

## **Verbale GdL 15 dicembre 2020**

**PARTECIPANTI:** Corti P , Maggio A , Palazzi G, Lassandro G, Giona F, Ramenghi U, Laura Luti L, Giordano P, A Finocchi A, Timeus F, Guardo D, Muggeo P , Marinoni M, Lanciotti M , Boscarol G, Cantarini ME, Palmisani E, Koronica R, Angarano R, Calvillo M, Farruggia P, Mastrodicasa E, Russo G, Grassi M, Marzollo A, Onofrillo D, Zatterale A, Gervasoni C, Santoro N, Sainati L, Pillon M, Marzollo A, Cervellera M, Notarangelo L, Baldassarre M, Miano M, LaDogana S, Quarello P, D'Amico G, Barone A, Verzeznassi F, Saettini F, Dufour C, Gambineri E, Menna G, Bezzerri V, Savoia A , Tucci F, Licciardello M, Mura R, De Leonardis F, Fioreda F.

### **Approfondimenti tematici di ricerche in corso**

#### **Studio del difetto dell'angiogenesi di cellule mesenchimali di pazienti SDS.**

Il Gruppo di Monza, nella persona della Dott.ssa D'Amico, illustra attraverso eleganti esperimenti il difetto dell'angiogenesi che affligge le cellule mesenchimali di soggetti affetti da SDS. Il disturbo e' causato da una difettosa produzione di VGFalfa attraverso una iperproduzione di p53. Analogamente il pathway di TGFbeta1 risulta alterato cosi come l'apoptosi delle cellule mesenchimali indotta da fattori angiogenetici risulta incrementata ; questo fenomeno potrebbe essere dovuto a maggiore espressione della proteina p53 nei soggetti SDS rispetto ai soggetti sani .

L'angiogenesi, in una certa quota di soggetti SDS, si corregge con la somministrazione esogena di VGFalfa e/ TGFbeta1 e curiosamente cio' si concretizza meglio nei pazienti con neutropenia piu profonda .

Questo fornisce spunti di riflessione interessanti riguardo alla correlazione tra neutropenia/ meccanismo che governa l'angiogenesi e possibile iperstimolazione e proliferazione del comparto delle mesenchimali. La miglior comprensione dei meccanismi molecolari che regolano il rapporto neutrofili e cellule mesenchimali e l'innescio dell'apoptosi/proliferazione potrebbe portare a nuove strategie per capire i meccanismi del disturbo ematopoietico nei soggetti SDS e la tendenza alla trasformazione leucemica.

Uno dei programmi in fieri e' studiare il tipo di proteine espresse nei midolli di soggetti SDS rispetto ai controlli sani attraverso studi di proteomica.

Al fine di arricchire gli esperimenti, nuovo materiale di pazienti SDS e' sempre gradito. Serve 2-5ml di sangue midollare in EDTA (provette tappo viola) che deve essere spedito a Giovanna D'Amico

Fondazione Tettamanti

Via Pergolesi, 33

C/O Centro M.L Verga

20900 Monza

Se volete, la spedizione può essere a carico del destinatario previo accordo. In tal caso contattare Giovanna : giovanna.damico@asst-monza.it

## **Soppressione farmacologica di mutazioni nonsense nelle insufficienze midollari congenite.** (dott.V Bezzeri)

Le mutazioni nonsense sono causative di insufficienza midollare nel 17% di Discheratosi Congenita, nel 20% in Sindrome di Shwachman (SDS), 21% nell'anemia di Diamond-Blackfan, 24% delle neutropenie congenite severe e nel 28% di casi di Anemia di Fanconi. Alcune molecole (naturali e sintetiche) sono in grado di correggere la "mancanza di parte della proteina" attraverso la sostituzione di un aminoacido preferenziale al posto del codone di stop prematuro (PTC). Le prime molecole descritte sono stati gli aminoglicosidi, anche se con bassa efficienza ed alta tossicità alle dosi efficaci. Più recentemente, una piccola molecola sintetica in grado di indurre il "readthrough" di PTC con buona efficienza, denominata PTC124 (Ataluren), è stata approvata da EMA per il trattamento della distrofia muscolare di Duchenne. Abbiamo quindi testato l'efficacia di Ataluren nel ripristinare l'espressione del gene SBDS mutato in progenitori ematopoietici e in cellule mesenchimali stromali isolati da biopsie midollari ottenute una ristretta coorte di pazienti SDS. Ataluren, secondo i nostri risultati, è in grado di ripristinare l'espressione della proteina SBDS full-length, inducendo una migliorata differenziazione del lineage mieloide ex-vivo.

Il nostro obiettivo ora è di estendere questo primo studio preclinico ad un più ampio numero di soggetti e nello specifico studiare la maturazione mieloide e l'impatto sulle pathways p53/STAT3 (eccessivamente attivate in SDS). Idee future sono: testare l'effetto di Ataluren nel ripristinare l'espressione di SBDS in altri tipi cellulari (es osteoblasti primari e i condrociti) e studiare efficacia di Ataluren in altre Insufficienze midollari .

**Caratteristiche cliniche ed immunologiche di pazienti con varianti di CASP 10.** Il dott.Miano illustra una raccolta dati riguardanti pazienti portatori di varianti di CASP10 (41 soggetti provenienti da centri italiani ed extra-italiani) note e/o varianti che hanno aspetto controverso perché giudicate polimorfismi. Uno studio del nostro gruppo pubblicato recentemente su Br J of Hematol ha mostrato una compromissione dell'apoptosi in pz pazienti portatori di tali varianti. Lo studio è stato eseguito su linee cellulari dei pazienti affetti , che mostrano una alterata apoptosi dopo stimolo con FAS ligando ( citofluorimetria) evidenziata attraverso compromissione del clivaggio delle proteine "a valle"

Il presente lavoro (i cui risultati sono disponibili in 21 pazienti del centro di Genova ma che stanno per essere completati sui 41 totali) amplia la casistica in maniera rilevante e consente di segnalare una certa quota di mutazioni nuove, validate dal test suddetto. Il fenotipo dei pazienti caspasi 10 sembra essere peculiare e differente in sostanza dai mutati FAS classici ovvero sembrano "meno ALPS", ma più ALPS like (M>F, età esordio tardivo, linfoproliferazione solo nella metà dei pazienti e minor quota di citopenia autoimmune, linfociti T DN patologici nella metà dei casi rispetto all'ALPS) . Il fenotipo FAS in vitro risulta invece costantemente alterato e la vitamina B12 tendenzialmente alta come nell'ALPS-FAS

## **REGISTRI**

**Anemia di Blackfan Diamond** .La dott.ssa Quarello illustra l'aggiornamento del Registro Nazionale, i cui dati sono stati recentemente pubblicati su Brit J of Hematol nei primi mesi del 2020. I casi ad oggi registrati sono 292 provenienti da 37 centri italiani; il numero è di tutto rispetto se confrontato con altri analoghi Registri nel mondo e con qualità del dato molto buona. Il registro può vantare una quota di diagnosi molecolare nel 95% della coorte.

Il valore diagnostico del dosaggio dell'e-ADA è ancora molto rilevante, anche in una certa quota di popolazione trasfusa (41%) che associata allo studio delle subunità ribosomiali consente di orientare la diagnosi nel 75% dei casi. L'algoritmo diagnostico in effetti identifica un deficit importante di e-ADA correlata con geni mutati nella subunità grande del ribosoma, viceversa e-

ADA "piu' basso" si correla con mutazioni a carico della subunita' piccola del ribosoma. Non ci sono particolari news sulla corellazione genotipo/fenotipo

Di notevole interesse e' il fenomeno della remissione spontanea che nel registro ha una incidenza cumulativa nel 15% a 5 anni e del 30% a 40 anni. La remissione spontanea occorre prima in chi ha una trasfusione dipendenza piu' sporadica rispetto a chi ha un regime trasfusionale più regolare.

Dato anche importante e' il rischio oncologico che si assesta ad una quota del 13.5% all'eta' di 50 anni. Lo studio delle complicanze tardive, compresa l'incidenza di tumori e' un obiettivo futuro. Di fatto il registro e' una raccolta piuttosto "giovane" avendo piu' della meta' dei soggetti registrati di eta' inferiore ai 18 anni

**Malattie del telomero** Vengono presentati dalla dott.ssa Massaccesi i risultati del creando Studio Retrospektivo Prospettico sulle Malattie del Telomero. Il data base di raccolta dati delle malattie del telomero e' stato presentato al comitato etico del centro promotore (Gaslini) ed e' in attesa di essere approvato. Nel frattempo e' in costruzione il "contenitore" informatico per finalizzare input dei dati. La finalizzazione del lavoro sulle curve dei normali del telomero ha subito un arresto per fatti contingenti occorsi negli ultimi 12 mesi.

I primi dati disponibili si riferiscono a 18 pazienti dei quali 8 con mutazioni caratteristiche e 10 con mutazioni sconosciute o non correlate alla DC classica. La raccolta, stante i numeri di partenza, sembra promettente e competitiva con i numeri presentati da altri data base internazionali.

**Anemia di Fanconi** I due data base storicamente presenti sul territorio italiano si sono fusi grazie alla disponibilita' della prof.ssa Zatterale a condividere i dati con l'esistente raccolta presso l'UOC dell'Istituto Giannina Gaslini per un totale di 266 casi. Purtroppo i fatti dell'ultimo anno non hanno favorito il completamento e l'implementazione definitiva dei dati per la cui viene proposta la seguente schedula: per i centri che hanno meno di 5 casi sara' avviato un contatto in remoto tra dott.ssa Ricci ed il responsabile del centro stesso, mentre per i centri con piu' di 5 pazienti si provvedera' alla raccolta tramite presenza "insitu".

**ALPS** La raccolta denominata ALPS.it.net ha visto una implementazione delle registrazioni (409) nell'arco di quest'ultimo anno come viene presentato dalla dott. Palmisani. Il dato della genetica e' disponibile in 261 soggetti dei quali mancano completezza del dato clinico in 17. Verranno contattati i centri a cui appartengono i 17 pazienti per completare il DB, in seconda istanza si cerchera' di acquisire il dato genetico dei restanti 149.

La completezza del dato consentirebbe di imbastire uno studio sui pazienti FAS in Italia nei quali sono emerse mutazioni mai descritte e quindi meritevoli di segnalazione.

I centri interessati a partecipare possono unirsi al progetto attraverso la compilazione della scheda allegata.

Si discute anche sull'opportunita' di raccogliere le citopenie refrattarie senza ovviamente sovrapporsi con altre raccolte esistenti, per lo sviluppo di studi successivi.

**Neutropenie.** Lo studio retrospettivo prospettico italiano delle neutropenie croniche e' stato presentato al comitato etico la scorsa estate nella sua nuova veste ed e' in attesa di essere approvato. Non sono state apportate modifiche sostanziali, eccetto l'aggiunta di una scheda di F-up post trapianto. Il registro neutropenie continua lentamente ad implementare il numero delle registrazioni, al momento 664 totali di cui 410 con diagnosi di Np autoimmune, 153 Idiopatiche, 83 Genetiche Gravi e 18 "altro". Ci si domanda se l'arruolamento e' in linea con l'incidenza "reale" della malattia e quale potrebbe essere lo scostamento; di fatto su 6-8 pz attesi se ne registrano 3-4 in media perdendo una fetta cospicua della popolazione in oggetto. Si invitano i centri ad ottimizzare la registrazione ricordando che la scadenza delle registrazioni e dei fup dei dati 2020 e' il **15 MARZO 2021**. Chi non fosse provvisto delle schede mi puo' scrivere in privato.

## **STATO DELL'ARTE DEGLI STUDI DA SOTTOMETTERE, IN FASE DI REVISIONE, ACCETTATI**

**Diagnosis and management of neutropenia in children: consensus audit of the “Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica”** e' il titolo del lavoro che riassume le Linee Guida aggiornate delle quali la dottssa Onofrillo presenta i punti. Il nuovo lavoro verra' a breve sottomesso a Ped Blood and Cancer stante la volonta' dell' editore di ricevere la versione aggiornata rispetto alla precedente (pubblicata sulla stessa rivista nel 2011)

**ALPS disease vs ALPS phenotype clinical, laboratory and genetic differences**. La dott Palmisani illustra il lavoro (sottomesso a Blood, Blood Advances, Jacie in Practice e British Journal of Hematology e rifiutato ed attualmente in fase di correzione dopo i commenti di Journal of Clinical Immunology) che confronta le caratteristiche di due gruppi di pazienti ALPS definiti secondo i criteri NIH2009 la cui genetica identifica un gruppo ALPS FAS/CASP 10 + ed un gruppo negativo per FAS-CASP10 (ALPS-U). In estrema sintesi, il fenotipo del gruppo ALPS-U mostra un clinica più complessa con maggiore coinvolgimento multiorgano, associazione a più markers di autoimmunità e minor risposta alla terapia con MMF o rapamicina rispetto all'ALPS FASCASP10+. Di rilievo, il gruppo ALPS FASCASP10 presenta contemporaneamente patologici tutti e 4 gli elementi del pannello ALPS (Linfociti T doppi negativi (CD3+TCRab+ CD4-CD8-, CD27+, TCR αβ+ B220+, rappCD3CD25+/CD3HLADR+) che potrebbe costituire un valido marker surrogato.

**Late onset and long lasting autoimmune neutropenia: data from the Italian neutropenia registry**. Il lavoro è pubblicato su Blood Advances, numero di Novembre 2020 e sottolinea la diversità del gruppo di neutropenie autoimmuni non tipiche ovvero le primarie dell'infanzia per caratteristiche di esordio tardivo (> 5 aa) e per persistenza oltre i 3aa. Tali gruppi chiamati rispettivamente Late Onset Np e Long Lasting neutropenia presentano una leucopenia, una riduzione del valore delle cellule B, una riduzione delle cellule NK e l'associazione più frequente con l'acquisizione di markers di autoimmunità nel tempo confrontate con le primarie. In un piccolo sottogruppo l'analisi genetica rileva varianti di disimmunità immunodeficienza (TACI, TINF2, LRBA) nel 25% dei casi

### **Nuove proposte**

**Progetto di approfondimento su neutropenie autoimmuni ed idiopatiche “non primarie”** Come conseguenza “naturale” del sopradescritto lavoro, viene da chiedersi se nelle neutropenie di lunga durata (> 3 anni) o in quelle neutropenie esordite al di sopra dei 3 anni (che durano almeno da un anno) siano esse autoimmuni o idiopatiche ci siano dei meccanismi sottostanti.

Viene proposta una raccolta di dati clinici, immunologici (soprattutto lo studio delle maturative B) e genetici (pannello minimo di 260 geni) da applicare su una estesa coorte di pazienti appartenenti al Registro. I centri pilota sono Monza, Padova Roma, Firenze e Genova. I pazienti verranno selezionati dal Registro previo consenso dei centri di provenienza. Sui pazienti inclusi verranno effettuati, se mancanti, esami immunologici/genetici di approfondimento. Per maggiori dettagli contattare francescafioredda@gaslini.org

**Infezione da COVID in soggetti neutropenici**. La dott.Guardo illustra un progetto di raccolta dati sull'infezione da COVID in pz neutropenici proposta da EuroInnochron. Tale progetto europeo triennale, sviluppato nell'ambito 5 Gruppi lavoro, propone iniziative di collaborazione in diversi ambiti della patologia. I dati sul COVID-19 vengono raccolti attraverso la compilazione di

un questionario online, previa acquisizione del parere favorevole del proprio comitato etico. Di seguito i link per accedere e registrarsi al sito EuroInnochron ed avere l'accesso al questionario <https://ehaweb.org/organization/newsroom/news-and-updates/cost-action-eunet-innochron/>, <https://www.eunet-innochron.eu/patient-registry/>

**Linee Guida Aplasia 2.0:** La dott. Saracco ed il dott. Farruggia propongono una edizione aggiornata delle linee guida delle aplasie. La schedula e' piuttosto serrata e dovrebbe iniziare con la sottomissione al coordinatore del GdL del conflitto di interessi entro il **31/12/20** ed arrivare per **giugno 2021** ad un completamento del "prodotto" almeno nella versione italiana. Il lavoro di aggiornamento e' diviso in sottoambiti come nella versione precedente. Chiunque volesse partecipare ed unirsi al lavoro di uno dei sottogruppi (come sotto indicato) DEVE comunicarlo a Piero Farruggia entro e non oltre il 31/12: per favore, unitamente alla adesione, ricordatevi di inviare, opportunamente compilato, il modulo del conflitto di interessi.  
Sottogruppi di lavoro:

- 1 Introduzione, classificazione etc
- 2 Diagnosi
- 3 IST
- 4 Eltrombopag
- 5 Altre terapie
- 6 Trapianto
- 7 Follow up
- 8 Supporto
- 9 Gravidanza
- 10 Protocolli di Ricerca:
- 11 Analisi statistica
- 12 Flow-chart (percorso diagnostico-terapeutico):
- 13 Revisione finale