità misurabili di residui di glicosaminoglicani nel flusso sanguigno, lì per assorbire le riserve di ascorbato per portare ad un aumento dei livelli di PHI. Nella fase di guarigione gli enzimi inibitori della ialuronidasi determineranno il blocco della degradazione della matrice, blocco della crescita con cellule reintegrate in una matrice ristabilizzata, con il ritorno degli indici biochimici ad uno stato di equilibrio stazionario. In assenza di ascorbato, cioè nello scorbuto, le ferite non riescono a guarire, persiste una matrice destabilizzata, “granulomi” proliferativi di cellule indifferenziate e la continua fuoriuscita di sottoprodotti della matrice degradata nel flusso sanguigno. Carenze di acido ascorbico tipiche del cancro saranno sicuramente limitative per il corretto funzionamento dei meccanismi naturali di controllo negativo su gli enzimi degradativi della matrice per inibirli.

Per riassumere: le caratteristiche pericolose del comportamento delle cellule neoplastiche (invasività, nutrizione selettiva e crescita) sono causate dalla depolimerizzazione microambientale; la destabilizzazione della matrice è determinata dalla costante esposizione ad enzimi degradativi rilasciati dalle cellule neoplastiche; l'ascorbato è coinvolto nel naturale contenimento di questa attività enzimatica degradativa.

d) Matrice extracellulare e collagene. La matrice è rinforzata da una rete tridimensionale di fibre di collagene. Un aumento generalizzato del contenuto di collagene della matrice può essere indotto da alcuni ormoni (estrogeni, androgeni, corticosteroidi, tiroxina) con un graduale passaggio da uno

schema amorfo ad uno più fibrotico; lo stesso cambiamento si osserva nel processo di invecchiamento. La quantità di collagene presente determina la forza di un tessuto e anche la sua resistenza all'infiltrazione maligna. È risaputo che le cellule tumorali invasive si diffondono preferenzialmente lungo i piani dei tessuti “molliti” e vengono deviate e limitate da tessuti fibrotici come cicatrici, capsule e legamenti. Se l'integrità della matrice è la prima linea di difesa contro la crescita invasiva, questa difesa è rafforzata in modo molto potente dalla barriera successiva, la rete di collagene. Le cellule neoplastiche invasive possiedono la capacità di distruggere le barriere di collagene preesistenti, con un aumento del catabolismo del collagene e della produzione dei risultanti residui di idrossiprolina. Interessante, dal punto di vista della terapia pratica, è la capacità variabile degli individui di incapsulare il tumore. L'effetto distruttivo operato dalle cellule neoplastiche invasive può essere ridotto in modo significativo aumentando l'assunzione di ascorbato. L'acido ascorbico infatti è essenziale per la formazione di nuovo collagene. La mancanza di ascorbato riduce drasticamente l'idrossilazione dei residui di prolina e lisina in idrossiprolina e idrossilisina del collagene maturo durante l'assemblaggio della molecola di collagene nei ribosomi, portando all'instabilità della struttura molecolare del collagene. Tale instabilità provoca un aumento del catabolismo del collagene, come è stato dimostrato nello scorbuto e nel cancro. La vitamina C è essenziale per la fibrillogenesi del collagene, sia perché stabilizza la matrice e proteggendola dagli effetti erosivi delle ialuronidasi, sia facilitando l'idrossilazione dei residui di prolina e lisina durante la formazione di nuovo collagene.

e) Immunocompetenza. È generalmente accettato che il sistema immunitario svolga un ruolo nella resistenza dell'ospite al cancro, sia nel senso profilattico di un efficiente sistema di immunosorveglianza che distrugge le cellule neoplastiche in una fase iniziale del loro sviluppo, sia nel senso protettivo di ritardare la crescita di tumori già consolidati. Qualsiasi misura pratica in grado di migliorare l'immunocompetenza è vantaggiosa per il malato di cancro. I meccanismi di immunocompetenza sono una combinazione di reazioni difensive umorali e cellulari con l'ascorbato coinvolto in numerosi modi. La risposta al segnale "nemico" è la rapida mobilitazione di agenti umorali e cellulari specifici con l'elaborazione di unità di riconoscimento, ovvero di immunoglobuline specifiche e l'ascorbato è essenziale per la sintesi delle immunoglobuline. Nell'immunità cellulo-mediata, l'immunocompetenza è esercitata prevalentemente dai linfociti. Nei tumori, il grado di infiltrazione dei linfociti stromali è una misura dell'efficienza della resistenza dell'ospite al processo neoplastico. I linfociti contengono concentrazioni elevate di ascorbato, e ci sono forti indicazioni che questa caratteristica sia “intenzionale” e correlata al loro ruolo attivo nell'immunocompetenza cellulo-mediata. I pazienti affetti da cancro generalmente mostrano una ridotta immunocompetenza e quasi invariabilmente hanno un basso contenuto di ascorbato nei linfociti. Il modo più semplice e sicuro per migliorare l'immunocompetenza in tali pazienti è quello di aumentare la loro assunzione di ascorbato.

Acido ascorbico e prevenzione

Qualsiasi misura che ritarderà la crescita di tumori già consolidati dovrebbe anche, se applicata abbastanza precocemente, sopprimere efficacemente i tumori “latenti” e quindi in termini clinici avere un valore profilattico. L'evidenza clinica è che l'ascorbato supplementare offre protezione contro un ampio spettro di malattie virali, pertanto, se mai venisse provata un'eziologia virale del cancro umano, ci si potrebbe aspettare che l'ascorbato eserciti un effetto profilattico e terapeutico. L'ascorbato offre una protezione contro gli idrocarburi cancerogeni e le nitrosammine, di provenienza ambientale o produzione endogena. Studi in vivo e vitro indicano che l'ascorbato supplementare ha un valore protettivo e inibitorio nel cancro della vescica perché in grado di contrastare l'effetto di agenti cancerogeni per l'uroepitelio, come i metaboliti derivati dal fumo di sigaretta riscontrati nelle urine dei forti fumatori, o sostanze assorbite per esposizione professionale

come l'amminofenile, benzidina e 2-naftilammina noti cancerogeni. Oltre alla relazione tra fumo di sigaretta e cancro alla vescica, è ormai comprovata la relazione tra fumo e cancro ai polmoni. Esistono prove considerevoli che il fumo esaurisca le riserve di acido ascorbico, come dimostrato dalla diminuzione dei livelli di ascorbato nel sangue intero, nel siero e nei leucociti nei fumatori rispetto ai controlli non fumatori. L'eccessiva esposizione ai raggi UV è stata considerata potenzialmente cancerogena. In laboratorio, l'esposizione della pelle di topi albini ai raggi UV ad alta intensità provoca la formazione di sostanze cancerogene e il cancro della pelle. Ma è stato dimostrato anche che questi processi (produzione di sostanze cancerogene a livello cutaneo e cancro della pelle) sono soppressi alimentando gli animali con un numero di antiossidanti, compreso l'acido ascorbico.

Altri effetti rilevanti dell'acido ascorbico

Ascorbato e produzione di energia. Una carenza di ascorbato potrebbe determinare una diminuzione dei citocromi, alterando i processi di trasporto di elettroni, la fosforilazione ossidativa e la produzione di ATP. La diminuzione della respirazione ossidativa e conseguente aumento della glicolisi anaerobica è un cambiamento biochimico tipico riconosciuto nel cancro.

Ascorbato come antiossidante. Le proprietà antiossidanti dell'acido ascorbico sono note sin dalla sua scoperta, e poiché altri antiossidanti sembrano possedere una certa attività antitumorale, anche l'ascorbato potrebbe funzionare a questo riguardo.

Acido deidroascorbico. I prodotti di ossidazione dell'acido ascorbico hanno attività antitumorale *in vivo*. L'acido deidroascorbico, e l'acido 2,3-dichetogulonico hanno inibito la crescita di tumori in esperimenti su topi.

Ascorbato e nucleotidi ciclici. Molte attività biologiche sono potenziate da azioni ormonali che utilizzano nucleotidi ciclici come "secondi messaggeri". È stato dimostrato che l'ascorbato potenzia la formazione di questi nucleotidi ciclici.

Ascorbato ed eritropoiesi. L'anemia è una caratteristica comune del cancro. È noto che l'ascorbato promuove l'assorbimento e l'utilizzo del ferro ingerito ed è necessario per una risposta eritroblastica completa.

Ascorbato e potenziale di ossidoriduzione. Si ritiene che il sistema acido ascorbico-acido deidroascorbico svolga un ruolo importante nel mantenimento di condizioni ottimali di ossidoriduzione nei tessuti. Il potenziale di ossidoriduzione deve essere bilanciato entro limiti abbastanza ristretti per una salute normale. Qualsiasi disturbo del potenziale di ossido-riduzione, come potrebbe risultare dall'esaurimento delle riserve di ascorbato nel cancro, potrebbe avere effetti sistemici deleteri.

Conclusione

Esistono prove sia da studi sull'uomo che su animali da esperimento che lo sviluppo e il progresso del cancro evocano un aumento del fabbisogno di acido ascorbico. L'acido ascorbico è essenziale per l'integrità della matrice intercellulare e la sua resistenza alla crescita infiltrativa maligna, e vi sono prove evidenti che sia coinvolto nell'inibizione degli enzimi tumorali invasivi. È necessario per la formazione di nuovo collagene, permettendo la costruzione di una barriera di nuovo tessuto fibroso per incapsulare cellule tumorali.

Esistono buone prove che elevate assunzioni di ascorbato potenziano il sistema immunitario in vari modi. L'ascorbato può anche offrire una certa protezione contro una varietà di agenti cancerogeni chimici e fisici e contro virus oncogeni ed è anche coinvolto in una serie di altri processi biologici che si ritiene siano coinvolti nella resistenza al cancro.

L'evidenza collettiva suggerisce che l'aumento dell'assunzione di ascorbato potrebbe produrre benefici misurabili sia nella prevenzione che nel trattamento del cancro. L'acido ascorbico ha un

vantaggio unico rispetto ad altri rimedi contro il cancro; è quasi completamente sicuro e innocuo anche se somministrato a dosi elevate e prolungate per periodi di tempo prolungati.