

open access journal



eISSN 2036-7503 | www.pagepress.org/pr

**XXXVIII Congresso Nazionale
AIEOP**

Roma, 9-11 giugno 2013

ABSTRACTS

PEDIATRIC REPORTS

ISSN 2036-749X - eISSN 2036-7503

Editor-in-Chief

Maurizio Aricò, Italy

Editorial Board

Dario Galante, University Department of Anesthesia
and Intensive Care and University Hospital
Ospedali Riuniti of Foggia, Italy

Eleonora Gambineri, Paediatric Immunology Unit,
Anna Meyer Children's Hospital, Florence, Italy

Carl Philip Kaplan, University School of Medicine,
Stony Brook, NY, USA

Veronica Neefjes, Royal Aberdeen Children's
Hospital, Aberdeen, UK

Carlo Rodriguez Galindo, Department of Oncology,
St Jude Children's Research Hospital, Memphis,
TN, USA

Kieko Sato, Department of Pediatric Dentistry,
Nihon University School of Dentistry, Tokyo,
Japan

Shinsaku Imashuku, Takasago-seibu Hospital,
Takasago, Japan

Thomas Boehler, University of Heidelberg,
Mannheim Institute of Public Health; Medical
Service of Statutory Health Insurance in Baden-
Wuerttemberg, Mannheim, Germany

Editorial Staff

Emanuela Fusinato, Managing Editor

Cristiana Poggi, Production Editor

Claudia Castellano, Production Editor

Anne Freckleton, Copy Editor

Filippo Lossani, Technical Support



XXXVIII CONGRESSO NAZIONALE AIEOP

Associazione
Italiana
Ematologia
Oncologia
Pediatrica

Affiliata alla S.I.P.

per Medici e Infermieri

AIEOP incontra l'Europa



ROMA 9-11 GIUGNO 2013 Centro Congressi Angelicum

ABSTRACT BOOK

ABSTRACTS / *Comunicazioni e Poster*

Tumori solidi	1
Trapianto	13
Leucemie e Linfomi	24
Ematologia	49
Altro	69

ABSTRACTS / *Dati per Letti*

.....	92
-------	----



XXXVIII Congresso Nazionale AIEOP

Roma, 9-11 giugno 2013

TUMORI SOLIDI

CP01

SECONDI TUMORI DELLA TIROIDE IN PAZIENTI TRATTATI DURANTE L'INFANZIA ADOLESCENZA PER TUMORE MALIGNO: DIAGNOSI E TERAPIA DELLA CASISTICA DELLA FONDAZIONE IRCCS ISTITUTO NAZIONALE DEI TUMORI DI MILANO

M. Podda,¹ M. Terenziani,¹ L. Gandola,² N. Pizzi,³ P. Collini,⁴ A. Marchianò,⁵ R. Luksch,¹ A. Ferrari,¹ M. Casanova,¹ F. Spreafico,¹ D. Polastri,¹ C. Meazza,¹ S. Catania,¹ E. Schiavello,¹ V. Biassoni,¹ M. Massimino¹

¹SC Pediatria; ²SS Radioterapia Pediatrica;

³SC Otorinolaringoiatria; ⁴SC Anatomia Patologica;

⁵SC Radiodiagnostica, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale Dei Tumori, Milano, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il rischio di sviluppare secondi tumori della tiroide nei pazienti guariti da un tumore pediatrico dura parecchie decadi dalla fine della radioterapia ed aumenta all'aumentare della dose di radiazioni ricevuta dalla tiroide fino a 25-30 Gy per poi diminuire per effetto del "cell-killing".¹ Il tumore della tiroide è uno dei secondi tumori radioindotti più frequenti. Riportiamo la casistica della Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori che rappresenta una delle più consistenti numericamente riportate in letteratura.

METODI: è stato condotto uno studio retrospettivo su tutti i pazienti, con una età massima alla diagnosi del primo tumore di 21 anni, che abbiano sviluppato secondo tumore della tiroide tra il 1980 e il 2012. Tutti i casi sono trattati dal 1969 al 2004 per una neoplasia maligna insorta in età pediatrica presso la Fondazione.

RISULTATI: Casistica Sono stati individuati 36 pazienti con secondo tumore della tiroide, di cui 21 erano femmine. L'età mediana alla prima diagnosi era 8 anni (range 1-21 anni). Il tumore primitivo per cui sono stati curati era il seguente: 17 linfoma di Hodgkin, 4 neuroblastoma, 6 neoplasia del SNC (4 medulloblastoma, 1 ependimoma, 1 astrocitoma anaplastico), 2 sarcomi dei tessuti molli (1 rhabdomyosarcoma, 1 sarcoma del polmone), 2 sarcomi di Ewing, 2 tumore di Wilms, 2 istiocitosi a cellule di Langerhans, 1 Linfoma non Hodgkin. Il follow-up mediano è di 80 mesi (range 10-394). 20/36 pazienti erano in follow-up per il tumore primitivo o per il monitoraggio delle sequele dei pregressi trattamenti o perché seguiti per altro secondo tumore. 5/20 pazienti hanno preso parte ad uno studio prospettico di sorveglianza descritto in un altro lavoro.² 16 pazienti non eseguivano alcun tipo di controllo e si sono ripresentati nel momento di auto-riscontro di una tumefazione tiroidea o quando sono stati ricontattati dal nostro centro per riprendere il follow-up. La latenza mediana "apparente" tra il trattamento radiante e il primo riscontro dei noduli è 123 mesi (range 44-418), la latenza mediana tra il trattamento radiante e la diagnosi di tumore della tiroide è di 151 mesi (range 61-452). Trattamento del primo tumore Tutti questi pazienti avevano ricevuto un trattamento radiante nel corso della prima cura oncologica, la maggior parte dei pazienti sono stati sottoposti anche a chemioterapia (n=30). La dose mediana ricevuta dal tumore con potenziale coinvolgimento di parte del parenchima tiroideo era stata di 30 Gy (range 6-49 Gy). Trattamento del tumore della tiroide: In 29/36 pazienti è stato eseguito un accertamento cito-istologico prima di effettuare l'intervento chirurgico, in 5/36 casi non è stato eseguito e in 2/36 casi il dato non è noto. In 13/29 casi biopsiati il reperto orientava per carcinoma, in 8/29 il reperto

era dubbio o inadeguato, in 4/29 reperto era di benignità ed in 4/29 non è noto l'esito. 27/36 pazienti sono stati sottoposti ad intervento chirurgico presso il nostro istituto. Il tipo di trattamento chirurgico e le relative sequele sono descritte nella Tabella sottostante:

Tipo chirurgia		Sequele		
		ipoparatiroidismo	neurologiche	
Tiroidectomia totale	+ linfadenectomia	5	2	-
		18	3	-
Tiroidectomia totale 2 tempi	+ linfadenectomia	1	1	1
		3	2	-
Emitiroidectomia	+ linfadenectomia	3	-	-
		6	-	-

La diagnosi istologica è la seguente: 31 carcinomi papillari, 4 carcinomi follicolari, 1 carcinoma papillare ad incerto potenziale di malignità. 12 pazienti sono stati sottoposti anche a radioterapia metabolica, in 6 casi alla dose di 1 mCi/kg e nei rimanenti alla dose di 1-2 mCi/kg. Tutti i pazienti tranne 2 sono poi stati avviati a terapia soppressiva con L-tiroxina. In 14/36 casi i tumori sono stati classificati come pT4(6/14 N1a), 2/36 pT3, 9/36 pT2 (2/9 N1a), 10/36 pT1 (1/10 N1a), secondo la classificazione TNM 1989. 11/36 risultavano multifocali. L'OS a 5 e 10 anni è del 100 e 95% rispettivamente, la PFS a 5 e 10 anni è del 96 e 83%. 3/36 hanno avuto una recidiva di malattia a livello linfonodale, 1 paziente ha avuto metastatizzazione polmonare. I pazienti con recidiva linfonodale sono stati sottoposti a nuovo intervento chirurgico e in un caso anche a radioterapia metabolica, la paziente con metastasi polmonari è stata trattata con radioterapia metabolica. 6 pazienti hanno sviluppato oltre al tumore della tiroide anche altre neoplasie (4 tumori della mammella, 3 sarcomi). L'unico decesso è avvenuto per tossicità cardio-polmonare dovuta ai trattamenti eseguiti per guarire dal primo tumore ma anche per il sommarsi della tossicità della radioterapia metabolica. Una paziente è attualmente in trattamento perchè ha sviluppato un terzo tumore.

CONCLUSIONI: I nostri dati evidenziano che la prognosi dei pazienti affetti da secondo tumore della tiroide è ottima, come lo è quella dei carcinomi della tiroide de novo insorti in età pediatrica.³ La sopravvivenza di questi pazienti non dipende dall'aggressività chirurgica: tutti i pazienti con recidiva di malattia sono stati recuperati da un nuovo intervento chirurgico e da un adeguato trattamento soppressivo ormonale. L'unica paziente deceduta ha avuto complicanze correlate ai pregressi trattamenti, aggravate dalla radioterapia metabolica. I long term survivors sono pazienti in cui spesso trattamenti apparentemente innocui possono portare all'aggravarsi di precedenti patologie. La gestione di un ipoparatiroidismo può comportare controlli medici ravvicinati e la necessità di assumere ulteriori terapie sostitutive in pazienti già altamente medicalizzati, tutto ciò può avere un impatto sulla qualità di vita. Non sono quindi da incentivare trattamenti troppo aggressivi che comportano elevata morbilità per una malattia indolente, d'altra parte un approccio chirurgico conservativo necessita una maggiore compliance ad un follow-up a lungo termine che è comunque auspicabile nei pazienti sottoposti in precedenza a radioterapia.

Bibliografia:

1. Veiga LH, Lubin JH, Anderson H, et al: A pooled analysis of thyroid cancer incidence following radiotherapy for childhood cancer. Radiat Res. 2012 Oct;178(4):365-76.

- Massimino M, Gandola L, Mattavelli F et al: Radiation-induced thyroid changes: a retrospective and a prospective view. *Eur J Cancer*. 2009 Sep;45(14):2546-51
- Massimino M, Collini P, Leite SF et al: Conservative surgical approach for thyroid and lymph-node involvement in papillary thyroid carcinoma of childhood and adolescence. *Pediatr Blood Cancer*. 2006 Mar;46(3):307-13.

C001

METOTREXATO AD ALTE DOSI NELLA CHEMIOTERAPIA DELL'OSTEOSARCOMA: DUE DOSAGGI EMATICI PRECOCI IN CORSO DI INFUSIONE PER IDENTIFICARE PAZIENTI A RISCHIO DI ELIMINAZIONE LENTA E TOSSICITÀ

M. Gigante, M. Mascarini, P. Bulian, A. Lleshi, S. Scalone, S. Zanolin, M. Trovò

CRO, IRCCS, Aviano (PN), Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il metotrexato (MTX) viene somministrato ad alte dosi a giovani pazienti affetti da osteosarcoma ed è potenziale causa di tossicità severa. In presenza di eliminazione lenta, l'efficacia dei provvedimenti detossificanti, quali l'aumento dell'acido folico o la somministrazione dell'antidoto carbosipetidase-G2, è legata alla loro precocità. La curva in fase di infusione del MTX è in relazione con la sua velocità di eliminazione. Si vuole caratterizzare la curva della metotrexatemia con due dosaggi ematici in corso di infusione, verificare la correlazione con l'emivita di eliminazione e con la tossicità renale, per identificare precocemente i pazienti con eliminazione lenta del MTX.

METODI: Eleggibilità: pazienti con osteosarcoma in cura al CRO di Aviano, prescrizione di MTX ad alte dosi, da infondere in 4 o più ore. Tempo 0: inizio infusione MTX; prelievi di sangue venoso periferico al tempo 1, 2, 4, 24, 48, 72 ore. Monitoraggio clinico: diuresi elevata per almeno 3 giorni dopo MTX, alcalinizzazione del pH urinario e creatinemia pre- e post-MTX. Analisi dei dati: calcolo della correlazione (r) fra il rapporto di concentrazione tra la seconda e la prima ora (C_2/C_1) e l'emivita ($t_{1/2(4h-48h)}$). I cicli sono stratificati in gruppi con C_2/C_1 alto (A) >1.5 e C_2/C_1 basso (B) <1.5 . Sono stati presi in esame il n° di cicli che hanno richiesto, secondo il protocollo ISG/Oss, un aumento di acido folico ai tempi 24, 48 e 72 ore, per MTX maggiore di 20, 2, 0.2mM rispettivamente e il n° di cicli con incremento di creatinemia post-MTX, nei gruppi A e B.

RISULTATI: Sono stati monitorati 10 pazienti con età media di 18 anni (min - max: 15 - 24), per un totale di 35 cicli di MTX, di cui 31 valutabili per lo studio di correlazione; dose di MTX: 12 mg/mq in 28 cicli (6-12), tempo di infusione 4h (4 - 4.5). C_2/C_1 : media 1.56 (1.17 - 1.94). $t_{1/2}$: 4.1h (3.6 - 6.4); la correlazione r tra $t_{1/2}$ e C_2/C_1 è pari a 0.4 ($p=0.03$). $C_2/C_1 >1.5$ (gruppo A) in 19 cicli e $C_2/C_1 <1.5$ (gruppo B) in 11 cicli. Aumento della creatinemia >0.2 mg/dl: 7 cicli in A; 0 cicli in B. $C_{24h} >20$ mM: 11 cicli in A, 1 ciclo in B; $C_{48h} >2$ mM: 3 cicli in A; 0 cicli in B; $C_{72h} >0.2$ mM: 7 cicli in A; 2 cicli in B. Somministrazione antidoto: 2 cicli in A (C_2/C_1 : 1.51 e 1.69); 0 cicli in B. Interruzione infusione MTX seguita da tossicità epatica G3 e renale G2: 1 ciclo in A (C_2/C_1 : 1.51); 0 cicli in B.

CONCLUSIONI: C'è una correlazione positiva tra il rapporto C_2/C_1 e l'emivita di eliminazione del MTX: maggiore è C_2/C_1 più lenta è l'eliminazione. Valori di $C_2/C_1 >1.5$ sono associati a più frequenti incrementi della creatinemia post-MTX e a più frequenti metotrexatemie per le quali è richiesto l'avvio di procedure detossificanti.

C002

VALUTAZIONE DEI DISTURBI DELL'EQUILIBRIO DEI BAMBINI CON TUMORE DELLA FOSSA CRANICA POSTERIORE

E. Castelli,¹ D. Chieffo,¹ S. Staccioli,¹ A. Mastronuzzi,¹ C.E. Marras,¹ F. Locatelli,² P. Cappa,¹ M. Petarca¹

¹Dipartimento di Neuroscienze e neuroriabilitazione, Unità di Neuroriabilitazione; ²Istituto di Onco Ematologia Pediatrica, Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù", Roma, Italy

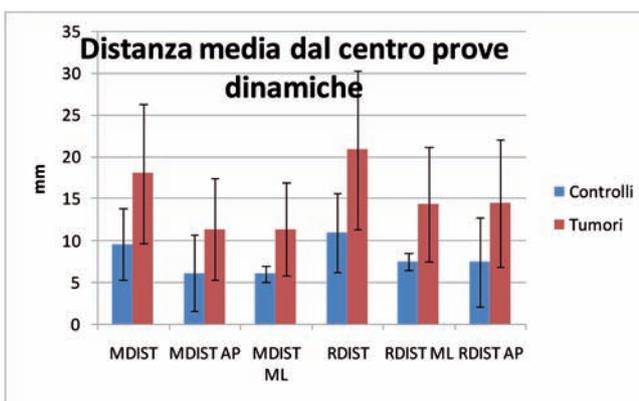
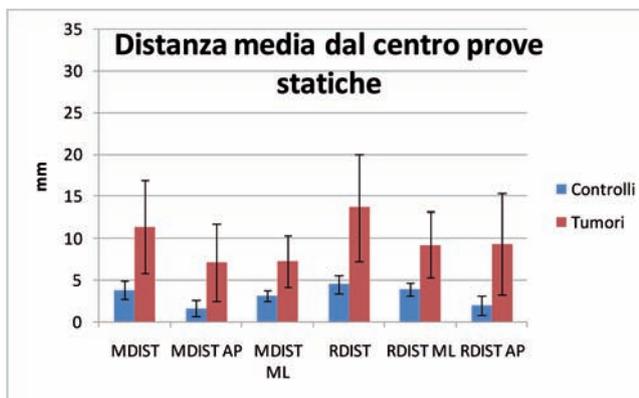
RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: I tumori primitivi del sistema nervoso centrale sono i più frequenti tumori solidi nel bambi-

no, secondi solo alla leucemia, con una incidenza di 250-300 nuovi casi ogni anno in Italia per pazienti di età inferiore ai 15 anni. Di conseguenza, i tumori cerebrali rappresentano una causa significativa di mortalità e morbilità nell'infanzia. Negli ultimi decenni, i miglioramenti nel trattamento di tali tumori hanno determinato un aumento della sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi, passata dal 50% all'80% per gli istotipi a basso grado di malignità. Tuttavia la sopravvivenza si associa, in pazienti lungosopravvissuti, a deficit complessi in ambito motorio, sensoriale, endocrino, cognitivo e psicologico, che compromettono significativamente la loro autonomia e qualità di vita. La valutazione ed il trattamento riabilitativo di tali problematiche cliniche è essenziale per ridurre gli esiti, ottenere il massimo recupero funzionale e favorire il reinserimento scolastico e sociale. Poiché la fossa cranica posteriore è la sede più frequente di localizzazione del tumore (oltre la metà delle neoplasie cerebrali insorge infatti nel cervelletto, nel tronco encefalico e nel IV° ventricolo) i disturbi dell'equilibrio, l'ataxia e i deficit di coordinazione motoria rappresentano il principale deficit motorio di tali pazienti. L'obiettivo del presente studio è la caratterizzazione clinica oggettiva dei disturbi dell'equilibrio durante la stazione eretta in bambini con neoplasia della fossa cranica posteriore, al fine di definire protocolli riabilitativi intensivi volti al recupero di tali deficit invalidanti, al miglioramento delle autonomie personali e della qualità di vita dei pazienti.

METODI: La valutazione dell'equilibrio è stata effettuata utilizzando la piattaforma RotoBit3D, che consiste in un robot a tre gradi di libertà. La base mobile del robot è in grado di ruotare intorno ad un punto fisso sotto il centro della superficie superiore della piattaforma. Il movimento è pertanto sferico, ovvero la base mobile si può orientare secondo i tre assi spaziali di rollio, beccheggio e imbardata. La condizione classica di studio dell'equilibrio su matrici di pressione o su piattaforme di forza prevede la realizzazione di prove statiche della durata di 30 s, durante le quali il soggetto deve mantenere la stazione eretta con la braccia lungo i fianchi ed i piedi sulla proiezione verticale delle spalle. Convenzionalmente per test dinamico s'intende l'esecuzione di piegamenti sulle ginocchia detti 'squat', mentre nel nostro caso la condizione dinamica consiste nel mantenere l'equilibrio in piedi mentre la pedana viene controllata in impedenza. In tal modo si crea un naturale presupposto di controtensioni tra pedana e soggetto. Il test è consistito nell'analisi delle traiettorie del *Centro di Pressione (CoP)* in prove di stazione eretta della durata di 30s, condotte ad occhi aperti e chiusi sia in condizioni statiche che dinamiche. Ogni condizione è stata ripetuta 3 volte. Tutti i soggetti sono stati misurati, nelle prove dinamiche, in condizioni comparabili in quanto la risposta in forza del robot è stata normalizzata in base alla loro altezza e peso. I movimenti del CoP sono stati registrati utilizzando due metodi: il primo basato sui sensori di forza propri della piattaforma RotoBit3D, il secondo con una matrice di pressione Matscan posta sulla piattaforma e in contatto diretto con i piedi. L'analisi statistica è effettuata utilizzando il software SPSS e confrontando le prove con ANOVA univariata e con il post hoc test di Bonferroni.

RISULTATI: Da un campione di 42 soggetti con neoplasia della fossa cranica posteriore sono stati selezionati 33 pazienti con caratteristiche cliniche tali da consentirne l'inserimento nello studio dell'equilibrio (18 maschi e 15 femmine, età media 10,2 SD 5,1 anni). In tale gruppo l'età media alla diagnosi è pari a 6,9 anni, mentre la diagnosi istologica è risultata la seguente: 27% medulloblastoma, 43% astrocitoma, 15% ependimoma, 15% altro. I risultati dello studio dell'equilibrio di tali soggetti sono stati comparati con quelli ottenuti con un gruppo di 9 soggetti di controllo (4 maschi e 5 femmine, età media 12,1 SD 3,9 anni). Solo una piccola parte dei pazienti con tumore è risultata in grado di eseguire le prove statiche a occhi chiusi, mentre in condizioni dinamiche è stato impossibile per la quasi totalità di essi eseguire il compito. Pertanto le prove ad occhi chiusi non sono qui analizzate in quanto il campione è risultato troppo ristretto. L'impossibilità ad eseguire i test significa che le alterazioni senso-motorie dei pazienti sono di entità tale da non consentir loro la stazione eretta se, oltre a privarli del canale visivo, viene contemporaneamente manipolata l'informazione propriocettiva tramite il movimento della base di appoggio. Analizzando la distanza media del CoP, ottenuta nelle prove statiche e dinamiche nelle due popolazioni studiate, si osserva un forte incremento, statisticamente significativo, nei risultati ottenuti nel gruppo di bambini con tumore (Figure seguenti). In particolare, la distanza media percorsa dalle oscillazioni del CoP aumenta in modo statisticamente significativo quando si eseguono le prove con la pedana in condizioni dinamiche. L'analisi delle oscillazioni medio-laterali e antero-posteriori, mostra una tendenza all'aumento delle oscillazioni medio-laterali rispetto a quelle antero-posteriori, ad eccezione delle prove dinamiche nelle quali si equivalgono. Le prove dinamiche mostrano valori maggiori rispetto a quelle statiche, quindi la distanza media dal centro medio di oscillazione

(MDIST) è maggiore nelle prove dinamiche, così come la lunghezza totale del percorso descritto dal CoP a terra e la sua velocità media di spostamento. Pertanto l'equilibrio su una superficie instabile come la pedana controllata in forza con punto di equilibrio orizzontale induce maggiori oscillazioni del CoP. Altro elemento rilevante, dalla lettura dei risultati sugli indicatori, è la tendenza ad una maggiore oscillazione in medio-laterale (ML) rispetto alla direzione antero-posteriore (AP). La possibile spiegazione è relativa al contesto dell'esercitazione ed alla configurazione biomeccanica del corpo. Al contesto, in quanto l'esercizio e la valutazione sono entrambi effettuati a piedi paralleli con base di appoggio allargata all'altezza delle spalle. Alla configurazione biomeccanica del corpo, in quanto con i piedi tenuti paralleli la base di appoggio è più estesa in medio-laterale piuttosto che in antero-posteriore. In aggiunta, sempre da un punto di vista biomeccanico, il controllo in AP può essere esercitato solo attraverso la flessione-estensione di anca e caviglia. Mentre, in ML tutto il parallelepipedo, costituito dai due arti inferiori, bacino e terreno, può compiere ampie oscillazioni laterali a patto che il tronco oscilli in direzione contro laterale. Dal confronto dei risultati tra bambini sani e soggetti con disturbi di equilibrio emerge che relativamente al bilanciamento nella direzione più critica, l'AP, si osserva una tendenza a maggiori valori nei soggetti con tumore. I valori in AP in questo test possono essere considerati come indici di maturità nel controllo dell'equilibrio in piedi, in particolare minori sono i valori più maturo è il controllo.



CONCLUSIONI: Le caratteristiche del controllo dell'equilibrio, rilevate nei soggetti con neoplasia della fossa cranica posteriore mediante la piattaforma robotizzata RotoBiT3D, costituiscono un punto di riferimento oggettivo per il follow up dei pazienti e pongono le basi per uno specifico training. I risultati ottenuti meritano attenzione anche perché la valutazione dell'equilibrio in condizioni dinamiche come quelle descritte nello studio ha caratteristiche di novità. Infatti, la metodologia dello studio dell'equilibrio in condizioni dinamiche utilizzata finora e riportata in letteratura, prevede sbilanciamenti autoindotti dal soggetto, al quale viene chiesto un piegamento sulle gambe, o indotti da pedane che si muovono su traiettorie monodirezionali. Il sistema RotoBiT3D, con i suoli 3 gradi di libertà e la possibilità di muoversi contemporaneamente su più piani, offre invece un ambiente riabilitativo ideale per il training dei disturbi atassici di questi pazienti.

P001

LA PROTEINA POLYCOMB EZH2: UNA METIL-TRANSFERASI COME POTENZIALE TARGET DI TERAPIA NEL RABDOMIOSARCOMA ALVEOLARE

R. Rota,¹ D. Palacios,² R. Ciarapica,¹ M. De Salvo,¹ G. Bracaglia,¹ L. Adesso,¹ E. Carcarino,² P.P. Leoncini,¹ A. Dall'agnese,² L. De Sio,¹ R. Boldrini,¹ A. Inserra,¹ G. Bisogno,³ A. Rosolen,³ R. Alaggio,³ A. Ferrari,⁴ P. Collini,⁴ M. Locatelli,¹ S. Rutella,¹ V.E. Marquez,⁵ S. Valente,⁶ A. Mai,⁶ L. Miele,⁷ P.L. Puri,² F. Locatelli¹

¹IRCCS, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy; ²IRCCS, Santa Lucia, Roma, Italy; ³Dipartimento di Pediatria, Università di Padova, Padova, Italy; ⁴Fondazione IRCCS, Istituto Tumori, Milano, Italy; ⁵Frederick National Laboratory for Cancer Research, CCR, National Cancer Institute, Frederick, USA; ⁶Sapienza, Università, Roma, Italy; ⁷Cancer Institute, University of Mississippi Medical Center, Jackson, USA

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: EZH2 è una proteina chiave che regola il processo di differenziamento cellulare. In particolare, EZH2 è l'unità catalitica del complesso detto "Polycomb Repressor Complex 2" (PRC2) e trimetila la Lisina 27 dell'Istone 3 (H3K27me3) reprimendo trascrizionalmente geni chiave del differenziamento tissutale. È sovra-espressa in vari tipi di tumori spesso considerata un marker prognostico negativo. In particolare, EZH2 agisce come un inibitore della miogenesi favorendo l'espansione dei progenitori staminali del muscolo. Di recente è stato riportato che la sua deplezione molecolare induce *in vitro* differenziamento di cellule di rhabdomyosarcoma (RMS) embrionale che, come conosciuto, sono essere di derivazione scheletrico-muscolare. Tuttavia, il ruolo di EZH2 nel RMS alveolare, caratterizzato dall'espressione di proteine oncogeniche della famiglia PAX/FOXO1 e che presenta spesso una prognosi infausta, non è conosciuto. Il nostro studio, pertanto, si propone di valutare l'espressione di EZH2 nei pazienti con rhabdomyosarcoma di caratterizzare le vie molecolari dipendenti da EZH2 nell'istotipo PAX/FOXO1 alveolare allo scopo di comprendere se tale proteina/gene può potenzialmente essere considerato come un bersaglio terapeutico.

METODI: Mediante studi di immuno-istochimica è stata valutata l'espressione di EZH2 in RMS primari. Il gene EZH2 è stato quindi silenziato per diminuire la sua espressione e sono state studiate la sopravvivenza e la morte (apoptosi) di linee cellulari di RMS alveolare positivo per PAX3/FOXO1 mediante analisi al citofluorimetro. Lo studio dei promotori dei geni regolati da EZH2 è stato fatto mediante immunoprecipitazione cromatinica con anticorpi anti-EZH2 e anti-H3K27me3. EZH2 è stata inibita farmacologicamente in linee cellulari *in vitro* e in un modello preclinico di xenotrapianto tumorale in vivo con (i) un inibitore che induce degradazione della proteina (DZNep) o con (ii) un inibitore catalitico che blocca la trimetilazione della K27(MC1945).

RISULTATI: I nostri risultati sui campioni primari di RMS indicano che EZH2 è espressa in modo anormale rispetto al tessuto muscolare, soprattutto nei campioni alveolari PAX/FOXO1-positivi, ed è correlata con l'espressione di Ki67. Il suo silenziamento molecolare induce differenziamento delle cellule RMS embrionali, come già riportato, e apoptosi delle cellule PAX3/FOXO1 alveolari. Mediante esperimenti di perdita di funzione, il nostro studio identifica FBXO32, un gene soppressore tumorale che induce apoptosi ed è represso da EZH2 in diversi tipi tumorali, quale gene chiave nel processo apoptotico mediato dalla deplezione di EZH2. Inoltre, dimostra che FBXO32 è direttamente represso da EZH2 che si lega sul suo promotore genico e ne inibisce la trascrizione in cellule PAX3/FOXO1 alveolari di RMS. Gli studi su modelli animali di xenografts trattati con gli inibitori di EZH2 DZNep e MC1945 dimostrano che entrambi riducono la crescita tumorale di cellule PAX3/FOXO1 in topi nudi.

CONCLUSIONI: I risultati ottenuti indicano che EZH2 (i) è deregolata nella sua espressione nel RMS, (ii) è uno dei geni responsabili dell'incapacità delle cellule di RMS embrionale di differenziare, (iii) regola la sopravvivenza delle cellule di RMS alveolare PAX/FOXO1 inibendo geni pro-apoptotici e (iv) la sua inibizione molecolare e farmacologica blocca la proliferazione e la crescita tumorale in vivo. Tali risultati forniscono una "proof of principle" del fatto che EZH2 possa rappresentare in futuro un target di terapia epigenetica adiuvante nella forma alveolare metastatica di RMS.

P002

COINVOLGIMENTO DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE NEI PAZIENTI AFFETTI DA RABDOMIOSARCOMA: CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEL LIQUOR CEFALORACHIDIANO

A. Zin,¹ E. Poli,² G. Bisogno,² A. Brunello,³ A. Garaventa,⁴ R. Burnelli,⁵ P. Bertolini,⁶ L. Miglionico,⁷ L. De Sio,⁸ M. Nardi,⁹ C. Cerri,¹⁰ M. Provenzi,¹¹ A. Rosolen²

¹Istituto della Ricerca Pediatrica Città della Speranza, Azienda Ospedaliera, Università di Padova, Padova; ²Clinica di Oncoematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera, Università di Padova, Padova; ³UO Oncologia Medica 1, Istituto Oncologico Veneto, IOV, IRCCS, Padova; ⁴Istituto Giannina Gaslini, Dipartimento di Emato-Oncologia Pediatrica, Genova; ⁵Pediatría, Azienda Ospedaliera, Università Arcispedale S. Anna, Ferrara; ⁶UO di Pediatria e Onco-Ematologia, Azienda Ospedaliera di Parma, Parma; ⁷Divisione di Pediatria, Ospedale Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo; ⁸Oncologia Pediatrica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma; ⁹Centro di Oncoematologia Pediatrica e Trapianto Midollo Osseo, Ospedale S. Chiara, Pisa; ¹⁰UO di Pediatria e Onco-Ematologia, Ospedale S. Maria della Misericordia, Perugia; ¹¹Pediatría Oncologica, Ospedali Riuniti di Bergamo, Bergamo, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Le meningiti di origine neoplastica sono causate dall'infiltrazione di cellule tumorali attraverso la via sistemica o da tumori primitivi che coinvolgono il sistema nervoso centrale (SNC), come ad esempio i sarcomi dei tessuti molli o malattie linfoproliferative maligne. La disseminazione meningea nel rhabdomyosarcoma (RMS) è riportata in diversi studi, soprattutto per quanto riguarda i tumori parameningei e della zona testa-collo, ed è considerata uno dei fattori prognostici sfavorevoli. L'esame citologico del fluido cerebrospinale (CSF) è una delle indagini diagnostiche richieste all'esordio di malattia o nel caso di sospetto coinvolgimento del SNC e la sua positività è un evento poco comune ed ancor più raro quando il tumore primitivo è localizzato in altre sedi, come ad esempio le estremità ed il tronco. In questo studio abbiamo confrontato i risultati ottenuti mediante la caratterizzazione molecolare e l'esame citologico di alcuni CSF, allo scopo di determinare quale indagine diagnostica risulti essere maggiormente sensibile nell'identificare la presenza di malattia e consentire un rapido trattamento a livello del SNC.

METODI: Abbiamo valutato l'espressione di *MyoD1*, *Miogenina* (marcatori tumore-associati) e *PAX3-FOXO1* e *PAX7-FOXO1* (marcatori di RMS alveolare) utilizzando la reazione polimerasica a catena (RT-PCR) sul liquor cefalo-rachidiano (3-5 mL) di 23 pazienti affetti da RMS arruolati nei protocolli RMS2005. Nella Tabella sottostante sono riportate alcune caratteristiche cliniche ed il *timing* di prelievo al quale è stato valutato il CSF.

Localizzazione del tumore primitivo				
	Parameningeo (pazienti =17)	Testa-collo (pazienti=2)	Altre sedi (pazienti=3)	Non nota (pazienti=1)
Età				
<10	10	2	0	1
>10	7	0	3	0
Sesso				
Maschio	9	1	3	1
Femmina	8	1	0	0
Istologia				
Alveolare (RMSA)	5	0	3	0
Embrionale (RMSE)	11	2	0	1
Altro	1	0	0	0
Stadio, IRS				
I	0	0	0	0
II	0	0	1	0
III	14	0	0	0
IV	3	2	2	0
non noto	0	0	0	1
CSF (timing prelievo)				
Esordio	11	1	1	1
Esordio e recidiva	2	0	0	0
Recidiva	4	1	2	0
Totale valutati	17	2	3	1

RISULTATI: La ricerca dei marcatori molecolari per RMS è risultata negativa su 14 dei 16 CSF valutati all'esordio di malattia (13 RMS parameningei); l'unico caso positivo in RT-PCR per *MyoD1* e *Miogenina* lo era anche all'esame citologico, ma la caratterizzazione molecolare è stata un valido supporto per la definizione della diagnosi istologica di RMS embrionale in quanto la sede del tumore primitivo non era nota. In seguito ad un sospetto clinico di recidiva e progressione di malattia, in 2 casi di RMSA parameningeo, è stato nuovamente valutato il liquor e per entrambi è risultato positivo oltre che ai due trascritti miogenici, anche per la presenza del trascritto chimerico *PAX3-FOXO1*. L'esame citologico era negativo. In altri 4 casi di RMS metastatico (1 arti, 1 parameningeo, 1 retroperitoneale e 1 testa-collo) dopo il sospetto clinico e radiologico di una possibile disseminazione meningea di malattia, è stato analizzato il CSF ed in tutti è stata dimostrata la presenza dei marcatori molecolari specifici del RMS (1 RMSE e 3 RMSA); la citologia era risultata positiva in un 1 in un altro era sospetta per presenza di cellule cancerose e in 2 era negativa.

CONCLUSIONI: Il coinvolgimento del SNC nel RMS parameningeo e della zona testa-collo è un evento raro ma possibile e rappresenta un fattore prognostico estremamente negativo. Recenti pubblicazioni riportano anche la possibile disseminazione meningea in tumori localizzati in regioni diverse da quelle descritte e l'importanza di valutare la presenza di cellule neoplastiche nel CSF per poter instaurare una terapia adeguata. In questo studio abbiamo dimostrato che la caratterizzazione molecolare mediante RT-PCR può essere considerato un test diagnostico più sensibile, rispetto a quello morfologico comunemente raccomandato dai protocolli correnti, per evidenziare la presenza di cellule tumorali nel liquor cefalo-rachidiano e può essere dirimente in caso di dubbio clinico-radiologico.

P003

TRATTAMENTO DEL NEUROBLASTOMA NELL'INFANT CON COMPRESSIONE EPIDURALE SINTOMATICA. L'ESPERIENZA AIEOP

A.R. Gliotti,¹ V. Vitale,² B. De Bernardi,¹ A. Castellano,³ M. Bianchi,⁴ R. Lustch,⁵ L. Quaglietta,² S. Mastrangelo,⁶ E. Viscardi,⁷ E. Pota,⁸ P. Pierani,⁹ P. D'Angelo,¹⁰ R. Burnelli,¹¹ C. Gandolfo,¹² A. Nastro,² G. Cinalli,² G. Piattelli,¹ G. Erminio,¹ M. Conte¹

¹IRCCS, Istituto Giannina Gaslini, Genova; ²AORN, Santobono-Pausilipon, Napoli; ³IRCCS, Ospedale Bambino Gesù, Roma; ⁴Clinica Pediatrica, Ospedale Regina Margherita, Torino; ⁵IRCCS, Istituto Nazionale Tumori, Milano; ⁶Clinica Pediatrica, Ospedale Gemelli, Roma; ⁷Clinica Pediatrica, Ospedale Civile, Padova; ⁸Clinica Pediatrica, Seconda Università di Napoli, Napoli; ⁹Clinica Pediatrica, Ospedale Salesi, Ancona; ¹⁰Clinica Pediatrica, Policlinico Universitario, Palermo; ¹¹Clinica Pediatrica, Ospedale Civile, Ferrara; ¹²IRCCS, Istituto Gaslini, Genova, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Oltre la metà dei bambini con neuroblastoma (NB) con sintomi di compressione midollare (CM) all'esordio è diagnosticato nell'infant (0-11 mesi). Il riconoscimento precoce dei sintomi di CM (dolore rachideo, deficit motorio, disfunzioni sfinteriche e deficit della sensibilità) in questi bambini spiega il frequente ritardo di diagnosi e trattamento, e l'elevato rischio di sequele neurologiche ed ortopediche. La terapia della CM è inizialmente neurochirurgica (NCH) o chemioterapica (CT), senza che siano ben definite le indicazioni per l'una o l'altra opzione. La scelta dell'approccio terapeutico è tuttavia particolarmente rilevante per l'infant, più suscettibile rispetto alle età successive a sviluppare complicanze iatrogene. Poiché non esistono specifiche pubblicazioni sulla CM nell'infant con NB (a parte la casistica Santobono-Pausilipon in corso di stampa), ci è parso utile descrivere l'esperienza dei Centri di Oncologia Pediatrica AIEOP a questo riguardo.

METODI: Dal gennaio 2000 all'ottobre 2011, dei 1436 pazienti di età compresa tra 0-18 anni con diagnosi istologica di tumore neuroblastico maligno (NB e GNB, nodulare o intermixed) registrati al Centro Coordinatore AIEOP, 571 (40%) erano infant, di cui 43 (7%) presentavano sintomi di CM. L'iter diagnostico ha seguito le linee guida INSS. Il trattamento antitumorale è stato eseguito secondo i protocolli SIO-PEN. I centri partecipanti hanno utilizzato schede ad hoc per riportare le caratteristiche cliniche, il trattamento della CM/tumore e le sequele. Di 43 pazienti eleggibili, 35 sono risultati valutabili. Il follow-up è stato esteso al 31 Dicembre 2012. Il deficit motorio, sintomo preminente, è stato quantizzato da 0 a 3 secondo la scala ASIA, adattata all'età. Gli altri sintomi sono stati segnalati come presenti o assenti.

RISULTATI: Le principali caratteristiche cliniche ed i sintomi di CM dei pazienti valutabili sono riportate in Tabella 1. Dei 35 pazienti, 14 sono stati sottoposti inizialmente a decompressione neurochirurgica (laminotomia in 9, laminectomia in 5) seguita da CT. I rimanenti 21 pazienti sono stati trattati inizialmente con CT, seguita a distanza di alcuni mesi da asportazione di residuo intraspinale in 3 casi. La CT è stata somministrata prima della biopsia diagnostica in 4 pazienti, di cui 3 presentavano paraplegia ed 1 dispnea severa. Corticosteroidi sono stati somministrati a 16 pazienti. *Risposta alla terapia.* La risoluzione completa del deficit motorio è stata ottenuta in 6/34 pazienti (17%): 2/14 (14%) trattati con NCH e 4/21 (19%) trattati con CT. Un miglioramento parziale è stato ottenuto in 13 pazienti: 6/14 (38%) trattati con NCH e 8/21 (38%) trattati con CT. In altri 13 pazienti il deficit non ha subito modificazioni: 5/14 (36%) trattati con NCH e 8/21 (38%) trattati con CT. Infine, 3 pazienti sono peggiorati in corso di trattamento: 1 trattato con NCH e 2 con CT. La disfunzione vescicale era presente in 11 pazienti: si è risolta in 1, è rimasta stabile in 6, è peggiorata in 3 ed è insorta in corso di trattamento in 2. La disfunzione intestinale era presente in 8 pazienti: si è risolta in 4, è migliorata in 1, è rimasta stabile in 2, è peggiorata in 1, ed è insorta in corso di trattamento in 1. Il dolore, presente alla diagnosi in 11 pazienti, si è risolto in tutti entro due mesi. Deficit sensitivo, presente in 8 pazienti, si è risolto in 7 e persiste in 1. Due dei 3 pazienti con dispnea severa hanno richiesto tracheostomia che rimane in situ a 3 e 5 anni dalla diagnosi. *Sequela.* Con un tempo di osservazione di 12-60 mesi (mediana, 60), 12 pazienti (34%) sono esenti da deficit motori e 23 (66%) presentano un qualche deficit (13 di grado 1, 4 di grado 2, 6 di grado 3). Dodici pazienti (34%) hanno disfunzione vescicale (de novo in 3 casi). Otto pazienti (23%) presentano disfunzioni intestinali (de novo in 5 casi). Otto pazienti (23%) presentano esiti ortopedici. *Sopravvivenza.* Tutti i 35 pazienti sono vivi senza malattia attiva da 13 a 139 mesi (mediana, 76).

Tabella 1.

Caratteristiche alla diagnosi	#	%
Genere		
Maschio	21	60
Femmina	14	40
Età (giorni)		
0-30	5	14
31-180	14	40
>180	16	46
Età mediana	161	
Sede tumore primitivo		
Collo	2	6
Torace	11	32
Toraco-addominale	7	20
Addome	13	37
Pelvi	2	6
Stadio INSS		
2	4	11
3	25	71
4	3	9
4s	3	9
Sede tumore primitivo		
Cervicale	2	6
Toracica	11	31
Toraco-addominale	7	20
Addominale	13	37
Pelvic	2	6
Deficit motorio		
Assente	1	3
1	8	23
2	13	37
3	13	37
Altri sintomi		
Dolore rachideo	11	31
Deficit sensitivo	7	20
Turbe intestinali	7	20
Disfunzione vescicale	11	31
Dispnea	3	9

CONCLUSIONI: Questi dati confermano che la maggioranza degli infant con NB e CM sviluppano sequele di vario tipo, in particolare motorie. La risposta alla terapia è sembrata indipendente dal tipo di trattamento iniziale (NCH vs CT).

Bibliografia:

- De Bernardi B, Pianca C, Pistamiglio P, et al. Neuroblastoma with symptomatic spinal cord compression at diagnosis: Treatment and results with 76 cases. *J Clin Oncol.* 2001;19:183-190.
- Katzenstein HM, Kent PM, London WB, et al. Treatment and outcome of 83 children with intraspinal neuroblastoma: The Pediatric Oncology Group experience. *J Clin Oncol.* 2001;19:1047-1055.
- De Bernardi B, Balwier W, Bejant J, et al. Epidural compression in neuroblastoma: diagnostic and therapeutic aspects. *Cancer Letters.* 2005;228:283-299.
- Angelini P, Plantaz D, De Bernardi B, et al. Late sequelae of symptomatic compression in children with localized neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2011;57:473-480.
- Simon T, Niemann CA, Hero B, et al. Short- and long-term outcome of patients with symptoms of spinal cord compression by neuroblastoma. *Dev Med Child Neurol.* 2012;54:347-52.
- Capasso M, Cinalli G, Anna Nastro, et al. Symptomatic Epidural Compression in Infants with Neuroblastoma. A Single-Center Experience with Five Cases. *J Ped Hematol Oncol.* 2013 (in corso di stampa).

P004

MULTIFOCALITÀ COME FATTORE DI RISCHIO INDIPENDENTE IN BAMBINI CON EPATOBLASTOMA

M. Provenzi,¹ F. Saettini,¹ E. Giraldo,¹ C. Foglia,¹ L. Cavalleri,¹ L. Cattaneo,¹ A. Allegrini,¹ G. Fasolini,² A. Sonzogni,³ A. Lucianetti,⁴ M. Colledan,⁵ L. D'Antiga⁶

¹Oncoematologia Pediatrica; ²Radiologia; ³Anatomia Patologica; ⁴Chirurgia Toracica; ⁵Chirurgia dei Trapianti; ⁶Gastroenterologia e Trapianti Pediatrici, Ospedale Papa Giovanni XXIII, Bergamo, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: L'epatoblastoma (HB) è il più frequente tumore epatico in età pediatrica. Negli ultimi decenni la sopravvivenza è notevolmente aumentata ed in particolare l'utilizzo di un regime chemioterapico intensificato nei pazienti considerati ad alto rischio ne ha significativamente migliorato l'*outcome*. Lo scopo di questo studio è di analizzare la frequenza di malattia multifocale (Mul+) alla diagnosi nella casistica del centro AIEOP di Bergamo e di identificarla come nuovo fattore di rischio. Allo stato attuale la multifocalità non rientra nella stratificazione prognostica in uso, anche se recentemente alcuni autori ne hanno proposto l'introduzione¹.

METODI: Sono stati retrospettivamente identificati 33 pazienti con HB, presso gli Ospedali Riuniti di Bergamo tra il 1998 e il 2011. I pazienti sono stati stratificati, in accordo con i protocolli SIOPEL in uso, in alto rischio (HR se AFP < 100 ng/ml, e/o PRETEXT IV e/o invasione vascolare e/o malattia extraepatica intra-addominale (V+/P+/E+) e/o metastasi a distanza M+) o in rischio standard (SR, tutti i rimanenti). Inoltre, in aggiunta ai fattori sopra-menzionati è stata indagata come possibile fattore prognostico, la presenza di malattia multifocale alla diagnosi. Gli *outcomes* considerati sono stati espressi con Event Free Survival (EFS) e Overall Survival (OS) stimate in accordo con il metodo di Kaplan Meier.

RISULTATI: Le caratteristiche degli 11 pazienti Mul+ alla diagnosi sono descritte nella Tabella 1. Gli HB Mul+ sono stati diagnosticati ad un'età maggiore (39,2 mesi, DS=22,6) rispetto ai Mul- (21,4 mesi, DS=29,2), sebbene il dato sia solo prossimo alla significatività statistica (p=0,07). Non è stata rilevata differenza significativa nel volume tumorale alla diagnosi tra i due gruppi (p =0,548). Dopo chemioterapia (CT) neoadiuvante si è invece osservato un maggiore residuo tumorale nei pazienti Mul+ (122 vs 297 cm³, p =0,019). Tuttavia in questo setting di pazienti una riduzione volumetrica maggiore si è ottenuta con l'intensificazione del trattamento: nei 6 pazienti trattati con protocolli precedenti al SIOPEL 4 la massa è rimasta invariata (aumentando da 281 cm³ a 290 cm³, p=0,94), mentre il gruppo che ha ricevuto il SIOPEL 4 ha visto diminuire il volume medio da 724 cm³ a 296 cm³ (n=5, p=0,035). La multifocalità peggiora l'*outcome* a 3 anni, sia valutata con l'analisi univariata (p=0,01) che multivariata (p=0,007). Con il metodo di Kaplan Meier il dato raggiunge la significatività (EFS p=0,006, Figura 1; OS p=0,0004, Figura 2).

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti Mul+. Età e follow up indicati in mesi.

Pt n.	Sex	Età	AFP ng/ml	Pretext	Protocollo	Chirurgia	Recidiva	Follow up	Status
1	F	8	168	III	3SR	Res+OLTxr	Epatica	16	Deceduto
2	F	33	20000	IV	3HR	OLTx	Epatica	5	Deceduto
3	M	78	1000000	IV V+P+	3HR	OLTx	Epatica	8	Deceduto
4	M	37	2333	III M+E+	3HR	OLTx	Epatica	7	Deceduto
5	M	73	48736	III	3SR	Res	M	106	NED
6	F	29	1402455	IV M+	3HR	OLTx	M	34	Deceduto
7	M	16	0	IV	4	Res+OLTxr	Epatica	5	Deceduto
8	M	12	48870	IV	4	Res	-	62	NED
9	M	94	88893	IV P+	4	OLTx	M	36	NED
10	F	20	60500	IV P+	4	OLTx	-	17	NED
11	M	142	869	IV M+P+	4	OLTx	-	7	NED

Res=epatectomia parziale, NED=non evidence of disease.

Anche considerando il solo gruppo di pazienti HR la multifocalità è significativamente associata ad un peggioramento dell'outcome (Figura 3): l'EFS a 3 anni è pari al 26% rispetto al 90% dei pazienti Mul- HR ($p=0,04$). Per quanto concerne il trattamento chirurgico (Figura 4):

- in 4 pazienti (2 classificati SR in base al PRETEXT) è stata effettuata resezione epatica dopo CT; 3 pazienti hanno presentato recidiva, di cui 2 a livello epatico (decaduti nonostante OLTx rescue) e 1 a livello polmonare (recuperato dopo metastasectomia e CT)
- in 7 pazienti è stato effettuato dopo CT trapianto epatico (OLTx); 5 sono recidivati, di cui 3 a livello epatico, in un caso a livello polmonare e in un paziente sia polmonare che extra-epatico (4 pazienti sono deceduti). Tra i 22 HB Mul- sono stati effettuati 4 OLTx: tutti i pazienti risultano liberi da malattia.

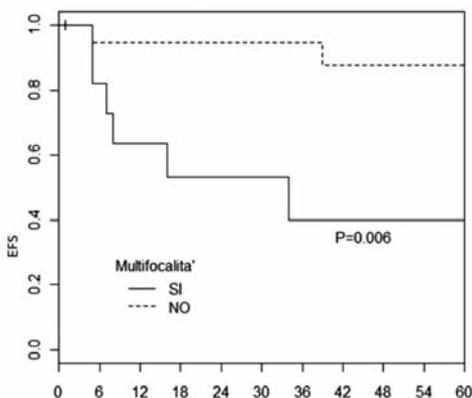


Figura 1. EFS stratificato secondo multifocalità. Mul+ 40% (CI 95% 72-85%), Mul- 95% (100-85%).

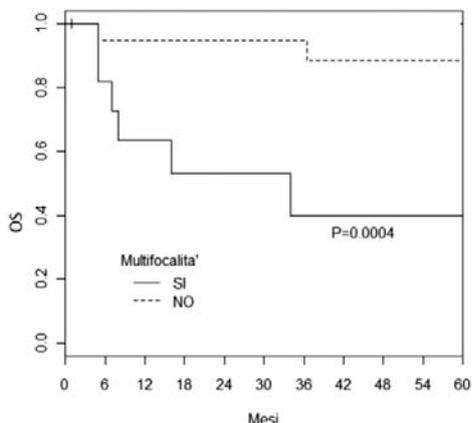


Figura 2. OS stratificato secondo multifocalità.

Per quanto concerne il trattamento chemioterapico utilizzato, abbiamo osservato che nei 5 pazienti trattati con un regime ad aumentata dose-intensity (SIOPEL 4) l'OS stimata è 80%: (l'unico evento si è verificato in un paziente che presentava come fattore di rischio aggiuntivo un valore di AFP < 100 ng/ml) rispetto ai pazienti trattati con protocolli precedenti in cui l'OS è stata del 17% (2/5 recidive nel SIOPEL 4 vs 6/6 nei protocolli precedenti). Probabilmente a causa dell'esiguità del campione questo dato non raggiunge ma si avvicina alla significatività statistica (Fisher Test $p=0,06$).

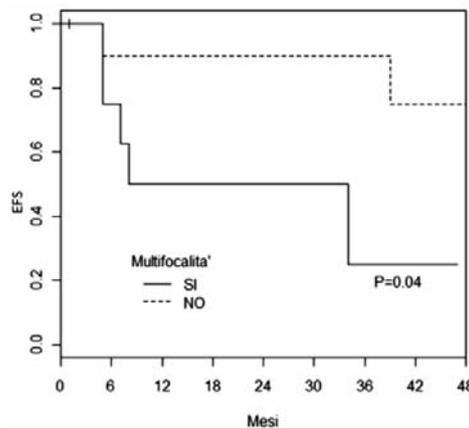


Figura 3. EFS stratificato secondo multifocalità nei pazienti HR.

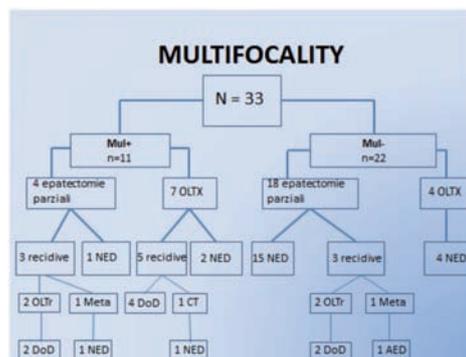


Figura 4. Management chirurgico e outcomes dei 33 pazienti con HB. OLTxr=OLTx rescue, AED=alive with evidence of disease, Meta=metastasectomia.

CONCLUSIONI: In questo studio abbiamo dimostrato come la presenza di malattia multifocale alla diagnosi nei pazienti con HB sia un fattore di rischio indipendente, associato ad un peggiore *outcome*. Questi risultati si allineano con quanto proposto da Maibach et al. in una recente revisione di oltre 500 casi di HB trattati con i protocolli SIOPEL¹. I pazienti con malattia multifocale dopo epatectomia parziale presentano un rischio aumentato di recidiva rispetto ai monofocali e vanno quindi più frequentemente avviati a OLTX. Nella nostra casistica abbiamo tuttavia osservato anche dopo OLTX un maggior numero di recidive rispetto ai soggetti trapiantati per malattia monofocale non resecabile. I pazienti Mul+ trattati con protocollo chemioterapico a maggiore dose-intensità (SIOPEL 4) hanno ottenuto una riduzione dimensionale significativamente maggiore e un miglioramento dell'*outcome*. Anche se considerata l'esiguità del campione i nostri dati non sono sufficienti per conclusioni definitive, riteniamo che, qualora venissero confermati dall'analisi di una casistica più ampia, i pazienti Mul+ indipendentemente dal PRETEXT all'esordio vadano considerati ad alto rischio e quindi trattati con regimi chemioterapici più intensi.

Bibliografia:

1. Maibach R, Roebuck D, Brugieres L, Capra M, Brock P, Dall'Igna P, Otte JB, De Camargo B, Zsiros J, Zimmermann A, Aronson D, Childs M, Scopinaro M, Morland B, Plaschkes J, Czuderna P, Perilongo G. Prognostic stratification for children with hepatoblastoma: The SIOPEL experience. *European Journal of Cancer* 2012; 48: 1543– 1549.
2. D'Antiga L, Vallortigara F, Cillo U, Talenti E, Rugge M, Zancan L, Dall'Igna P, De Salvo GL, Perilongo G. Features predicting unresectability in hepatoblastoma. *Cancer* 2007; 110(5): 1050-8.

P005

TUMORE CEREBRALE SOTTOTENTORIALE E OUTCOME: IMPLICAZIONI RIABILITATIVE IN ETÀ PEDIATRICA

D. Chieffo,¹ S. Staccioli,¹ D.E. Secco,² A. Mastronuzzi,² C.E. Marras,¹ F. Locatelli,² E. Castelli¹

¹Dipartimento di Neuroscienze e Neuroriabilitazione; ²Istituto di Onco Ematologia Pediatrica, Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù", Roma, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il progresso scientifico in campo neuro-oncologico pediatrico ha aperto nuove frontiere sulla presa in carico del piccolo paziente non solo dal punto di vista clinico-terapeutico ma anche per quanto concerne il reinserimento del piccolo paziente nel mondo sociale. Questo passaggio, talvolta, viene impedito dalle sequele spesso inevitabili che una malattia neuro-oncologica e i trattamenti a cui i bambini vengono sottoposti possono comportare. Come descritto in letteratura (Pruitt DW 2011) i bambini con un tumore cerebrale vanno incontro a un significativo cambiamento dal punto di vista neuropsicologico con una secondaria compromissione nel comportamento adattivo e nel reinserimento nelle attività della vita quotidiana. Le cause di questi disordini neuro-funzionali, che insorgono molto precocemente rispetto alla diagnosi, possono essere diverse e direttamente legate alla patologia di base e/o alla sua terapia. La riabilitazione è finalizzata al recupero di tali disabilità attraverso nuove strategie di intervento. L'obiettivo di questo studio è la caratterizzazione clinica, neuropsicologica e funzionale di bambini affetti da un tumore cerebrale sottotentoriale, con particolare attenzione alle autonomie della vita quotidiana che lo stesso bambino e la sua famiglia ricercano dopo un periodo di malattia. Tutti i risultati sono stati correlati con i fattori che potrebbero incidere sulla diversità dei disordini riscontrati. In particolare sono state considerate le seguenti variabili: età d'insorgenza del tumore, diagnosi istologica, tipo di trattamento neurochirurgico e oncologico.

METODI: Sono stati arruolati i pazienti con tumore della Fossa Cranica Posteriore riferiti all'Unità di Neuroriabilitazione dell'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù. Sono stati esclusi i pazienti con grave compromissione neurologica, in accordo con la classificazione WHO Measuring Health and Disability. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a valutazione neurologica, *screening* neuro-psicologico (sviluppo cognitivo, prassia, attenzione uditiva e visiva, funzioni mnestiche, funzioni esecutive, funzioni visuo-percettive) e delle funzioni neuro-visive (motilità oculare, acuità e attenzione a distanza), oltre a un inquadramento secondo la Classificazione Internazionale del Funzionamento (ICF). I risultati neu-

ropsicologici e del funzionamento della disabilità proposta dall'ICF sono stati correlati con l'età d'insorgenza del tumore (Infant/Late children), con l'istologia (Medulloblastoma –MB-/Astrocitoma pilocitico/Ependimoma/Glioblastoma), e con i diversi approcci terapeutici: (1) chirurgia, (2) chirurgia-chemio e radioterapia, (3) chirurgia e chemio, (4) chirurgia e radioterapia.

RISULTATI: Sono stati arruolati quarantadue bambini (Maschi=30; Femmine=12), età media al primo controllo post-chirurgico di 6 anni e 9 mesi, età media a fine follow up 9 anni e 1 mese. Nel gruppo "Infant" (inteso come bambini di età inferiore ai 5 anni) sono stati arruolati 19 pazienti (45%) mentre nel gruppo "late children" (bambini di età superiore ai 5 anni) ne sono stati inclusi 23 (55%). Il 43% era affetto da Astrocitoma pilocitico, il 27% da MB, il 15% da ependimoma e il restante 15% da glioblastoma. Di questi 42 pazienti, il 32% era stato sottoposto esclusivamente alla neurochirurgia, il 36% aveva eseguito chirurgia, chemio e radioterapia, il 15% chirurgia e chemioterapia, il 17% chirurgia e radioterapia. I risultati globale complessivi hanno messo in luce che 36 pazienti su 42 (85,78%) presentavano sequele neurofunzionali. In particolare, dai risultati neuropsicologici emergeva un funzionamento intellettivo nella norma in 36 pazienti, mentre risultava inferiore in 6 pazienti (media QIT=77,33; QIV=85,22; QIP=68,2) con un profilo disarmonico con cadute nelle prove non verbali. Quando venivano indagate le funzioni cognitive superiori, si rilevavano i disordini di linguaggio nel 64% dei casi, di memoria nel 31%, di attenzione nel 78% e di integrazione visuo-motoria nel 42%. Le funzioni esecutive risultavano deficitarie nel 62% dei casi. Si rilevava inoltre un disordine neurosensoriale nel 62% dei pazienti e neuromotorio, soprattutto con implicazione dell'equilibrio, nel 78% dei casi. Dai risultati dell'ICF emergevano complicanze in tutte le aree esplorate. In particolare si osservava in 27 pazienti (64%) una compromissione delle autonomie, una limitazione e un abbandono nei confronti dell'ambiente nel 62% dei bambini. Una necessità di ricorrere a una figura di sostegno nel 78% dei pazienti scolarizzati. Nel 48% dei bambini al questionario ICF emergeva una difficoltà del funzionamento cognitivo globale. Sia i risultati neuropsicologici che le scale ICF (autonomia, limitazione nei confronti dell'ambiente e funzionamento cognitivo generale) venivano correlate con l'età alla diagnosi ("Infant"/Late children), l'istologia (MB, Astrocitoma pilocitico, Ependimoma, Glioblastoma), e con i diversi approcci terapeutici (chirurgia/chirurgia-radio e chemio/chirurgia e chemio/chirurgia e radio). I risultati più salienti ricavati dall'analisi statistica mettevano in luce una correlazione significativa tra i deficit cognitivi e l'età della diagnosi "late children" ($p=0,023$). Tale dato veniva confermato anche nell'analisi con ICF, riduzioni delle autonomie e abbandono nei confronti dell'ambiente risultavano correlate con una età superiore ai 6 anni ($p=0,031$). Al contrario, i disordini neurosensoriali erano significativamente correlati con età "Infant" ($p=0,012$), così come i disordini neuromotori ($p=0,014$). La diagnosi istologica di MB era significativamente correlata con il funzionamento cognitivo globale ($p=0,021$) e con la scala sulle riduzioni delle autonomie ($p=0,012$), mentre la scala di limitazione era correlata sia col MB ($p=0,001$) che con i pazienti affetti da astrocitoma pilocitico ($p=0,0123$). I disordini del linguaggio erano presenti sia nei bambini con MB che con astrocitoma, senza però raggiungere un valore statisticamente significativo. In modo analogo si comportavano le abilità di attenzione e le funzioni esecutive. I disordini neurosensoriali erano correlati significativamente con la diagnosi istologica di MB ($p=0,034$). Il funzionamento cognitivo globale appariva statisticamente correlato con il trattamento neurochirurgico ($p=0,034$) e con la chirurgia e il trattamento oncologico chemio e radioterapico ($p=0,012$), mentre non emergeva correlazione con altri trattamenti terapeutici. Le funzioni neuropsicologiche, nello specifico il linguaggio, era correlato con il trattamento neurochirurgico ($p=0,001$) mentre le funzioni attentive risultavano correlate con il trattamento chemioterapico e chirurgico ($p=0,031$). La velocità di processamento e le abilità mnestiche sembravano correlarsi con il trattamento chirurgico e radiante ($p=0,012$). Riguardo i fattori ICF, le funzioni e le attività e partecipazione erano correlate con il trattamento oncologico chirurgico, chemio e radioterapico ($p=0,032$), al contrario i fattori ambientali e personali risultavano correlati con la neurochirurgia ($p=0,042$).

CONCLUSIONI: I nostri risultati hanno evidenziato, in accordo con la letteratura (Pillai S 2012), che nei bambini con tumore cerebrale della fossa cranica posteriore, le importanti disabilità che richiedono uno specifico programma di neuro-riabilitazione. Tali disabilità intervengono sulle autonomie, sull'abbandono delle proprie attività e quindi sulla qualità di vita del piccolo paziente. I fattori verosimilmente responsabili delle disabilità potrebbero essere l'età d'insorgenza del tumore, (soprattutto dopo i 6 anni), la diagnosi istologica del tumore e

in particolare le implicazioni sul funzionamento cognitivo globale e la limitazione nelle riprese di una vita sociale sono più evidenti nei pazienti affetti da MB. Riguardo ai percorsi terapeutici, i nostri risultati suggeriscono un maggior impatto sull'*outcome* del trattamento chirurgico, associato a quello medico neuro-oncologico. Questi dati, per quanto parziali, fanno riflettere sulla necessità di prendere in carico precocemente il bambino neuro-oncologico dal punto di vista neuro-riabilitativo (Nazemi KJ 2011), non solo quando effettua terapie mediche ma anche quando la cura è limitata alla neurochirurgia. Al riguardo sarà importante effettuare un'analisi multifattoriale e uno *screening* nella fase della diagnosi, al fine di studiare la responsabilità del tumore stesso sulle disabilità neuro-cognitive e sul loro impatto sulle autonomie e sull'ambiente in cui il bambino vive (Msall ME 2010).

Bibliografia:

- Pruitt DW 2011, Ayyangar R, Craig K Paediatric brain tumor rehabilitation J paediatric Rehabilitation Med 2011 4(1); 59-70.
 Pillai S, Metrie M, Dunham C, Sargent M, Hukin J, Steinbok P Intracranial tumor in infants: long-term functional outcome, survival and its predictors Childs Nervous System 2012 Apr 28 (4) 547-55.
 Nazemi KJ, Butler RW Neuropsychological rehabilitation for survivors of childhood and adolescent brain tumor: a view of the past and a vision for promising future J paediatric Rehabilitation Med 2011 4(1) 37-46.
 Msall ME Developing preschool surveillance tools for adaptive functioning: Lessons for neuro-oncology European journal of paediatric neurology 2010 14 (368-379).

P006

IMMUNOTERAPIA DEL NEUROBLASTOMA AD ALTO RISCHIO BASATA SULL'ATTIVITÀ ANTI-TUMORALE DELLE CELLULE NATURAL KILLER: TRATTAMENTO FARMACOLOGICO PER INDURRE L'ESPRESSIONE DEI LIGANDI ATTIVATORI.

L. Cifaldi, S. Lorenzi, M.A. De Ioris, F. Locatelli, D. Fruci

Dipartimento di Ematologia/Oncologia Pediatrica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS, Roma, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il Neuroblastoma (NB) metastatico, la forma più aggressiva di tumore solido dell'infanzia, oltre il primo anno di età costituisce una grande sfida per gli oncologi pediatrici. Nonostante le intense strategie terapeutiche basate su chemioterapia sistemica, chirurgia, chemioterapia ad alte dosi seguita da trapianto autologo di cellule staminali ottenute da midollo osseo e/o da sangue periferico, radioterapia e trattamento differenziante con acido cisretinoico, i risultati relativi alla sopravvivenza a 3 anni dal trattamento sono meno del 40%. Una delle principali cause di recidive è imputabile alla mancata espressione di ligandi attivatori sulle cellule tumorali, molecole essenziali per mediare il riconoscimento da parte delle cellule Natural Killer (NK). Infatti questo deficit compromette la capacità delle cellule NK di rigettare il tumore. Sfortunatamente molti sono i tipi di cancro come il NB capaci di evadere la sorveglianza immuno-mediata innescando una serie di meccanismi atti alla down-modulazione di ligandi attivatori. Farmaci capaci di indurre queste molecole dovrebbero garantire un migliore riconoscimento tumorale da parte delle cellule NK. Inoltre tale trattamento farmacologico effettuato dopo ablazione chirurgica di tumori solidi contribuirebbe ad evitare una eventuale recidiva.

METODI: Al fine di identificare molecole capaci di indurre l'espressione di ligandi attivatori, diverse linee cellulari di NB, classificate come "più o meno" aggressive dipendentemente dall'amplicazione del gene MYCN, sono state non trattate e trattate con farmaci correntemente usati in chemioterapia del NB come Carboplatin, Etoposide, Cyclophosphamide, Vincristina, Adriamicyn, Cisplatin, Topotecan. Inoltre per identificare nuove molecole capaci di indurre i ligandi attivatori, le linee di NB sono state trattate per diversi fattori trascrizionali come p65, una subunità di NF-kappa B, e IRF-1, molecole che recentemente abbiamo mostrato essere capaci di indurre l'espressione di MHC-I e di diverse molecole coinvolte nel pathway della presentazione dell'antigene (Lorenzi S. et al. PlosOne 2012). L'effetto dei farmaci e dei fattori trascrizionali sull'espressione dei ligandi attivatori sono stati valutati tramite citofluorimetria e RT-PCR. Il loro readout funzionale è stato analizzato studiando l'attività citotossica a carico delle cellule NK.

RISULTATI: Abbiamo osservato che alcune delle molecole studia-

te permette il riconoscimento delle cellule di NB e la loro eliminazione non solo mediante l'attività citotossica delle cellule T, come abbiamo recentemente riportato (Lorenzi S. et al. PlosOne 2012), ma anche tramite quella promossa dalle cellule NK. Queste molecole infatti inducono l'espressione di ligandi attivatori e di MHC-I, molecole che vengono riconosciute dai recettori attivatori delle cellule NK.

CONCLUSIONI: L'aumentata funzione anti-tumorale mediata dai linfociti T citotossici, che avviene nella fase tardiva della reazione immunitaria associata con una aumentata funzione mediata dalle cellule NK, che avviene invece nella fase precoce della reazione immunitaria, fortemente potrebbe confermare il ruolo cruciale di questi fattori trascrizionali nell'immunoterapia del NB.

P007

CARCINOMI MIOEPITELIALI DEI TESSUTI MOLLI: REPORT DAL PROGETTO TREP

A. Tagarelli,¹ A. Ferrari,² A. Schiavetti,³ G. Cecchetto,⁴ G. Scarzello,⁵ C. Pizzato,⁶ F. De Leonardis,⁷ R. Alaggio,⁸ G. Bisogno⁹

¹Dipartimento per la Salute della Donna e del Bambino, Clinica di Oncoematologia Pediatrica, Università degli Studi di Padova, Padova; ²Istituto Nazionale Tumori, Milano, Milano; ³UOC di Oncologia Pediatrica, Dipartimento di Pediatria, Università La Sapienza, Roma; ⁴Dipartimento per la Salute della Donna e del Bambino, Chirurgia Pediatrica, Università degli Studi di Padova, Padova; ⁵UO di Radioterapia, Università degli Studi di Padova, Padova; ⁶UO di Pediatria, Ospedale Ca Foncello di Treviso, Treviso; ⁷UO Pediatrica "F. Vecchio", Azienda Ospedaliera Consorziale Policlinico, Bari; ⁸UOC di Anatomia Patologica, Università degli Studi di Padova, Padova; ⁹Dipartimento per la Salute della Donna e del Bambino, Clinica di Oncoematologia Pediatrica, Università degli Studi di Padova, Padova, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: I carcinomi mioepiteliali rappresentano un gruppo di tumori rari in età pediatrica, descritti in letteratura come tumori aggressivi e con prognosi sfavorevole, per cui non esiste un trattamento standard. In questo lavoro abbiamo analizzato le caratteristiche cliniche e la prognosi dei pazienti affetti da Carcinoma Mioepiteliale dei tessuti molli trattati secondo le linee guida proposte dal progetto TREP (Tumori rari in età Pediatrica), un progetto nazionale fondato in Italia nel 2000 e dedicato al trattamento e alla ricerca dei tumori rari in età pediatrica.

METODI: Dal 2005 al 2011 sei pazienti con diagnosi di Carcinoma Mioepiteliale dei tessuti molli sono stati registrati nel progetto TREP. La diagnosi istologica è stata rivista centralmente. Un paziente è stato trattato empiricamente con il regime chemioterapico ICpE che include Ifosfamide 900 mg, Cisplatino 20 mg/mq ed Etoposide 60 mg/mq x 5 giorni. Sulla base della buona risposta alla chemioterapia somministrata in questo paziente tutti i pazienti successivi con diagnosi di Carcinoma Mioepiteliale sono stati trattati con lo stesso regime chemioterapico limitando la chemioterapia a 4 cicli ICpE quando il tumore risultava asportato completamente ed aggiungendo 3 cicli IVE (Ifosfamide, Vincristina, Etoposide) in presenza di residui macroscopici. Considerando l'aggressività locale della neoplasia descritta in letteratura, tutti i pazienti sono stati sottoposti a radioterapia.

RISULTATI: La chirurgia iniziale ha previsto una biopsia in 3 casi ed una asportazione del tumore negli altri 3, risultata radicale in 2 pazienti e con residui microscopici in 1. Un solo paziente è stato trattato con il regime chemioterapico VAIA (Vincristina, Actinomomicina, Ifosfamide ed Adriamicina) con l'aggiunta di Cisplatino, Fluorouracile ed Epirubicina ed ha presentato una recidiva di malattia a livello polmonare dopo 5 mesi dal termine del trattamento. Tutti gli altri pazienti sono stati trattati con il regime ICpE, con l'aggiunta di 3 cicli IVE in coloro che hanno eseguito una biopsia alla diagnosi. Dopo chemioterapia iniziale si è assistito ad una buona riduzione del volume tumorale in 2 dei 3 pazienti valutabili. La chirurgia differita è stata eseguita in 2 pazienti ed ha comportato in entrambi una resezione del tumore con residui microscopici. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a trattamento radioterapico, in due casi mediante brachiterapia. Con un follow-up mediano di 3,9 anni (range 1-5 anni) 5 pazienti sono vivi in prima remissione completa ed 1 risulta deceduto in seguito ad una recidiva polmonare.

CONCLUSIONI: La nostra analisi, seppur in un numero limitato di pazienti, dimostra come la collaborazione con il gruppo TREP ha permesso di raccogliere dei dati in merito a tale neoplasia in modo tale da poter proporre un trattamento omogeneo con buoni risultati per i pazienti affetti.

P008

LO STUDIO BERNIE: STUDIO DI FASE II RANDOMIZZATO PER VALUTARE L'AGGIUNTA DI BEVACIZUMAB ALLA CHEMIOTERAPIA IN BAMBINI E ADOLESCENTI CON SARCOMA DELLE PARTI MOLLI METASTATICO

M. Casanova,¹ J. Chisholm,² J. Merks,³ B. Geoerger,⁴ R. Rousseau,⁵ A. Monnet,⁶ C. Dhalluin,⁷ O. Oberlin⁴

¹Pediatric Oncology Unit, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano, Italy; ²Pediatric Department, Royal Marsden Hospital, Sutton, UK; ³Academic Medical Center, Emma Children's Hospital, Amsterdam, The Netherlands; ⁴Department of Pediatric Oncology, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; ⁵Development Team, Pediatrics, Genentech Inc., South San Francisco, USA; ⁶Statistics; ⁷Clinical Science, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel

Studio collaborativo ITCC (Innovative Therapies for Children with Cancer) e EpSSG (European paediatric Soft Tissue Sarcoma Group)

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Nonostante i significativi miglioramenti ottenuti nel trattamento dei sarcomi delle parti molli grazie al trattamento multidisciplinare, la prognosi dei pazienti che si presentano con malattia metastatica resta insoddisfacente. I risultati ottenuti con la chemioterapia convenzionale sembrano avere raggiunto un plateau e diverse strategie sono state tentate per migliorare la sopravvivenza in questa categoria di pazienti.¹ Tra queste, a livello europeo, si è deciso di focalizzare l'attenzione sull'inibizione dell'angiogenesi. *Bevacizumab (Avastin)* è un anticorpo monoclonale umanizzato anti-*VEGF* che agisce legandosi specificamente a tutte le isoforme biologicamente attive del *VEGF* impedendone l'interazione con i suoi recettori, *VEGFR1* e *VEGFR2*. Il blocco dell'attività biologica del *VEGF* fa regredire la vascolarizzazione dei tumori, normalizza la vascolarizzazione tumorale residua, e inibisce la formazione di nuova vascolarizzazione. Lo studio di fase I del COG (*Children's Oncology Group*) ha dimostrato che la somministrazione di bevacizumab è ben tollerata nei pazienti con tumore solido refrattario alla dose di 5, 10 e 15 mg/kg ogni 2 settimane e non è stata identificata nessuna tossicità dose-limitante (*DLT*) e di conseguenza nessuna dose massima tollerabile (*MTD*); gli effetti collaterali e la farmacocinetica sono risultati essere sovrapponibili a quelli dell'adulto.² È da segnalare inoltre che il trattamento con *bevacizumab* in monoterapia ha dimostrato una attività limitata nella maggior parte dei tumori, mentre i benefici clinici più significativi sono stati osservati quando il farmaco è stato somministrato in associazione alla chemioterapia.

METODI: Il disegno dello studio prevede che 150 pazienti di età compresa tra 6 mesi e 18 anni con sarcoma delle parti molli metastatico (rabbdomiosarcoma o non-rabbdomiosarcoma) vengano randomizzati a ricevere il trattamento convenzionale secondo le linee guida *EpSSG* (chemioterapia, chirurgia e/o radioterapia) ± bevacizumab. Il trattamento chemioterapico prevede 2 fasi. Durante la fase di induzione i pazienti ricevono 9 cicli di chemioterapia ogni 3 settimane: 4 cicli *IVADO* (ifosfamide, vincristina, actinomicina-D e adriamicina) e successivamente 5 cicli *IVA* (ifosfamide, vincristina e actinomicina-D). Nella fase di mantenimento vengono somministrati 12 cicli di 4 settimane della combinazione di vinorelbina e ciclofosfamide secondo modalità metronomica.³ Per i pazienti randomizzati al braccio sperimentale, bevacizumab viene somministrato alla dose di 7,5 mg/kg ogni 3 settimane durante la fase di induzione e 5 mg/kg ogni 2 settimane durante la fase di mantenimento. Il trattamento locale chirurgico e/o radioterapico è previsto dopo il settimo ciclo della fase di induzione. L'obiettivo primario dello studio è il miglioramento della sopravvivenza libera da eventi. I prelievi di farmacocinetica sono previsti in tutti i pazienti randomizzati al braccio sperimentale, durante i primi 4 cicli di induzione. I pazienti che completano il trattamento secondo protocollo vengono tenuti in osservazione per almeno 47 mesi per la valutazione della sopravvivenza libera da eventi, la sopravvivenza globale e gli effetti collaterali a lungo termine.

RISULTATI: Dal luglio 2008 al febbraio 2013 sono stati arruolati 114 pazienti. Nel dicembre 2012, in accordo a quanto previsto dal protocollo, è stata effettuata una *futility analysis* sui primi 80 pazienti arruolati. La valutazione dell'*Independent Data Safety Monitoring Board* che ha valutato dati di tossicità, di farmacocinetica e di efficacia, è stata che non vi era alcuna indicazione alla sospensione dello studio in accordo alle *stopping rules* definite dal protocollo. Lo studio sta pertanto proseguendo l'arruolamento in 14 nazioni: Belgio, Brasile, Canada, Cile, Francia, Germania, Inghilterra, Israele, Italia, Olanda, Polonia, Repubblica Ceca, Russia e Spagna.

In particolare i centri aperti all'arruolamento in Italia sono:

- 1) Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori; *Principal Investigator* (PI): Michela Casanova;
- 2) Azienda Ospedaliera di Padova; PI: Gianni Bisogno;
- 3) IRCCS Istituto Gaslini; PI: Alberto Garaventa;
- 4) Ospedale Infantile Regina Margherita di Torino; PI: Franca Fagioli;
- 5) IRCCS Ospedale Pediatrico del Bambino Gesù; PI: Giuseppe Maria Milano;
- 6) A.O. Universitaria Meyer di Firenze; PI: Maurizio Aricò,

Bibliografia

1. Casanova M, Ferrari A. Pharmacotherapy for pediatric soft-tissue sarcomas. *Expert Opin Pharmacother* 2011; 12: 517-531.
2. Glade Bender JL, Admson PC, Reid JM et al. Phase I trial and pharmacokinetic study of bevacizumab in pediatric patients with refractory solid tumors: a Children's Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2008; 26:399-404.
3. Casanova M, Ferrari A, Bisogno G et al. Vinorelbine and low-dose cyclophosphamide in the treatment of pediatric sarcomas: pilot study for the upcoming European Rhabdomyosarcoma Protocol. *Cancer* 2004;101:1664-1671.

P009

L'ANALISI DEL TRASCrittOMA DELLE CELLULE STAMINALI DI MEDULLOBLASTOMA, MEDIANTE NEXT GENERATION SEQUENCING, HA PERMESSO DI IDENTIFICARE GENI CORRELATI CON LA PROGNOSI

E. Miele,¹ F. Cicconardi,² A. Po,¹ L. Grassi,² D. Cucchi,¹ E. De Smaele,³ A. Mastronuzzi,⁴ C.E. Marras,⁵ L. Massimi,⁶ G. Persano,⁴ F. Locatelli,⁴ I. Screpanti,¹ A. Tramontano,² A. Gulino,¹ E. Ferretti³

¹Dipartimento di Medicina Molecolare; ²Dipartimento di Fisica; ³Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università La Sapienza, Roma; ⁴Dipartimento di Onco-Ematologia e Medicina Trasfusionale; ⁵Dipartimento di Neuroscienze e Neuroriabilitazione, SC di Neurochirurgia, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma; ⁶Dipartimento di Scienze Chirurgiche delle patologie della testa e del collo, UOC di Neurochirurgia Infantile, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il medulloblastoma (MB) è uno dei più frequenti tumori del sistema nervoso centrale (SNC) la cui prognosi rimane a tutt'oggi severa sia in termini di mortalità che in termini di morbilità. I progressi nel campo chirurgico, chemio e radioterapico hanno permesso di raggiungere risultati incoraggianti nei MB a rischio standard consentendo di ottenere una sopravvivenza globale (OS) attorno al 75% (Jemal A, Cancer statistics, 2008; CA Cancer J Clin 2008), mentre per i MB ad alto rischio la OS raggiunge il 20-25% (Pollack IF, Nature rev 2011). Per lungo tempo il MB è stato trattato come una singola entità nosologica, riconoscendo come fattori di rischio la presenza di metastasi, l'età < di 3 anni e l'asportazione chirurgica incompleta con residuo tumorale >di 1.5 cmq. La caratterizzazione istologica del MB ha permesso di identificare un sottogruppo di tumori a prognosi peggiore (anaplastici/a grandi cellule) e un sottogruppo di MB a minore aggressività (desmoplastici/a estensiva nodularità). Solo di recente, mediante tecniche di *high-throughput micro-array* (Cho et al, 2011; Northcott et al, 2011; 2012) e di *deep sequencing* (Jones et al, 2012; Pugh et al, 2012), sono stati identificati quattro sottogruppi di MB (WNT, SHH-Sonic Hedgehog-, Group 3 and Group 4) con modalità di espressione genica profondamente differenti tra loro (Taylor et al, 2011; Northcott, et al, 2011; 2012), alcuni dei quali rivestono un significato prognostico. Per 3 dei 4 sottogruppi, inoltre, è stato possibile identificare l'origine della cellula tumorale (Wang & Wechsler-Reya, 2012; Northcott et al, 2012). L'identificazione di una popolazione cellulare altamente tumorigenica all'interno della massa tumorale, rappresentata dalle cellule staminali tumorali (CSC) (Clarke MF, Cell 2006), è attualmente oggetto di numerosi studi anche nell'ambito dei tumori del SNC. Le CSC sono dotate di illimitata capacità replicativa a differenza delle cellule del resto del tumore (Frank NY, JCI 2010); sono responsabili di recidiva di malattia in quanto resistenti ai comuni approcci terapeutici e di metastatizzazione. Dati recenti suggeriscono come alterazioni genetiche e vie metaboliche delle CSC possono fornire indicazioni su come dalla cellula somatica si arrivi alla cellula tumorale: questi pathways includono segnali tumorigenici quali Hedgehog, Notch e RNA non codificanti quali i microRNA (Ferretti E

et al Trends Mol Med 2005, Gulino A et al, Embo Mol Med 2009, Zimmerman AL et al, Cancer Lett 2011, Ferretti E et al, Embo J 2008). La caratterizzazione biologica delle CSC di MB può offrire importanti informazioni prognostiche e indicazioni su bersagli terapeutici che consentano di colpire elettivamente questa popolazione cellulare. L'obiettivo principale dello studio è stato quello di analizzare quantitativamente mediante tecniche di *RNA next-generation sequencing* (RNA-Seq) gli aspetti trascrizionali delle *stem cells* di MB (MBSC).

METODI: Lo studio è stato condotto analizzando, mediante deep sequencing, l'RNA estratto da cellule staminali neurali (NcSC) derivate da cervelletto di modelli murini, da cellule staminali di medulloblastoma (MBSC) derivate da modelli murini. Le MBSC murine sono state isolate e coltivate da topi *Ptch1^{+/-}* i quali sviluppano spontaneamente medulloblastoma e costituiscono il modello del MB umano SHH. Sono stati analizzati in questi studio 36 campioni di MB umano raccolti durante la procedura chirurgica eseguita su pazienti per i quali era disponibile un follow up di almeno 5 anni da cui sono state isolate e coltivate le MBSC. Utilizzando le tecniche di *RNA next-generation sequencing* (RNA-Seq) è stato studiato il trascrittoma e le informazioni ricavate hanno permesso gli RNA codificanti e non, già annotati o mai descritti. Quest'ultima è stata confrontata con le sequenze già note e presenti in differenti banche dati. I risultati ottenuti nei modelli di cellule staminali murini hanno permesso di identificare una serie di trascritti over-espressi in MBSC e quindi potenziali oncogeni. Tali geni sono stati validati in una serie di MB umani mediante PCR quantitativa.

RISULTATI: Lo studio del trascrittoma delle MBSC confrontate con le cellule staminali normali prima e dopo differenziamento ha permesso di identificare una serie di geni specificamente espressi nei diversi modelli cellulari analizzati. Il trascrittoma delle MBSC murine ha inoltre messo in evidenza una serie di geni molto espressi che sono stati verificati nei tumori umani. Un sottogruppo di questi geni sono risultati deregolati anche nei MBs. Tra questi, *ATF4*, *ERO1L* e *GADD45A*, geni connessi con la risposta cellulare allo stress sono risultati più alti e con una correlazione statisticamente significativa una prognosi peggiore.

CONCLUSIONI: Questo lavoro identifica per la prima volta alcuni geni espressi dalle MBSC come predittivi di cattiva prognosi e quali potenziali bersagli per nuove strategie terapeutiche.

P010

ARRAY-CGH E PROFILO DI ESPRESSIONE IDENTIFICANO NKAIN2 (NA/K TRANSPORTING ATPASE INTERACTING 2) COME UN NUOVO POSSIBILE GENE PREDISPONENTE IL NEUROBLASTOMA

P. Romania,¹ C. Surace,¹ L. Longo,² A. Angioni,¹ F. Locatelli,¹ A. Castellano,¹ D. Fruci¹

¹IRCSS, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma; ²IRCSS, AOU San Martino-IST, Genova, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il Neuroblastoma (NB) rappresenta il tumore solido più comune nella prima infanzia la cui insorgenza nelle forme sporadiche avviene per cause non ancora del tutto note. Tuttavia, come per altri tumori pediatrici di origine embrionale, esistono rare forme familiari la cui eziologia genetica è largamente ignota. Mutazioni germinali dei geni *ALK* e *PHOX2B* sono state associate ad una piccola percentuale delle forme familiari di NB. Tuttavia, la presenza di queste mutazioni in individui sani suggerisce che per lo sviluppo del NB siano necessarie ulteriori alterazioni genetiche. Nel presente studio abbiamo studiato una nuova famiglia italiana con 3 individui affetti (stadio 3,4 e 4S) per identificare nuovi geni predisponenti alla patologia.

METODI: Tutti gli individui della famiglia sono stati caratterizzati per la presenza di mutazioni a carico dei geni *ALK* e *PHOX2B*. Una comparazione quantitativa del DNA dei campioni tumorali e del sangue degli individui affetti rispetto ai sani è stata effettuata tramite ibridazione genomica comparativa su microarray ad alta risoluzione (array-Comparative Genomic Hybridization o array-CGH). I dati ottenuti sono stati confermati per qPCR.

RISULTATI: In tutti gli individui affetti è stata trovata la mutazione R1192P nel gene *ALK*, ereditata dai genitori non affetti. Non sono state trovate mutazioni a carico del gene *PHOX2B*. L'analisi dell'array-CGH ha rivelato 3 nuove alterazioni genomiche in regioni cromosomiche prive di variazioni del numero di copie (CNV) comprendenti i geni *PCNX* (pecanex homolog), *CASC4* (cancer susceptibility candidate 4) e *NKAIN2* (Na/K transporting ATPase interacting 2). L'alterazione nel-

l'espressione del gene *NKAIN2* è stata confermata per qPCR. I livelli di espressione di *NKAIN2* sono stati analizzati in pannello di linee cellulari di NB e in una casistica di 21 individui affetti da NB fuori terapia.

CONCLUSIONI: I livelli di *NKAIN2* sono significativamente più alti negli individui affetti da NB rispetto ai sani e nelle linee cellulari di NB più aggressive. Inoltre la sua elevata espressione anche in assenza di alterazioni cromosomiche suggerisce la presenza ulteriori livelli di regolazioni a carico di questo gene ed un suo possibile ruolo nella patogenesi del NB.

P011

ATTIVITÀ ANTIPROLIFERATIVA E PRO-APOPTOTICA DI RITONAVIR E DELL'ASSOCIAZIONE RITONAVIR+SAQUINAVIR SU LINEE DI NEUROBLASTOMA

F. Timeus,¹ N. Crescenzo,² A. Doria,² L. Foglia,² S. Pagliano,² F. Fagioli,¹ P.Tovo,² L. Cordero di Montezemolo²

¹Oncematologia Pediatrica e Centro Trapianti; ²Dipartimento di Pediatria, Presidio Ospedaliero Infantile Regina Margherita, Azienda Ospedaliera Città della Salute e della Scienza, Torino, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il neuroblastoma in stadio avanzato presenta tuttora una prognosi sfavorevole pur in presenza di trattamenti molto aggressivi. Da qui l'interesse per terapie alternative che possano essere utilizzate in fase di mantenimento o di contenimento della malattia, garantendo un'accettabile qualità di vita. (Yalcin B, Cochrane Database Syst Rev 12, 2010). Il saquinavir, inibitore delle proteasi virali, è utilizzato nella terapia a lungo termine dei pazienti HIV positivi, con buona tollerabilità. L'associazione del saquinavir con il ritonavir, altro farmaco anti-HIV, modifica la farmacocinetica del saquinavir, permettendo di ottenere livelli plasmatici di saquinavir significativamente più elevati, a parità di dose somministrata. Tale effetto ha determinato l'usuale utilizzo dell'associazione saquinavir+ritonavir nel trattamento dei pazienti HIV positivi. (Johnson M, AIDS Rev 5, 2003; Winston A, Clin Infect Dis 44, 2007). Precedenti studi hanno evidenziato un'attività anti-tumorale del saquinavir su linee cellulari di vari tumori. (Ikezo T, Cancer Res 64, 2004; Pajonk F, Cancer Res 62, 2002; Timeus F, Haematologica 91;2006) Il nostro gruppo ha dimostrato un'attività pro-apoptica e anti-proliferativa di saquinavir su linee di neuroblastoma umano. Tale attività era potenziata dall'associazione con imatinib e correlata ad una inibizione del proteosoma. (Timeus F, Oncol Rep 27, 2012). Scopo del presente lavoro è stata la valutazione di una eventuale attività anti-neuroblastoma di ritonavir da solo o associato a saquinavir su 2 linee di neuroblastoma umano, di cui una MYCN-amplificata/overespressa. (Fischer M, Cancer Lett 190, 2003; Cohn SL, J Clin Oncol 18, 2000).

METODI: Linee di neuroblastoma: SJ-N-KP e IMR5 (MYCN-amplificata/overespressa). Condizioni di coltura: RPMI 1640+ FCS 1% o 10% in presenza di varie concentrazioni di ritonavir da solo o associato a saquinavir. Timing: 24, 48, 72 ore. Proliferazione: MTT test. IC50 è stata calcolata con il programma SPSS 20. Test di apoptosi: analisi citofluorimetrica per binding della annexina V e ioduro propidio. Timing: 24, 48, 72 ore. Tutti i test sono stati eseguiti in triplicato.

RISULTATI: Il ritonavir da solo ha dimostrato attività antiproliferativa sulle 2 linee di neuroblastoma. La Tabella 1 indica le IC50 di ritonavir, saquinavir e saquinavir+ritonavir nelle 2 linee. L'attività antiproliferativa del saquinavir da solo non è stata significativamente modificata dall'associazione con ritonavir 2 µM (Figura 1). Il ritonavir ha anche esercitato una modesta attività pro-apoptica sulle 2 linee. La percentuale di cellule apoptotiche dopo 24 ore di esposizione a ritonavir 5 µM era 12.9% nella linea SJ-N-KP (controllo:8.1%) e 9% nella linea IMR5 (controllo 5%). L'associazione di ritonavir con saquinavir non ha significativamente modificato l'attività pro-apoptica del saquinavir da solo.

Tabella 1. IC50 di ritonavir e saquinavir in linee cellulari di neuroblastoma.

	Ritonavir	Saquinavir	Saquinavir (+ Ritonavir 2 µM)
SJ-N-KP	10.7	8.1	8.1
IMR5	8.2	9.5	7.4

IC50 (espressa in µM, calcolata mediante regressione non lineare) di ritonavir (concentrazioni studiate: 0.01, 0.1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 µM), saquinavir (concentrazioni studiate: 0.1, 1, 5, 10, 20, 30, 40 µM) e saquinavir in associazione con ritonavir 2 µM dopo 72 ore di esposizione.

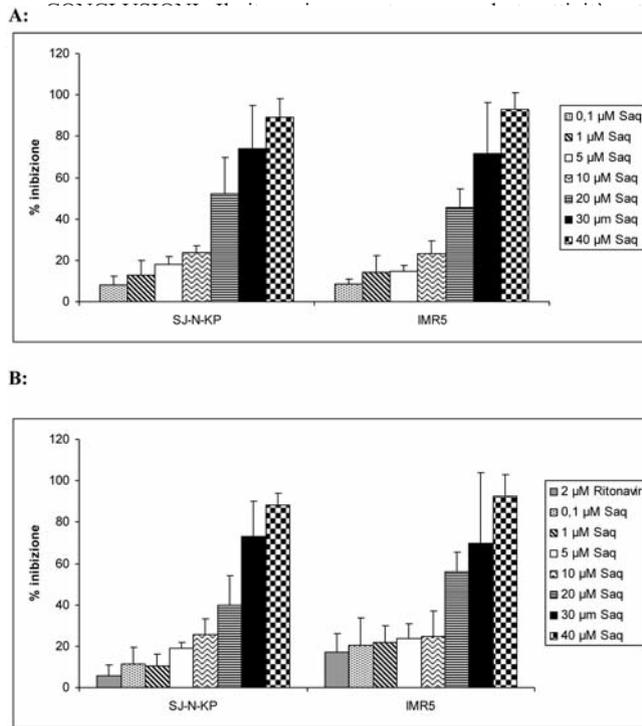


Figura 1. Percentuale di inibizione della proliferazione di SJ-N-KP e IMR5 dopo 72 ore di esposizione a saquinavir (A) da solo e saquinavir in associazione a ritonavir 2µM (B). Esperimenti effettuati in triplicato.

P012

CAPTAZIONI PERSISTENTI ALLA SCINTIGRAFIA CON ¹²³I MIBG IN LUNGO SOPRAVVIVENTI DOPO NEUROBLASTOMA METASTATICO CON ETÀ MAGGIORE AD UN ANNO ALLA DIAGNOSI

M.A. De Ioris,¹ M.C. Garganese,² A. Crocoli,³ F. del Bufalo,¹ M.D. De Pasquale,¹ A. Serra,¹ M.F. Villani,² R. Boldrini,⁴ M. Pizzoferrò,² A. Castellano,¹ A. Inserra,³ F. Locatelli¹

¹Dipartimento di Oncoematologia e Medicina Trasfusionale;

²Dipartimento di diagnostica per immagini, Medicina Nucleare;

³Dipartimento Chirurgico, Chirurgia Generale e Toracica;

⁴Dipartimento Laboratori, Anatomia Patologica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù IRCCS, Roma, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La scintigrafia con ¹²³I-MIBG rappresenta un utile strumento per la diagnosi, stadiazione e valutazione della risposta nei pazienti affetti da neuroblastoma. Alcuni pazienti presentano persistenti e stabili captazioni dopo la fine del trattamento, in assenza di alcun segno di progressione. Lo scopo di questo studio retrospettivo è di verificare la presenza di residue captazioni alla scintigrafia ¹²³I-MIBG in pazienti lungo sopravvissuti dopo un neuroblastoma metastatico.

METODI: Per questo studio è stata rivista una serie di pazienti trattati per neuroblastoma metastatico sopra ad 1 anno alla diagnosi e con almeno 3 anni di follow-up. I pazienti erano stati trattati tutti con due consecutivi protocolli istituzionali e le informazioni inerenti alla diagnosi, al trattamento ed al follow-up prospetticamente raccolte. Per i pazienti lungo sopravvissuti che presentavano captazioni residue alla scintigrafia MIBG, le cartelle cliniche e gli esami di imaging (Scintigrafia, TC/RMN ed ecografie) sono state revisionate per questo studio.

RISULTATI: 58 pazienti affetti da neuroblastoma metastatico sono stati diagnosticati e trattati tra Luglio 1996 e Agosto 2009. Tutti tranne che uno dei 58 pazienti presentavano delle lesioni metastatiche alla scintigrafia con ¹²³I-MIBG. L'OS e il PFS a 5 anni è stato del 36% (95% CI 24-49%) e 28% (95% CI 17-40%). Dei 17 pazienti lungo sopravvissuti, tre presentano captazioni persistenti e stabili alla scintigrafia con ¹²³I-MIBG ad un follow-up di 188, 130 e 117 mesi dalla diagnosi. Tutti i pazienti presentavano un'età alla diagnosi < a 24 mesi ed avevano raggiunto almeno una PR al termine dell'induzione inoltre nessuno

presentava un'amplificazione di MYCN. Il primo paziente presentava una singola captazione a livello della teca cranica, il secondo una captazione addominale (minimo residuo confermato alla TC) e l'ultimo paziente tre captazioni residue a carico della teca cranica, della tibia e della regione sovraclavicolare (minimo residuo confermato alla TC). Nessuno dei pazienti presenta valori patologici di acido vanilmandelico ed omovanillico nelle urine.

CONCLUSIONI: In alcuni pazienti con neuroblastoma metastatico con età < 24 mesi senza amplificazione di MYCN, la presenza di captazioni alla scintigrafia ¹²³I-MIBG sembra non aver impatto sulla sopravvivenza. Tali captazioni potrebbero corrispondere a una malattia residua ben differenziata pur captante la ¹²³I-MIBG. Ulteriori analisi su una casistica più ampia sono necessarie per chiarire il significato di tali captazioni residue nei pazienti lungo sopravvissuti dopo un neuroblastoma metastatico.

P013

IL RUOLO DELLA CHEMIOTERAPIA NEL SARCOMA DELLO STROMA SPECIALIZZATO DELLA PROSTATA

E. Cavaliere,¹ R. Alaggio,² W. Rigamonti,³ D. Di Carlo,¹ P. Indolfi,⁴ G. Cecchetto,⁵ G. Bisogno¹

¹Dipartimento per la salute della donna e del bambino; ²Dipartimento di Anatomia Patologica; ³Dipartimento di Urologia, Azienda Ospedaliera, Università di Padova, Padova; ⁴Dipartimento di Pediatria, Università II, Napoli; ⁵Divisione di Chirurgia Pediatrica, Azienda Ospedaliera, Università di Padova, Padova, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il Sarcoma dello stroma specializzato della prostata (SSP) è un tumore raro ed aggressivo che nasce dalle cellule mesenchimali pluripotenti dello stroma prostatico. Rappresenta lo 0.1-0.2% di tutti i tumori della prostata e colpisce tipicamente gli adulti. Il trattamento di scelta è rappresentato dalla chirurgia che prevede una prostatectomia radicale. La sopravvivenza è insoddisfacente

METODI: In questo report descriviamo un adolescente affetto da un SSP e discutiamo il possibile ruolo della chemioterapia (CT).

RISULTATI: Un ragazzo di 14 anni con anamnesi positiva per displasia cistica polmonare corretta chirurgicamente all'età di un anno, è stato ricoverato presso l'ospedale locale per disuria, pollachiuria, dolenzia preminzionale ipogastrica e ritenzione urinaria. Eseguita cistoscopia con biopsia, l'analisi istologica deponeva per tumore miofibroblastico infiammatorio. Il paziente è stato trasferito presso il nostro Centro dove ha eseguito cistoscopia con biopsia che ha permesso di porre diagnosi di SSP. Le indagini radiologiche evidenziavano una formazione di 6x5x6.5 cm a partenza dalla prostata e infiltrante vescica, vescichette seminali e parete del retto. Erano inoltre presenti un linfonodo di 3.5 cm in sede paravescicale e una lesione di 1 cm a livello acetabolare sinistro. Data l'estensione della malattia e l'età del paziente si è deciso di mantenere un atteggiamento conservativo e di somministrare inizialmente un trattamento chemioterapico. Dopo 3 cicli secondo lo schema IVADo (ifosfamide 3 gr/m²/die nei giorni 1 e 2, vincristina 1.5 mg/m²/die nei giorni 1,8,15, actinomicina 1.5 mg/m²/die nel giorno 1 e doxorubicina 40 mg/m²/die nei giorni 1 e 2) si è resa evidente una buona riduzione della massa (>87%), la scomparsa del linfonodo paravescicale, mentre la lesione ossea appariva stabile. In considerazione della buona risposta la CT è continuata in associazione a radioterapia a livello pelvico (50.4 Gy) e della lesione ossea. Tuttavia una biopsia di controllo al termine di 9 cicli di CT, ha dimostrato persistenza di malattia. Pertanto è stata programmata una cistoprostatectomia con confezionamento di neovesica. Al tavolo operatorio si è evidenziata una progressione di malattia con estensione del tumore a livello della vescica, dei muscoli perineali e del retto. Un intervento chirurgico radicale non è stato quindi possibile e il paziente è deceduto a 15 mesi dalla diagnosi. Un'analisi della letteratura dal 1975 al 2012 ha permesso di identificare solo 14 casi con diagnosi di SSP in cui è stata somministrata CT come parte del trattamento, di cui 9 in maniera neoadiuvante (5 in prima linea e 4 in seconda linea). La risposta al trattamento era valutabile solo in 5 pazienti ed è stata buona in 3. Gli antiblastici più utilizzati sono stati ifosfamide, cisplatino e doxorubicina.

CONCLUSIONI: Il nostro paziente è il più giovane affetto da SSP descritto in letteratura. Presentava purtroppo una malattia disseminata e l'outcome è stato fatale. La nostra esperienza e alcuni dati della letteratura dimostrano che il SSP può essere chemiosensibile e giustifica un approccio multidisciplinare che includa anche, ma non solo, una chirurgia aggressiva.

P014

COMPRESSIONE MIDOLLARE SINTOMATICA IN LATTANTI CON NEUROBLASTOMA

L. Quaglietta,¹ S. Ruotolo,¹ S. Vetrella,¹ G. Cinalli,² A. Nastro,³ M.E. Errico,⁴ U. Caccioppoli,⁵ R. Turco,¹ M. Capasso¹

¹Dipartimento di OncoEmatologia Pediatrica; ²Dipartimento di Neurochirurgia; ³Servizio di Diagnostica per Immagini; ⁴Servizio di Anatomia Patologica; ⁵Divisione di Chirurgia Oncologica, AORN Santobono-Pausilipon-Annunziata, Napoli, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Pochi sono i dati presenti in letteratura riguardanti decorso clinico e follow-up di lattanti affetti da neuroblastoma con compressione epidurale sintomatica. Tali dati mostrano che circa il 50-60% di essi sviluppa complicanze tardive. Di seguito sono riportati i dati di 5 bambini consecutivi con diagnosi di neuroblastoma associato a compressione midollare osservati in una singola istituzione lungo un periodo di 5 anni.

METODI: Tra il 2007-2011, presso il Dipartimento di Oncologia Pediatrica dell'Ospedale Santobono-Pausilipon-Annunziata di Napoli, sono state effettuate 51 nuove diagnosi di neuroblastoma. Cinque/51 (9,8%) lattanti presentavano sintomi di compressione midollare. Il work up diagnostico è stato eseguito secondo le linee guida dell'International Neuroblastoma Staging System (INSS). Il trattamento a cui sono stati sottoposti i pazienti in oggetto è quello della Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique-Neuroblastoma (SIOPEN). Il grading della compromissione neurologica è stato valutato applicando la scala ASIA (American Spinal Injury Association). La risposta al trattamento è stata valutata revisionando report clinici e strumentali.

RISULTATI: Età alla diagnosi: 3-11 mesi (mediana, 11 mesi); rapporto M / F: 3/2. L'intervallo di tempo intercorso tra i primi sintomi di compressione midollare e la diagnosi di neuroblastoma è stata di 3-8 giorni in 4/5 (80%) casi. Due/5 (40%) pazienti sono stati trattati con la sola chemioterapia, mentre 3/5 (60%) lattanti sono stati sottoposti ad intervento chirurgico di laminoplastica in emergenza, seguita da trattamento chemioterapico. Nessun paziente ha presentato paraplegia né prima né dopo il trattamento. Dopo un follow-up di 9-39 mesi (mediana 20) tutti i pazienti in oggetto sono vivi. Quattro/5 (80%) hanno presentato completo recupero neurologico dopo 2 mesi dalla diagnosi; 1 presenta a tutt'oggi moderato equinismo del piede destro.

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti alla diagnosi.

Casi	Sesso, età	TP sito	Metastasi	INSS stadio	Urine VMA	Siero LDH	Ferri na Sierica	NSE Sierico	MIBG Positivo
1	♀ 9 m	P	No	3	E	E	E	E	TP
2	♀ 11 m	T-L	No	3	E	E	N	E	TP
3	♂ 11 m	T and A	Fegato, tessuti molli	4S	E	E	E	E	TP, fegato, tessuti molli
4	♂ 3 m	A	No	3	E	N	N	E	TP
5	♂ 11 m	T	No	3	E	N	N	E	TP

11 m T No 3 E N N E TP Abbreviazioni. TP: tumore primitivo. INSS: international neuroblastoma staging system. CE: compressione epidurale. VMA: acido vanilmandelico. LDH: lattico deidrogenasi. NSE: enolasi neuro-specifica. MIBG: 131I-metaiodobenzilguanidina. m: mesi. P: pelvi. T-L: regione toraco-lombare. A: addome. T: torace. E: elevato. N: normale.

Tabella 2. Caratteristiche cliniche alla diagnosi, terapia e outcome.

CASE	INTERVALLO O SINTOMO DIAGNOSI	LIVELLO SICE	SEGNE	SINTOMI DI CE				TRATTAMENTO				RISPOSTA			SEQUELE TARDIVE		
				Dolore	Deficit motori	Deficit sensoriali	Deficit vescicali	Definizione	Chirurgia	Chemioterapia	Risposta	Immediata	Migliore	RM		SECONDO CLINICO E OUTCOME	
1	7 m	13-05	Massa spinale	Si	1	Si	Si	No	CE+2 CY-Doxo+2	Si	+3 m	Miglioramento di 2 mesi di CT	Assolutamente a carico 2 set di CT	Normale a 6 m	RC a 6 m	Assenti	
2	7 m	09-12	Paraparesi	No	2	No	No	No	Laminoplastica in emergenza a carico del torace e chemio terapia	CE+2 CY-Doxo+2	Si	+3 m	Miglioramento di 2 mesi di CT	Assolutamente a carico 2 set di CT	Paraparesi a carico di 10 set di CT a 3 mesi di CT	RC a 32 m	Assenti
3	7 m	08-01	Torace e addome e midollo spinale	Si	0	No	No	No	Laminoplastica in emergenza a carico del torace e chemio terapia	CE+2 CY-Doxo+2	Si	+3 m	Miglioramento di 2 mesi di CT	Assolutamente a carico 3 set di CT	Normale a 6 m	RC a 20 m	Assenti
4	7 m	01-14	Midollo spinale	No	2	No	No	No	Laminoplastica in emergenza a carico del torace e chemio terapia	CE+2 CY-Doxo+2	Si	+3 m	Miglioramento di 2 mesi di CT	Assolutamente a carico 2 set di CT	Normale a 6 m	RC a 14 m	Midolo stabile in aspettando
5	3 m	01-04	Dolore	No	2	No	No	No	Chirurgia in emergenza a carico del torace e chemio terapia	CE+2	Si	+3 m	Miglioramento di 2 mesi di CT	Assolutamente a carico 2 set di CT	Paraparesi a carico di 10 set di CT	RC a 6 m	Assenti

Abbreviazioni. CE: compressione epidurale. TP: tumore primitivo. m: mesi. C-E: carboplatino-etoposide. CY-Doxo: ciclofosfamide-doxorubicina. RC: remissione completa.

CONCLUSIONI: I lattanti affetti da neuroblastoma con compressione midollare sintomatica richiedono precoce diagnosi e trattamento

appropriato per evitare gravi sequele tardive. L'individuazione precoce dei sintomi seguita da un rapido work-up diagnostico strumentale, da un trattamento neurochirurgico -laddove opportuno- più conservativo (laminoplastica) ha sicuramente contribuito nei nostri pazienti a determinare l'assenza di deficit motorio grave al momento della diagnosi e nel follow-up.

P015

TRATTAMENTO COMBINATO DI CHEMIO E RADIOTERAPIA PER I TUMORI ASTROCITARI AD ALTO GRADO IN ETÀ PEDIATRICA: ESPERIENZA MONOISTITUZIONALE

D. Aloï,¹ G. Vidano,¹ S. Vagge,² F. Giannelli,³ S. Barra,³ M. Garrè⁴

¹UOC Oncologia Radioterapica, Università degli Studi di Genova, Genova; ²UOC Oncologia Radioterapica, IRCCS Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino-IST, Genova; ³S.S. Radioterapia Infantile e Tecniche Speciali, IRCCS Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino-IST, Genova; ⁴UOS Neuro-Oncologia, I.G.Gaslini, Genova, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il trattamento raccomandato per gliomi ad alto grado in pazienti in età pediatrica consiste in un approccio multidisciplinare tra chirurgia, chemioterapia e radioterapia. Mentre, per i tumori più frequenti in questa fascia di età come medulloblastomi ed ependimomi esistono numerosi studi, per i gliomi ad alto grado di origine astrocitaria non esistono ancora protocolli clinici condivisi tra i vari specialisti. Noi riportiamo, una analisi retrospettiva, del nostro reparto di Radioterapia infantile e Tecniche speciali-IRCCS Azienda Ospedaliera Universitaria-IST di Genova per il trattamento di queste neoplasie cerebrali.

METODI: Dal Febbraio 2001 al Giugno 2012 abbiamo avviato a radioterapia con intento radicale 24 pazienti di età media 10 anni, (mediana 9 anni, range 4 - 22) affetti da tumori astrocitari ad alto grado. 22/24 pazienti (91,7%) avevano una diagnosi istologica post-chirurgia o dopo sola biopsia. In 2/24 pazienti (8,3%) non era stato possibile avere una conferma istologica e la diagnosi era solo clinica attraverso RM e spettroscopia. Tutti i pazienti sono stati avviati a trattamento combinato di Chemioterapia e Radioterapia. I pazienti sono stati sottoposti a centraggio con TAC e RM. L'identificazione del target e degli organi a rischio è stato eseguito su immagini fuse, il trattamento è stato eseguito con acceleratore lineare o tomoterapia utilizzando una tecnica 3-D- conformal radiotherapy o IMRT-intensity modulation therapy. La dose totale era somministrata con uno schema di frazionamento con dose singola di 180-200 cGy per frazione. Tutti i bambini erano immobilizzati con maschere termoplastiche personalizzate. Per i bambini non collaboranti la radioterapia è stata eseguita in sedazione.

RISULTATI: 15/24 (62,5%) sono stati sottoposti a intervento chirurgico di cui 13/15 (86,7%) presentavano residuo macroscopico post chirurgico documentata alla RM. Le varianti istologiche erano le seguenti:6/24 (25%) gliomatosi cerebrali, 9/24 (37,5%) glioblastoma multiforme e 9/24 (37,5%) astrocitomi anaplastici. (classificazione WHO 2007). Tutti i pazienti hanno ricevuto chemioterapia prima o concomitante alla radioterapia. Per 16/24 (66,7%) lo schema chemioterapico utilizzato prevedeva Temozolamide da sola o in associazione con altri chemioterapici. 7/24 (29,1%) pazienti, che presentavano malattia diffusa encefalica e spinale, hanno ricevuto un trattamento radioterapico craniospinale seguito da un boost sulla sede primaria di malattia come illustrato nella Tabella che segue:

Tabella.

Istologia	Craniospinale	BOOST
✓ 1 Gliomatosi cerebrali	Dose media xxGy (Range 24-36Gy)	Dose mediana 24Gy (Range 14Gy-36.7Gy)
✓ 3 Glioblastomamultiforme		
✓ 3 Astrocitoma anaplastico		

I rimanenti 17 pazienti (70,8%) con malattia focale sono stati irradiati sulla sede primitiva di malattia con dose mediana di 56 Gy (range 50Gy-60Gy). Un paziente è andato incontro a ritrattamento per progressione di malattia a scopo palliativo per un totale di 74Gy. Nessun paziente ha presentato effetti collaterali acuti di grado III e tutti i pazienti hanno concluso lo schema di trattamento. In 9/17 (52,9%) pazienti con malattia locale hanno sviluppato diffusione al SNC. 15/24 (62,5%) pazienti morivano per progressione di malattia. 9/24 (37,5%) sono vivi di cui 3 con malattia stabile e 5 in assenza di malattia. (fol-

low-up mediano di 36 mesi). La OS dell'intero gruppo in studio a 1-2-5 anni è stata di 65.4%, 36,3% e 24% rispettivamente. I pazienti sottoposti a irradiazione craniospinale per presenza di malattia diffusa hanno riportato un OS nettamente inferiore rispetto a i pazienti con malattia localizzata 50% vs 70% a 1 aa. (Figura 1).

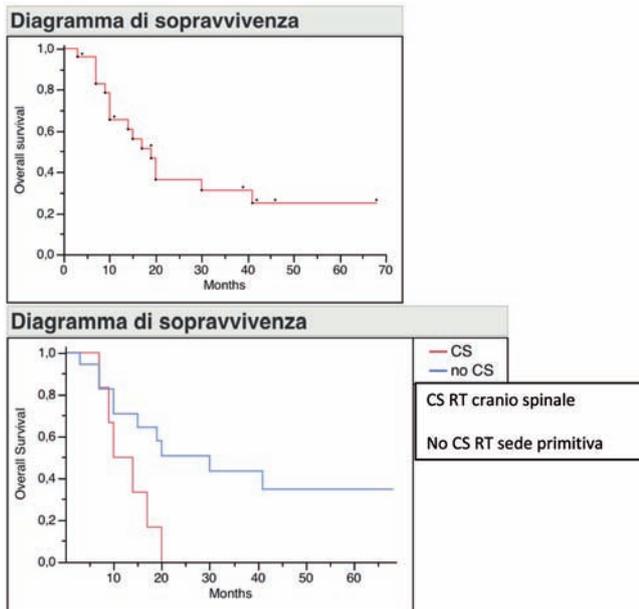


Figura 1.

CONCLUSIONI: I risultati ottenuti evidenziano come questi tumori cerebrali presentano risultati di sopravvivenza più alti rispetto i pazienti adulti. La presenza di malattia diffusa rappresenta un fattore prognostico molto negativo e la RT estesa a tutto il nevrasso non appare migliorare la sopravvivenza. Un dato interessante in questo studio è l'alta incidenza di progressione al SNC. Questo comportamento si discosta dall'andamento clinico in età adulta dove la malattia raramente si diffonde al di fuori della sede primitiva.

TRAPIANTO

CP02

TRAPIANTO DA DONATORE FAMILIARE HLA-PARZIALMENTE COMPATIBILE DOPO T-DEPLEZIONE TCR ALFA/BETA-CD19+: UNA NUOVA OPZIONE TRAPIANTOLOGICA PER PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA MALATTIE NON MALIGNI

A. Bertaina,¹ C. Messina,² R. Masetti,³ M. Romano,¹ S. Rutella,¹ D. Pagliara,¹ F. Moretta,¹ M.V. Gazzola,² D. Pende,⁴ S. Ceccarelli,¹ M. Tumino,² L.P. Brescia,¹ G. Li Pira,¹ P. Rossi,⁵ C. Cancrini,⁶ M.E. Bernardo,⁷ G.M. Milano,⁷ G. Palumbo,⁷ M. Falco,⁸ L. Moretta,⁸ F. Locatelli⁷

¹Dipartimento di Oncoematologia, IRCCS Ospedale Bambino Gesù, Roma; ²Dipartimento di Pediatria, Università di Padova, Padova; ³Dipartimento di Pediatria, Ospedale Sant'Orsola Università di Bologna, Bologna; ⁴Istituto Giannina Gaslini Genova, IRCCS Istituto Giannina Gaslini Genova, Genova; ⁵Dipartimento Pediatrico Universitario Ospedaliero, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Università Tor Vergata, Roma; ⁶Dipartimento Pediatrico Universitario Ospedaliero, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù - Università Tor Vergata, Roma; ⁷Dipartimento di Oncoematologia, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma; ⁸IRCCS Istituto Giannina Gaslini Genova, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Sebbene il trapianto aploidotico sia stato largamente impiegato in pazienti affetti da patologie non maligne *life-threatening*, i dati riportati in letteratura mostrano una sopravvivenza libera da malattia (DFS) inferiore rispetto a quella ottenuta utilizzando un donatore volontario HLA-compatibile. Al fine di migliorare l'*outcome* e il recupero immunologico di questi pazienti, abbiamo sviluppato un nuovo metodo di T-deplezione (utilizzando il sistema CliniMacs-Milteny) che rimuove dal *graft* T linfociti alfa/beta + (TCR alfa/beta +) e cellule B, mantenendo T linfociti gamma/delta + (TCR gamma/delta +), cellule NK, cellule commissionate in senso mieloide e megacariocitario e cellule dendritiche.

METODI: Ad oggi, con questa nuova strategia, sono stati trapiantati 20 pazienti affetti da patologie non maligne in due Centri Italiani (Ospedale Pediatrico Bambino Gesù-Roma e Azienda Ospedaliera-Padova). Undici pazienti erano maschi e nove femmine, l'età mediana al trapianto era 3 anni e 3 mesi (range 4 mesi-13 anni). Sette pazienti erano affetti da SCID, tre da Anemia di Fanconi (FA), quattro da Anemia Aplastica Severa (SAA), uno da Sindrome di Wiskott-Aldrich (WAS), uno da Drepanocitosi, uno da Porpora Amegariocitica Congenita (CAMT), uno da HLH, uno da Talassemia Major con anemia emolitica autoimmune resistente e uno da immunodeficienza con poliendocrinopatia ed enteropatia X-linked (IPEX). Tutti i pazienti sono stati trapiantati da uno dei due genitori (12 dalla madre e 8 dal padre), il numero mediano di cellule CD34+, T-linfociti alfa/beta e B-linfociti infusi è stato di $17.9 \times 10^6/\text{Kg}$ (range 9.73-47.27), $0.042 \times 10^6/\text{Kg}$ (range 0.003-0.3) e $0.082 \times 10^6/\text{Kg}$ (range 0.003-0.8) rispettivamente. Il regime di condizionamento utilizzato è stato Treosulfano e Fludarabina in 10 pazienti (7 SCID, 1 SAA, 1 WAS e 1 talassemia), Fludarabina e Ciclofosfamide in 5 pazienti (3 FA and 2 SAA), Thiotepa, Ciclofosfamide e total nodal irradiation in 1 paziente (SAA), Thiotepa, Treosulfano e Fludarabina in 3 casi (1 CAMT, 1 IPEX e 1 Drepanocitosi), Busulfano, Thiotepa e Fludarabina in un caso (HLH). Come profilassi del rigetto tutti i pazienti hanno ricevuto ATG Fresenius® alla dose di 3 mg/Kg/die in giornata -5, -4 e -3 prima del trapianto. Al fine di prevenire lo sviluppo di malattia linfoproliferativa EBV-correlata, inoltre, in giornata -1, tutti i pazienti hanno ricevuto Rituximab® alla dose di 200 mg/mq. Dopo il trapianto, non è stata somministrata alcuna profilassi per la GvHD.

RISULTATI: L'attecchimento primario delle cellule del donatore si è verificato in 16/20 pazienti trapiantati; il tempo mediano di recupero dei polimorfonucleati è stato pari a 13,5 giorni (range 10-19) e quello delle piastrine a 10 giorni (range 7-40). I pazienti (4/20) che hanno rigettato (3 con SAA e 1 con talassemia) sono stati tutti ritrapiantati con successo, 2 dallo stesso donatore e 2 dall'altro genitore. GvHD acuta cutanea di grado I/II è stata osservata in 5/20 pazienti, mentre nessun paziente ha sviluppato GvHD acuta a localizzazione viscerale. Non è stato osservato nessun caso di GvHD cronica. Due pazienti (1 SAA e 1 CAMT) sono

deceduti in seguito ad insufficienza respiratoria secondaria ad infezione da CMV e Adenovirus, rispettivamente a 60 e 80 giorni post-trapianto. Ad un follow-up mediano di 268 giorni (range 35-764), 18/20 pazienti della nostra coorte sono vivi e liberi da malattia (Figura 1). Il recupero immunologico del compartimento T cellulare osservato è caratterizzato da un rapido incremento dei linfociti T gamma/delta nei primi 30 giorni; già dopo 45 giorni predominano T linfociti alfa/beta.

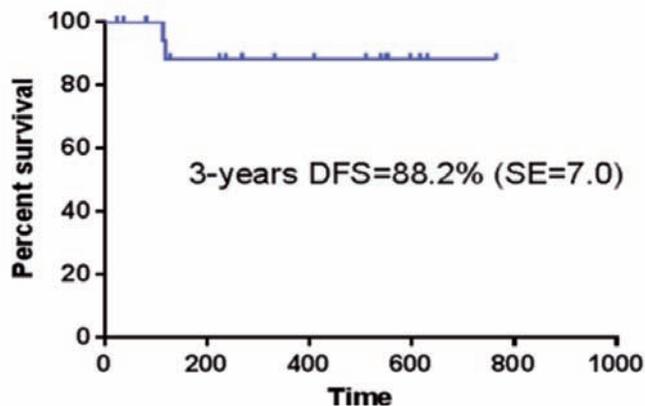


Figura 1. Disease free survival a 3 anni dal trapianto.

CONCLUSIONI: In conclusione, l'80% dei pazienti ha mostrato un rapido e robusto attecchimento con un'incidenza cumulativa (CI) di GvHD acuta del 21.6% e nessun caso di GvHD cronica. Sebbene sia necessario un follow-up più lungo, i risultati del nostro studio indicano che il trapianto aploidentico dopo procedura di T-deplezione TCR alfa/beta-CD19+ può essere considerato un'opzione efficace e sicura da offrire a tutti i pazienti pediatrici affetti da patologie non maligne ereditarie o acquisite *life-threatening* che non dispongano di un donatore HLA identico.

CP03

TERAPIA GENICA CON CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE INGEGNERIZZATE CON VETTORI LENTIVIRALI PER IL TRATTAMENTO DELLA SINDROME DI WISKOTT-ALDRICH

M.P. Cicalese,¹ F. Ferrua,¹ S. Scaramuzza,² L. Biasco,² S. Giannelli,² C. Castiello,² C. Evangelio,¹ A. Assanelli,¹ M. Casiraghi,¹ M. Bosticardo,² P. Rizzardi,³ A. Finocchi,⁴ A. Metin,⁵ P. Banerjee,⁶ J. Orange,⁶ A. Biffi,¹ A. Villa,² F. Ciceri,⁷ M.G. Roncarolo,⁸ L. Naldini,⁸ A. Aiuti²

¹Unità di Pediatria Immuno-ematologica e Trapianto di Midollo Osseo, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano, Italy; ²HSR-TIGET, San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy, Milano, Italy; ³MolMed, MolMed SpA, Milano, Italy; ⁴Immunofettivologia Pediatrica, Università di Roma "Tor Vergata", Roma, Italy; ⁵Children's Hospital, Ankara Dispaki, Ankara, Turchia; ⁶Texas Children's Hospital, Baylor College of Medicine, Houston, USA; ⁷Unità di Ematologia e Trapianto di Midollo Osseo, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano, Italy; ⁸Università Vita-Salute, Ospedale San Raffaele, Milano, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La Sindrome di Wiskott-Aldrich (WAS) è una immunodeficienza legata al cromosoma X caratterizzata da trombocitopenia, infezioni ricorrenti, autoimmunità e un rischio aumentato per lo sviluppo di linfomi. In assenza di un donatore HLA-identico, il trapianto allogenico di cellule ematopoietiche staminali/progenitori (HSPC) da donatori non consanguinei è efficace ma associato a rischio di complicanze e mortalità. Studi preliminari di terapia genica per WAS basati sull'uso di vettori gamma-retrovirali hanno dimostrato la fattibilità di questo approccio, ma allo stesso tempo hanno mostrato un rischio di genotossicità legato al vettore impiegato.

METODI: Abbiamo quindi sviluppato un nuovo approccio di terapia genica con HSPC, basato sull'uso di vettori lentivirali auto-inattivanti che esprimono la proteina WAS sotto il controllo del promotore endogeno. Cinque pazienti sono stati trattati con cellule CD34+ autologhe isolate dal midollo osseo (BM) e trasdotte con un vettore lentivirale purificato, in combinazione con un regime di condizionamento ad

intensità ridotta (anti-CD20, busulfano 8 mg/Kg, fludarabina 60 mg/m²). Il primo paziente ha anche ricevuto HSPC trasdotte purificate da sangue periferico dopo mobilizzazione per raggiungere una dose di cellule CD34+ adeguata.

RISULTATI: La trasduzione dei progenitori clonogenici in vitro è risultata molto efficiente (>90%) e la dose di cellule CD34+ infuse adeguata (range 7.8-14.1x10⁶ CD34+/Kg). Abbiamo quindi analizzato l'attecchimento delle cellule trasdotte nel BM e nel sangue periferico (PB) e le funzioni immunologiche nei primi tre pazienti trattati con un follow up tra 1 e 2.5 anni. I test molecolari mostrano la presenza di una quota elevata di cellule progenitrici geneticamente corrette in vivo nel BM dei pazienti (26-48%), confermata anche nelle cellule differenziate di tutte le linee sia nel BM che nel sangue periferico. L'espressione della proteina WAS, analizzata mediante citofluorimetria, è stata ripristinata nei linfociti, monociti e piastrine, consentendo una normalizzazione dell'MPV ed un miglioramento delle conte delle piastrine. La proliferazione dopo stimolazione con anti-CD3, l'attività citotossica delle NK, la formazione della sinapsi immunologica e la capacità soppressiva delle Treg si sono normalizzate dopo terapia genica. Tutti i pazienti sono in buone condizioni cliniche, indipendenti da trasfusione di piastrine, e non mostrano più eczema ed infezioni severe. Il sequenziamento high-throughput per i siti di integrazione del vettore dopo terapia genica mostra una ematopoiesi altamente policlonale. Inoltre, abbiamo potuto paragonare direttamente il profilo di inserzione dei vettori lentivirale e retrovirale nelle cellule di pazienti trattati con terapia genica per lo stesso malattia. Tale analisi ha evidenziato differenze significative nella distribuzione genomica delle inserzioni dei vettori tra i 2 trial clinici, dimostrando che la terapia genica con vettore LV non induce selezione *in vivo* di integrazioni vicino a geni tumorali o espansioni clonali aberranti.

CONCLUSIONI: Nel complesso l'osservazione clinica, i dati di laboratorio e le analisi di integrazione dimostrano il buon profilo di sicurezza del nostro protocollo di terapia genica. Sarà necessaria una osservazione a lungo termine in più ampio gruppo di pazienti per confermare la sicurezza ed efficacia di questa terapia. In conclusione, la terapia genica con HSPC ingegnerizzate con vettori lentivirali rappresenta una nuova alternativa per il trattamento della Sindrome di Wiskott-Aldrich e potenzialmente per altre malattie ematologiche a base genetica.

C003

VALORE PROGNOSTICO DELLA MALATTIA RESIDUA MINIMA PRE E POST TRAPIANTO ALLOGENICO NELLA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA IN ETÀ PEDIATRICA

A. Balduzzi,¹ L. Di Maio,¹ D. Silvestri,² S. Songia,³ S. Bonanomi,¹ A. Rovelli,¹ V. Conter,¹ A. Biondi,¹ G. Cazzaniga,³ M.G. Valsecchi²

¹Clinica Pediatrica, Ospedale San Gerardo; ²Centro di Ricerca in Biostatistica per l'Epidemiologia Clinica; ³Centro di Ricerca Tettamanti, Clinica Pediatrica, Università Milano Bicocca, Milano, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Lo studio della malattia residua minima (MRM) durante l'ultimo decennio ha assunto sempre più importanza nei trattamenti di prima e seconda linea di leucemia linfoblastica acuta (LLA), rivestendo un ruolo sia come fattore prognostico per il rischio di recidiva, sia come indice di stratificazione dei pazienti. Lo studio della MRM ha mostrato inoltre un ruolo cardine anche in ambito trapiantologico: elevati livelli di MRM pre-trapianto sono stati associati ad elevato rischio di recidiva e riduzione della sopravvivenza libera da malattia. Finalità del nostro studio è stata quella di valutare l'impatto dei livelli di MRM pre- e post-trapianto sull'outcome e valutare l'impatto di possibili interventi in una coorte di pazienti sottoposti a trapianto allogenico per LLA in remissione completa (RC).

METODI: Presso la Clinica Pediatrica di Monza, è stato possibile studiare la MRM con metodica di real-time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR), secondo le linee guida dell'European Study Group for MRD detection in ALL (EuroMRD ALL), al momento del trapianto ed a 1, 3, 6, 9 e 12 mesi dopo il trapianto in 82 pazienti (età mediana 8 anni) affetti da LLA in RC sottoposti a primo trapianto allogenico tra il 2001 ed il 2011 (follow-up mediano: 4.9 anni).

RISULTATI: Il 68% dei pazienti al momento del trapianto presentava MRM negativa o <1x10⁻⁴ ed ha riportato, a 5 anni, una sopravvivenza libera da malattia (5-a SLM) del 77.7% (ES 5.7) ed una incidenza cumulativa di recidiva di malattia (5-a ICR) dell'11.4% (ES 4.4) (Figura 1); il 32% dei pazienti al momento del trapianto presentava MRM³1x10⁻⁴ e ha riportato, una 5-aSLM del 30.8% (ES 9.1) (p value <0.001) e una 5-a ICR del 61.5% (ES 9.5) (Figura 2). La presenza di MRM³1x10⁻⁴ al momento

del trapianto è risultata essere associata ad incremento di rischio di recidiva di 9.2 volte (IC 3.54-23.88; p-value <0.001) rispetto ai pazienti che presentavano MRM 1×10^{-4} o negativa. L'intensificazione del trattamento chemioterapico pre-trapianto (1-2 blocchi FLA-D), con l'obiettivo di ridurre il livello di MRM, è risultata associata ad una riduzione di 5 volte del rischio di fallimento terapeutico (HR 0.18, 95% IC 0.05-0.66, p-value 0.01). Dei 26 pazienti con MRM $\geq 1 \times 10^{-4}$, ad eccezione dei 7 che presentavano GvHD nel secondo mese post-TCSE, 19 erano candidati ad intervento immunologico post-trapianto: in 11 è stato anticipato lo scalo della terapia immunosoppressiva e 6 di questi sono in remissione completa ad una mediana di 8.9 anni post-trapianto e 5 sono recidivati. I pazienti che hanno presentato almeno un valore positivo di MRM nel periodo post-trapianto hanno riportato, a 5 anni, una SLM del 40.3% (ES 9.3); la positività della MRM nel periodo post-trapianto è risultata associata ad un incremento di rischio di fallimento terapeutico di 2.5 volte (IC 1.05-5.75; p-value 0.04) se riscontrata nei primi 100 giorni post trapianto e di 7.8-volte (IC 2.2-27.78; p-value 0.002) se riscontrata dopo il 6° mese. Dodici pazienti hanno presentato una positività della MRM post-TCSE "de novo", non preceduta cioè da livelli di MRM $\geq 10^{-4}$ pre-TCSE: 3 pazienti hanno presentato GvHD; 3 pazienti avevano già precedentemente sospeso la terapia immunosoppressiva; sei pazienti, candidabili a interventi immunologici sulla base dei livelli di MRM post-TCSE, hanno sospeso l'immunosoppressione. Di questi sei pazienti, quattro hanno presentato come primo valore MRM 10^{-3} e sono in remissione completa ad una mediana di 3,4 anni post-TCSE, mentre entrambi i pazienti che hanno presentato come prima positività valori di MRM $\geq 10^{-3}</math> hanno presentato recidiva di malattia. L'anticipo dello scalo e della sospensione dell'immunosoppressione sulla base dei livelli di MRM pre e post trapianto può avere un ruolo sul miglioramento dell'outcome, nonostante i pazienti che hanno presentato MRM ad un livello $\geq 1 \times 10^{-3}</math> ad un qualsiasi tempo post-trapianto hanno poi manifestato recidiva di malattia, indipendentemente dagli interventi terapeutici messi in atto, quali la sospensione dell'immunosoppressione o l'infusione di linfociti del donatore.$$

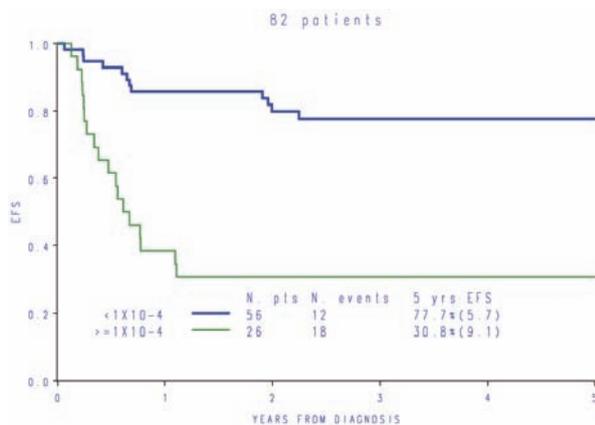


Figura 1. Sopravvivenza libera da eventi (EFS) a seconda del livello di MRM al momento del TCSE.

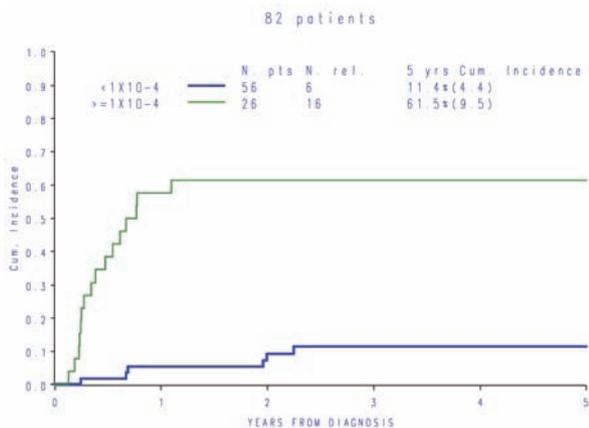


Figura 2. Incidenza cumulativa di recidiva di malattia (CIR) a seconda del livello di MRM al momento del TCSE.

CONCLUSIONI: Il nostro studio evidenzia che: 1) il livello di MRM al momento del trapianto è il più importante fattore determinante l'outcome, 2) l'intensificazione del trattamento chemioterapico pre-trapianto migliora l'outcome, 3) lo scalo precoce dell'immunosoppressione potrebbe ridurre il rischio di recidiva post-trapianto, 4) la positività della MRM post-TCSE non è necessariamente associata a recidiva di malattia, in particolare se riscontrata a bassi livelli e precocemente nel post-trapianto.

P016

RUOLA DELLA RIATTIVAZIONE DA CYTOMEGALOVIRUS SULLA MATURAZIONE DELLE CELLULE NK NEI PAZIENTI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO DA DONATORE FAMILIARE HLA-APLOIDENTICO T-DEPLETO E A TRAPIANTO DI SANGUE CORDONALE

M. Della Chiesa,¹ A. Bertaina,² F. Frassoni,³ F. Moretta,² S. Rutella,² M. Podestà,³ K. Girardi,² G. Li Pira,² L.P. Brescia,² F. Di Florio,² M.E. Bernardo,² L. Moretta,³ A. Moretta¹

¹Dipartimento di Medicina Sperimentale e Centro di Eccellenza per la Ricerca Biomedica, Università di Genova, Genova; ²Dipartimento di Oncematologia, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma; ³IRCCS Istituto G. Gaslini, IRCCS Istituto G. Gaslini, Genova, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Precedenti studi del nostro gruppo hanno dimostrato che la riattivazione d'infezione da Cytomegalovirus (HCMV) è in grado di influenzare la ricostituzione delle cellule NK in pazienti adulti sottoposti a trapianto intraosseo di cellule staminali emopoietiche di sangue cordonale (UCBT). Sulla base di questi dati, con il presente studio, abbiamo analizzato e confrontato le caratteristiche della ricostituzione delle cellule NK in pazienti pediatrici affetti da emopatie maligne sottoposti a trapianto di cellule staminali emopoietiche da donatore familiare HLA-aploidentico (dopo deplezione dei T linfociti $\alpha\beta+$ e dei B linfociti CD19+), valutando, in particolare, il ruolo giocato da una riattivazione d'infezione da HCMV. Inoltre, si sono analizzate eventuali differenze nelle caratteristiche della ricostituzione NK post-trapianto tra i pazienti sottoposti a trapianto aploidentico (aplo-HSCT) e quelli sottoposti a UCBT (sia per via intraossea che endovenosa).

METODI: Dodici pazienti pediatrici erano stati sottoposti a UCBT infuso per via endovenosa, 26 pazienti pediatrici erano stati sottoposti a aplo-HSCT e 14 pazienti adulti a UCBT infuso per via intraossea. Per l'analisi dei dati sono stati raccolti campioni di sangue periferico a distanza di 1, 3, 6 e 12 mesi dal trapianto.

RISULTATI: In maniera simile a quanto riscontrato negli adulti sottoposti a UCBT per via intraossea, i pazienti pediatrici sottoposti ad aplo-HSCT andati incontro a riattivazione di HCMV hanno mostrato una più rapida espansione e maturazione delle cellule NK. Inoltre, le cellule NK dei pazienti che hanno sviluppato una riattivazione d'infezione da HCMV mostravano un fenotipo maturo, caratterizzato dall'assetto recettoriale KIR⁺ NKG2A⁻ già a 3 mesi dopo il trapianto (vedi Figura 1). Considerata la presenza di cellule NK nel graft dei pazienti sottoposti ad aplo-HSCT, non è possibile escludere che parte delle cellule NK mature riscontrate nei riceventi, siano in realtà rappresentate da cellule NK long-lived del donatore. Nei pazienti sottoposti ad aplo-HSCT, a differenza di quanto osservato nei riceventi UCBT, non è stato possibile individuare l'espansione di un particolare subset di cellule NK aberrante e iporesponsivo, fenotipicamente caratterizzato dalla positività per CD16 e dalla negatività per CD56. In modo del tutto peculiare, all'interno della nostra coorte, è emerso che in tutti i pazienti andati incontro a riattivazione d'infezione da HCMV è possibile individuare uno specifico subset di cellule NK altamente differenziate NKG2C⁺CD57⁺. Questo subset di cellule NK potrebbe rappresentare un comparto di cellule NK long-lived con funzione di "memoria" per l'antigene, e quindi garantire maggior protezione nei confronti dei patogeni.

CONCLUSIONI: I risultati del nostro studio indicano chiaramente come la riattivazione d'infezione da HCMV promuova lo sviluppo e l'espansione delle cellule NK nei pazienti sottoposti ad aplo-HSCT e a UCBT. Questo dato risulta particolarmente importante se si considera che in entrambi i casi i riceventi non possono beneficiare della protezione contro le infezioni conferita da T linfociti di memoria, patogeno-specifici. Inoltre la riattivazione di HCMV, favorendo l'espansione di un particolare sottotipo di cellule NK NKG2C⁺CD57⁺ a lunga sopravvivenza, permetterebbe l'acquisizione di una protezione immunologica precoce in grado di garantire un'azione efficace anche contro altri agen-

ti patogeni e, verosimilmente, contro cellule leucemiche sopravvissute alla terapia di preparazione al trapianto.

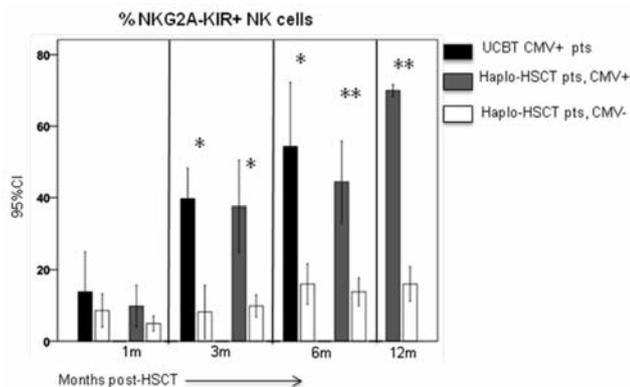


Figura 1.

Bibliografia:

- Della Chiesa M, Falco M, Podestà M, Locatelli F, Moretta L, Frasson F, Moretta A. Phenotypic and functional heterogeneity of human NK cells developing after umbilical cord blood transplantation: a role for human cytomegalovirus? *Blood*. 2012 Jan 12;119(2):399-410. doi: 10.1182/blood-2011-08-372003. Epub 2011 Nov
- Bjorkstrom NK, Ljunggren HG, Sandberg JK. CD56 negative NK cells: origin, function, and role in chronic viral disease. *Trends Immunol*. 2010;31(11):401-406.
- Brown JA, Stevenson K, Kim HT, et al. Clearance of CMV viremia and survival after double umbilical cord blood transplantation in adults depends on reconstitution of thymopoiesis. *Blood*. 2010; 115(20):4111-4119.

P017

INFUSIONI MULTIPLE DI CELLULE STROMALI MESENCHIMALI DETERMINANO REMISSIONI SOSTENUTE IN PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA MALATTIA DEL TRAPIANTO CONTRO L'OSPITE, STEROIDE-RESISTENTE, DI GRADO III-IV

M.E. Bernardo,¹ A. Conforti,¹ M.A. Avanzini,² W.E. Fibbe,³ A.C. Lankester,⁴ B. Contoli,¹ A. Bertaina,¹ G. Giorgianni,² M. Zecca,² F. Locatelli¹

¹Dipartimento di Onco-ematologia, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Dipartimento di Onco-ematologia, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy; ²Onco-Ematologia Pediatrica, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Onco-Ematologia Pediatrica, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italy;

³Department of Immunohematology and Blood Transfusion, Leiden University Medical Centre, Department of Immunohematology and Blood Transfusion, Leiden University Medical Centre, Leiden, The Netherlands; ⁴Department of Pediatrics, Stem Cell Transplantation Unit, Leiden University Medical Centre, Department of Pediatrics, Stem Cell Transplantation Unit, Leiden University Medical Centre, Leiden, The Netherlands

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Le cellule stromali mesenchimali (MSC) sono cellule multipotenti che possono differenziare nei vari stadi cellulari della linea mesodermica. Inoltre, esse posseggono spiccate proprietà immunomodulatorie che sono rivolte verso tutti i componenti cellulari della risposta immune. Grazie a queste proprietà, le MSC vengono oggi impiegate in approcci di terapia cellulare nell'ambito del trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (TCSE) e della Medicina Rigenerativa. In particolare, è stato riportato che le MSC sono efficaci nel trattamento della malattia del trapianto contro l'ospite acuta (aGvHD), steroide-resistente insorta dopo TCSE. In questo contesto, i dati che si riferiscono a pazienti pediatrici trattati con MSC sono limitati. Obiettivo di questo studio è stato analizzare l'outcome di 37 pazienti pediatrici che hanno ricevuto infusioni multiple per via endovenosa di MSC per il trattamento della GvHD acuta, steroide-resistente, di grado III-IV.

METODI: Nello studio sono stati arruolati 37 pazienti pediatrici (età mediana 7 anni; range di età 3 mesi-17 anni) affetti da GvHD

acuta, steroide-resistente, di grado III-IV insorta dopo TCSE o infusione di linfociti del donatore. Tutti i pazienti hanno ricevuto infusioni per via endovenosa di MSC. Le MSC sono state espanse *ex vivo* dal midollo osseo di donatori sani (MSC *third party*) secondo le norme di Good Manufacturing Practice (GMP), dopo separazione su Ficoll delle cellule mononucleate midollari. Le cellule sono state coltivate in presenza di terreno di coltura DMEM-LG addizionato di siero fetale bovino al 10% fino al passaggio 2, quando sono state congelate in azoto liquido per la successiva infusione ai pazienti. I criteri di qualità impiegati per il rilascio delle MSC per uso clinico sono stati i seguenti: morfologia di tipo affusolato, assenza di contaminazione microbica, vitalità valutata con Trypan Blue, immunofenotipo in citofluorimetria (positività per CD73, CD90 e CD105; assenza di CD34, CD45, CD14 e CD31). Le cellule sono state infuse al dosaggio di 1-2 x 10⁶/kg di peso del ricevente.

RISULTATI: Trentacinque pazienti avevano sviluppato aGvHD dopo TCSE, mentre i rimanenti 2 bambini dopo aver ricevuto una o più infusioni di linfociti del donatore (DLI). Il tempo mediano tra TCSE/DLI e sviluppo di aGvHD è stato di 29 giorni (range 7-92). In 5 bambini le manifestazioni cliniche relative a aGvHD coinvolgevano un solo organo, in 11 pazienti 2 organi e nei rimanenti 21 bambini 3 organi. Un solo paziente presentava aGvHD cutanea isolata con interessamento esteso della cute. La mediana di infusioni per paziente è stata di 2 (range 1-13) per un totale di 109 somministrazioni. Ventidue pazienti hanno ricevuto 1 o 2 infusioni di MSC, 12 bambini da 3 a 5 infusioni e ai rimanenti 3 sono state somministrate 6 o più dosi di MSC. Trentaquattro dei 37 pazienti hanno ricevuto infusioni multiple di MSC. È stata osservata una risposta completa (CR) in 24 bambini (65%), mentre 8 pazienti hanno mostrato una risposta parziale (PR) e 5 non hanno risposto (NR) al trattamento con MSC. La dose mediana di MSC infuse ai pazienti che hanno risposto al trattamento è stata 2.0x10⁶/kg (range 1- 3x10⁶/kg), mentre i bambini che non hanno mostrato risposta hanno ricevuto 1.8x10⁶ MSC/kg (range 0.9-3x10⁶/kg; p=N.S.). Nei 30 pazienti che presentavano un coinvolgimento cutaneo da aGvHD il tempo mediano per la risoluzione della stessa è stato di 6 giorni (range 4-10) con 17 CR, 7 PR e 6 NR. Dei trentadue bambini con aGvHD a localizzazione intestinale 19 hanno mostrato CR. Dieci pazienti con risposta completa al trattamento con MSC continuavano, però, a presentare sintomi tipici della malattia, quali diarrea ed un numero aumentato di evacuazioni. L'endoscopia digestiva con biopsie multiple effettuata ha escluso la presenza di aGvHD in atto, ma ha mostrato lesioni suggestive per atrofia dei villi intestinali associata a fibrosi. aGvHD epatica era presente in 25 bambini dei quali 11 hanno presentato CR e 7 PR. Dodici pazienti hanno sviluppato GvHD cronica (cGvHD), dei quali 7 sono vivi (2 con cGvHD estesa). Dopo una mediana di follow-up di 2,9 anni (range 2 mesi-6,7 anni), la sopravvivenza globale (OS) è stata del 37% (95% CI 16% - 57%); in particolare è stata del 65% (95% CI 38-82) nei bambini che hanno raggiunto CR e 0% nei pazienti che non hanno mostrato risposta al trattamento con MSC (p=0,001). L'incidenza cumulativa di mortalità trapianto-correlata (TRM) a 6 anni è stata del 17% (95% CI 3-45) nei pazienti che hanno mostrato CR e del 69% (95% CI 39-87) in quelli che non hanno risposto (p=0,001). Diciotto pazienti sono morti, dei quali 6 avevano mostrato CR dopo l'infusione di una o più dosi di MSC. Tutti i pazienti che avevano presentato PR/NR al trattamento con MSC sono deceduti, fatta eccezione per uno. Il tempo mediano tra l'inizio della terapia steroidea e la prima infusione di MSC è stato di 13 giorni (range 5-85 giorni). Nel gruppo di bambini trattati tra il quinto e il dodicesimo giorno dopo l'inizio della terapia steroidea (trattamento precoce con MSC), è stata osservata più frequentemente una CR (14 dei 18 pazienti, pari al 78%), se confrontati con i bambini che hanno ricevuto il trattamento con MSC tra il tredicesimo e l'ottantacinquesimo giorno (trattamento tardivo con MSC; 10 dei 19 pazienti, pari al 52%; p=0,05). Inoltre, i pazienti con trattamento precoce hanno mostrato un trend in favore di una TRM inferiore (17%; 95% CI 6%-33%) a confronto con i bambini trattati tardivamente (53%, 95% CI 29%-76%; p=0,06). Infine, la mortalità legata ad infezioni è stata inferiore nel gruppo di bambini che hanno ricevuto le MSC precocemente (1 bambino, a confronto con 4 pazienti nel gruppo con trattamento tardivo; p=0,12).

CONCLUSIONI: In conclusione, questi dati indicano che il trattamento con MSC *third party* è sicuro ed efficace nell'indurre remissione in pazienti pediatrici affetti da aGvHD severa, steroide-resistente. Inoltre, i nostri risultati suggeriscono che infusioni multiple di MSC sono necessarie per indurre remissioni sostenute nel tempo. Infine, il trattamento precoce con MSC sembra essere associato ad un migliore outcome.

P018

STUDIO DELLA PENTRAXINA 3 (PTX3) COME NUOVO MARCATORE DI GVHD IN UNA COORTE PEDIATRICA DI PAZIENTI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO ALLOGENICO DI CELLULE STAMINALI

E. Dander,¹ P. De Lorenzo,² P. Vinci,¹ I. Cuccovillo,³ S. Bonanomi,⁴ A. Balduzzi,⁴ F. Masciocchi,⁴ M. Migliavacca,⁴ L. Di Maio,⁴ F. Pavan,⁴ C. Garlanda,³ A. Mantovani,³ M.G. Valsecchi,² B. Bottazzi,³ A. Rovelli,⁴ A. Biondi,⁵ G. D'Amico¹

¹Centro Ricerca "M. Tettamanti", Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca, Monza (MB); ²Centro di Biostatistica per l'Epidemiologia Clinica, Università di Milano-Bicocca, Monza (MB); ³Dipartimento di Immunologia e Infiammazione, Istituto Clinico Humanitas, Milano; ⁴Clinica Pediatrica, Ospedale San Gerardo, Monza (MB); ⁵Centro Ricerca "M. Tettamanti", Clinica Pediatrica, Ospedale San Gerardo, Università di Milano-Bicocca, Monza (MB), Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La GvHD è una delle maggiori cause di mortalità a seguito del trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (HSCT). Al momento la diagnosi di questa invalidante patologia, caratterizzata da una forte componente infiammatoria, si basa sull'osservazione delle manifestazioni cliniche e su biopsie invasive, difficilmente eseguibili in pazienti pediatrici. L'utilizzo di biomarcatori specifici potrebbe facilitarne la diagnosi precoce ed il monitoraggio. La pentraxina lunga di tipo 3 (PTX3) è prodotta localmente nei siti di infiammazione. Il suo rapido aumento in patologie a base infiammatoria e la correlazione fra i suoi livelli e la severità determinata in diverse patologie autoimmuni, ne suggeriscono il potenziale utilizzo come marcatore di GvHD. A tale scopo abbiamo studiato i livelli plasmatici di PTX3 in pazienti sottoposti HSCT che hanno sviluppato GvHD post trapianto.

METODI: Previa firma del consenso informato, sono stati arruolati nello studio 80 pazienti pediatrici sottoposti ad HSCT dal 2009 ad oggi, presso la Clinica Pediatrica dell'Ospedale San Gerardo di Monza. Campioni di plasma sono stati raccolti prima dell'inizio del regime di condizionamento e settimanalmente dal giorno del trapianto (giorno 0) fino al giorno 100. Fra questi, 39/80 pazienti hanno sviluppato GvHD acuta entro il giorno 28 dal trapianto, mentre 23/80 hanno sviluppato GvHD fra il giorno 28 e il 100 dopo il trapianto (20 in forma acuta e 3 in forma cronica o di overlap sindrome). 18 pazienti non hanno mai sviluppato la patologia nel periodo temporale in analisi. Per quanto riguarda i pazienti con GvHD, il plasma è stato inoltre raccolto al giorno di insorgenza della GvHD, prima dell'inizio della terapia. I livelli di PTX3 sono stati monitorati mediante saggi ELISA.

RISULTATI: Abbiamo inizialmente valutato i livelli plasmatici di PTX3 all'insorgenza della patologia. Dal momento che i valori di PTX3 potrebbero essere influenzati dall'insorgenza di eventi infettivi, abbiamo comparato i livelli di PTX3 all'insorgenza della GvHD entro il giorno 28 dal trapianto, finestra temporale caratterizzata da una bassa incidenza di infezioni nella nostra coorte di pazienti, con i livelli della proteina riscontrati in prelievi di pazienti che non hanno sviluppato GvHD entro il giorno 28 (gruppo controllo no GvHD). Il livello mediano di PTX3 all'insorgenza della GvHD è risultato di 37 ng/ml (intervallo=11-847), significativamente più elevato (Wilcoxon p-value<0.0001) rispetto al gruppo dei pazienti no GvHD (livello mediano=14, intervallo=4-59 ng/ml). Per studiare il potenziale valore predittivo di PTX3 nei confronti della GvHD precoce, abbiamo inoltre calcolato i livelli della proteina al giorno 0, 7 e 14 dopo trapianto, normalizzandoli con quelli ottenuti prima del regime di condizionamento (livello basale). Tali valori sono stati comparati fra pazienti con insorgenza precoce della GvHD (entro il giorno 28) e pazienti del gruppo no GvHD. Abbiamo osservato che il regime di condizionamento provoca un aumento dei livelli di PTX3 rispetto al basale in entrambi i gruppi, senza differenze significative. Al contrario, al giorno 7 dopo trapianto i livelli mediani di PTX3 risultano aumentati in quei pazienti che sviluppano GvHD precoce (incremento normalizzato rispetto al basale=3) rispetto al gruppo no GvHD (incremento normalizzato rispetto al basale=1.48; Wilcoxon p-value=0.06). Tale trend di aumento viene mantenuto anche al giorno 14.

CONCLUSIONI: Questi risultati preliminari mostrano che PTX3 aumenta rapidamente nel plasma di pazienti con GvHD acuta, candidando questa molecola come fattore facilmente misurabile e potenzialmente utile per corroborare il monitoraggio clinico della patologia. Ulteriori studi sono necessari per chiarire il ruolo di PTX3 nella patogenesi della GvHD e per confermarne il potenziale utilizzo come biomarcatore predittivo in una coorte più ampia di pazienti.

P019

IL TRAPIANTO DI MIDOLLO IN PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA ANEMIA FALCIFORME NELLE VARIANTI ARABA E AFRICANA: EFFETTI DEL TRAPIANTO SUI PROCESSI DI ERITROPOIESI E DI APOPTOSI INTRAMIDOLLARE

A. Isgrò,¹ P. Sodani,¹ M. Marziali,¹ J. Gaziev,¹ D. Fraboni,² K. Paciaroni,¹ C. Gallucci,¹ L. Cardarelli,¹ M. Ribersani,¹ C. Alfieri,¹ G. De Angelis,¹ O.O. Akinyanju,³ T.T. Wakama,⁴ G. Lucarelli¹

¹Istituto Mediterraneo di Ematologia, Fondazione Policlinico Tor Vergata, Roma, Italy; ²Dipartimento Medicina di Laboratorio, Fondazione Policlinico Tor Vergata, Roma, Italy; ³Foundation, Sickle Cell Foundation, Lagos, Nigeria; ⁴Hospital, National Hospital, Abuja, Nigeria

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) rappresenta l'unica strategia terapeutica in grado di curare definitivamente i pazienti affetti da anemia falciforme, soprattutto se effettuato precocemente, prima dell'insorgenza di complicanze correlate alla patologia e di danno d'organo irreversibile. Riportiamo la nostra esperienza relativa a 34 trapianti di midollo da donatore familiare HLA-identico in pazienti pediatrici affetti da anemia falciforme SCA, nella variante araba (13 bambini arabi) e africana (21 pazienti nigeriani). Abbiamo inoltre analizzato le variazioni post trapianto delle popolazioni eritroidi midollari e dei meccanismi di apoptosi intramidollare.

METODI: Il primo gruppo era rappresentato da 13 pazienti arabi, affetti da anemia falciforme con età media di 12 anni (range 2-16), le cui complicanze prima del trapianto erano rappresentate da crisi vaso-occlusive (6 pazienti), sindrome toracica acuta (5 pazienti), osteonecrosi (1 paziente) e ictus emorragico (1 paziente). Tutti i pazienti stati sottoposti a trapianto di midollo da donatore HLA-identico con il seguente regime di condizionamento: Busulfano 14 mg/kg, Ciclofosfamide 200 mg/kg e ATG 10 mg/kg e profilassi per la GVHD con l'associazione di ciclosporina (CSA) e Methotrexate short-term. Tutti i pazienti erano trasfusione dipendenti prima del trapianto. Il secondo gruppo era rappresentato da 21 pazienti nigeriani con età media di 12 anni (range 2-17) e con quadri clinici eterogenei ma più severi rispetto al primo gruppo, caratterizzati da crisi dolorose frequenti (8 casi), spesso associate a acute chest syndrome (8 casi) o da complicanze neurologiche cerebrali conseguenti a stroke ischemico (4 casi). Un paziente mostrava solo leucocitosi pre-trapianto. I pazienti africani sono stati sottoposti a trapianto di midollo da donatore HLA-identico con lo stesso regime di condizionamento del primo gruppo, ma con la Fludarabina 30 mg/m²/die per 5 giorni in sostituzione dell'ATG. Per i pazienti SCA Nigeriani è stata adottata la stessa profilassi per la GVHD. Per analizzare l'effetto del trapianto di midollo sulle popolazioni eritroidi midollari e sui processi di apoptosi intramidollare, abbiamo studiato in citofluorimetria l'espressione dei recettori di apoptosi Fas (CD95+) e caspasi-3 sulle diverse sottopopolazione eritroidi. Utilizzando come marcatori l'espressione della molecola CD71 e come parametro dimensionale il FSC, abbiamo ottenuto tre principali popolazioni eritroidi, che abbiamo denominati eritroblasti A, B, C (Ery. A, Ery. B, Ery. C). Ery. A (CD71high FSChigh) rappresenta la popolazione eritroide basofila, Ery. B (CD71high FSClow) rappresenta la popolazione eritroide policromatofila, mentre Ery. C (CD71low FSClow) sono gli eritroblasti ortocromatici e i reticolociti.

RISULTATI: Tutti i pazienti arabi sono guariti e hanno mostrato un'attaccamento completo (100% donor) con una normalizzazione dei valori di Hb. Un paziente ha presentato una condizione di chimerismo misto (25% donor) stabile a 6 anni dal trapianto, ma con una prevalenza di eritrociti in circolo di derivazione del donatore (80% donor). Tutti i pazienti nigeriani hanno mostrato un attaccamento completo post trapianto (100% donor) e sono guariti. Un solo paziente è deceduto al gg + 73 post trapianto, ma per le complicanze emorragiche del posizionamento di un accesso venoso. La probabilità di sopravvivenza, la sopravvivenza libera da SCA, e la mortalità trapianto correlata sono stati il 97%, 97% e 3%, rispettivamente. A livello midollare abbiamo osservato un'espansione delle popolazioni eritroidi (Ery. A, Ery. B e Ery. C) probabilmente espressione di un processo eritropoietico essenziale per il mantenimento di una produzione costante di globuli rossi nei pazienti affetti da anemia falciforme. Dopo il trapianto abbiamo osservato una significativa riduzione di tutte le popolazioni eritroidi, in parallelo alla riduzione dell'espressione di Fas e un aumento iniziale della caspasi 3 sulla popolazione eritroide più matura (Ery. C), come riportato nei "normali" processi di maturazione eritroide.

CONCLUSIONI: Il trapianto di midollo rimane l'unico approccio

terapeutico potenzialmente curativo per il trattamento dell'anemia falciiforme. I risultati del trapianto sono positivi e i rischi connessi alla procedura ragionevolmente limitati. La sopravvivenza libera da malattia è oltre il 90% con un significativo miglioramento della qualità e dell'aspettativa di vita di questi pazienti. Dopo il trapianto, abbiamo osservato una "normalizzazione" delle popolazioni eritroidi e una significativa riduzione dei processi di apoptosi intramidollare, e ciò suggerisce una normalizzazione dell'eritropoiesi negli ex pazienti SCA. Pertanto riteniamo che il trapianto di midollo dovrebbe essere offerto a tutti i pazienti SCA se disponibile un donatore familiare HLA-identico e prima dell'insorgenza di complicanze e danni d'organo irreversibili.

P020

LA PRODUZIONE DI CHEMERINA DA PARTE DELLE CELLULE STROMALI MESENCHIMALI (MSC) È INFLUENZATA DALLE CONDIZIONI DI COLTURA

P. Vinci,¹ E. Dander,¹ S. Sozzani,² A. Biondi,¹ G. D'Amico¹

¹Centro di Ricerca "M. Tettamanti", Clinica Pediatrica, Ospedale San Gerardo, Università degli studi di Milano-Bicocca, Monza;

²Dipartimento di Patologia Generale e Immunologia, Università degli Studi di Brescia, Brescia, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Negli ultimi anni è emerso come l'utilizzo delle MSC rappresenti un valido strumento terapeutico per il trattamento delle forme gravi di Graft versus Host Disease. Ad oggi però, nonostante il loro ampio utilizzo clinico, il meccanismo d'azione con cui queste cellule esplicano la loro azione anti-infiammatoria non è noto. Emerge quindi la necessità di identificare nuove molecole che possono essere coinvolte nell'attività immunoregolatoria delle MSC. Chemerina è una proteina ad attività chemiotattica coinvolta sia nell'insorgenza che nella risoluzione del processo di infiammazione. Viene secreta in forma inattiva, Prochemerina, e successivamente attivata attraverso il taglio proteolitico degli ultimi 6 aminoacidi in corrispondenza del dominio C terminale. In questa forma è in grado di legarsi a tre diversi recettori accoppiati a proteine G chiamati ChemR23, CCRL2 e GPR1. Scopo del lavoro è quindi valutare la capacità delle MSC di produrre chemerina in differenti condizioni di coltura e comprenderne il ruolo nella loro attività immunoregolatoria.

METODI: Le MSC sono state coltivate in DMEM a basso contenuto di glucosio in presenza del 5% di lisato piastrinico (PL-MSC, n=10) o del 10% di siero fetale bovino (FBS-MSC, n=10). Al raggiungimento di una confluenza pari a circa l'80%, sia le PL-MSC che le FBS-MSC sono state coltivate per 72 ore con DMEM 2% FBS in presenza o in assenza di stimoli infiammatori (IL-6+IL-1 β +TNF α). La produzione di Chemerina è stata valutata nel terreno di coltura delle cellule mediante ELISA, mentre l'espressione dei recettori ChemR23, CCRL2 e GPR1 è stata valutata tramite RT PCR. Inoltre, al fine di comprendere se le MSC producono la forma attiva di Chemerina, è stata valutata tramite saggio Western Blot la produzione di diverse serine proteasi che convertono in modo specifico Pro-chemerina in Chemerina.

RISULTATI: Le FBS-MSC sono in grado di produrre Chemerina in condizioni basali (media=29, intervallo=15-46 pg/ml). Dopo stimolazione con citochine infiammatorie la sua produzione aumenta (media=223, intervallo= 23-1013 pg/ml). È stato in particolare osservato che le PL-MSC, utilizzate presso il nostro centro per il trattamento di pazienti affetti da GvHD severa steroide-resistente, producono una maggiore quantità di Chemerina sia in condizioni basali (media=316, intervallo=15-1526 pg/ml) che dopo stimolazione con citochine infiammatorie (mean=3566 range=794-9876 pg/ml). Abbiamo inoltre osservato che sia le PL-MSC che le FBS-MSC non esprimono i recettori ChemR23 e CCRL2, altamente espressi sulla membrana delle cellule dendritiche immature. Al contrario, sia le FBS-MSC che le PL-MSC esprimono il recettore GPR1 con un indice di espressione 16 volte maggiore rispetto alle cellule mononucleate del sangue periferico utilizzate come controllo negativo (rispettivamente media 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}=16,34, intervallo=15,10-17,11 e media 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}=16,26, intervallo=15,10-18,08, n=3). In particolare la stimolazione per 24 ore con IFN γ provoca un aumento dell'espressione di GPR1 da parte sia delle PL-MSC che delle FBS-MSC. È interessante notare come la stimolazione combinata di IFN γ e TNF α provoca una diminuzione di espressione di GPR1. L'analisi dei surmatanti al Western Blot mostra inoltre che le MSC producono tPA (attivatore tissutale del plasminogeno) e Neutrophil Elastase, due serine proteasi capaci di convertire Chemerina nella sua forma attiva.

CONCLUSIONI: In questo lavoro è stato quindi dimostrato che le MSC producono Chemerina in condizioni di coltura basali e che l'in-

fiammazione ne aumenta la produzione. È stato inoltre osservato che la concentrazione di questa proteina è influenzata dal protocollo di coltura utilizzato per coltivare le MSC. Inoltre, le MSC esprimono il recettore GPR1, la cui espressione è modulata dalla stimolazione con citochine infiammatorie e producono due serine proteasi, tPA e Neutrophil Elastase, capaci di convertire Chemerina nella sua forma attiva. Ulteriori studi sono necessari al fine di comprendere il ruolo di chemerina nell'attività immunoregolatoria delle MSC.

P021

STUDIO PROSPETTICO SUL VALORE PREDITTIVO DI CARICA VIRALE DI BK PER CISTITE EMORRAGICA IN PAZIENTI PEDIATRICI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO ALLOGENICO DI CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE

S. Cesaro,¹ G. Tridello,¹ M. Pillon,² E. Calore,² M. Tumino,² N. Carucci,² S. Varotto,² L. Barzon,³ C. Messina²

¹Oncematologia Pediatrica, Policlinico G.B. Rossi, Verona;

²Oncematologia Pediatrica; ³Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera, Università degli Studi di Padova, Padova, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Valutare il valore predittivo della carica virale del BK virus (BKV) su sangue per la comparsa di cistite emorragica (CE) nei primi 100 giorni post trapianto di cellule staminali ematopoietiche (TCSE).

METODI: Da aprile 2005 a dicembre 2011, i pazienti con età inferiore a 18 anni, sottoposti a primo TCSE allogenico, sono stati monitorati ogni settimana, fino al giorno +100, mediante la determinazione del valore quantitativo PCR di BKV. Per valutare la predittività di CE nei giorni +30, +45, +60 e +100, è stato analizzato il massimo valore di BK riscontrato fino alle 2 settimane precedenti tali periodi. Mediante la curva ROC, è stato ricercato il valore di massima sensibilità, considerando una specificità minima di 80%. I dati sono stati aggiornati a giugno 2012.

RISULTATI: 107 pazienti, 66 maschi (62%) e 41 femmine (38%), con un'età mediana al TCSE di 7,7 anni (range 0,7-17,3), sono stati arruolati. La diagnosi era di leucemia o linfoma in 82 pazienti (77%), di tumore solido in 1 (1%) e di malattia non maligna in 24 (22%). Il donatore era identico correlato in 32 (30%) casi, identico non correlato in 32 (30%) e non identico non correlato in 43 (40%). La fonte di cellule staminali era midollo in 73 (68%) casi, sangue periferico in 13 (12%) e cordone in 21 (20%). Il regime di condizionamento includeva l'irradiazione corporea totale in 43 casi (40%). Ad un tempo mediano dal TCSE di 25 giorni, range 7-98, 20 pazienti hanno sviluppato CE di grado II-IV, con un'incidenza cumulativa a 100 giorni di 19,2% (95% CI 13-29). Il 90% dei pazienti ha sviluppato sintomi: disuria e stranguria (83%), pollachiuria (72%) e dolore addominale (67%). La durata mediana della microematuria era di 13 giorni (range 2-71). Il BK virus era positivo su sangue nel 75% dei pazienti (15), con un valore mediano di 14151 copie/ml (range 7,661- 3,159,500). Dato che la maggior parte degli episodi di CE si è manifestata intorno al giorno +30, è stato possibile analizzare la curva ROC solo in questo periodo. Un valore di carica virale pari a 1023 copie/ml ha raggiunto una sensibilità del 100%, una specificità dell'86%, un valore predittivo positivo e negativo del 39% e del 100%, rispettivamente. Ad un tempo mediano dal TCSE di 3 anni, la sopravvivenza totale era del 69% (CI 58-77). Si sono verificati 32 decessi, 13 per progressione di malattia e 19 per cause legate al trapianto; 3 pazienti sono deceduti con emorragia, ma nessuno di questi aveva sviluppato CE.

CONCLUSIONI: Un valore di carica virale di BK pari a 1023 copie/ml ha raggiunto massima sensibilità e una buona specificità per predire lo sviluppo di CE al giorno +30. Il basso valore predittivo positivo è in accordo con la patogenesi multifattoriale della CE.

P022

STUDIO DI PTX3 COME MARCATORE DI GvHD E ANALISI DEL SUO POTENZIALE RUOLO NELLA PATOGENESI DELLA MALATTIA IN UN MODELLO MURINO DI TRAPIANTO ALLOGENICO

C. Cappuzzello,¹ E. Dander,¹ P. Vinci,¹ C. Garlanda,² A. Mantovani,² A. Rovelli,³ A. Biondi,⁴ G. D'Amico¹

¹Centro Ricerca "M. Tettamanti", Clinica Pediatrica, Università Milano-Bicocca, Monza (MB); ²Dipartimento di Immunologia e Infiammazione, Istituto Clinico Humanitas, Milano; ³Clinica

Pediatrica, Ospedale San Gerardo, Università Milano-Bicocca, Monza (MB); ⁴Centro Ricerca "M. Tettamanti", Clinica Pediatrica, Ospedale San Gerardo, Università Milano-Bicocca, Monza (MB), Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) rappresenta il trattamento d'elezione per diverse patologie tumorali e non. La malattia del trapianto verso l'ospite (GvHD), rappresenta tutt'ora una complicanza che ne limita la sua più ampia applicazione. La maggiore speranza per l'avanzamento in questo campo è rappresentata dallo sviluppo di trattamenti innovativi per la cura della GvHD, ottenibile attraverso una migliore comprensione delle basi patogenetiche della malattia ed attraverso l'identificazione di nuovi marcatori di malattia, facilmente misurabili, capaci di predirne l'insorgenza. La pentraxina lunga di tipo 3 (PTX3) è una proteina di fase acuta prodotta localmente a seguito di stimoli pro-infiammatori, che gioca un ruolo non ridondante nella modulazione dell'immunità innata e dell'infiammazione. Il suo rapido aumento in patologie a base infiammatoria e la correlazione fra i suoi livelli e la severità determinata in diverse patologie autoimmuni, ne suggeriscono il potenziale utilizzo come marcatore di GvHD. Scopo del nostro studio è stato quello di valutare il ruolo di PTX3 nella patogenesi e progressione della GvHD ed il suo potenziale utilizzo come marcatore di malattia, mediante l'utilizzo di un modello murino di GvHD in seguito a trapianto allogenico realizzato in topi wild type (WT) e mancanti di PTX3 (PTX3 KO).

METODI: Topi C57BL/6 WT e topi C57BL/6 PTX3 KO sono stati sottoposti a regime di condizionamento mediante irradiazione mieloablativa e trapiantati con cellule di midollo e splenociti, derivati da topi donatori del ceppo Balb-c (trapianto allogenico) o del ceppo C57BL/6 WT (controllo singenico). I topi recipienti del trapianto, sono stati poi monitorati nel tempo per valutare le manifestazioni cliniche di GvHD e la sopravvivenza. Inoltre gli animali trapiantati sono stati sottoposti a prelievo di sangue venoso fino al giorno +22 dal trapianto. La concentrazione plasmatica di PTX3 è stata valutata mediante saggi ELISA.

RISULTATI: I livelli plasmatici di PTX3, risultano prima del regime di condizionamento pari a 43,36 pg/ml (es=4,17, n=6) ed aumentano significativamente (Student T-test<0,001) a seguito dell'irradiazione fino a 348,21 pg/ml (es=30,32, n=6). Di rilievo, successivamente al trapianto, i livelli plasmatici di PTX3 diminuiscono nel gruppo di controllo (topi singenici), mentre rimangono elevati nei topi che hanno ricevuto il trapianto allogenico. In particolare al giorno +6, quando le prime manifestazioni della GvHD diventano osservabili clinicamente, il livello medio di PTX3 nei topi trapiantati in allogenico risulta pari a 347,71 ng/ml (es=46,29, n=6), significativamente più elevato rispetto ai topi trapiantati singenicamente (livello medio di PTX3=188.64 ng/ml, es=40,73, n=6). È molto importante sottolineare che il livello plasmatico medio di PTX3 risulta più elevato nel gruppo allogenico rispetto a quello di controllo anche prima delle manifestazioni cliniche della GvHD (PTX3 al giorno +4=329 ±28,12 ng/ml vs 156.51 ±9,37 ng/ml). Il monitoraggio della GvHD, in topi PTX3 KO trapiantati allogenicamente, ha mostrato, al giorno +70, un tasso di sopravvivenza paragonabile ai topi WT, con il 75% di animali ancora vivi in entrambi i gruppi. Nessuna differenza è stata osservata anche considerando la variazione di peso media nei due gruppi. Al contrario, lo score clinico complessivo di GvHD è risultato più elevato nei topi PTX3 KO e questo aumento è diventato maggiormente evidente dopo il giorno +50. Interessante, dall'osservazione dei singoli parametri clinici della GvHD, risulta che lo stato di salute della cute e della pelliccia dei topi PTX3 KO è peggiore rispetto a quello dei topi WT.

CONCLUSIONI: I risultati preliminari di questo studio indicano che i livelli plasmatici di PTX3 aumentano rapidamente e fortemente dopo il trapianto allogenico all'insorgenza della GvHD supportando il potenziale utilizzo di PTX3 come marcatore di malattia. Inoltre tale proteina risulta incrementata in maniera significativa nel plasma dei topi trapiantati allogenicamente rispetto ai controlli singenici già prima della manifestazione dei sintomi della GvHD, indicando dunque un potenziale ruolo predittivo di PTX3. Inoltre i dati preliminari ottenuti dal modello di GvHD in topi PTX3 KO sembrano indicare un potenziale ruolo della proteina oltre che come marcatore anche nella patogenesi della GvHD. Ulteriori studi sono necessari allo scopo di indagare il possibile ruolo di PTX3 nel controllo dell'insorgenza/progressione della GvHD nelle diverse sedi interessate dalla patologia e per verificarne il potenziale utilizzo quale innovativo bersaglio terapeutico.

P023

LA LINFOFOTOAFERESI EXTRACORPOREA NEL TRATTAMENTO DELLA GRAFT VERSUS HOST DISEASE: 11 ANNI DI ESPERIENZA PEDIATRICA MONOCENTRICA

S. Giardino,¹ M. Faraci,¹ G. Morreale,¹ F. Bagnasco,¹ G. Dini,¹ M. Riso,² M. Montera,² P. Terranova,¹ D. Di Martino,¹ P. Toselli,² A. Arleo,² P. Messina,² L. Tenerini,² E. Lanino¹

¹Unità di Trapianto di Cellule Staminali Emopoietiche, Area di Aggregazione Dipartimentale di Emato-Oncologia Pediatrica;

²Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, Istituto Giannina Gaslini, Genova, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La linfo-fotoafesi extracorporea (FEC) rappresenta una opzione terapeutica di provata efficacia e sicurezza nel trattamento della Graft versus Host Disease acuta e cronica (a-GvHD/ c-GvHD). Molteplici sono i report pubblicati relativi al suo impiego sia in età adulta che pediatrica, ma allo stato attuale mancano le definizioni di eventuali fattori prognostici in grado di predire la risposta alla FEC. La seguente analisi retrospettiva condotta su una casistica di pazienti in età pediatrica sottoposti a Trapianto di Cellule Staminali Emopoietiche (TCSE) allogenico in 11 anni di attività dell'Unità di TCSE dell'Istituto Giannina Gaslini di Genova ha come obiettivo l'identificazione di fattori prognostici predittivi della risposta della GvHD alla FEC, in grado di essere utilizzati dal clinico nella scelta di introdurre la FEC nel trattamento della GvHD e nell'identificare, in corso di FEC, quei pazienti che, per caratteristiche di risposta, possono necessitare di terapie aggiuntive.

METODI: Nel periodo compreso tra il 2000 e il 2010, presso l'Unità di TCSE dell'Istituto Giannina Gaslini sono stati osservati 160 TCSE allogenici eseguiti per patologie oncologiche (70.6%) e non oncologiche (29.4%) che hanno sviluppato GvHD. Nel 51.2% dei casi si trattava di una acuta (a-GvHD), nel 6.3% dei casi cronica (c-GvHD) de novo, mentre nel 42.5% dei casi si trattava di forme acute che successivamente sono evolute in una forma cronica, di tipo classico o overlap. Sono state considerate eleggibili a ricevere la FEC le GvHD acute o croniche resistenti alla prima linea di trattamento (steroidi) o ad ulteriori linee terapeutiche e tutte le GvHD che, nonostante la risposta alla prima linea di trattamento, recidivavano alla riduzione dello steroide. Nel primo caso l'obiettivo era ottenere la remissione (parziale o completa) della GvHD, nel secondo era mantenere la risposta ottenuta consentendo la riduzione della dose di steroide. Criterio di esclusione per ricevere la FEC erano le condizioni cliniche generali compromesse giudicate incompatibili con l'impegno richiesto per la procedura. La FEC stata utilizzata in 46 casi (28.8%): in 36 per a-GvHD (grado I-II=13; grado III-IV=23) e in 10 per la c-GvHD (limitata=2; estensiva=8). Gli organi coinvolti dalla a-GvHD erano: la cute in 26 casi, il tratto gastroenterico in 18 e il fegato in 10. Lo schema di trattamento prevedeva una fase di induzione (2 procedure FEC settimanali per un totale di almeno 16) e una fase di mantenimento (2 procedure ogni 2 settimane per un totale di almeno 8), la cui durata rispettiva era variabile in base alla risposta clinica osservata in ciascuno degli organi coinvolti. La FEC è stata eseguita in tutti i casi con il metodo definito "discontinuo", per il quale si utilizza un separatore cellulare (COBE SPEC-TRA™) per ottenere le cellule mononucleate dal sangue periferico del paziente, che vengono successivamente addizionate con 8-metossi-psoralene (8-MOP) e irradiate con raggi UVA, per poi essere reinfuse al letto del paziente.

RISULTATI: Al momento dell'analisi il follow-up mediano era di 3.5 anni (0.1-12.1). Nel gruppo di a-GvHD, la risposta positiva complessiva (overall response - OR) è stata osservata nel 75% dei casi, completa (RC) nel 61.1% e parziale (RP) nel 13.9% dei casi. L'OR, osservata nel 85.2% dei casi di a-GvHD cutanea, nel 77.8% di a-GvHD gastrointestinale e nel 50% dei casi di a-GvHD epatica, è stata ottenuta dopo un numero mediano rispettivamente di 7 (2 - 23), 6.5 (3 - 21) e 6 (3 - 23) procedure FEC eseguite. Nel gruppo di c-GvHD, l'OR è stata osservata nel 70% dei casi (RC nel 20%, RP nel 50% dei casi) dopo un numero mediano di procedure FEC pari a 18 (8 - 36). L'analisi bi-variatrice condotta nel gruppo di a-GvHD ha rivelato come unici fattori di rischio associati a scarsa risposta all'ECP: il grado severo di GvHD (III - IV) (p=0.016), un numero di organi coinvolti ≥2 (p=0.042) e le forme di a-GvHD resistenti allo steroide (p=0.02). La riduzione della dose di steroide assunta dai pazienti eseguita entro i primi 30 giorni dall'inizio della FEC è risultata essere correlata alla risposta positiva alla FEC (p=0.021). L'analisi multivariata ha confermato la relazione tra le caratteristiche di steroido-resistenza della GvHD e la scarsa risposta alla

FEC ($p=0.012$) e ha mostrato come il tasso di risposta alla FEC non si modifichi al crescere del numero di procedure erogate ($p=0.001$). Nel gruppo della a-GvHD, la sopravvivenza complessiva a 5 anni è stata del 63.2% (40.1–79.4; IC 95%), più alta nel gruppo responsivo alla FEC (70.4% vs 41.7%, $p=0.022$). La riduzione della dose di steroide eseguita entro i primi 30 giorni è risultata essere l'unico fattore significativamente correlato alla sopravvivenza ($p=0.007$). Nel gruppo della c-GvHD, la sopravvivenza a 3 anni è stata del 78.8% (38.1–94.3; IC 95%), più alta nel gruppo responsivo alla FEC (85.7% vs 66.7%).

DISCUSSIONE: I risultati di tale analisi confermano il ruolo terapeutico della FEC nella gestione della GvHD sia acuta che cronica. Sebbene le maggiori risposte siano state osservate nella localizzazione cutanea della a-GvHD, la risposta complessiva è risultata soddisfacente anche nei casi a coinvolgimento viscerale, nei quali l'indicazione alla FEC, compatibilmente allo stato clinico generale, è confermata. La relazione emersa tra il grado severo (III-IV), la caratteristica di steroido-resistenza della a-GvHD e la scarsa risposta alla FEC suggerisce in presenza di tali caratteristiche l'eventuale associazione della FEC con altre terapie di seconda linea. Nella nostra casistica la risposta alla FEC, nei casi in cui è stata ottenuta, si è verificata nel corso del primo mese di trattamento intensivo nel caso della a-GvHD (entro le prime 7 procedure), più tardivamente nella c-GvHD (entro le prime 18 procedure), indicando tali numeri di procedure come potenziale soglia oltre la quale è opportuno considerare ulteriori terapie di seconda linea in caso di risposta assente o non soddisfacente. La riduzione della dose di steroide somministrata al paziente nel corso dei primi 30 giorni dall'inizio della FEC rappresenta l'unica variabile correlata alla risposta alla FEC stessa e alla sopravvivenza del paziente e come tale rappresenta un dato utilizzabile come parametro per considerare o escludere ulteriori provvedimenti terapeutici aggiuntivi.

Bibliografia:

- Greinix HT, Knobler RM, Worel N, Schneider B, Schneeberger A, Hoecker P, Mitterbauer M, Rabitsch W, Schulenburg A, Kalhs P. The effect of intensified extracorporeal photochemotherapy on long-term survival in patients with severe acute graft-versus-host disease. *Haematologica* 2006 Mar;91(3):405-8
- Perotti C, Del Fante C, Tinelli C, Viarengo G, Scudeller L, Zecca M, Locatelli F, Salvaneschi L. Extracorporeal photochemotherapy in graft-versus-host disease: a longitudinal study on factors influencing the response and survival in pediatric patients. *Transfusion* 2010 Jun;50(6):1359-69. Epub 2010 Jan 22
- Greinix HT, Socié G, Bacigalupo A, Holler E, Edinger MG, Apperley JF, Schwarz T, Ullrich SE, Albert ML, Knobler RM, Peritt D, Ferrara JL. Assessing the potential role of photopheresis in hematopoietic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant* 2006 Aug;38(4):265-73
- Foss FM, DiVenuti GM, Chin K, Sprague K, Grodman H, Klein A, Chan G, Stiffler K, Miller KB. Prospective study of extracorporeal photopheresis in steroid-refractory or steroid-resistant extensive chronic graft-versus-host disease: analysis of response and survival incorporating prognostic factors. *Bone Marrow Transplant*. 2005 Jun;35(12):1187-93
- Messina C, Locatelli F, Lanino E, Uderzo C, Zacchello G, Cesaro S, Pillon M, Perotti C, Del Fante C, Faraci M, Rivabella L, Calore E, De Stefano P, Zecca M, Giorgiani G, Brugiolo A, Balduzzi A, Dini G, Zanesco L, Dall'Amico R. Extracorporeal photochemotherapy for paediatric patients with graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2003 Jul;122(1):118-27
- Flowers ME, Apperley JF, van Besien K, Elmaagacli A, Grigg A, Reddy V, Bacigalupo A, Kolb HJ, Bouzas L, Michallet M, Prince HM, Knobler R, Parenti D, Gallo J, Greinix HT. A multicenter prospective phase 2 randomized study of extracorporeal photopheresis for treatment of chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2008 Oct 1;112(7):2667-74. Epub 2008 Jul 11
- Kanold J, Messina C, Halle P, Locatelli F, Lanino E, Cesaro S, Deméocq F. Paediatric Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Update on extracorporeal photochemotherapy for graft-versus-host disease treatment. *Bone Marrow Transplant* 2005;35 Suppl1:S69-71
- Foss FM, Di Venuti GM, Chin K, Sprague K, Grodman H, Klein A, Chan G, Stiffler K, Miller KB. Prospective study of extracorporeal photopheresis in steroid-refractory or steroid-resistant extensive chronic graft-versus-host disease: analysis of response and survival incorporating prognostic factors. *Bone Marrow Transplant*. 2005 Jun;35(12):1187-93

Kanold J, Merlin E, Halle P, Paillard C, Marabelle A, Rapatel C, Evrard B, Berger C, Stephan JL, Galambrun C, Pigué C, D'Incan M, Bordigoni P, Deméocq F. Photopheresis in pediatric graft-versus-host disease after allogeneic marrow transplantation: clinical practice guidelines based on field experience and review of the literature. *Transfusion*. 2007 Dec;47(12):2276-89. Epub 2007 Aug 30

Salvaneschi L, Perotti C, Zecca M, Bernuzzi S, Viarengo G, Giorgiani G, Del Fante C, Bergamaschi P, Maccario R, Pession A, Locatelli F. Extracorporeal photochemotherapy for treatment of acute and chronic GVHD in childhood. *Transfusion* 2001;41:1299-305.

P024

RUOLO E FUNZIONI DELLO PSICOLOGO IN UN CENTRO TRAPIANTI CELLULE STAMINALI

M. Bertolotti,¹ T. Geuna,¹ S. Bellini,¹ E. Rocca,¹ C. Peirola,¹ E. Vassallo²

¹Psiconcologia; ²SC Oncoematologia Pediatrica e Centro Trapianti, Azienda Ospedaliera Città della Salute e della Scienza, Torino Presidio OIRM, Torino, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il trapianto di cellule staminali emopoietiche viene vissuto in età evolutiva, dai pazienti e dai loro familiari, con intensa ansia, ma anche con enorme speranza, in quanto procedura medica avanzata da un punto di vista scientifico, in grado di rappresentare un'ulteriore possibilità di cura per molte malattie oncematologiche e l'unica possibilità di guarigione per alcune patologie ematologiche non oncologiche. Tuttavia esso non è privo di complicanze anche importanti che possono mettere a rischio la vita del paziente. Essendo praticato in condizioni di stretto isolamento per un lungo periodo di cure intensive, comporta una radicale modificazione del normale assetto di vita della famiglia, a causa della separazione prolungata dei membri. Il bambino, fisicamente sofferente soprattutto nel periodo di aplasia post-trapianto, ha come interlocutore privilegiato prevalentemente un solo genitore (l'altro genitore ha accesso nel centro per due ore serali). L'equipe multidisciplinare operante presso la Struttura Complessa di Oncoematologia Pediatrica e Centro Trapianti di Torino ha ritenuto utile avviare un'esperienza che prevede la presenza giornaliera dello psicologo nel Centro e non solo su chiamata come avveniva in precedenza. Tale continuità ha l'obiettivo sia di una presa in carico più modulata delle diverse criticità psicologiche, sia di creare uno spazio di riflessione all'interno dell'equipe multidisciplinare, utile per individuare la miglior possibilità di aiuto per il paziente e la sua famiglia.

METODI: Le modalità di intervento sul paziente e sui familiari sono le seguenti: 1) "colloquio iniziale di presentazione" del Servizio di Psiconcologia (nel caso di bambini/adolescenti non conosciuti precedentemente dall'equipe); 2) "colloqui di sostegno" (nel caso di pazienti e genitori già in carico alla psiconcologia viene assicurata la continuità terapeutica con la psicologa che già segue il caso); 3) "osservazione partecipata" genitore/bambino nei nuclei familiari con bambini sotto i cinque anni; 4) "maternage" nelle situazioni con particolari criticità, valutate dalla psicologa o segnalate dall'equipe, qualora non vi sia la compliance per effettuare dei colloqui di sostegno. La modalità di intervento sull'equipe curante che ha in carico il paziente si realizza mediante la presenza quotidiana alla riunione con medici ed infermieri del Centro al fine di discutere gli aspetti emotivi e relazionali relativi al caso, in integrazione all'iter terapeutico.

RISULTATI: Nei pazienti che hanno accettato i "colloqui di sostegno" è emerso come le sedute abbiano contenuto l'angoscia che caratterizza la permanenza in un luogo sentito come chiuso, isolato e pericoloso. I colloqui hanno aiutato a tollerare i cambiamenti che la malattia comporta sia a livello corporeo sia a livello intrapsichico e sociale. In questi interventi, risulta importante porre l'attenzione sugli avvenimenti esterni della vita del paziente per non negare che ansia e depressione siano legate alla situazione di malattia, alla separazione da casa e dal contesto sociale e al cambiamento dei ritmi di vita. Nel far ciò sembra comunque essenziale riuscire a fermarsi sulla tonalità affettiva del paziente, mantenendo vivo il desiderio di capire (la funzione K di Bion) e di tollerare la frustrazione di non sapere, di incontrare il dolore e una vasta gamma di emozioni primitive e non elaborate. Il lavoro che si intraprende in questi interventi, anche se limitato nel tempo, è già sostenibile e in alcuni casi può configurarsi come punto di partenza di un progetto terapeutico più a lungo termine. Nei nuclei familiari in cui è avvenuta l'"osservazione partecipata" si esperisce un clima emotivo molto intenso, la cui peculiarità è l'incertezza: l'impatto è molto forte, si sperimenta il sentimento di essere invasi, e di mettersi all'affannosa

ricerca di qualcosa da fare, da dire e da dare. Solo l'elaborazione controtransferale di questo dolore origina uno stato di reverie che può venire in soccorso del genitore la cui capacità di contenimento è temporaneamente bloccata. Per questi genitori è preziosa l'esperienza di un ascolto attento, di una porta aperta in cui la momentanea disorganizzazione che la malattia crea possa essere occasione di modifiche e trasformazioni nel loro rapporto con il bambino. Dalle nostre osservazioni è stato evidenziato come gli incontri hanno permesso di aumentare la compliance rispetto alle procedure mediche e infermieristiche, soprattutto nelle famiglie straniere. Nei casi in cui si è adottato il "maternage" si è evidenziato l'importante ruolo di "ponte" svolto dalla psicologa tra il paziente e l'equipe curante. Il maternage offre un contenitore che "non si rompe" e costituisce una funzione estremamente importante di condivisione per il paziente. In tali situazioni la presenza assidua (anche tutti i giorni), attenta e non giudicante, permette a giovani pazienti ricoverati (dai sei/otto anni in su) di sperimentare un contenimento dell'ansia del vuoto e della separazione che spesso il lungo periodo di isolamento fa emergere. Infine, la partecipazione della psicologa alle "riunioni d'equipe" garantisce la presa in carico degli aspetti emotivi, oltre che fisici del paziente e della famiglia e permette di esaminare le criticità emotive ed assistenziali medico-infermieristiche che eventualmente possono emergere. In alcune situazioni in cui le competenze genitoriali erano risultate fragili, la possibilità di parlare in gruppo anche degli aspetti emotivi e relazionali ha permesso di passare da un iniziale atteggiamento "giudicante" ad un atteggiamento maggiormente sostenente da parte di tutta l'equipe. Dal lavoro è emerso anche come l'isolamento e la stretta convivenza possono portare i pazienti e i genitori a intrecciare relazioni paritarie e eccessivamente familiari con gli operatori, compromettendo l'imprescindibile differenziazione reciproca.

CONCLUSIONI: Nel lavoro qui presentato si è cercato di delineare la complessità che accompagna il trapianto di Cellule Staminali e l'accavallarsi di criticità mediche ed emotive che il paziente e la sua famiglia si trovano a vivere. Una prima considerazione riguarda l'esperienza particolarmente delicata che segna profondamente l'assetto emotivo dei pazienti e del nucleo familiare durante il periodo di isolamento. Il bambino può entrare in uno stato di apatia (apparendo ritirato e inaccessibile) oppure di intolleranza e rifiuto, soprattutto nei confronti del genitore presente e degli operatori sanitari; per tale ragione è importante offrire un setting flessibile attraverso una presenza costante ma non intrusiva. Inoltre si possono manifestare crisi di angoscia e di depersonalizzazione, che devono transitoriamente essere trattate con farmaci. Il genitore in assistenza (più spesso la madre) già carico di incertezze e timori, vive l'isolamento con sentimenti di profonda solitudine che possono acuire fantasie di colpa, accrescere le ansie non solo rispetto all'andamento, ma anche rispetto alla tipologia del trapianto (cellule staminali da midollo osseo, da sangue periferico o da cordone) e all'impossibilità di poter scegliere altre alternative di cura. Tutti questi vissuti rendono inoltre insopportabile la percezione di momenti di rifiuto, rabbia e di insofferenza che possono normalmente insorgere nei confronti del proprio figlio. Ne consegue la tendenza a sviluppare un rapporto quasi fusionale con il bambino, soprattutto quando è molto piccolo, sotto i cinque anni, o nei nuclei stranieri che arrivano in Italia solo per il trapianto. In tali circostanze si è notato come inserire l'osservazione partecipata sia stato utile per favorire la separazione e la differenziazione della coppia genitore bambino. Una seconda considerazione, scaturita da questa esperienza triennale, riguarda il tentativo di dare una risposta il più appropriata possibile rispetto al bisogno di un aiuto psicologico, reale o percepito dall'equipe, mantenendo un equilibrio tra un contesto ambientale difficile e il setting psicologico. Si parla di bisogno reale o percepito in quanto non sempre i due termini coincidono: è reale in quanto le angosce di morte che circolano tra pazienti, genitori e curanti sono più reali che fantasmatiche; è percepito dall'equipe in quanto non sempre tale bisogno è davvero avvertito dal paziente o dalla sua famiglia, ma unicamente dallo staff multidisciplinare. In alcuni casi la domanda di aiuto proviene dal paziente stesso o da uno dei due genitori, in molti altri casi è l'equipe curante che legge un bisogno non ancora esplicitato o compreso. Nell'uno e nell'altro caso bisogna distinguere (all'interno di un continuum che va da un normale e fisiologico sentimento di ansia contenuta fino ad una profonda angoscia non tollerabile) dove si colloca la necessità di intervento. La possibilità di condivisione può aiutare ad alleviare la sofferenza mentale, ma non può farla scomparire del tutto. È fondamentale l'accettazione di questo limite altrimenti si cerca inutilmente, così come si controlla farmacologicamente il dolore fisico, una "medicina" per il dolore mentale. Il quotidiano spazio di riflessione all'interno dell'equipe multidisciplinare è utile per individuare la miglior possibilità di aiuto per il paziente e in alcuni casi per ridimensionare l'aspettativa di una "medicina mentale magica".

Bibliografia:

- Alvarez A. e al. (1994), *Un buon incontro. La valutazione secondo il modello Tavistock*. Casa Editrice Astrolabio, Roma 1994.
- Bertolotti M. e al. (2010), *Modello di intervento in oncematologia pediatrica* in Giornale Italiano di Psico-Oncologia, Vol. 12, Luglio-Dicembre 2010.
- Massaglia P. e Bertolotti M (1998), *Psicologia e gestione del bambino portatore di tumore e della sua famiglia*, in Saccomani R. (a cura di), *Tutti Bravi*, Raffaello Cortina Editore, Milano 1998.
- Pozzi M.E. (2003), *I disagi dei bambini da 0 a 5 anni*. Bruno Mondadori Editore, Milano 2004.
- Sourkes B. (1995), *Il tempo tra le braccia*. Raffaello Cortina Editore, Milano 1999.
- Vallino D. (2009), *Fare Psicoanalisi con Genitori e Bambini*. Borla, Roma 2009.

P025

CARATTERIZZAZIONE DEL MICROBIOTA INTESTINALE IN PAZIENTI PEDIATRICI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO ALLOGENICO DI CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE

C. Nastasi,¹ E. Biagi,² M. Candela,² D. Zama,¹ R. Masetti,¹ P. Brigidi,² A. Pession¹

¹Unità di Oncologia e Ematologia Pediatrica "Lalla Seràgnoli", Ospedale S. Orsola-Malpighi, Università di Bologna, Bologna;

²Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie, Università di Bologna, Bologna, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il TCSE allogeneico è una procedura potenzialmente curativa per un ampio gruppo di patologie di interesse pediatrico oncologiche e non-oncologiche. Le principali complicanze che limitano l'utilizzo di questa procedura sono la malattia acuta da trapianto contro l'ospite (GVHD) e le infezioni. È stato recentemente dimostrato che il sistema immunitario, sia innato che adattivo, è profondamente influenzato, dall'interazione con i trilioni di microbi che vivono tratto gastrointestinale (microbiota intestinale [MI])¹. Alla luce di queste evidenze, abbiamo studiato nei bambini sottoposti a TCSE allogeneico i cambiamenti quantitativi e qualitativi del MI per valutare la correlazione tra questi cambiamenti e la frequenza e la severità delle principali complicanze del TCSE.

METODI: Sono stati arruolati i pazienti pediatrici candidati a TCSE allogeneico presso l'Unità Trapianto dell'Oncematologia Pediatrica dell'Ospedale S. Orsola - Malpighi di Bologna. Per ogni paziente sono stati raccolti campioni ematici e fecali con la seguente tempistica: pre-TCSE successivamente valutazioni seriate ogni 10-15 giorni per un periodo di monitoraggio complessivo di cento giorni dopo il TCSE. La caratterizzazione del MI è stata ottenuta mediante HTF-MicroBi.Array, una tecnica validata capace distinguere rapidamente i principali sottogruppi che compongono la struttura del MI intestinale mediante la rilevazione del gene del 16S rRNA.

RISULTATI: Sono stati arruolati 7 pazienti le cui caratteristiche cliniche e trapiantologiche sono riassunte in Tabella 1. La struttura del MI pre-TCSE non è dissimile dalla struttura tipicamente osservata in bambini sani e caratterizzata da un profilo dominato per circa l'80% da Firmicutes e Bacteroidetes (Figura 1).² Il TCSE rivoluziona profondamente la struttura del MI, che si ricostruisce progressivamente nei primi 60-80 giorni (Figura 1). È stata osservata nei campioni pre-TCSE dei pazienti che hanno sviluppato GVHD la presenza costante di ceppi streptococchi (Figura 1). Inoltre nei pazienti con GVHD i campioni prelevati in concomitanza con l'esordio della GVHD, erano caratterizzati dalla crescita di *Streptococcus* e/o *Enterococcus* e dalla riduzione di simbionti dominanti membri del *Clostridium* cluster IV, un gruppo contenente molte specie in grado di produrre acidi grassi a corta catena, soprattutto butirrico, antinfiammatorio e protettivo della perla mucosa intestinale. Questa associazione tra la riduzione di tali membri dei Firmicutes e la comparsa di GVHD si allinea al dato recentemente descritto da Jenq e coll.³ su un modello sperimentale murino e confermato su soggetti adulti sottoposti a TCSE ed affetti da GVHD intestinale.

CONCLUSIONI: Questo è il primo studio che analizza la ricostituzione del MI nei pazienti pediatrici sottoposti a TCSE allogeneico. Si tratta di un modello con caratteristiche peculiari in quanto analizza il comportamento della flora intestinale sottoposta a elementi di forte stress come il regime chemioterapico di condizionamento, la forte

P027

DONAZIONE DI MIDOLLO OSSEO DA DONATORI INFANTI: FATTIBILITÀ E CARATTERISTICHE DEL GRAFT

K. Paciaroni, C. Alfieri, C. Gallucci, G. De Angelis, A. Roveda, A. Isgrò, M. Marziali, M. Ribersani, L. Cardarelli, J. Gaziev, P. Sodani, G. Lucarelli

International Centre for Transplantation in Thalassaemia and Sickle Cell Anaemia, Policlinico Tor Vergata, Roms, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Dati riguardanti gli infanti di età inferiore ai 3 anni candidati come donatori di midollo sono mancanti. Il nostro gruppo ha condotto uno studio paragonando un gruppo di donatori infanti (<3anni) con un gruppo di giovani donatori candidati alla donazione di midollo per i fratelli HLA identici affetti da talassemia major o Sickle Cell Anemia (SCA). Scopo del lavoro è valutare la sicurezza della procedura di raccolta di sangue midollare e la fattibilità a raccogliere un adeguato numero di progenitori cellulari anche in presenza di larghe disparità di peso tra donatore e ricevente.

METODI: Da Marzo 2004 a Dicembre 2012, 163 donatori HLA-relati hanno donato il sangue midollare: 27 donatori sani infanti (<36 mesi di età: 7-36 mesi, mediana 20 mesi) and 136 giovani donatori (3-51 anni, mediana 15,22 anni). La composizione del "Graft" è stata valutata mediante una standard conta citofluorimetrica delle Cellule nucleate totali (NC), cellule CD34 e cellule CD3; le conte sono state confrontate tra i due gruppi di studio. Sono state inoltre considerate altre variabili: peso del donatore, peso del ricevente, il rapporto tra peso del donatore e del ricevente (pair-ratio) al fine di identificare e quantificare grandi discrepanze tra il peso del donatore e quello del ricevente a sfavore del ricevente (ratio <1) e conseguentemente poter valutare il rischio in tali coppie di non raggiungere la minima soglia di cellule nucleate (2x108/kg) o CD34 (2x106/kg) richiesta.

RISULTATI: Il peso dei donatori infanti è significativamente inferiore a quello dei giovani donatori (mediana 11,93 vs 44,03 Kg, $p<0.001$) e conseguentemente, anche il volume di sangue midollare raccolto (mediana 276,52 ml vs 654,57 ml ($p<0.001$)). Nel gruppo degli infanti la pair-ratio è significativamente più bassa del valore calcolato nel gruppo dei donatori giovani (0,63 vs 1,72, $p<0.001$), ad indicare che il peso dei donatori infanti è più basso in maniera statisticamente significativa di quello dei rispettivi riceventi; effettivamente la mediana del peso dei riceventi è quasi 2-volte più grande di quello dei rispettivi donatori infanti (mediana 20,81 kg pazienti vs 11,93 kg donatori) diversamente da quanto si osserva nel gruppo dei giovani donatori (mediana 44.03 kg pazienti vs 28.4 kg donatori). A dispetto di ciò, la conta mediana per kg ricevente delle cellule NC, CD34 e CD3 non sono significativamente diverse tra il prodotto midollare raccolto dai donatori infanti e quelle dei giovani donatori (NC: $3.31 \times 10^8/\text{Kg}$ vs $4.63 \times 10^8/\text{Kg}$ ($p=0.002$); CD34: $9.36 \times 10^6/\text{Kg}$ vs $7.13 \times 10^6/\text{Kg}$, ($p=0,05$), CD3: $51.48 \times 10^6/\text{Kg}$ vs $71.44 \times 10^6/\text{Kg}$ ($p=0,041$)). È interessante notare che la mediana delle cellule CD34 calcolate per Kg del peso del donatore tra gli infanti è significativamente aumentata confrontata a quella dei giovani donatori (CD34 $17.168 \times 10^6/\text{Kg}$ vs $4.99 \times 10^6/\text{Kg}$ ($p=0.000$)) ad indicare un midollo particolarmente ricco di progenitori cellulari in età infantile tanto da garantire una buona quota di cellule CD34 anche a riceventi più grandi di età o peso. Non si sono riscontrate eventi avversi o complicazioni rischiose nei donatori anche infanti durante la procedura di donazione, sebbene il supporto trasfusionale sia stato impiegato più frequentemente nei donatori infanti (48.1% vs 9.5%, $p<0.001$) a dispetto di un valore di Hb post-donazione simile a quello riscontrato nei giovani donatori (Hb 9,8 gr/dl vs 9,7 gr/dl, $p=0,92$).

CONCLUSIONI: Il nostro studio documenta la fattibilità a raccogliere un adeguato numero di progenitori cellulari da donatori infanti anche nelle coppie donatore/ricevente con forte disparità di peso. Le alte conte di cellule CD34 nel midollo degli infanti e la sicurezza della procedura incoraggiano la loro eleggibilità come donatori di midollo quando fosse necessario.

P028

'C.T.M.O PEDIATRICO, PERCORSO INFERMIERISTICO GUIDATO DAL CENTRO TRAPIANTO AL RITORNO A CASA. L'ESPERIENZA DI BRESCIA

M. Dotti,¹ E. Cavagna,¹ R. Ceresoli,² M. Crotti Partel,² V. Grassi,² F. Porta²

¹Associazione Bambino Emopatico; ²UO Oncoematologia Pediatrica, Spedali Civili, Brescia, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: L'obiettivo di questa guida infermieristica è quello di comunicare le informazioni utili e far conoscere le regole del Centro Trapianto di Midollo Osseo (CTMO) ai genitori che per la prima volta entrano in contatto con questa nuova realtà. Alcuni pazienti che arrivano in Centro Trapianti sono già stati ricoverati per periodi più o meno lunghi nel Reparto di Oncoematologia Pediatrica attiguo al CTMO e hanno già avuto la possibilità di confrontarsi con le regole dell'isolamento, anche se non così restrittive come quelle del CTMO, altre volte arrivano direttamente per il trapianto e sono spesso stranieri. In CTMO vi è la possibilità di usufruire del lavoro di mediatori culturali preparati per spiegare ai genitori tutte le regole, inoltre il personale del CTMO segue passo dopo passo tutti i genitori per insegnare loro le regole fondamentali da rispettare. Proprio per la peculiarità delle regole da rispettare e la loro fondamentale importanza nel processo di cura del bambino, il personale ha espresso l'esigenza di fornire ai genitori un libretto nel quale fossero riportate le regole fondamentali del CTMO. Gli obiettivi di questo libretto, che fa da compendio al corso svolto dal personale, sono:

- far conoscere il CTMO ai genitori e al paziente; Migliorare in ogni singolo paziente la percezione di essere aiutato, sostenuto e seguito nel miglior modo possibile nel percorso del suo ricovero;
- favorire una maggiore collaborazione da parte di ogni singolo paziente e di coloro che se ne occupano;
- tranquillizzare e rassicurare;
- fornire uno strumento scritto nella propria lingua che aiuti i genitori e i pazienti che li faccia sentire maggiormente accolti, che favorisca il ricordo delle regole e che permetta loro di rivederle nel momento del bisogno.

In questa ottica il genitore che si prende cura del bambino ha la possibilità di sentirsi parte attiva nel percorso di cure del proprio bambino.

METODI: Oltre che in italiano, la guida infermieristica è tradotta in diverse lingue, arabo, russo, spagnolo, inglese con l'obiettivo di fornire ai genitori uno strumento da subito accessibile nella propria lingua. Visto che le statistiche degli accessi al CTMO dimostrano l'ampia presenza di pazienti molto piccoli, che non hanno ancora iniziato il periodo scolastico, si è scelto di rivolgere la guida ai genitori e corredarla con alcune illustrazioni comprensibili anche al bambino, in modo tale da non farlo sentire escluso dalle comunicazioni dei "grandi". Lo strumento ha una duplice funzione:

- trasmettere in modo chiaro ed inequivocabile tutte le regole necessarie per salvaguardare la salute del paziente;
 - elevare ulteriormente gli standard di qualità del reparto e della struttura ospedaliera relativamente ai servizi ed all'assistenza in generale del degente, a prescindere dall'origine, dalla cultura e dalla provenienza geografica degli stessi.
- La guida si articola in due sezioni:
- la prima concerne l'ingresso in CTMO da parte della famiglia e contiene le informazioni utili sulle norme da rispettare durante il ricovero, che riguardano la dieta, i documenti necessari per il ricovero, il servizio di mediazione culturale, le informazioni su come si svolge la giornata e le norme generali da rispettare e le informazioni su ciò che è utile portare in CTMO per il ricovero;
 - la seconda è dedicata al ritorno a casa del bambino e contiene le informazioni utili per preparare l'abitazione che lo accoglierà secondo i criteri di sicurezza necessari per salvaguardare la sua salute e le indicazioni utili per gestire i giochi e il tempo libero.

RISULTATI: La guida infermieristica in questo nuovo formato verrà distribuita a partire da aprile 2013. Rappresenta una modalità innovativa di comunicare con i pazienti e i loro genitori coinvolgendoli attivamente nel percorso di cure del proprio figlio e contemporaneamente senza escludere il bambino dalle comunicazioni che riguardano la sua salute grazie alle illustrazioni che sono facilmente comprensibili per i bambini più piccoli. Visto quanto detto, uno dei risultati attesi riguarda la maggiore compiacenza alle terapie e un migliore adattamento all'isolamento e alle regole del CTMO.

CONCLUSIONI: Questa guida infermieristica rappresenta un completamento e non una sostituzione della comunicazione infermiere-paziente, l'intento è quello di dotare le famiglie di uno strumento di facile comprensione che permetta loro di recuperare le informazioni utili qualora ne sentano il bisogno. Si ipotizza che questo strumento possa essere particolarmente utile per i pazienti stranieri che possono riscontrare particolari difficoltà nella comunicazione orale. Questo opuscolo rappresenta anche un intervento psicologico perchè una comunicazione semplice ed accessibile rappresenta un primo strumento di contenimento dell'ansia per il bambino e i genitori.

P029

DEFICIT DI STAT1: È SUFFICIENTE IL TRAPIANTO DI MIDOLLO OSSEO PER GARANTIRE LA PROTEZIONE CONTRO INFEZIONI VIRALI?C. D'Ippolito,¹ E. Soncini,¹ R. Badolato (2) - V. Grassi,¹ F. Ricci,¹ L. Gazzolla,¹ L. Squassabia,¹ M. Parpanesi,¹ R.F. Schumacher,¹ F. Porta¹¹Onco-Ematologia Pediatrica; ²Clinica Pediatrica dell'Università, Ospedale dei Bambini, Brescia, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il deficit completo di STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) è una rara immunodeficienza primitiva generalmente ad ereditarietà autosomica recessiva che colpisce la risposta immunitaria innata contro i virus, micobatteri ed altri patogeni intracellulari, con rischio di infezioni anche mortali. Il gene è espresso ubiquitariamente, la sua assenza determina blocco della risposta mediata da IFN- α e IFN- γ . Inoltre, STAT1 è coinvolto nella risposta cellulare ad altre citochine con attività antivirale ed ha un impatto determinante sull'attivazione delle Natural Killer cells.

METODI: Aggiorniamo l'unico caso descritto in letteratura di paziente affetto da immunodeficit primitivo da deficit di STAT 1 sottoposto a trapianto di midollo osseo (TMO).

RISULTATI: Il piccolo, nato da genitori consanguinei, ha goduto di buona salute fino ai 10 mesi di vita, quando ha cominciato una sequenza di infezioni: infezione polmonare da micobatteri (*M. kansasii*) trattata con successo con antimicobatterici per 9 mesi, a 20 mesi ha presentato mononucleosi infettiva complicata da infezione erpetica cutanea, a 21 mesi insufficienza respiratoria acuta in corso di infezione polmonare da CMV, a 27 mesi sepsi aggravata da coagulopatia intravascolare disseminata e stato di male epilettico. All'età di tre anni circa identificazione di mutazione in omozigosi a carico di STAT1: (G720C con effetto skipping esone 3 e formazione di un trascritto aberrante). Successivamente meningite acuta da enterovirus. All'età di quattro anni il piccolo è stato sottoposto a TMO da donatore non familiare compatibile (MUD) con attecchimento totale degli stiptipi ematopoietici donati. Il decorso post-trapianto è stato complicato da anemia emolitica, GVHD cutanea e intestinale di 3° grado, trattate con corticosteroidi, micofenolato e tacrolimus progressivamente sospesi. In questa fase anche infezione da EBV, cheratocongiuntivite da CMV bilaterale con perdita del visus, linfedema cutaneo. Durante l'ulteriore follow up post TMO le condizioni cliniche del piccolo sono progressivamente migliorate, si è raggiunta completa clearance virale, l'attecchimento degli stiptipi ematopoietici donati si è mantenuto totale, e si normalizzata la risposta immunitaria sia cellulare che anticorpo-mediata con normale risposta alle vaccinazioni da virus uccisi. Il paziente ha presentato discreto accrescimento staturale-ponderale ed è stato inserito in comunità con frequenza scolastica regolare con ausili per non-vedenti. A quattro anni e mezzo dal TMO, comparsa di episodio febbrile associato a faringite e tosse, trattato con cefalosporina, complicato da leucopenia, piastrinopenia (GB 2.700/mmc, PLT 133.000/mmc), indici di danno epatico ALT 433 U/L. Nei giorni successivi le condizioni cliniche sono progressivamente peggiorate con parallelo incremento degli indici di citolisi epatica fino ad un massimo di 4.233 U/L di AST, ed alterazione della coagulazione responsiva alla vitamina K. Le emocolture si sono rivelate negative, le sierologie per virus epatotropi quali HBV, HCV, HIV, HEV, HAV, Rosolia, HHV6, HSV1 e 2, EBV, Adenovirus, sono risultate tutte negative, tuttavia si è riscontrato un aumento di IgM per CMV ed una positività debole di Parvovirus DNA su siero. Il quadro clinico e strumentale (eco) deponiva per epatite acuta di probabile eziologia virale. Si eseguiva pertanto infusione di immunoglobuline endovena seguito da una dose di cidofovir con rapido miglioramento clinico e dei parametri ematologici.

CONCLUSIONI: Essendo questo paziente l'unico caso affetto da STAT1 vivo dopo TMO descritto in letteratura, non è possibile affidarci ad altre esperienze per avere indicazioni di follow up. Alla luce di questo caso, possiamo supporre che nel trapianto di un paziente con deficit di STAT1, malgrado si sia osservato un attecchimento totale del trapianto con normalizzazione della risposta cellulare ed umorale, possa persistere una condizione di suscettibilità alle infezioni dovuta all'assenza di STAT1 nei tessuti di origine non ematopoietica. Infatti, mentre il paziente post-TMO sia in grado di eliminare il virus dal plasma, nei tessuti dove l'espressione di STA1 non è corretta da TMO, la continua mancanza di STA1 potrebbe giustificare una persistente suscettibilità ad alcuni patogeni. Questa osservazione suggerisce l'opportunità di uno stretto controllo dei pazienti con deficit di STAT1 sottoposti a TMO.

LEUCEMIE E LINFOMI

CP04

CBFA2T3-GLIS2: UN NUOVO TRASCRITTO DI FUSIONE IDENTIFICATO MEDIANTE SEQUENZIAMENTO MASSIVO DEL TRASCRITTOMA, RICORRENTE NELLE LAM PEDIATRICHE A CARIOTIPO NORMALE E ASSOCIATO A PROGNOSI SFAVOREVOLER. Masetti,¹ M. Pigazzi,² M. Togni,³ A. Astolfi,⁴ V. Indio,⁴ E. Manara,⁵ R. Casadio,⁴ A. Pession,¹ G. Basso,⁵ F. Locatelli⁶¹Oncologia ed Ematologia Pediatrica "Lalla Seragnoli", Università di Bologna, Bologna; ²Oncoematologia Pediatrica, Università di Padova, Padova; ³Oncoematologia Pediatrica, Università di Bologna, Bologna; ⁴Centro Interdipartimentale Ricerca sul Cancro, Università di Bologna, Bologna; ⁵Oncologia ed Ematologia Pediatrica, Università di Padova, Padova; ⁶Oncologia ed Ematologia Pediatrica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Le leucemie acute mieloidi pediatriche a cariotipo normale (CN-LAM) sono un eterogeneo sottogruppo di disordini mieloproliferativi clonali che non presentano mutazioni note. Approcci di sequenziamento massivo sono stati utilizzati con lo scopo di determinare il completo profilo mutazionale presente nelle CN-LAM e recenti studi hanno fornito nuove importanti informazioni sulla complessità genetica e sulla biologia delle CN-LAM. Tuttavia, c'è ancora una porzione rilevante di bambini affetti da CN-LAM in cui nessuna anomalia genetica è stata ancora identificata. Pertanto, l'identificazione dei profili genetici che caratterizzano questo gruppo di leucemie rimane un obiettivo primario da perseguire. Con questo razionale, abbiamo recentemente allestito un sequenziamento massivo del trascrittoma (*Whole-transcriptome sequencing*) di 7 casi di CN-LAM pediatriche con lo scopo di identificare delle nuove, ricorrenti mutazioni o riarrangiamenti cromosomici che possono avere un ruolo importante nel processo di leucemogenesi e, di riflesso, nella definizione del profilo prognostico e terapeutico.

METODI: I pazienti analizzati sono bambini con diagnosi *de novo* di CN-AML arruolati al protocollo AIEOP LAM 2002/01. Tutti i pazienti della coorte di sequenziamento (N=7) e di quella di validazione (N=230) sono negativi per i riarrangiamenti cromosomici noti e per alterazioni genetiche ricorrenti a carico dei geni *MLL*, *CBFB*, *NPM1* e *FLT3*. Il *whole-transcriptome sequencing* è stato effettuato sul sequenziatore di nuova generazione HiScanSQ (Illumina) a 75bp in *paired-end mode*. Le *reads* ottenute sono state mappate contro il genoma umano di riferimento mediante TopHat2/BowTie2. I *software* deFuse, ChimeraScan e FusionMap sono stati utilizzati per identificare i trascritti di fusione. Il trascritto di fusione *CBFA2T3-GLIS2* è stato validato tramite RT-PCR e sequenziamento di Sanger. I *primers* utilizzati sono: *forward* 5'-CGAAGGGCCCTCAGCTA-GACGT-3', *reverse* 5'-AGCCACTGCGCTATTTGGAT-3'.

RISULTATI: Il *Whole-transcriptome sequencing* dei 7 casi di CN-AML ha prodotto una media di 88.3 milioni di *reads* mappate/paziente con una *coverage* media di 36X. In 3 su 7 pazienti analizzati abbiamo identificato un nuovo trascritto chimerico *CBFA2T3-GLIS2* che deriva da una inversione criptica del cromosoma 16. Il riarrangiamento cromosomico porta alla fusione *in-frame* del 5' del gene *CBFA2T3*, membro della *myeloid translocation gene family* (noto per essere fuso con *AML1* nella traslocazione t(16;21)(q24;q22) nelle LAM *therapy-related*), con il 3' del gene *GLIS2*, membro della *GLI-similar Krüppel-like zinc finger protein family* che agisce come inibitore del *Pathway di Hedgehog* (Figura 1A). 42 *span reads* e 153 *split reads* supportano l'identificazione di questo trascritto di fusione. L'analisi di RT-PCR e il sequenziamento di Sanger hanno validato la fusione e confermato che in 2 pazienti il punto di fusione è tra l'esone 11 di *CBFA2T3* e l'esone 3 di *GLIS2*, mentre nell'ultimo caso il punto di fusione coinvolge l'esone 10 di *CBFA2T3* e l'esone 2 di *GLIS2* (Figura 1B). Per determinare la ricorrenza di questo nuovo trascritto di fusione abbiamo analizzato una coorte di validazione di 230 casi pediatrici di CN-LAM. Considerando anche i campioni della coorte di sequenziamento, il trascritto di fusione *CBFA2T3-GLIS2* è stato globalmente identificato in 20 pazienti su 237 (8.4%) (Tabella 1) di cui solamente 10 appartengono al sottogruppo FAB M7. Infine abbiamo valutato se la presenza del trascritto di fusione *CBFA2T3-GLIS2* influenziasse l'*outcome* dei pazienti. La *5-year event-free survival* (EFS) dei 20 pazienti *CBFA2T3-GLIS2*-positivi è significativamente peggiore rispetto a quella dei 217 pazienti *CBFA2T3-GLIS2*-negativi (27.4%, *standard error* [SE] 10.5 vs 59.6%, SE 3.6 P=0.01) (Figura 1C).

Tabella 1. Caratteristiche cliniche dei pazienti CN-LAM che presentano il trascritto di fusione CBFA2T3-GLIS2. * indicano i pazienti della coorte di sequenziamento in cui abbiamo inizialmente identificato il trascritto di fusione. MUD=Matched Unrelated Donor, MFD=matched family donor, AUTO=autologous. BM=Bone Marrow. CNS=Central Nervous System; +=paziente vivo e in remissione completa.

ID	Age, y	Gender	WBC x 10 ⁹ /L	FAB	Bone marrow blast percentage at diagnosis	HSCT (Type)	CR after induction therapy	Relapse (site)	Disease free duration (months)	Survival duration (months)
#1*	0.8	M	13.63	M2	52	Yes (MFD)	Yes		46.7	+48.0
#2*	0.3	F	7.52	M5A	88	Yes (AUTO)	Yes		90.6	+91.4
#3	1.4	F	65.08	M0	98	Yes (AUTO)	Yes	Yes (BM)	9.3	13.0
#4	12.7	F	22.8	M1	61	Yes (AUTO)	Yes		70.1	+74.5
#5	17.0	F	0.91	M1	98	Yes (AUTO)	Yes	Yes (BM+skin)	38.7	50.4
#6	13.3	M	7.52	M5	90	No	No		-	2.6
#7	0.9	M	7.53	M5	60	Yes (MUD)	Yes	Yes (BM)	15.1	19.3
#8	12.1	M	20.82	M0	70	Yes (AUTO)	Yes	Yes (BM)	22.7	24
#9	17.2	M	35.7	M0	85	No	No		-	3.2
#10	16.4	F	26.4	M4	70	Yes (AUTO)	Yes	Yes (BM)	8.2	12.1
#11	3.2	F	24.2	M7	70	Yes (MUD)	Yes	Yes (BM)	12.2	24.7
#12	4.0	M	12.79	M7	74	Yes (MUD)	Yes	Yes (BM)	8.6	10.7
#13	0.7	M	13.6	M7	95	Yes (MUD)	No		-	9.4
#14	0.7	F	9.6	M7	90	Yes (MUD)	No	Yes (BM)	-	21.1
#15	2.0	F	7.4	M7	95	Yes (MFD)	Yes		109.2	+111.8
#16	1.4	F	128.6	M7	50	No	No		-	2.1
#17*	0.5	F	13.25	M7	90	No	Yes	Yes (BM+CNS)	3.2	5.7
#18	3.0	F	13.63	M7	40	Yes (MUD)	Yes		37.2	+45.2
#19	1.6	F	115	M7	90	Yes (MFD)	Yes	Yes (BM)	17.7	24.7
#20	1.9	F	56.5	M7	30	Yes (MFD)	Yes		13.5	+15.6

In aggiunta abbiamo calcolato la 5-year EFS stratificando i pazienti secondo il sottogruppo FAB (M7 vs non-M7) in modo da chiarire se il peggiore outcome fosse legato alla presenza del trascritto di fusione o al sottogruppo FAB (Figura 1D). La 5-years EFS dei pazienti FAB M7 che presentano o meno il trascritto di fusione CBFA2T3-GLIS2 è significativamente differente con, rispettivamente, 26.6% (SE 15.0) e 60.7% (SE 8.3; P=0.04). Risultati analoghi sono stati ottenuti per i pazienti non-M7 con una 5-years EFS di 30.0% (SE 14.4) per i pazienti CBFA2T3-GLIS2-positivi e di 59.4% (SE 3.5) per i pazienti CBFA2T3-GLIS2-negativi (P=0.04).

CONCLUSIONI: Mediante il sequenziamento massivo di nuova

generazione del trascrittoma di 7 casi di CN-LAM pediatrica abbiamo identificato un nuovo trascritto di fusione tra il gene CBFA2T3 e il gene GLIS2. Lo screening in una coorte di validazione di 230 bambini affetti da CN-LAM ci ha poi permesso di dimostrare come il trascritto di fusione CBFA2T3-GLIS2 sia ricorrente nelle CN-LAM pediatriche (8.4%) e calcolando l'EFS a 5 anni abbiamo dimostrato come la presenza di questa nuova alterazione genetica influenzi negativamente l'outcome dei pazienti. Nel complesso questi dati indicano che il trascritto di fusione CBFA2T3-GLIS2 è una nuova alterazione genetica ricorrente nelle CN-LAM pediatriche e definisce un sottogruppo di pazienti con prognosi sfavorevole.

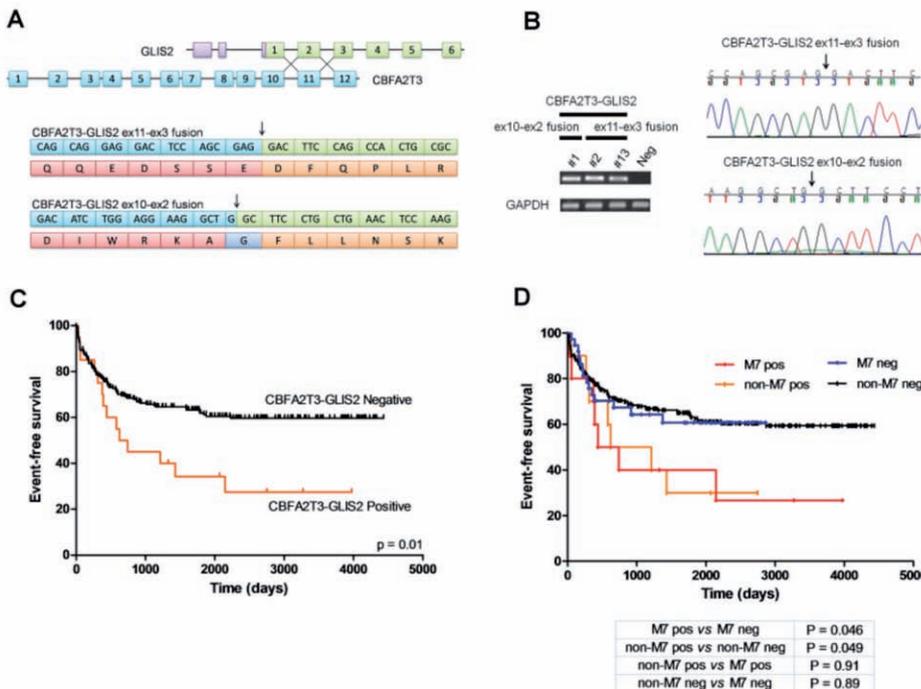


Figura 1. Il Trascritto di Fusione CBFA2T3-GLIS2 è una nuova alterazione ricorrente nelle CN-LAM pediatriche che caratterizza un gruppo di pazienti con outcome negativo. (A) Rappresentazione schematica della fusione tra CBFA2T3 e GLIS2. I Blocchi viola rappresentano esoni non tradotti. Le Frecche nere indicano i punti di fusione. (B) RT-PCR e sequenziamento di Sanger per confermare il trascritto di fusione. L'amplificazione della GAPDH è stata utilizzata come controllo positivo di amplificazione. Un library della coorte di sequenziamento negativa alla fusione è stata utilizzata come controllo negativo. (C) 5-year event-free survival (EFS) in bambini CBFA2T3-GLIS2-positivi (27.4%, SE 10.5) versus pazienti CBFA2T3-GLIS2-negativi (59.6%, SE 3.6) (P=0.01). (D) 5-year EFS in CN-LAM positive o non positive al trascritto di fusione CBFA2T3-GLIS2 stratificati secondo il sottogruppo FAB (M7 vs non-M7): EFS dei non-M7 CN-LAM CBFA2T3-GLIS2-negativi=59.4%, SE 3.5 vs EFS dei non-M7 CN-LAM CBFA2T3-GLIS2-positivi=30.0%, SE 14.4 (P=0.04). EFS dei FAB-M7 CN-LAM CBFA2T3-GLIS2-negativi=60.7%, SE 8.3 vs EFS dei FAB-M7 CN-LAM CBFA2T3-GLIS2-positivi=26.6%, SE 15.0, (P=0.04).

C004

STUDIO AIEOP ALL 2000 NELLA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA (LLA) AD ALTO RISCHIO (HR): RUOLO DEL TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE (HSCT) IN PRIMA REMISSIONE COMPLETA (RC)

V. Conter, M.G. Valsecchi, R. Parasole, C. Putti, F. Locatelli, E. Barisone, L. Lo Nigro, N. Santoro, M. Aricò, O. Ziino, A. Pession, A.M. Testi, C. Micalizzi, F. Casale, M. Zecca, G. Casazza, P. Tamaro, G. La Barba, L.D. Notarangelo, E. Giraldo, D. Silvestri, A. Colombini, C. Rizzari, A. Biondi, G. Basso

Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica AIEOP, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Nello Studio AIEOP-BFM ALL 2000 la stratificazione dei pazienti nei gruppi di rischio è stata basata largamente sulla risposta alla terapia misurata come malattia residua minima (MRM) alla fine della terapia di Induzione/Consolidamento sia per il Gruppo AIEOP che per il Gruppo BFM. Il protocollo AIEOP era tuttavia parzialmente diverso sia per il trattamento chemioterapico che per le indicazioni trapiantologiche. Scopo di questo lavoro è di descrivere l'impatto della strategia terapeutica dello Studio AIEOP ALL 2000 per la LLA HR, e in particolare del HSCT in prima RC.

METODI: Nel periodo Settembre 2000 – Luglio 2006 sono stati reclutati nello Studio AIEOP ALL 2000 in totale 1999 pazienti di età 1-17 anni, con diagnosi di LLA Ph negativa. 312 di essi sono stati trattati nel gruppo HR. Criteri per HR erano: traslocazione t(4;11), Prednisona Poor Response (PPR), no CR al giorno 33 (TP1), MRM $\geq 1 \times 10^{-3}$ al giorno 78 (TP2). Il trattamento chemioterapico includeva le fasi di Induzione/Consolidamento (fase IA e IB), 3 Blocchi di polichemioterapia, Reinduzione (protocollo II x 2 o protocollo III x 3) e Mantenimento. L'HSCT da donatore identico familiare era indicato per pazienti con PPR + GB $\geq 100\ 000/\text{mm}^3$ o T-ALL o pro-B ALL o MRM $\geq 1 \times 10^{-2}$ al TP1, o t(4;11), o MRM-HR (1×10^{-3} at TP2). Per pazienti con MRM 1×10^{-2} at TP2, o no-CR al giorno 33, o PPR + t(4;11), era indicato anche l'HSCT da donatore compatibile unrelated.

RISULTATI: In ordine gerarchico 132 dei 312 pazienti HR presentavano MRM 1×10^{-3} al giorno 78; 17 no-CR al giorno 33; 11 t(4;11); 152 solamente PPR. Globalmente, con un follow-up mediano di 6 anni, la sopravvivenza libera da malattia (EFS) e la sopravvivenza globale (OS) a 5 anni sono rispettivamente del 59.1% (SE 2.8) e del 68.8% (SE 2.7). L'EFS è relativamente favorevole nei pazienti HR solamente per PPR (EFS a 5 anni del 74.7%, SE 3.6), ma è nettamente peggiore (EFS a 5 anni del 40%), negli altri pazienti, la maggior parte dei quali presenta MRM-HR (p-value < 0.001). L'HSCT è stato eseguito complessivamente in 78 pazienti: 44 da donatore familiare compatibile, 18 da donatore unrelated compatibile e 16 da donatore non compatibile; i risultati sono stati simili in questi 3 sottogruppi. Nei pazienti a rischio più alto di ricaduta (MRM-HR, no-CR al giorno 33 o con traslocazione t(4;11)), tenendo conto del tempo di attesa, la sopravvivenza libera da malattia (DFS) e la OS a 5 anni sono state del 54.2% (SE 6.4) e 60.8% (SE 6.3) nei pazienti trattati con HSCT, e del 46.1% (SE 5.9) e 52.1% (SE 5.6) nei pazienti trattati solamente con chemioterapia. [DFS (p-value=0.36) and OS (p-value=0.31)]. Nei pazienti a prognosi più favorevole con indicazione all'HSCT (PPR + GB $\geq 100\ 000/\text{mm}^3$ o T-ALL o pro-B ALL; n=72), solamente 12 sono stati trapiantati; in questo sotto gruppo la DFS e la OS a 5 anni sono state del 83.3% (SE 10.8) nei pazienti trattati con HSCT, e del 70.5% (SE 6.3) and 80.2% (SE 5.5) nei pazienti trattati solamente con chemioterapia.

CONCLUSIONI: Questi dati mostrano che la terapia attuale è efficace nei pazienti HR solamente per PPR, ma rimane inadeguata per tutti gli altri pazienti HR, identificati prevalentemente dalla persistenza di alti livelli di MRM dopo la fase di Induzione/Consolidamento. In questo ultimo gruppo l'HSCT consente di migliorare l'EFS a 5 anni di circa il 10%; questi pazienti potrebbero trarre beneficio dalla somministrazione di terapie innovative. D'altra parte i risultati ottenuti nel gruppo HR solamente per PPR non giustificano l'indicazione all'HSCT; per questi pazienti potrebbe essere invece opportuno ottimizzare la terapia per ridurre il rischio di tossicità e soprattutto di sequele a lungo termine.

C005

I RECETTORI CHIMERICI ARTIFICIALI COME NUOVO MODELLO DI TARGETING SELETTIVO DELLA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA

I. Pizzitola,¹ S. Tettamanti,¹ F. Anjos-Afonso,² K. Rouault-Pierre,² F. Lassailly,² A. Biondi,² D. Bonnet,² E. Biagi¹

¹Centro di Ricerca "M. Tettamanti", Università Milano-Bicocca, Clinica Pediatrica, Ospedale San Gerardo, Monza (MB), Italy;

²Haematopoietic Stem Cell, Cancer Research UK, London Research Institute, London, UK

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Nonostante i progressi raggiunti negli ultimi anni nel trattamento della leucemia mieloide acuta (LMA), i regimi chemioterapici convenzionali garantiscono una remissione completa solo nel 50%-60% dei pazienti; la prognosi in casi di recidiva è sfavorevole, con una sopravvivenza inferiore al 40% dei pazienti trattati. È quindi necessario lo sviluppo di nuove terapie alternative. L'immunoterapia cellulare adottiva che prevede la modificazione genica di linfociti T con recettori chimerici (CARs) rappresenta una valida opzione in questo senso. I CARs sono molecole artificiali costituite da un dominio extracellulare di riconoscimento antigenico e da una regione intracellulare di trasduzione del segnale; in seguito al legame con l'antigene target le cellule T trasdotte con i CAR vengono così attivate e reindirizzate in modo specifico, esplicando la loro attività citotossica contro le cellule tumorali. In questo contesto la LMA, essendo caratterizzata dall'overespressione di diverse molecole di superficie, quali CD33 e CD123, è una malattia verso cui la strategia dei CAR può essere potenzialmente applicata. Tuttavia, l'utilizzo di un CAR specifico per la molecola CD33 potrebbe comportare una potenziale compromissione della normale mielopoiesi, in quanto l'antigene CD33 è espresso a livelli considerevoli anche dalle cellule staminali e dai precursori ematopoietici normali (HSPCs). Il CD123 rappresenta una nuova interessante potenziale molecola target grazie al suo pattern di espressione differenziale, essendo overespressa dalla popolazione cellulare di LMA e allo stesso tempo espressa a bassi livelli sulle cellule HSPCs.

METODI: In questo studio abbiamo testato *in vivo*, grazie all'utilizzo di un modello murino di xenotrapianto (NSG), i profili di efficacia e di sicurezza di cellule effettrici CIK (Cytokine-Induced Killer) geneticamente modificate per l'espressione di molecole CAR di terza generazione specifiche per gli antigeni CD33 e CD123 (CAR anti-CD33-CD28-OX40- ζ e CAR anti-CD123-CD28-OX40- ζ).

RISULTATI: Le cellule CIK geneticamente modificate con i CAR, una volta iniettate in topi NSG xenotrapiantati con bassi livelli di engraftment di LMA primaria pediatrica (media di hCD45⁺CD33⁺ 0.6% prima del trattamento), hanno mostrato una potente attività antitumorale. Infatti, il midollo osseo di topi controllo non trattati oppure trattati con CIK non manipolate presentava infiltrati di cellule leucemiche pari all'86% e 81% rispettivamente, mentre in 7/8 topi trattati con CIK esprimenti il CAR anti-CD33-CD28-OX40- ζ e in 8/10 topi trattati con CIK manipolate con il CAR anti-CD123-CD28-OX40- ζ non sono state virtualmente riscontrate cellule di LMA. Risultati simili sono stati ottenuti quando le CIK sono state iniettate in topi con un alto livello di engraftment di malattia (media di blasti hCD45⁺CD33⁺ 70% prima del trattamento). Una settimana dopo l'ultima iniezione di CIK, il livello di LMA era di 96%, 87%, 0.35% e 0.34% per i topi non trattati, trattati con CIK non manipolate e con CIK trasdotte con anti-CD33-CD28-OX40- ζ e anti-CD123-CD28-OX40- ζ rispettivamente. Successivamente abbiamo effettuato trapianti secondari utilizzando le cellule di LMA residue presenti nei topi precedentemente trattati, infondendo di nuovo le cellule CIK trasdotte. Le cellule di LMA sono risultate ancora sensibili alla strategia CAR, portando ad una quasi totale eradicazione della malattia (livello medio di attecchimento di hCD45⁺CD33⁺ pari a 98%, 0.02% e 0.04% rispettivamente per topi non trattati, trattati con CIK trasdotte con anti-CD33-CD28-OX40- ζ e con anti-CD123-CD28-OX40- ζ). L'analisi del profilo di sicurezza di questo approccio nei confronti del normale compartimento ematopoietico (HSPCs) è stato un ulteriore aspetto considerato nel nostro studio. Il livello di cellule CD34⁺ derivate da cordone ombelicale è risultato pari a 42% nei topi non trattati, mentre in topi trattati con CIK non manipolate e CIK trasdotte con anti-CD33-CD28-OX40- ζ o con anti-CD123-CD28-OX40- ζ sono stati riscontrati livelli pari a 40%, 11.7% e 26.3% rispettivamente. Considerando in particolare il compartimento ematopoietico CD34⁺CD38⁻, arricchito in cellule staminali, il livello di attecchimento osservato è stato pari a 1.92%, 1.02%, 0.55% e 0.83% nelle varie condizioni sopracitate. Esperimenti di trapianti secondari sono al momento in corso, al fine di delineare un più completo profilo di sicurezza, valutando la capacità di ripopolamento ematopoietico da parte delle cellule HSPCs residue.

CONCLUSIONI: Il presente studio effettuato *in vivo* offre importanti informazioni relative al profilo di efficacia e di sicurezza della strategia CAR proposta, in modo particolare per una potenziale applicazione clinica in un contesto di malattia residua minima in pazienti di LMA trapiantati ad alto rischio. La strategia dei CAR potrebbe essere inoltre utilizzata per il trattamento di pazienti resistenti ai regimi chemioterapici convenzionali o per pazienti ai quali non possa essere proposto alcun tipo di trattamento chemio-radioterapico ad alte dosi.

P030

MYCN COME NUOVO BERSAGLIO TERAPEUTICO NELLE LEUCEMIE ACUTE LINFOBLASTICHE DI TIPO T DELL'ETÀ PEDIATRICA

F. Vendemini,¹ A. Astolfi,² M. Urbini,² F. Melchionda,¹ R. Masetti,¹ M. Franzoni,¹ V. Libri,¹ S. Serravalle,¹ M. Togni,¹ L. Montemurro,¹ R. Rondelli,¹ G. Paone,¹ D. Bressanin,³ F. Chiarini,³ A.M. Martelli,⁴ R. Tonelli,⁴ A. Pession¹

¹Oncologia e Ematologia Pediatrica "Lalla Seragnoli", Sant'Orsola Malpighi, Università di Bologna, Bologna; ²Centro Interdipartimentale di Ricerca sul Cancro "Giorgio Prodi"; ³Dipartimento di Anatomia Umana; ⁴Dipartimento di Farmacologia e Biotecnologie, Università di Bologna, Bologna, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La Leucemia Acuta Linfoblastica di tipo T (LAL-T) rappresenta circa il 15% delle LAL pediatriche e si associa tipicamente a caratteristiche cliniche sfavorevoli e a maggior rischio di primary resistant disease e di recidiva precoce.¹⁻² Analisi dei profili di espressione genica di LAL-T pediatriche hanno consentito di delineare numerosi meccanismi molecolari implicati nella patogenesi di malattia e di identificare differenti sottogruppi associati all'espressione aberrante di oncogeni quali TLX1, TAL1, LYL1, TLX3 and HOXA.³ MYCN è un oncogene frequentemente iperespresso nei tumori solidi dell'età pediatrica: alcuni studi supportano un suo ruolo nella patogenesi di neoplasie ematologiche.⁴⁻⁶ Lo scopo di questo studio è di valutare l'espressione di MYCN in una casistica di LAL-T pediatriche e il suo ruolo di potenziale bersaglio terapeutico mediante l'utilizzo di Acidi Nucleici Peptidici diretti contro MYCN (PNA-MYCN).

METODI: I profili di espressione genica di campioni di LAL-T e di midollo osseo non patologico sono stati ottenuti da 2 datasets precedentemente pubblicati: lo studio Stage 1 Microarray Innovations in LEukemia (MILE)⁷ e la casistica pediatrica SET-NUP214 LAL-T.⁸ Il materiale genetico di 21 pazienti pediatrici affetti da LAL-T trattati dal 1996 al 2010 presso la nostra Istituzione è stato utilizzato per valutare in RT-PCR l'espressione di MYCN, TAL1, TLX1, TLX3. Per gli studi in vitro sono state utilizzate le linee cellulari di LAL-T: Jurkat, CCRF-CEM, RPMI 8402, MOLT-4, che iperesprimono TAL1, e DND-41, che iperesprime TLX3. In tali linee cellulari è stata valutata l'espressione del gene MYCN mediante RT-PCR e della proteina mediante Western-Blot. Gli esperimenti in vitro sono stati eseguiti con PNA-MYCN, mismatch PNA (PNA-MUT, ovvero che presenta 3 mutazioni puntiformi) e siRNA diretti contro MYCN e siRNA diretti contro TAL1. I blasti provenienti da 3 bambini appartenenti alla nostra casistica sono stati trattati ex vivo con PNA-MYCN e PNA-MUT.

RISULTATI: L'analisi dei profili di espressione genica di 174 campioni di LAL-T di pazienti adulti e pediatrici dello studio MILE ha mostrato un'espressione di MYCN significativamente superiore rispetto a quella presente in campioni di midollo osseo normale (espressione media \pm 95% CI: 5.57 ± 0.25 , LAL-T; 4.44 ± 0.08 , midollo osseo donatori sani; $P < 0.0001$): il 40% dei campioni di LAL-T è risultato esprimere MYCN a valori superiori alla media +3SD rispetto all'espressione osservata nel midollo osseo dei donatori. Nella casistica di sole LAL-T pediatriche dello studio SET-NUP214 è stato osservato che l'iperespressione di MYCN è associata al solo sottogruppo iperesprimente TAL-1 (Figura 1A), mentre gli altri sottogruppi molecolari non presentano alti livelli di espressione del gene. Un'elevata espressione di MYCN è stata riscontrata in 9/21 (42%) pazienti pediatriche con LAL-T trattati presso la nostra Istituzione e tale elevata espressione è significativamente correlata alla sola iperespressione di TAL-1 (6 pazienti su 7 TAL1 positivi iperesprimono MYCN, Figura 1B). Tutte le linee cellulari di LAL-T analizzate, ad eccezione della linea DND-41, hanno mostrato elevata espressione del trascritto di MYCN e della proteina. La correlazione tra l'espressione di MYCN e TAL1 è stata confermata mediante l'utilizzo di 2 differenti siRNA diretti contro TAL1 nelle linee CCRF-CEM e RPMI 8402: tale trattamento ha determinato la riduzione marcata dell'espressione di MYCN. Inoltre, l'analisi ChIP sulle stesse linee cellulari TAL1 positive conferma che TAL1 lega la regione promotrice di MYCN. Il silenziamento trascrizionale di MYCN sulle linee cellulari ottenuto mediante PNA-MYCN ha determinato una riduzione della vitalità cellulare fino al 50% con un aumento delle cellule apoptotiche fino al 19.5% (Figura 2A e 2B). Il trattamento con PNA-MYCN determina una significativa riduzione dell'espressione genica di MYCN e della proteina. La specificità del meccanismo d'azione del PNA-MYCN è supportata dal fatto che il trattamento con PNA-MUT non si traduce in riduzioni significative della vitalità cellulare, dell'espressione genica di MYCN e della proteina. Il trattamento ex vivo con PNA-MYCN di blasti di LAL-T con alta espressione di MYCN provenienti da 2 pazienti pedia-

trici della nostra casistica riduce significativamente la vitalità cellulare (42% per T-ALL#02 -Figura 3- e 34% per T-ALL#03, $P < 0.0001$), mentre non è stato ottenuto alcun effetto nei blasti di un paziente MYCN negativo e in seguito a trattamento con PNA-MUT.

CONCLUSIONI: Questo studio dimostra che almeno il 40% delle LAL-T pediatriche iperesprime MYCN, in stretta correlazione con l'elevata espressione di TAL1. Sebbene sia necessaria una migliore definizione dei pathways molecolari che correlano MYCN e TAL1, i nostri risultati supportano il ruolo di MYCN come potenziale target terapeutico nelle LAL-T dell'età pediatrica.

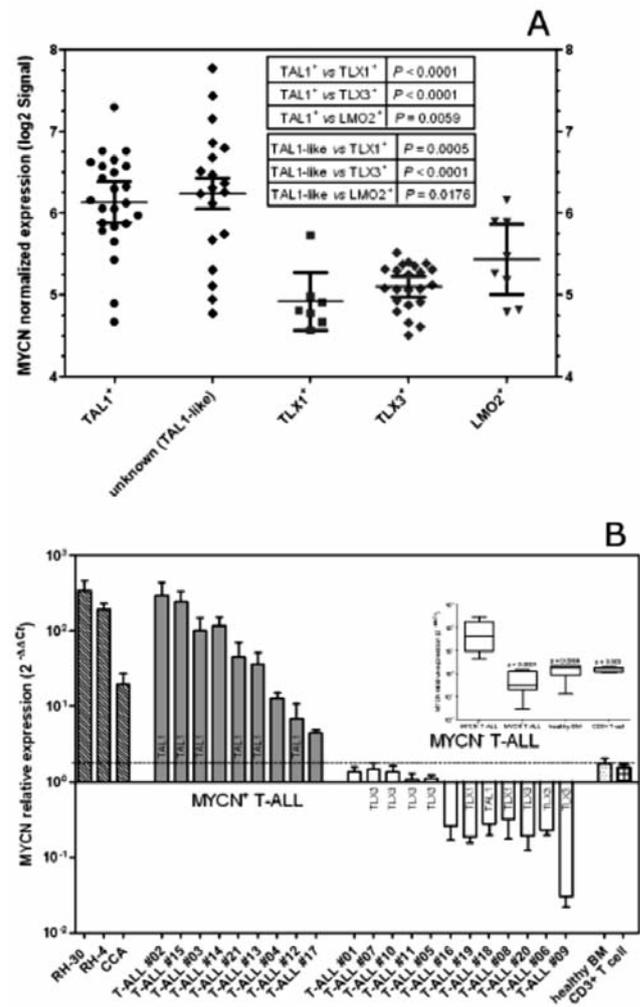


Figura 1.

Bibliografia:

- Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2006; 354(2):166-168.
- Conter V, et al. Long-term results of the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP) Studies 82, 87, 88, 91 and 95 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2010;24(2):255-264.
- Ferrando AA, et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell.* 2002;1(1):75-87.
- Van Lohuizen M, et al. N-myc is frequently activated by proviral insertion in MuLV- induced T-cell lymphomas. *EMBO J.* 1989;8(1):133-136.
- Dildrop R, et al. IgH enhancer-mediated deregulation of N-myc gene expression in transgenic mice: generation of lymphoid neoplasias that lack c-myc expression. *EMBO J.* 1989;8(4):1121-1128.
- Kawagoe H, et al. Overexpression of N-myc rapidly causes acute myeloid leukemia in mice. *Cancer Res.* 2007;67(22):10677-10685.
- Haeflrich T, et al. Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia:

- report from the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group. *J Clin Oncol.* 2010;28(15):2529-2537.
8. Van Vlierberghe P, et al. The recurrent SET-NUP214 fusion as a new HOXA activation mechanism in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2008;111(9):4668-4680.

P031

STUDIO AHOPCA-LLA 2008 PER LA CURA DELLA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA IN ETÀ PEDIATRICA NEI PAESI DEL CENTRO AMERICA: RISULTATI PRELIMINARI

V. Conter,¹ M. Navarrete,² E. Rossi,³ R. Vasquez,⁴ L. Fu,⁵ C.M. Pacheco Espinoza,⁶ H. Rodriguez,⁷ R. Batista,⁸ M.G. Valsecchi,³ E. Brivio,¹ G. Masera¹

¹Dipartimento di Emato-Oncologia, Ospedale San Gerardo, Monza (MB), Italy; ²Dipartimento di Ematologia, Hospital Nacional de Niños "Dr. Carlos Saenz Herrera", San José, Costa Rica; ³Dipartimento di Scienze della Salute, Università di Milano Bicocca, Monza (MB), Italy; ⁴Dipartimento di Emato-Oncologia, Hospital Benjamin Bloom, San Salvador, El Salvador; ⁵Dipartimento di Emato-Oncologia, Hospital Escuela "Francisco Morazan", Tegucigalpa, Honduras; ⁶Dipartimento di Emato-Oncologia, Hospital Infantil "Manuel de Jesus Rivera", Managua, Nicaragua; ⁷Dipartimento di Emato-Oncologia, Hospital del Niño, Panama City, Panama; ⁸Dipartimento di Ematologia Pediatrica, Hospital José Domingo de Obaldí, Chiriquí, Panama

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Programmi di cooperazione internazionale supportati dalla Monza International School of Pediatric Hematology-Oncology (MISPHO) e dall'International Outreach Program (IOP) del St. Jude Children's Research Hospital di Memphis hanno favorito la nascita di un gruppo cooperativo per la cura dei tumori infantili in Centro America (AHOPCA - Asociación de Hemato-Oncologia Pediátrica de Centro América). Dal 2008 Costa Rica, Honduras, Nicaragua, El Salvador e Panama utilizzano un protocollo comune per la cura della leucemia linfoblastica acuta (AHOPCA-LLA 2008), che è basato sulla strategia terapeutica dei protocolli BFM e adattato alla realtà di paesi a risorse limitate. I dati, che vengono sistematicamente registrati nel database POND, consentono l'analisi comparativa dei risultati ottenuti per sottogruppi di pazienti che potrebbero beneficiare di nuove strategie terapeutiche.

METODI: Sono arruolati nel protocollo AHOPCA-LLA 2008 tutti i pazienti con diagnosi di LLA-B o T (definita mediante analisi morfologica o citochimica) di età <18 anni, che non abbiano ricevuto altro trattamento in precedenza. I pazienti vengono stratificati in tre classi di rischio (Standard, RS; Intermedio, RI; Alto, RA) sulla base dell'età, della conta leucocitaria alla diagnosi, dell'immunofenotipo, dell'interessamento testicolare o del sistema nervoso centrale, della presenza di traslocazioni o ipodiploidia, della risposta periferica alla terapia con prednisone e della risposta midollare alla terapia di Induzione. Il trattamento prevede per i pazienti RS una fase di induzione di 5 settimane con 3 farmaci (prednisone, vincristina, L-asparaginasi), una fase di consolidamento (MTX 2g/m² in 4 ore x4), una reinduzione (Protocollo III-BFM) e una fase di mantenimento con 6-mercaptopurina, MTX e terapia intratecale protratta. Per i pazienti RI e RA è prevista un'induzione della durata di 9 settimane composta dalle fasi Ia e Ib dei protocolli BFM. Nella fase Ia viene somministrata anche daunorubicina, 2 dosi per RI e 4 dosi per RA. Nella fase di consolidamento la dose di MTX è di 2 g/m² per il RI e di 5 g/m² per il RA, in 4 ore. Il protocollo di reinduzione (Protocollo III-BFM) viene ripetuto 2 e 3 volte rispettivamente per RI e RA. Ad un sottogruppo appartenente al RA viene somministrata la radioterapia (RT) craniale. Gli eventi considerati nella stima dell'EFS sono stati la resistenza alla terapia, la morte e la ricaduta di malattia. L'abbandono di terapia è stato valutato come evento nell'analisi principale.

RISULTATI: Dal 01/08/2008 al 31/07/2012 sono stati arruolati nello studio AHOPCA-LLA 2008 complessivamente 1313 pazienti suddivisi nei 3 gruppi di rischio: 353 RS, 548 RI, 412 RA. Il 7.3% dei pazienti è stato trattato anche con RT craniale. La mortalità in induzione e la mortalità in remissione completa (RC) sono state del 3.0% e del 3.3% rispettivamente. L'incidenza di "abbandono della terapia" è stata del 2.7% dei pazienti in fase di induzione e del 7.0% in fase di RC. I pazienti resistenti alla terapia sono stati l'1.1%. Il 93.2% dei pazienti ha raggiunto la remissione completa di malattia. Considerando i diversi gruppi di rischio, l'incidenza cumulativa di ricaduta a 3 anni è risultata del 19% (ES=3.0) per RS, del 24% (ES=2.7) per RI e del 37% (ES=3.7) per RA. L'EFS a 3 anni dalla diagnosi, con abbandono considerato come evento, è stato del 68.5% (3.2) per RS, del 62.1%(2.6) per RI e del 47.8% (3.2) per RA. È stata eseguita anche un'analisi secondaria in cui i pazienti sono stati censurati al momento dell'abbandono. L'EFS con abbandono censurato è stata rispettivamente del 77.9% (3.7), 69.3% (2.7) e 53.2% (3.4) nei pazienti a RS, RI e RA. Dall'analisi del sottogruppo di pazienti classificati a RI (n=529) è stato evidenziato che

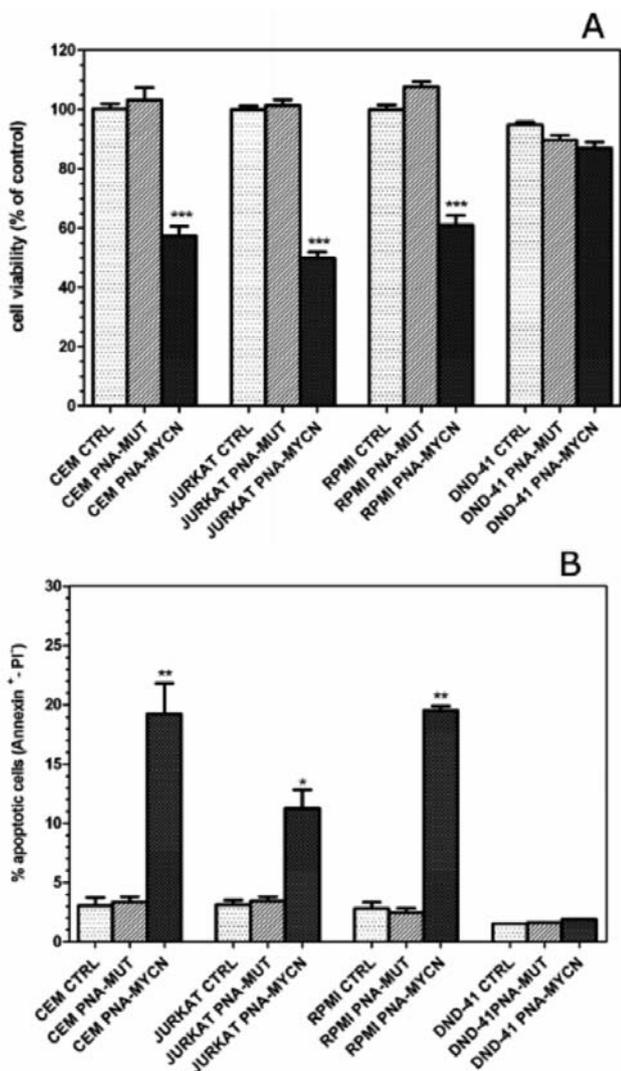


Figura 2.

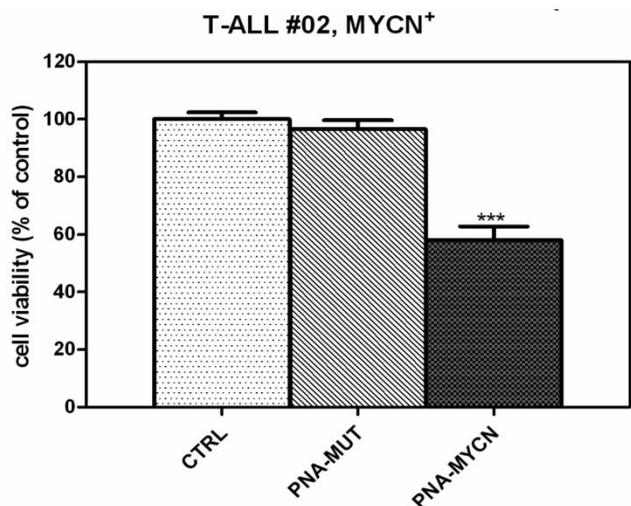


Figura 3.

le ricadute di malattia sono state del 13.8% per i pazienti <10 anni e del 19.8% per i ≥ 10 anni. Il modello di Cox ha dimostrato che all'interno del RI, i pazienti di età ≥ 10 anni hanno un rischio maggiore e statisticamente significativo di ricaduta di malattia (HR 1.85; P-value=0.0085). Non è risultata, invece, associata ad un rischio maggiore di ricaduta di malattia la conta leucocitaria alla diagnosi (≥ 50.000 vs < 50.000 : HR 1.08; P-value=1.7634).

CONCLUSIONI: Lo studio evidenzia la fattibilità del protocollo AHOPCA-LLA 2008 nei cinque paesi in cui viene applicato, avendo ottenuto risultati di outcome generale soddisfacenti per gli standard di paesi a risorse limitate. La mortalità e l'“abbandono di terapia”, sia in induzione che in remissione completa, pur rientrando nei limiti attesi, rimangono i maggiori ostacoli al raggiungimento di buoni risultati del trattamento. Nel gruppo di pazienti di età ≥ 10 anni si è riscontrata una tossicità accettabile e un'incidenza di ricadute superiore alle attese, consentendo di ipotizzare un beneficio da una terapia più intensa. In particolare si può considerare una intensificazione della terapia di induzione con 4 dosi di daunorubicina, anziché 2. La somministrazione di 2 g/m² di MTX in 4 ore in fase di consolidamento potrebbe essere poco efficace, considerando che viene effettuata una rescue generosa di leucovorin per l'impossibilità di monitorare i livelli di metotrexatemia (5 dosi ogni 6 ore a partire da 36 ore dall'inizio della somministrazione di MTX). Dati della letteratura evidenziano come alte dosi di leucovorin siano associate ad un maggior rischio di ricaduta di malattia nella LLA pediatrica (anche in presenza di alti livelli ematici di MTX).¹⁻³ Uno studio dell'ALL-REZ BFM ha dimostrato pari efficacia per 1 g/m² di MTX in infusione di 36 ore rispetto a 5 g/m² in infusione di 24 ore.⁴ Potrebbe quindi essere di beneficio, per il gruppo di pazienti di età ≥ 10 anni, la somministrazione in consolidamento di 1 g/m² di MTX in 36 ore. Questo schema terapeutico consente un utile risparmio di risorse, non è associato a tossicità renale acuta rilevante e non necessita di un monitoraggio della metotrexatemia (non attuabile in molti paesi AHOPCA). Infine va considerato che nei pazienti adolescenti esiste un problema di compliance alla terapia e questo problema potrebbe essere ancora più rilevante nei LIC. Potrebbe quindi essere di vantaggio una terapia di mantenimento somministrata almeno in parte per via parenterale in ambiente ospedaliero. Questi aspetti saranno considerati per il nuovo protocollo AHOPCA.

Bibliografia:

- Skärby TV, Anderson H, Heldrup J, Kanerva JA, Seidel H, Schmiegelow K; Nordic Society of Paediatric Haematology and Oncology (NOPHO). High leucovorin doses during high-dose methotrexate treatment may reduce the cure rate in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2006 Nov;20(11):1955-62. Epub 2006 Sep 21.
- Mikkelsen TS, Sparreboom A, Cheng C, Zhou Y, Boyett JM, Raimondi SC, Panetta JC, Bowman WP, Sandlund JT, Pui CH, Relling MV, Evans WE. Shortening infusion time for high-dose methotrexate alters antileukemic effects: a randomized prospective clinical trial. *J Clin Oncol*. 2011 May 1;29(13):1771-8
- Pui CH, Relling MV, Sandlund JT, Downing JR, Campana D, Evans WE. Rationale and design of Total Therapy Study XV for newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol*. 2004;83 Suppl 1:S124-6.
- von Stackelberg A, Hartmann R, Bühner C, Fengler R, Janka-Schaub G, Reiter A, Mann G, Schmiegelow K, Ratei R, Klingebiel T, Ritter J, Henze G; ALL-REZ BFM Study Group. High-dose compared with intermediate-dose methotrexate in children with a first relapse of acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2008 Mar 1;111(5):2573-80

P032

SCREENING DI NUOVE ABERRAZIONI GENETICHE NELLE LEUCEMIE MIELOIDI ACUTE PEDIATRICHE: RESOCONTO DEL GRUPPO AIEOP AML-2002

M. Pigazzi,¹ E. Manara,¹ V. Bisio,¹ S. Aveic,¹ S. Gelain,¹ R. Masetti,² G. Menna,³ M. Zecca,⁴ A. Pession,² F. Locatelli,⁵ G. Basso¹

¹Dipartimento di Salute di Donna e del Bambino, Università di Padova, Padova; ²Dipartimento di Pediatria, “Lalla Seragnoli”, Università di Bologna, Bologna; ³Ospedale Santobono-Pausillipon, Napoli; ⁴Oncoematologia Pediatrica, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia; ⁵Dipartimento di Pediatria Ematologia-Oncologia, IRCCS Ospedale Bambino Gesù, Roma, Italy

Le leucemie mieloidi acute (LMA) sono un disordine clonale originato dalla trasformazione neoplastica di una primitiva cellula staminale ematopoietica multipotente e caratterizzato da un'aberrante proliferazione, differenziazione e maturazione dei progenitori ematopoietici. L'elevata eterogeneità di questa patologia è sostenuta dalla notevole varietà dei danni genetici che la possono determinare, ed è evidenziabile su base morfologica, nell'espressione dei markers superficiali e profondi delle cellule leucemiche, nelle diverse cinetiche di proliferazione cellulare, e infine nella risposta alla terapia. La ricerca di nuove lesioni genetiche e mutazioni nelle LMA costituisce uno dei punti cruciali per la comprensione della leucemogenesi, e soprattutto nell'identificare nuovi sottogruppi di pazienti con LMA a diversa prognosi (1,2). Nel presente lavoro abbiamo valutato l'incidenza di alcune anomalie genetiche rare, tra cui del(4)(q12) *FIP1L1-PDGFR*, t(16;21)(p11;q22) *FUS-ERG*, t(8;16)(p11;p13) *MOZ-CBP*, t(11;17)(q23,q12-21) *MLL-AF17*, t(4;11)(q35;q23) *MLL-ArgB2*, t(5;11)(q35;p15.5) *NUP98-NSD1*, t(3;5)(q25;q34) *NPM1-MLF1*, e *MLLPTD*, in 306 pazienti affetti da LMA, arruolati presso i centri AIEOP dal 2000 al 2009. I pazienti con diagnosi di LMA de novo, non promielocitica, e risultati negativi per i riarrangiamenti ricorrenti ai geni *MLL*, *CBF* e *FLT3* sono stati utilizzati per uno screening in multiplex RT-PCR. Il sequenziamento diretto con metodo Sanger è stato poi applicato a tutti i casi positivi per caratterizzare il breakpoint di fusione. I risultati rivelano che 1 solo paziente sull'intera coorte era positivo per tre delle traslocazioni studiate, cioè per la t(16;21)(p11;q22)*FUS-ERG*, la t(11;17)(q23,q12-21) *MLL-AF17* e la t(4;11)(q35;q23) *MLL-ArgB2* suggerendo che questi riarrangiamenti sono estremamente rari in LMA dell'età pediatrica. Sono invece risultati positivi 2 pazienti per la del(4)(q12) *FIP1L1-PDGFR*, 4 per la t(8;16)(p11;p13) *MOZ-CBP*, 6 pazienti (2%) per la t(3;5)(q25;q34) *NPM1-MLF1*, 6 (2%) per *MLLPTD*, e 6 (2%) per la t(5;11)(q35;p15.5)*NUP98-NSD1*. Siccome quest'ultima aberrazione è stata precedentemente riportata da Hollink et al. (3) essere più frequente nelle LMA a causa di una forte associazione con *FLT3ITD* (91% dei casi), abbiamo esteso lo screening delle t(5;11) in 42 casi LMA con mutazione *FLT3ITD*, arruolati presso i centri AIEOP. Abbiamo trovato 6 casi positivi su 42 (14%) per la fusione *NUP98-NSD1*. Pertanto, 6 dei 12 pazienti positivi per *NUP98-NSD1* (50%) sono anche *FLT3ITD* positivi, mostrando una minore associazione nella nostra coorte pediatrica per queste 2 aberrazioni rispetto a quanto riportato da Hollink et al. Infine, abbiamo esaminato la sopravvivenza libera da eventi (EFS) dei pazienti con t(5;11)*NUP98-NSD1* (n=12) che si è rivelata peggiore rispetto ai pazienti negativi e arruolati nel protocollo LAM 2002 (30,1% vs 57,1% a 3 anni, $p < .05$). Inoltre, analizzando i pazienti con entrambe le mutazioni, t(5;11) e *FLT3ITD* abbiamo scoperto che la concomitanza delle aberrazioni ha un significato prognostico negativo sui casi *FLT3ITD*, che infatti a 8 anni hanno una EFS del 33,3% se *FLT3ITD* positivi con t(5;11), rispetto al 42,7% con *FLT3ITD* isolata ($p=0,2$). Non è stata trovata alcuna differenza nelle caratteristiche cliniche o biologiche tra i pazienti con t(5;11) e quelli con t(5;11) e *FLT3ITD*. Questi risultati suggeriscono che la fusione *NUP98-NSD1* identifica un sottogruppo di pazienti *FLT3ITD* con una prognosi peggiore. Infine, abbiamo valutato se *MLLPTD* presente nel 2% delle LMA pediatriche all'esordio può svolgere un ruolo nella comparsa della recidiva, e quindi lo screening è stato effettuato in 40 campioni di ricaduta LMA, ma non abbiamo identificato questa anomalia in nessun caso. Per contro, i 4 pazienti positivi alla diagnosi presentavano alla recidiva la stessa anomalia *MLLPTD*, suggerendo la stabilità di questa mutazione. In sintesi, si conferma che t(5;11) non è eccezionale nella LMA pediatrica, è frequentemente associata a *FLT3ITD*, e identifica un nuovo sottogruppo di pazienti ad alto rischio di fallimento del trattamento. Il ruolo delle restanti anomalie rare qui descritte, resta da confermare in futuri studi prospettici dove un più grande numero di pazienti potrà garantire la valutazione prognostica di questi nuovi markers.

Bibliografia:

- Pigazzi M, Masetti R, Martinolli F, Manara E, Beghin A, Rondelli R, Locatelli F, Fagioli F, Pession A, Basso G. Presence of high-ERG expression is an independent unfavorable prognostic marker in MLL-rearranged childhood myeloid leukemia. *Blood*. 2012 Jan 26;119(4):1086-7.
- Pigazzi M, Masetti R, Bresolin S, Beghin A, Di Meglio A, Gelain S, Trentin L, Baron E, Giordan M, Zangrando A, Buldini B, Leszl A, Putti MC, Rizzari C, Locatelli F, Pession A, Te Kronnie G, Basso G. MLL partner genes drive distinct gene expression profiles and genomic alterations in pediatric acute myeloid leukemia: an AIEOP study. *Leukemia*. 2011 Mar;25(3):560-3.
- Hollink IH, van den Heuvel-Eibrink MM, Arentsen-Peters ST,

Pratcorona M, Abbas S, Kuipers JE, van Galen JF, Beverloo HB, Sonneveld E, Kaspers GJ, Trka J, Baruchel A, Zimmermann M, Creutzig U, Reinhardt D, Pieters R, Valk PJ, Zwaan CM. NUP98/NSD1 characterizes a novel poor prognostic group in acute myeloid leukemia with a distinct HOX gene expression pattern. *Blood*. 2011 Sep 29;118(13):3645-56.

P033

LEUCEMIA LINFOIDE ACUTA DEL BAMBINO A CELLULE T. VALUTAZIONE DEL SIGNIFICATO CLINICO E PROGNOSTICO DEL SIL/TAL NEI BAMBINI ITALIANI ARRUOLATI NEI PROTOCOLLI AIEOP LAL 2000-R2006

M. D'Angiò,¹ G. Cazzaniga,² V. Nunes,¹ V. Conter,³ G. Basso,⁴ M.G. Valsecchi,⁵ D. Silvestri,⁵ F. Locatelli,⁶ R. Parasole,⁷ E. Barisoni,⁸ N. Santoro,⁹ M.C. Putti,⁴ A.M. Testi¹

¹Dipartimento Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università Sapienza, Roma; ²Centro di Ricerca Tettamanti, Ospedale San Gerardo, Monza (MB); ³Dipartimento di Pediatria, Ospedale San Gerardo, Monza (MB); ⁴Dipartimento di Pediatria, AO, Università degli Studi di Padova, Padova; ⁵Centro Operativo di Ricerca Statistica, Università Milano Bicocca, Milano; ⁶Oncoematologia Pediatrica, Ospedale Bambino Gesù, Roma; ⁷Dipartimento di Oncoematologia Pediatrica, Ospedale Pausillipon, Napoli; ⁸Divisione di Oncoematologia Pediatrica, Ospedale Pediatrico Regina Margherita, Torino; ⁹Unità di Oncoematologia Pediatrica, Università di Bari, Bari, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Sebbene le alterazioni del gene TAL1 (1p32) costituiscano alcuni tra i più comuni difetti genetici nelle Leucemie Acute Linfoidi (LAL) T del bambino, il significato clinico e prognostico di tali riarrangiamenti, e tra questi quello del Sil/TAL, risulta di difficile definizione. Ciò potrebbe essere attribuito da una parte alla scarsità e alla discordanza dei dati pubblicati in letteratura, dall'altra alla carenza di studi clinici rivolti a valutare il valore di tali alterazioni in pazienti arruolati in protocolli di cura più moderni ed intensivi. È stata condotta una analisi su pazienti pediatrici affetti da LAL T arruolati nei protocolli AIEOP allo scopo di definire l'incidenza del Sil/TAL, di valutare l'associazione tra tale alterazione genica e le caratteristiche clinico biologiche della malattia e di definirne l'eventuale impatto prognostico.

METODI: Sono stati analizzati mediante PCR qualitativa 359 campioni di pazienti pediatrici affetti da LAL T diagnosticati e trattati secondo i protocolli AIEOP LAL 2000 e AIEOP LAL 2000/R2006 nei centri AIEOP da settembre 2000 a dicembre 2009. Sono state quindi confrontate le caratteristiche clinico-biologiche della malattia (età, sesso, stadio maturativo della cellula neoplastica, numero di globuli bianchi all'esordio), la risposta al trattamento (risposta alla fase presteroidica, stato del paziente al termine delle fasi Ia e Ib, livelli di malattia minima residua (Ig/TCR-MMR)) e le percentuali di sopravvivenza libera da eventi (EFS) e di incidenza cumulativa di recidiva in due gruppi di pazienti discriminati in base alla positività del Sil/TAL1 db1.

RISULTATI: La presenza del riarrangiamento db1 del gene di fusione Sil/TAL1 è stata riscontrata nel 14,5% (52/359) della popolazione analizzata; il restante 85,5% (307/359) non presentava evidenza dell'alterazione. L'età mediana dell'intero campione è stata 8,3 anni (9,5 e 8,1 anni rispettivamente nei pazienti Sil/TAL1 positivi e negativi). Sebbene non statisticamente significativa, la percentuale di casi Sil/TAL1 positivi è risultata maggiore nella fascia di età superiore a 10 aa a differenza di quanto rilevato nel gruppo di pazienti negativi in cui la frequenza dell'alterazione era sovrapponibile nelle tre fasce di età considerate (1-5 aa, 6-9 aa, ≥10aa). Nessuna differenza è stata osservata nelle due coorti relativamente alla distribuzione dei pazienti per sesso e stadio maturativo delle cellule leucemiche (Tabella 1). La mediana dei globuli bianchi (GB) alla diagnosi è risultata più elevata nel gruppo di pazienti positivi rispetto ai negativi (rispettivamente 182,7 x10⁹/L vs 69,1 x10⁹/L). Il 62% (32/52) dei Sil/TAL1 positivi si collocava nel gruppo con GB ≥100 x10⁹/L mentre solo il 39% dei pazienti negativi presentava all'esordio GB ≥100 x10⁹/L con una differenza statisticamente significativa. Trentotrenta/359 (92%) bambini sono risultati valutabili per la risposta allo sterode: 216 (65%) hanno ottenuto una buona risposta (PGR); i restanti 114 (35%) non hanno ottenuto una risposta soddisfacente (PPR). Il 44% dei bambini Sil/TAL1 positivi sono risultati PPR vs il 30% dei pazienti negativi con una mediana di cellule leucemiche circolanti rispettivamente di 11,8 vs 8,2 x10⁹/L.

Conseguentemente la percentuale di pazienti ad alto rischio è risultata superiore nei Sil/TAL1 positivi (50%) rispetto ai negativi (39%). Nessuna differenza è stata rilevata, nei due gruppi analizzati, relativamente alla risposta alla terapia d'induzione Ia (RC 81% vs 88%; resistenti 4% vs 7%) e alla stratificazione dei pazienti per livelli di MMR ai due punti di valutazione previsti (17%vs16%, 52%vs42%, 10%vs11% rispettivamente per Sil/TAL1 positivi e negativi nei gruppi alto, intermedio e basso rischio). Sono state inoltre prese in considerazione il numero e il tipo di recidiva nei pazienti appartenenti ai due gruppi. Su un totale di 79 recidive 12 si sono verificate nel gruppo di pazienti portatori dell'anomalia genica, 67 nei pazienti negativi. Analizzando la localizzazione delle recidive è emersa una maggiore frequenza di recidive (8/12; 67%) extramidollari nel gruppo di pazienti Sil/TAL1 positivi (4 recidive del sistema nervoso centrale, 1 testicolare, 2 linfonodali, di cui una mediastinica e 1 combinata midollare ed extramidollare). Nel gruppo di pazienti negativi la distribuzione tra recidive midollari ed extramidollari è risultata sovrapponibile (rispettivamente 39 (57%) midollari e 29 (43%) extramidollari). Infine è stato valutato l'impatto della presenza del Sil/TAL1 sulla EFS e sull'incidenza cumulativa di recidive nei due gruppi considerati; nessuna differenza statisticamente significativa è stata dimostrata tra i due gruppi di pazienti sia in termini di EFS che di incidenza cumulativa di recidive (EFS 70% vs 64%, p=0,49; incidenza cumulativa di recidiva 24% vs 27%, p= 0,52).

CONCLUSIONI: I risultati ottenuti confermano i dati precedentemente pubblicati in letteratura su casistiche meno ampie. Come descritto dal POG¹ si conferma la correlazione tra Sil/TAL1 e un valore medio più elevato di globuli bianchi alla diagnosi. In accordo con quanto pubblicato da Cavè et al.² e da Ballerini et al.³ è stato possibile osservare una maggiore frequenza di pazienti resistenti alla terapia steroidica nel gruppo Sil/TAL1, sebbene la valutazione della risposta all'induzione mediante studio della MMR molecolare non dimostri differenze tra i due gruppi di pazienti analizzati. Un dato interessante riguarda la crescente espressione del gene di fusione con l'aumentare dell'età osservato anche nella nostra casistica. Tale risultato, alla luce della scarsa frequenza di questa alterazione nell'età adulta, ne suggerisce una maggiore incidenza nell'adolescente e nel giovane adulto^{2,4}. La presenza dell'anomalia genica, nella nostra casistica, non sembra avere un impatto indipendente sulla sopravvivenza. Dall'analisi condotta emerge, tuttavia, un dato interessante relativo alla maggiore frequenza di recidive extramidollari osservata nel gruppo di pazienti positivi come a suggerire il valore predittivo positivo di tale alterazione rispetto ad eventuali recidive in sedi extramidollari. I dati descritti saranno ulteriormente integrati dalla valutazione del più raro riarrangiamento genico Sil/TAL1 db2 al fine di confermare i risultati ottenuti.

Tabella 1. Caratteristiche dei 359 pazienti analizzati per Sil/TAL1.

Caratteristica	N° (%) Sil/TAL +	N° (%) Sil/TAL -	p
Età			0,35
1-5 aa	15 (29%)	95 (31%)	
6-9 aa	12 (23%)	95 (31%)	
≥10 aa	25 (48%)	117 (38%)	
Sesso			0,02
M	47 (90%)	233 (76%)	
F	5 (10%)	74 (24%)	
Immunofenotipo			0,18
Early T	24 (46%)	113 (37%)	
Thym-Thym/T	15 (29%)	133 (43%)	
T Matura	6 (12%)	37 (12%)	
Altro	7 (13%)	24 (8%)	
GB alla diagnosi			<0,001
< 20 x 10 ⁹ /L	6 (11,5%)	68 (22%)	
20-100 x 10 ⁹ /L	8 (15%)	111 (36%)	
≥100 x 10 ⁹ /L	32 (61,5%)	118 (39%)	
Non noto	6 (11,5%)	10 (3%)	
Totale	52 (14,5%)	307 (85,5%)	

Bibliografia:

- Bash RO, Crist WM, Shuster JJ et al. Clinical features and outcome of T cell acute lymphoblastic leukemia in childhood with respect to alterations at the TAL1 locus: a Pediatric Oncology Group study. *Blood* 1993; 81: 2110-2117.
- Cavè H, Suci S., Preudhomme C et al. Clinical significance of

HOX11L2 expression linked to t(5;14)(q35;q32), of HOX11 expression, and SIL-TAL fusion in childhood T-Cell malignancies: results of EORTC studies 58881 and 58951. *Blood* 2004; 103:442-450.

- Ballerini P, Landman Parker J, Cayuela JM. Impact of genotype on survival of children with T cell acute lymphoblastic leukemia treated according to the French protocol FRALLE 93: the effect of TLX3/HOX11L2 gene expression on outcome. *Haematologica* 2008; 93(11): 1659-1665.
- Stock W, Westbrook CA, Sher DA, et al. Low incidence of TAL1 gene rearrangements in adult acute lymphoblastic leukemia: A cancer and Leukemia group B study (8762). *Clin Cancer Res*.1995;1:459-463.
- Kikuchi A, Hayashi Y, Kobayashi s. et al. Clinical significance of TAL1 gene alteration in childhood T cell acute lymphoblastic leukemia and lymphoma. *Leukemia* 1993; 7: 933-938.
- Van Grotel M, Meijerink J, Berna Beverloo H. The outcome of molecular cytogenetic subgroups in pediatric T cell acute lymphoblastic leukemia; a retrospective study of patients treated according to DCOG or COALL protocols. *Haematologica* 2006; 91(9): 1212-1221.

P034

INFANTS ARRUOLATI AL PROTOCOLLO AIEOP LAM 2002/01: CARATTERISTICHE CLINICHE, BIOLOGICHE E OUTCOME

R. Masetti,¹ R.Rondelli,² C. Rizzari,³ N. Santoro,⁴ L. Lo Nigro,⁵ M. Luciani,⁶ G. Menna,⁷ M. Pigazzi,⁸ G. Basso,⁸ A. Pession,¹ F. Locatelli⁹

¹Oncologia ed Ematologia Pediatrica, Università di Bologna, Bologna; ²Oncologia ed Ematologia Pediatrica, Bologna, Bologna; ³Oncologia ed Ematologia Pediatrica, Ospedale San Gerardo, Monza (MB); ⁴Oncologia ed Ematologia Pediatrica, Bari, Bari; ⁵Oncologia ed Ematologia Pediatrica, Catania, Catania; ⁶Oncologia ed Ematologia Pediatrica, Ospedale Bambin Gesù, Roma; ⁷Oncologia ed Ematologia Pediatrica, Napoli Pausillipon, Napoli; ⁸Oncologia ed Ematologia Pediatrica, Università di Padova, Padova; ⁹Oncologia ed Ematologia Pediatrica, Ospedale Pediatrico Bambin Gesù, Roma, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: I pazienti (pz) di meno di un anno di età (infants) affetti da Leucemia Acuta Mieloide (LAM) sono un sottogruppo generalmente considerato a prognosi sfavorevole, per l'alta incidenza di caratteristiche citogenetiche e molecolari sfavorevoli ed il particolare profilo di suscettibilità al trattamento chemioterapico. L'obiettivo è riportare le caratteristiche cliniche, citogenetiche e biologico-molecolari oltre che i ragguardevoli risultati di outcome del sottogruppo degli infants arruolati al Protocollo AIEOP LAM 2002/01 e compararli con quelli delle altre fasce di età.

METODI: Per i pazienti trattati secondo Protocollo LAM 2002/01 sono state comparate statisticamente (Fisher Test) le caratteristiche cliniche all'esordio, citogenetiche, biologico molecolari delle seguenti fasce di età: ≤1 anno, 1-2 anni, 2-10 anni and >10 anni. Per le medesime fasce di età sono state calcolate la probabilità a 8 anni (FUP mediano di 57 mesi, range 6-130) di Overall Survival (OS), Event Free Survival (EFS), Disease Free Survival (DFS), Incidenza Cumulativa (CI) di recidiva e morte in remissione completa (RC) e sono state comparate con Log Rank Test. è stata condotta un'analisi uni e multi-variata per stabilire quali fossero le variabili cliniche e biologiche potenzialmente influenzanti l'outcome degli infants.

RISULTATI: Gli infant analizzati sono stati 63 (32 femmine e 31 maschi) con una età media di 7 mesi (range 2-12) alla diagnosi, su 482 pazienti arruolati al Protocollo AIEOP LAM 2002/01. La distribuzione del numero di pazienti per fasce di età è stata la seguente: ≤1 anno =63 (13%), 1-2 anni =52(11%), 2-10 anni =181 (38%), >10 anni =186 (39%). Come mostrato nella Tabella 1a, dal punto di vista delle caratteristiche cliniche all'esordio gli infants presentano in maniera significativamente più frequente (P<0.05) una più alta conta dei globuli bianchi, la localizzazione di malattia al sistema nervoso centrale, il FAB M5 ed M7 mentre i FAB M1 e M2 sono invece più caratteristici dei pz >2 anni. Relativamente alle caratteristiche citogenetiche e biologico molecolari (Tabella 1b) gli infants si distinguono per una significativamente più bassa incidenza di caratteristiche citogenetiche sfavorevoli, per una più alta frequenza dei riarrangiamenti del gene *MLL* (in assenza di un partner significativamente più frequente), e una più bassa incidenza di mutazioni dei geni *FLT3*, *NPM* e *CEBPA*. Quarantuno infants su 63 hanno ricevuto un TCSE in prima RC (7 AUTO and 34 ALLO) raggiungendo i seguenti

risultati di outcome (Figura 1): OS, EFS e DFS a 8 anni del 74% (SE 5.7), 55% (SE 6.4) e 65% (SE 6.7) rispettivamente e CI di recidiva e di morte in CR pari al 31% (SE 6.5) e 4% (SE1.0). La mortalità correlata al trapianto è stata dell'1%. Questi risultati non differiscono significativamente da quelli delle altre fasce di età. All'interno del gruppo degli infants nessuna delle variabili clinico-biologiche testate si è rivelata essere significativamente associata ad un outcome peggiore.

Tabella 1. A. Riassunto delle caratteristiche cliniche. B. Citogenetiche-biologico-molecolari, all'esordio dei pazienti arruolati al Protocollo AIEOP LAM 2002/01 per fasce di età.

A

Age Groups	Infants 0-1 year N (%)	1-2 years N (%)	2-10 years N (%)	>10 years N (%)	P-Values
Number of patients	63	52	181	186	
Leukocytes (x10 ³ /mm ³ , median (range))	71 298 (3100-653 000)	46 961 (3300-671 000)	45 956 (66-475 000)	39 787 (70 165 000)	
Gender: male	31/63 (49)	24/52 (46)	103/181 (57)	104/186 (56)	0.434
CNS Leukemia	1/63 (16)	6/52 (12)	5/181 (3)	16/186 (9)	0.002
Extramedullary Leukemia (Non-CNS)	9/63 (15)	6/52 (12)	30/181 (17)	32/186 (18)	0.809
Leukocytes >100.000	13/63 (21)	9/52 (17)	25/181 (14)	30/186 (16)	0.568
FAB Subtypes					
FAB M0	8/63 (13)	4/52 (8)	9/181 (5)	13/186 (7)	0.231
FAB M1	8/63 (13)	5/52 (10)	31/181 (17)	44/186 (24)	0.042
FAB M2	3/63 (5)	1/52 (2)	45/181 (25)	42/186 (23)	<0.001
FAB M4	1/63 (16)	4/52 (8)	34/181 (19)	35/186 (19)	0.103
FAB M5	2/63 (32)	17/52 (33)	40/181 (22)	40/186 (22)	0.133
FAB M6	0/63 (0)	1/52 (2)	2/181 (1)	2/186 (1)	0.568
FAB M7	12/63 (19)	17/52 (33)	13/181 (7)	2/186 (1)	<0.001
Unclassifiable/not known	2/63 (3)	3/52 (6)	7/181 (4)	8/186 (4)	0.760

B

Cytogenetic and biological features	Infants 0-1 year N (%)	1-2 years N (%)	2-10 years N (%)	>10 years N (%)	P-Values
Pts with available cytogenetic data	58/63 (92)	46/52 (88)	156/181 (86)	158/186 (85)	0.553
Complex karyotype	6/58 (10)	3/46 (7)	9/156 (7)	11/158 (7)	0.885
Favourable cytogenetic (t(8;21)(16;16) or inv(16))	4/63 (6)	5/52 (10)	43/181 (24)	47/186 (25)	0.001
11q23/MLL-rearrangements	21/58 (36)	13/46 (30)	25/156 (13)	22/158 (14)	0.001
t(9;11)(p22;q23) and/or MLL-AF9	6/58 (10)	3/46 (7)	10/156 (6)	6/158 (5)	0.553
t(10;11)(p11;q23) and/or MLL-AF10	4/58 (7)	2/46 (4)	8/156 (4)	5/158 (3)	0.813
t(11;19)(q23;p13)	1/58 (1)	2/46 (4)	2/156 (1)	2/158 (1)	0.423
t(11;11)(variable;q23)	2/58 (4)	3/46 (7)	2/156 (1)	1/158 (1)	0.051
MLL rearrangement with other translocation partners	8/58 (14)	3/46 (7)	5/156 (3)	6/158 (4)	0.023
Patients tested for FLT3 aberrations	50/63 (79)	40/52 (77)	140/181 (77)	154/186 (83)	0.694
FLT-3 mutations	1/50(2)	2/40 (5)	10/140 (7)	39/154 (25)	<0.001
Patients tested for NPM and CEBPA aberrations	28/63 (45)	21/52 (40)	99/181 (55)	103/186 (55)	0.08
NPM mutations	1/28 (4)	0/21 (0)	7/99 (7)	7/103 (7)	0.036
CEBPA mutations	1/28 (4)	0/21 (0)	5/99 (5)	12/134 (9)	0.022

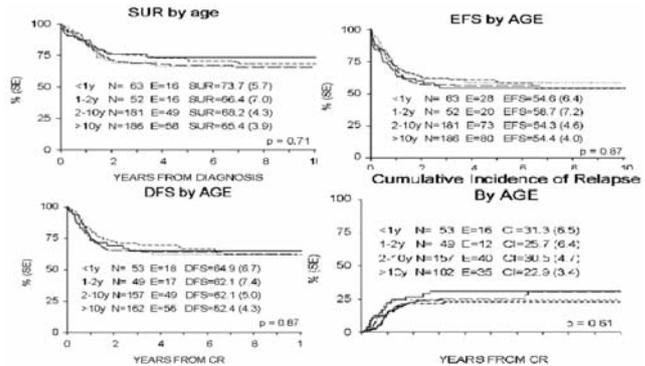


Figura 1.

CONCLUSIONI: Nonostante il sottogruppo degli infants arruolati nel Protocollo AIEOP LAM 2002/01 presenti caratteristiche cliniche e biologico-molecolari generalmente associate ad una prognosi sfavorevole, una strategia caratterizzata da un trattamento chemioterapico intensivo seguito da un importante utilizzo del TCSE in prima RC, ha permesso di ottenere risultati di outcome non differenti rispetto alle altre fasce di età. Tali risultati si allineano a quanto riportato dai più grandi gruppi collaborativi internazionali.

P035

D1H-RHEBL1: UN NUOVO TRASCRITTO DI FUSIONE, IDENTIFICATO MEDIANTE WHOLE-TRANSCRIPTOME SEQUENCING, RICORRENTE NELLO SCENARIO DELLE LEUCEMIE ACUTE MIELOIDI INFANTILI CBFA2T3-GLIS2-POSITIVE

M. Togni,¹ R. Masetti,¹ A. Astolfi,¹ M. Pigazzi,² V. Indio,³ G. Biasco,³ C. Rizzari,⁴ G. Basso,² F. Locatelli,⁵ A. Pession¹

¹Oncologia ed Ematologia Pediatrica, Università di Bologna, Bologna;

²Oncoematologia Pediatrica, Università di Padova, Padova; ³Centro Interdipartimentale Ricerca sul Cancro, Università di Bologna, Bologna; ⁴Ematologia ed Oncologia Pediatrica, Università di Milano-Bicocca, Monza (MB); ⁵Oncologia ed Ematologia Pediatrica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Le leucemie mieloidi acute pediatriche (LAM) sono un eterogeneo sottogruppo di disordini mieloproliferativi clonali secondarie a trasformazione maligna di un progenitore emopoietico o di una cellula staminale emopoietica. Recentemente, differenti studi hanno utilizzato degli approcci di sequenziamento massivo con lo scopo di chiarire il profilo mutazionale di queste leucemie e hanno fornito nuove importanti informazioni sulla complessità genetica delle LAM pediatriche. Tuttavia, circa un 20% delle LAM pediatriche non presenta nessuna delle alterazioni genetiche note e, per questo, sono definite a cariotipo normale (CN-LAM). Tra le CN-LAM pediatriche, quelle che esordiscono entro il primo anno di vita (*infant*) sono un sottogruppo estremamente poco caratterizzato dal punto di vista biologico e considerati storicamente una categoria ad alto rischio. Pertanto, l'identificazione dei profili genetici che caratterizzano questo gruppo di leucemie rimane un obiettivo primario da perseguire per consentire una corretta classificazione molecolare, per indirizzare le scelte terapeutiche, definire la prognosi e monitorare la presenza di malattia in corso di terapia o durante il follow-up. Con questo fine, recentemente, abbiamo allestito un sequenziamento massivo del trascrittoma (*Whole-transcriptome sequencing*) di 7 casi di CN-LAM infantili con lo scopo di identificare delle nuove, ricorrenti mutazioni o riarrangiamenti cromosomici che possono avere un ruolo importante nel processo di leucemogenesi e, di riflesso, nella definizione del profilo prognostico e terapeutico.

METODI: I pazienti analizzati sono bambini con CN-LAM esordita entro il primo anno di vita differente dalla leucemia acuta promielocitica arruolati nel protocollo Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica (AIEOP) 2002/01. Tutti i pazienti sequenziati sono negativi per i riarrangiamenti cromosomici noti e per alterazioni genetiche ricorrenti a carico dei geni *MLL*, *CBFB*, *NPM1* e *FLT3*. Il *whole-transcriptome sequencing* è stato effettuato sul sequenziatore di nuova generazione HiScanSQ (Illumina) a 75bp in *paired-end mode*. Le *reads* ottenute sono state mappate contro il genoma umano di riferimento mediante TopHat2/BowTie2. Il software SNVMix2 è stato utilizzato per identificare le varianti a singolo nucleotide (SNVs), mentre i software deFuse, ChimeraScan e FusionMap sono stati utilizzati per identificare i trascritti di fusione. I predittori SNP&GO e Provean sono stati utilizzati per identificare le SNVs potenzialmente associate alla patologia.

RISULTATI: Il *Whole-transcriptome sequencing* dei 7 casi di CN-LAM ha prodotto una media di 88.3 milioni di *reads* mappate/paziente con una *coverage* media di 36X. In 3 su 7 pazienti analizzati abbiamo identificato una inversione criptica del cromosoma 16 che genera un nuovo trascritto di fusione tra il gene *CBFA2T3* e il gene *GLIS2*. Il trascritto chimerico *CBFA2T3-GLIS2* è stato quindi validato (RT-PCR e sequenziamento di Sanger) in una coorte di 230 pazienti affetti da CN-LAM pediatrici e globalmente identificato in 20 pazienti (8.4%) dimostrandosi essere ricorrente non solamente nelle CN-LAM infantili, ma anche nelle LAM pediatriche a cariotipo normale. La *5-year event-free survival* (EFS) dei 20 pazienti *CBFA2T3-GLIS2*-positivi è significativamente peggiore rispetto a quella dei 217 pazienti *CBFA2T3-GLIS2*-negativi (27.4%, *standard error* [SE] 10.5 vs 59.6%, SE 3.6 $P=0.01$) (Figura 1C) e ciò indica come la presenza di questo trascritto di fusione sia associata ad una prognosi peggiore. Dati in letteratura tuttavia dimostrano come l'espressione della solo trascritto di fusione *CBFA2T3-GLIS2* non sia sufficiente a indurre la trasformazione leucemica in un modello murino. Eseguendo ulteriori analisi dei dati del sequenziamento massivo del trascrittoma abbiamo successivamente identificato in tutti e 3 i pazienti in cui avevamo inizialmente individuato il trascritto di fusione *CBFA2T3-GLIS2*, un altro trascritto di fusione appartenente alla classe dei *read-through fusion transcript*. Tale trascritto chimerico consiste nella fusione *in-frame* del 5' del gene *DHH*, membro della *Hedgehog family*, e il 3' del gene *RHEBL1*, codificante per una GTPasi appartenente alla *Ras family*, entrambi localizzati sul cromosoma 12 nello stesso orientamento, sul filamento *reverse* (Figura 1A-1B). La fusione tra l'esone 2 di *DHH* e l'esone 2 di *RHEBL1* è stata confermata mediante RT-PCR e sequenziamento di Sanger. Per determinare la ricorrenza di questo nuovo trascritto di fusione si è analizzata una coorte di 56 bambini comprendente 24 CN-LAM, 17 pazienti *CBFA2T3-GLIS2*-positivi, 12 pazienti con alterazioni genetiche/citogenetiche note (come alterazioni dei geni *MLL*, *NPM1*, *FLT3*, t(8;22)(p11;q13), t(9;11)(p22;q23), inv(16)(p13;q22)) e cellule staminali ematopoietiche CD34⁺ da 3 donatori sani. Il trascritto di fusione *DHH-*

RHEBL1 è stato identificato solamente pazienti *CBFA2T3-GLIS2*-positivi (8/20, 40% [considerando anche i 3 pazienti in cui è stato inizialmente identificato]). Per valutare se la presenza del trascritto di fusione *DHH-RHEBL1* influenzasse l'*outcome* dei pazienti *CBFA2T3-GLIS2*-positivi abbiamo infine valutato l'*8-year overall-survival* (OS). L'*8-year OS* degli 8 pazienti *DHH-RHEBL1*-positivi è peggiore rispetto a quella dei 12 pazienti *CBFA2T3-GLIS2*-positivi che non presentano il trascritto di fusione *DHH-RHEBL1* (25% vs 55%, rispettivamente) sebbene non si raggiunga una significatività statistica probabilmente a causa del ridotto numero di campioni analizzati ($P=0.1$) (Figura 1D). D'altra parte, il sequenziamento massivo del trascrittoma delle 7 CN-LAM infantili ha permesso di individuare anche 60 SNVs potenzialmente associate allo sviluppo della leucemia. Tra queste, mutazioni puntiformi ricorrenti sono state individuate a carico di geni che regolano l'apoptosi (*TRAP1* [37.5%], *BCL3* [12.5%], *MCL1* [25%]), in geni implicati nel controllo della proliferazione e del differenziamento cellulare (*RUNX3* [25%], *APBB1* [25%], *EP300* [25%]) e anche in geni appartenenti alla via di segnalazione *JAK/STAT*.

CONCLUSIONI: Mediante il sequenziamento massivo di nuova generazione del trascrittoma di 7 casi di CN-LAM infantili abbiamo identificato un nuovo ricorrente (8.4%) trascritto di fusione tra il gene *CBFA2T3* e il gene *GLIS2* associato ad un *outcome* negativo. Ulteriori analisi hanno permesso di identificare successivamente un ulteriore trascritto chimerico tra il gene *DHH* e il gene *RHEBL1* che è ricorrente (40%) e specifico del sottogruppo di pazienti *CBFA2T3-GLIS2*-positivi e che potrebbe contribuire alla trasformazione leucemica e alla definizione di un *outcome* negativo sebbene ulteriori studi siano necessari per chiarire il ruolo di questo trascritto di fusione. Unitamente a ciò il *whole-transcriptome sequencing* ha permesso di identificare differenti SNVs ricorrenti che colpiscono vari geni implicati in importanti processi cellulari confermando la complessità e la eterogeneità di questo sottogruppo di leucemie.

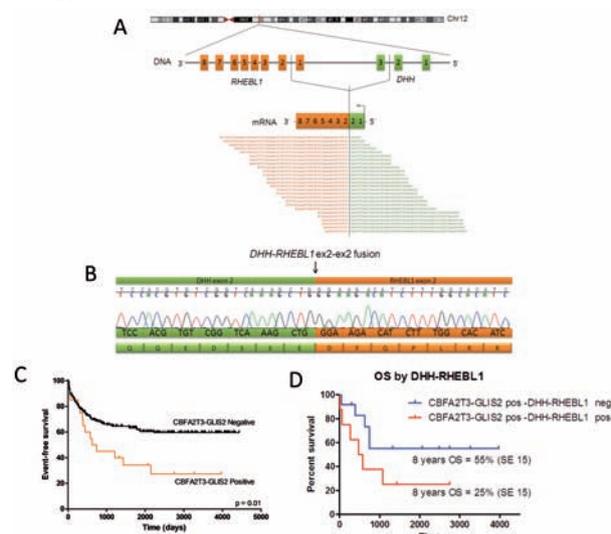


Figura 1. Nuovi trascritti di fusione identificati nelle CN-AML pediatriche mediante *whole-transcriptome sequencing*. (A) Rappresentazione schematica del locus genetico da cui origina il trascritto di fusione tra *DHH* e *RHEBL1*. (B) Elettroferogramma del punto di fusione tra l'esone 2 del gene *DHH* e l'esone 2 del gene *RHEBL1*. La freccia nera indica il punto di rottura. (C) *5-year event-free survival* (EFS) in bambini *CBFA2T3-GLIS2*-positivi (27.4%, SE 10.5) versus pazienti *CBFA2T3-GLIS2*-negativi (59.6%, SE 3.6) ($P=0.01$). (D) *8-year overall-survival* (OS) in pazienti *CBFA2T3-GLIS2*-positivi che portano anche la fusione *DHH-RHEBL1* (25%, SE 15) versus pazienti *CBFA2T3-GLIS2*-positivi che non portano la fusione *DHH-RHEBL1* (55%, SE 15) ($P=0.1$).

P036

SIGNIFICATO PROGNOSTICO DELLA MALATTIA RESIDUA CITOMETRICA NELLE LEUCEMIE MIELOIDI ACUTE DELL'ETÀ PEDIATRICA

F. Rizzati,¹ B. Buldini,¹ R. Rondelli,² R. Masetti,² S. Francescato,¹ A. Zangrando,¹ B. Michielotto,¹ A. Pession,² F. Locatelli,^{3,4} G. Basso¹

¹Università di Padova, Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino - SDB; ²Università di Bologna, Dipartimento di Pediatria "Lalla Seragnoli", Unità di Ematologia-Oncologia; ³Università di Roma, Dipartimento di Oncematologia Pediatrica, IRCCS Ospedale Bambin Gesù; ⁴Università di Pavia, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Con gli attuali protocolli terapeutici utilizzati nella cura dei pazienti pediatrici affetti da leucemia mieloide acuta (LMA), la prognosi dei pazienti è significativamente migliorata: la probabilità di *event-free-survival* (EFS) è compresa tra 40-55%. Tra i pazienti in remissione completa, il 35% ricade; ciò è dovuto, verosimilmente, alla persistenza di blasti nel midollo resistenti alla terapia. La valutazione morfologica non è in grado di individuare con certezza i blasti residui, quando presenti ad una percentuale inferiore al 5% sul totale delle cellule midollari. Nasce, pertanto, l'esigenza di utilizzare nuove metodiche dotate di maggior sensibilità, per ricercare e quantificare la malattia residua (MRM) durante le varie fasi della terapia. Obiettivi di questo studio sono quello di confermare l'applicabilità della citometria a flusso (CFM) nel monitoraggio della MRM in pazienti pediatrici affetti da LMA, definirne l'impatto prognostico (in termini di *disease-free-survival*, DFS) e considerarne il possibile utilizzo come strumento di stratificazione dei pazienti.

METODI: Nel nostro studio sono stati arruolati 142 pazienti consecutivi (unica selezione è stata la disponibilità del campione di sangue midollare) con diagnosi di LMA *de novo*, con esordio tra Maggio 2003 e Maggio 2011, in 29 centri AIEOP, arruolati nel protocollo AIEOP LAM 2002/01-02. Abbiamo valutato la MRM in CFM nell'aspirato midollare eseguito al recupero ematologico (tra i giorni +21 e +28) dopo il primo e secondo ciclo di induzione (ICE1 e ICE2). L'analisi citofluorimetrica è stata eseguita a 5 colori, mediante l'utilizzo di 1-3 combinazioni per paziente; in ogni combinazione è presente un *backbone* di tre anticorpi monoclonali, CD45(ECD)/CD33(PEcy5)/CD34(PEcy7), associato a due antigeni specifici per paziente, definiti sulla base dell'immunofenotipo dei blasti identificato alla diagnosi. Le cellule leucemiche residue sono state quantificate come percentuale di blasti, sul totale delle cellule mieloidi nucleate.

RISULTATI: La distribuzione dei 142 pazienti in base ai livelli di MRM (MRM $\geq 1\%$, MRM 0,1-1%, MRM $< 0,1\%$) al termine del primo ciclo di induzione, è riportata in Tabella 1. 69,1% dei pazienti arruolati e successivamente ricaduti presentano una MRM $\geq 0,1\%$ al primo ciclo di induzione, vs un 33,3% dei pazienti non ricaduti. Abbiamo valutato la correlazione tra i livelli di CFM-MRM, al primo e secondo ciclo di induzione terapeutica, e la *Disease Free Survival* (DFS), attraverso il metodo Kaplan-Meier. I pazienti con MRM $\geq 0,1\%$ al primo ciclo di induzione, hanno evidenziato una sopravvivenza libera da malattia a 6 anni nel $35,29\% \pm 7,23\%$ dei casi, mentre i pazienti con MRM $< 0,1\%$ si caratterizzano per una DFS a 6 anni nel $73,16\% \pm 5,62\%$ dei casi ($p < 0,01$) (Figura 1). Risultati sovrapponibili sono stati ottenuti alla valutazione del secondo ciclo di induzione ($p < 0,01$) (ICE 2).

Tabella 1.

MRM ICE I	Numero casi (n)/Frequenza relativa
MRM $\geq 1\%$	51 (35,9%)
MRM 0,1-1%	16 (11,3%)
MRM $< 0,1\%$	69 (48,6%)
MRM non valutabile	6 (4,2%)

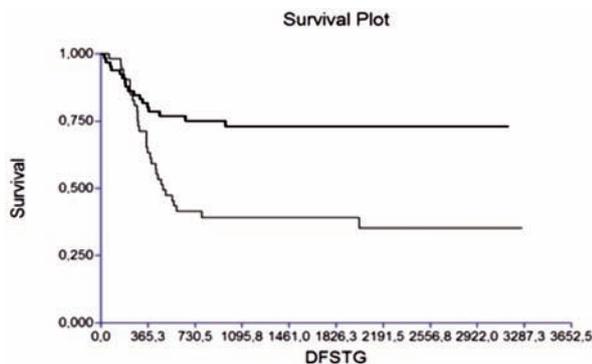


Figura 1. DFS calcolata secondo il metodo di Kaplan-Meier nei pazienti con MRM $\geq 0,1\%$, MRM $< 0,1\%$, valutata al recupero ematologico dopo il primo ciclo di induzione terapeutica (ICE I).

CONCLUSIONI: Il nostro studio ha evidenziato un'importante correlazione tra la malattia minima residua, valutata mediante citofluorimetria al termine del primo ciclo di induzione, e l'*outcome* dei pazienti. Il riscontro di un livello positivo di MRM ($\geq 0,1\%$), precocemente nel corso della terapia (termine del primo ICE1) appare significativo di una prognosi sfavorevole per il paziente. Il nostro studio conferma i dati dei gruppi americani e olandesi,¹⁻³ ottenuti in serie di pazienti diverse e trattati con protocolli terapeutici diversi e propone la MRM in citofluorimetria come standard per nuovi protocolli terapeutici.

Bibliografia:

- Rubnitz JE, Inaba H, Dahl G, Ribeiro RC, Bowman WP, Taub J, Pounds S, Razzouk BI, Lacayo NJ, Cao X, Meshinchi S, Degar B, Airewele G, Raimondi SC, Onciu M, Coustan-Smith E, Downing JR, Leung W, Pui CH, Campana D. Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia: results of the AML02 multicentre trial. *Lancet Oncol.* 2010 Jun;11(6):543-52.
- Van der Velden VHJ, A van der Sluijs-Geling, BES Gibson, JG te Marvelde, PG Hoogeveen, WCJ Hop, K Wheatley, MB Bierings, GJ Schuurhuis, SSN da Graaf, ER van Wering and JJM van Dongen Clinical Significance of flowcytometric minimal residual detection in pediatric acute myeloid leukemia patients treated according to the DCOG ANLL97/ MRC AML12 protocol. *Leukemia* 2010; 24: 1599-1606.
- Loken M, Alonzo T, Pardo L, Gerbing R, Raimondi C, Hirsch B, Ho P, Franklin J, Copper T, Gamis A, Meshinchi S. Residual disease detected by multidimensional flow cytometry signifies high relapse risk in patients with de novo acute myeloid leukemia: a report from Children's Oncology Group. *Blood* 2012, 20:1581-1588.

P037

SIGNIFICATO PROGNOSTICO DELLA MALATTIA RESIDUA MINIMA ANALIZZATA TRAMITE CITOFUORIMETRIA AL GIORNO +15 IN BAMBINI AFFETTI DA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA: UNA VALIDAZIONE PRELIMINARE

M. Gabelli,¹ B. Buldini,¹ M.G. Valsecchi,² D. Silvestri,¹ V. Conter,² S. Disarò,¹ P. Scarparo,¹ E. Bortoloso,¹ A. Zangrando,¹ G. Basso¹

¹Clinica di Oncematologia Pediatrica, Dipartimento per la Salute della Donna e del Bambino, Università degli Studi di Padova, Padova; ²Clinica Pediatrica, Università degli Studi di Milano Bicocca, Ospedale San Gerardo, Monza (MB), Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Nel trattamento della leucemia linfoblastica acuta (LLA) pediatrica individuare precocemente i pazienti ad alto rischio di recidiva permette di mettere in atto strategie terapeutiche più aggressive e di utilizzare terapie meno intense per i pazienti con prognosi favorevole. È pertanto fondamentale identificare strumenti per una precisa stratificazione dei pazienti in base al rischio di recidiva. Uno dei fattori con maggiore valore prognostico è la risposta alla terapia, tradizionalmente valutata attraverso l'analisi morfologica del sangue periferico e dell'aspirato midollare. Numerose recidive avvengono però nei pazienti in remissione completa morfologica: è chiaro pertanto che la morfologia non è sufficientemente precisa e sensibile nell'individuare eventuali cellule neoplastiche residue responsabili della ricaduta. La quota blastica non identificabile dalla morfologia viene denominata Malattia Residua Minima (MRM). Per determinare la MRM ci si avvale della Polymerase Chain Reaction (PCR) per l'individuazione di sequenze clone-specifiche (riarrangiamento di TCR e Ig) e della citofluorimetria (CF) per la determinazione di immunofenotipi associati alla leucemia. Nel protocollo BFM-AIEOP LLA2000 è stata utilizzata la PCR-MRM determinata al giorno +33 e +78 della terapia d'induzione per stratificare i pazienti in fasce di rischio a diversa prognosi e guidare il trattamento successivo. La citofluorimetria è una metodica più veloce, facilmente applicabile, meno costosa della PCR. Nel lavoro di Basso e collaboratori (*J Clin Oncol* 2009;27:5168-5174) la MRM determinata tramite citofluorimetria (CF-MRM) al giorno +15 è risultata avere un alto valore prognostico permettendo la stratificazione dei pazienti in diversi gruppi di rischio: standard ($< 0,1\%$ di blasti), intermedio (blasti 0.1-10%) ed alto (blasti $\geq 10\%$) con Event Free Survival (EFS) a 5 anni rispettivamente del 89,9%, 79,3% e 46,1%. Obiettivo di questo studio è validare tale risultato in un gruppo diverso di pazienti.

METODI: Abbiamo studiato 1318 bambini affetti da LLA trattati secondo protocollo BFM-AIEOP LLA2000 e R2006. Dopo 14 giorni di terapia con steroidi, 1 dose di daunorubicina, vincristina, asparaginasi e di metotrexate intratecale, l'aspirato midollare è stato analizzato tramite citofluorimetria a 6 colori per la determinazione della quota blastica.

RISULTATI: Sulla base della CF-MRM, come nel precedente lavoro, abbiamo stratificato i pazienti in 3 gruppi: il 36% dei pazienti era a rischio standard (<0.1% blasti/cellule nucleate), il 48% a rischio intermedio (blasti 0.1-10%), il 16% ad alto rischio (blasti ≥10%). Questi gruppi mostrano un Event Free Survival a 5 anni (Figura 1) e una Cumulative Incidence of Relapse significativamente diversi ($p<0.001$), rispettivamente del 90.1% (Errore standard SE 2.2), 79.6% (SE 3.2), 65.8% (SE 5.1) e 7.8% (SE 2.1), 18.5% (SE 3.1) e 26.9% (SE 5.0).

CONCLUSIONI: In conclusione, i nostri dati confermano il valore prognostico della MRM valutata in citofluorimetria dopo 14 giorni di terapia. Questa metodica risulta pertanto adeguata per la valutazione della risposta precoce al trattamento permettendo di identificare in meno di 24 ore quei pazienti che possono beneficiare di terapie meno aggressive. Inoltre contribuisce assieme alla PCR-MRM alla stratificazione finale dei pazienti. La citofluorimetria apre infine nuove possibilità per quei centri ove risorse limitate non permettono l'utilizzo di metodiche più costose e sofisticate per la stratificazione prognostica dei bambini affetti da LLA.

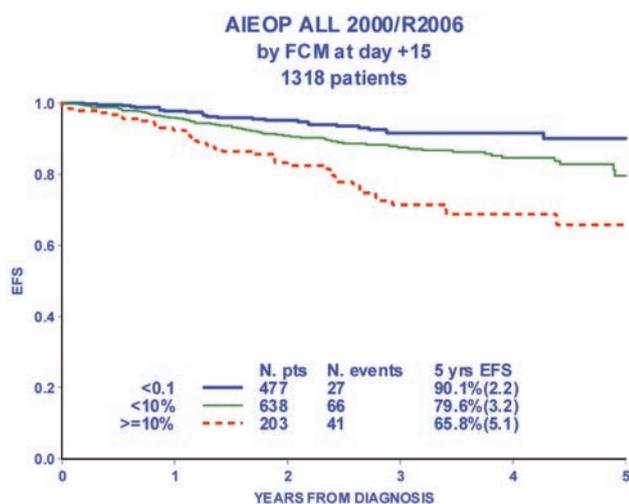


Figura 1. Event Free Survival a 5 anni (errore standard) per 1318 pazienti stratificati in 3 gruppi di rischio per CF-MRM al giorno +15 ($p<0.001$).

P038

LE DELEZIONI DEL GENE IKAROS HANNO IMPATTO PROGNOSTICO NELLA LEUCEMIA ACUTA LINFOBLASTICA B PEDIATRICA BCR-ABL1 POSITIVA

G. Cazzaniga,¹ A. van der Veer,² M. Zaliova,³ F. Mottadelli,¹ P. De Lorenzo,⁴ G. te Kronnie,⁵ C. Harrison,⁶ H. Cavé,⁷ J. Trka,⁸ V. Saha,⁹ M. Schrappe,³ R. Pieters,² M. Stanulla,³ M. den Boer,² M.G. Valsecchi,⁴ A. Biondi¹

¹Centro Ricerca Tettamanti, Clinica Pediatrica, Università Milano Bicocca, Ospedale San Gerardo, Monza (MB), Italy; ²Department of Pediatric Oncology, Erasmus MC, Sophia Children's Hospital, Rotterdam, The Netherlands; ³Department of Pediatrics, University Medical Center Schleswig-Holstein, Kiel, Germany; ⁴EsPhALL Trial Data Center, Department of Health Sciences, University of Milano-Bicocca, Monza (MB), Italy; ⁵Laboratorio di Oncoematologia, Clinica Pediatrica, Università di Padova, Padova, Italy; ⁶Leukaemia Research Cytogenetics Group, Northern Institute for cancer Research, Newcastle University, Newcastle Upon Tyne, UK; ⁷University Paris Diderot, France, APHP, Hôpital Robert Debré, Department of Genetics, Paris, France; ⁸CLIP, Childhood Leukaemia Investigation Prague, Department of Pediatric Hematology and Oncology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic; ⁹Children's Cancer Group, Manchester Academic Health Science Center, University of Manchester, Manchester, UK

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il trascritto BCR-ABL1, derivato dalla traslocazione Philadelphia è correlato ad una pro-

gnosi infausta nella leucemia acuta linfoblastica a precursori di cellule B (LAL-B). I pazienti BCR-ABL1 positivi hanno una frequenza elevata di delezioni del gene Ikaros (IKZF1). Il valore prognostico di delezioni di IKZF1 è stato valutato in bambini con LAL-B BCR-ABL1 positiva, trattati con e senza Imatinib.

METODI: Grazie ad una collaborazione europea, 191 pazienti pediatrici (1-18 anni) BCR-ABL1 positivi che hanno raggiunto la remissione clinica sono stati analizzati per la delezione di IKZF1, utilizzando il metodo 'multiplex ligation dependent amplification' (MLPA). Di questi, 84 pazienti sono stati diagnosticati nel periodo pre-Imatinib e trattati secondo protocolli di trattamento nazionali. Invece, 107 pazienti sono stati arruolati al protocollo europeo per LAL positive per il cromosoma Philadelphia (EsPhALL), in vigore dal 2005. Di questi, 63 sono stati arruolati nel braccio a rischio standard (sulla base della buona risposta alla terapia di induzione) e di conseguenza sono stati randomizzati per ricevere Imatinib, 44 sono stati arruolati nel braccio a rischio alto e pertanto hanno tutti ricevuto Imatinib.

RISULTATI: Delezioni di IKZF1 sono state riscontrate in 126/191 pazienti (66%); 36 (5%) delle delezioni hanno comportato aplo-insufficienza di IKZF1 (considerando la perdita mono-allelica di almeno l'esone 2) e 52 (4%) presentavano invece l'isoforma IK6 (delezione degli esoni 4-7), nota per agire da dominante negativa. In epoca pre-Imatinib, i pazienti con delezione di IKZF1 hanno avuto esito sfavorevole rispetto ai pazienti wild-type (DFS a 4 anni: $30,0 \pm 6,8\%$ contro $57,5 \pm 9,4\%$; $p=0,01$). Nel protocollo EsPhALL, i pazienti con delezione di IKZF1 avevano una prognosi sfavorevole, se trattati secondo il braccio a rischio standard (DFS a 4 anni: $51,9 \pm 8,8\%$ rispetto al $78,6 \pm 13,9\%$; $p=0,03$). È importante sottolineare che i pazienti con delezione di IKZF1 a rischio standard che hanno ricevuto Imatinib hanno avuto una prognosi sfavorevole (DFS a 4 anni: $55,5 \pm SE 9,5\%$) rispetto a pazienti wild-type (DFS a 4 anni: $75,0 \pm SE 21,7\%$) ($p=0,05$) (Figura 1).

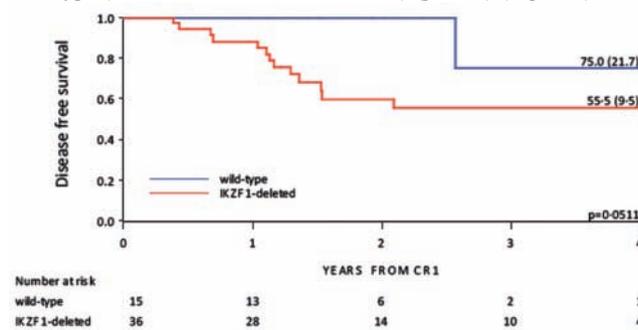


Figura 1.

CONCLUSIONI: Le delezioni di IKZF1 predicono un risultato molto sfavorevole nei bambini con LAL-B BCR-ABL1 positiva trattati con o senza Imatinib, sottolineando la necessità di una terapia alternativa. Di particolare interesse, i pazienti con IKZF1 wild-type e rischio standard rispondono molto bene al trattamento con Imatinib, suggerendo che questo sottoinsieme di pazienti BCR-ABL1 positivi potrebbero essere risparmiati dal trapianto di cellule staminali emopoietiche.

P039

L'IPERMETILAZIONE DEL PROMOTORE DEL miR-34b INDUCE L'OVERESPRESSIONE DI CREB E LA TRASFORMAZIONE MIELOIDE

M. Pigazzi,¹ E. Manara,¹ C. Tregnago,¹ E. Giarin,¹ S. Gelain,¹ R. Masetti,² S. Bresolin,¹ G. Basso¹

¹Dipartimento della Salute della Donna e del Bambino, Università di Padova, Padova; ²Dipartimento di Pediatria, Università di Bologna "Lalla Seragnoli", Bologna, Italy

INTRODUZIONE: Il fattore di trascrizione cAMP response element binding protein (CREB) è noto per regolare un'ampia gamma di processi cellulari come la crescita, la proliferazione, la differenziazione e l'apoptosi. Inoltre, ci sono ormai forti evidenze che CREB svolge un ruolo cruciale nel processo di ematopoiesi normale e che le sue anomalie di espressione concorrono alla trasformazione neoplastica. Infatti, il silenziamento di CREB ha diminuito la proliferazione e la sopravvivenza di cellule progenitrici mieloidi, e topi transgenici overesprimenti CREB hanno sviluppato una neoplasia mieloproliferativa con splenomegalia, ma non malattia acuta, evidenziando nelle aberrazioni di CREB un putativo hit tumorigenico. A oggi, ci sono evidenze che la

proteina CREB è iperespressa nel midollo osseo in più del 60% dei pazienti affetti da LMA de novo (1,2). In precedenza, abbiamo studiato le possibili cause di questa aberrante espressione di CREB e dimostrato che viene regolato da un micro-RNA, il miR-34b. Il miR-34b si è trovato sottosoppresso nelle linee cellulari mieloidi a causa dell'ipermetilazione del suo promotore, e in grado di regolare i livelli di espressione di CREB direttamente legandosi alla sua regione 3' non tradotta. Il suo ruolo di oncosoppressore è stato ampiamente dimostrato in queste linee mieloidi, così come in diversi tessuti, tra cui il cancro al colon, al cavo orale e all'ovaio. Tuttavia, il ruolo del miR-34b nei pazienti affetti da LMA non è stato ancora compreso.

MATERIALE E METODI: Abbiamo esaminato l'espressione del miR-34b e l'attività del suo promotore in cellule di pazienti con diagnosi di neoplasie mieloidi oltre che acuta, la LMA, in Mielodisplasie (MDS) e leucemie mielomonocitiche giovanili (JMML). Abbiamo studiato poi le caratteristiche del miR-34b come soppressore e CREB come oncogene in colture primarie di cellule di midollo osseo e in vivo, in topi NOD-SCID.

RISULTATI: L'espressione del miR-34b è stata trovata alta in pazienti pediatrici con JMML (n=17) e sindromi mielodisplastiche (n=28), ma molto bassa in pazienti affetti da LMA al momento della diagnosi (n=112), rispetto a un pool di midolli sani. I livelli di espressione sono direttamente correlati all'ipermetilazione del promotore del miR-34b, come dimostrato dallo studio della metilazione, e presente esclusivamente nelle LMA de novo. Visto che il miR-34b era altamente espresso nelle MDS con concomitante assenza di CREB, ed essendo queste malattie note per evolvere nel 30% dei casi in LMA, sono state incluse nello studio 5 pazienti per all'esordio di MDS poi evoluti in LMA. Abbiamo confermato in questi casi che l'ipermetilazione del promotore di miR-34b si acquisiva solo all'evoluzione LMA. È stata seguita un'analisi di espressione genica di queste coppie che ha rivelato che tra i geni significativamente espressi tra i due stadi della malattia c'erano 103 geni target di CREB, e che usando solamente questi 103 geni, le due malattie, MDS e LMA, erano perfettamente clusterizzate. Per validare la predittività di evoluzione LMA di questi geni, abbiamo usato una coorte indipendente di MDS (n=20). L'analisi non supervisionata ha evidenziato la suddivisione dei 20 casi in 2 gruppi distinti: uno conteneva 4 pazienti tutti noti per essere evoluti in LMA, e un secondo gruppo delle MDS mai evolute fino a oggi (8 anni di follow up). Inoltre, esperimenti eseguiti in colture primarie sane e di LMA hanno confermato il ruolo di miR-34b come oncosoppressore e di CREB come oncogene in vitro. Lo xenotrapianto di linee cellulari di leucemia acuta stabilmente esprimenti il miR-34b hanno confermato il ruolo protettivo che svolge questo mirna alla progressione delle LMA riducendo i livelli di CREB, stabilendo quindi per la prima volta che il miR-34b è un oncosoppressore della LMA.

CONCLUSIONI: Questi dati dimostrano che la sovraespressione di CREB, attraverso l'alterazione dei suoi geni bersaglio, agisce come forza trainante alla trasformazione in LMA. Questo lavoro evidenzia inoltre un nuovo circuito oncogenico che parte dall'ipermetilazione del promotore del miR-34b, che provoca l'aumento dei livelli di CREB, che altera un set di geni che attivano segnali che concorrono alla trasformazione mieloidale. Inoltre, abbiamo identificato un sottoinsieme di geni controllati da CREB che può essere considerato utile a riconoscere le MDS ad alto rischio. Ulteriori studi funzionali riguardanti farmaci demetilanti e l'uso di oligo miR-34b saranno eseguiti per validare queste nuove strategie terapeutiche nella cura delle LMA.

P040

STUDIO FARMACOLOGICO SULL'UTILIZZO DELLA PEG-L-ASPARAGINASI NEL PROTOCOLLO AIEOP-BFM ALL 2009 PER LA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA DELL'ETÀ PEDIATRICA

A. Ballerini,¹ A. Colombini,² M. Zucchetti,³ D. Silvestri,⁴ F. Dell'Acqua,² G.M. Ferrari,² I. Fuso Nerini,³ L. Lo Nigro,⁵ L. Vinti,⁶ A. Mandese,⁷ S. Casagrande,² F. Petruzzello,⁸ M.G. Valsecchi,⁴ V. Conter,² C. Rizzari²

¹Dipartimento di Oncologia, Unità di Farmacologia Clinica Antitumorale, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, IRCCS UNIMI, Milano; ²Clinica Pediatrica, Ospedale S. Gerardo, Monza (MB); ³Dipartimento di Oncologia, Unità di Farmacologia Clinica Antitumorale, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, IRCCS, Milano; ⁴Dipartimento di Medicina Clinica e Prevenzione, Università di Milano-Bicocca, Monza (MB); ⁵Divisione Ematologia, Oncologia Pediatrica, Azienda Ospedaliero -

Universitaria Policlinico Vittorio Emanuele, Catania; ⁶Oncematologia Pediatrica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma; ⁷Oncematologia Pediatrica e Centro Trapianti Cellule Staminali e Terapia Cellulare, Ospedale Infantile Regina Margherita, Torino; ⁸Dipartimento di Onco - Ematologia Pediatrica, AORN Santobono, Pausilipon, Napoli, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: L'asparaginasi (ASP) è un farmaco di natura enzimatica utilizzato da molti decenni nella terapia della leucemia linfoblastica acuta (LLA) del bambino e dell'adulto. L'ASP determina la deplezione delle scorte ematiche di asparagina (ASN), promuovendo la morte della cellula leucemica alterando la sintesi proteica cellulare per insufficiente attività asparaginasi sintetica. La deplezione di ASN è osservata generalmente anche nel liquor (LCS). Nell'ambito del protocollo di polichemioterapia intensiva AIEOP-BFM ALL 2009, attualmente utilizzato nei centri AIEOP per il trattamento dei bambini affetti da LLA, è previsto un programma di monitoraggio dell'attività asparaginasi nel siero e dei livelli di ASN nel LCS in corso di trattamento con il prodotto PEG-ASP. Vengono qui riportati i risultati di questo programma effettuato nei pazienti arruolati nei primi 2 anni dello studio.

METODI: Nel Protocollo AIEOP-BFM ALL 2009 i pazienti sono trattati con due dosi di PEG-ASP (2500 IU/mq e.v.) 12 e 26 giorni dopo l'inizio della fase di induzione (protocollo IA) e con una dose (stesso dosaggio) durante ogni fase di reinduzione (protocollo II o prot III, ripetuto 3 volte nei pazienti ad alto rischio (HR) o dopo ognuno dei 3 blocchi (previsti solo nei pazienti HR). L'attività enzimatica della PEG-ASP nel siero viene studiata con un test enzimatico (MAAT test kit) sia in induzione (giorni 19, 26, 33 e 40) che in reinduzione o dopo i blocchi (in real time) 7 giorni dopo la somministrazione dell'unica dose del farmaco. Valori di attività plasmatica ≥ 100 IU/L sono considerati indicativi di adeguata attività terapeutica. I livelli di ASN nel LCS sono valutati tramite HPLC nella fase di induzione ai giorni 33 e 45; livelli $< 0,2$ microM sono considerati indicativi di adeguata deplezione.

RISULTATI: Su 367 pazienti che hanno concluso la fase d'induzione, l'attività asparaginasi media nel siero è stata di 1369, 724, 1825 e 839 IU/L rispettivamente nei giorni 19, 26, 33 e 40. Nei giorni 26 e 40 sono stati rilevati valori < 100 IU/L solamente nel 3.7% e 11.7% dei casi. La valutazione in real time dell'attività asparaginasi nel corso dei protocolli II è risultata con valori medi di 1880 IU/L, con livelli < 100 IU/L nello 0.9% dei casi mentre, dopo i blocchi dell'HR ha mostrato attività < 100 IU/L nel 2.5%, 9.7% e 3.2% dei casi, rispettivamente. Il monitoraggio in real time nel corso dei protocolli III ha mostrato livelli medi di attività ≥ 100 IU/L in tutti i casi analizzati (rispettivamente 27, 14 ed 8 pazienti) (Tabelle 1 e 2). La concentrazione media (\pm SD) di ASN nel LCS è stata valutata in 85 pazienti ed è risultata 1.21 (± 1.47) e 3.46 (± 3.67) microM ai giorni 33 e 45, rispettivamente, con livelli inferiori a 0,2 microM (soglia di deplezione ritenuta adeguata in termini di efficacia) solamente nel 31.8% dei casi al giorno 33 (Tabella 3). La concentrazione di ASN nel LCS del giorno 33 è risultata inversamente correlata all'attività asparaginasi (Coefficiente Spearman = -0.39; $p < 0.01$)

Tabella 1.

	Giorno d'induzione				
	+19	+26	+33	+40	+45
N pts (%)	218	218	201	162	156
<30 IU/L	4(1.8)	5(2.3)	7(3.5)	16(9.9)	54(34.6)
30-100 IU/L	0	3(1.4)	1(0.5)	3(1.8)	23(14.7)
≥ 100 IU/L	214(98.2)	210(96.3)	193(96.0)	143(88.3)	79(50.7)

Tabella 2.

	Attività enzimatica (IU/L) durante l'induzione				
	+19	+26	+33	+40	+45
Media	1369	724	1825	839	354
Dev stand.	405	257	707	368	357
Mediana	1355	694	1825	828	247
Range	327-2688	203-1729	162-3823	105-2225	102-2761

CONCLUSIONI: La PEG-ASP, somministrata al dosaggio di 2500 IU/mq nello studio AIEOP-BFM ALL 2009, si è dimostrata capace di determinare un'attività enzimatica adeguata (≥ 100 IU/L) in oltre il 90% dei casi trattati in tutte le fasi di terapia monitorate. Nel LCS i livelli di ASN sono risultati inferiori a 0,2 microM solamente in una ridotta quota di pazienti. Quest'ultima evidenza resta di difficile interpretazione.

ne, potendosi ipotizzare o una maggiore difficoltà del prodotto PEG-ASP a penetrare, anche in minime quantità, direttamente all'interno del LCS o una ridotta velocità di deplezione a livello plasmatico del farmaco stesso.

Tabella 3.

	Giorno d'induzione	
	+33	+45
N. pts	85	59
< 0.2 uM	27(31.8%)	5(8.5%)
≥ 0.2uM	58(68.2%)	54(91.5%)
Concentrazioni di Asn (uM)		
Media	1.21	3.46
Dev Stand.	1.47	3.67
Mediana	0.81	2.22
Range	0.17-7.06	0.18-15.6

P041

STUDIO DELL'ESPRESSIONE DEI microRNAs (miRs) NEL LINFOMA LINFOBLASTICO T PEDIATRICO

L. Mussolin,¹ K. Basso,² M. Pillon,³ E. Carraro,³ E.S.G. d'Amore,⁴ A. Rosolen³

¹Istituto di Ricerca Pediatrico Fondazione Città della Speranza, Azienda Ospedaliera, Università di Padova, Padova, Italy; ²Institute for Cancer Genetics and Department of Pathology and Cell Biology, Columbia University, New York, NY, USA; ³Clinica di Oncematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera-Università di Padova, Padova, Italy; ⁴Anatomia Patologica, Ospedale San Bortolo, Vicenza, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il linfoma linfoblastico T (LBL-T) rappresenta circa il 30% dei linfomi non-Hodgkin pediatrici ed ha ancora una prognosi severa. Il recente impiego di trattamenti chemioterapici specifici per ben definiti sottogruppi di pazienti ha significativamente aumentato la probabilità di guarigione, passando dal 50% al 75%. Tuttavia nonostante i numerosi tentativi fatti per identificare fattori di rischio in grado di predire la recidiva o il fallimento della risposta al trattamento, non c'è finora evidenza di alcuna caratteristica clinica o variabile biologica con sicuro impatto prognostico. Inoltre, a differenza di altri tumori pediatrici, poco si conosce in merito agli aspetti biologici del linfoma linfoblastico, ed in particolare poco è noto sul ruolo che alcune caratteristiche biologiche potrebbero avere sulla prognosi. In questi ultimi anni vari studi molecolari hanno individuato una nuova classe di RNA di piccole dimensioni non codificanti definiti microRNA (miR). Queste molecole regolano l'espressione genica a livello post-trascrizionale provocando degradazione o repressione degli RNA messaggeri targets. I miR rappresentano l'1-3% del genoma dei vertebrati e ogni miR può regolare centinaia di geni differenti. I miR controllano aspetti della proliferazione cellulare, del differenziamento, dell'apoptosi, svolgono funzioni regolatorie nell'organogenesi e sono stati implicati nello sviluppo di neoplasie sia per la funzione oncogenica che di repressore tumorale. Lo scopo principale di questo studio è di valutare l'espressione e il ruolo che i miRs possono avere nel LBL-T.

METODI: I profili di espressione dei miRs sono stati generati usando piattaforma Agilent. Gli algoritmi utilizzati e gli strumenti di analisi bio-informatica sono stati in parte ottenuti da siti web pubblici ed in parte dal Dipartimento di bio-informatica della Columbia University, New York. Saggi TaqMan (Applied Biosystems) sono stati utilizzati per convalidare i dati di espressione ottenuti. Infine l'espressione di CDKN1B è stata valutata a livello trascrizionale mediante Real-Time PCR e a livello proteico mediante immunoblotting.

RISULTATI: L'analisi *unsupervised* dei profili di espressione dei miRs, generata da 13 biopsie tumorali di LBL-T, 6 campioni ciascuno di tessuto timico normale e linfociti T purificati doppi positivi, ha messo in evidenza che ciascun fenotipo presenta un distinto profilo di espressione dei miRs. Attraverso un'analisi *supervised* abbiamo identificato una *signature* caratteristica per il LBL-T pediatrico. In particolare miR-221 e miR-222 risultano up-regolati nel LBL-T rispetto alla controparte normale. Dalla letteratura recente è noto che CDKN1B (p27) è un target di questi miRs. CDKN1B(p27) svolge un ruolo chiave nella regolazione del ciclo cellulare. Abbiamo quindi innanzitutto validato l'espressione di questi due miRs in un set indipendente di 18 biopsie

tumorali con diagnosi di LBL-T mediante Real-Time PCR. L'espressione dell'RNA messaggero di CDKN1B (p27), come atteso, non è risultata alterata nella biopsia tumorale dei pazienti analizzati, mentre abbiamo trovato che l'espressione proteica di p27 era significativamente ridotta nei tumori rispetto alla controparte normale (p=0.0008)

CONCLUSIONI: L'identificazione di un profilo di espressione dei miRs specifico per LBL-T suggerisce che alcuni miRs svolgono un ruolo importante nella patogenesi di questa neoplasia. In particolare l'over-espressione di miR-221 e miR-222 porta ad una riduzione dell'espressione di p27, promuovendo così la progressione del ciclo cellulare. L'estensione dello studio ad una casistica più ampia ci permetterà di confermare se questi miRs possono essere utilizzati come marcatori di malattia o come possibili bersagli terapeutici.

P042

TRASFERIMENTO GENICO SLEEPING BEAUTY-MEDIATO DI RECETTORI CHIMERICI (CAR) IN CELLULE CIK: UN NUOVO STRUMENTO PER LA CURA DELLE LEUCEMIE PEDIATRICHE

C.F. Magnani,¹ G.M.P. Giordano Attianese,¹ S. Tettamanti,¹ N. Turazzi,¹ V. Marin,¹ L.J.N. Cooper,² A. Biondi,¹ E. Biagi¹

¹Centro di Ricerca "M. Tettamanti", Università degli Studi di Milano-Bicocca, Clinica Pediatrica, Ospedale San Gerardo, Monza (MB), Italy; ²CooperLab, M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il trasferimento genico stabile di recettori chimerici (CAR) risulta essere uno strumento potente per ridirigere la specificità di cellule T effettrici nei confronti di antigeni tumorali, allo scopo di sviluppare protocolli di immunoterapia adottiva per il cancro. Lo sviluppo di metodiche non virali di manipolazione genica con caratteristiche di alta efficienza ha il vantaggio di superare i problemi di sicurezza e di produzione dei vettori virali che ne limitano la applicazione clinica. In questo contesto, l'uso *ex-vivo* del sistema di trasferimento genico trasposone-mediato di ultima generazione Sleeping Beauty (SB) rappresenta una valida alternativa ai vettori virali per la terapia genica nell'ambito della sperimentazione clinica.

METODI: Allo scopo di sviluppare un protocollo di terapia genica facilmente trasferibile in clinica, abbiamo utilizzato nucleofezione del sistema SB e un protocollo di stimolazione ottimizzato per generare e propagare cellule killer indotte da citochine (CIK) geneticamente modificate per esprimere il CAR di 3° generazione specifico per la molecola CD123. Il protocollo di stimolazione è stato prodotto in accordo con quanto previsto dallo standard di settore per la produzione di prodotti cellulari utilizzati in protocolli clinici (GMP, Good Manufacturing Practices). Il trasferimento genico del suddetto CAR permette di reindirizzare la specificità antigenica dei linfociti T verso i blasti di leucemia mieloide acuta (AML) CD123 positivi. La molecola CD123 è considerata un ottimo obiettivo per eliminare specificamente le cellule di AML, dato che la sua overespressione è nota essere un marcatore di prognosi infausta in AML.

RISULTATI: Con questo protocollo abbiamo ottenuto un'espressione media del transgene a 24 ore pari a 66,6% (± 10,5, n=5) e una percentuale di sopravvivenza media del 34,8% (± 5,6, n=5). Tale protocollo di stimolazione ottimizzato accoppiato alla nucleofezione non influenza il fenotipo a fine differenziamento del nostro prodotto cellulare, preservando le popolazioni naive e staminale memoria delle cellule CIK, e risulta in un aumento della crescita alla giorno 21 di fine coltura CIK pari a 35,3 ± 11,6 volte. Le cellule CIK modificate esprimono stabilmente il CAR di 3° generazione specifico per la molecola CD123 (scFvCD123.3rdCAR, 40,6% ± 5,3), lisano efficacemente le cellule bersaglio di AML e mostrano secrezione di citochine CAR-specifica. Infine, allo scopo di mimare *in vitro* quello che succede nel paziente dopo l'infusione, abbiamo espanso le cellule CIK modificate a lungo termine tramite stimolazione con cellule AML al giorno 21. L'espansione a lungo termine promuove un consistente aumento della crescita (423,8 ± 222,3 ± 176,3 volte, n=5 al giorno 40) e un'efficiente selezione delle cellule CIK CAR positive che continuano ad esibire una potente attività citotossica nei confronti della leucemia mieloide acuta (81,1% ± 6,2, n=5). Il risultato dell'espansione a lungo termine suggerisce che le cellule CIK modificate possano persistere e continuare a essere funzionali dopo l'infusione nel paziente.

CONCLUSIONI: In conclusione, abbiamo sviluppato un protocollo di terapia cellulare GMP per la selezione e propagazione di cellule CIK modificate esprimenti il CAR specifico per l'antigene tumorale

CD123, utilizzando il sistema trasposone SB come metodo di trasferimento genico e un protocollo di stimolazione ottimizzato. Tale strumento sarà determinante per definire nuovi approcci terapeutici per la cura delle forme più aggressive di leucemia mieloide acuta infantile e potrà essere opportunamente modificato allo scopo di affrontare anche altre forme di leucemia acuta quali la linfoblastica tramite l'utilizzo di molecole CAR specifiche per l'antigene CD19.

P043

STUDIO DELL'ESPRESSIONE DI BAG1 E IL PATHWAY ANTI-APOPTOTICO NELLE LEUCEMIE MIELOIDI ACUTE PEDIATRICHE

S. Aveic,¹ B. Accordi,¹ E. Manara,¹ A. Pession,² F. Locatelli,³ M. Pigazzi,¹ G. Basso,² R. Masetti⁴

¹Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino, Università di Padova, Padova; ²Dipartimento di Pediatria "Lalla Seragnoli" Università di Bologna; ³Dipartimento di Pediatria Ematologia-Oncologia IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma; ⁴Univ. di Bologna, Italy

INTRODUZIONE: La leucemia mieloide acuta (LMA) è una patologia caratterizzata dall'espansione clonale e l'accumulo di cellule staminali ematopoietiche arrestate a vari stadi di sviluppo. Le cellule leucemiche non sono in grado di arrestare la crescita né di attivare l'apoptosi in risposta agli stimoli fisiologici, pertanto molte attività di ricerca clinica sono attualmente concentrate sull'identificazione di nuove terapie che inducano l'apoptosi nelle cellule di LMA. Il gene BCL2-associated AthanoGene1 (*BAG1*) codifica per una proteina multifunzionale che preferenzialmente ha attività anti-apoptotica sostenendo la sopravvivenza cellulare. La sua espressione infatti è risultata aberrante in diversi tipi di cancro, e recentemente abbiamo confermato che *BAG1* è deregolato anche in linee cellulari leucemiche. Grazie a studi di silenziamento di *BAG* abbiamo dimostrato che la sopravvivenza delle cellule leucemiche dipende dall'attività di *BAG1* che infatti è overpresso nella LMA. Questa azione di *BAG1* è stata confermata avvenire in sinergia con *BCL2* e indirettamente con *MCL1*, essendo entrambi importanti fattori anti-apoptotici tutt'oggi ancora poco studiati nelle LMA pediatriche (1).

MATERIALI E METODI: L'espressione della proteina *BAG1* è stata studiata in pazienti pediatriche con LMA de novo. Mediante Western Blot (WB) sono stati valutati per *BAG1* 10 pazienti con LMA al momento della diagnosi e in un punto in remissione completa raccolto durante il follow, 10 linee cellulari leucemiche e 6 midolli sani. In seguito, è stata valutata anche l'espressione di altre proteine anti-apoptotiche (*BCL2*, *MCL1*, *BCL-XL*, *HSP90*, *HSP70* e *CHIP*) usando la tecnica del Reverse-phase protein array (RPPA) su una coorte di 99 pazienti con LMA de novo arruolati nel protocollo AIEOP-LAM 2002.

RISULTATI: La proteina *BAG1* è risultata molto più espressa nei campioni di leucemia all'esordio rispetto ai controlli in remissione e ai midolli sani, dove *BAG1* era difficilmente rilevabile mediante WB. In seguito, l'analisi mediante RPPA su 99 pazienti ha dimostrato un'elevata espressione di *BAG1* in 87/99 (88%) dei casi (0.93 ± 0.67 , range 0.12 – 3.78 unità arbitrarie (UA); $p=0,05$) rispetto alla media dell'espressione nei midolli sani (numero di volte medio di incremento=2.4). Nella stessa coorte di pazienti abbiamo studiato l'espressione di *BCL-2*, suo principale co-partner anti-apoptotico, che è risultata correlare direttamente con *BAG1* ($p=0,75$, $p<0,0001$). Abbiamo quindi ipotizzato che le elevate espressioni di *BAG1* e *BCL2* sostengano un forte segnale anti-apoptotico nei pazienti LMA. Abbiamo poi confermato che anche l'espressione della forma attiva fosforilata di *BCL2*(S70) e della *HSP70* correlavano direttamente con *BAG1* ($p=0,58$, $p<0,0001$ e $p=0,61$, $p<0,0001$), mentre una debole correlazione è stata trovata per *MCL1* ($p=0,46$, $p<0,0001$), *HSP90* ($p=0,40$, $p<0,001$) e *BCL-XL* ($p=0,25$, $p<0,01$). Considerando *BAG1* come proteina driver all'origine di questo pathway, abbiamo considerato la sua espressione come indicativa dell'attività anti-apoptotica dei blasti LMA. I pazienti sono stati suddivisi in base all'espressione in quartili di *BAG1* e sottoposti ad analisi di sopravvivenza e multivariata con le caratteristiche biologiche e cliniche. Non è stata trovata alcuna correlazione significativa tra *BAG1* e i parametri LMA, tra cui il cariotipo, la genetica molecolare, il FAB, l'età e il numero di globuli bianchi alla diagnosi. Mentre lo studio della sopravvivenza libera da eventi (EFS) con il metodo di Kaplan-Meier ha mostrato che i pazienti appartenenti ai primi tre quartili erano molto simili tra loro con un EFS=63,8% a 5 anni, mentre i pazienti con alta espressione di *BAG1* (quarto quartile) avevano una EFS=36,9% (a 5 anni, $p=0,027$). Considerando che per un gruppo di

pazienti con alta espressione di *BAG1* la prognosi è molto infausta, è stato considerato un composto nuovo, la Thioflavina S, che si è dimostrata interrompere l'interazione di *BAG1* con le sue proteine target. Abbiamo utilizzato come modello in vitro due linee cellulari mieloidi con espressione di *BAG1* appartenente al secondo quartile, le ML2, e al quarto quartile le HL60. La concentrazione inibente (IC_{50}) la proliferazione delle HL60 è risultata più bassa (0.76 ± 0.2 mM) di quella per le ML2 (1.04 ± 0.28 mM) confermando le HL60 più sensibili al farmaco. Questo dosaggio inoltre provocava un lieve aumento dell'apoptosi nelle HL60. In seguito, abbiamo testato la thioflavina S insieme ai farmaci comunemente utilizzati nelle LMA (Doxorubicina e Etoposide). Il calcolo del combination index (CI) ha rivelato che la Thioflavina-S ha una forte sinergia (CI <1), suggerendo che ulteriori studi potrebbero supportare l'uso della thioflavina-S come nuova terapia delle LMA ad alta espressione di *BAG1*.

CONCLUSIONI: Infine, abbiamo scoperto che i pazienti affetti da LMA de novo hanno alti livelli della proteina anti-apoptotica: *BAG1*. Questa aberrante espressione è in grado di mantenere elevati altri fattori anti-apoptotici tra cui *BCL2*, *MCL1* e *HSP70* supportando che l'attivazione aberrante di *BAG1* possa avere un ruolo cruciale nel mantenimento della LMA.

P044

STRATIFICAZIONE DEI PAZIENTI AFFETTI DA ALCL IN BASE ALLA MALATTIA MINIMA RESIDUA: STUDIO COLLABORATIVO AIEOP-BFM

L. Mussolin,¹ C. Damm-Welk,² M. Pillon,³ M. Zimmermann,² E. Carraro,³ A. Reiter,² W. Woessmann,² A. Rosolen³

¹Istituto di Ricerca Pediatrico Fondazione Città della Speranza, Azienda Ospedaliera, Università di Padova, Padova, Italy; ²Non-Hodgkin's Lymphoma, Berlin-Frankfurt-Muenster Study Centre, Justus Liebig University, Giessen, Germany; ³Clinica di Oncoematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera-Università di Padova, Padova, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: I linfomi anaplastici a grandi cellule (ALCL) costituiscono circa il 15% dei linfomi non Hodgkin pediatrici. L'aberrazione cromosomica più frequente è la t(2;5)(p23;q35) presente in circa il 90-95% degli ALCL pediatrici. Questa traslocazione coinvolge sul cromosoma 5 il gene NPM, che codifica per la proteina ubiquitaria nucleofosmina, e sul cromosoma 2 il gene ALK. La traslocazione porta alla formazione sul cromosoma derivativo 5 di un gene di fusione NPM-ALK attivo dal punto di vista trascrizionale. Risulta quindi possibile valutare mediante Reverse-Transcriptase (RT) PCR la presenza del trascritto chimero NPM-ALK. Abbiamo recentemente dimostrato che la presenza di malattia minima all'esordio è un fattore prognostico negativo (Mussolin L et al, Leukemia 2013). L'obiettivo della nostra ricerca è stato la valutazione prospettica della presenza di Malattia Minima Residua (MMR) durante il trattamento chemioterapico in una numerosa serie di pazienti italiani e tedeschi trattati all'interno del trial europeo ALCL-99, valutando la possibilità di stratificare i pazienti in diversi gruppi di rischio.

METODI: Lo studio dei campioni biologici (midollo osseo e sangue periferico) è stato condotto mediante analisi morfologica e la presenza di trascritto NPM-ALK è stata valutata mediante RT-PCR. L'analisi di MMR è stata condotta nel campione di midollo osseo e sangue periferico all'esordio e, se positivo, anche prima del secondo ciclo chemioterapico.

RISULTATI: Lo studio di MMR è stato condotto su un totale di 184 pazienti, risultati positivi per NPM-ALK nella biopsia tumorale. La malattia minima è risultata positiva all'esordio nel 56% (103/184) dei pazienti. L'incidenza cumulativa di recidiva (CIR) è risultata essere 16±5% per i pazienti negativi all'esordio (81/184) e del 51±5% per i 103 pazienti positivi per malattia minima ($p<0.01$). Lo studio di MMR prima del secondo ciclo chemioterapico è stato possibile in 52 pazienti risultati positivi all'esordio. La CIR dei 26 pazienti che mantenevano la positività per MMR anche prima del secondo ciclo chemioterapico (81±8%) è stata significativamente più alta rispetto ai 26 pazienti che invece si sono negativizzati ($31 \pm 9\%$) ($p<0.01$). Da notare che l'OS (sopravvivenza globale) a 5 anni è risultata essere molto simile per i pazienti negativi per malattia minima all'esordio ($92\% \pm 2\%$) e quelli positivi all'esordio ma che si sono negativizzati prima del secondo ciclo ($92\% \pm 5\%$); mentre per i pazienti che hanno mantenuto la positività prima del secondo ciclo chemioterapico, l'OS è risultata essere del $65\% \pm 9\%$ ($p<0.001$)

CONCLUSIONI: Dai nostri dati emerge una risposta piuttosto

lenta della MMR agli attuali schemi di chemioterapia. Non meno rilevante, la persistenza di positività per MMR ci ha permesso di identificare un gruppo di pazienti con un rischio molto elevato di recidiva. L'European Intergrup for Childhood non-Hodgkin Lymphomas (EICNHL), di cui AIEOP e BFM sono membri, sta disegnando un nuovo trial per il trattamento degli ALCL pediatrici, che verrà aperto prima della fine dell'anno, in cui il trattamento chemioterapico sarà basato sulla stratificazione dei pazienti in base ai gruppi di rischio da noi individuati.

P045

L'ESPRESSIONE DI IDO1 NELLE LEUCEMIE MIELOIDI DELL'ETÀ PEDIATRICA INIBISCE L'ATTIVITÀ DEI T LINFOCITI E DELLE CELLULE NK E CONFERISCE SIGNIFICATO PROGNOSTICO SFAVOREVOLE

S. Rutella,¹ V. Folgiero,¹ R. Caruso,¹ A. Bertaina,¹ R. Masetti,² M. Zecca,³ G.F. Torelli,⁴ V. Bertaina,¹ A.M. Testi,⁴ R. Foa,⁴ A. Pession,² F. Locatelli¹

¹Ematologia ed Oncologia Pediatrica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma; ²Università di Bologna, S. Orsola-Malpighi, Bologna; ³Università di Pavia, San Matteo, Pavia; ⁴Università La Sapienza, Policlinico Umberto I, Roma, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) è un enzima citoplasmatico deputato alla degradazione di triptofano, aminoacido essenziale, in kynurenine, le quali favoriscono, in ultima analisi, lo sviluppo, la stabilizzazione e l'attivazione delle cellule T regolatorie e sopprimono le risposte T linfocitarie anti-tumorali.¹⁻³ L'espressione di IDO1 a carico di cellule tumorali e di cellule presentanti l'antigene è stata associata a meccanismi di fuga dall'immunosorveglianza, sia in modelli animali di malattia neoplastica che in pazienti affetti da melanoma, tumori del distretto cervico-facciale, carcinoma del polmone, mieloma multiplo, carcinoma del colon-retto e neoplasie ginecologiche. Non è attualmente noto se le leucemia acute mieloidi (LAM) dell'età pediatrica esprimono IDO1 e se l'attività di IDO1 sia coinvolta nella regolazione della risposta immunitaria anti-tumorale.

METODI: Abbiamo valutato in modo retrospettivo l'espressione e la funzione di IDO1 in 41 pazienti pediatrici affetti da LAM (età mediana alla diagnosi 10 anni, intervallo 1-17). L'espressione di IDO1 è stata analizzata a livello proteico mediante WB; i livelli di triptofano e kynurenine, nei surnatanti di coltura, sono stati misurati con RP-HPLC dopo attivazione dei blasti con IFN- γ per 24 ore. Linfociti T o cellule NK allogeneiche sono stati mantenuti in coltura a breve termine (5 giorni) con blasti mieloidi attivati con IFN- γ , al fine di misurare gli effetti funzionali dell'espressione dell'enzima su effettori della risposta immunitaria.

RISULTATI: I blasti leucemici di 20/41 (49%) dei pazienti esaminati erano in grado di esprimere IDO1 dopo attivazione *in vitro* con IFN- γ , come suggerito dagli esperimenti di WB e dall'aumento dei livelli di kynurenine nei surnatanti di coltura (21,0 μ M/L, intervallo 6,1-36,0), rispetto alle colture non stimolate (0,85 μ M/L, 0,4-1,7; $p=0.0022$; Figura 1). Tutti i casi di LAM positivi per IDO1 appartenevano ai sottogruppi M4/M5 della classificazione FAB. Cinque dei 19 casi esperimenti IDO1 risultavano positivi per la lesione molecolare FLT3/ITD, 3 dei 19 per la t(10;11) e 3 dei 19 presentavano anomalie citogenetiche ricorrenti di significato prognostico favorevole [2 l'inversione del cromosoma 16 ed 1 la traslocazione reciproca bilanciata t(8;21)]. L'induzione di IDO1 veniva abrogata dal pre-trattamento dei blasti leucemici con inibitori di STAT3; saggi di co-immunoprecipitazione suggerivano, infatti, il verificarsi di interazioni fisiche tra IDO1 e STAT3. Sotto il profilo più strettamente funzionale, i blasti di LAM esprimenti IDO1 inibivano la polarizzazione Th1 di linfociti CD8⁺ allogeneici e tale effetto era parzialmente abrogato da un inibitore chimico di IDO1 (D,L-1-methyl-tryptophan). Analogamente, i blasti leucemici positivi per IDO1 inibivano la de-granulazione di cellule NK allogeneiche, valutata mediante l'esposizione di superficie dell'antigene lisosomiale CD107a. L'analisi di sopravvivenza a 5 anni, effettuata con il metodo di Gehan-Breslow-Wilcoxon, evidenziava un chiaro svantaggio per i casi di LAM positivi per IDO1 (OS pari a 34 mesi [SE 16], contro 64,7 mesi per i casi negativi per IDO1 [SE 11]; $p=0.04$).

CONCLUSIONI: I blasti dei pazienti con LAM dell'età pediatrica esprimono l'enzima IDO1 in modo inducibile. Sul profilo terapeutico, l'interferenza con l'attività di IDO1 potrebbe tradursi nel ripristino delle risposte immunitarie di tipo Th1 e nel miglioramento della

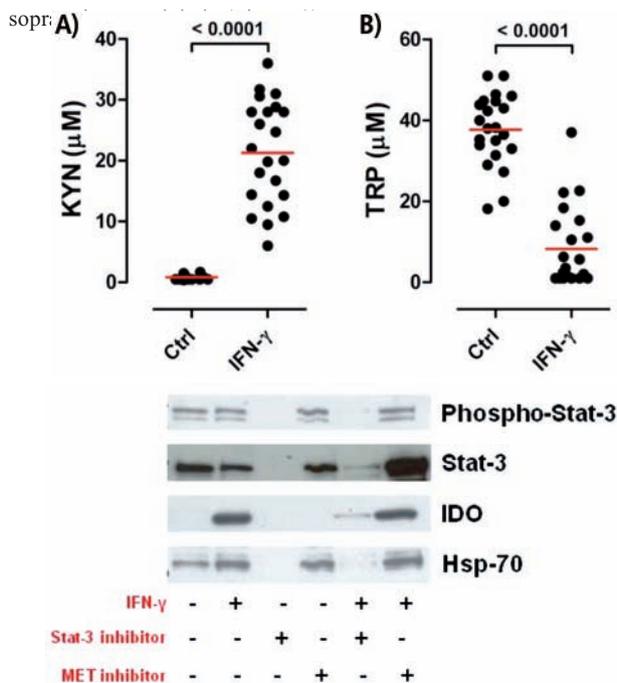


Figura 1. Pannello A: Espressione di IDO1 in risposta ad IFN- γ . I blasti leucemici sono stati attivati con IFN- γ (100 unità internazionali/ml) per 24 ore, prima dello studio dell'espressione di IDO e STAT-3 in forma nativa e fosforilata. Questo esperimento rappresentativo illustra l'induzione di IDO1 in risposta ad IFN- γ e la sua abrogazione nelle colture pre-trattate con inibitori di STAT3 (ma non con un inibitore di *c-met*). **Pannello B:** Livelli di kynurenine e triptofano nei surnatanti di coltura dei blasti leucemici. Kynurenine e triptofano sono stati misurati con metodica cromatografica nelle colture di blasti mieloidi stimolate con IFN- γ . Le barre in rosso si riferiscono al valore mediano. Il confronto tra i livelli nelle colture non stimolate e quelli nelle colture attivate con IFN- γ è stato effettuato con il test di Mann - Whitney.

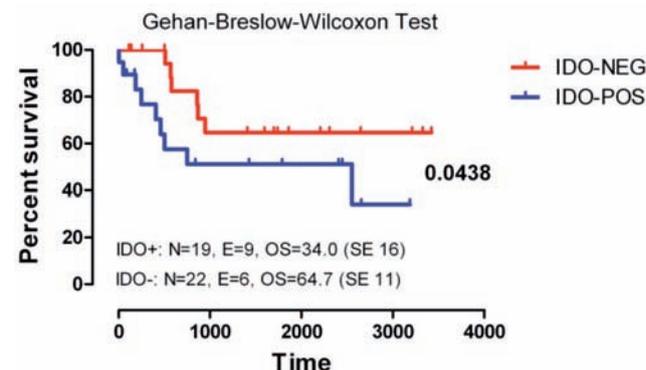


Fig. 2. Analisi della sopravvivenza complessiva a 5 anni. La curva è espressione della sopravvivenza complessiva dei pazienti pediatrici con LAM, suddivisi in due gruppi sulla base dell'espressione inducibile dell'enzima IDO1. La differenza in termini di sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi risultava significativa e a vantaggio dei pazienti negativi per IDO1.

Bibliografia:

- Munn DH. Indoleamine 2,3-dioxygenase, tumor-induced tolerance and counter-regulation. *Curr Opin Immunol.* 2006;18:220-5.
- Bonanno G, Mariotti A, Procoli A, Folgiero V, Natale D, De Rosa L, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) activity correlates with immune system abnormalities in multiple myeloma. *J Transl Med.* 2012;10:247.
- Curti A, Pandolfi S, Valzasina B, Aluigi M, Isidori A, Ferri E, et al. Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25⁻ into CD25⁺ T regulatory cells. *Blood.* 2007;109:2871-7.

P046

DISLIPIDEMIA ASSOCIATA A TRATTAMENTO CON ASPARAGINASI IN PAZIENTI AFFETTI DA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA TRATTATI SECONDO I PROTOCOLLI AIEOP BFM ALL 2000/R06 ED AIEOP BFM ALL 2009.

C. Barboni,¹ S. Casagrande,¹ D. Silvestri,² M. Casati,³
M.G. Valsecchi,² G.M. Ferrari,¹ F. Dell'Acqua,¹ A. Colombini,¹
V. Conter,¹ C. Rizzari¹

¹Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca, Fondazione MBBM c/o A.O. S. Gerardo, Monza (MB); ²Dipartimento di Scienze della Salute e della Prevenzione, Università Milano-Bicocca, Monza (MB); ³Laboratorio Analisi chimico-fisiche, AO S. Gerardo, Monza (MB), Italy

INTRODUZIONE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: L'Asparaginasi (ASP) è un farmaco consolidato nel trattamento dei pazienti affetti da Leucemia Linfoblastica Acuta (LLA). Sono attualmente disponibili tre tipi di ASP: due derivano dall'Escherichia Coli (una nativa: ASP ed una pegilata: PEG-ASP) ed una deriva dall'Erwinia Chrysantemi. Tra gli effetti collaterali del trattamento con ASP si annoverano principalmente reazioni allergiche locali e sistemiche, disordini del sistema emostatico con aumentato rischio trombotico, disfunzioni pancreatiche e pancreatite; sono segnalati come rari l'encefalopatia, l' alcalosi, l'ipotiroidismo secondario e l'ipoparatiroidismo. La dislipidemia in corso di trattamento con asparaginasi (\pm steroide) viene raramente riportata. Nella maggior parte dei casi tale anomalia di laboratorio viene descritta come transitoria e a risoluzione spontanea, tuttavia l'ipertrigliceridemia grave, non adeguatamente monitorata ed eventualmente non trattata, è riportata poter favorire l'insorgenza di pancreatite o di complicanze cerebrovascolari per l'aumentata viscosità ematica. Disponendo dei dati biochimici archiviati presso il laboratorio analisi del nostro ospedale è stato possibile indagare l'ipercolesterolemia (COL) e l'ipertrigliceridemia (TGL) nella coorte di pazienti affetti da LLA seguiti presso il nostro centro, allo scopo di poter valutare:

1. Livelli di COL e TGL nei pazienti affetti da LLA trattati con la fase di Induzione dei protocolli AIEOP-BFM LLA 2000/R06 o AIEOP-BFM LLA 2009.
2. Eventuali differenze dei livelli di COL e TGL determinati da differenze biologiche, cliniche e dall'uso di diversi tipi di asparaginasi o di steroide.

METODI: È stato fatto un record linkage tra i dati biochimici di laboratorio ed il data base dello studio per una coorte di 299 pazienti, di età inferiore a 18 anni alla diagnosi, diagnosticati con LLA nel nostro centro dall'1.1.2005 al 31.12.2012 e trattati secondo i protocolli AIEOP BFM ALL 2000/R06 (n= 205) o 2009 (n= 94). I dati raccolti riguardano esclusivamente i valori di COL e TGL ai time-points 0, +7, +14, +21, +28, +33, +40, + 47 dalla diagnosi e quindi dall'inizio del trattamento. La significatività statistica delle differenze dei dati biochimici relativamente all'uso delle diverse asparaginasi e dei diversi tipi di steroide è stata valutata al time point + 33 per tener conto dell'effetto cumulativo delle somministrazioni. La fase di Induzione prevedeva, nel trial 2000/R06, la somministrazione di 8 dosi di ASP nativa da E. Coli ogni 3 giorni dal +12 al + 33, associata a terapia steroidea con Prednisone (PRED) o Desametasone (DEXA) (studio randomizzato); nel trial 2009 si prevede invece, ai giorni + 12 e + 26, la somministrazione di 2 dosi PEG-ASP associata a terapia steroidea con Prednisone o Desametasone (quest'ultimo steroide viene utilizzato esclusivamente per i pazienti con LLA T non ad alto rischio prednisone good responder: PGR).

RISULTATI: Prima del trattamento i livelli medi di colesterolo (COL) e trigliceridi (TGL) sono risultati, rispettivamente, 132 mg/dl e 133 mg/dl. (vedi Tabelle 1 e 2). I dati globali hanno mostrato un picco massimo di COL e TGL a 33 giorni dalla diagnosi. Sia per COL che per TGL l'andamento del profilo lipidico in relazione ai due diversi tipi di asparaginasi è risultato progressivamente divergente (vedi Figure 1 e 2). Al time point +33, le differenze relative alle diverse ASP non sono risultate statisticamente significative pur mostrandosi una maggiore tendenza alla dislipidemia con l'utilizzo del prodotto pegilato. L'analisi dei valori di COL nei pazienti suddivisi per protocollo e trattati con solo prednisone ha mostrato un differente comportamento in relazione alle diverse asparaginasi (ASP vs PEG-ASP), statisticamente più elevato nel gruppo PEG-ASP al giorno +33 (p-

value=0.01). Per quanto riguarda i TGL, nel gruppo di pazienti trattati con la PEG-ASP si osserva, al time point + 33, un valore superiore rispetto a quello riscontrato con l'uso di ASP, ma la differenza non è risultata statisticamente significativa. È stato possibile studiare il ruolo del DEXA solamente nella coorte di pazienti trattati secondo il protocollo AIEOP BFM ALL 2000/R06 giacché era ivi compreso uno studio randomizzato PRED vs DEXA mentre nel protocollo 2009 oltre l'85-90% dei pazienti viene trattato in induzione esclusivamente con il PRED. La media dei valori di COL al giorno +33 dei soli pazienti trattati con ASP è risultato di 166 mg/dl con il PRED e di 198 mg/dl con DEXA (p-value= 0.05). Anche per quanto riguarda i TGL la media dei valori al + 33 è risultata maggiore con il DEXA rispetto al PRED, ma con una differenza priva di significatività statistica. Le alterazioni dislipidemiche descritte sembrano essere transitorie, poiché i valori medi di COL e TGL al time point + 47 tendono a rientrare ai valori basali. Nessuno dei pazienti studiati in questa coorte ha presentato complicanze cliniche rilevanti correlabili alla dislipidemia in corso di induzione.

Tabella 1. Colesterolo.

	0	+14	+33	+47
Overall	n=291	n=288	n=251	n=143
MEDIA (99% CI)	132(127-138)	190(183-196)	194(181-208)	172(156-189)
<i>Secondo protocollo</i>				
AIEOP 2000/R06	133(127-139)	191(183-198)	188(174-201)	p-value: 169(156-183)
AIEOP 2009	131(121-141)	187(175-199)	207(179-235)	0,1 177(140-213)
<i>Induzione: PDN</i>				
AIEOP 2000/R06	132(119-145)	182(167-197)	166(142-190)	p-value: 150(109-191)
AIEOP 2009	129(118-139)	187(175-200)	203(174-232)	0,01 169(128-210)
<i>Induzione:</i>				
AIEOP 2000/R06 PDN	132(119-145)	182(167-197)	166(142-190)	p-value:150(109-191)
AIEOP 2000/06 DEXA	132(125-140)	195(185-205)	198(181-216)	0,05 176(159-192)

Tabella 2. Trigliceridi.

	0	+14	+33	+47
Overall	n=291	n=291	n=252	n=144
MEDIA (99% CI)	133(123-143)	102(94-110)	257(172-341)	140(99-181)
<i>Secondo protocollo</i>				
AIEOP 2000/R06	136(124-149)	105(95-116)	232(155-309)	p-value: 127(79-175)
AIEOP 2009	125(108-142)	95(82-108)	304(104-504)	0,38 158(84-232)
<i>Induzione: PDN</i>				
AIEOP 2000/R06	139(117-161)	115(89-133)	253(64-441)	p-value: 106(51-161)
AIEOP 2009	125(106-143)	96(82-111)	316(95-537)	0,56 165(77-252)
<i>Induzione:</i>				
AIEOP 2000/R06 PDN	139(117-161)	115(89-133)	253(64-441)	p-value: 106(51-161)
AIEOP 2000/06 DEXA	131(116-146)	103(90-116)	232(148-316)	0,79 132(67-198)

CONCLUSIONI: I nostri dati confermano un consistente aumento dei livelli medi di COL e TGL nel corso del trattamento di Induzione con ASP e steroidi. Il valore medio di TGL al giorno + 33 (257 mg/dl) si è collocato al di sopra del 95° percentile rispetto alle curve pediatriche standardizzate per sesso ed età il cui cut off statico è pari a 150 mg/dl. I valori overall di colesterolo si sono mantenuti invece al di sotto del 95° percentile per tutti i time points. Emerge inoltre che globalmente il prodotto PEG-ASP determina una dislipidemia più elevata rispetto all'ASP nativa anche se questo confronto non risulta significativamente differente. Mantenendo la suddivisione dei pazienti in base al tipo di protocollo, si evince il particolare ruolo del prednisone che sembra determinare valori medi di COL al g + 33 significativamente maggiori con l'uso della PEG-ASP rispetto all'ASP nativa, fenomeno che non accade in relazione ai trigliceridi. Il desametasone, valutato tramite il confronto con i dati relativi al prednisone all'interno del gruppo di pazienti trattati solo secondo protocollo 2000/R06, sembra determinare valori medi più elevati sia di COL che di TGL, (differenza statisticamente significativamente per i valori di COL ma non per quelli di TGL).

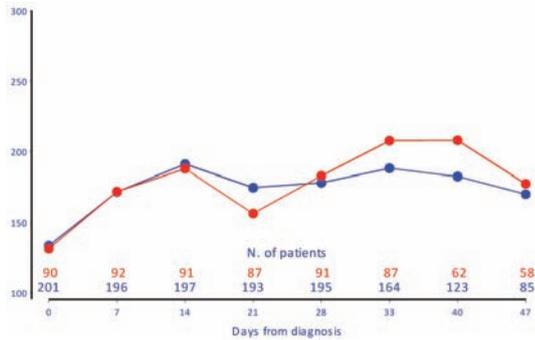


Figura 1. Colesterolo (mg/dl) secondo protocollo. Linea blu=L-Asp, Linea rossa=PEG-L-Asp.

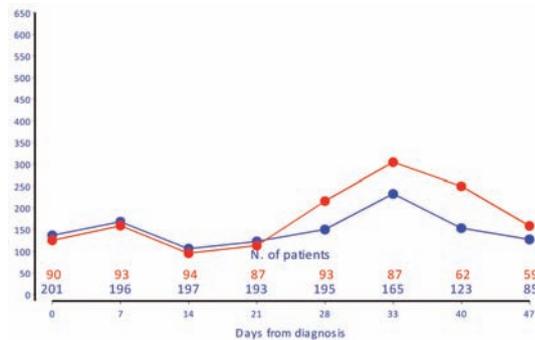


Figura 2. Trigliceridi (mg/dl) secondo protocollo. Linea blu=L-Asp, Linea rossa=PEG-L-Asp.

P047

LE CELLULE MESENCHIMALI STROMALI MIDOLLARI SI ADATTANO ALLA L-ASPARAGINASI TRAMITE INNESCO DELL'AUTOFAGIA ED AUMENTO DELL'ATTIVITÀ DI GLUTAMINA SINTETASI

M. Chiu,¹ G. Foderà,¹ R. Franchi-Gazzola,¹ G. D'Amico,² G. Cazzaniga,² F. Dell'Acqua,³ C. Rizzari,³ O. Bussolati¹

¹Unità di Patologia Generale, Dipartimento Scienze Biomediche, Biotecnologiche e Traslazionali (SBiBiT), Università di Parma, Parma; ²Centro Ricerca M. Tettamanti, Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca, Monza (MB); ³Clinica Pediatrica Università di Milano-Bicocca, Ospedale S. Gerardo, Fondazione MBBM, Monza, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: è noto che le cellule mesenchimali stromali del midollo osseo (MSC) stabiliscono complessi rapporti con le cellule staminali emopoietiche. è stato ipotizzato che, in caso di leucemia, le MSC interagiscano con i blasti leucemici, promuovendone la sopravvivenza e contribuendo alla loro resistenza ai trattamenti. L'enzima L-Asparaginasi (ASP) è un componente essenziale dei protocolli terapeutici nella leucemia linfoblastica acuta (ALL). ASP idrolizza gli aminoacidi asparagina e glutamina ed i blasti ALL, esprimendo bassi livelli di asparagina sintetasi (ASNS), subiscono un grave stress nutrizionale che causa morte cellulare. Esperimenti condotti *in vitro* hanno dimostrato che le MSC producono asparagina, contrastando così l'effetto di ASP.¹ Di conseguenza, è stato ipotizzato che le MSC possano fungere *in vivo* da fonte di asparagina per i blasti leucemici e che tale interazione possa costituire uno dei meccanismi di resistenza all'ASP, un'ipotesi che ha suscitato un dibattito con valutazioni contrastanti.^{2,3} Tuttavia, nessuna informazione è a tutt'oggi disponibile sugli effetti di ASP su MSC. Per questo motivo, abbiamo studiato gli effetti di ASP su MSC, derivanti da donatori sani, valutando gli effetti dell'enzima sulla proliferazione delle MSC nonché sulla loro capacità di adattarsi allo stress nutrizionale causato da ASP. Dato che la sintesi intracellulare di asparagina richiede la disponibilità di glutamina, gli esperimenti sono stati effettuati in assenza od in presenza dell'inibitore irreversibile di Glutamina Sintetasi (GS) L-metionina-sulfoximina (MSO).

METODI: Le MSC sono state isolate da midollo osseo di donatori sani, seguendo le procedure di purificazione descritte dal nostro gruppo⁴ e successivamente coltivate in DMEM (Dulbeccòs modified Eagle medium) contenente il 10% di FBS, 2 mM di glutamina ed antibiotici (100 U/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomina). Le cellule sono state seminate ad una densità di 3 x 10³ cells/cm² e sono state trattate con 1 U/ml di ASP (da *Erwinia chrysanthemi*), in presenza o in assenza di MSO (1 mM). La vitalità è stata misurata ogni giorno, per sei giorni consecutivi, tramite saggio della resazurina e conta cellulare. qRT-PCR e Western Blot sono stati utilizzati per valutare l'espressione genica a livello di mRNA e di proteina. L'attività di mTORC1 è stata valutata determinando in Western Blot la forma fosforilata in T389 del substrato specifico p70S6K1. L'induzione della forma lipidata di LC3 è stata utilizzata come marker di autofagia.

RISULTATI: Entrambi i trattamenti, ASP ed ASP con MSO, inibiscono la proliferazione delle MSC a tempi precoci (48 ore) anche se questo modello cellulare si dimostra scarsamente sensibile all'enzima (IC₅₀ per ASP >10 U/ml e 0.3 ± 0.05 U/ml, rispettivamente, in assenza ed in presenza di MSO). Le cellule trattate solo con ASP, dopo l'iniziale arresto proliferativo, al terzo giorno riprendono a crescere, a dimostrazione di un'evidente capacità di adattamento al trattamento. Viceversa, durante la contemporanea somministrazione di ASP e dell'inibitore di GS, MSO, le MSC non mostrano alcuna ripresa proliferativa e vanno incontro a morte dopo sei giorni (Figura 1). Le analisi di espressione genica mostrano che, a seguito del trattamento con ASP, le MSC inducono rapidamente l'espressione di asparagina sintetasi (ASNS) e del trasportatore di glutamina SNAT2 (SLC38A2), mentre i livelli di GS aumentano a tempi più tardivi e solo a livello proteico. La presenza di stress nutrizionale in cellule trattate con ASP è dimostrata dal transiente aumento della quota fosforilata del fattore tradizionale eIF2alfa e del fattore proapoptotico CHOP, nonché dalla diminuzione dell'attività di mTOR, con innesco di autofagia. Il trattamento simultaneo con ASP e MSO sopprime l'innesco di autofagia e causa un persistente aumento di CHOP.

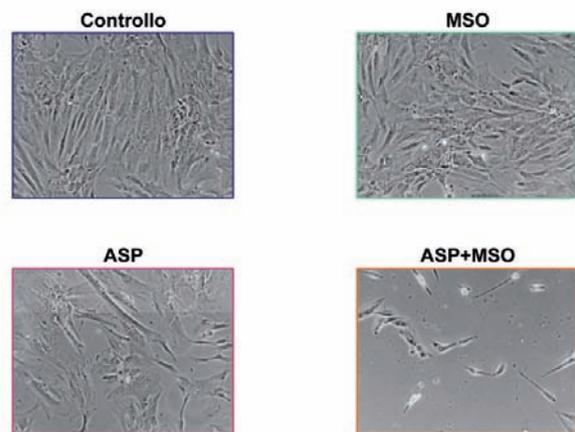
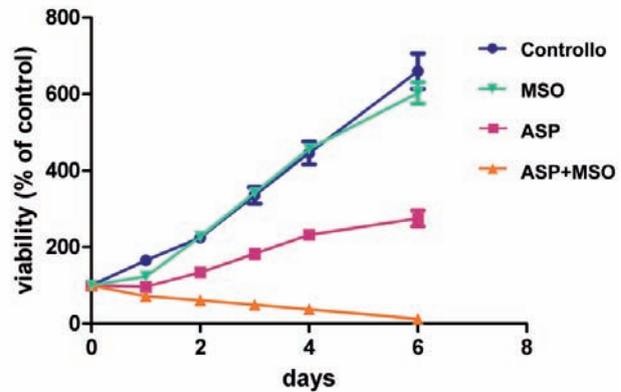


Figura 1.

CONCLUSIONI: Le MSC sono poco sensibili ad ASP e manifestano capacità adattative al trattamento, con ripresa proliferativa al terzo giorno di trattamento. L'inibizione di Glutamina Sintetasi (GS) con

MSO aumenta la sensibilità delle MSC ad ASP e causa la comparsa non solo di arresto proliferativo ma anche di morte cellulare. Sia in cellule trattate con ASP che con ASP + MSO aumenta la fosforilazione di eIF2alfa, un indicatore di stress nutrizionale che attiva numerose risposte a livello genico, e vengono indotti tipici bersagli di p-eIF2alfa, quali l'Asparagina Sintetasi, il trasportatore SNAT2 ed il fattore pro-apoptico CHOP. Tuttavia, mentre nelle cellule trattate con la sola ASP, CHOP è indotto solo transitoriamente, nelle cellule trattate sia con ASP che con MSO l'induzione di CHOP è prolungata, rivelando la natura apoptotica della morte cellulare causata dal trattamento. Lo stress nutrizionale indotto da ASP causa anche un progressivo aumento dei livelli di Glutamina Sintetasi ed una diminuzione di attività di mTOR con conseguente attivazione di autofagia. È interessante notare che, in queste condizioni, la ripresa proliferativa avviene a tempi tardivi, quando aumentata espressione di GS ed attivazione di autofagia si sono già verificate, suggerendo che questi due meccanismi giochino un ruolo importante nell'adattamento. L'ipotesi è confermata dal fatto che MSO, inibendo GS e bloccando l'autofagia per una anomala attivazione di mTOR (come descritto da nostro gruppo in altri modelli cellulari^{5,6}), sopprime l'adattamento. Questi risultati pongono le basi per chiarire e modulare farmacologicamente l'interazione tra MSC e blasti ALL.

Bibliografia:

1. Iwamoto S, Mihara K, Downing JR, Puj CH, Campana D. Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *J Clin Invest* 2007; 117:1049-1057
2. Tong WH, Pieters R, Hop WC, Lanvers-Kaminsky C, Boos J, van der Sluis IM. No evidence of increased asparagine levels in the bone marrow of patient with acute lymphoblastic leukemia during asparaginase therapy. *Pediatr Blood Cancer* 2013; 60:258-26
3. Steiner M, Hochreiter D, Kasper DC, Kornmüller R, Pichler H, Haas OA, Pötschger U, Hutter C, Dworzak MN, Mann G, Attarbaschi A. Asparagine and aspartic acid concentrations in bone marrow versus peripheral blood during Berlin-Frankfurt-Münster-based induction therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2012; 53:1682-1687.
4. André V et al Mesenchymal stem cells from Shwachman-Diamond syndrome patients display normal functions and do not contribute to hematological defects. *Blood Cancer J.* 2012 Oct 12; 2:e94
5. Tardito S, Chiu M, Franchi-Gazzola R, Dall'Asta V, Comi P, Bussolati O. The non-proteinogenic amino acids L-methionine sulfoximine and DL-phosphinothricin activate mTOR. *Amino Acids* 2012; 42:2507-2512
6. Tardito S, Chiu M, Uggeri J, Zerbini A, Da Ros F, Dall'Asta V, Missale G, Bussolati O. L-Asparaginase and inhibitors of glutamine synthetase disclude glutamine addiction of β -catenin-mutated human hepatocellular carcinoma cells. *Curr Cancer Drug Targets* 2011;11:929-43.

P048

INCIDENZA, FATTORI DI RISCHIO E CAUSE DEGLI EVENTI MORTALI PRECOCI OSSERVATI NEI BAMBINI AFFETTI DA LMA NON-M3 TRATTATI IN ITALIA NEL PERIODO 1982-2011: UN REPORT DEL GDL AIEOP PER LA LMA

M. Spinelli,¹ A. Pession,² R. Masetti,² R. Rondelli,² G. Basso,³ A. Biondi,¹ F. Casale,⁴ T. Coliva,¹ F. Fagioli,⁵ M. Luciani,⁶ L. Lo Nigro,⁷ G. Menna,⁸ M.C. Micalizzi,⁹ N. Santoro,¹⁰ A.M. Testi,¹¹ M. Zecca,¹² F. Locatelli,⁶ C. Rizzari¹

¹Per il Gruppo di Lavoro AIEOP ANLL, A.O. San Gerardo, Fondazione MBM, Monza (MB); ²Per il Gruppo di Lavoro AIEOP ANLL, Policlinico Sant'Orsola Malpighi, Bologna; ³Per il Gruppo di Lavoro AIEOP ANLL, Dipartimento di Pediatria, Padova; ⁴Per il Gruppo di Lavoro AIEOP ANLL, Dipartimento di Pediatria, Seconda Università degli Studi di Napoli, Napoli; ⁵Per il Gruppo di Lavoro AIEOP ANLL, Ospedale Regina Margherita, Torino; ⁶Per il Gruppo di Lavoro AIEOP ANLL, Ospedale Bambin Gesù, Roma; ⁷Per il Gruppo di Lavoro AIEOP ANLL, Dipartimento Scienze Mediche e Pediatriche, Catania; ⁸Per il Gruppo di Lavoro AIEOP ANLL, Ospedale Santobono - Pausilipon, Napoli; ⁹Per il Gruppo di Lavoro AIEOP ANLL, Istituto G. Gaslini, Genova; ¹⁰Per il Gruppo di Lavoro AIEOP ANLL, UO Pediatrica I Policlinico, Bari; ¹¹Per il Gruppo di Lavoro AIEOP ANLL, Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università La Sapienza, Roma; ¹²Per il Gruppo di Lavoro AIEOP ANLL, Fondazione IRCCS, Policlinico San Matteo, Pavia, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Le leucemie mieloidi acute (LMA) dell'età pediatrica rappresentano il 15-20% dei casi di leucemia acuta dell'età pediatrica. I risultati dei moderni protocolli di cura per la LMA riportano una sopravvivenza a lungo termine superiore al 60-65%. Nonostante questi miglioramenti, un'importante causa di fallimento terapeutico resta la morte del paziente per cause non direttamente legate all'espressione della malattia leucemica, soprattutto nella fase di Induzione. Da oltre 30 anni i bambini affetti da LMA diagnosticati in Italia vengono sottoposti a trattamenti specifici secondo protocolli di cura disegnati in gran parte da specifici gruppi di lavoro dell'Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica (AIEOP). A partire dal 2001 è stato introdotto il protocollo AIEOP LAM 2002 che è stato adottato nella quasi totalità dei Centri AIEOP e che è stato chiuso nel giugno 2011 con un arruolamento finale di circa 400 pazienti. L'obiettivo primario dello studio è stato quello di valutare l'incidenza degli episodi mortali precoci (Early Deaths=ED) e delle loro cause nella fase di Induzione nei pazienti pediatrici affetti da LMA diagnosticati e trattati in Italia dal 01/02/1982 (data di apertura del protocollo AIEOP LAM-82) al 30/06/2011 (data di chiusura del protocollo AIEOP LAM 2002). Gli obiettivi secondari sono stati la valutazione delle caratteristiche cliniche e biologiche dei pazienti deceduti rispetto a quelli non deceduti, e la rilevanza di altri eventuali fattori di rischio associati, limitatamente alle coorti di pazienti nei quali fossero disponibili dati utilizzabili per tale analisi.

METODI: La definizione di ED per questo studio include qualunque evento che ha portato a morte il paziente e che sia stato osservato entro le prime 6 settimane (42 giorni) dalla diagnosi. Dal 1982 al 2001 l'AIEOP (Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica) ha condotto cinque trials consecutivi (AIEOP LAM-82/-87/-87M/-91P/-92PM), che in questo studio sono stati per comodità definiti AIEOP LAM 1982-1987 e AIEOP LAM 1987-2001, per il trattamento dei pazienti di età <15 anni affetti da LMA. Nel periodo 1981-2001 alcuni Centri AIEOP hanno reclutato i pazienti affetti da LMA in protocolli non AIEOP, che in questo studio sono stati per comodità raggruppati e definiti come NON-AIEOP 1981-2001. Questi protocolli sono derivati da numerose altre esperienze internazionali (gruppi BFM, MRC, CCSG, EORTC). A partire dal 2001 è stato aperto al reclutamento il protocollo AIEOP LAM 2002, che ha visto la partecipazione di tutti i pazienti AIEOP (tale protocollo è stato chiuso nel 2011). Dal 1981 al 2011, in Italia, 1223 pazienti pediatrici hanno ricevuto una diagnosi di LMA e sono stati trattati in accordo con protocolli AIEOP o con protocolli non AIEOP. Dei 1223 pazienti, 964 sono stati arruolati nei protocolli AIEOP (AIEOP LAM 1982-1987 [n. 171], AIEOP LAM 1987-2001 [n. 397] e AIEOP LAM 2002-2011 [n. 396], mentre 259 pazienti sono stati reclutati nei protocolli non AIEOP (NON-AIEOP 1981-2001). Grazie ai dati disponibili presso il database AIEOP FONOP di Bologna, è stata effettuata un'analisi statistica retrospettiva dell'incidenza delle EDs, delle corrispettive caratteristiche cliniche e biologiche all'esordio della malattia e dei possibili fattori di rischio connessi osservati nei pazienti pediatrici affetti da LMA e arruolati in Italia nel periodo 1982-2011. È stata condotta un'analisi descrittiva delle misure di tendenza centrale (media e mediana), complete di range (minimo-massimo) e deviazione standard (DS) delle variabili continue (età, sesso, globuli bianchi, SNC, FAB, fascia di rischio).

RISULTATI: L'incidenza di EDs sul numero totale dei pazienti osservati è stato del 6,1% mentre nei protocolli AIEOP LAM 1982-1987, AIEOP LAM 1987-2001, NON-AIEOP 1981-2001 ed AIEOP LAM 2002-2011 è stata rispettivamente del 8,8%, 6,1%, 8,9% e 3,1%. Il confronto tra i quattro gruppi ha evidenziato come la riduzione di incidenza di EDs nel protocollo AIEOP LAM 2002 sia risultata statisticamente significativa sia rispetto al gruppo AIEOP LAM 1982-1987 (p=0.001), che rispetto al gruppo AIEOP LAM 1987-2001 (p=0.007), che rispetto al gruppo NON-AIEOP 1981-2001 (p=0.001). Nell'analisi univariata è stato possibile individuare che tra i pazienti arruolati nei protocolli AIEOP nel periodo 1987-2001 e nel protocollo AIEOP LAM 2002 l'iperleucocitosi ha rappresentato un fattore di rischio statisticamente significativo (AIEOP LAM 1987-2001: 10 [17.9%] di 56 pazienti con WBC $\geq 100 \times 10^9/L$ vs 14 [4.6%] di 302 pazienti con WBC < $100 \times 10^9/L$; p=0.001; AIEOP LAM 2002-2011: 6 [9.2%] di 65 pazienti con WBC $\geq 100 \times 10^9/L$ vs 6 [1.8%] di 331 pazienti con WBC < $100 \times 10^9/L$; p=0.001). Nel gruppo di pazienti AIEOP LAM 1987-2001 sono risultati essere fattori di rischio statisticamente significativi anche il sesso maschile (19 [8.4%] di 226 pazienti maschi vs 5 [2.9%] di 171 pazienti femmine; p=0.017) ed il coinvolgimento SNC all'esordio (4 [18.2%] di 22 pazienti SNC positivo vs 11 [3.8%] di 287 pazienti SNC negativo; p=0.016). Va tenuto presente che questo dato è stato ottenuto in un numero molto piccolo di pazienti (4/22). Invece, nel gruppo di

pazienti NON-AIEOP 1981-2001 un fattore di rischio statisticamente significativo per EDs è risultata l'età < 2 anni (14 [19.7%] di 71 pazienti < 2 anni vs 9 [4.8%] di 188 pazienti > 2 anni; $p=0.001$). La comparazione delle EDs osservate in base al tipo di gruppo di rischio (SR vs HR) attribuito nel gruppo AIEOP LAM 2002-2011 non ha invece determinato differenze statisticamente significative. L'analisi di regressione logistica multivariata ha mostrato come l'iperleucocitosi ($p=0.031$) ed il protocollo AIEOP LAM 2002 ($p=0.003$) siano fattori prognostici indipendenti per EDs e specificatamente il primo è un fattore indipendente prognosticamente sfavorevole per EDs, mentre il secondo rappresenta un fattore indipendente prognosticamente favorevole. Le cause principali di ED osservate nel nostro studio sono stati gli eventi emorragici e la leucostasi (28 [47.5%] di 59 pazienti), che si manifestano soprattutto nei primi 14 giorni dalla diagnosi (20 [74.1%] di 27 pazienti). Dei 21 pazienti con iperleucocitosi all'esordio deceduti in Induzione, 16 (76.2%) pazienti hanno presentato come evento fatale proprio un evento emorragico o leucostasi. Solo il 18.6% dei pazienti (11/59) è deceduto in Induzione per un evento infettivo, peraltro la maggior parte (7/11) nel periodo 15-42 giorni.

CONCLUSIONI: I risultati ottenuti nel nostro studio ci hanno permesso in sintesi di disporre di alcune importanti informazioni: l'incidenza globale di EDs in un periodo di tempo molto lungo (1981-2011) ed il suo frazionamento nel corso degli anni (1981-2001 e 2001-2011) e per tipo di trattamento (protocolli di estrazione AIEOP nel periodo 1982-2001 e 2001-2011, e protocolli di estrazione non AIEOP nel periodo 1981-2001), documentandone la progressiva riduzione. In particolare, l'incidenza di ED nei pazienti affetti da LMA arruolati nel protocollo AIEOP LAM 2002 è risultata significativamente più bassa rispetto ai precedenti protocolli AIEOP e tra le più basse in confronto ai più recenti protocolli di studio internazionali.

Lo studio ci ha permesso di evidenziare le cause di morte sia globalmente che nei periodi critici 0-14 giorni e 15-42 giorni della fase di Induzione, permettendo quindi di individuare le criticità (iperleucocitosi, leucostasi, emorragie, infezioni) e le aree di potenziale miglioramento, tra queste un ulteriore perfezionamento delle linee guida specifiche nella terapia di supporto per il trattamento delle complicanze metaboliche, emorragiche ed infettive, che sono oggi parte integrante e fondamentale di un moderno protocollo di cura.

Bibliografia:

1. Pizzo, P.A.P., D.G., *Principles and practice of pediatric oncology* fourth edition ed.
2. Kaspers, G.J. and C.M. Zwaan, *Pediatric acute myeloid leukemia: towards high-quality cure of all patients*. Haematologica, 2007. 92(11): p. 1519-32.
3. Kaspers, G.J. and U. Creutzig, *Pediatric acute myeloid leukemia: international progress and future directions*. Leukemia, 2005. 19(12): p. 2025-9.
4. Pession, A., et al., *Treatment and long-term results in children with acute myeloid leukaemia treated according to the AIEOP AML protocols*. Leukemia, 2005. 19(12): p. 2043-53.
5. Creutzig, U., et al., *Early deaths and treatment-related mortality in children undergoing therapy for acute myeloid leukemia: analysis of the multicenter clinical trials AML-BFM 93 and AML-BFM 98*. J Clin Oncol, 2004. 22(21): p. 4384-93.

P049

RUOLO DEI POLIMORFISMI COME PREDITTORI GENETICI DELLE ALTERAZIONI NEURO-COGNITIVE E COMPORTAMENTALE NEI BAMBINI AFFETTI DA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA

J.M.C. Blom,¹ C. Migliozi,² L. Montanari,² G. Rigillo,³ M. Cellini²

¹Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche Materno-Infantili e dell'Adulto, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena; ²Azienda Ospedaliera, Università di Modena Policlinico, Modena; ³Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La Leucemia Linfoblastica Acuta (LLA) colpisce bambini e adolescenti in una fase di rapido e cruciale sviluppo encefalico. Studi precedenti hanno dimostrato che i farmaci utilizzati per la terapia della LLA, in particolare Metotressate e Corticosteroidi, sono responsabili di danni all'encefalo, soprattutto a carico della sostanza bianca delle zone prefrontali e dell'ippocampo, alterandone il normale accrescimento. L'adeguata matu-

razione di tali aree encefaliche nel periodo dell'infanzia e dell'adolescenza è essenziale per un corretto sviluppo cognitivo, comportamentale, esecutivo ed emozionale: questo dato dovrebbe dunque fare ipotizzare la presenza costante di outcome neurocognitivi negativi nei bambini colpiti dalla LLA. Tuttavia, soltanto una modesta percentuale di bambini long-term survivors alla LLA va incontro a problematiche neurocognitive, mentre la maggior parte di essi supera la malattia e le sue implicazioni senza reliquati. In questo studio abbiamo, in primo luogo, investigato i fattori di rischio e i fattori protettivi che possano essere responsabili della differenza negli outcome neurocognitivi dei bambini long-term survivors alla LLA; tra questi, abbiamo valutato alcuni polimorfismi genetici rilevanti per la normale fisiologia encefalica (5-HTTLPR, BDNF, COMT). In secondo luogo, abbiamo selezionato una batteria di test, utili per effettuare uno screening di potenziali alterazioni neurocognitive, al fine di suddividere i bambini con diagnosi di LLA in diverse classi di rischio, e offrire loro, dove necessario, un intervento precoce e mirato.

METODI: Sono stati arruolati 21 bambini di età compresa tra 1 e 18 anni, con nuova diagnosi di LLA, trattati secondo i protocolli AIEOP 2000-2005 o AIEOP-BFM-2009, e suddivisi in classi di rischio secondo protocollo. Tutti i bambini sono stati sottoposti a valutazione esecutiva, comportamentale, emozionale. Le funzioni esecutive sono state testate utilizzando i test BRIEF e BRIEF-P. La valutazione comportamentale ed emozionale è stata effettuata utilizzando i test SDQ. La genotipizzazione è stata effettuata tramite un unico prelievo di sangue periferico per i polimorfismi di 5HTTLPR (SS, SL, LL), BDNF (val66met, met66met) e COMT (val158met, met158met). Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando test non parametrici (test U di Mann-Whitney e test di Kruskal-Wallis) e, dove possibile, test parametrici (ANOVA, MANOVA, test di regressione e correlazioni).

RISULTATI: Dai risultati preliminari, è emersa una compromissione delle funzioni esecutive nel 26-38% dei casi, mentre problemi emozionali e comportamentali sono risultati presenti nel 27% dei casi, con peggiori performance nel sesso maschile. I pazienti con allele SL del gene 5HTTLPR hanno ottenuto punteggi significativamente più compromessi in alcune aree delle funzioni esecutive rispetto ai pazienti con allele LL; le aree cognitive maggiormente influenzate dalla presenza dell'allele S sono risultate essere quelle implicate nella modulazione delle risposte emozionali e nella flessibilità per la risoluzione di compiti e problemi (Figura 1 e 2). Il campione ristretto e la suddivisione asimmetrica dei polimorfismi all'interno di esso non hanno invece permesso, per il momento, alcuna correlazione con i polimorfismi dei geni BDNF e COMT.

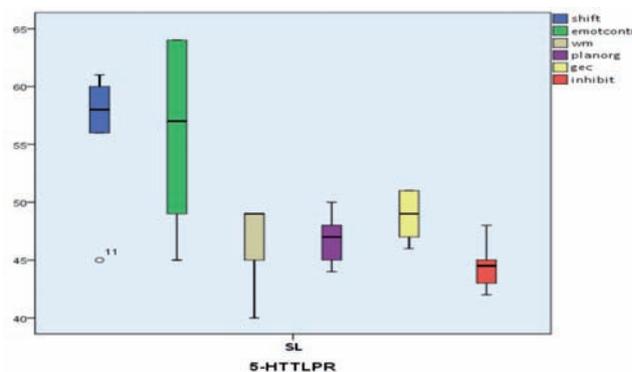


Figura 1. Profilo dei domini delle funzioni esecutive relazionati al polimorfismo SL del gene 5HTTLPR: le funzioni Shift ed Emotional Control hanno dimostrato un'associazione con i polimorfismi del gene 5HTTLPR.

CONCLUSIONI: La Leucemia Linfoblastica Acuta ha raggiunto, negli ultimi anni, ottimi risultati in termini di sopravvivenza, grazie soprattutto alla ricerca e al perfezionamento dei protocolli di trattamento; tuttavia, l'importante traguardo in termini di sopravvivenza non è stato seguito da un'adeguata attenzione alla qualità della vita a lungo termine di questi bambini: infatti, attualmente non siamo ancora in grado prevedere in modo completo e precoce il rischio di sviluppare alterazioni neurocognitive ed emozionali nel lungo periodo. Questo studio si è proposto di indagare questi ambiti ancora poco conosciuti e, nonostante esso sia ancora in fase iniziale, ha fornito e sta fornendo interessanti spunti di riflessione riguardo la vulnerabilità dei bambini long-term survivors alla LLA. I risultati ottenuti hanno confermato che,

nonostante la maggior parte dei pazienti non presenti deficit neurocognitivi a lungo termine, una percentuale di essi mostra una franca compromissione delle funzioni esecutive e delle performance comportamentali ed emozionali. Tali outcome sono risultati correlati ai polimorfismi del gene 5HTTLPR. Questo dato suggerisce un ruolo rilevante dei polimorfismi genetici nel determinare la vulnerabilità di bambini sottoposti alla terapia per LLA, e la necessità di ulteriori indagini in questa direzione. La genetica, infatti, e la sua correlazione con le funzioni neurocognitive, lasciano aperte diverse strade interpretative all'interno dell'ambito dell'interazione GXE (genesXenvironment). Alla luce di questi dati, ci sembra essenziale approfondire ulteriormente il ruolo della vulnerabilità genetica nell'insorgenza di problemi neurocognitivi nei bambini colpiti dalla LLA, procedere all'individuazione, tramite un approccio multidisciplinare, di una metodica di screening in grado di identificare gli endofenotipi a rischio, e tentare così di dare risposta alle innumerevoli domande ancora aperte: uno screening neurocognitivo e psicosociale potrebbe identificare precocemente lo sviluppo degli outcome neurocognitivi a lungo termine dei bambini sopravvissuti alla LLA? C'è un momento giusto per intervenire e prevenire queste alterazioni? Ed infine, la suddivisione in classi di rischio neurocognitivo potrebbe permettere una prevenzione ed un intervento precoce, e, di conseguenza, una riduzione delle disabilità esecutive, comportamentali ed emozionali a lungo termine di questi bambini?

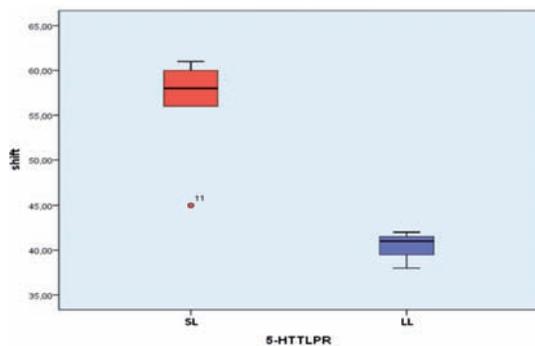


Figura 2. Relazione tra la scala Shift del test BRIEF e i polimorfismi del gene 5HTTLPR: i bambini che presentano l'allele S hanno ottenuto punteggi significativamente più patologici rispetto ai bambini che non presentano l'allele S.

Bibliografia:

- Krull, Kevin R. et al. *Screening for Neurocognitive Impairment in Pediatric Cancer Long-Term Survivors*. Journal of Clinical Oncology. 2008, vol.26, 25:4138-4143
- Kamdar, Kala Y. et al. *Folate Pathway Polymorphisms Predict Deficit in Attention and Processing Speed After Childhood Leukemia Therapy*. Pediatric Blood Cancer. 2011, vol.57, 3:454-460
- Browers, Pim *Commentary: Study of the Neurobehavioral Consequences of Childhood Cancer: Entering the Genomic Era?* Journal of Pediatric Psychology. 2005, vol.30,1:79-84
- Pessoa, Luiz *On the relationship between emotion and cognition*. Nature Reviews Neuroscience. 2008, vol.9:148-158

P050

MLL/AF6 INDUCE L'ATTIVAZIONE DEL RAS PATHWAY CONTROLLANDO LA LOCALIZZAZIONE DI AF6 NELLA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA

E. Manara, C. Tregnago, A. Sanja, V. Bisio, M. Pigazzi, G. Basso
Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino, Università di Padova, Padova, Italy

SCOPO DEL LAVORO: Il gene *MLL* è coinvolto molto frequentemente nelle traslocazioni cromosomiche associate alla leucemia acuta. I partner genici di *MLL* identificati ad oggi sono più di 60, ma ancora molto rimane da capire sul ruolo funzionale di queste traslocazioni. In particolare, la traslocazione t(6;11)(q27;q23)*MLL-AF6* ha una frequenza del 14% nella casistica italiana (AIOEP) delle traslocazioni coinvolgenti il gene *MLL*, ed è risultata contraddistinguere un sottogruppo di pazienti a prognosi infausta (EFS 23.3% a 3 anni).¹ Recentemente,

Liedtke M. et al. hanno attribuito un ruolo di fattore di trascrizione alla chimera *MLL-AF6* in quanto capace di accendere lo stesso pathway oncogenico, caratterizzato dall'overespressione dei geni *HOXA* e di *MEIS1*, descritto per le fusioni più comuni e conosciute di *MLL*, come *MLL-AF9* e *MLL-AF10*.² In questo lavoro, ci siamo prefissati di approfondire il ruolo funzionale della chimera *MLL-AF6*, perchè diversamente dagli altri geni partner di *MLL* spesso a localizzazione nucleare, AF6 è una proteina citoplasmatica che svolge un ruolo chiave nell'attivazione fisiologica del pathway di RAS. Inoltre, delucidare i meccanismi molecolari coinvolti nel processo di trasformazione della chimera *MLL-AF6* può portare a miglioramenti delle terapie esistenti per questo gruppo di pazienti a cattiva prognosi.

METODO: Sono stati eseguiti esperimenti di immunofluorescenza per identificare la localizzazione di AF6 e di RAS in colture primarie di midollo sano e nelle linee leucemiche ML-2 e SHI-1, entrambe traslocate t(6;11)*MLL-AF6*. Il silenziamento genico di AF6 e di *MLL-AF6* è stato condotto in midolli sani e nelle suddette linee cellulari e sono stati condotti saggi di clonogenicità e di apoptosi. Sono state eseguite analisi di Real time PCR (RQ-PCR) e di western blot (WB) per monitorare i livelli di espressione genica e proteica delle proteine a valle di AF6/RAS. L'espressione genica (GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Affymetrix) di 11 pazienti t(6;11) riarrangiati e di 11 midolli sani è stata eseguita per trovare i geni differenzialmente espressi tra i due gruppi. Sono stati effettuati trattamenti con inibitori chimici di RAS o della sua via di segnale.

RISULTATI: Le proteine AF6 e RAS si rivelano co-localizzare nel citoplasma dei midolli sani. Esperimenti di immunoprecipitazione e saggi di attività di RAS nei controlli sani hanno inoltre dimostrato che la presenza di AF6 e RAS è importante per mantenere bassi i livelli della forma attiva di RAS (RAS-GTP) nel citoplasma. Il silenziamento del trascritto di AF6 in questi midolli sani si è dimostrato indurre un aumento dell'espressione di RAS e un aumento della fosforilazione della sua via di segnale evidenziando che AF6 controlla l'attività di RAS. A differenza dei midolli sani, la proteina AF6 è localizzata nel nucleo delle cellule delle linee t(6;11) traslocate, ML-2 e SHI-1. È stato interessante trovare che l'attivazione di RAS in queste linee cellulari è elevata. Il silenziamento della chimera nelle linee cellulari ha spostato AF6 dal nucleo al citoplasma, e abbassato i livelli della forma attiva di RAS suggerendo che AF6, tornando nel citoplasma, sia in grado di inibire RAS. Inoltre, la fosforilazione dei geni target (RAF, MEK e ERK) a valle di RAS, dopo il silenziamento della chimera, risulta diminuita confermando ulteriormente il coinvolgimento di RAS nelle leucemie *MLL-AF6* traslocate. L'analisi di espressione genica dei pazienti *MLL-AF6* e dei midolli sani ha mostrato come i geni differenzialmente espressi tra questi due gruppi risultano essere quelli tipicamente coinvolti nelle leucemie *MLL*-riarrangiate (cioè i geni *HOX*). L'analisi di pathway con il software DAVID ha evidenziato però che anche il pathway delle MAPK e dell'apoptosi sono maggiormente deregolati in questi pazienti. Nelle stesse linee cellulari quindi abbiamo usato un composto che blocca la via di segnale di RAS (PD98059) che ha prodotto risultati, in termini di proliferazione e morte cellulare, simili agli effetti indotti dal silenziamento della chimera. Attenzione particolare va riposta sul farmaco Tipifarnib, la cui azione ha effetti su RAS tramite l'inibizione delle farnesiltransferasi, gli enzimi deputati all'attacco di un gruppo farnesile alla proteina RAS e che dunque ne permettono l'ancoraggio alla membrana plasmatica, condizione necessaria per la ricezione e la trasmissione del segnale dai recettori di membrana alle proteine a valle del suo pathway. Questo farmaco è stato dimostrato diminuire la crescita cellulare e aumentare l'apoptosi sia in linee cellulari che in colture primarie di pazienti *MLL-AF6* riarrangiati ed è stato documentato come lo stesso farmaco non sia stato in grado di indurre gli stessi effetti in diverse linee cellulari con differente riarrangiamento di *MLL* (es. *MLL-AF9*).

CONCLUSIONI: Queste evidenze attribuiscono alla chimera *MLL-AF6* la capacità di controllare la localizzazione di AF6 promuovendo così l'attivazione aberrante di RAS. Inoltre, ulteriori studi con il Tipifarnib sono in corso per poter proporre questo farmaco come una nuova possibile strategia terapeutica nel trattamento di questi bambini con t(6;11).

Bibliografia:

- Pigazzi M, Masetti R, Bresolin S, Beghin A, Di Meglio A, Gelain S, Trentin L, Baron E, Giordan M, Zangrando A, Buldini B, Leszl A, Putti MC, Rizzari C, Locatelli F, Pession A, Te Kronnie G, Basso G. *MLL partner genes drive distinct gene expression profiles and genomic alterations in pediatric acute myeloid leukemia: an AIEOP study*. Leukemia. 2011 Mar;25(3):560-3.

2. Liedtke M, Ayton PM, Somerville TC, Smith KS, Cleary ML. Self-association mediated by the Ras association 1 domain of AF6 activates the oncogenic potential of MLL-AF6. *Blood*. 2010 Jul 8;116(1):63-70.

P051

TRATTAMENTO DIVERSIFICATO PER GRUPPI DI RISCHIO PER LE MALATTIE LINFOPROLIFERATIVE POST-TRAPIANTO DI ORGANNO SOLIDO (PTLD) "AGGRESSIVE" IN PEDIATRIA: ESPERIENZA DI UN SINGOLO CENTRO

E. Giraldi,¹ M. Provenzi,¹ C. Foglia,¹ M. Colledan,² R. Fiocchi,³ S. Bolognini,¹ R. Sebastiani,³ L. Cavalleri,¹ A. Allegrini,¹ L. Cattaneo,¹ A. Sonzogni,⁴ A. Gianatti,⁴ G. Fasolini,⁵ G. Bonini,⁵ A. Rambaldi,⁶ L. D'Antiga,⁷ V. Conter⁸

¹Pediatria Oncologica; ²Chirurgia Trapianti; ³Cardiologia; ⁴Anatomia Patologica; ⁵Radiologia; ⁶Ematologia; ⁷Pediatria, Azienda Ospedaliera Papa Giovanni XXIII, Bergamo; ⁸Pediatria, Università Bicocca Milano, Ospedale San Gerardo Monza, Monza, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVITÀ DELLO STUDIO: I disordini linfoproliferativi post-trapianto (PTLD) aggressivi rappresentano una complicanza severa, potenzialmente fatale, del trapianto d'organo solido. Sebbene la maggior parte delle PTLD siano di origine B-cellulare, una piccola percentuale (10-15%) è di derivazione T-cellulare ad andamento clinico particolarmente aggressivo, spesso fatale.^{1,2} Le PTLD aggressive, solitamente ad insorgenza tardiva (oltre i 12 mesi dal trapianto), sono generalmente indistinguibili dai franchi linfomi degli immunocompetenti presentandosi nella maggior parte dei casi come malattia monomorfo-mono-clonale, per lo più disseminata e/o rapidamente progressiva. Fattori prognostici sfavorevoli sono stati identificati nell'interessamento multi-sistemico (>2 siti interessati), coinvolgimento del sistema nervoso centrale e/o midollare, disfunzione d'organo, insorgenza tardiva, EBV-negatività, basso *performance status*, origine T-cellulare ed elevato LDH; la monoclonalità è un altro fattore prognostico negativo, sebbene anche malattie polimorfiche e policlonali possono comportarsi come franco linfoma.^{3,4} Non vi è ancora un consenso sul trattamento ottimale delle PTLD aggressive ma è ormai chiaro che la esclusiva modulazione della immunosoppressione (IS), *gold standard* delle PTLD benigne, è generalmente inefficace nell'ottenere RC a lungo termine. Diverse opzioni terapeutiche aggiuntive tra cui la chirurgia, radioterapia, immunoterapia e chemioterapia sono state, pertanto, impiegate. La chemioterapia convenzionale, pur rappresentando l'unico trattamento in grado di ottenere risposte a lungo termine, è tuttavia gravata da un'elevata morbidità e mortalità, dovute principalmente alla severa immunodepressione e complicanze infettive.⁵ Risultati incoraggianti sono stati ottenuti con l'uso dell'anticorpo monoclonale anti-CD20 Rituximab,⁶ caratterizzato da un'elevata specificità e sicurezza; tuttavia, se impiegato come agente singolo nei pazienti ad alto rischio determina una risposta spesso incompleta e/o di breve durata; così la chirurgia o la radioterapia, nelle PTLD localizzate, e la chemioterapia a ridotta intensità, per le forme disseminate e/o progressive, dovrebbero essere associate per migliorarne l'*outcome* a lungo termine.⁷ Descriviamo la nostra esperienza nella identificazione di diversi gruppi di rischio delle PTLD aggressive e nel conseguente trattamento gruppo-specifico.

PAZIENTI E METODI: Dal 1997 al 2011 c/o il Centro Trapianti Pediatrici di Bergamo più di 500 bambini sono stati sottoposti a trapianto di organo solido e, dopo una mediana di 33 m (5-93) dal trapianto di fegato (14), cuore (6), e multiorgano (2), sono state osservate 22 PTLD aggressive in 11 F e 11 M, di età mediana di 50 mesi (9-206). Tutti i pazienti erano in trattamento immunosoppressivo con gli inibitori delle calcineurine (tacrolimus o ciclosporina-A). Sec. la class. WHO⁸ le PTLD sono state suddivise in: a) PTLD *early lesions* CD20+ multi-sistemica (1); b) PTLD CD20+ polimorfica policlonale (5) e monoclonale (1); c) LNH B-cellulare (14), di cui Burkitt/Burkitt like (6) ed a grandi cellule B (8); d) PTLD T-cellulare polimorfica monoclonale. Lo stadio sec. Murphy era I in 2 II in 3, III in 15 e IV in 2 casi, rispettivamente. 15 bambini presentavano uno scarso *performance status* (≥ 2 sec. ECOG); in tutti i casi è stata osservata una correlazione con EBV ed in 21 di loro il livello ematico di LDH era >500 U/L. 4 PTLD diagnosticate prima del 2001 sono state trattate con la riduzione della IS associata a resezione chirurgica, da sola o in combinazione con rituximab in 2 bambini, e chemioterapia nei restanti 2. A partire dal 2001 i pazienti con PTLD aggressive sono stati suddivisi in due gruppi di rischio. Il gruppo ad alto rischio (HR) ha compreso i pazienti (12) con almeno due dei seguenti criteri: a) stadio III o IV; b) istologia monomorfoica; c) *perfor-*

mance status ≥ 2 ; d) LDH ≥ 1000 U/L; nel gruppo a rischio standard (SR) sono stati inclusi gli altri pazienti (6). Il trattamento è stato, quindi, diversificato in base al gruppo di rischio: a) i pazienti SR hanno ricevuto una riduzione dell'IS in combinazione con rituximab, da solo (5) o con resezione chirurgica, in 1 bambino con tumore resecabile; b) i pazienti HR, dopo una completa sospensione della IS, sono stati avviati ad un programma di polichemioterapia a ridotta intensità associata a rituximab.

RISULTATI: 3 dei 4 pazienti la cui PTLD è stata diagnosticata prima del 2001 sono vivi e rispettivamente in prima (1), seconda (1) e terza (1) RC. Un paziente è deceduto per progressione di malattia 19 mesi dopo la diagnosi di PTLD. Nessuno dei 18 pazienti trattati secondo il gruppo di rischio dopo il 2001 è recidivato. In 9 di loro, dopo il completamento del trattamento per la PTLD, si è verificato un rigetto d'organo (fegato 6; cuore 2, intestino 1) trattato con successo dall'intensificazione della IS. 4/18 pazienti sono deceduti, in assenza di malattia, per complicanze correlate al trapianto d'organo. Complessivamente 17/22 bambini sono vivi, liberi da malattia e con una normale funzione d'organo con un *follow up* mediano di 56 mesi (18-172) ed una OS a 1 e 5 anni dalla diagnosi di 95.5% e 75.9%, rispettivamente (Figura 1).

CONCLUSIONI: Nella nostra esperienza la suddivisione delle PTLD aggressive dopo trapianto di organo solido in due gruppi di rischio ha consentito di instaurare un trattamento gruppo-specifico grazie al quale si è potuto ottenere un miglioramento dell'*outcome* a lungo termine. Se per i pazienti a rischio standard la modulazione della IS associata a rituximab ed eventuale resezione chirurgica rappresenta una corretta scelta terapeutica, nei pazienti ad alto rischio, al fine di ottenere remissioni complete a lungo termine, si rende necessario un programma terapeutico combinato di immunoterapia e regimi chemioterapici ad intensità ridotta. Nonostante la completa sospensione della IS, grazie alla quale è stata ridotta la tossicità della chemioterapia, nessun paziente ha sviluppato rigetto d'organo durante il trattamento chemioterapico dimostrando un sufficiente effetto immunosoppressivo dei regimi impiegati. Al termine del programma chemioterapico rimane da stabilire la migliore politica immunosoppressiva al fine di ridurre il rischio di rigetto tardivo.

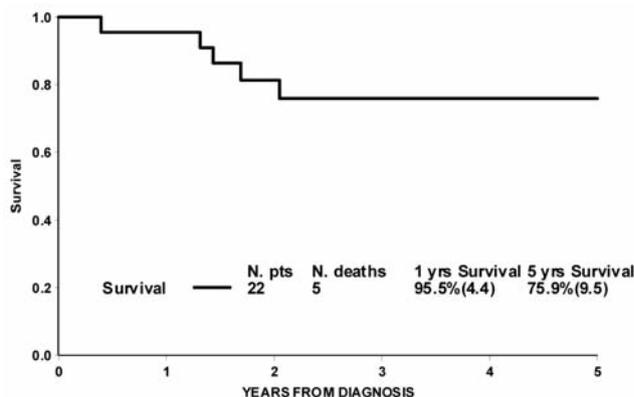


Figura 1. 1 paziente, diagnosticato prima del 2001, è deceduto per progressione di malattia; i rimanenti decessi sono stati dovuti alle seguenti complicanze correlate al trapianto: 1) *primary non function* in secondo trapianto di fegato; 2) rigetto cardiac cronico; 3) aspergilliosi invasive in un contest di infezione cronica da CMV; 4) Polmonite da *Pneumocystis j.*

Bibliografia:

- Green M, Webber S. Posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Pediatr Clin North Am*. 2003;50:1471-1491.
- Evans AW, Porter DL, Stadtmauer EA, Tsai DE. Post-transplant lymphoproliferative disorder: a review. *Bone Marrow Transplant*. 2003;31:145-155.
- Leblond V, Dhedin N, Mamzer Bruneel MF, et al. Identification of prognostic factors in 61 patients with posttransplantation lymphoproliferative disorders. *J Clin Oncol*. 2001;19:772-778.
- Evens AM, David KA, Helenowski I, et al. Multicenter analysis of 80 solid organ transplantation recipients with post-transplantation lymphoproliferative disease: outcomes and prognostic factors in the modern era. *J Clin Oncol*. 2010;28:1038-1046.
- Dotti G, Fiocchi R, Motta T, et al. Epstein-Barr virus-negative lymphoproliferative disorders in long-term survivors after heart, kidney, and liver transplant. *Transplantation*. 2000;69:827-833.

6. Dotti G, Rambaldi A, Fiocchi R, et al. Anti-CD20 antibody (rituximab) administration in patients with late occurring lymphomas after solid organ transplant. *Haematologica*. 2001;86:618-623
7. Giraldi E, Provenzi M, Fiocchi R, et al. Fludarabine, cyclophosphamide, doxorubicin (FCD), and rituximab: a remission induction therapy for aggressive pediatric post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD). *Pediatr Blood Cancer*. 2011; 57:324-328
8. Harris NL, Ferry JA, Swerdlow SH. Posttransplant lymphoproliferative disorders: summary of Society for Hematopathology Workshop. *Semin Diagn Pathol*. 1997;14:8-14.

P052

REGOLAZIONE EPIGENETICA MEDIATA DALLE PROTEINE POLYCOMB SUL LOCUS INK4A-ARF (CDKN2A) NELLA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA A T CELLULE

A. Iannotta, M. Ramaglia, V. D'Angelo, C. Fusco, M. Di Martino, M. Oreste, C. Barone, C. Indolfi, G. Gualdiero, C. Ficociello, I. Martinelli, S. Perrotta, F. Rossi, P. Indolfi, F. Casale

Servizio di Onco-Ematologia, Dipartimento della Donna, del Bambino e della Chirurgia generale e specialistica, Seconda Università degli Studi di Napoli, Napoli, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La metilazione a livello istonico avviene grazie all'istone metiltransferasi (HMT) con il coinvolgimento di un largo numero di complessi regolatori per il rimodellamento della cromatina. Le proteine Polycomb (PcG) sono state trovate in diverse famiglie di complessi multiproteici inclusi i Polycomb repressive complexes PRC1 e PRC2. PRC1 catalizza la monoubiquitinazione della lisina 119 dell'istone H2A grazie all'attività enzimatica di RING1B e Bmi-1. PRC2 è responsabile della metilazione sulla lisina 27 dell'istone H3, che ha un effetto di repressione dell'espressione. Il complesso core di PRC2, conservato dalla Drosophila fino ai mammiferi, è formato da quattro componenti: EZH1/2, SUZ12, EED e RbAp46/48.¹ La funzione più importante nella metilazione della lisina 27 dell'istone H3 viene svolta da EZH2 (Enhancer of Zeste, Drosophila, Homologo 2), una istone lisina metiltransferasi che presenta un dominio SET il quale fornisce il sito attivo per l'attività metiltransferasica. Alle proteine Polycomb (PcG) sono state assegnate una moltitudine di funzioni biologiche che vanno dalla differenziazione fino alle decisioni che riguardano il destino di una cellula staminale. Il locus INK4A/ARF codifica per due regolatori negativi del ciclo cellulare, rispettivamente p16 e p14. EZH2 risulta sovra-espresso in molti tumori ed è stato osservato che la sua presenza a livello del promotore di INK4A può contribuire direttamente al suo silenziamento epigenetico mediante metilazione del DNA.² Bmi-1 induce l'immortalità cellulare regolando negativamente p16/INK4a e la sua iper-espressione è stata osservata in diversi tipi di leucemie. La Leucemia linfoblastica acuta a T cellule (T-ALL) è una neoplasia ematologica caratterizzata dalla frequente delezione del locus INK4A-ARF (CDKN2A). Studi recenti hanno identificato il profilo genetico ed epigenetico di un sottotipo di T-ALL definito "early T-cell precursor" (ETP) che comprende fino al 15% delle T-ALL ed è associata ad un alto rischio di insuccesso terapeutico.³ Scopo del nostro studio è stato quello di analizzare i livelli di espressione delle proteine Polycomb ed il controllo di EZH2 sul regolatore del ciclo cellulare p16 nella linea cellulare Jurkat e in bambini affetti da T-ALL cells.

METODI: Sono stati studiati in linea cellulare Jurkat ed in 20 pazienti con T-ALL (6 ETP e 14 non ETP) trattati presso il Servizio di Oncologia Pediatrica della Seconda Università di Napoli i livelli di espressione di EZH2, SUZ12 e EED analizzati mediante Real Time PCR e l'espressione proteica mediante l'analisi Western Blot utilizzando anticorpi diretti contro EZH2, SUZ12, EED e Bmi-1. L'RNA totale è stato estratto con reagente Triazol e sono stati utilizzati esameri random per la retrotrascrizione. È stata effettuata inoltre l'analisi di Immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) su linea cellulare Jurkat e sui linfoblasti di due pazienti pediatrici utilizzando un anticorpo per EZH2. Come controllo è stato utilizzato midollo osseo normale. Per quanto riguarda lo studio in vitro Jurkat e i blasti leucemici separati da sangue midollare sono stati coltivati in RPMI + siero 10% + PEN-STREP 1%. I test di vitalità e di proliferazione (Conta cellulare, Trypan Blue e test di proliferazione con MTT) sono stati eseguiti ogni 24 ore.

RISULTATI: L'analisi dei livelli di espressione di EZH2 ha evidenziato in Jurkat e in tutti i campioni analizzati livelli di espressione più elevati rispetto al controllo, mentre SUZ12 e EED non presentavano variazione di espressione. In particolare la maggiore espressione genica

è stata osservata in Jurkat, nel 14% delle non EPT T-ALL e nel 50% delle EPT. L'analisi mediante western blot ha evidenziato l'espressione proteica di EZH2 in 16/20 campioni e nella linea cellulare Jurkat. La proteina SUZ12 risultava espressa in 12/20 campioni e negativa nella linea cellulare Jurkat, mentre Bmi-1 in 16/20 campioni e in Jurkat. La proteina EED risultava espressa in tutti i campioni analizzati. L'analisi mediante ChIP non ha evidenziato il controllo di EZH2 sulla regione del promotore di INK4a analizzata.

CONCLUSIONI: I nostri risultati preliminari hanno mostrato che EZH2 non contribuisce al silenziamento epigenetico del locus di INK4a-ARF nei campioni analizzati. L'alterata espressione delle proteine Polycomb suggerisce un ruolo chiave nella patogenesi delle T-ALL, con maggiore evidenza nel sottotipo più indifferenziato delle EPT T-ALL. Pertanto ulteriori studi potrebbero fornire dati aggiuntivi per considerare l'utilizzo dell'inibitore di EZH2 come una possibile terapia epigenetica mirata nelle forme di leucemia a maggior rischio di insuccesso terapeutico.

Bibliografia:

1. Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life Nature. (2011),469: 343-3
2. Bracken A, Kleine-Kohlbrecher D, Dietrich N, et al. The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are dis-associated in senescent cells. *Genes & Development*. (2007), 21: 525-530.
3. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* (2012), 481:157-163.

P053

OUTCOME DELLA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA A CELLULE B IN ETÀ PEDIATRICA TRATTATA CON IL PROTOCOLLO AIEOP LNH-97

M. Pillon,¹ L. Mussolin,¹ E. Carraro,¹ A. Garaventa,² A. Sala,^{3,33} A. Lombardi,⁴ M. Aricò,⁵ M. Pigiione,⁶ E. Giraldi,⁷ S. Buffardi,⁸ M. Zecca,⁹ F. Porta,¹⁰ G.A. Zanazzo,¹¹ M. Cellini,¹² A. Pession,¹³ G. Arcamone,¹⁴ L. Lo Nigro,¹⁵ D. Sperli,¹⁶ F. Casale,¹⁷ F. Gregucci,¹ S. Cesaro,¹⁸ G. Basso,¹ A. Rosolen,¹

¹Clinica di Oncoematologia Pediatrica, Dipartimento della Salute della Donna e del Bambino, AO di Padova, Università degli Studi di Padova, Padova; ²Istituto, Dipartimento di Ematologia e Oncologia Pediatrica, Genova; ³Clinica Pediatrica dell'Università di Milano-Bicocca, AO San Gerardo, Monza (MB); ⁴Oncoematologia Pediatrica, Ospedale Bambino Gesù, Roma; ⁵Dipartimento Al Oncoematologia Pediatrica e Cure Domiciliari, Azienda Ospedaliero-Universitaria Meyer, Firenze; ⁶SC Oncoematologia e Centro Trapianti, Ospedale Infantile Regina Margherita, Torino; ⁷UO Pediatrica, OO. RR. Bergamo, Bergamo; ⁸Dipartimento di Oncologia, AO Santobono-Pausilipon, Napoli; ⁹Oncoematologia Pediatrica, Fondazione IRCCS, Policlinico San Matteo, Pavia; ¹⁰Clinica di Oncoematologia Pediatrica e TMO, Ospedale dei Bambini, Brescia; ¹¹UO Ematooncologia Pediatrica, Ospedale Infantile Burlo Garofalo-Università degli Studi di Trieste, Trieste; ¹²UO di Ematologia, Oncologia e Trapianto, Azienda Policlinico di Modena, Modena; ¹³Oncologia ed ematologia, Policlinico Sant'Orsola Malpighi, Bologna; ¹⁴Dipartimento Biomedicina Età evolutiva, UO Pediatrica I Policlinico, Bari; ¹⁵Dipartimento Scienze Mediche e Pediatriche, Università di Catania, Catania; ¹⁶UO Pediatrica, AO Annunziata, Cosenza; ¹⁷Servizio di Oncologia Pediatrica, Seconda Università degli Studi di Napoli, Napoli; ¹⁸UOC Oncoematologia Pediatrica, Policlinico, Verona, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La leucemia linfoblastica acuta a cellule B (LLA-B), rappresenta il 2-3% delle LLA dell'età pediatrica. I linfoblasti B esprimono i markers delle cellule B-mature e le immunoglobuline di superficie, e sono caratterizzati dalle traslocazioni cromosomiche t(8;14)(q24;q32) o, meno frequentemente, t(8;22)(q24;q11) o t(2;8)(p12;q24). La LLA-B è inoltre caratterizzata da un alto indice proliferativo e da un breve ciclo cellulare. Può presentarsi con masse extramidollari in addome o in sede testa-collo o con interessamento del sistema nervoso centrale (SNC). Da un punto di vista clinico è di fatto indistinguibile dalla forma leucemizzata del linfoma di Burkitt, ed è quindi trattata con lo stesso protocollo basato sull'utilizzo di cicli di polichemioterapia, per una durata totale di circa 3-4 mesi. Obiettivo del nostro studio è stato analizzare le caratteristiche cliniche dei bambini con LLA-B trattati nel protocollo nazionale

AIEOP LNH-97 e valutare l'outcome confrontandolo con il precedente protocollo AIEOP 8805 (entrambi basati sul protocollo BFM).

METODI: Sono stati arruolati nello studio tutti i pazienti con infiltrazione di blasti B maturi $\geq 25\%$ a livello del midollo osseo (BM) trattati nel protocollo AIEOP LNH-97 tra il 1999 e il 2011. La terapia, secondo il gruppo R4 per l'alto rischio, prevedeva una prefase di 5 giorni con l'uso di corticosteroidi e Ciclofosfamide e 6 cicli di chemioterapia ad alta dose-intensità, contenenti Methotrexate (blocchi AA e BB) e Citarabina (blocchi CC) ad alte dosi. In caso di interessamento del SNC, è stata utilizzata terapia intratecale ma non radioterapia craniale.

RISULTATI: In totale, 81 pazienti sono stati arruolati nel protocollo. L'età mediana alla diagnosi era 8 anni (range 1.2-16 anni), con una predominanza del sesso maschile 4.1:1. Secondo la classificazione FAB, 78 erano L3, 2 L2, 1 L1. Il 21% dei pazienti presentavano interessamento del SNC. La prima remissione completa (RC) è stata raggiunta in 77/81 (95%). Diciassette pazienti sono morti (21%): 16 per progressione di malattia (12 dopo ricaduta, 4 senza aver mai raggiunto la RC) e 1 per sepsi. Le ricadute sono avvenute in 16 pazienti dopo un tempo mediano di 3 mesi dalla prima RC. La sopravvivenza globale (OS) e la sopravvivenza libera da eventi (EFS) a 5 anni erano 78% (ES 5%) e 74% (ES 5%), rispettivamente. Abbiamo osservato una tossicità di grado 3-4 prevalentemente di tipo ematologico e gastrointestinale.

CONCLUSIONI: I risultati del protocollo AIEOP LNH-97 hanno mostrato una OS e una EFS comparabile con il precedente protocollo AIEOP 8805 (OS 77% e EFS 75%) e in linea con i concomitanti trials pubblicati in letteratura. L'uso di una terapia aggressiva combinata con una stratificazione dei pazienti basata sui recenti risultati ottenuti in base alla malattia residua minima potrebbe migliorare l'outcome della LLA-B.

P054

LINFOMA DI HODGKIN PEDIATRICO A PREVALENZA LINFOCITARIA. ESPERIENZA PROTOCOLLI AIEOP MH'83-89-96 ED LH-2004

M. Mascarin,¹ C. Elia,¹ P. Bartolini,² M. Bianchi,³ P. Bulian,⁴ S. Buffardi,⁵ M. Caniglia,⁶ R. Caruso,⁷ M. Cellini,⁸ S. Cesaro,⁹ C. Consarino,¹⁰ S. D'Amico,¹¹ R. De Santis,¹² P. Farruggia,¹³ A. Garaventa,¹⁴ P. Indolfi,¹⁵ M.L. Moleti,¹⁶ G. Murgia,¹⁷ M. Nardi,¹⁸ E. Passone,¹⁹ P. Pierani,²⁰ F. Porta,²¹ M. Provenzi,²² R. Rondelli,²³ A. Sala,²⁴ N. Santoro,²⁵ A. Todesco,²⁶ G.A. Zanazzo,²⁷ M. Zecca,²⁸ R. Burnelli²⁹

¹Radioterapia Pediatrica e Area Giovani, IRCCS Centro di Riferimento Oncologico, Aviano; ²Onco-Ematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera Parma, Parma; ³Onco-Ematologia, Ospedale Regina Margherita, Torino; ⁴Onco-Ematologia, IRCCS Centro di Riferimento Oncologico, Aviano; ⁵Onco-Ematologia Pediatrica, AORN, Sanbono-Pausilipon, Napoli; ⁶Onco-Ematologia Pediatrica, Ospedale Santa Maria della Misericordia, Perugia; ⁷Onco-Ematologia, Ospedale Bambin Gesù, Roma; ⁸Onco-Ematologia Pediatrica, II Policlinico di Modena, Modena; ⁹Onco-Ematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata Verona, Verona; ¹⁰Onco-Ematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera Pugliese Ciaccio, Catanzaro; ¹¹Ematologia ed Oncologia, Azienda Ospedaliera Universitaria, Catania; ¹²Ematologia ed Oncologia Pediatrica, IRCCS Ospedale Casa Sollievo della Sofferenza, Foggia; ¹³Onco-Ematologia Pediatrica, Ospedale dei Bambini, "G. Di. Cristina, Palermo; ¹⁴Ematologia ed Oncologia Pediatrica, Istituto G. Gaslini, Genova; ¹⁵Oncologia Pediatrica, Seconda Università degli Studi di Napoli, Napoli; ¹⁶Ematologia, Università, Roma; ¹⁷Oncoematologia Infantile, Ospedale Microcitico, Cagliari; ¹⁸Onco-Ematologia Pediatrica, Ospedale Santa Chiara, Pisa; ¹⁹Oncologia Pediatrica, Policlinico Universitario di Udine, Udine; ²⁰Onco-Ematologia Pediatrica, Ospedale Pediatrico G. Salesi, Ancona; ²¹Onco-Ematologia, Ospedale Civile Brescia, Brescia; ²²Onco-Ematologia, Ospedali Riuniti di Bergamo, Bergamo; ²³Pediatria, Policlinico Sant'Orsola - Malpighi, Bologna; ²⁴Pediatria, Ospedale San Gerardo, Monza; ²⁵Biomedicina della Età Evolutiva, I Policlinico, Bari; ²⁶Pediatria, Università degli Studi di Padova, Padova; ²⁷Onco-Ematologia Pediatrica, IRCCS Burlo Garofolo, Trieste; ²⁸Onco-Ematologia Pediatrica, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia; ²⁹Onco-Ematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara, Ferrara, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il linfoma di Hodgkin a prevalenza linfocitaria (LPHL) è un'entità CD20+ separata dalla forma classica. Presenta malattia in stadio precoce nella maggior parte dei pazienti (pz). Nel complesso ha una buona prognosi, tuttavia,

nonostante il decorso clinico indolente, ha una propensione per lo sviluppo di recidive tardive. L'obiettivo del nostro studio è di registrare la sopravvivenza globale (OS) e la sopravvivenza libera da malattia (EFS) a lungo termine nei pz lungo-sopravvivenuti per LPHL trattati con i protocolli AIEOP-MH'83, MH'89, MH'96, LH'2004 e di determinare se il diverso carico terapeutico abbia inciso sulla EFS dei pz.

METODI: Sono stati raggruppati i dati relativi ai 4 protocolli AIEOP HL, nei quali sono stati arruolati 182 LPHL dal 1983 al 2012 su un totale di 1737 pz con HL. I 182 pz sono così suddivisi per protocollo: MH'83: 32/215 (14,8%), MH'89: 27/259 (10,4%), MH'96: 58/560 (10,3%), LH-2004: 65/703 (9,27%). Due pz di 182 sono stati persi al follow-up (FUP); i pz valutabili per la OS ed EFS, con un FUP mediano di 107 mesi (range: 4-326), sono 180. I protocolli prevedevano una stratificazione dei pz in 3 gruppi di rischio. Nel protocollo MH'83 erano previsti, rispettivamente nel Gruppo 1°, Gruppo 2° e Gruppo 3°, 3ABVD, 3MOPP/ABVD e 5MOPP/ABVD + radioterapia (RT) 25Gy se RC o 40 Gy se RP<75%. Il protocollo MH'89 prevedeva, rispettivamente per gli stessi gruppi, 3ABVD, 3MOPP/ABVD e 2OPPA / 4COPP + RT involved fields (IF) 20Gy se RC o 40Gy se RP<75%. Nel protocollo MH'96 venivano somministrati 3ABVD, 4COPP/ABV e 6COPP/ABV + RT IF 20Gy se RC o 36Gy se RP<75%. Il protocollo LH-2004, invece, prevedeva 3ABVD, 4 COPP/ABV e 6 COPP/ABV + RT IF 14.4Gy se RC (solo Gruppo 2° e 3°) o 25.4Gy se RP<75%. La stessa stratificazione dei pz in 3 gruppi terapeutici, eccetto per i protocolli MH'96 ed LH-2004 dove i pazienti con malattia bulky (M/T ≥ 0.33) all'esordio sono stati inseriti nel Gruppo 3°, ci consente di confrontare i risultati terapeutici. Le analisi globali sono state stratificate per protocollo. La variabile nei diversi protocolli rimane il carico terapeutico. Col susseguirsi dei protocolli sono state apportate delle modifiche nei trattamenti chemioterapici e sono state ridotte le dosi e i volumi di radioterapia.

RISULTATI: I 182 pz sono così distribuiti: 148 maschi, 34 femmine (M/F=4.35); età mediana 11 anni (range 1-17 anni); stadio I: 76 (41.8%), II: 73 (40.1%), III: 28 (15.4%), IV: 5 (2.7%); categoria A: 172, B: 10 (A/B=17.2). La OS globale dei 180 pz valutabili è risultata pari a 100%, 100% e 98.7% rispettivamente a 5, 10 e 20 anni. La EFS globale è pari a 86.5%, 79.8% e 79.8% rispettivamente a 5, 10 e 20 anni (Figura 1). La EFS a 5 e a 10 anni è rispettivamente per MH'83: 88.5% e 87.1%; MH'89: 94.3% e 84.3%; MH'96: 85.1% e 78.4%. La EFS a 5 e 8 anni per LH-2004 rimane stabile all'80.0% e la differenza tra i 4 protocolli non è statisticamente significativa (p value=0.4) (Figura 2). È stato registrato 1 episodio di seconda neoplasia, seguito da decesso in età adulta, in un pz stadio III A, trattato nel protocollo MH'83. L'analisi per stadio ha mostrato 23 recidive/149 pz (15.4%) negli stadi I e II vs 8 recidive/33 pz (24.2%) negli stadi III e IV.

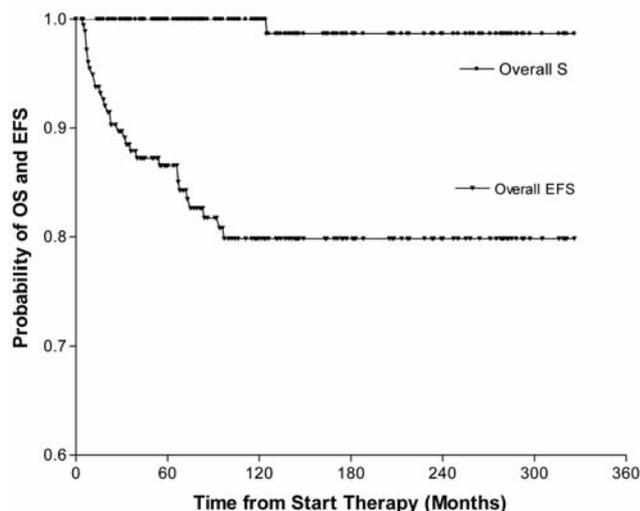


Figura 1. Sopravvivenza globale (OS) e sopravvivenza libera da malattia (EFS).

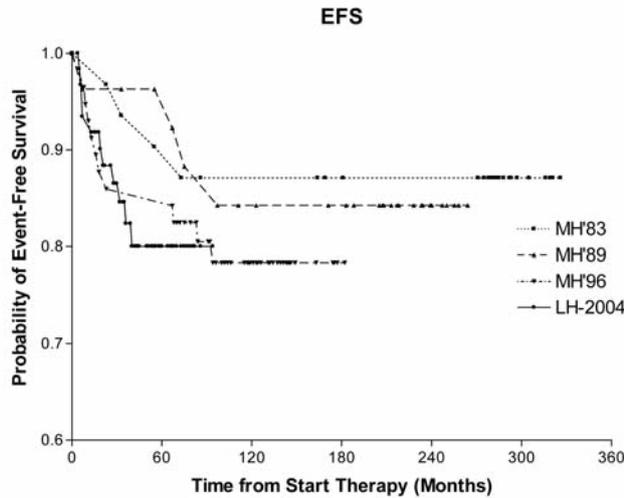


Figura 2. Confronto della sopravvivenza libera da malattia per i diversi protocolli terapeutici: MH'83, MH'89, MH'96, LH-2004.

CONCLUSIONI: La OS del 100% e la EFS dell'80% a 10 anni dalla diagnosi riscontrata per gli studi MH'83, MH'89, MH'96 ed LH-2004, suggeriscono che un approccio terapeutico meno aggressivo può essere perseguibile, in particolare per gli stadi iniziali. Lo studio più recente (LH-2004) necessita, tuttavia, di un periodo d'osservazione più lungo. Sarebbe indispensabile continuare a seguire i pazienti con lungo follow-up, possibilmente definendo dei protocolli di sorveglianza, differenziati in base al trattamento ricevuto, per il monitoraggio della comparsa di seconde neoplasie.

P055

EFFETTI TARDIVI E SEQUELE NEI LUNGOSOPRAVVIVENTI (LS) DA LEUCEMIA LINFOLASTICA ACUTA (LLA) IN ETÀ PEDIATRICA: ESPERIENZA DI UN CENTRO AIEOP

F. Petruzzello,¹ A. Mangione,² A. De Matteo,¹ I. Iuliano,² A.M. Pinto,² G. Sepe,¹ V. Poggi,¹ R. Parasole¹

¹Dipartimento di Oncoematologia Pediatrica, AORN Santobono-Pausilipon, Napoli; ²Servizio di Psico-Oncologia, AORN Santobono-Pausilipon, Napoli, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Con l'introduzione dei nuovi protocollo chemioterapici intensivi ed il miglioramento delle terapie di supporto, la sopravvivenza globale dei bambini affetti da LLA è attualmente dell'80% a 5 anni. L'incremento della sopravvivenza e l'istituzione di ambulatori dedicati al follow-up dei lungo sopravvissuti (LS) hanno consentito l'identificazione di eventi avversi tardivi post-chemio-radioterapia. Il presente studio retrospettivo si propone di valutare, in un singolo centro AIEOP, l'incidenza e la tipologia degli effetti tardivi e/o sequele in una coorte di 301 pazienti con pregressa LLA in età pediatrica.

METODI: Da giugno 1986 a gennaio 2013, 301 pazienti fuori terapia (154 M e 147 F), di età < a 18 anni alla diagnosi di LLA, sono stati seguiti in follow-up (F-U). Il protocollo di sorveglianza utilizzato è schematizzato nella Figura 1 ed è rivolto sia alla precoce identificazione di eventuali recidive della malattia di base che al monitoraggio di eventi avversi tardivi. Il follow-up è stato modificato, caso per caso, nella tempistica dei controlli, alla comparsa di eventi avversi o di patologia d'organo.

RISULTATI: In questa coorte di 301 pazienti, il tempo medio tra stop terapia (ST) ed ultimo F-U è stato 5 anni e 10 mesi (range 1-26 anni). La maggioranza dei nostri LS è attualmente un adolescente o un giovane adulto (35% dei casi tra 15 e 20 anni), il 19,7% ha un'età >21 anni e il restante 45,3% ha meno di 14 anni. Nel corso del F-U sono state identificate 16 recidive tardive (5,3%) e 3 seconde neoplasie (0,99%: 1 paraganglioma mesenterico e 2 LMA in pazienti LS in II RC di LLA). 39 pazienti (12,96%) avevano ricevuto RT craniale durante il trattamento; ad oggi nessuna II neoplasia cerebrale è stata riscontrata. 43 LS (14,3%) hanno presentato almeno una sequela intesa come evento avverso comparso in corso di terapia e persistito dopo lo ST; le più

frequenti sequele sono state le neurologiche (circa 6%), in particolare convulsioni-epilessia (32%), polineuropatia periferica (23%) e disturbi comportamentali e dell'apprendimento (36%), seguite dalle ortopediche (circa 3% sul totale di cui il 67% osteonecrosi). La Figura 2 riassume le principali sequele osservate nei nostri LS. 164 LS pari al 54,5% ha presentato almeno un effetto tardivo e 68 (22,59%) 2 o più eventi. Gli ET sono stati per il 34,5% (N=104) endocrino-metabolici (62% obesità/sovrappeso, 20,3% disfunzioni tiroidee, 3,5% bassa statura, 14,2% altro), 9,3% odontostomatologici e ginecologici, più del 6% neurologici e nefrourologici. La distribuzione degli ET identificati nei LS è schematizzata nella Figura 3.

Tempo (mesi)	1	2	3	4	5	6	8	10	12	15	18	21	24	30	36	48	60	72	84	
Visita ematologica	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★
Emecromo	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★
Funzionalità cardiaca (visita, ECG ed ecocardiogramma)	★								★				★		★	★	★	★	★	★
Funzionalità epatica																				
Eco addome	★					★			★				★		★	★	★	★	★	★
Biomorali	★								★				★		★	★	★	★	★	★
Markers epatici	★					★			★				★		★	★	★	★	★	★
Funzionalità renale	★					★			★				★		★	★	★	★	★	★
Biomorali	★																			
Sistema endocrino	★								★				★		★	★	★	★	★	★
Tiroide (ormoni, autoab ed eco)	★								★				★		★	★	★	★	★	★
Ormoni sessuali	★								★				★		★	★	★	★	★	★
Crescita	★								★				★		★	★	★	★	★	★
Ecografia total body	★								★				★		★	★	★	★	★	★
Età ossea	★								★				★		★	★	★	★	★	★
Ultrasonografia falange									★				★		★	★	★	★	★	★
Sistema nervoso (se + o RT)	★																			
RMN/TAC	★																			
EEG	★																			
Esame neurologico	★												★		★	★	★	★	★	★
Immunologia	★																			
Sottopopolazioni linfocitarie	★																			
Immunoglobuline	★																			
Occhi, orecchie e denti																				
Visita	★												★		★	★	★	★	★	★
Stato malattia																				
Agospiroto midollare	★												★		★	★	★	★	★	★

Figura 1. Monitoraggio pazienti fuori terapia da Leucemia acuta linfoblastica.

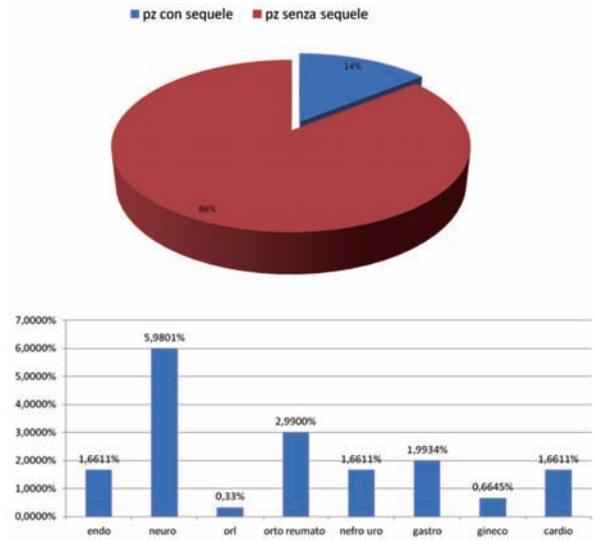


Figura 2. Distribuzione delle sequele nei LS da LLA.

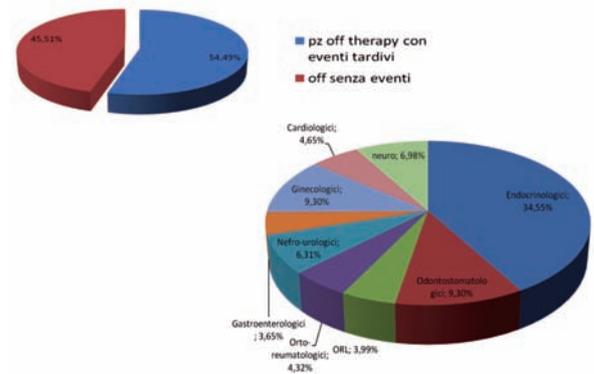


Figura 3. Distribuzione degli ET nei lungosopravvissuti da LLA.

CONCLUSIONI: Nella nostra esperienza l'incidenza di ET nei LS dopo diagnosi di LLA in età pediatrica è risultata del 54,5%, in linea con i dati della letteratura. Gli ET più frequenti sono stati gli endocrino-metabolici ed in particolare sovrappeso/obesità, secondari alle alte dosi di steroidi somministrati e alle scorrette abitudini alimentari, perpetuate anche allo ST. Il 14,3% dei LS ha inoltre presentato almeno una sequele da terapia, in particolare neurologiche e ortopediche. Il ridotto tempo medio di F-U dei LS trattati con la RT cranica non consente una corretta valutazione dell'incidenza di II neoplasia cerebrale nella nostra casistica. In conclusione i LS da LLA in età pediatrica richiedano una lunga e continuativa sorveglianza per riconoscere e trattare prontamente gli ET e le sequele da terapia, oltre a monitorare l'eventuale insorgenza di II neoplasie chemio-radioindotte.

P056

LE DELEZIONI DEL GENE IKAROS HANNO UN IMPATTO PROGNOSTICO LIMITATO NEI PAZIENTI PEDIATRICI CON LEUCEMIA ACUTA LINFOBLASTICA A PRECURSORI B E PHILADELPHIA NEGATIVA

C. Palmi,¹ M.G. Valsecchi,² G. Longinotti,¹ D. Silvestri,² V. Carrino,¹ V. Conter,³ G. Basso,⁴ A. Biondi,³ G. te Kronnie,⁴ G. Cazzaniga¹

¹Centro Ricerca Tettamanti, Clinica Pediatrica; ²Centro di Biostatistica per l'Epidemiologia Clinica, Università di Milano Bicocca, Monza (MB); ³Clinica Pediatrica, Università Milano Bicocca, Ospedale San Gerardo, Monza (MB); ⁴Laboratorio di Oncematologia, Dipartimento di Pediatria, Università di Padova, Padova, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: L'analisi di nuovi marcatori prognostici per la LAL pediatrica a precursori di cellule B è necessaria per migliorare la stratificazione dei pazienti, ad oggi eseguita prevalentemente mediante MRD e per individuare pazienti potenzialmente curabili con terapie specifiche mirate.

METODI: L'analisi di delezione del gene Ikaros è stata eseguita in una coorte omogenea di 410 pazienti pediatrici con leucemia acuta linfoblastica a precursori B, arruolati in Italia nello studio AIEOP-BFM ALL2000, escludendo i casi Philadelphia positivi o con sindrome di Down.

RISULTATI: Le delezioni del gene Ikaros confermano il valore di prognostico negativo già riportato in letteratura; tuttavia la sopravvivenza libera da eventi è risultata relativamente elevata (70.2%). La differenza nell'incidenza cumulativa di recidiva tra i pazienti positivi o non per delezioni di IKZF1 non è risultata significativa (24,2% (5,9) vs 13,1% (1,8) nella coorte complessiva e 23,9% (6,6) vs 16,5% (2,5) nel sottogruppo di pazienti a rischio intermedio). In linea con tale risultato, le delezioni di IKZF1 non sono un fattore prognostico indipendente del rischio di recidiva. Inoltre, la maggior parte dei casi con delezioni di IKZF1 stratificate nel gruppo ad alto rischio ha comunque presentato recidiva di malattia, indicando la necessità di ricorrere a terapie alternative (Figura 1).

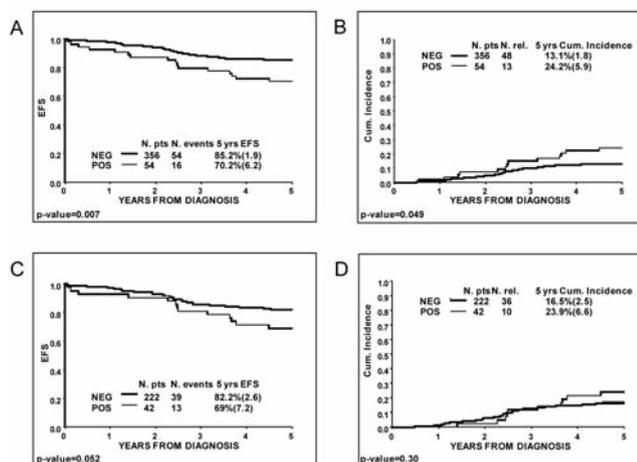


Figura 1. Associazione della delezione di *IKZF1* con la sopravvivenza: (A) EFS e (B) CIR della coorte analizzata; (C) EFS e (D) CIR dei pazienti a rischio Intermedio.

CONCLUSIONI: La necessità e il vantaggio di introdurre le delezioni di IKZF1 come marcatori di stratificazione aggiuntiva per i pazienti LAL-B Ph-negativi rimane discutibile.

P057

VARIAZIONI DEL CICLO CELLULARE TRA DIAGNOSI E RICADUTA IN PAZIENTI CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA DI LINEA B

R. Bortolozzi,¹ G. Viola,¹ S. Disarò,¹ S. Bresolin,¹ M. Paganin,¹ V. Conter,¹ B. Buldini,¹ G. Basso¹

¹Laboratorio di Oncematologia Pediatrica, Dipartimento Salute della Donna e del Bambino, Università di Padova, Padova; ²Emato-oncologia Pediatrica, Ospedale San Gerardo di Monza, Università Milano Bicocca, Monza (MB), Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La leucemia linfoblastica acuta (LAL) è la forma di tumore più frequente dell'età pediatrica e, nonostante i progressi nei protocolli diagnostici e terapeutici, circa il 25% dei pazienti va incontro a ricaduta. Date le basse percentuali di guarigione della recidiva, diventa importante lo studio di ulteriori fattori prognostici e di nuove strategie terapeutiche. Per tutti gli esordi di LAL, viene analizzato il DNA index come uno dei parametri per la stratificazione dei pazienti e la scelta del protocollo terapeutico adeguato. L'analisi, effettuata tramite citometria a flusso, consente di valutare la ploidia e lo stato di proliferazione cellulare (attraverso l'identificazione della percentuale di fase S del ciclo cellulare). Diversi lavori dimostrano il valore prognostico della percentuale di cellule leucemiche in fase S nelle LAL: alla diagnosi, la fase S è stata correlata con prognosi, età, immunofenotipo e genotipo, e livelli di fase S maggiori del 6% sono stati associati a cattiva prognosi. Dall'analisi del DNA index abbiamo osservato che, in un numero considerevole di pazienti, la percentuale di cellule in fase S valutata alla ricaduta è significativamente aumentata rispetto al relativo esordio. Essendo un fenomeno ancora poco studiato, frequente ma non presente in tutti i pazienti, il nostro obiettivo è comprenderne il meccanismo biologico alla base e studiarne eventuali implicazioni a livello terapeutico.

METODI: Lo studio è stato eseguito su una coorte di 180 pazienti con leucemia linfoblastica acuta di linea B arruolati nei protocolli terapeutici AIEOP, nei quali la percentuale di blasti superava il 60% all'esordio e alla ricaduta e di cui fossero disponibili i dati relativi al ciclo cellulare. Sono stati esclusi pazienti con ricaduta extramidollare/isolata.

Per la valutazione della variazione relativa alla frazione di fase S tra esordio e ricaduta, è stato calcolato un ΔS -Phase corrispondente alla differenza tra percentuale di fase S alla ricaduta e percentuale di fase S all'esordio. Il ΔS -Phase è stato correlato a: sesso, tempo intercorso tra la diagnosi e la ricaduta, immunofenotipo, gruppo di rischio ed età alla ricaduta.

RISULTATI: Lo studio dei cicli cellulari di campioni accoppiati esordio-ricaduta ha mostrato che, nel 66% dei pazienti della coorte studiata, la fase S alla ricaduta risulta aumentata rispetto a quanto riscontrato alla diagnosi. Tale aumento di fase S è legato a una riduzione della fase G1 del ciclo cellulare, mentre non sono state osservate variazioni significative nella fase G2/M. Non è stata individuata alcuna correlazione significativa tra il dato di ΔS -Phase e parametri di classificazione quali sesso, immunofenotipo ed età alla ricaduta. Dati significativi sono stati ottenuti invece per quanto riguarda tempo intercorso tra la diagnosi e la ricaduta, ploidia e stratificazione per rischio. In particolare, un aumento di fase S alla ricaduta è stato associato a ricaduta molto precoce, ad assetto diploide e gruppo di rischio S4. Analisi preliminari di espressione genica eseguite su alcuni campioni alla ricaduta mostrano come, nei pazienti con più elevato ΔS -Phase, ci sia un aumento nell'espressione di geni implicati nella regolazione della proliferazione cellulare, del ciclo cellulare e del DNA repair.

CONCLUSIONI: I nostri risultati indicano che un significativo numero di pazienti con ricaduta LAL di linea B (più frequentemente nel gruppo di rischio S4), presenta un aumentato numero di cellule in fase S del ciclo cellulare rispetto al relativo esordio. Questa aumentata capacità proliferativa sembra essere associata ad un'elevata espressione di geni regolatori della proliferazione cellulare e del controllo del danno al DNA. Ulteriori studi a livello genomico e proteomico saranno necessari per approfondire le alterazioni a livello del ciclo cellulare riscontrate nelle recidive, con lo scopo di individuare nuove strategie terapeutiche che possano sfruttare i meccanismi molecolari alla base di questo fenomeno.

EMATOLOGIA

C006

ANALISI DI MUTAZIONE NELL'EMOFILIA A GRAVE E MODERATA E CORRELAZIONE CON I DATI CLINICI E DI LABORATORIO: ESPERIENZA DI UN CENTRO PEDIATRICO

S. Guarisco,¹ F. Barbieri,¹ S. Cavagnini,¹ V. Bennato,¹ E. Soncini,¹ G. Martini,² B. Bonafini,¹ S. Martinazzi,¹ G. Patelli,¹ M. Mortarino,³ L.D. Notarangelo,¹ F. Porta¹

¹Oncoematologia Pediatrica, Presidio Ospedale dei Bambini, Spedali Civili Brescia, Brescia; ²UOL, Azienda Ospedaliera Spedali Civili Brescia, Brescia; ³Centro Emofilia e Trombosi "Angelo Bianchi Bonomi", Fondazione IRCCS CàGrande, Ospedale Maggiore Policlinico Milano, Milano, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: L'Emofilia A (OMIM 306700) è una malattia emorragica ereditaria, X-linked recessiva, caratterizzata da sanguinamenti prolungati e/o emorragie spontanee dovuti alla carenza del Fattore VIII (FVIII) implicato nell'emostasi secondaria. La severità clinica della malattia correla generalmente con i livelli plasmatici di FVIII coagulante (FVIII:C); si distinguono pertanto una forma grave (FVIII:C <1%), una moderata (FVIII:C 1%-5%) e una lieve (FVIII:C 5%-40%). Tale correlazione non è tuttavia assoluta potendo riscontrarsi un fenotipo meno grave anche in pazienti con FVIII:C <1%. La carenza del FVIII è dovuta a mutazioni a carico del gene codificante a cui consegue un'alterata o mancata sintesi della proteina. Il gene per il FVIII si localizza all'estremità telomerica del cromosoma X, in posizione Xq28, comprende 26 esoni, trascritti in un mRNA e tradotti in una proteina matura costituita da 2332 amminoacidi. L'inversione dell'introne 22 è la mutazione più frequente, ma ad oggi sono note più di 2000 mutazioni implicate nel meccanismo patogenetico dell'emofilia A; il sequenziamento genico consente di identificare alterazioni non ancora descritte in letteratura, il cui ruolo patogenetico necessita di correlazione con i dati clinici e di laboratorio. La comparsa di inibitori contro il FVIII esogeno interessa circa il 25% degli affetti e rappresenta attualmente un problema maggiore nel trattamento dell'emofilia. Tale comparsa correla anche se in modo non assoluto con il genotipo, essendo di più frequente riscontro in pazienti con mutazioni null; la propensione allo sviluppo dell'inibitore sembra inoltre essere correlata ad altri marcatori genetici implicati nella risposta immunitaria. Scopo del lavoro è la valutazione del genotipo in una popolazione pediatrica affetta da Emofilia A grave o moderata e correlazione con i dati clinici e di laboratorio. Si vuole inoltre verificare l'importanza dell'analisi di mutazione per una migliore definizione del quadro clinico e della prognosi.

METODI: Sono stati inclusi nello studio tutti i pazienti seguiti per Emofilia A grave o moderata e ne è stata valutata la percentuale di fattore VIII:C con metodo coagulometrico funzionale ad 1 step (mediana dei valori riscontrati per ciascun paziente). La classificazione clinica in emofilia grave o moderata è stata effettuata in base alla propensione verso le emorragie spontanee e la comparsa di ematriti. L'analisi genetica è stata eseguita presso il laboratorio del Centro Emofilia e Trombosi "Angelo Bianchi Bonomi" di Milano mediante Long PCR/PCR e sequenziamento diretto del gene, previa acquisizione del consenso all'indagine.

RISULTATI: 16 pazienti sono stati classificati come clinicamente gravi e 15 come clinicamente moderati. Tutti i pazienti con Emofilia A clinicamente grave presentavano una percentuale di fattore VIII:C <1%. Nell'ambito del gruppo di pazienti con emofilia clinicamente moderata, 7 pazienti presentavano una percentuale di Fattore VIII:C superiore all'1% (mediana 1,8%, range 1,2-4%) mentre 8 pazienti avevano una percentuale di fattore VIII:C inferiore o uguale all'1%. Per i pazienti affetti da emofilia A grave le mutazioni riscontrate sono state: inversione dell'introne 22 (3 casi, 2 italiani e 1 di etnia araba), una mutazione nonsense (p.Arg2307Stop) (1 caso di etnia araba), l'inserzione di una Citosina al nucleotide 1360 nell'esone 8 (p.H378fsX3), non riportata in letteratura. Il paziente con la mutazione p.Arg2307Stop ha presentato una transitoria comparsa di inibitore in corso di profilassi, con clearance spontanea e successiva negativizzazione; 1 paziente con inversione dell'introne 22 ha sviluppato l'inibitore ed è stato sottoposto a immunotolleranza con fattore ricombinante, con persistenza dell'inibitore. Nei pazienti affetti da emofilia A clinicamente moderata sono state evidenziate due mutazioni missen-

so: p.Arg1997Trp in 6 pz e p.Arg1689Cys in 1 paziente. In 5 dei 6 pz con la mutazione p.Arg1997Trp (in due differenti famiglie e tutti provenienti dalla stessa regione geografica) la percentuale di fattore VIII:C era pari o inferiore all'1%. Nessun paziente con la forma clinicamente moderata, indipendentemente dalla percentuale di fattore VIII:C, ha finora sviluppato inibitori.

CONCLUSIONI: La mutazione più frequente nelle forme gravi è risultata l'inversione dell'introne 22 mentre le forme moderate sono tutte riconducibili a mutazioni missenso, in linea con quanto riportato in letteratura. Nelle forme clinicamente gravi è stata riscontrata una correlazione tra il tipo di mutazione e la percentuale di FVIII:C. Nell'ambito del gruppo di pazienti con forma clinicamente moderata con mutazione p.Arg1997Trp non si è invece evidenziata tale correlazione in quanto 5 su 6 pazienti finora sottoposti a indagine presentavano una percentuale di fattore VIII:C < all'1%. Tale mutazione è riportata nel database HAMSTeRS con fenotipo variabile (2). L'analisi molecolare in questi pazienti ci ha permesso di giungere ad una definizione prognostica più precisa rispetto alla sola determinazione della percentuale di fattore VIII:C. È inoltre possibile che gli altri 2 pz affetti da forma clinicamente moderata e con fattore VIII <1%, il cui genotipo non è noto, presentino analoghe mutazioni provenienti dalla medesima regione geografica. Per quanto riguarda la mutazione p.H378fsX3 riscontrata in un paziente con emofilia grave, non ancora riportata, può essere considerata causale di malattia in quanto porta alla formazione di un codone prematuro di stop. Sebbene il numero limitato di pazienti non ci permetta di correlare l'insorgenza di inibitori con il genotipo, nella nostra coorte tale evento è stato riscontrato in pazienti con mutazioni null in accordo con i dati riportati in letteratura. Nella nostra casistica, in un sottogruppo di pazienti affetti da forma clinicamente moderata ma con fattore VIII:C < all'1%, l'analisi di mutazione ci ha permesso di giungere ad una definizione diagnostica e prognostica più corretta. Il dato anamnestico della provenienza geografica potrebbe inoltre contribuire in alcuni casi ad una più rapida definizione del genotipo.

C007

INCIDENZA E FATTORI DI RISCHIO DEGLI EVENTI TROMBOEMBOLICI IN ETÀ NEONATALE E PEDIATRICA: STUDIO PROSPETTICO DI SINGOLO CENTRO

A. Viano,¹ M. Agostini,¹ R. Bagna,² F. Magnetti,² G. Agnoletti,¹ E. Barisone,¹ M.T. Cascarano,¹ B. Bassi,¹ M. Casabianca,¹ D. Farinasso,² G. Migliore,¹ D. Farina,² E. Girardo,¹ R. Bonaudo,¹ P. Simioni,³ P. Saracco¹

¹Dipartimento di Scienze Pediatriche, Presidio OIRM - S. Anna, Città della Salute e della Scienza, Torino; ²Dipartimento di Ostetricia-Ginecologia-Neonatalogia, Presidio OIRM - S. Anna, Città della Salute e della Scienza, Torino; ³Dipartimento Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari, Università di Padova, Padova, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La malattia tromboembolica in pediatria, per quanto molto più rara che nell'adulto, è un problema emergente ed è diagnosticata con sempre maggior frequenza soprattutto nel contesto degli ospedali pediatrici di III° livello. L'istituzione di Registri nazionali ed internazionali ha aiutato a definire meglio l'epidemiologia di questa patologia in termini d'incidenza e di fattori di rischio sia in età neonatale (N) che pediatrica (P). I dati di incidenza del primo registro, pubblicati nel 1994, riportavano un'incidenza di 0.07 eventi tromboembolici venosi (ETV) ogni 10000 bambini (1 mese-18 anni)¹. Successivamente il registro Olandese riportava un'incidenza maggiore (0.14/10000)². Più recentemente negli USA l'incidenza di ET nel bambino, negli anni 1979-2001, è stata riferita pari a 4.9/100000³. Uno studio recente, condotto analizzando i dati provenienti da tutti gli ospedali pediatrici di III° livello degli USA (2001-2007), ha dimostrato un drammatico incremento (in tutte le fasce di età), del tasso d'incidenza di ETV pari circa al 70% (da 34 a 58 casi/10000 ricoveri ospedalieri)⁴. Non esistono studi di incidenza in Italia. Il presente lavoro rappresenta il primo studio prospettico sull'incidenza degli eventi ET infantili in un ospedale pediatrico di III° livello in Italia. L'obiettivo principale è l'analisi epidemiologica dell'incidenza e dei fattori di rischio degli ET neonatali e pediatrici (esclusi gli stroke ischemici arteriosi - AIS) consecutivamente diagnosticati presso il Presidio Ospedale Infantile Regina Margherita - S. ANNA di Torino, tra il 1° Gennaio 2007 ed il 31 Dicembre 2011.

METODI: Tutti gli ET consecutivi (esclusi AIS), con diagnosi clinica e radiologica, sono stati raccolti prospetticamente e di questi sono

stati analizzati: sesso, etnia, età (distinguendo gli ET neonatali, 0-28 giorni, da quelli pediatrici, suddividendo anche nelle seguenti classi di età: 0-28 giorni, 29 giorni -1 anno, 2-5 anni, 6-10 anni, 11-15 anni, >15 anni), tipo e sede di trombosi, fattori di rischio (trombofilia, interventi chirurgici, traumi, tumori, malattie cardiache o renali, condizioni patologiche materne o legate al periodo pre-perinatale, infezioni, catetere), trattamento (tipo, durata ed eventuali complicanze), durata del ricovero ed eventuale ricovero in terapia intensiva, outcomes (mortalità e morbilità). Tali dati sono stati anche inseriti nel Registro Italiano Trombosi Infantili (RITI). Attraverso il data-warehouse Reportmed (Oslo s.r.l.) sono stati ottenuti il numero di ricoveri ospedalieri ordinari (complessivi e di alcuni reparti ad alto rischio) del Centro per ciascuno dei 5 anni di studio.

Tabella 1.

	ET Neonatali (n=17)	ET Pediatrici (n=43)
Malattie cardiache	53%	16.3%
Infezioni	41%	32.5%
Interventi chirurgici	12%	27.9%
Catetere vascolare	76%	46.5%

RISULTATI: Sono stati registrati 60 ET consecutivi, di questi 17 insorti in epoca neonatale (28%) e 43 in bambini più grandi (72%). Il 62% degli ET in soggetti di sesso maschile (76.4% dei neonatali e 58.1% dei pediatrici). Dei 60 ET, oggetto di studio, 17 sono trombosi dei seni venosi cerebrali (SVT), 34 sistemiche (di cui 5 arteriosi e 29 venosi) e, dei restanti, 7 sono trombosi intracardiache e 2 embolie polmonari. In epoca neonatale il tasso d'incidenza globale/10000 nati vivi è risultato di 4.09 (1.2 SVT e 2.89 sistemiche). L'incidenza calcolata nel nido fisiologico è di 1.93/10000 nati vivi, mentre quella dei reparti di Terapia Intensiva Neonatale (TIN) è di 25.25/10000 ricoveri. In età pediatrica il tasso d'incidenza complessivo di ET/10000 ricoveri ordinari è pari a 12 (3.36 SVT e 8.64 sistemiche). Analizzando l'andamento degli ET per fasce di età nei cinque anni in studio si è notato un significativo incremento del numero in tutte le fasce considerate, anche se non sempre con andamento lineare. L'incidenza/ogni 10000 ricoveri risulta diversa a seconda dei reparti considerati; il tasso più elevato si riscontra nelle rianimazioni/terapie intensive (19.69), seguito da oncematologia (16.38), cardiologia/cardiocirurgia (13.87) e pediatria d'urgenza (12.87). Uno o più fattori di rischio sono presenti nell'88.3% degli ET, mentre solo una minoranza dei casi risulta idiopatica (N=3, P=4). La distribuzione dei fattori di rischio nelle 2 popolazioni N e P è riportata in Tabella 1. Differenze specifiche tra le due epoche sono: la patologia materna, caratteristica degli ET N (infezioni: 29%, disturbi della gravidanza: 47%, disordini placentari: 17%, condizioni legate al periodo pre-perinatale: 47%) e la malattia neoplastica presente soltanto in quelli P (23.2%). Considerando le sole trombosi sistemiche il catetere è il principale fattore di rischio in entrambe le popolazioni. La trombofilia ereditaria, studiata in 12/17 N e in 31/43 P, è stata riscontrata nel 16.6% dei casi (mutazione MTHFR in omozigosi e del Fattore II G20210A). In 5/13 ET P riscontro di valori elevati di Lipoproteina (a). Il deficit ereditario di proteina C, S e ATIII non è stato confermato, in una rivalutazione a distanza durante il follow-up, in nessun caso. Anticorpi anti-fosfolipidi risultano presenti in 1/9 dei neonati (Ab-anti-cardiolipina in IgG e in IgM) e in 3/13 dei bambini (Ab anti β -glicoproteina, IgG e IgM anticardiolipina) studiati. Terapia anticoagulante: l'86.7% ha ricevuto un trattamento antitrombotico, soprattutto eparina a basso peso molecolare, e i pazienti P sono stati trattati con maggior frequenza rispetto ai neonati (93% vs 70.5%); nessuna complicanza maggiore osservata. Il 16.2% dei pazienti P con ET, è stato ricoverato in terapia intensiva come conseguenza dell'evento. Il tasso di mortalità è risultato pari al 5% in epoca N, nessun exitus risulta direttamente correlato all'evento ma legato alle precarie condizioni cliniche sottostanti; nessun decesso in età P. Esiti (quali epilessia, neuro-deficit, sindrome post-trombotica, ipofunzione organo) in 25% N e 35.5% P. Un secondo evento precoce entro un mese dal primo, è stato riscontrato in 1 N (5%) e in 3 P (6.9%); ET ricorrenti, in un follow-up fino a 36 mesi sono stati registrati in 2 casi P (4.6%) di cui 1 ETV sistemica a distanza di 1 anno (3.4%) e una SVT (5.8%) a distanza di 2 anni.

CONCLUSIONI: Lo studio, confermando i dati di Raffini in USA⁴, evidenzia un significativo incremento, anche se non sempre lineare, del numero di ET neonatali e pediatrici, per ricoveri ordinari, in un singolo Centro in Italia, nel periodo 2007-2011. Riguardo i neonati, il tasso d'incidenza globale per 10000 nati vivi, osservato è pari a 4.09; non esi-

stano altri studi pubblicati di singolo centro sull'incidenza di ET per numero di nati vivi. Uno studio ha stimato un tasso d'incidenza di ET, inclusi gli eventi cerebrali, nell'intera popolazione neonatale tedesca di 0.51/10000 nati vivi (76% ETV)⁵; tale incidenza inferiore deriva dal fatto che quello tedesco è uno studio di popolazione, mentre la presente casistica è riferita ai dati di un Centro Ostetrico di III° livello, di riferimento regionale a cui afferiscono tutte le gravidanze patologiche del territorio (30% dei nati vivi per anno). L'incidenza dei soli eventi diagnosticati nel nido fisiologico, che meglio rispecchia la popolazione neonatale generale, risulta invece di 1.93/10000 nati vivi. Inoltre si conferma la incidenza elevata nelle TIN: 25.25/10000 ricoveri, come riportato dal Registro Canadese (24/10000 ricoveri; 66% ETV)⁶. In età pediatrica, il tasso d'incidenza complessivo di ET per 10000 ricoveri ordinari osservato nel Centro è di 16.18 casi, sovrapponibile al recente dato riportato presso un singolo ospedale pediatrico in Australia (ET arteriosi 8.5/10000 ricoveri⁷, ET venose 8/10000⁸). L'incremento degli ET P (da 3.7 a 22.24/10000 ricoveri), può essere in parte dovuto alla riduzione (pari al 37.6%) dei ricoveri ospedalieri ordinari, passati da una media di 8200 nei primi due anni a circa 5115 nell'ultimo biennio oggetto di studio. Ciò nonostante, analizzando il numero assoluto di eventi, si può confermare un aumento dell'incidenza della malattia, seppur con un andamento non lineare. Si conferma la prevalenza del sesso maschile in entrambe le popolazioni e la multifattorialità dei fattori di rischio; inoltre, pur con basso indice di mortalità, la patologia tromboembolica si presenta associata ad elevata morbilità ed importanti e spesso invalidanti esiti. Si auspica, per il futuro, di riuscire a migliorare le strategie di prevenzione in modo da ridurre i fattori di rischio predisponenti (gestione accorta del catetere vascolare, studio della trombofilia ereditaria e acquisita, profilassi anticoagulante primaria in casi selezionati). Studi multicentrici collaborativi sono auspicabili al fine di indagare meglio tutte le problematiche della patologia, incluse le complicanze a lungo termine e la farmacocinetica dei vecchi e nuovi anti-coagulanti.

Bibliografia:

- Andrew M, David M, Adams M, et al. Venous thromboembolic complications (VTE) in children: first analyses of the Canadian Registry of VTE. *Blood*. 1994;83:1251-1257.
- van Ommen CH, Heijboer H, Büller HR, et al. Venous thromboembolism in childhood: a prospective two-year registry in The Netherlands. *J. Pediatr*. 2001;139:676-681.
- Stein PD, Kayali F, Olson RE. Incidence of venous thromboembolism in infants and children: data from the National Hospital Discharge Survey. *J. Pediatr*. 2004;145:563-565.
- Raffini L, Huang Y-S, Witmer C, Feudtner C. Dramatic increase in venous thromboembolism in children's hospitals in the United States from 2001 to 2007. *Pediatrics*. 2009;124:1001-1008.
- Nowak-Göttl U, von Kries R, Göbel U. Neonatal symptomatic thromboembolism in Germany: two year survey. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed*. 1997;76:F163-167.
- Schmidt B, Andrew M. Neonatal thrombosis: report of a prospective Canadian and international registry. *Pediatrics*. 1995;96:939-943.
- Monagle P, Newall F, Barnes C, et al. Arterial thromboembolic disease: a single-centre case series study. *J Paediatr Child Health*. 2008;44:28-32.
- Newall F, Wallace T, Crock C, et al. Venous thromboembolic disease: A single-centre case series study. *Journal of Paediatrics and Child Health*. 2006;42:803-807.

C008

CORRELAZIONE TRA VASCULOPATIA CEREBRALE E CARDIO-POLMONARE IN BAMBINI CON DREPANOCITOSI

V. Munaretto,¹ R. Manara,² G. Meneghetti,² P. Rampazzo,² M. Ermani,² N. Maschietto,³ O. Milanese,³ G. Basso,¹ L. Sainati,¹ R. Colombatti¹

¹Azienda Ospedaliera, Università degli Studi di Padova, Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino, Clinica Onco-Ematologica Pediatrica, Padova; ²Azienda Ospedaliera, Università degli Studi di Padova, Dipartimento di Neuroscienze, Clinica Neurologica, Padova; ³Azienda Ospedaliera, Università degli Studi di Padova, Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino, Clinica Pediatrica, Padova, Italy

RAZIONALE ED OBIETTIVI DELLO STUDIO: La Drepanocitosi

o Sickle Cell Disease (SCD) è una malattia complessa caratterizzata da un danno progressivo multiorgano. Tale danno può comparire già in età pediatrica con importanti conseguenze sia sulla morbilità che sulla mortalità associate alla malattia. Studi consistenti^{1,2} dimostrano lo sviluppo precoce di complicanze a livello cerebrovascolare, mentre esistono solo studi preliminari che valutano il danno d'organo cardio-polmonare in età pediatrica.³ Il meccanismo eziopatogenetico ritenuto maggiormente coinvolto nello sviluppo sia delle complicanze neurologiche che di quelle cardio-polmonari è la vasculopatia, ma gli studi che esplorano la relazione tra il danno d'organo nei due distretti sono pochi e associati a risultati contrastanti.^{4,5} Gli obiettivi del nostro studio sono stati: (1) valutare, in maniera sistematica, la presenza di vasculopatia cerebrale e cardio-polmonare mediante esami strumentali in bambini con SCD seguiti presso il nostro Centro, (2) suggerire il contributo di ciascun esame strumentale nel monitoraggio del danno d'organo dei bambini con SCD; (3) verificare se esiste una correlazione tra il danno d'organo cerebrale e cardio-polmonare in età pediatrica.

METODI: Lo studio, retrospettivo, ha incluso i bambini con diagnosi di SCD che avevano eseguito gli esami neurosonologici, di neuroimaging e l'ecocardiogramma, entro 6 mesi l'uno dall'altro. Per il rischio di sviluppare stroke, i pazienti sono stati stratificati nelle categorie definite dai criteri dello Stroke Prevention Trial (STOP), sulla base delle velocità del flusso cerebrale al Transcranial Doppler (TCD) e al Transcranial Doppler imaging (TCDi).⁶ La RMN cerebrale è stata considerata alterata se era presente almeno una lesione ischemica di 3mm.² Per la valutazione dell'angio-RMN, è stato utilizzato uno score basato sulla scala di Houkin modificata; se lo score risultava superiore a 1, l'esame è stato considerato alterato.⁷ Per lo studio della funzionalità cardiaca sono stati considerati parametri cardiaci ottenuti dallo studio ecocardiografico standard e dal Tissue Doppler Imaging (TDI). Per lo screening ecocardiografico di sospetta ipertensione polmonare è stato considerato un valore soglia di velocità di rigurgito transtricuspidalico (TRV) $\geq 2,5$ m/sec.³ Per l'analisi statistica sono stati utilizzati il t di Student per le variabili a distribuzione normale, il Mann Whitney U test per le variabili ordinali e il Chi quadrato di Pearson, il Fisher exact test o il test di Mc Nemar quando opportuno per le variabili qualitative sconnesse. Per testare le correlazioni tra la avsculopatia dei diversi distretti è stato utilizzato l'r di Pearson o il rho di Spearman. Il livello di significatività prefissato è stato $p < 0,05$.

RISULTATI: Sono stati inclusi 38 bambini (F=18, M=20), età media $8,67 \pm 3,8$ anni (range: 3-18). 32 erano HbSS, 5 HbSC e 1 HbS β thal. La quasi totalità dei pazienti erano immigrati di origine africana (prevalentemente da Nigeria e Ghana). 8 erano in terapia cronica: 4 con idrossiurea (HU) e 4 in regime trasfusione cronico con eritrocitaferesi (EEX). In un solo bambino si era verificato uno stroke, due anni prima. Nessun bambino aveva presentato TIA e l'esame obiettivo neurologico era normale in tutti. All'esame obiettivo cardiologico, in 6 pazienti è stato riscontrato un soffio 1-2/6 al BSSA.

Vasculopatia Cerebrale: Il TCD e il TCDi erano alterati rispettivamente nel 16% e 21% dei casi. Alla RMN, il 42% dei bambini presentava lesioni ischemiche, nella maggior parte dei casi bilaterali (95%). L'angio-RMN risultava alterata nel 68% dei casi, con stenosi bilaterali in più dei 2/3 dei bambini.

Vasculopatia cardio-polmonare: All'ecocardio, i diametri telediastolico e telesistolico del ventricolo sinistro erano aumentati rispetto ai valori di riferimento nella popolazione sana di pari età. Erano presenti inoltre segni di precoce disfunzione diastolica del ventricolo sinistro al TDI: la velocità di picco proto diastolica (onda è) all'anulus mitralico alla parete laterale del ventricolo sinistro, parametro che si riduce in presenza di disfunzione diastolica, confrontata con i valori di riferimento nei soggetti sani di pari età, era ridotta in 8 bambini e il rapporto Em/è, parametro che cresce all'aumentare della pressione telediastolica nel ventricolo sinistro, era aumentato in 14 bambini. La prevalenza di TRV $\geq 2,5$ m/sec era del 24%, dato in linea con la letteratura, ma nella nostra popolazione si evidenzia un aumento del TRV già a partire dai 3 anni di età.⁸

Si è evidenziata:

- 1) assenza di correlazione tra l'aumento di velocità riscontrato al TCD/TCDi e la presenza di lesioni silenti. Lo stesso risultato è stato ottenuto da Wang et al.⁹ su 78 bambini ma di età media maggiore; studi di singoli centri hanno riportato risultati contraddittori. L'ipotesi fisiopatologica suggerisce una diversa patogenesi alla base degli eventi cerebrovascolari acuti. Mentre lo stroke sembra la manifestazione clinica di un'ostruzione delle arterie cerebrali di grosso calibro, in particolare dell'ACM e della DICA, valutabile al TCD, gli infarti cerebrali silenti sembrano associati alla compromissione del microcircolo con danno vascolare a carico delle arterie

cerebrali di piccolo e/o medio calibro, non direttamente visualizzabili mediante esami di neurosonologia.

- 2) assenza di correlazione tra la velocità al TCD ed il grado di stenosi rivelato all'angioRMN (dato in linea con la letteratura)¹⁰, ma presenza di correlazione tra la velocità al TCDi e le stenosi all'angioRMN. Tali risultati possono essere spiegati con il fatto che l'angio-RMN rileva dati morfologici, mentre il doppler evidenzia alterazioni dell'emodinamica cerebrale: la correlazione del TCDi (e non del TCD) con l'angio-RMN potrebbe essere legata, quindi, al vantaggio del TCDi rispetto al TCD nella visualizzazione diretta dei vasi intracranici.
- 3) nessuna correlazione tra la presenza di infarti silenti e stenosi nei distretti vascolari corrispondenti, dal confronto tra RMN cerebrale e angio-RMN. L'angio-RMN può, infatti, rilevare tortuosità o stenosi in presenza di RMN cerebrale normale e viceversa la RMN cerebrale può essere alterata in assenza di stenosi rilevabili all'angio-RMN. Tale dato supporta l'ipotesi che l'angio-RMN così come il TCD sia in grado di valutare la macro-vasculopatia cerebrale associata all'aumentato rischio di stroke piuttosto che il coinvolgimento dei vasi di piccolo calibro.
- 4) correlazione tra alcuni parametri ecocardiografici e le velocità del flusso cerebrale nelle arterie cerebrali medie e nei tratti distali delle carotidi interne, rilevate sia al TCD che al TCDi. Le correlazioni più significative si ottengono per l'onda Em, e l'onda Am al Doppler transmitralico e il rapporto Em/E e potrebbero essere dovute allo stato di anemia cronica di questi bambini. Nessun parametro rilevato al TDI correla con le velocità al TCD/TCDi in questo studio.

Non è stata riscontrata alcuna correlazione tra gli stessi indici cardiaci e gli esami di neuroimaging (RMN e AngioRMN).

Non è stata riscontrata differenza nella media dei valori di TRV nel gruppo di pazienti con TCD/TCDi patologico rispetto a quelli con TCD/TCDi normale, né in quelli con RMN/angio-RMN alterata rispetto a quelli con RMN/angio-RMN normale. La mancata associazione tra i dati ottenuti dalla valutazione strumentale del danno d'organo cerebrale e cardio-polmonare potrebbe essere spiegata dalla diversa età di insorgenza della vasculopatia e del conseguente danno d'organo nei due distretti corporei. Sono necessari studi di follow-up più lunghi per valutare se le complicanze cerebrali e cardiopolmonari insorgano in momenti successivi durante l'infanzia nei pazienti con SCD pur presentando gli stessi meccanismi fisiopatologici e bambini con maggior predisposizione al danno cerebrale in età infantile, possano avere maggior rischio di sviluppare vasculopatia polmonare in età adolescenziale.

Conclusioni:

La valutazione sistematica della vasculopatia cerebrale e cardio-polmonare nei bambini con SCD è fattibile e mostra un'alta prevalenza di anomalie del circolo cerebrale e, in misura minore, una compromissione cardio-polmonare a partire da un'età precoce. Il TCD, unica metodica finora raccomandata dalle linee guida internazionali, consente di evidenziare solo il rischio di vasculopatia dei grossi vasi (stroke), ma non definisce in dettaglio il rischio di vasculopatia dei piccoli vasi. Per quest'ultima, e quindi per una migliore e complessiva definizione della vasculopatia cerebrale sono necessarie anche altre indagini. Una precoce identificazione del danno d'organo cerebrale e cardio-polmonare con gli esami strumentali considerati, in aggiunta alla clinica e agli esami emato-chimici, potrebbe condurre ad interventi terapeutici per controllare la malattia di base che potrebbero modificarne l'evoluzione.

Bibliografia:

1. Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moehr JW, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood* 1998; 91(1): 288-94.
2. DeBaun MR, Armstrong FD, McKinstry RC, Ware RE, Vichinsky E, Kirkham FJ. Silent cerebral infarcts: a review on a prevalent and progressive cause of neurologic injury in sickle cell anemia. *Blood* 2012; 119(20): 4587-96.
3. Kato GJ, Onyekwere OC, Gladwin MT. Pulmonary hypertension in sickle cell disease: relevance to children. *Pediatr Hematol Oncol* 2007; 24(3): 159-70.

- Kato GJ, Hsieh M, Machado R, Taylor J6, Little J, Butman JA, et al. Cerebrovascular disease associated with sickle cell pulmonary hypertension. *Am J Hematol* 2006; 81(7): 503-10.
- Pashankar FD, Carbonella J, Bazyzy-Asaad A, Friedman A. Prevalence and risk factors of elevated pulmonary artery pressures in children with sickle cell disease. *Pediatrics* 2008; 121(4): 777-82.
- Adams R, McKie V, Nichols F, Carl E, Zhang DL, McKie K, et al. The use of transcranial ultrasonography to predict stroke in sickle cell disease. *N Engl J Med* 1992; 326(9): 605-10.
- Houkin K, Nakayama N, Kuroda S, Nonaka T, Shonai T, Yoshimoto T. Novel magnetic resonance angiography stage grading for moyamoya disease. *Cerebrovasc Dis* 2005; 20(5): 347-54.
- Colombatti R, Maschietto N, Varotto E, Grison A, Grazzina N, Meneghello L, et al. Pulmonary hypertension in sickle cell disease children under 10 years of age. *Br J Haematol* 2010; 150(5): 601-9.
- Wang WC, Gallagher DM, Pegelow CH, Wright EC, Vichinsky EP, Abboud MR, et al. Multicenter comparison of magnetic resonance imaging and transcranial Doppler ultrasonography in the evaluation of the central nervous system in children with sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol* 2000; 22(4): 335-9.
- Steen RG, Emudianughe T, Hankins GM, Wynn LW, Wang WC, Xiong X, et al. Brain imaging findings in pediatric patients with sickle cell disease. *Radiology* 2003; 228(1): 216-25.

P058

INCIDENZA DI MIELODISPLASIA, LEUCEMIA E MORTE PER SEPSI IN PAZIENTI AFFETTI DA NEUTROPENIA CONGENITA GRAVE: DATI DAL REGISTRO ITALIANO NEUTROPENIE (RIN)

F. Fioredda,¹ M.G. Cefalo,¹ M. Calvillo,¹ F. Tucci,² P. Farruggia,³ M. Lanciotti,¹ G. Casazza,⁴ S. Bonanomi,⁵ L.D. Notarangelo,⁶ A. Barone,⁷ G. Palazzi,⁸ M. Davitto,⁹ S. Barella,¹⁰ F. Cardinale,¹¹ E. Mastrodicasa,¹² C. Dufour¹

¹Unità di Ematologia, Istituto Giannina Gaslini, Genova; ²Unità di Oncologia ed Ematologia, Ospedale Meyer, Firenze; ³Dipartimento di Oncologia Pediatrica, Ospedale Pediatrico Di Cristina Palermo; ⁴Unità di Oncologia ed Ematologia Pediatrica, Ospedale S. Chiara, Pisa; ⁵Clinica Pediatrica, Università di Milano Bicocca, Milano; ⁶Clinica Pediatrica, Università di Brescia, Brescia; ⁷Unità di Onco-Ematologia Pediatrica, Ospedale Universitario di Parma, Parma; ⁸Dipartimento di Pediatria, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena; ⁹Unità di Ematologia, Ospedale Regina Margherita, Torino; ¹⁰Dipartimento di Pediatria, Università di Cagliari, Ospedale Regionale Microcitemie, Cagliari; ¹¹Dipartimento di Allergologia e Pneumologia Pediatrica, Ospedale Pediatrico Giovanni XXIII, Università di Bari, Bari; ¹²Unità di Ematologia ed Oncologia Pediatrica, Ospedale Santa Maria della Misericordia, Perugia, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La neutropenia congenita grave (NCG) è una malattia caratterizzata da un numero assoluto di neutrofili persistentemente <500/mmc, precoce comparsa di infezioni batteriche gravi e blocco maturativo midollare allo stadio di promielocita/mielocita. È noto che pazienti affetti da NCG, nel corso della loro malattia, possono sviluppare mielodisplasia e/o leucemia acuta. A partire dagli anni 90, l'introduzione in terapia del fattore di crescita dei neutrofili (G-CSF) ha radicalmente modificato la prognosi di questi pazienti, conferendo loro migliori difese contro gli eventi infettivi. Tale terapia somministrata cronicamente e ad alti dosaggi incrementa il rischio di trasformazione in mielodisplasia e/o leucemia acuta (MDS/LA). Il rischio cumulativo di sviluppare MDS/LA o di morire per sepsi è differente a seconda delle coorti studiate (Coorte del Registro Internazionale Neutropenie-SCNIR, Registro Francese e coorte svedese). Obiettivo dello studio è stabilire l'incidenza cumulativa di MDS/LA e sepsi letali nella coorte di pazienti affetti da SCN arruolati nel Registro Italiano Neutropenie.

METODI: Il Registro Italiano Neutropenie (RIN) raccoglie dati relativi ai pazienti affetti da neutropenia cronica in Italia. Il data-base è stato approvato dal comitato etico di ciascuno dei centri partecipanti. Per ciascun paziente vengono riportati i seguenti parametri: data di nascita, sesso, epoca di comparsa della neutropenia, data di diagnosi, data dell'ultimo follow-up. Inoltre, ogni anno sono richiesti i seguenti dati: morfologia del midollo, tipo di mutazione molecolare, presenza di mutazione del GCSF, dose e frequenza di somministrazione del G-CSF, numero e tipo di infezioni, eventuale causa di morte.

RISULTATI: Nel periodo da Giugno 2003 a Dicembre 2012, tra i 306 pazienti registrati nell'RIN, 22 pazienti sono stati considerati eleggibili per lo studio. Nove dei 22 (41%) erano di sesso femminile e 13/22 (59%) erano di sesso maschile; l'età media, all'ultimo follow-up, era di 6,3 anni (range 0,5-40,2). La diagnosi di NCG è stata posta ad un'età media di 9 mesi (range 0-418). In tutti i casi era presente il peculiare arresto maturativo midollare allo stadio di promielocita o mielocita. In questa coorte, 16/22 (73%) presentavano la mutazione ELANE, 2/22 (9%) la mutazione HAX1, mentre i restanti 4/22 (18%) non presentavano mutazioni note. Tutti i soggetti hanno ricevuto terapia con G-CSF, intrapresa ad un'età media di 9 mesi (range 0,5-418). La dose media di G-CSF era ≤ 5 mcg/kg/die in 10/21(48%), 6-10 mcg/kg/die in 5/21 (24%), 11-19 mcg/kg/die in 3/21 (14%) e ≥20 mcg/kg/die nei restanti 3/21 (14%). In un paziente la dose media di G-CSF non è stata riportata. In questa coorte di pazienti soltanto 1/22 (4%) ha sviluppato MDS dopo 4 anni di terapia con G-CSF alla dose di 5 mcg/kg/die. Nessuno è evoluto in leucemia acuta. Quattro dei 22 pazienti (18%) sono deceduti di cui 2 pazienti per sepsi e 2 pazienti per cause correlate al trapianto (evento infettivo e GvHD acuta). I due eventi di morte per sepsi erano riferibili a scarsa compliance alla terapia con G-CSF. L'incidenza cumulativa di trasformazione a MDS è stata del 6% a 4 anni dall'inizio della terapia con G-CSF e la probabilità di sviluppare MDS è stata pari a 8% a 8 anni di vita. Il rischio cumulativo di sepsi mortale è stato stimato essere pari al 10% dopo 3 anni dall'inizio della terapia con G-CSF; il rischio di morte per sepsi è stato pari al 10% a 3,5 anni di vita.

CONCLUSIONI: L'incidenza cumulativa di MDS nella nostra coorte di pazienti è inferiore a quella calcolata nelle coorti svedese, francese e nello SCNIR, in particolare dopo 10-15 anni di follow-up. Il fenomeno potrebbe essere spiegato considerando che il gruppo italiano è meno numeroso e costituito da pazienti di età mediamente inferiore rispetto alle coorti del Registro Francese e dello SCNIR. In virtù della più giovane età media, la nostra coorte presenta inoltre un follow-up di durata minore, ma allo stesso tempo va sottolineato che in questi pazienti si ricorre più precocemente a trapianto di midollo, anticipando potenzialmente l'evento di trasformazione a MDS/LA. L'incidenza di sepsi letale è pressoché sovrapponibile a quella delle coorti del Registro Francese e dello SCNIR. Questo dato potrebbe essere motivato da una ridotta/assente compliance alla terapia con G-CSF. Una diagnosi precoce, una maggiore compliance al trattamento (i.e. formulazione di G-CSF a lunga emivita) ed uno stretto monitoraggio della morfologia midollare potrebbero essere utili nel ridurre le sepsi e il rischio di trasformazione a MDS nei pazienti con NCG.

P059

MALATTIA NEURODEGENERATIVA NELLA ISTIOCITOSI A CELLULE DI LANGERHANS: RICERCA DI MARCATORI PRECOCI PER UNA PROSPETTIVA DI TERAPIA PRESINTOMATICA

E. Sieni,¹ C. Barba,² M. Mortilla,³ S. Savelli,³ C. Fonda,³ R. Guerrini,² M. Aricò¹

¹Oncoematologia Pediatrica; ²Neurologia Pediatrica; ³Radiologia Pediatrica, AOU A. Meyer, Firenze, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La istiocitosi a cellule di Langerhans (ICL) è una rara malattia del sistema delle cellule dendritiche a patogenesi sconosciuta che può colpire soggetti di ogni età. Si può presentare con quadri clinici variabili tra lesioni cutanee o ossee unifocali autolimitanti e malattia disseminata ad organi vitali potenzialmente letale. Fino al 25% dei bambini affetti presenta coinvolgimento del sistema nervoso centrale. La forma neurodegenerativa (ND-ICL) è caratterizzata dalla presenza in RM di alterazioni bilaterali e simmetriche della sola sostanza grigia cerebellare che possono estendersi alla sostanza bianca circostante, ai gangli basali e agli emisferi cerebrali. Pazienti con lesioni ossee cranio-facciali e/o diabete insipido (DI) sono considerati a maggior rischio di sviluppare questa complicanza. Secondo le limitate conoscenze ad oggi disponibili il quadro radiologico è lentamente progressivo, non esiste una chiara correlazione con le manifestazioni cliniche, modalità e tempistiche di trattamento non sono codificate. Scopo del presente studio è quello di proporre un protocollo diagnostico multidisciplinare per individuare precocemente e seguire in *follow-up* pazienti potenzialmente a rischio di sviluppare ND-ICL e possibilmente determinare il momento appropriato per iniziare la terapia.

METODI: Sono stati considerati eleggibili pazienti con diagnosi istologica di ICL, divisi in due gruppi: gruppo 1, con evidenza di ND-

ICL in RM; gruppo 2, con fattori di rischio per ND-ICL. Secondo la letteratura, si considera come fattore di rischio la presenza di lesioni ossee cranio-facciali e/o di diabete insipido (DI). Tutti i pazienti sono stati sottoposti presso il nostro Centro a valutazione clinica neurologica, neurofisiologica, neuropsicologica ed a RM con spettroscopia secondo protocollo specifico. Sono stati esclusi i pazienti che non hanno effettuato RM o potenziali evocati. Dati demografici, clinici, funzionali e radiologici sono stati raccolti in uno specifico database (Access, Microsoft) e analizzati. La differenza tra le varianze delle età all'esordio di ICL in ogni gruppo è stata calcolata con il test Anova. La differenza tra le proporzioni di positività dei potenziali evocati somatosensoriali (PESS) è stata calcolata con il test di Fisher.

RISULTATI: Dei 27 pazienti arruolati, 23 (12M, 11F; età mediana, 9 anni) sono risultati eleggibili per lo studio, così suddivisi: gruppo 1, 13 pazienti (6M, 7F, età mediana: 7 anni); gruppo 2, 10 pazienti (6M, 4F; età mediana 13 anni). All'arruolamento, il 70% dei pazienti in entrambi i gruppi presentava malattia multi-sistemica; l'84% di essi era stato trattato con chemioterapia. Tutti i pazienti del gruppo 1 avevano DI (n=9) e/o lesioni ossee cranio facciali (n=9). L'età mediana alla diagnosi di ICL è risultata significativamente inferiore nel gruppo 1 vs 2: 24 vs 72 mesi (p=0.0448). Cinque dei 13 pazienti (38%) con quadro radiologico di ND-ICL presentavano alterazioni all'esame obiettivo neurologico ma solo uno di essi (pt 7) aveva manifestazioni

cliniche conclamate. Le alterazioni dei PESS erano significativamente più frequenti nel gruppo 1 (8/13 pazienti) che nel gruppo 2 (1/10 pazienti) (p=0.02597). Potenziali evocati visivi (PEV) e elettroencefalogramma (EEG) erano normali in tutti i pazienti eccetto uno. La valutazione neuropsicologica non differiva nei due gruppi. Nella nostra serie si conferma che le alterazioni RM compaiono nel cervelletto come sede più frequentemente e precocemente interessata. L'analisi spettroscopica ha mostrato una riduzione del rapporto NAA/Cr nel cervelletto di 9/13 pazienti del gruppo 1 (69%), nessuno del gruppo 2. Dati clinici, neurofisiologici, neuropsicologici e RM dettagliati sono riportati in Tabella 1.

CONCLUSIONI: questo è il primo studio prospettico monocentrico di pazienti con ICL volto ad identificare gli strumenti clinici, funzionali e radiologici capaci di individuare le fasi più precoci della ND-ICL. L'utilizzo dei potenziali evocati (PESS) sembra promettente nell'identificare disfunzioni neurologiche iniziali. Tuttavia il rilevamento, in 4 pazienti, di lievi alterazioni radiologiche in assenza di alterazioni neurofisiologiche impone anche l'utilizzo della RM nel monitoraggio dei pazienti a rischio. La spettroscopia appare un utile complemento alla RM. La disponibilità di nuovi approcci terapeutici efficaci per la ND-ICL potrebbe giustificare l'utilizzo di un ampio *screening* per questa severa complicanza la cui reale frequenza, secondo i nostri dati, sembra essere finora sottostimata.

Tabella 1. Caratteristiche neurologiche, neurofisiologiche, neuropsicologiche e RM dei 23 pazienti nei 2 gruppi.

#	Esame neurologico	PEA	PESS	PEV	EEG	NPS	Topografia RM	Spettroscopia RM
Gruppo 1								
1	N	Intervallo I-V aumentato	Aumentata latenza N20 bilaterale (>dx)	N	N	N	Cervelletto	Neg
2	Sordità dx, clono sn, atassia lieve	N	Aumentata latenza N20 dx, assente N20 a sn	N	N	FSIQ: N; IQ < PIQ; iperattività	Cervelletto, sWMM	Neg
3	Atassia lieve	Intervallo I-V aumentato	N	N	N	N	Cervelletto, TE	Pos
4	Clono e riflessi tendinei aumentati agli arti inferiori	N	Aumentata latenza P14 dx, ridotta ampiezza N20 sn	N	N	N	Cervelletto, sWMM	Neg
5	Debolezza braccio sn, dismetria sn, nistagmo	N	Aumentata latenza N20 bilaterale	N	Punte FC dx	N	Cervelletto, sWMM, TE	Pos
6	N	N	N	N	N	N	Cervelletto	Neg
7	Tetraparesi, disfonia, disartria	N	P14 e N20 assenti bilaterale	N	N	N	Cervelletto, sWMM, GB, TE	Pos
8	N	N	Ridotta ampiezza N20 bilaterale	N	N	N	Cervelletto	Pos
9	N	N	Aumentata latenza N20 bilaterale	NE	N	N	Cervelletto, sWMM, TE	Pos
10	N	N	N	N	N	FSIQ: N; Disordini linguaggio	Cervelletto, sWMM	Pos
11	N	N	Latenza N20 ai limiti superiori	N	NE	NE	Cervelletto	Pos
12	N	N	N	N	NE	NE	Cervelletto, sWMM	Pos
13	N	N	N	N	N	N	Cervelletto, sWMM	Pos
Gruppo 2								
14	N	N	N	N	NE	NE	N	Neg
15	N	N	N	N	N	FSIQ: N; DLE	N	Neg
16	N	N	N	N	NE	NE	N	Neg
17	N	N	N	N	N	FSIQ: N; VIQ > PIQ	N	Neg
18	N	N	N	N	N	N	N	Neg
19	Tremori posturali lievi	Alterata morfologia onda V	N	N	N	N	N	Neg
20	N	N	Aumentata latenza bilaterale N20	N	N	N	N	Neg
21	N	N	N	N	N	N	N	Neg
22	N	N	N	N	N	N	N	Neg
23	N	N	N	N	N	N	N	Neg

PEA: potenziali evocati acustici; PESS: potenziali evocati somatosensoriali; PEV: potenziali evocati visivi; EEG: elettroencefalogramma; NPS: valutazione neuropsicologica; N: normale; NE: non effettuato; FSIQ: scala completa quoziente intelligenza; VIQ: quoziente di intelligenza verbale; PIQ: quoziente di intelligenza di performance; DLE: disturbo del linguaggio espressivo; Bilat: bilaterale; sWMM: sostanza bianca sopratentoriale; GB: gangli della base; TE: troncocefalico.

P060

LA PERCENTUALE DI ESPRESSIONE DI PERFORINA IN CITOFLUORIMETRIA È PREDITTIVA DELLO STATO MUTAZIONALE. DATI PRELIMINARI DEL REGISTRO LINFOISTIOCITOSI

E. Sieni,¹ M.L. Coniglio,¹ M. Da Ros,¹ B. Ciambotti,¹ A. Bertaina,² M.C. Putti,³ C. Micalizzi,⁴ C. Rizzari,⁵ C. De Fusco,⁶ F. Fagioli,⁷ V. Cetica,¹ M. Aricò¹

¹Oncoematologia Pediatrica, AOU A. Meyer, Firenze;

²Oncoematologia Pediatrica, IRCCS, Ospedale Bambino Gesù, Roma;

³Oncoematologia Pediatrica, Università di Padova, Padova;

⁴Oncoematologia Pediatrica, IRCCS, Istituto G. Gaslini, Genova;

⁵Oncoematologia Pediatrica, Ospedale San Gerardo, Monza (MB);

⁶Oncoematologia Pediatrica, Ospedale Pausillipon, Napoli;

⁷Oncoematologia Pediatrica, Ospedale Regina Margherita, Torino, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Mutazioni bialleliche del gene *PRF1* inducono una parziale o completa riduzione della sintesi della perforina, proteina effettrice del *pathway* citotossico, e sono associate a Linfoistiocitosi emofagocitica familiare di tipo 2 (LEF2). Il test citofluorimetrico che misura la espressione intracitoplasmatica di perforina è utilizzato come *screening* per dirigere la analisi di mutazioni, in quanto la sua mancata espressione nelle cellule NK o nei linfociti Citotossici (CTL) si associa a mutazioni del gene *PRF1*. Ci proponiamo di descrivere quantitativamente le alterazioni dell'espressione di perforina in una serie di pazienti con sospetta LEF e correlarle con le alterazioni genetiche allo scopo di individuare valori predittivi dello stato mutazionale.

METODI: Campioni di sangue di pazienti con sospetta LEF vengono centralizzati presso il nostro laboratorio nell'ambito del Registro Italiano. L'analisi citofluorimetrica dell'espressione di perforina prevede per ogni campione analizzato un controllo sano. Per ogni campione vengono allestite due provette contenenti ciascuno 100 ul di sangue intero. Dopo 2 lavaggi con Lysing Solution 1x e PBS rispettivamente, le cellule vengono permeabilizzate con Cytofix/Cytoperm, contenente formaldeide, per 30 min a 4° C e successivamente lavate con PBS/BSA (0.05%) per neutralizzare la formaldeide, e marcate con CD3/CD56/ISOTIPO (controllo sano) e CD3/CD56/PERFORINA (campione in esame) per 15 min a T amb. Dopo opportuni lavaggi le cellule vengono risospese in PBS/BSA (0.05%) e acquisite al citofluorimetro. L'analisi genetica è stata effettuata su DNA mediante sequenziamento diretto. Per la valutazione comparativa tra l'espressione della proteina e l'analisi genetica i pazienti sono stati suddivisi in 3 gruppi in base allo stato mutazionale.

RISULTATI: Nei 60 pazienti studiati da Aprile 2012 ad oggi l'espressione di perforina varia da 0,1% a 93%, con una suddivisione in quartili di: 22;53;75;93%. Il grafico mostra la distribuzione globale e quella dei 3 sottogruppi caratterizzati geneticamente come normali (WT), eterozigoti (mutazione monoallelica) e affetti (mutazioni bialleliche). I pazienti affetti da LEF2 (con mutazioni bialleliche) hanno valori di espressione compresi tra 0% e 30%; i soggetti eterozigoti hanno valori compresi tra 2% e 55% ed i soggetti senza mutazioni di *PRF1* hanno valori compresi tra 4% e 93%. Un valore superiore al 30% di espressione di perforina allo *screening* citofluorimetrico non è mai stato osservato in soggetti affetti. In soggetti normali alla analisi di mutazioni, il 25% mostra valori inferiori al valore mediano della popolazione totale studiata (53%). È interessante osservare che alcuni di questi pazienti alla ripetizione del test mostrano un recupero della espressione. Infine, tutti i pazienti eterozigoti per mutazioni di *PRF1* hanno valori compresi tra 12% e 55%, con due sole eccezioni.

CONCLUSIONI: Lo studio citofluorimetrico della espressione di perforina intracitoplasmatica è uno strumento riproducibile, rapido ed a costo limitato che permette di orientare, già nelle prime 24 ore, lo studio genico dei pazienti con sospetta LEF2, che rappresenta da sola il 40% dei casi di LEF nella nostra popolazione. Il test ci permette di identificare prontamente soggetti con carenza assoluta di espressione di perforina che poi si rivelano portatori di mutazioni bialleliche e quindi geneticamente affetti da LEF2. I nostri dati propongono per la prima volta in letteratura dei *cut-off* per la previsione dello stato mutazionale dei soggetti studiati. Sono in corso degli studi mirati a definire le caratteristiche genetiche e funzionali di alcuni soggetti che mostrano un difetto transitorio di espressione in fase acuta di malattia, poi reversibile nel *follow-up*.

P061

MUTAZIONI MONOALLELICHE DEI GENI LEF-CORRELATI PREDISPONGONO ALLA SINDROME DA ATTIVAZIONE MACROFAGICA

E. Sieni,¹ M. Da Ros,¹ C. Bracaglia,² V. Cetica,¹ M.L. Coniglio,¹ B. Ciambotti,¹ C. De Fusco,³ C. Micalizzi,⁴ F. De Benedetti,² M. Aricò¹

¹Oncoematologia Pediatrica, AOU A. Meyer, Firenze; ²Reumatologia Pediatrica, IRCCS, Ospedale Bambino Gesù, Roma; ³Oncoematologia Pediatrica, Ospedale Pausillipon, Napoli; ⁴Oncoematologia Pediatrica, IRCCS, Istituto G. Gaslini, Genova, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La sindrome da attivazione macrofagica (MAS) è una complicanza grave delle malattie reumatologiche, frequentemente associata all'artrite idiopatica giovanile sistemica (AIGs) ma descritta anche in combinazione con altre malattie infiammatorie, tra cui il lupus eritematoso sistemico (LES) e la malattia di Kawasaki. Per la stretta somiglianza con un gruppo di disordini istiocitari noti collettivamente come linfoistiocitosi emofagocitica familiare (LEF), la MAS è attualmente classificata tra le forme secondarie o acquisite di linfoistiocitosi e recentemente identificata con il termine di *rheumatoid HLH*. Studi recenti suggeriscono la correlazione tra difetti del *pathway* citotossico, come quelli causati da mutazioni dei geni correlati alla LEF, e lo sviluppo della MAS. Scopo dello studio è quello di descrivere le caratteristiche cliniche, funzionali e genetiche della MAS e contribuire a definire il ruolo delle mutazioni monoalleliche in questa condizione.

METODI: La revisione e l'aggiornamento dei dati del Registro Nazionale Italiano della LEF ha permesso di selezionare pazienti affetti da MAS, definita come HLH in accordo con i criteri diagnostici stabiliti dalla *Histiocyte Society*, in associazione a malattie reumatologiche. La diagnosi di malattia reumatologica è stata definita all'esordio della MAS o durante il *follow-up*. Dati demografici, clinici, funzionali e genetici dei pazienti sono stati raccolti in un unico database (Access, Microsoft) e analizzati. Lo *screening* funzionale dell'espressione di perforina e della degranolazione (misurata in termini di espressione di CD107a) è stato effettuato tramite metodica citofluorimetrica. Lo studio genetico è stato eseguito presso il nostro laboratorio mediante sequenziamento diretto dei geni LEF-correlati attualmente noti.

RISULTATI: Tra gli 813 pazienti riferiti al Registro, 38 (5%) sono stati diagnosticati come MAS. Maschi: n=13, femmine: n=25. Caucasi: n=30, Indiani: n=8. L'età mediana era di 94 (quartili: 37; 94; 136; 708) mesi. La diagnosi reumatologica: AIGs (n=28), LES (n=4); malattia di Kawasaki (n=1), dermatomiosite (n=1), malattia reumatologica (n=3) o autoimmune (n=1) non definita. Il quadro clinico mostrava: febbre (n=28/28; 100%), splenomegalia (n=17/28, 61%), manifestazioni neurologiche (n=7/28, 25%), anemia (n=15/25, 60%), piastrinopenia (n=14/25, 56%), neutropenia (n=3/25, 12%), ipertrigliceridemia (n=14/25, 56%), ipofibrinogenemia (n=7/25, 28%), iperferritinemia (n=22/23, 96%); quartili: 2.430, 10.264, 15.953, 96.000 ng/ml, emofagocitosi (n=9/25, 36%). Quattro pazienti (10.5%) sono deceduti per progressione di malattia. Lo *screening* funzionale è stato effettuato in 22 casi: l'espressione di perforina è risultata normale in 14 e ridotta in 8 (36%); la degranolazione difettiva in 3/18 (17%). Almeno uno dei due test è risultato difettivo in 10/23 (43%) casi. L'analisi di mutazione ha incluso: *PRF1* (n=36), *UNC13d* (n=22), *STX11* (n=33) e *STXBP2* (n=19) ed ha permesso di identificare la presenza di 12 varianti monoalleliche in 11 dei 38 pazienti (29%), come segue: *PRF1* (n=8/36, 22%), *STX11* (1/33, 3%), *STXBP2* (3/19, 16%). Un paziente aveva mutazioni in due geni (*PRF1* e *STXBP2*). La correlazione tra difetto funzionale e evidenza di mutazione è mostrata in Tabella 1.

CONCLUSIONI: La MAS è una complicanza potenzialmente fatale delle malattie reumatologiche. Rispetto ai criteri diagnostici per HLH, la neutropenia è rara e la ipofibrinogenemia raggiunge il *cut-off* solo nel 28% dei casi, mentre la elevazione della ferritina è solitamente presente ed a livelli elevati. Mutazioni eterozigoti in uno dei geni LEF-correlati sono osservate nel 29% dei pazienti studiati. *PRF1* è il gene più frequentemente coinvolto e p.A91V la mutazione singola più frequente. Degli 8 pazienti con ridotta espressione di perforina in citofluorimetria, 4 erano eterozigoti per mutazioni di *PRF1*, mentre 4 erano *wild-type*. Dei 3 pazienti con difetto di degranolazione, 1 presentava una mutazione di *STXBP2* e 2 erano apparentemente *wild-type*; entrambi avevano una moderata riduzione della attività NK. In conclusione, un difetto parziale del *pathway* citotossico sembra essere un fattore predisponente in pazienti che sviluppano una MAS come complicanza di una malattia reumatologica in età pediatrica. Ulteriori studi dovranno chiarire la eventuale presenza di meccanismi patogenetici che coinvolgono geni con effetto regolatore o geni diversi da quelli noti.

Tabella 1. Dati funzionali e genetici degli 11 pazienti con MAS portatori di mutazioni monoalleliche dei geni LEF-correlati.

UPN	Età (mesi)	PRF espressione	GRA	Varianti	Analisi <i>in silico</i>	Database HGMD	Gene
238	6	ND	NORM	c.272C>T, p.A91V	Probabilmente dannosa	SI	<i>PRF1</i>
431	53	ND	ND	c.272C>T, p.A91V	Probabilmente dannosa	SI	<i>PRF1</i>
527	120	NORM	NORM	c.799G>A, p.V267M	Probabilmente dannosa	NO	<i>STX11</i>
579	95	RID	RID	c.1034C>T, p.T345M	Probabilmente dannosa	NO	<i>STXBP2</i>
660	ND	NORM	RID	c.272C>T, p.A91V	Probabilmente dannosa	SI	<i>PRF1</i>
661	6	RID	NORM	c.272C>T, p.A91V	Probabilmente dannosa	SI	<i>PRF1</i>
717	106	RID	ND	c.1357G>A, p.V453M	Probabilmente dannosa	NO	<i>PRF1</i>
738	40	ND	ND	c.1681C>T, p.W561R	Probabilmente dannosa	NO	<i>STXBP2</i>
746	1	NORM	NORM	c.272C>T, p.A91V c.610G>A, p.A204K	Probabilmente dannosa Probabilmente dannosa	SI NO	<i>PRF1</i> <i>STXBP2</i>
787	115	RID	NORM	c.755A>G, p.N252S	Benigna	SI	<i>PRF1</i>
799	0	RID	NORM	c.272C>T, p.A91V	Probabilmente dannosa	SI	<i>PRF1</i>

PRF: perforina, GRA: de granulazione, NORM: normale, RID: ridotto, ND: non disponibile.

P062

L'APPROCCIO PSICOSOCIALE CON BAMBINI AFFETTI DA DREPANOCITOSI E LE LORO FAMIGLIE

M. Montanaro, S. Manoli, R. Colombatti, C. Marin, S. Zaccaria, M. Pierobon, G. Basso, L. Sainati

Gruppo Drepanocitosi, Clinica di Oncoematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova, Padova, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La Malattia Drepanocitica (SCD) sta diventando un problema di salute emergente, per le implicazioni fisiche, sociali e psicologiche nei bambini affetti e nelle loro famiglie.¹ L'esperienza della migrazione, fatto sociale totale, investe le famiglie migranti coinvolgendole in un processo di riposizionamento identitario, che le rende più vulnerabili dal punto di vista sociale di fronte alle molteplici sfide che l'integrazione nella società ricevente pone loro.² Il percorso migratorio, infatti, determina spesso una maggiore vulnerabilità sociale della persona migrante, che la rende più fragile di fronte alle variabili maggiormente influenzanti le sue condizioni di vita: occupazione, alloggio, alimentazione, supporto psico-affettivo, accessibilità dei servizi socio-sanitari. Quella dell'immigrazione è una delle realtà in cui il "sociale" ed il "sanitario" si intrecciano indissolubilmente, a volte fino a confondersi, come accade nella drepanocitosi, comportando spesso un aggravamento dello stato di vulnerabilità sociale indotto dalla migrazione, dal momento che spesso la salute è il primo, e in certi casi l'unico, capitale che la persona migrante può investire, per sostenere il suo progetto migratorio e quello della sua famiglia. La malattia può essere vista dunque come un evento esterno e ostativo: ammetterla con sé stessi e con gli altri, siano questi i membri del gruppo familiare rimasti in patria o gli operatori sanitari che potrebbero curarlo, potrebbe significare un fallimento o un "tradimento".³ Questo si verifica soprattutto quando la famiglia deve confrontarsi con l'esperienza della malattia di un figlio, che rappresenta spesso un crollo, non soltanto fisico ma totale, che va ad innestarsi sulla situazione di fragilità identitaria, connaturata al processo dell'immigrazione.⁴ I pazienti pediatrici affetti da drepanocitosi sperimentano non solo crisi dolorose, ma anche diverse limitazioni collegate alla malattia: distress emotivi quali ansia, depressione, rabbia, paura della morte; conseguenze sociali quali lo stigma, l'isolamento relazionale o un maggior numero di assenze scolastiche; difficoltà/deficit intellettivi o cognitivi, con conseguenze bassa autostima e ridotte prestazioni a scuola o sul lavoro, che compromettono notevolmente la loro Qualità di Vita (QdV).⁵ I fattori psicologici (stili di coping e supporto sociale) e sociodemografici (etnia, sesso, età, scolarità e livello socioeconomico) contribuiscono a spiegare le differenze individuali nel fronteggiare la malattia.⁶ Il peso della malattia può essere mitigato, sia riducendo la frequenza e la durata delle crisi dolorose, spesso imprevedibili, che fornendo adeguate informazioni e supporti psicosociali alle famiglie.^{7,8} Dal 2009 presso la Clinica di Oncoematologia Pediatrica di Padova, si è costituito un gruppo multidisciplinare (SCD Group), dedicato alla "comprehensive care" dei pazienti con drepanocitosi e delle loro famiglie, attraverso rapporti di collaborazione con altri centri veneti, italiani e stranieri, per la creazione di un modello di rete nel trattamento di questi pazienti. All'interno di questo gruppo si è creata un'équipe psico-sociale (medico, psicologa, segretaria,

assistente sociale, esperta in diritto internazionale stranieri), che si occupa degli aspetti sociali e della consulenza/sostegno psicologico e scolastico dei pazienti afferenti al Centro. Garantire la presa in carico globale ("comprehensive care") dei pazienti con drepanocitosi e delle loro famiglie, con particolare attenzione ai loro bisogni sociali e psicologici; creare una rete di riferimenti sul territorio veneto, operanti in sinergia tra loro per migliorare l'assistenza, l'integrazione e la formazione ad essi rivolte.

METODI: Il presente lavoro si basa sul modello dell'intervento di rete o networking sociale,⁹ una nuova strategia o modo di pensare il lavoro sociale, finalizzato a costruire delle pratiche integrate e una continuità di dialogo tra i vari servizi e la comunità. Viene solitamente descritto come *approccio integrato o complesso o sistemico* di lavoro sociale. L'incontro di rete ha lo scopo di organizzare un piano d'azione di rete per l'utente, riunendo le figure più significative (assistenti sociali appartenenti a diversi enti, psicologi, assistenti domiciliari, educatori, insegnanti, sacerdoti, medico, professionisti della psichiatria per gli adulti e infantile), che si occupano di lui. Alcuni interventi dell'approccio psicosociale sono stati monitorati attraverso strumenti costruiti ad hoc per insegnanti e genitori coinvolti, mentre per i bambini partecipanti al progetto "Compitinsieme ... in ospedale!" è stato utilizzato il questionario AMOS 8-15 anni¹⁰ per la valutazione della motivazione e delle abilità di studio prima e dopo l'iniziativa.

RISULTATI: Sulla base dei risultati ottenuti dalla ricerca sulla valutazione cognitiva e l'influenza del linguaggio e dei fattori socio-demografici nei bambini con SCD afferenti ai Centri di Padova e Modena,¹¹ abbiamo strutturato il seguente intervento psicosociale:

1. Stesura di una relazione clinica della valutazione intellettuale eseguita, da condividere con i genitori dei bambini, illustrando punti di forza e debolezza.
2. Incontri di rete con medico e psicologo del Centro di cura, team insegnanti, genitori e referenti dei Servizi sul territorio (pediatra, NPI, psicologo, ecc.), per la segnalazione e l'avvio ad un approfondimento diagnostico delle difficoltà/deficit emersi presso il Distretto di riferimento.
3. Sostegno psicologico a bambini e famiglie per la gestione degli aspetti emotivi e cognitivi collegati alla malattia drepanocitica.
4. Realizzazione di una festa cittadina in occasione della Giornata Mondiale della Drepanocitosi, allo scopo di estendere la conoscenza della malattia alla cittadinanza e alle istituzioni locali e di promuovere l'integrazione sociale di cittadini a rischio di emarginazione in quanto affetti da patologia cronica ed extra-comunitari.
5. Organizzazione di un seminario informativo "Il bambino con drepanocitosi a scuola: bisogni medici, cognitivi e psicologici in ambito scolastico", che si propone di informare/sensibilizzare gli insegnanti sulla malattia drepanocitica.
6. Realizzazione del progetto "Compitinsieme ... in ospedale!" da Marzo 2013, indirizzato ad un gruppo di bambini con SCD, di età 6-14 anni, seguiti presso il nostro Centro, per offrire loro un supporto nello svolgimento dei compiti pomeridiani e nell'apprendimento della lingua italiana, attraverso strategie di intervento individualizzate, fornite da insegnanti volontari esperti nelle diverse discipline.

I risultati della valutazione dell'efficacia di alcuni step dell'approccio psicosociale saranno presentati e discussi in sede di convegno.

CONCLUSIONI: Un modello di presa in carico di tipo psicosociale si innesta nel quadro di doppia fragilità, sperimentata dalle famiglie migranti con un figlio affetto da drepanocitosi, quella indotta dalla migrazione e quella determinata dalla malattia, ponendosi come obiettivo quello di offrire un approccio olistico, che riconosce l'interdipendenza reciproca delle determinanti di salute sociali e sanitarie.

La partecipazione alle iniziative del modello di intervento psicosociale da parte di tutte le figure coinvolte (pazienti, famiglie, scuole, cittadini ed istituzioni...) è sempre stata molto elevata ed entusiasta, dimostrando il bisogno di azioni globali in contesti simili.

Bibliografia:

1. Anye KA, Green J. Psychological terapie for sickle cell disease and pain. In *The Cochrane Library*, vol. 3, Oxford, 2002.
2. Tognetti Bordogna M. Immigrazione e disuguaglianze di salute. In Tognetti Bordogna (a cura di), *Disuguaglianze di salute e immigrazione*, Franco Angeli, Milano 2008.
3. Geraci S. Immigrazione e salute: politiche sanitarie inclusive ed il nodo dell'accessibilità. In Libanora R. (a cura di), *Dossier Umanamente*, 2010.
4. Testa R., Di Palma R., Pecoraro L, Franco G., Mirisola C. Salute nelle popolazioni fragili. Un modello di approccio olistico alla cura. *Argomenti*, 2012 (2): 51-57.
5. Panepinto JA, òMahar KM, De Baun MR e al. Health-related quality of life in children with sickle cell disease: child and parents perception. *Br J Haematol*, 2005, 130: 437-444.
6. Broom ME, Maikler V, Kelber S e al. An intervention to increase coping and reduce health care utilization for school-aged children and adolescents with sickle cell disease. *J Natl Black Nurses Assoc*. 2001, 12: 6-14.
7. Ohaeri, Shokunbi WA, Akinlade KS, Dare LO. The psychosocial problems of sickle cell disease sufferers and their methods of coping. 1995 Apr; 40 (7): 955-60.
8. Ohaeri JU, Shokunbi WA. Psychosocial burden of sickle cell disease on caregivers in a Nigerian setting. *J Natl Med Assoc*. 2002 Dec;94(12):1058-70.
9. Maguire, 1987
10. Cornoldi C., De Beni R., Zamperlin C., Meneghetti C. AMOS 8-15. Strumenti di valutazione di abilità e motivazione allo studio per studenti dagli 8 ai 15 anni. Trento, Erickson 2005.
11. Montanaro M, Colombatti R, Pugliese M, Migliozi C, Zani F, Guerzoni ME, Manoli S, Renzo Manara R, Meneghetti G, Rampazzo P, Cavalleri F, Basso G, Paolucci P, Palazzi G, Sainati L, 2012, in press.

P063

LA NECESSARIA COLLABORAZIONE NORD-SUD PER LE EMOGLOBINOPATIE: RISULTATI PRELIMINARI DELLO STUDIO DI FREQUENZA DELL'ALLELE HbS IN GUINEA BISSAU

M. Martella,¹ F. Riccardi,² D. Cumbà,³ E. Martins,⁴ S. Piedade da Costa,⁴ V. Munaretto,¹ M. Pierobon,¹ G. Basso,¹ L. Sainati,¹ R. Colombatti¹

¹Clinica di Oncoematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera, Università di Padova, Padova, Italy; ²Aid, Health and Development, Onlus, Hospital Raoul Follereau, Bissau, Guinea-Bissau; ³Clinica Pediatrica Bor, Bissau, Guinea-Bissau; ⁴Hospital Raoul Follereau, Bissau, Guinea-Bissau

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Le malattie ereditarie dell'emoglobina, in particolare la Drepanocitosi o Sickle Cell Disease (SCD), sono le più comuni malattie monogeniche a livello mondiale.¹ Come risultato della selezione dell'eterozigote nel vantaggio contro le forme gravi di malaria, la SCD raggiunge alte frequenze nei paesi tropicali ed in tutti quei paesi in cui ci sono grandi popolazioni di immigrati provenienti da tali regioni. Lo screening neonatale, la profilassi con penicillina, le vaccinazioni e la prevenzione dello stroke mediante Doppler Transcranico hanno aumentato la sopravvivenza e la qualità di vita dei pazienti con SCD nei paesi sviluppati, mentre l'assenza dello screening precoce e la carenza di tali misure aumentano notevolmente la mortalità dei bambini affetti da SCD nei paesi Africani.^{2,3} Nei paesi Africani l'alta frequenza di malattie infettive contribuisce ad aggravare il quadro clinico della SCD, malattia che si associa ad asplenia funzionale e compromissione immunitaria. Si stima che il 10% della mortalità al di sotto dei 5 anni in Africa sia in realtà dovuta alla SCD.³ La fragilità dei sistemi sanitari africani richiede il supporto dall'estero per favorire lo sviluppo di pro-

grammi nazionali adeguati. Pertanto, migliorare la diagnostica e l'assistenza clinica ai bambini con SCD e per favorire la ricerca, è importante sviluppare la partnership tra i gruppi di ricerca che lavorano su questa malattia nei paesi ricchi e nei paesi poveri. La Guinea Bissau, ex-colonia portoghese dell'Africa Occidentale (Figura 1), è uno dei paesi più poveri del mondo, con un tasso di mortalità infantile entro il primo anno di vita molto elevato (126/1000). Esistono dati limitati sulla frequenza dell'allele HbS in Guinea-Bissau⁴ e, di conseguenza, il reale peso sanitario della SCD nel paese non è noto e non esistono servizi per bambini affetti da questa malattia. L'obiettivo del nostro studio è di determinare la frequenza dell'allele HbS in una popolazione pediatrica della capitale Bissau, poiché la posizione geografica della Guinea-Bissau, tra paesi ad alta frequenza di HbS (Nigeria, Senegal, Guinea Conakry), fa presupporre una frequenza simile e la necessità di sviluppare servizi di diagnostica e cura adeguati.

METODI: Lo studio si svolge in due ospedali della capitale Bissau: l'Ospedale Raoul Follereau (ospedale della rete pubblica, Centro di Riferimento Nazionale per la Tubercolosi, gestito dall'Associazione Italiana Aid, Health and Development-Onlus, in cui tutte le prestazioni sono gratuite) e l'Ospedale Pediatrico Bor (ospedale privato, gestito da associazioni italiane, in cui le prestazioni sono tutte a pagamento). Lezioni di formazione ai medici e ai tecnici di laboratorio dei due Ospedali sono state tenute nel mese di dicembre 2012. La raccolta dei campioni è iniziata nello stesso mese, utilizzando sangue rimanente dai prelievi dell'emocromo di tutti i bambini che si presentavano ad entrambi gli ospedali, raccolto su carta assorbente. Le cartine assorbenti sono state inviate in Italia tramite corriere. Il DNA genomico ad alto peso molecolare, estratto secondo protocollo Qiagen dai "dried blood spot", è stato sottoposto ad amplificazione degli esoni della β -globina e a sequenziamento diretto. I campioni di DNA risultati eterozigoti HbS/HbA sono stati analizzati anche a livello dell'esone 2 e 3 con lo scopo di individuare eventuali altre varianti di sequenza responsabili di un genotipo eterozigote composto. È stato richiesto consenso verbale ai genitori per l'esecuzione del test.

RISULTATI: Otto medici e tre tecnici di laboratorio hanno ricevuto la formazione sulla SCD e sulle tecniche del prelievo nei due Ospedali. 120 bambini (28 all'Ospedale Raoul Follereau, 92 all'Ospedale Bor) sono stati sottoposti al test: 66 M e 54 F. L'età media era 6.61 anni (range:1-14). Il 92.5% dei bambini (111/120) veniva dalla capitale Bissau, prevalentemente dai quartieri attorno ai due ospedali (Bor, Contum, Quelele). I bambini appartenevano a 15 delle 20 etnie presenti in Guinea Bissau, costituendo un campione rappresentativo della popolazione del paese anche se l'etnia Pepel era sovra rappresentata (Tabella 1). I campioni raccolti erano tutti di ottima qualità. L'analisi molecolare ha permesso di individuare: 2 individui affetti da SCD omozigote HbS/HbS (1.6%) (età media 9.5 anni), 11 individui portatori di SCD HbS/HbA (9.1%) (età media 7.8 anni), 1 individuo portatore di una variante di sequenza samesense, 0.8% (8 anni). Nessun individuo presenta varianti di sequenza a livello dell'esone 2 o 3, pertanto non sono state evidenziate forme di doppia eterozigosi HbS/HbC né HbS/ β talassemia, frequenti invece in altri paesi dell'Africa Occidentale. È stata rilevata una significativa differenza della frequenza dell'allele S tra le diverse etnie: 38.4% nei Fula, 23% nei Mandinga, 15.3% nei Pepel e meno nelle altre. Sorprendentemente, in questa analisi preliminare, i bambini del maggior gruppo etnico della Guinea, i Balanta, non hanno presentato la mutazione S (Tabella 1).

CONCLUSIONI: I risultati preliminari del nostro studio mostrano la fattibilità della raccolta di campioni per l'analisi del gene S mediante carta assorbente in un contesto a risorse limitate come la Guinea Bissau. Mostrano inoltre una frequenza superiore al 10% dell'allele HbS nella popolazione pediatrica studiata, confermando la necessità di sviluppare programmi di screening e di presa in carico dei pazienti con SCD nel paese. La differenza significativa tra i diversi gruppi etnici andrà confermata ampliando il numero di bambini analizzati, per le implicazioni genetiche, sociali e di salute pubblica che potrebbe avere.

Bibliografia:

1. Weatherall D, Hofman K, Rodgers G, Ruffin J, Hrynkow S. A case for developing North-South partnerships for research in sickle cell disease. *Blood*. 2005 Feb 1;105(3):921-3. Epub 2004 Oct 5.
2. Aygun B, Odame I. A global perspective on sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer*. 2012 Aug;59(2):386-90. doi: 10.1002/pbc.24175. Epub 2012 Apr 25.
3. Grosse SD, Odame I, Atrash HK, Amendah DD, Piel FB, Williams TN. Sickle cell disease in Africa: a neglected cause of early childhood mortality. *Am J Prev Med*. 2011 Dec;41(6 Suppl 4):S398-405. doi: 10.1016/j.amepre.2011.09.013.
4. Mamas TN, Garly ML, Lisse IM, Rodrigues A, Petersen PT, Birgens H. Inherited hemoglobin disorders in Guinea-Bissau, West Africa: a population study. *Hemoglobin*. 2006;30(3):355-64

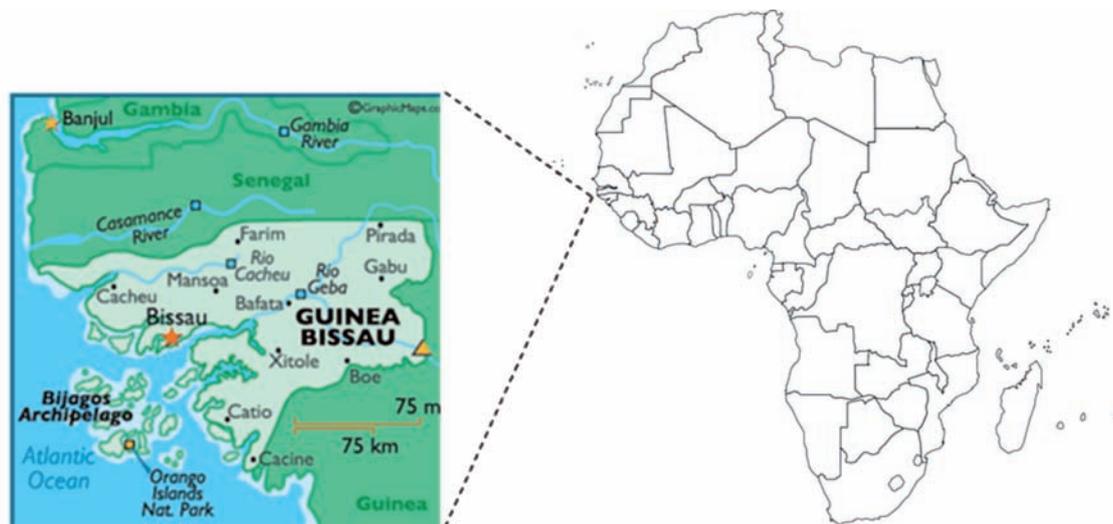


Figura 1.

Tabella 1.

Etnia	Pazienti analizzati% Sulla popolazione della Guinea Bissau		Pazienti con Gene S		
	N°	%	N°	%	
Fula	15	12.5	20-23	5	38.4
Pepel	26	21.6	7-10	2	15.4
Mandinga	13	10.8	13	3	23
Manjaco	15	12.5	11-14	1	7.6
Biafada	3	0.83	3	1	7.6
Susso	3	0.83	1	1	7.6
Balanta	21	17.5	27-30	0	0
Mancanha	10	8.3	3	0	0
Altri	14	11.6		0	0
TOTALE	120	100		13	100

P064

ANEMIA FERRO-CARENTE FERRO-REFRATTARIA (IRIDA) IN ETÀ PEDIATRICA: STUDIO PROSPETTICO PER L'IDENTIFICAZIONE DI SOGGETTI CON MUTAZIONE DEL GENE *TMPRSS6*

P. Corti,¹ N. Maserà,¹ V. Leoni,¹ F. Cichello,¹ C. Rigotti,¹ G. Casati,² S. Pelucchi,² F. Bertola,² A. Piperno²

¹Clinica pediatrica, FBBM, S. Gerardo, Università degli Studi Milano Bicocca, Monza (MB); ²Consorzio per la Genetica Molecolare Umana, S. Gerardo, Monza, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: L'anemia microcitica sideropenica è la forma più comune di anemia in età pediatrica. A fronte delle molteplici cause acquisite di sideropenia, esistono rare forme geneticamente determinate. Tra queste l'anemia ferro-carente ferro-refrattaria (IRIDA) è una rara anemia microcitica a trasmissione autosomica recessiva dovuta a mutazioni nel gene *TMPRSS6*. Questo gene codifica per la proteina matriptasi-2 implicata nella regolazione di epcidina, ormone chiave nella regolazione del metabolismo del ferro, che agisce inibendo la ferroportina, unico esportatore del ferro cellulare, sia a livello intestinale che macrofagico. Mutazioni di *TMPRSS6* determinano livelli di epcidina inappropriatamente elevati rispetto allo stato del ferro e quindi, un ridotto assorbimento di ferro a livello intestinale ed un ridotto rilascio dai depositi. I soggetti affetti sviluppano un'anemia ferro-carenziale che non risponde al trattamento marziale orale e solo parzialmente al trattamento parenterale. L'anemia può essere da moderata a severa, la microcitosi è spiccata ed il quadro marziale è caratteristico con livelli di ferritina normali o bassi e percentuale di saturazione della transferrina molto bassa. La prevalenza e l'incidenza di questa patologia non è nota. Riportiamo lo screening eseguito in un

centro pediatrico di secondo livello per l'identificazione delle rare forme congenite di anemia sideropenica.

METODI: Abbiamo studiato prospetticamente i bambini afferenti presso il nostro centro di Ematologia Pediatrica per anemia sideropenica che rispondevano ai seguenti requisiti:

- anemia microcitica (Hb ed MCV < -2DS per età secondo Natan-Osky) con elettroforesi dell'emoglobina nella norma, non suggestiva per emoglobinopatie;
- sideropenia con percentuale di saturazione della transferrina <10% in assenza di stato infiammatorio;
- screening per celiachia negativo (anticorpi antiendomisio, antitransglutaminasi) con dosaggio delle immunoglobuline (IgA, IgG, IgM) nella norma per età;
- scarsa risposta al trattamento marziale orale (cioè più di 2 cicli di ferro al dosaggio di almeno 2 mg/Kg die eseguiti per almeno 2 mesi con buona compliance da parte della famiglia) e/o necessità di trattamento marziale parenterale;
- sono stati sottoposti ad analisi del gene *TMPRSS6*, responsabile dell'IRIDA.

RISULTATI: Dal 2009 ad oggi, sono stati identificati 15 probandi non consanguinei fra loro che rispondevano ai criteri di selezione dello studio. L'analisi molecolare del gene *TMPRSS6* ha permesso l'identificazione di 5 nuove mutazioni (p.V70L, IVS10-1G>C, IVS12+2T>G, p.P555S, p.W643X) che, all'analisi *in silico*, risultano probabilmente lesive e 3 varianti già descritte, dal ruolo patogenetico incerto (IVS2+8_+10delTGT, p.A188A, p.R271Q). Complessivamente sono stati identificati 2 pazienti con IRIDA (omozigoti o con doppia eterozigosi) e 5 pazienti eterozigoti per una mutazione (Tabella 1). Inoltre, lo screening familiare ha permesso di identificare 2 ulteriori soggetti con fenotipo IRIDA di cui un omozigote e un eterozigote.

Tabella 1. Caratteristiche dei soggetti con mutazione del gene *TMPRSS6* identificati attraverso lo studio oltre ai 2 casi familiari

	Sesso	Etnia	Età diagnosi (aa)	Hb min (g/dL)	MCV (fL)	Ferritina (ng/mL)	Transferrina (mg/dL)	Saturazione TRF (%)	Mutazione <i>TMPRSS6</i>
Pazienti con IRIDA									
1	M	Italiana	1.1	6.6	47	38	255	3	IVS10-IG>C eter+IVS12+2T>G eter
2	F	Africana	2.5	6.8	46	56	207	8	p.V70L omoz
0	F	Africana	0.3	7.0	38	157	242	4	p.V70L omoz
Eterozigoti per IRIDA									
1	M	Italiana	2.9	9.7	67	8	383	4	p.P555S eter
2	M	Italiana	7.9	8.5	59	12	336	3	p.R271Q eter
3	M	Pakistana	4.5	7.5	53	20	337	4	p.P555S eter
4	M	Africana	6.0	8.8	52	48	311	3	p.Trp643X eter
5	F	Pakistana	4.0	9.3	48	3	401	3	Ala188Ala omoz+p.P555S eter
0	F	Pakistana	6.0	9.9	56	8	316	3	p.P555S eter + IVS2+8_+10 delTGT eter +Ala188Ala eter

Legenda: 0) soggetti identificati attraverso lo studio familiare allargato.

CONCLUSIONI: Questo studio ha permesso l'identificazione di validi criteri capaci di indirizzare verso una diagnosi di una rara forma ereditaria di anemia ferro-privata, pur consapevoli del bias di selezione dei pazienti (i bambini afferenti ad un centro di secondo livello rappresentano una porzione rispetto al totale delle anemie sideropeniche valutate sul territorio). Mutazioni del gene *TMPRSS6* sono state identificate nel 46.6% dei bambini studiati (13.3% in omozigosi e doppia eterozigosi e 33.3% in eterozigosi). Ulteriori varianti del gene, il cui ruolo patogenetico non è ancora chiaro, sono state osservate e meritano una sorveglianza all'interno della casistica. Questo studio evidenzia che l'analisi di *TMPRSS6* porta alla frequente identificazione di mutazioni in una popolazione selezionata di bambini con anemia microcitica da deficit di ferro. La diagnosi di IRIDA è importante oltre che per la definizione della patologia, anche per un corretto approccio terapeutico.

P065

TERAPIA CON ANAGRELIDE IN BAMBINI E ADOLESCENTI AFFETTI DA TROMBOCITEMIA: FOLLOW-UP A LUNGO TERMINE

D. Marzella, F. Giona, G. Palumbo, M.L. Moleti, M. Rea, A.M. Testi, A. De Vellis, M. Laurino, R. Foà

Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università Sapienza, Roma, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: L'anagrelide idrocloride (ANA) è un farmaco utilizzato nel trattamento della trombocitemia essenziale; la sua efficacia e tolleranza sono già stata ampiamente dimostrate negli adulti. In età pediatrica la trombocitemia essenziale è rarissima, per cui i dati riguardanti l'ANA sono sporadici e nella maggioranza dei casi i pazienti pediatrici sono inclusi in casistiche di adulti. Allo stato attuale la letteratura riporta un numero veramente esiguo di bambini e adolescenti trattati con ANA, circa 20.⁽¹⁻⁴⁾ L'obiettivo principale di questo studio retrospettivo è quello di valutare dell'efficacia e tolleranza di ANA in pazienti di età <20 anni alla diagnosi, affetti da trombocitemia essenziale o trombocitosi familiare non trattati in precedenza oppure resistenti o intolleranti ad altre terapie citoriduttrive. Oltre alla risposta al trattamento sono stati valutati: il tipo ed il tempo alla risposta, gli effetti collaterali ematologici ed extraematologici ed il follow-up a lungo termine.

METODI: Abbiamo retrospettivamente considerato i pazienti giunti all'osservazione dell'Ematologia Pediatrica del Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologiche dell'Università "Sapienza" di Roma dal Dicembre 1981 al Dicembre 2006, affetti da TE (n=12) e TF (n=1). L'età mediana alla diagnosi dei 13 pazienti (9 femmine e 4 maschi) era di 10^{9/12} anni, con un range variabile da 5^{3/12} a 19^{6/12} anni. La diagnosi è stata effettuata secondo i criteri PVSG e, a partire dal 2002 in poi, rivista secondo i criteri del WHO (2002 e 2008), grazie allo studio di markers biologici caratterizzanti le diverse forme, quali la crescita spontanea delle colonie eritroidi (EECs), la clonalità per le pazienti di sesso femminile, la mutazione *JAK2*^{V617F} e la mutazione del gene della TPO e del suo recettore c-MPL. I 13 pazienti, arruolato dall'aprile

1997 al gennaio 2007, sono stati trattati con ANA ad un dosaggio compreso tra 0.5-1.5 mg/die per un periodo di tempo variabile da 2 a 170 mesi (mediana di trattamento: 58 mesi). Tre pazienti hanno ricevuto ANA in prima linea, dopo un tempo dalla diagnosi di 14, 67 e 1 mese, rispettivamente. Dieci avevano ricevuto in precedenza un trattamento citoriduttrivo per un periodo di tempo variabile da 1 a 204 mesi (mediana: 57 mesi). Prima di iniziare l'ANA, 7 pazienti avevano ricevuto 1 solo farmaco (idrossiurea, HU), 2 pazienti avevano ricevuto 2 farmaci (HU e Pipobromano), 1 paziente aveva ricevuto 3 farmaci (HU, interferone e Pipobromano). Complessivamente, il tempo mediano intercorso tra la diagnosi e l'inizio del trattamento con ANA è stato 2^{7/12} anni (range: 1 mese e 20^{8/12} anni). La risposta ematologica è stata così definita:⁽⁵⁾

- **COMPLETE (RC):** numero di piastrine minore di 450x109/L persistente per 1 mese;
- **PARZIALE (RP):** numero di piastrine tra le 450-600x109/L persistente per 1 mese;
- **ASSENTE:** numero di piastrine persistentemente >600 x109/L.

Tutti i pazienti sono stati seguiti nel follow-up dal punto di vista clinico-obiettivo, emocromocitometrico e chimico, con cadenze programmate sia per controllare l'efficacia e gli effetti collaterali del farmaco sia per monitorare l'evoluzione della malattia. Per valutare l'insorgenza di un'eventuale fibrosi midollare, tutti sono stati valutati periodicamente con biopsia osteomidollare sia durante che dopo trattamento con ANA. L'ultimo follow-up è a dicembre 2012.

RISULTATI: Una risposta è stata ottenuta in 10/13 pazienti (76,9%), in 9 dei quali è stata ottenuta una risposta completa dopo un periodo di tempo mediano di 20 settimane; mentre in 1 paziente è stata osservata una risposta parziale dopo 22 mesi di trattamento. Tre pazienti, (2F,1M) (23%) sono stati considerati non rispondenti all'ANA (persistenza di piastrine superiori al milione) e, per l'ulteriore comparsa di effetti collaterali persistenti di grado >2 WHO, hanno sospeso il trattamento, dopo 2, 11 e 27 mesi. Dei 9 pazienti che avevano ottenuto una risposta completa, 4 in risposta completa persistente (RCP) hanno sospeso l'ANA e, all'ultimo follow-up, mantengono tutti la risposta dopo una mediana di 38 mesi dalla sospensione (range:34-144), senza ulteriori trattamenti. Un paziente in RCP è ancora in trattamento con ANA. Quattro pazienti hanno perso la risposta completa e proseguono l'ANA con una risposta parziale. Quattro pazienti di sesso femminile hanno affrontato una gravidanza, sospendendo il trattamento con ANA; dopo la gravidanza, 2 in risposta parziale, continuano a non eseguire alcun trattamento; una paziente è in RCP senza terapia e un'altra è in terapia con INF. Il paziente che aveva avuto una risposta parziale la mantiene dopo 170 mesi di trattamento con ANA. Undici pazienti hanno presentato effetti collaterali isolati e/o combinati, come cefalea (n=9), epigastralgia (n=3), tachicardia (n=3), diarrea (n=3), scomparsi nel corso del tempo in 8/11 pz. In tre pazienti la cefalea è stata così importante da determinare, rispettivamente dopo 5 settimane, 11 e 28 mesi l'interruzione del trattamento con ANA. Nel follow-up a lungo termine due pazienti hanno presentato anemia, risoltasi in breve tempo con terapia marziale. Nessuno dei pazienti ha sviluppato fibrosi midollare, né leucemie, né eventi tromboembolici. Abbiamo registrato 5 gra-

vidanze in 4 pazienti: una è risultata in una interruzione dopo 6 settimane per presenza di sola camera gestazionale e 4 sono state portate a termine, con nascita di feti normali, in ottima salute e con un numero di piastrine nella norma.

CONCLUSIONI: Nella nostra esperienza, il trattamento con ANA si è dimostrato efficace nel controllare il numero di PLT in pazienti con trombocitemia essenziale in età <20 anni alla diagnosi, con una risposta completa nel 69,2% della coorte (9/13 pz), inoltre il 30% ha sospeso il trattamento ed è in RCP (4/13 pz). Non sono stati registrati effetti collaterali gravi, ma il 23% dei pazienti ha avuto disturbi tali da dover sospendere il trattamento.

Bibliografia:

1. Chintagumpala MM, Kennedy LL, Steuber CP. Treatment of essential thrombocythemia with anagrelide. *J Pediatr.* 1995 Sep;127(3):495-8.
2. Scherer S, Ferrari R, Rister M. Treatment of essential thrombocythemia in childhood. *Pediatr Hematol Oncol* 2003; 20:361-365.
3. Kratz CP, Abd el-Monheim A, Manke EM, Rister M, Rogge T, Niemeyer Cm. Retrospective analysis of the clinical course of 12 children given the diagnosis essential thrombocythemia. *Klin Paediatr* 2004; 216:349-355.
4. Lackner H, Urban C, Benesch M, Moser A, Sovinz P, Schwinger W, Dornbusch HJ Long-term use of anagrelide in the treatment of children with essential thrombocythemia. *Eur J Haematol.* 2006 Oct;77(4):358-9.
5. Mazzucconi MG, Redi R, Bernasconi S, Bizzoni L, Dragoni F, Latagliata R, Santoro C, Mandelli F. A long-term study of young patients with essential thrombocythemia treated with anagrelide. *Haematologica.* 2004 Nov;89(11):1306-13.

P066

ANEMIA DI BLACKFAN DIAMOND: NUOVO TEST DIAGNOSTICO SU RNA RIBOSOMIALE

P. Quarello,¹ E. Garelli,² A. Carando,² C. Botta,² S. Guarrera,³ G. Matullo,⁴ I. Dianzani,⁵ U. Ramenghi²

¹Oncoematologia, Ospedale Infantile Regina Margherita, Torino;

²Ematologia, Dipartimento di Scienze della Salute Pubblica e

Pediateriche, Università di Torino, Torino; ³Human Genetics Foundation, Università di Torino, Torino; ⁴Dipartimento di Genetica Biologia e Biochimica, Università di Torino, Torino; ⁵Dipartimento di Scienze della Salute, Università del Piemonte Orientale, Novara, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: L'anemia di Blackfan Diamond (DBA) è la più frequente forma di aplasia congenita pura della serie eritroide. La maggior parte dei casi di DBA è associata ad aploinsufficienza di geni codificanti per proteine ribosomiali (RP) della subunità maggiore o minore del ribosoma. In circa il 70% dei casi sono state identificate mutazioni a carico di 10 geni RP (*RPS7, RPS10, RPS17, RPS19, RPS24, RPS26, RPL5, RPL11, RPL26, RPL35a*). Le RP alterate nella DBA sono risultate essenziali per il processamento del pre-RNA ribosomiale nelle forme mature 18S, 5.8S e 28S (*Leger-Silvestre et al. J Biol Chem 2005, Flygare et al. Blood 2007*). Le alterazioni delle RP modificano il processamento del pre-RNA ribosomiale determinando un accumulo o una riduzione di frammenti intermedi con conseguente alterazione del rapporto tra le forme mature (28S e 18S) evidenziate mediante Northern Blot (*Flygare et al. Blood 2007*).

METODI: L'obiettivo di questo studio è stato quello di realizzare un test diagnostico rapido mediante l'analisi dei frammenti di RNA ribosomiale (rapporto 28S/18S) utilizzando la tecnica del Bioanalyzer (Agilent Technologies). È stata effettuata l'analisi del RNA di 30 pazienti DBA (15 mutati in RP) e di 20 controlli. L'RNA analizzato presentava un elevato grado di purezza (RNA Integrity Number (RIN) compreso tra 8-9.8).

RISULTATI: Il rapporto 28S/18S è risultato aumentato nei pazienti con mutazione nota in RP della subunità minore (media: 2.52, range: 2.1-3.25) e ridotto nei pazienti con mutazione in RP della subunità maggiore (media: 1.27, range: 1.15-1.35). Il rapporto 28S/18S è risultato compreso tra 1.4 e 1.8 con valore medio di 1.55 nei controlli mentre nei pazienti DBA senza mutazione nota in RP tra 1.3 e 2.5 con valore medio di 2.05 (Figura 1). L'analisi eseguita su 15 pazienti DBA senza mutazione nota ha evidenziato un rapporto 28S/18S aumentato o ridotto in 11 pazienti lasciando pertanto ipotizzare la presenza di una mutazione in RP non ancora analizzate. Un rapporto 28S/18S normale è stato osservato in 4 pazienti; tale riscontro può indurre ad ipotizzare il coin-

volgimento di geni che non svolgono un ruolo nel processo di maturazione del pre-RNA ribosomiale oppure che questi pazienti siano affetti da una patologia simile ma non identica alla DBA.

CONCLUSIONI: Il riscontro di un rapporto alterato tra i frammenti di RNA ribosomiale 28S e 18S in tutti e 15 i pazienti DBA che presentavano una mutazione nota in RP fa ritenere il test un valido e rapido strumento per la conferma della malattia nei pazienti di nuova diagnosi. Inoltre la riduzione del rapporto 28S/18S nei pazienti con coinvolgimento della subunità maggiore e l'aumento di tale rapporto nei pazienti con mutazioni a carico di RP della subunità ribosomiale minore suggerisce quali geni debbano essere sottoposti a sequenza.

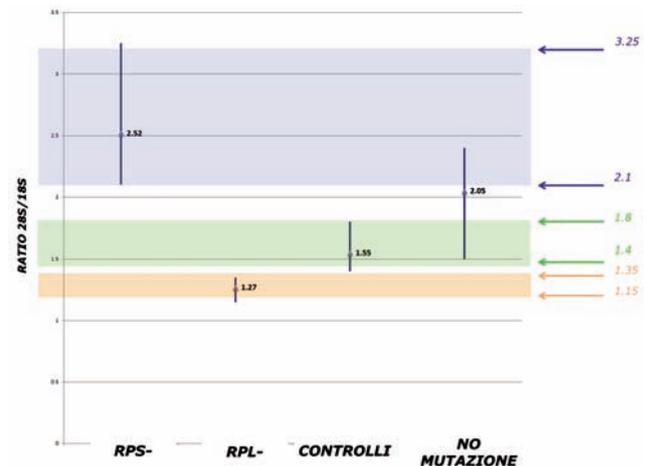


Figura 1. Rapporto 28S/18S nei pazienti e nei controlli sani.

P068

UN CASO DI ANEMIA IPORIGENERATIVA NEONATALE ASSOCIATO ALLA NABLUS SYNDROME: L'ARRAY CGH NELLA DIAGNOSTICA DELLE SINDROMI COMPLESSE

M. Luciani,¹ A. Aquilani,² V. Coletti,¹ M.C. Digilio,³ A. Grandin,³ P. Sirleto,⁴ A. Villani,³ F. Locatelli¹

¹Dipartimento di Ematologia Oncologia e Medicina Trasfusionale;

²Dipartimento Universitario Ospedaliero; ³Dipartimento di Medicina

Pediaterica; ⁴Dipartimento dei Laboratori, SS di Citogenetica e Genetica Molecolare, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Anomalie cromosomiche del midollo osseo (delezioni/duplicazioni) sembrano giocare un ruolo fondamentale nella patogenesi di citopenie e/o ipoplasie midollari persistenti anche in assenza di alterazioni morfologiche tipiche delle sindromi mielodisplastiche, oltre a rappresentare la causa principale di malattie genetiche a fenotipi complessi (dismorfie, ritardo mentale).¹ L'impiego negli ultimi anni dell'Array Comparative Genomic Hybridization (a-CGH) come tecnica di screening dell'intero genoma ad elevato potere di risoluzione in grado di studiare mutazioni cromosomiche sbilanciate, sia congenite che acquisite, ha aumentato la sensibilità delle indagini citogenetiche, migliorando la comprensione dei meccanismi patogenetici alla base di numerose condizioni patologiche.^{2,3}

METODI: Riportiamo il caso di una bambina affetta sin dalla nascita da scarso accrescimento, DIA, dismorfie facciali (blefarofimosi, ipetelorismo, sopracciglia rade, sottili e arcuate, bocca piccola con labbra sottili, capelli radi, naso largo e piatto, orecchie dismorfiche di forma triangolare con prominente antielice) giunta alla nostra attenzione all'età di 3 anni per il riscontro di anemia grave (Hb 4,1 mg/dl-GB 5500 - MCV 110fL - PLT 218000) durante un episodio di crisi convulsiva in corso di febbre. La paziente era stata sottoposta all'età di 8 mesi di vita ad analisi del cariotipo e studio dei telomeri risultati nella norma. Alla prima osservazione presso il nostro centro la bambina appariva in condizioni generali discrete con adeguato sviluppo cognitivo, accrescimento staturò-ponderale inferiore al terzo percentile. In prima istanza veniva esclusa un'origine metabolica del quadro clinico. Dal punto di vista infettivo risultava la presenza di Ab anti-VCA IgG per EBV nel sangue periferico. L'EEG evidenziava anomalie lente fronto-centrali destre in assenza di alterazioni epilettiformi. In considerazione dell'anemia grave veniva eseguito aspirato midollare e biopsia ossea.

L'esame morfologico del sangue midollare mostrava un'ipoplasia della serie eritroblastica e una normale rappresentazione delle altre linee cellulari. Le indagini virologiche su aspirato midollare evidenziavano una positività per EBV e HHV-6. La biopsia osteomidollare mostrava un midollo emopoietico ipocellulato per l'età con ipoplasia eritroide, quadro compatibile con un disordine da insufficienza costituzionale dell'emopoiesi o in alternativa secondario a un'infezione virale. Sulla base del reperto istologico e del riscontro di una infezione virale midollare da EBV e HHV-6, l'ipoplasia midollare veniva interpretata inizialmente come post-infettiva. Successivamente, visto il persistere dell'anemia grave (trasfusione dipendente) venivano effettuati ulteriori approfondimenti genetici con tecnica FISH (Fluorescence In Situ Hybridation) e il test al DEB risultati negativi. Pertanto veniva richiesto lo studio delle microanomalie cromosomiche con aCGH.

RISULTATI: L'analisi condotta su DNA estratto su sangue periferico della paziente mostrava la presenza di una duplicazione che si estendeva per circa 4Mb sul cromosoma 1 (1p22.1-1p21.3) e una delezione di circa 2 Mb del cromosoma 8 (8q21.3-8q22.1). In particolare la delezione del cromosoma 8 coinvolgeva alcuni geni tra cui RUNX1T1 (run-related transcription factor1). Successivamente l'esame veniva ripetuto su saliva per confermare che tale condizione fosse costituzionale e non acquisita (Figura 1).

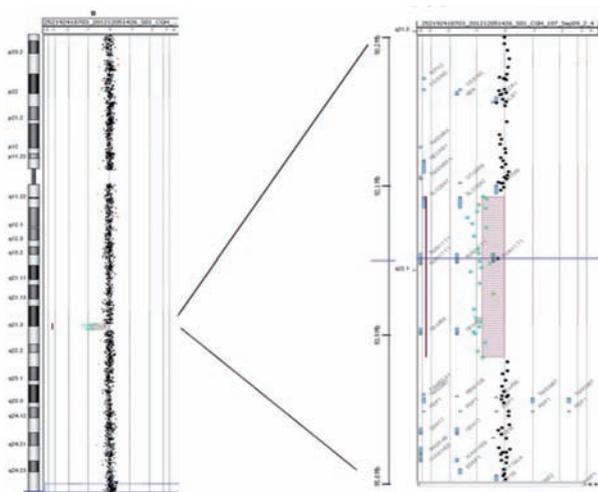


Figura 1.

CONCLUSIONI: La delezione del cromosoma 8 risulta essere la causa di una rara condizione caratterizzata da un pattern caratteristico di malformazioni facciali sovrapponibile al fenotipo dismorfo della nostra bambina, descritta per la prima volta da Teebi nel 2000,⁴ la Nablus mask-like facial syndrome, la cui eziologia genetica venne identificata nel 2006 utilizzando l'a-CGH.⁵ La dismorfia facciale può essere associata ad anomalie della dentizione, criptorchidismo, campilodattilia, ritardo dello sviluppo cognitivo e comportamento "happy".^{5,6} L'alterazione strutturale del cromosoma 8 coinvolge anche il gene RUNX1T1, un fattore di trascrizione coinvolto nel processo dell'emopoiesi.⁷ Questo è comunemente sede di traslocazioni cromosomiche responsabili di alcune forme di leucemia acuta. Tuttavia nel nostro caso la microdelezione sembra essere la causa primaria dell'anemia persistente caratterizzata dall'assenza di popolazioni anomale all'esame morfologico e strutturale del midollo osseo.¹ L'associazione della Nablus mask-like facial syndrome con l'anemia iporigenerativa rappresenta una condizione eccezionale, mai precedentemente descritta in letteratura. L'estensione della delezione e il coinvolgimento più o meno esteso di geni contigui sembra condizionare un pattern fenotipico caratteristico differente per ogni singolo paziente. Quindi l'identificazione di altri casi e la mappatura del sito deletato è cruciale per migliorare la comprensione delle correlazioni precise tra genotipo e fenotipo.⁶ Indubbiamente l'impiego dell'a-CGH ha rivestito un ruolo fondamentale nel percorso diagnostico. Ha permesso, consentendo lo studio delle microanomalie cromosomiche sull'intero genoma, di formulare una diagnosi certa pur non avendo all'inizio un sospetto diagnostico mirato e di chiarire l'eziologia della citopenia. Questa tecnica infatti è in grado di superare i limiti di risoluzione del microscopio utilizzato della citogenetica tradizionale ed ampliare le possibilità diagnostiche della moderna tecnica FISH impiegata solo in casi selezionati in base a spe-

cifici sospetti diagnostici per caratterizzare determinate anomalie citogenetiche.² Una valutazione citogenetica complessiva quindi consente di approfondire il ruolo patogenetico di aberrazioni cromosomiche sbilanciate del midollo osseo con effetto su specifici geni (come nel caso di RUNX1T1) implicati in disordini ematologici non inquadrabili in una sindrome mielodisplastica.¹ Pertanto risulta particolarmente utile nel sospetto di malattie genetiche con fenotipi complessi, dove l'analisi del cariotipo con tecnica citogenetica tradizionale potrebbe risultare normale malgrado il fenotipo chiaramente patologico e la FISH non applicabile visto il sospetto non "mirato".

P069

MONITORAGGIO DELLA MALATTIA MINIMA RESIDUA NELLA LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA ATTRAVERSO L'INDIVIDUAZIONE DEL BREAK POINT GENOMICO BCR-ABL

G. Porta,¹ I.S. Pagani,² C. Pirrone,² D. Pigni,² F. Passamonti,² F. D'Avila,³ S. Lupoli,³ C. Barlassina,³ O. Spinelli,⁴ A. Rambaldi,⁴ R. Baffelli,⁵ F. Bolda,⁶ F. Porta,⁷ A. Lanfranchi⁶

¹Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi dell'Insubria, Varese; ²Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale; ³Fondazione Filarete per le Bioscienze e l'Innovazione, Milano; ⁴Ospedali Riuniti di Bergamo; ⁵Servizio di Medicina di Laboratorio, Laboratorio Cellule Staminali; ⁶Servizio di Medicina di Laboratorio, Laboratorio Cellule; ⁷UO di Oncoematologia Pediatrica e Trapianto di Midollo Osseo, Ospedale dei Bambini, Brescia, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La Leucemia Mieloide Cronica (LMC) è un disordine mieloproliferativo clonale caratterizzato dalla traslocazione reciproca t(9;22)(q34;q11). Conseguenze di questa traslocazione sono la formazione del cromosoma di Philadelphia (Ph) e della sua controparte molecolare, il gene di fusione BCR-ABL1, che codifica per una tirosin-chinasi ad attività anomala. Il punto di rottura nei due geni può avvenire in diversi siti: generalmente vicino all'esone 2 nel gene ABL1 e in tre differenti regioni nel gene BCR (regione Major: esone 13 o 14, minor: tra gli esoni 1 e 2 e micro: tra gli esoni 19 e 20). Punti di rottura in regioni diverse portano alla formazione di trascritti di mRNA differenti che vengono tradotti in tre diverse proteine de-regolate (p210^{BCR-ABL1}, p190^{BCR-ABL1} and p230^{BCR-ABL1}) (1). Il 90% dei pazienti possiede il cromosoma Ph mentre una minoranza mostra cellule leucemiche citogeneticamente normali o presenta anomalie che non coinvolgono uno dei due cromosomi. La LMC evolve da una fase cronica iniziale ad una fase intermedia accelerata fino a raggiungere una crisi blastica se non si interviene con una terapia. La prima linea terapeutica per i pazienti in fase cronica è basata sull'utilizzo dell'inibitore delle tirosin-chinasi Imatinib Mesilato (IM). Questo farmaco aumenta le prospettive di vita bloccando semplicemente il prodotto della traslocazione. Prima dell'avvento dell'IM le terapie comuni erano il trapianto di cellule staminali e l'uso dell'Interferone α e queste rimangono comunque ancora un'opzione. Farmaci di seconda generazione, come il Dasatinib e il Nilotinib, stanno acquisendo negli ultimi anni sempre maggior importanza soprattutto nei casi di resistenza all'Imatinib. A causa dell'elevato costo della terapia e degli effetti collaterali dovuti all'assunzione di IM, risulta veramente importante riuscire a individuare i possibili candidati per l'interruzione della terapia e questo è possibile grazie al monitoraggio della "malattia residua". La risposta all'Imatinib può essere valutata nel corso del tempo osservando la riduzione dei leucociti, delle cellule Ph-positive e del trascritto di BCR-ABL1.¹ Generalmente, le prime analisi per il monitoraggio della malattia residua includono studi citogenetici (analisi del cariotipo e FISH) ma la sensibilità di questi metodi è molto bassa. Nel 2003, la "Europe against Cancer" (EAC) ha stabilito un protocollo standard per la rilevazione del trascritto di BCR-ABL1. La tecnologia basata sull'RNA (qRT-PCR) presenta, però, dei limiti in quanto i livelli del trascritto non sono direttamente correlati al numero di cellule leucemiche ed è impossibile così rilevare le cellule leucemiche trascrizionalmente silenti. Queste cellule potrebbero però essere individuate con metodi in grado di riconoscere i riarrangiamenti all'interno del DNA genomico. Il nostro laboratorio ha sviluppato una tecnica altamente sensibile che, attraverso l'uso della Real-time PCR quantitativa (Q-PCR), identifica le cellule leucemiche quiescenti individuando le sequenze di DNA originatesi in seguito alla traslocazione. Ogni paziente mostra una specifica sequenza genomica di fusione che deve essere quindi caratterizzata per poter disegnare dei saggi specifici. Fino ad ora abbiamo identificato le sequenze di giunzione attraverso due metodi differenti: la Long-range PCR² e un sistema di PCR originariamente sviluppato per il genome walking che

permette di frammentare, legare degli adattatori e amplificare il DNA e infine sequenziare il punto di rottura.³ Questi metodi sono però troppo costosi e laboriosi per scopi diagnostici. Lo scopo dei nostri studi è, oltre quello di rendere disponibile la nostra metodica basata sul DNA per il monitoraggio della malattia residua in clinica, identificare una tecnica per l'individuazione dei punti di rottura che possa essere la più veloce e la meno costosa per la diagnosi. Gli eventi oncogenici nella LMC avvengono all'interno di cellule staminali ematopoietiche capaci di dar luogo a una differenziazione multilinea.⁴ Per valutare in quale passaggio del processo ematopoietico si viene a formare il gene di fusione BCR-ABL1, abbiamo sviluppato un metodo per isolare e studiare le cellule staminali CD34+ e CD34- dal midollo e cellule differenziate della linea mieloide e linfocite da sangue periferico.

METODI: Nel nostro laboratorio stiamo monitorando 10 pazienti affetti da LMC, diagnosticati in fase cronica, usando la tecnica della Q-PCR e analizzando follow-up fino a 8 anni dall'inizio della terapia. La PCR consiste di due reazioni: la prima rivolta verso il gene BCR, usato come controllo, e la seconda rivolta verso il gene di fusione per il quale vengono disegnati appositamente primers e sonde specifiche per ogni paziente. La percentuale delle cellule leucemiche viene calcolata con la formula: $LC = [100 * 2^{2\Delta Ct} + 1] * n/N$ (1). I nostri risultati vengono poi confrontati con i valori di mRNA degli stessi campioni ottenuti con il saggio convenzionale di q-RT PCR. Per l'individuazione dei punti di rottura nei due geni abbiamo testato una nuova tecnica basata sul next-generation-sequencing: Agilent Sure Select Enrichment e Illumina paired-end sequencing. Abbiamo usato in totale 10 campioni: tre, la linea cellulare K562 e due pazienti, con punti di rottura noti nella regione Major di BCR come controllo e sette con punti di rottura sconosciuti nelle diverse regioni. I punti di rottura sono stati poi controllati con una PCR e un normale sequenziamento. Usando l'autoMACS™ Separator (Miltenyi Biotec) e specifici marker molecolari abbiamo separato dal midollo di tre dei 10 pazienti, già usati per il monitoraggio della malattia residua, le cellule staminali CD34+ e CD34- e da sangue periferico le CD3+, CD19+, CD3-, CD19- e CD15+. Abbiamo inoltre analizzando le cellule staminali mesenchimali, i polimorfonucleati e colonie formanti precursori eritroidi, granulociti e macrofagi. L'individuazione del gene di fusione è stata effettuata tramite Q-PCR.

RISULTATI: Per il monitoraggio della malattia residua abbiamo ottenuto risultati differenti: in tutti i campioni positivi per il trascritto chimerico abbiamo misurato livelli positivi anche del DNA genomico corrispondente. In alcuni campioni, i livelli di mRNA scompaiono e riappaiono durante il trattamento con IM contrariamente alla continua presenza di DNA. In un paziente abbiamo misurato valori positivi di DNA che di mRNA durante tutto il corso della terapia. In altri campioni, invece, a valori negativi di mRNA corrispondono valori positivi di DNA. In due pazienti, livelli non individuabili di mRNA sono stati confermati dalla corrispondente negatività di DNA. Con la tecnica dell'Enrichment associata al sequenziamento siamo riusciti a confermare i punti di rottura dei pazienti noti, validando così la tecnica, e a individuare i sette sconosciuti. Per quanto riguarda lo studio delle cellule staminali non abbiamo trovato la presenza del cromosoma Ph nei due pazienti con valori negativi di DNA negli ultimi follow-up analizzati ma abbiamo invece riscontrato positività nelle CD34+, nelle CD15+ e nelle CD19+ del paziente con valori positivi di DNA.

CONCLUSIONI: Con l'uso di diversi approcci terapeutici, il monitoraggio dei singoli pazienti affetti da Leucemia Mieloide Cronica può portare a predire e riconoscere coloro che hanno un alto rischio di progressione della malattia e la conoscenza e l'interpretazione dei dati riguardanti la malattia minima residua è necessaria per le giuste decisioni terapeutiche. La tecnica basata sull'individuazione del DNA genomico associata alla metodica dell'Enrichment per l'individuazione del breakpoint oltre ad identificare i possibili candidati per il blocco della terapia potrebbe rivelarsi uno strumento molto utile sia nella ricerca che per il miglioramento delle pratiche diagnostiche convenzionali. Inoltre identificare quando le cellule staminali ematopoietiche diventano leucemiche può aiutare a capire meglio la biologia della LMC e fornire un mezzo diagnostico, prognostico e terapeutico utile nella clinica. Inoltre questa tecnica può essere applicata a tutti i tumori e/o neoplasie che presentano traslocazioni cromosomiche.

Bibliografia:

1. E Mattarucchi, O Spinelli, A Rambaldi, F Pasquali, F Lo Curto, L Campiotti, and G Porta. Molecular Monitoring of Residual Disease in Chronic Myeloid Leukemia by Genomic DNA Compared with Conventional mRNA Analysis. *Journal of Molecular Diagnostics* (2009).
2. DM Ross, S Brandford, JF Seymour, AP Schwaer, C Arthur, PA

Bartley, C Slader, C Field, P Dang, RJ Filshie, AK Mills, AP Grigg, JV Melo and TP Hughes. Patient with chronic myeloid leukemia who maintain a complete molecular response after stopping Imatinib treatment have evidence of persistent leukemia by DNA PCR. *Leukemia* (2010).

3. E Mattarucchi, V Guerini, A Rambaldi, L Campiotti, A Venco, F Pasquali, F Lo Curto, and G Porta. Micro-homologies and Interspersed Repeat Elements at Genomic Breakpoints in Chronic Myeloid Leukemia. *Genes, chromosomes and cancer* (2008).
4. N Takahashi, I Miura, K Saitoh and AB Miura. Lineage involvement of stem cells bearing the Philadelphia chromosome in Chronic Myeloid Leukemia in the chronic phase as shown by a combination of fluorescence-activated cell sorting and fluorescence in situ hybridization. *Blood* (1998)1

PO70

LA NEUTROPENIA IN ETÀ PEDIATRICA: CLINICA, DIAGNOSI E FOLLOW UP IN UNA COORTE DI 155 PAZIENTI

A. Sorlini,¹ S. Cavagnini,¹ V. Grassi,¹ F. Ricci,¹ S. Pulcini,¹ L. Porretti,² G. Savoldi,³ R. Badolato,⁴ L.D. Notarangelo,¹ F. Porta¹

¹Oncoematologia Pediatrica e TMO, Ospedale dei Bambini, Spedali Civili di Brescia, Brescia; ²Servizio di Citometria, Fondazione IRCCS Cà Grande Ospedale Maggiore, Policlinico Milano, Milano;

³Laboratorio di Genetica Pediatrica, Istituto di Medicina Molecolare, A. Nocivelli; ⁴Clinica Pediatrica, Spedali Civili Brescia, Brescia, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La neutropenia grave è una malattia rara con una frequenza pari a 1/100.000 per le forme autoimmuni e a 1/1.000.000 per le forme congenite. Le conoscenze sulla patogenesi delle diverse forme di neutropenia sono in rapida evoluzione, in particolare nell'ultima decade sono state comprese le basi molecolari di molteplici difetti congeniti e i meccanismi patogenetici alla base di alcune forme acquisite. Dal punto di vista clinico la variabilità è molto ampia: tale difetto ematologico può essere transitorio, a riscontro occasionale in pazienti asintomatici, oppure essere associato a infezioni mucocutanee recidivanti, quadri settici o far parte di complessi quadri sindromici.¹ Scopo del nostro lavoro è la descrizione clinica, diagnostica e follow up di una popolazione di pazienti pediatrici giunti alla nostra osservazione per neutropenia. Il presente lavoro si prefigge inoltre l'obiettivo di evidenziare eventuali differenze tra i vari sottogruppi dal punto di vista clinico e del follow up.

METODI: Sono stati valutati in modo retrospettivo i pazienti giunti nel periodo compreso tra il gennaio 1986 e il giugno 2012 con termine dell'osservazione clinica al 31/12/2012. La neutropenia è stata classificata in base alla conta dei neutrofilari e all'età come già riportato.² Per ciascun paziente sono stati registrati i seguenti dati: etnia, familiarità per neutropenia o autoimmunità, età di comparsa dei sintomi, tipo di infezioni, età cronologica al termine del periodo di osservazione, durata del follow up, durata della neutropenia se risolta, e accertamenti eseguiti durante il follow up. L'età è stata calcolata secondo il metodo decimale proposto da J.M Tanner. La ricerca degli anticorpi anti neutrofilari è stata effettuata su siero (test indiretto) con metodica citofluorimetrica (GIFT: Granulocyte Immunofluorescence Test). Le diagnosi sono stati effettuate in base alle Linee Guida AIEOP.² L'analisi molecolare di mutazione è stata effettuata con tecnica di amplificazione in PCR e sequenziamento genico. Per la valutazione statistica sono stati utilizzati il t-test per dati non appaiati per le variabili quantitative e il Fisher exact test per le variabili qualitative. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi per valori di $p < 0,05$.

RISULTATI: Sono stati inclusi 155 pz, 82 maschi (53%) e 73 femmine (47%); l'età mediana di esordio della neutropenia è risultata pari a 10 mesi (range 1 mese-15 anni) mentre l'età mediana al termine dello studio era di 6,8 anni (range 1,1-27,8 anni) con durata mediana di osservazione di 1 anno (range 1 mese-25 anni). Il riscontro della neutropenia è stato occasionale in 39/155 pz (25%); negli altri casi, i motivi di diagnosi (storia pregressa o ricovero) sono stati: infezione delle alte vie respiratorie (AVR) in 72 pz (46%), bronchite acuta 26 pz (17%), infezioni gastrointestinali (GI) 23 pz (15%); febbre isolata 21 pz (14%), infezioni cutanee 21 pz (14%), infezioni genito-urinarie (IVU) 14 pz (9%), broncopneumite (BPN) 12 pz (8%) mucosite 11 pz (7%), sepsi 6 pz (4%), linfadenite 5 pz (3%), sinusite 2 pz (1%). La maggior parte dei pazienti ha presentato più di un sintomo. Durante il follow up, 48 pz (31%) si sono mantenuti asintomatici. Le altre manifestazioni cliniche sono state: AVR 80 pz (52%) dei quali AVR ricorrenti 22 pz (14%), feb-

bre isolata 60 pz (39%), infezioni GI 33 pz (21%), mucositi 25 pz (16%), bronchiti 20 pz (13%), infezioni cutanee 18 pz (12%), BPN 11 pz (7%), IVU 5 pz (3%) e linfadeniti 4 pz (3%). Per quanto concerne i segni clinici di accompagnamento sono stati riscontrati: difetti cardiaci in 11 pz, albinismo in 2 pz (fratelli), verruche cutanee in 2 pz, alterazioni scheletriche 1 pz, reticolo venoso cutaneo 1 pz. La ricerca degli anticorpi anti neutrofili è stata effettuata in 123 pz (79%) ed è risultata positiva in 84 pz (68%). L'aspirato midollare è stato eseguito in 52 pz (34%) con riscontro di anomalie a carico della serie mieloidi in 31 pz (59%). L'analisi di mutazione di uno o più geni responsabili delle neutropenie congenite (per lo più mutazioni in ELANE, ricercate in 62 pz) è stata effettuata in 75 pz (48%) con riscontro positivo in 12 pz (16%). La conta neutrofila mediana all'esordio è stata pari a 500×10^6 (range 0-1570 $\times 10^6$); la risoluzione della neutropenia è avvenuta nel 51% dei pazienti con un tempo mediano di normalizzazione pari a 1,2 anni (range 1 mese-15,6 anni). Le diagnosi conclusive sono riportate in Figura 1. 15 pazienti (10%) sono risultati affetti da neutropenia congenita grave o associata a sindromi (NC). 1 pz (3%) con neutropenia congenita grave non ha al momento una diagnosi genetica. 6 pz (3%) hanno presentato un quadro ematologico più complesso (insufficienza midollare) o un'evoluzione verso malattie autoimmuni (Lupus o ALPS-like) o neutropenia associata a genodermatosi. In 5 pz (3%) la neutropenia non è stata riconfermata; in 3 pz (2%) non è stata formulata alcuna diagnosi in quanto persi al follow-up. Sono stati confrontati i gruppi più rappresentativi dal punto di vista numerico o a maggior impatto clinico: Neutropenia autoimmune (NA), Neutropenia congenita (NC) e Neutropenia idiopatica (NI). Per quanto riguarda l'età d'esordio, le forme congenite sono esordite ad un'età mediana di 0,3 anni (range 0,1-8,2 anni) e quelle autoimmuni a 0,9 anni (range 0,1-13 anni) (differenza non significativa); se confrontate con l'età d'esordio delle neutropenie idiopatiche (mediana 1,3 anni, range 0,1-14,3 anni), entrambe risultano avere un esordio più precoce in modo statisticamente significativo ($p < 0,0222$ e $p < 0,0001$, rispettivamente). In merito ai sintomi d'esordio, nel sottogruppo delle NC, sono risultate più frequenti sia le BPN sia le sinusiti rispetto agli altri gruppi. Durante il follow up i pazienti con NC hanno presentato un'incidenza significativamente superiore di alcune infezioni: in particolare di bronchite rispetto alla NI ($p = 0,0099$) e alla NA ($p = 0,0405$), di BPN rispetto alla NA ($p = 0,0005$) e alla NI ($p = 0,0033$), di linfadenopatie rispetto alla NA ($p = 0,0025$), di infezioni gastrointestinali rispetto all'NA ($p = 0,0048$) e alla NI ($p = 0,0028$), ed infine di infezioni cutanee rispetto alla NA ($p = 0,0006$) e alla NI ($p = 0,0225$). La conta neutrofila (ANC) mediana all'esordio nei pz con NC, pari 271×10^6 (range 45-616 $\times 10^6$), è risultata statisticamente inferiore sia rispetto alla ANC dei pz con NA (mediana 419×10^6 ; range 0-1340 $\times 10^6$) ($p = 0,047$) sia rispetto alla ANC dei pz con NI (mediana 625×10^6 ; range 97-1480 $\times 10^6$) ($p = 0,0048$). La percentuale di risoluzione della neutropenia nei pz con NA è stata pari al 56% mentre nei pz con NI pari al 50%. Il tempo di normalizzazione della ANC nei pazienti con NA (mediana 1,4 anni; range 1 mese-9 anni) è risultato statisticamente inferiore rispetto a quello dei pz con NI (mediana 1,8 anni; range 0,7-15,6 anni).

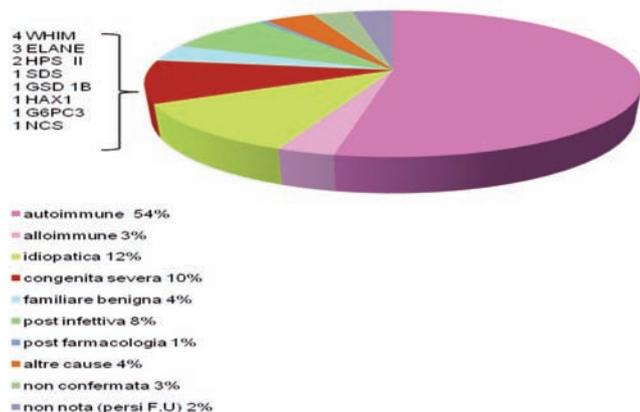


Figura 1. Diagnosi effettuate nella popolazione in studio.

CONCLUSIONI: Il nostro studio ha confermato la prevalenza delle forme di neutropenia acquisite, in particolare della neutropenia autoimmune primaria, caratterizzata da un decorso benigno e transitorio, dato avvalorato anche dall'elevato tasso di normalizzazione della ANC osservato nei pazienti studiati. La quota considerevole di pazienti con

NA inclusi nello studio, superiore anche ai pz con la forma post infettiva che è la più comune causa di neutropenia transitoria in età pediatrica, potrebbe essere attribuibile alla già avvenuta selezione dei pazienti che giungono a un centro specialistico; tale considerazione giustifica anche il significativo numero di pazienti con NC osservati. Le differenze riscontrate tra i sottogruppi analizzati indicano che l'età di comparsa, la conta neutrofila, la sintomatologia clinica presentata all'esordio e durante il follow up siano spesso suggestive e specifiche delle diverse forme di neutropenia. L'alta percentuale di pazienti sottoposti a indagini molecolari è, almeno in parte, attribuibile all'ampia durata del follow up ed alla precedente assenza di validate linee guida diagnostiche; il riscontro di positività in una percentuale bassa di pazienti suggerisce tuttavia la necessità di effettuare indagini molecolari più mirate. Infine, la considerevole percentuale di pazienti con NI risoltasi potrebbe essere imputabile alla presenza, nell'ambito di questo gruppo, di forme autoimmuni misconosciute con anticorpi anti neutrofili negativi. A nostro avviso, anche in base a segnalazioni della letteratura,³ i pazienti con neutropenia idiopatica o familiare, pur se clinicamente silenti, necessitano di un monitoraggio clinico ed ematologico di sorveglianza di una possibile evoluzione midollare.

Bibliografia:

1. Donadieu J, Fenneteau O, Beaupain B, et al. Congenital Neutropenia: diagnosis, molecular bases and patient management. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2011; 6:26.
2. Fioredda F, Calvillo M, Bonanomi S, et al. Congenital and acquired neutropenia consensus guidelines on diagnosis from the Neutropenia Committee of the Marrow Failure Syndrome Group of the AIEOP (Associazione Italiana Emato-Oncologia Pediatrica). *Pediatr Blood Cancer* 2011; 57:10-17.
3. Pasquet M, Bellané-Chantelot C, Tavitian S, et al. High frequency of GATA2 mutations in patients with mild chronic neutropenia evolving to MonoMac syndrome, myelodysplasia, and acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013 Jan 31;121(5):822-9. doi: 10.1182/blood-2012-08-447367. Epub 2012 Dec 6.

P071

QUANDO I CAPELLI FANNO LA DIFFERENZA... DIAGNOSTICA!

L. De Santis, G. Nardella, M. Foglia, E. Poli, A. Spirito, A. Ciliberti, A. Romondia, S. Ladogana

UO di OncoEmatologia Pediatrica, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG), Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Descrivere, a partire dalla storia clinica di Giuseppe, le peculiarità cliniche della Linfocitocitosi Emofagocitica e i progressi fatti dalla ricerca in questo campo per identificare i difetti genetici responsabili della patologia.

METODI: Giuseppe giunge alla nostra osservazione all'età di 2 mesi, dopo 3 ricoveri eseguiti presso altra struttura per un quadro clinico caratterizzato sempre da: iperpiressia persistente e resistente alla terapia antipiretica, senza una causa apparente, splenomegalia, pancitopenia con necessità di terapia di supporto, lieve ipertransaminasemia e aumento degli indici di flogosi. In tali occasioni, tutte le indagini laboratoristiche-strumentali volte ad individuare una possibile eziologia del quadro clinico (ecografia cerebrale e dell'addome completo, ecocardiogramma, Rx torace, esami colturali ed infettivologici) erano risultate negative. Allo striscio di sangue periferico, riscontro di linfociti attivati. Miglioramento delle condizioni cliniche e sfebbramento in seguito a terapia antibiotica ad ampio spettro, per cui il bambino era stato dimesso con diagnosi di "Sepsi da agente ignoto in lattante con Pancitopenia reattiva." Nel sospetto di un'aplasia midollare o una sindrome mielodisplastica giovanile, presso la nostra U.O. di Oncoematologia Pediatrica viene eseguito un aspirato midollare, la cui valutazione morfologica mostra note di displasia a carico della linea eritrocitaria, granulocitaria e megacariocitaria, nel complesso però normomaturanti. Visti i miglioramenti clinici ed ematologici (Hb $7,7 \times 11,1$ g/dl; Piastrine 26.000×104.000 /mcl; Neutrofili 300×900 /mcl) con reticolociti in aumento (3,29%), il piccolo viene dimesso, nonostante la persistenza dell'ipertransaminasemia (GOT 146×96 UI/L; GPT 128×192 UI/L), restando in attesa degli esami infettivologici (ricerca Parvovirus, TORCH, Monotest,...) eseguiti in corso di ricovero per definire la causa della Pancitopenia. Dopo 3 giorni dalla dimissione, il piccolo Giuseppe ripresenta però iperpiressia persistente (TC 39-40°C), associata a splenomegalia (diametro longitudinale di circa 9,5 cm all'esame

ecografico) e linfadenopatie pluridistrettuali. Gli esami ematochimici riconfermano la pancitopenia interessando le 3 linee del sangue periferico (GB 5.700/mcl, Hb 6.9 g/dl, Piastrine 39.000/mcl, N 200/mcl), con aumento della ferritina (1996 ng/ml) e dei trigliceridi (269 mg/dl). Si decide di ripetere l'aspirato midollare (Figura 1).

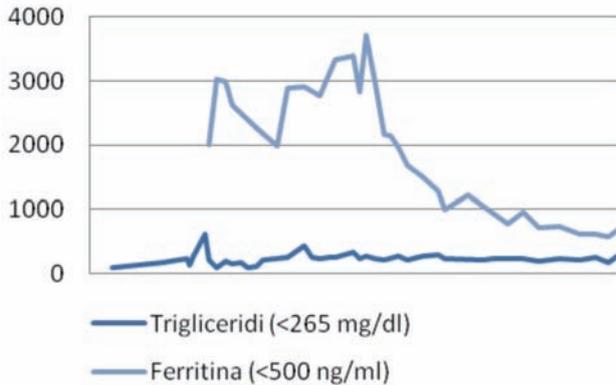


Figura 1. Variazioni di ferritina e trigliceridi in funzione dello stato di malattia.

RISULTATI: La rivalutazione morfologica dell'aspirato midollare evidenzia, rispetto all'esame eseguito in precedenza, l'espressione delle normali serie emopoietiche, con prevalenza di compartimenti più immaturi e note displastiche più marcate a carico della serie eritroblastica, ma soprattutto evidenzia cellule istiocitarie in evidente attività di EMOFAGOCITOSI. Alla luce di questo nuovo dato e in rispetto dei criteri diagnostici proposti dalla *Histiocyte Society nel Protocollo HLH 2004* (presenza di almeno 5 degli 8 criteri proposti: nel nostro caso febbre, splenomegalia, pancitopenia, ipertrigliceridemia, iperferritinemia, evidenza di emofagocitosi nell'aspirato midollare) è stata posta diagnosi di Linfocitocitosi Emofagocitica (LE) ed è stato iniziato trattamento secondo il Protocollo HLH 2004 modificato, riservandosi l'uso dell'Etoposide in caso di refrattarietà alla terapia di Induzione, vista l'età del paziente. Quindi il piccolo ha iniziato terapia con Desametasone a dosi scalari, Ciclosporina, Ig vena ad alte dosi (1 volta/settimana ogni 4 settimane), oltre ad un'adeguata terapia antibiotica ad ampio spettro con Imipenem e Teicoplanina, successivamente sostituiti con Ceftriaxone, antimicotica con Diflucan e antivirale con Zovirax (dosaggi calcolati su peso corporeo). Con l'introduzione del cortisonico e della ciclosporina, Giuseppe è sfebbrato e si è assistito ad una graduale normalizzazione dei valori dell'emocromo (GB 3.000/mcl, Hb 10.1 g/dl, PLT 212.000/mcl), dei trigliceridi, della ferritina e riduzione dell'epatosplenomegalia (milza di 7,2 cm). A questo punto, è stato necessario procedere ad una serie di indagini allo scopo di distinguere la forma primaria dalla forma secondaria di LE. Gli esami infettivologici (HHV-6 DNA, EBV DNA, CMV DNA, Herpesvirus DNA negativi; Herpes 1-2 IgM; Monotest, TORCH negativo, Parvovirus B19 DNA) e le colture (Urinocolture, coprocolture, emocolture, tampone faringeo) sono risultati negativi. Ma l'età e la storia clinica del piccolo Giuseppe orientano per una forma primitiva, per cui è stato avviato lo studio centralizzato della Linfocitocitosi Emofagocitica Familiare presso il Centro Coordinatore Italiano per la LE. Lo studio funzionale eseguito su campione periferico ha mostrato normali valori di espressione di Perforina, mentre la degranulazione linfocitaria misurata come espressione di CD107a è risultata ridotta. Difetti gravi di questo parametro sono suggestivi delle forme LEF3, LEF4 e LEF5. Le analisi di sequenza dei geni PRF, UNC13D, STX11 e STXBP non hanno mostrato mutazioni. Vista la presenza di un difetto di degranulazione, è stata approfondita l'anamnesi familiare con evidenza di un grado di parentela tra i genitori. Inoltre il piccolo presenta un deficit di pigmento con capelli biondi-argentei (Figura 2). Tali dati hanno indirizzato la ricerca di mutazione sul gene RAB27A che ha permesso di identificare le seguenti mutazioni:

- Giuseppe: omozigote per la mutazione c.514_518del (p.A173Lfs);
- Padre: eterozigote per la mutazione c.514_518del (p.A173Lfs);
- Madre: eterozigote per la mutazione c.514_518del (p.A173Lfs).

In conclusione, il quadro clinico di LE, insieme al difetto funzionale ed alle mutazioni bialleliche osservate nel gene RAB27A, hanno permesso di confermare la diagnosi di Sindrome di Griscelli di tipo 2, per cui il trattamento chemioterapico secondo Protocollo HLH 2004 segui-

ta da TCSE è considerato oggi l'unico standard terapeutico ideale e curativo. Il piccolo Giuseppe ha quindi proseguito trattamento chemioterapico secondo Protocollo HLH 2004 modificato, con un unico episodio di ricaduta caratterizzato da citopenia (GB 2.100/mcl, Hb 6.6 g/dl, Piastrine 170.000/mcl, N 100/mcl) ed epatosplenomegalia, senza febbre, in seguito a riduzione della terapia steroidea. In tale occasione, è stato posizionato catetere venoso centrale ed è stato eseguito nuovamente un aspirato midollare che ha confermato la presenza di fenomeni di emofagocitosi, seppure in netta riduzione rispetto alla precedente valutazione. Allo stato attuale, la sindrome emofagocitica di Giuseppe è in remissione completa e si è progressivamente raggiunta la dose minima di steroide che controlla la malattia con minori effetti collaterali. Il piccolo è in ottime condizioni cliniche, ed è in attesa di TCSE da donatore HLA-compatibile da banche Internazionali, in assenza di donatori familiari (il fratellino maggiore non è risultato HLA-identico ed i genitori sono entrambi portatori in eterozigosi della mutazione del gene RAB27A).



Figura 2. Capelli biondo-argentei del piccolo Giuseppe affetto da Sindrome di Griscelli di tipo 2.

CONCLUSIONI: Conoscere e riconoscere la Linfocitocitosi Emofagocitica, i criteri per porre diagnosi e i nuovi aspetti biologici, è il primo passo per diagnosticare precocemente l'emopatia. Non tutti i pazienti soddisfano i criteri diagnostici all'esordio, e questi possono presentarsi nel corso della malattia. L'assenza di un quadro istopatologico midollare compatibile con emofagocitosi all'esordio della malattia non esclude la diagnosi, ma questo va comunque ricercato con ripetuti aspirati midollari lungo il decorso della patologia o in altri organi (fegato, milza, linfonodi). In caso di forte sospetto clinico di LE, vista la rapida progressione della malattia, è consigliabile iniziare tempestivamente la terapia, per ridurre morbilità e mortalità correlate, in particolare modo l'incidenza e la gravità delle complicanze neurologiche. Per quanto riguarda la forma di LE primaria, questa può essere suddivisa in 2 condizioni: la forma familiare in cui la sindrome emofagocitica è l'unica manifestazione della malattia (LEF1-5) e quella associata a Immunodeficienze genetiche, in cui la sindrome emofagocitica è solo uno dei caratteri della malattia. Tra queste ultime, rientra la Sindrome di Griscelli tipo 2 (SG-2), una rara malattia autosomica recessiva descritta per la prima volta nel 1978, la cui caratteristica clinica distintiva è la colorazione grigio-argentea dei capelli, a volte anche di ciglia e sopracciglia, che può tuttavia essere anche estremamente sfuggente. È causata da mutazioni di RAB27A descritte oggi in più di 100 pazienti; l'omonima proteina, una GTP-asi, interagisce con Munc13-4 nella funzione delle cellule NK e LTC; il suo difetto causa incapacità dei granuli citotossici ad ancorarsi alla membrana plasmatica, mentre l'ipopigmentazione è da attribuire al difettoso rilascio dei melanosomi dai dendriti melanocitici. L'età di comparsa della LE è estremamente variabile da 2 mesi a 13 anni (con una mediana di 6 mesi). Recenti studi suggeriscono che le sequele neurologiche descritte in SG-2 sono secondarie alla LE, piuttosto che diretta conseguenza della disfunzione di RAB27A a livello del Sistema Nervoso Centrale. Questo suggerisce che una diagnosi precoce e un tempestivo trattamento potrebbe ridurre l'incidenza delle sequele (in particolare neurologiche), che non sono infrequenti nella SG-2. La diagnosi molecolare è attualmente supportata dall'esame

microscopico del capello, dove si evidenzia un accumulo irregolare di melanina localizzato principalmente nella zona midollare del fusto.

P072

EMOGLOBINA SALLANCHES: UNA RARA VARIANTE INSTABILE DELLA CATENA EMOGLOBINICA ALFA

N. Maserà,¹ P. Corti,¹ A. Piperno,² C. Arosio,² A. Brambilla,¹ A. Lazzerotti,¹ F. Peia,¹ F. Zucchetti,¹ A. Cattoni¹

¹Clinica Pediatrica; ²Consorzio di Genetica Molecolare Umana, Università Milano-Bicocca, Azienda Ospedaliera S. Gerardo, Monza (MB), Italy

INTRODUZIONE: In letteratura sono note più di 220 varianti della catena globinica alfa che determinano fenotipi variabili in relazione alla posizione della mutazione e all'alterazione della struttura della catena globinica che esse determinano. L'omozigosi per emoglobina Hb Sallanches è una delle rare forme di malattia da Hb H che condiziona instabilità dell'emoglobina manifestandosi con crisi emolitiche anche gravi. Pochi sono i casi descritti in letteratura: il primo case report si riferisce ad un paziente di origini francesi (Morlè 1995), si segnalano inoltre i casi di due famiglie Pakistane (Waye 2000; Khan 2000) mentre i restanti pazienti sono di origine indiana (Dash 2006, Roy 2009, Warang 2010). L'andamento clinico della patologia e le necessità trasfusionali sono variabili.

CASO CLINICO: Riportiamo il caso clinico di una bambina di 4 anni di origine pakistana, figlia di genitori consanguinei (cugini di primo grado). Nata a termine da parto eutocico in gravidanza normodecorsa, ha presentato sofferenza perinatale (Apgar ad 1 minuto: 3) e ha necessitato di intubazione orotracheale. In prima giornata di vita riscontro di grave anemia emolitica e moderata piastrinopenia (Hb 7,8 g/dL, PTL 76 x 10⁹/L, LDH 14501 U/L, CPK 778 U/L e AST 429 U/L) per cui la paziente è stata sottoposta a trasfusione di emazie concentrate e piastrine. In seconda giornata di vita grave ittero a bilirubina indiretta (bilirubina totale massima 21,7 mg/dL) che ha richiesto exanguinotrasfusione con rapido miglioramento clinico e normalizzazione degli indici di emolisi. La paziente è stata estubata in terza giornata di vita e non ha presentato ulteriori complicanze respiratorie. Dimessa in benessere a 2 settimane di vita con buona crasi ematica (Hb 11,8 g/dL, MCV 79,2 fl, PTL 276000/mmc), la famiglia non si è presentata ai successivi controlli programmati per ulteriori approfondimenti e ha soggiornato per diversi mesi in Pakistan. A 45 mesi di vita per comparsa di grave anemia emolitica in corso di febbre (Hb 6,4 g/dL, MCV 81,8 fL, reticolociti 50,9 x 10⁴/μL, LDH 3250 U/L, bilirubina totale 2,90 mg/dL, bilirubina indiretta 2 mg/dL) e modesta splenomegalia (milza palpabile a 2 cm dall'arcata costale) la paziente ha effettuato nuova emotrasfusione. I test di Coombs diretto e indiretto sono risultati negativi; la morfologia eritrocitaria e il tracciato cromatografico hanno evidenziato un quadro suggestivo per emoglobinopatia da Hb H, senza evidenza di emoglobine patologiche. Il dosaggio dell'attività del G6PDH, lo studio delle resistenze osmotiche, il test di lisi al glicerolo ed il Pink test, oltre alle sierologie virali (Citomegalovirus, Epstein Barr virus, Parvovirus) e alla ricerca del parassita malarico, sono risultati negativi. Si riscontrava una crescita staturo-ponderale al 3° percentile, regolare lungo la curva di crescita. A distanza di 2 mesi da tale evento, la bambina ha presentato sempre in corso di febbre (tampone nasofaringeo positivo per influenza B) un nuovo episodio di emolisi (Hb 6,0 g/dL, MCV 78,4 fL, reticolociti 12% LDH 1888 U/L) che ha necessitato nuovamente di trasfusione di emazie concentrate per lo scadimento delle condizioni generali. L'analisi molecolare dei geni delle catene emoglobiniche ha evidenziato omozigosi per l'emoglobina Sallanches. La bambina si presenta attualmente in buone condizioni generali, con obiettività generale negativa eccetto per polo splenico palpabile a circa 1 cm dall'arcata costale. È seguita con cadenza mensile, salvo comparsa di sintomatologia. Si valuterà nei prossimi mesi l'eventuale necessità di un regime trasfusionale cronico in base all'andamento della malattia (all'ultimo emocromo Hb 8,2 g/dL, MCV 77,7 fL, reticolociti 57,85 x 10⁴/μL). Assume terapia di supporto con acido folico e profilassi antibiotica con amoxicillina orale per ridurre gli eventi infettivi. Adeguate raccomandazioni per evitare alimenti o farmaci e sostanze pro-ossidanti sono state fornite alla famiglia. Risultano tuttora in corso accertamenti dei familiari per una corretta consulenza genetica.

CONCLUSIONI: L'emoglobina di Sallanches è una rara variante instabile della catena emoglobinica alfa che condiziona un quadro di moderata anemia cronica (fenotipicamente con un quadro simile alla malattia da HbH) che si complica con crisi emolitiche acute anche gravi in concomitanza ad eventi di stress ossidativo (malessere, febbre,

assunzione di farmaci/sostanze/fave) come osservato nella nostra paziente. In letteratura sono descritti pochi casi pediatrici di omozigosi per emoglobina di Sallanches: di questi i pazienti di origine pakistana presentano quadri di anemia severa trasfusione dipendenti, mentre nei pazienti indiani sono descritte crisi emolitiche sporadiche (Warang 2010). Vista la rarità di questa patologia e la scarsità di informazioni presenti in letteratura, sarà importante valutare l'andamento della paziente nel tempo; è auspicabile una raccolta sistematica dei casi segnalati che permetta di avere un quadro più completo dello spettro clinico di tale patologia ancora poco conosciuta.

Bibliografia:

- “Hb H disease due to homozygosity for a rare α 2globulin variant, Hb Sallanches”. Warang P et al. Hemoglobin (2010); 34 (1): 45-48.
- “Hb Sallanches [α G11]Cys->Tyr, TGC->TAC (α 2)]: an unstable hemoglobin variant found in an indian child”. Dash S et al. Hemoglobin (2006); 30 (3): 393-396.
- “Homozygous Hb Sallanches [α 104(G11)Cys->Tyr] in a Pakistani Child With Hb H Disease”. Waye JS et al. Hemoglobin (2000); 24 (4): 355-357.
- “Hb Sallanches [α 104(G11)Cys->Tyr]: a rare α 2globin Chain Variant found in the Homozygous state in three members of a Pakistani family”. Khan SN et al. Hemoglobin (2000); 24 (1): 31-35.
- “A new α chain variant Hb Sallanches [α ,104(G11)Cys->Tyr] associated with Hb H disease in one homozygous patient”. Morlè F et al. Br J Haematol (1995); 91 (3): 608-611.

P073

VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITÀ SPLENICA MEDIANTE SCINTIGRAFIA NEI BAMBINI CON SICKLE CELL DISEASE (SCD)

V. Munaretto,¹ M. Pinton,² M. Pierobon,¹ R. Colombatti,¹ G. Basso,¹ L. Sainati,¹ P. Zucchetta²

¹Azienda Ospedaliera-Università di Padova, Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino, Clinica di Onco-Ematologia Pediatrica, Padova; ²Azienda Ospedaliera-Università di Padova, UOC Medicina Nucleare, Padova, Italy

RAZIONALE ED OBIETTIVI: La milza è uno dei primi organi ad essere interessati dal processo patologico nei pazienti con Sickle Cell Disease (SCD). Spesso già in epoca precoce si può assistere ad iposplenismo e/o asplenia funzionale. Questo processo è più frequente e precoce nei pazienti SS, più raro negli S β , più tardivo negli SC.^{1,2} I pazienti sono esposti ad infezioni batteriche, in particolare a quelle sostenute da batteri capsulati; nei primi anni di vita sono inoltre a rischio di sequestro splenico, evento potenzialmente mortale e con elevato rischio di recidiva. La scintigrafia splenica consente lo studio della funzionalità, in particolare della funzione fagocitica reticolo-endoteliale e potrebbe costituire uno strumento utile per valutare opportunità e tempistica di un'eventuale splenectomia, qualora ce ne fosse indicazione. Tuttavia, sono scarse le evidenze pubblicate in letteratura sul suo impiego nei pazienti con SCD, specialmente nei bambini.^{3,4,5} Inoltre, le metodiche di valutazione sino ad ora proposte sono essenzialmente qualitative e quindi legate ad una lettura soggettiva delle immagini scintigrafiche. Il nostro progetto si propone di valutare, in maniera sistematica e prospettica, la funzionalità splenica mediante scintigrafia in tutti i bambini con SCD seguiti presso il nostro Centro a partire dall'anno e mezzo di età, con lo scopo di: (1) definire la prevalenza delle modifiche morfo-funzionali della milza nella nostra popolazione ed integrare i risultati funzionali con i dati clinici, ematochimici ed ecografici; (2) stratificare i pazienti con iposplenismo mediante un indice di funzione semiquantitativo che permetta di seguire nel tempo questi pazienti (3) disporre di uno strumento aggiuntivo per valutare l'indicazione alla splenectomia nei bambini affetti da SCD con situazioni a rischio (ad esempio pregresso sequestro splenico); (4) considerare l'eventuale inserimento della scintigrafia splenica in un più ampio programma di screening per la valutazione delle complicanze d'organo.

METODI: Sono reclutati tutti i bambini con SCD seguiti presso la Clinica di Emato-Oncologia Pediatrica da gennaio a dicembre 2013 con:

- Diagnosi confermata di HbSS, HbS β , HbSC;
 - Età 1.5-18 anni;
 - In steady-state (assenza di trasfusioni per evento acuto o episodi di ACS o VOC nelle 4 settimane precedenti).
- La funzionalità splenica è valutata mediante scintigrafia con collo-

di marcati con ^{99m}Tc , particelle radiomarcate che sono rapidamente fagocitate dal sistema retico-endoteliale di fegato, milza e midollo osseo. La dose somministrata è calcolata in base al peso corporeo del bambino in accordo alle raccomandazioni del D. Lgs 187/2000, facendo anche riferimento alle tabelle più recenti messe a punto dall'EAMN (2008). Dopo circa 15 minuti dalla somministrazione e.v. del radiofarmaco vengono acquisite immagini planari (matrice 256x256, zoom adeguato alla corporatura del paziente, impostato per avere nel campo di vista il fegato e la milza) in proiezione anteriore, posteriore, obliqua anteriore sinistra, obliqua posteriore sinistra. Vengono inoltre ottenute immagini tomografiche con tecnica SPET/TC (gamma-camera a due teste, collimatore ad alta risoluzione, matrice 128x128, 60 proiezioni per testa di 30"l'una) quando il paziente è in grado di mantenere spontaneamente la necessaria immobilità. La valutazione dell'esame scintigrafico è effettuata mediante analisi qualitativa e semi-quantitativa. Nell'analisi qualitativa le immagini sono analizzate visivamente, valutando la differenza di captazione delle particelle radiomarcate tra fegato e milza. L'entità della captazione splenica rispetto al parenchima epatico è quindi classificata con scala ordinale in: normale (grado 4 e 3), lievemente ridotta (grado 2), marcatamente ridotta (grado 1) e assente (grado 0).⁶ Per l'analisi semiquantitativa sono state calcolate le percentuali di captazione assolute e le percentuali di captazione normalizzate, corrette per le dimensioni dell'organo, nelle sole proiezioni posteriori (Capt-ass-post e Capt-corr-post) e le medie geometriche fra proiezione anteriore e posteriore (Capt-ass-geom e Capt-corr-geom). La tecnica SPET/TC è impiegata per valutare l'omogeneità di captazione del parenchima splenico.

I dati di funzionalità splenica sono confrontati con:

- dati demografici: età, etnia, genotipo;
- parametri clinici: peso, altezza, satO₂, dimensione della milza in cm dall'arcata costale se palpabile, precedenti ricoveri ed episodi clinici.
- esami ematochimici: emocromo, reticolociti, LDH, AST, ALT, urea, creatinina, bilirubina totale e frazionata, ferritina;
- assetto emoglobinico;
- presenza di corpi di Howell Jolly (HJ) e Pitted erythrocyte (PIT) allo striscio periferico;
- dati ecografici;
- velocità del flusso cerebrale al TCD (criteri STOP);

RISULTATI: I bambini che fino ad ora hanno eseguito la scintigrafia splenica sono 10: 6 maschi e 4 femmine. Nove bambini sono immigrati africani (prevalentemente da Nigeria) e uno è di origine albanese. Età mediana 4,4 anni (range 1.6- 9.4); 8 bambini sono HbSS, 1 HbSC e 1 HbS β^0 . Tutti i bambini, all'analisi qualitativa delle immagini scintigrafiche, presentano iposplenismo; in particolare nel 60% la captazione è marcatamente ridotta (grado 1) e nel 40% la captazione è assente (grado 0). Le caratteristiche dei due gruppi di bambini sono illustrate in Tabella 1. Dal confronto della funzionalità splenica con i parametri clinici, emato-chimici, strumentali emerge come i bambini con funzionalità splenica assente (gruppo 2), più grandi, presentino un maggior numero di eventi clinici quali ricoveri, episodi febbrili, crisi vaso-occlusive e crisi emolitiche; tuttavia le crisi aplastiche e i sequestri splenici sono più frequenti nei bambini con funzionalità marcatamente ridotta (gruppo 1). All'esame obiettivo, la milza era palpabile nel 100% dei bambini del gruppo 1 con una distanza media in cm dall'arcata costale pari a 4 ma in nessun bambino con funzionalità assente. Nella Tabella 2 sono posti a confronto i dati emato-chimici nei due gruppi di pazienti. Solo un bambino, appartenente al gruppo 2, ha TCD alterato. È tuttavia necessario un campione più ampio per poter effettuare un'analisi statistica tra le variabili considerate e trarre delle conclusioni sulle relazioni presenti.

L'analisi semiquantitativa delle immagini scintigrafiche ha mostrato: valori di captazione assoluta inferiori rispetto ai valori normalizzati per le dimensioni dell'organo in entrambi i gruppi di pazienti e medie geometriche fra proiezione anteriore e posteriore inferiori rispetto ai valori di captazione nelle sole proiezioni posteriori. Se si considerano i risultati dell'analisi qualitativa e i valori semiquantitativi di ciascun paziente sembra che i valori più idonei a stratificare i pazienti in categorie siano le percentuali di Capt ass geom. La media dei valori di Capt ass geom nei pazienti con funzionalità marcatamente ridotta è pari al 13% mentre nei pazienti con funzionalità assente scende al 3%.

CONCLUSIONI: Abbiamo documentato un'elevata prevalenza di iposplenismo nei bambini con SCD già dai primi anni di vita; in molti pazienti già a partire dai 2 anni d'età si riscontra una marcata riduzione della funzionalità splenica valutabile mediante scintigrafia epato-splenica. Dal confronto tra i risultati funzionali e i parametri clinici, emato-chimici e strumentali emerge il ruolo chiave della scintigrafia, metodica

attualmente poco impiegata nella SCD, nella precisa definizione della compromissione della milza. Ruolo che potrebbe essere clinicamente rilevante nell'indicazione alla splenectomia. In questo piccolo gruppo pilota sembra che l'indice di captazione assoluto correli meglio con l'andamento clinico della patologia.

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti con marcata riduzione della funzionalità splenica (Gruppo 1) e dei pazienti con funzionalità assente (Gruppo 2).

	Gruppo 1	Gruppo 2
No. (N=10) (%)	6 (60%)	4 (40%)
Età, anni (mediana)	2,9	8,3
Sesso, (% maschi)	4/6 (66%)	2/4 (50%)
Genotipo		
HbSS, (N=8)	4/8	4/8
HbSC, (N=1)	1/1	
HbS 0, (N=1)	1/1	
Terapia (N=6)		
Idrossiurea, (N=2)		2/2
Trasfusione/Eritrocitoferesi (N=4)	2/2	2/2

Tabella 2. Confronto dei parametri emato-chimici tra i pazienti con riduzione marcata della funzionalità splenica (Gruppo 1) e i pazienti con funzionalità assente (Gruppo 2).

Esami ematochimici	Gruppo 1	Gruppo 2
Hb (g/dL)	8,2	8,9
Htc (%)	25,1	26
Rdw	22,8	20,3
Hb F, %	13,9	7,3
HbS, %	55	60,1
Globuli bianchi x10 ⁹ /L	10,05	12,95
Neutri x10 ⁹ /L	3,76	6,7
Linfociti x10 ⁹ /L	4,53	2,45
Monociti x10 ⁹ /L	1,03	1,37
PtI	171833	416500
Reticolociti	319200	240500
Ferritina	277,8	883,3
AST	60	56,2
ALT	21,6	20,2
LDH	1453	1199
Bilirubina tot	44,9	30,3
Bilirubina non coniugata	38	24,7
Bilirubina coniugata	6,8	5,6
Urea	3,2	3,5
Creatinina	24,3	32,2

Bibliografia:

1. Lammers AJJ, de Porto A et al, Hyposplenism: *Comparison of different methods for determining splenic function*, AM J Hematol. 87:484-489, 2012.
2. Ballas SK, Lief S et al, *Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease*. Am J Hematol 85(1): 6-13, 2010.
3. Rogers Z, Wang WC et al, *Biomarkers of splenic function in infants with sickle cell anemia: baseline data from the BABY HUG trial*, Blood 117: 2614-2617, 2011.
4. Mc Carville MB, Luo Z et al., *Abdominal Ultrasound with scintigraphic and clinical correlates in infants with Sickle Cell Anemia: baselin data from the BABY HUG trial*, AJR 196:1399-1404, 2011.
5. Ali H, Al Jam'a et al, *Splenic function in Sickle Cell anemia Patients in Quatif, Saudi Arabia*, AM J Hematol 63:68-73,2000.

P074

IMPATTO DI UN CORSO DI FORMAZIONE PER L'ESECUZIONE DEL DOPPLER TRANSCRANICO (TCD) NELLA DREPANOCITOSI: ESPERIENZA DEL CENTRO DI PADOVA

M. Pierobon,¹ R. Colombatti,¹ P. Rampazzo,² V. Munaretto,¹ G. Basso,¹ M. Ermani,² L. Sainati¹

¹Azienda Ospedaliera-Università di Padova, Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino, Clinica di Onco-Ematologia Pediatrica, Padova; ²Azienda Ospedaliera-Università di Padova, Dipartimento di Neuroscienze, Clinica Neurologica, Padova, Italy

RAZIONALE ED OBIETTIVI: La prevenzione dell'ictus mediante screening con Doppler Transcranico (TCD) è una delle raccomandazioni principali nella gestione della malattia drepanocitica (SCD) in età pediatrica. Lo studio STOP¹ ha definito e standardizzato il protocollo diagnostico e le categorie di rischio in base ai valori delle velocità ematiche ottenuti tramite TCD cieco a livello delle arterie cerebrali medie (ACM) e del tratto terminale delle arterie carotidi interne (dICA). Più recentemente, il TCDi (TCD imaging o TCCS), è stato utilizzato nello screening dello stroke, con soglie di velocità inferiori rispetto al TCD per la definizione delle categorie di rischio. Il TCDi è più comunemente utilizzato in Neurosonologia, più preciso per la diretta visualizzazione anatomica dei vasi intracerebrali e di più facile apprendimento; questa metodica, tuttavia, non è ancora stata validata come alternativa al TCD cieco che rimane, a tutt'oggi, il gold standard nello screening dello stroke nei pazienti con drepanocitosi. Attualmente meno del 50% dei pazienti con SCD in USA e nel Regno Unito sono inseriti in un programma di screening adeguato per la mancanza di tecnici specializzati nelle cliniche di riferimento per la patologia, nonostante le raccomandazioni internazionali. La necessità di disporre di personale qualificato per l'esecuzione di TCD e TCDi, soprattutto in paesi in cui la drepanocitosi è un problema di nuova e rapida insorgenza come l'Italia, è di primaria importanza. Lo studio SCATES è un trial prospettico, non randomizzato, non terapeutico, multicentrico, internazionale, che ha come obiettivo di fornire le abilità di esecuzione del TCD e TCDi attraverso un programma di formazione. L'obiettivo del nostro studio è determinare l'efficacia di un training formativo breve, nel migliorare le capacità di esecuzione ed interpretazione dei dati del TCD/TCDi nei pazienti pediatrici con SCD del Centro di Oncoematologia di Padova ed implementare la diffusione dello screening del rischio di stroke nei bambini del Centro stesso.

METODI E RISULTATI: 70 pazienti (F 37, 52,8%; M 33, 47,2%), età mediana di 7,6 anni (range tra 2 e 16 anni) con genotipo HbSS 78,5%, HbSC 14,3%, HbSbetatalassemia⁰ 7,2%, sono stati valutati con TCD e TCDi prima e dopo un corso di formazione breve eseguito nel 2009. I TCD e TCDi eseguiti negli anni precedenti il training e quelli eseguiti negli anni successivi sono stati confrontati. Le TAMMv (Time Average Mean of the Maximum) a livello delle ACM erano 170,3 cm/s (SD 66.19) pre-training e 117,7 cm/s (SD 32.43) post-training (p-value 0,0003), dimostrando una riduzione non solo nel valore medio ma anche nelle SD, riflettendo una maggiore abilità tecnica. I valori del TCD hanno dimostrato una differenza significativa nella distribuzione all'interno delle categorie STOP prima e dopo il training (p-value 0,002). Le TAMMv a livello delle ACM erano 136.25 cm/s (SD 32,46) pre-training e 115.46 (SD 25.65) post training (p-value 0.002). Prima del training i pazienti venivano valutati con TCD e TCDi solo a livello delle ACM, la maggior parte degli esami risultavano quindi parziali.

CONCLUSIONI: Il nostro studio ha dimostrato l'efficacia del training breve per l'uso del doppler transcranico nello screening dello stroke nei pazienti affetti da drepanocitosi secondo il protocollo STOP nel nostro Centro. Nella nostra esperienza il training ha apportato un miglioramento rilevante nell'utilizzo delle due metodiche, ha permesso di ottenere valutazioni più complete e corrette e ha aumentato il numero di pazienti sottoposti allo screening.

Bibliografia:

- Adams R.J., McKie V.C., Hsu L., Files B., Vichinsky E., Pegelow C., et al.: "Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on Transcranial Doppler ultrasonography." - *N Eng J Med* 1998; 339(1): 5-11.

P075

IMPIEGO DEL PICC IN EMATOLOGIA PEDIATRICA: UN'ESPERIENZA MONOCENTRICA

A. De Vellis, M. Rea, A. Guerriero, S.G. Morano, P. Berneschi, T. Ceglie, M. D'Angiò, D. Marzella, A. Rosati, F. Giona, A.M. Testi, M.L. Moleti

Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università "Sapienza", Roma, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La presenza di un accesso venoso centrale è fondamentale in oncoematologia pediatrica, in quanto la necessità di ripetute venipunture per esami ematochimici e la somministrazione delle terapie rappresenta spesso un momento doloroso per i bambini. L'accesso venoso centrale riduce lo stress associato al dolore da venipuntura e riduce l'incidenza di lesioni conseguenti allo stravasamento di farmaci vescicanti. Il CVC (Central venous Catheter) rappresenta un'ottima opzione per l'impiego a medio e lungo termine, ma può essere associato a complicanze sia precoci (pneumotorace, ematoma) che tardive (infettive, trombotiche). Nei bambini richiede quasi sempre una procedura chirurgica per il suo impianto, un ricovero in ambiente specialistico e un'anestesia generale con notevole incremento dei costi. Il PICC (Peripherally Inserted Central Venous Catheters) è un catetere che viene inserito per via percutanea tramite tecnica eco-guidata attraverso una vena periferica del braccio (basilica o brachiale). Il dispositivo viene fissato attraverso un sistema di fissaggio adesivo (Stat lock) senza l'impiego di punti di sutura. Può essere utilizzato per lunghi periodi (tempo di permanenza fino a 12 mesi) e il suo inserimento, così come la sua rimozione, sono semplici e non richiedono procedure chirurgiche. È costituito da materiale bio-compatibile, generalmente poliuretano o silicone. Presentiamo l'esperienza effettuata presso la U.O.S. di Ematologia Pediatrica del Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia dell'Università "Sapienza" dove abbiamo iniziato ad utilizzare il PICC nei bambini e adolescenti affetti da patologie ematologiche neoplastiche e non neoplastiche.

METODI: Sono stati raccolti e analizzati prospetticamente i dati clinici e i dati relativi al posizionamento, alle complicanze e alla durata in sede di tutti i dispositivi PICC inseriti ai pazienti afferenti alla U.O.S. di Ematologia Pediatrica. I PICC utilizzati sono stati: PICC 4 Fr Groshong monolume e Power Groshong PICC 4 Fr monolume Bard Access System, Salt Lake City, UT, USA che sono stati impiegati per la somministrazione di fluidi, farmaci chemioterapici, antibiotici, emoderivati e per il prelievo di sangue venoso. Il posizionamento è stato effettuato all'interno della sala operatoria dell'Ematologia, da un team dedicato formato da un medico ematologo e da quattro infermieri. Il corretto posizionamento dell'estremità distale del dispositivo è stato confermato radiologicamente. Per ogni PICC inserito il team infermieristico ha compilato una scheda relativa a dati clinici e complicanze osservate, in relazione alla quale sono stati programmati gli interventi di medicazione e sorveglianza infettiva.

RISULTATI: Da settembre 2009 a febbraio 2013 sono stati posizionati 70 PICC in 54 pazienti, 26 maschi e 28 femmine, di età mediana di 12 anni (range 3-22 anni). Ventisette pazienti (50%) erano affetti da leucemia acuta linfocitica; 8 (15%) da leucemia acuta mieloide; 11 (20%) da linfoma di Hodgkin; 4 (7%) da linfoma non Hodgkin e 4 (7%) da altre patologie ematologiche (1 da emofilia A grave, 1 da drepanocitosi, 1 da aplasia midollare grave, 1 da mielodisplasia). Dei 70 PICC, 65 sono stati inseriti in pazienti affetti da patologie oncoematologiche in diverse fasi di malattia: 38 (58%) all'esordio; 4 (6%) in remissione; 13 (20%) in recidiva; 5 (8%) pre-autotrapianto, 4 (6%) pre-allotrapianto; 1 (1%) in fase avanzata. Il PICC è stato inserito con successo in tutti i 70 casi, 48 (68%) durante il ricovero ordinario e 22 (32%) in regime di day hospital. La procedura è stata eseguita con sola anestesia locale in 24 (34%) casi (età mediana 15 anni). La sedazione profonda è stata necessaria in 46 (66%) casi, di cui 16 (23%) per la sola inserzione del PICC (età mediana 6.5 anni) e 30 (43%) per la concomitanza di altre manovre invasive (età mediana 11 anni). Non si sono verificate complicanze immediate dovute alla manovra di impianto. Il numero totale di giorni di permanenza dei 70 PICC è stato di 8339, con una mediana per paziente di 102 giorni (range 13-437 giorni). Si sono verificate le seguenti complicanze: 9 infezioni PICC correlate (1/1000 giorni-PICC); 3 (4%) trombosi (0,36/1000 giorni-PICC) con un intervallo di tempo tra il posizionamento e la comparsa di trombosi rispettivamente di 4, 5 e 16 giorni. Si trattava di due pazienti con linfoma di Hodgkin all'esordio con massa mediastinica e di una leucemia acuta mieloide in recidiva. Le cause di rimozione del PICC sono state: cessata indicazio-

ne all'accesso venoso 22 (31%); infezione 9 (13%), complicanze meccaniche (dislocazione, malfunzionamento, ostruzione e rottura) 8 (11%). Sei pazienti (9%) sono deceduti senza rimuovere il dispositivo e, attualmente, 25 PICC sono ancora in situ.

CONCLUSIONI: La disponibilità di un accesso venoso centrale è fondamentale nei pazienti affetti da patologie oncoematologiche in età pediatrica. Nella nostra esperienza il PICC è stato impiegato con sempre maggiore frequenza anche in bambini piccoli (fino a 3 anni di età). Il posizionamento eco-guidato in vena periferica ha eliminato le complicanze correlate alla manovra di impianto rispetto ai CVC "tradizionali" con una riduzione dei costi legata alla possibilità di eseguire la manovra in regime di day hospital e senza l'obbligo della sedazione. Le complicanze infettive, trombotiche e meccaniche osservate, sono risultate paragonabili a quelle riportate in letteratura per i PICC (rispettivamente 1/1000 giorni PICC vs 0,42-8/1000 giorni PICC; 0,36/1000 giorni PICC vs 0,25-2,8/1000 giorni PICC; 0,96/1000 giorni PICC vs 1,27-1,99/1000 giorni PICC). Rispetto ai CVC "tradizionali" abbiamo riscontrato una incidenza di complicanze infettive sovrapponibile (1/1000 giorni PICC vs 1,4-1,9/1000 giorni catetere) e una incidenza di trombosi pari a 0,36/1000 giorni PICC vs 0,022/1000 giorni catetere. Il PICC è stato utilizzato fino alla cessazione dell'indicazione nel 62% dei casi valutabili. La nostra esperienza sull'impiego del PICC in pazienti di età pediatrica affetti da patologie ematologiche (neoplastiche e non neoplastiche) dimostra come tale dispositivo sia efficace, sicuro e associato ad un basso rischio di complicanze sia precoci che tardive. Il PICC è stato accettato con soddisfazione sia da parte dei pazienti che dei loro familiari.

Bibliografia:

- Sarfraz A, Gauri K. Peripherally inserted central venous catheters are a good option for prolonged venous access in children with cancer. *Pediatr Blood Cancer* 2008;51:251-255
- Hatakeyama N, Hori T, Yamamoto M, Mizue N, Inazawa N, Igrashi K, Tsutsumi H, Suzuki N. An evaluation of peripherally inserted central venous catheters for children with cancer requiring long-term venous access. *Int J Hematol* 2011;94:372-377
- Maki DG, Kluger DM, Crnich CJ. The risk of bloodstream infection in adults with different intravascular devices: a systematic review of 200 published prospective studies. *Mayo Clin Proc* 2006;81:1151-1152
- Levy I, Bendet M, Samra Z, Shalit I, Katz J. Infectious complications of peripherally inserted central venous catheters in children. *The pediatric infectious disease journal* 2010;29:426-429
- Matsuzakj A, Suminoe A, Koga Y, Hatano M, Hattori S, Hara T. Long-term use of peripherally inserted central venous catheters for cancer chemotherapy in children. *Support Care Cancer* 2006;14:153-160
- Dubois J, Rypens F, Garel L, avid M, Lacroix J, Gauvin F. Incidence of deep vein thrombosis related to peripherally inserted central catheters in children and adolescents. *CMAJ* 2007;177(10):1185-90
- Gasior AC, Marti Knott E, St Peter SD. Management of peripherally inserted central catheters associated deep vein thrombosis in children. *Pediatr Surg Int* 2013. Published online: 23 January 2013
- Shen G, Gao Y, Wang Y, Mao B, Wang X. Survey of the long-term use of peripherally inserted central venous catheters in children with cancer. Experience in a developing Country. *J Pediatr Hematol Oncol* 2009;31:489-92
- Gallieni M, Pittiruti M, Biffi R. Vascular access in oncology patients. *CA Cancer J Clin* 2008;58:323-346
- Cecinati V, Brescia L, Tagliaferri L, Giordano P. Catheter-related infections in patients with cancer. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:2869-2877

P076

QUANDO L'OSSO DIVENTA BERSAGLIO PRIMARIO DELLA DREPANOCITOSI

F. Zucchetti, A. Cattoni, A. Brambilla, P. Corti, N. Masera
Clinica Pediatrica Università Milano-Bicocca, Fondazione MBBM, Ospedale San Gerardo Monza, Monza, Italy

INTRODUZIONE: Il tessuto osseo è frequentemente sede di complicanza nella drepanocitosi (SCD). La falcizzazione delle emazie e le lesioni ischemiche che ne derivano possono colpire direttamente lo scheletro, esitando in eventi dolorosi acuti, ma potendo anche evolvere in infarto osseo conclamato. D'altro canto, quando la vaso-occlusione colpisce i vasi mesenterici, non è infrequente la disseminazione emato-

gena di agenti microbici enterici (prevalentemente *Salmonellae non typhi*) e la loro secondaria localizzazione a livello osseo, esitando in quadri di osteomielite (prevalenza dal 12 al 17%); in una quota minore dei casi, tale complicanza può essere imputabile allo *Stafilococcus aureus*. In caso di osteomielite, non esiste generale consenso né sulla scelta dell'antibiotico, né sulla durata della terapia. Un trattamento antimicrobico sub-ottimale può esitare nella cronicizzazione delle lesioni settiche, con potenziali severi esiti morfo-funzionali a distanza.

CASO: Riportiamo il caso clinico di un bambino di 5 anni ghanese, nato da genitori non consanguinei. A 10 mesi di vita, in seguito a numerose crisi dolorose ed episodi di dattilite, è stata posta diagnosi di SCD presso il centro medico di Accra, in Ghana. È stata quindi intrapresa profilassi con Penicillina V e acido folico, mantenendo dei livelli di emoglobina compresi tra 6,5 e 7 g/dL. All'età di 21 mesi, il paziente è stato ricoverato presso lo stesso centro per comparsa di febbre da più di due settimane, dolore e tumefazione a carico delle mani e degli arti inferiori. Un esame emocromocitometrico eseguito all'ingresso ha evidenziato anemia severa (Hb=5,2 g/dL) e leucocitosi neutrofila (GB=34.000/mmc, N=70%). In considerazione di tale dato e della clinica, oltre ad una trasfusione di globuli rossi concentrati (GRC), è stata eseguita una radiografia degli arti inferiori, con riscontro bilaterale di multiple lesioni litiche, ridotta densità ossea ed aree di rigenerazione focale, quadro compatibile con una diagnosi di osteomielite cronica (Figura 1). Il paziente è stato quindi posto in terapia con ciprofloxacina, clindamicina e cefpodoxima per la durata complessiva di 2 settimane. È stato applicato inoltre un apparecchio gessato al fine di prevenire fratture patologiche. Il paziente è stato quindi dimesso con indicazione ad eseguire studi radiografici di controllo, per valutare la rigenerazione ossea e la comparsa di eventuali sequestri. Due mesi dopo, appena arrivato in Italia, è giunto presso il nostro Centro. Per il persistere della sintomatologia dolorosa e dei segni di flogosi a carico degli arti superiori e inferiori, sono state eseguite radiografie mirate dei segmenti ossei interessati che hanno confermato la presenza di plurime aree litiche a carico delle prime due dita del piede destro e dell'omero destro, e importanti reazioni periostali a livello di omero sinistro e diffusamente degli arti inferiori. La scintigrafia ossea trifasica total body con ^{99m}Tc-Metilbifosfonati ha confermato tali reperti (Figura 2), evidenziando una diffusa iperfissazione del tracciante a livello di omero sinistro, radio destro e delle tibie; tale quadro era riferibile a fenomeni di iperostosi ed ascrivibile a una malattia osteomielitica in fase attiva e in rapida progressione. Al fine di controllare il quadro infettivo e di limitare gli esiti a lungo termine, il bambino è stato posto in trattamento con levofloxacina (23mg/kg/die), clindamicina (20mg/kg/die in 3 dosi) e cefpodoxima (7mg/kg/die in 2 dosi) per 6 mesi. È stato impostato inoltre regime trasfusionale cronico (trasfusioni di 5-8 ml/kg di GRC, ogni 4 settimane) sino a risoluzione del quadro infettivo, al fine di mantenere i livelli pretrasfusionali di HbS inferiori al 40% e facilitare la guarigione dell'osso. L'efficacia del trattamento impostato è stata evidenziata già dalle prime radiografie di controllo eseguite a 6 settimane (riduzione delle aree di osteolisi e della reazione periostale) e confermata dalle successive immagini (esiti di osteomielite a carico di tutte le sedi citate). Tenendo conto del desiderio espresso dalla famiglia di fare stabilmente ritorno in Ghana, è stato intrapreso trattamento con Idrossiurea (15 mg/kg/die) al fine di sospendere progressivamente il regime trasfusionale cronico (interrotto definitivamente nel Luglio 2010, dopo 6 mesi dal suo inizio). Nell'ottobre dello stesso anno, tuttavia, il bambino è stato nuovamente ricoverato per crisi dolorosa a carico dell'arto inferiore sinistro (sede non precedentemente coinvolta da processo infettivo di osteomielite), verosimilmente secondaria a disidratazione in corso di gastroenterite acuta. Data la negatività dell'esame radiografico mirato eseguito durante la degenza, a dispetto di una clinica suggestiva per complicanza ossea acuta, si è deciso di effettuare una risonanza magnetica degli arti inferiori e del bacino, estendendo lo studio alle sedi precedentemente interessate da osteomielite e mai indagate prima in quanto facilmente studiabili con radiologia convenzionale, in assenza di sedazione. L'esame ha documentato, in corrispondenza del terzo diafisario distale del femore sinistro, un'area ovoidale di circa 16x8mm, isointensa e circoscritta da linea serpigginosa a basso segnale in T1 e iperintensa in T2, compatibile con infarto osseo. È stata inoltre evidenziata una diffusa disomogeneità di segnale iperintensa in T2, estesa a tutta la diafisi tibiale omolaterale e al terzo diafisario prossimale di entrambe le tibie da riferire ad edema della spongiosa ossea e di non univoca interpretazione ma verosimilmente riconducibili ad esiti dei processi di osteomielite cronica. La nuova lesione non è risultata compatibile con recidiva del precedente processo infettivo, ma su base ischemico-infartuale. Vista l'apparente inefficacia della terapia con Idrossiurea nel prevenire l'instaurarsi di lesioni infartuate ossee, si è ritenuto necessario riprendere il

regime di trasfusioni croniche (8 ml di GRC pro kg di peso corporeo), precedute da salasso se $Hb > 9$ g/dL (impossibile l'esecuzione di eritrocitoferesi periodiche vista la difficoltà a reperire accessi venosi adeguati). Questa scelta terapeutica ha indotto i genitori ad abbandonare l'idea di un ritorno nel Paese d'origine, essendo la terapia trasfusionale scarsamente praticabile e sicura in Ghana. In accordo con lo specialista ortopedico, è stato intrapreso un follow-up con RMN, che a distanza di 6 mesi dalla precedente acquisizione ha evidenziato un quadro sostanzialmente invariato a livello dell'area infartuale e una completa regressione dell'edema della spongiosa ossea precedentemente segnalato nella stessa sede. Ad un anno di distanza, non sono più state riscontrate aree di alterato segnale a livello femorale. Il bambino ha proseguito RTC fino al gennaio 2013 quindi, vista la risoluzione clinica e strumentale delle lesioni, e in presenza di un Doppler transcranico nella norma, si è reintrodotta HU per valutarne l'efficacia a distanza di processi ossei acuti nella prospettiva di interrompere il regime trasfusionale cronico



Figura 1.



Figura 2

CONCLUSIONI: Dal caso esposto, emerge chiaramente l'importanza di sospettare sempre la complicanza ossea acuta (sia settica che infartuale) nel paziente affetto da SCD, qualora il dolore e la tumefazione in una data sede siano persistenti o ricorrenti, anche in presenza di dolore multifocale all'esordio. Il caso mette anche in luce il ruolo importante svolto dalla RMN e dalla scintigrafia (quest'ultima soprattutto in presenza di più sedi dolorose) per una identificazione precoce delle aree colpite da infarto o osteomielite, per quanto la diagnosi dif-

ferenziale tra i due quadri possa risultare non sempre univoca. Nella fase acuta di osteomielite, soprattutto in presenza di anemia, è da prendere in considerazione un periodo di regime trasfusionale allo scopo di ridurre i processi di calcificazione locale legati agli alti livelli di HbS e facilitare la rigenerazione ossea. La terapia antibiotica, in assenza di una eziologia accertata, non è univocamente condivisa; nel caso di complicanza acuta, si suggerisce una terapia ad ampio spettro per via parenterale da protrarre per almeno 3 settimane, seguita da un periodo almeno equivalente di terapia per os. Tale terapia dovrà essere protratta anche per 6 mesi in caso di infezioni già cronicizzate o recidivate.

Bibliografia:

- Marti-Carvajal AJ, Agreda-Pérez LH, Cortés-Jofré M. Antibiotics for treating osteomyelitis in people with sickle cell disease. The Cochrane Library 2009.
- Akakpo-Numado GK, Gnassingbé K, Boume MA, Songne B, Tekou H. Current bacterial causes of osteomyelitis in children with sickle cell disease. *Santé* 2008;18 67-70.
- Almeida A, Roberts I. Bone involvement in sickle cell disease. *Br J Haematol* 2005; 129: 482-490.
- Onuba O. Bone disorders in sickle-cell disease. *Int Orthop* 1993; 17:397-9.
- Linee guida AIEOP 2012 (su sito AIEOP)

P077

RITUXIMAB NEL TRATTAMENTO DELLA TROMBOCITOPENIA IMMUNE REFRATTARIA AI TRATTAMENTI STANDARD IN ETÀ PEDIATRICA

G. Palumbo, F. Giona, D. Marzella, M.L. Moleti, A. De Vellis, A.M. Testi, S. De Propriis, A. Guarini, R. Foà

Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università Sapienza Roma, Roma, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La trombocitopenia immune (PTI) in età pediatrica è un disordine ematologico benigno con una incidenza annua di 4-6/100000 bambini. Il 10% dei pazienti pediatrici presenta un decorso cronico con una persistenza della piastrinopenia superiore ai 12 mesi. Il trattamento standard della PTI in età pediatrica è rappresentato dalla terapia corticosteroidica, infusione endovenosa di Immunoglobuline e splenectomia. Nelle PTI pediatriche refrattarie possono essere utilizzati nuovi farmaci off label quali l'anticorpo monoclonale anti-CD20 (Rituximab) e l'agonista del recettore per la trombopoietina (Eltrombopag).⁽¹⁻⁵⁾ L'obiettivo dello studio è stata la valutazione dell'efficacia e tolleranza dell'anticorpo monoclonale anti-CD20 (Rituximab) nei pazienti di età < di 20 anni affetti da PTI cronica con sintomatologia emorragica, refrattari alle terapie convenzionali, osservati presso l'Ematologia Pediatrica dell'Università Sapienza di Roma. Oltre alla risposta al trattamento sono stati valutati: il tempo alla risposta, gli effetti collaterali e lo studio della popolazione linfocitaria B prima e dopo l'impiego del Rituximab.

METODI: Sono stati retrospettivamente valutati 7 pazienti (6 F e 1 M), affetti da PTI cronica, refrattari alle terapie convenzionali, di età <20 anni alla diagnosi, diagnosticati dal Settembre 1998 al Marzo 2012. Alla diagnosi l'età mediana era di 8,5 anni (range 3-20 anni) e la mediana del numero di piastrine era di $11.5 \times 10^9/L$ (range $3-66 \times 10^9/L$); in tutti i pazienti è stato eseguito un aspirato midollare che ha confermato la diagnosi di PTI e il dosaggio sierico delle Immunoglobuline plasmatiche risultò nella norma. Tutti i pazienti erano stati sottoposti ad altre linee terapeutiche. Tutti avevano ricevuto terapia con prednisone (PDN). 5 pazienti avevano ricevuto alte dosi di Ig endovena ed in 3 di essi era stata eseguita anche terapia con Desametasone. Un paziente era stato sottoposto a splenectomia. Al momento della somministrazione del Rituximab il tempo mediano dalla diagnosi era di 34 mesi (range 11-143 mesi); la mediana del numero di piastrine era di $9 \times 10^9/L$ (range $3-17 \times 10^9/L$). In 6/7 è stato eseguito lo studio delle sottopopolazioni linfocitarie B (CD19,CD20,CD22) da sangue periferico prima della somministrazione e dopo due e dodici mesi dalla sospensione del Rituximab, utilizzando metodiche standard.⁽²⁾ Lo schema di somministrazione del Rituximab è stato il seguente: 6 pazienti hanno ricevuto una dose totale di 100 mg ev; 5 di essi per 4 settimane mentre un paziente per sole 2 settimane, a causa di artralgie e cefalea comparse dopo la seconda infusione; 1 paziente ha eseguito il dosaggio di $375 \text{ mg/m}^2/\text{dose}$ ev. per 4 settimane consecutive. In accordo all'International Working Group (IWG) è stata definita Risposta (R) al trattamento con Rituximab una conta piastrinica $>30 \times 10^9/L$ e Risposta

Completa (RC) una conta piastrinica $>100 \times 10^9/L$.⁽¹⁾

RISULTATI: 3/7 (37,5%) hanno ottenuto una prima risposta ad una mediana di 21 giorni dalla prima infusione del farmaco, divenuta completa in due a 36 giorni. Tutti e tre avevano ricevuto il Rituximab al dosaggio di 100mg dose totale: 2/3 per 4 settimane e 1/3 per 2 settimane. Quattro pazienti, tra cui il paziente trattato con 375mg/m²/dose per 4 dosi, non hanno risposto. In un paziente si sono verificate reazioni avverse di grado 3-4 WHO rappresentate da artralgie e cefalea che hanno determinato la sospensione del trattamento dopo 2 dosi dall'inizio. 2/3 pazienti rispondenti sono recidivati dopo 9 e 11 mesi dalla sospensione. Attualmente dei 3 pazienti rispondenti 1 paziente è recidivato ed è in trattamento con PDN, 1 paziente è in RC completa continua, 1 paziente è recidivato ed ha eseguito una seconda linea con Rituximab al dosaggio di 100mg dose totale per 4 settimane ottenendo una RC dopo 1 mese dall'inizio del farmaco. In nessun paziente è stata documentata una ipogammaglobulinemia dopo la terapia con Rituximab; in tre pazienti studiati fino a un anno la ricostituzione in linfociti B è stata documentata a 2, 12 e 12 mesi dall'utilizzo del Rituximab.

CONCLUSIONI: In accordo con i dati della letteratura, nella nostra esperienza, il trattamento con Rituximab si è dimostrato efficace nel 37.5 % dei pazienti con PTI refrattaria ai trattamenti standard, con una tossicità moderata e senza alterazioni del profilo immunitario.⁽³⁻⁸⁾

Bibliografia:

1. Thomas Kuhne. Review. Update on the International Cooperative ITP Study Group (ICIS) and on the Pediatric and Adult Registry on Chronic ITP(PARC ITP). *Ped Blood Cancer* 2013;60:S15-S18.
2. Zaja F, Iacona I, Masolini P, Russo D., Sperotto A., Prosdocimo S., Priarca F., De Vita S., Regazzi M., Baccharani M., Fanin R. B-cell depletion with rituximab as treatment for immune hemolytic anemia and chronic thrombocytopenia. *Haematologica*. 2002; 87:189-195.
3. Liang Y, Zhang L, Gao J, Hu D, Ai Y Rituximab for children with immune thrombocytopenia: a systematic review. *PLoS One*. 2012;7(5):e36698.
4. Patel VL, Mahévas M, Lee SY, Stasi R, Cunningham-Rundles S, Godeau B, Kanter J, Neufeld E, Taube T, Ramenghi U, Shenoy S, Ward MJ, Mihatov N, Patel VL, Bierling P, Lesser M, Cooper N, Bussel JB. Outcomes 5 years after response to rituximab therapy in children and adults with immune thrombocytopenia. *Blood*. 2012 Jun 21;119(25):5989-95.
5. Journeycake JM. Childhood immune thrombocytopenia: role of rituximab, recombinant thrombopoietin, and other new therapeutics. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:444-9.
6. Parodi E, Nobili B, Perrotta S, Rosaria Matarese SM, Russo G, Licciardello M, Zecca M, Locatelli F, Cesaro S, Bisogno G, Giordano P, De Mattia D, Ramenghia U. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) in children with chronic refractory symptomatic immune thrombocytopenic purpura: efficacy and safety of treatment. *Int J Hematol*. 2006 Jul;84(1):48-53.
7. Bennett CM, Rogers ZR, Kinnamon DD, Bussel JB, Mahoney DH, Abshire TC, Sawaf H, Moore TB, Loh ML, Glader BE, McCarthy MC, Mueller BU, Olson TA, Lorenzana AN, Mentzer WC, Buchanan GR, Feldman HA, Neufeld EJ. Prospective phase 1/2 study of rituximab in childhood and adolescent chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2006 Apr 1;107(7):2639-42.
8. Stiakaki E, Perdikiogianni C, Thomou C, Markaki EA, Katzilakis N, Tsigotaki M, Kalmanti M. Idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood: twenty years of experience in a single center. *Pediatr Int*. 2012 Aug;54(4):524-7.

ALTRO

CP05

VALUTAZIONE DELLE POSSIBILITÀ DI PRESERVAZIONE DELLA FERTILITÀ OFFERTE A PAZIENTI PEDIATRICI E ADOLESCENTI AFFETTI DA MALATTIE ONCO-EMATOLOGICHE: SURVEY EUROPEA E CONFRONTO CON I DATI DEI CENTRI AIEOP

M. Terenziani,¹ M. Spinelli,² M. Jankovic,² E. Bardi,³ L. Hjorth,⁴ R. Haupt,⁵ G. Michel,⁶ J. Byrne⁷, on behalf of Pancare Network

¹Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano, Italy; ²Fondazione MBMB Ospedale San Gerardo, Monza (MB), Italy; ³Markusovszky Hospital, Szombathely, Hungary; ⁴Skane University Hospital, Lund, Sweden; ⁵Istituto Giannina Gaslini, Genova, Italy; ⁶University of Bern and University of Lucerne, Switzerland; ⁷Boyne Research Institute, Drogheda, Ireland

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La sopravvivenza dei bambini affetti da un tumore pediatrico (tumore solido, leucemia) è aumentata nel corso degli anni e la possibilità di preservare la fertilità è diventato un argomento importante nell'ambito di quanto viene definito "survivorship". L'infertilità potrebbe, infatti, essere associata a distress psicologico e avere un impatto negativo nella qualità di vita di questi soggetti. Nonostante questi presupposti, l'argomento non viene sempre affrontato al momento dell'inizio del programma terapeutico. Mancano ancora linee guida, comuni e condivise, per mettere in atto tecniche di preservazione della fertilità, qualora possibili, basate su evidenze scientifiche. Prima della stesura di linee guida, tuttavia, sarebbe importante conoscere lo stato della pratica clinica messa in atto nei diversi Centri per preservare la fertilità.

METODI: Sotto l'egida del PanCare (network europeo multidisciplinare che ha come obiettivo il miglioramento della sopravvivenza a lungo termine e la qualità di vita di tutti i cittadini europei che hanno avuto un tumore in età pediatrica o adolescenziale) abbiamo spedito a 198 Centri di Onco-Ematologia Pediatrica in tutta Europa (22 Stati Europei) un questionario con domande specifiche riguardo la disponibilità attuale di "counseling" e alle tecniche per la preservazione della fertilità nei pazienti (maschi e femmine, pre e post-puberi). L'analisi attuale mette a confronto i risultati della survey condotta nei centri AIEOP con i risultati di tutti gli altri paesi analizzati.

RISULTATI: 198 questionari sono stati inviati e 74 (37%) sono ritornati compilati da 18 diverse nazioni con una compliance variabile nei diversi paesi dal 6% al 100%. 31 dei questionari ricevuti sono provenienti da Centri AIEOP (A). Il confronto è stato pertanto effettuato tra i 31 Centri AIEOP, che rappresentano il 60% dei Centri AIEOP totali e i 43 Centri nei restanti paesi europei (E). Dei 31 Centri AIEOP 18 sono situati al nord mentre 13 sono Centri del centro-sud; i 43 Centri europei sono, invece, sparsi a macchia di leopardo (dal Portogallo alla Finlandia). Tra i "responders" italiani 27 su 31 (87%) offrono ai loro pazienti un "counseling" per la fertilità mentre tale servizio è offerto nel 100% dei Centri Europei. I 4 Centri A che hanno risposto negativamente alla domanda sul counseling sono stati eliminati dalle analisi successive. In 14/27 (A) vs 19/43 (E) Centri la consulenza è effettuata dall'onco-ematologo, in 3/27 (A) vs 6/43 (E) da un esperto di tecniche di preservazione della fertilità e nei rimanenti 10/27 (A) vs 17/43 (E) da un team combinato dei due. La maggioranza dei Centri non dispone di linee guida (locali/nazionali) a cui fare riferimento: 70% A vs 58% E. Riguardo la componente maschile, 2/27 (7%) Centri A offrono la preservazione di tessuto testicolare nei maschi pre-puberi contro 7/43 (16%) dei Centri E, mentre tutti i Centri consigliano la raccolta del seme (con adesione molto variabile) nei maschi post-puberi. Riguardo la componente femminile, 19 (70%) Centri A e 20 (46%) Centri E offrono la possibilità di preservare il tessuto ovarico, mentre la prescrizione di terapie ormonali per una ipotetica protezione ovarica (per esempio GnRH agonisti) avviene nel 62% (17) dei Centri A vs il 48% (21) dei Centri E.

CONCLUSIONI: Il questionario dimostra un alto interesse per il problema della fertilità tra i Centri che hanno risposto. È vero, tuttavia, che l'adesione tra i Centri europei è stata bassa (43/147 Centri - 29%) e che pertanto questo potrebbe creare un bias di selezione tra coloro interessati all'argomento e quelli che non hanno ritenuto importante il questionario. Tra i questionari ricevuti, i soli 4 Centri che non offrono una consulenza per la fertilità sono tutti italiani. Tuttavia è importante

sottolineare che le percentuali ottenute per le diverse metodiche, anche altamente specialistiche, sembrano in linea, se non addirittura superiori, con le percentuali del resto d'Europa. La raccolta del seme tra i ragazzi puberi sembra ormai entrata nella normale pratica clinica, ma sottovalutiamo l'importanza che tale dato raggiunga, anche in Italia, il 100%. L'analisi segnala, infine, la necessità di dimostrare l'efficacia di tecniche ancora non convalidate e soprattutto l'importanza di creare linee guida condivise e basate su evidenze scientifiche.

C009

RUOLO DEL RECETTORE CANNABINOIDE DI TIPO 2 NELLA REGOLAZIONE DELLA SOPRAVVIVENZA E DELL'ATTIVITÀ DELLE CELLULE STROMALI MESENCHIMALI

F. Rossi,¹ M.E. Bernardo,² G. Bellini,³ A. Conforti,² B. Nobili,¹ S. Maione,³ F. Locatelli²

¹Dipartimento della Donna, del Bambino e di Chirurgia Generale e Specialistica, Seconda Università degli Studi di Napoli, Napoli;

²Dipartimento di Oncematologia e Medicina Trasmucosale, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma; ³Dipartimento di Medicina Sperimentale, Seconda Università di Napoli, Napoli, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Le Cellule Mesenchimali Stromali (MSC) sono cellule pluripotenti, in grado di differenziare in una grande varietà di cellule (osteoblasti, adipociti, condrociti, miociti, cellule epiteliali).¹ Le MSC possono essere isolate dal midollo osseo dell'adulto e - grazie alla loro capacità di aderire alla plastica - possono essere facilmente espanse *in vitro* in quantità potenzialmente utili per le applicazioni terapeutiche.² Peculiarità delle MSC sono l'assenza sulla loro superficie degli antigeni MHC di classe I e delle molecole co-stimolatorie CD40, CD80 e CD86 e la moderata espressione degli antigeni MHC di classe II. Per tali caratteristiche, le MSC riescono a sfuggire al riconoscimento da parte dei linfociti T alloreattivi.¹ Oltre a essere non immunogene, le MSC hanno un'attività immunoregolatoria ed anti-infiammatoria. Numerosi studi *in vitro* hanno dimostrato, infatti, che le MSC inibiscono diverse cellule dell'immunità cellulo-mediata: esse, infatti, prevengono la risposta T-cellulare nella reazione mista linfocitaria allogenica, bloccano la differenziazione e la maturazione delle cellule dendritiche indotte da alloantigeni, inibiscono la proliferazione di linfociti, inducono la differenziazione in cellule T regolatorie (T reg) e, infine, favoriscono la risposta mediata dai linfociti *T helper 2* (Th2) rispetto ai *T helper 1* (Th1).³ Inoltre, le MSC possono modulare anche l'immunità umorale, sopprimendo la proliferazione, la chemiotassi e la produzione di anticorpi da parte delle cellule B. L'effetto immunosoppressivo delle MSC è stato dimostrato anche *in vivo* in alcuni modelli animali sperimentali di trapianto di organo solido e nell'uomo in alcune malattie a patogenesi immuno-mediata, prima fra tutte la *Graft versus Host Disease* (GvHD).⁴ Il "sistema endocannabinoide" è un sistema neuro-modulatore che comprende i recettori cannabinoidi, i loro ligandi endogeni (endocannabinoidi, EC), nonché gli enzimi che li sintetizzano e li degradano. Fino ad oggi, sono stati identificati due tipi di recettori cannabinoidi: CB1 e CB2.⁵ Questi recettori appartengono alla superfamiglia dei recettori accoppiati a proteine G. Il recettore CB1 è largamente distribuito nel SNC, mentre il recettore CB2 è espresso soprattutto sulle cellule del sistema immunitario.⁵ Recentemente, questi recettori sono stati identificati anche sulle cellule staminali embrionali di topo e su cellule staminali ematopoietiche umane.^{6,7} Gli EC sono molecole di natura lipidica che fungono da mediatori locali andando a legare e ad attivare i recettori presenti sulle cellule circostanti il sito di rilascio e sintetizzati "on demand" a partire da precursori fosfolipidici, presenti nelle membrane cellulari. I principali EC sono l'anandamide (AEA) e il 2-Arachidonilglicerolo (2-AG).⁵ Dopo il rilascio, gli EC agiscono legandosi ai recettori dei cannabinoidi e successivamente vengono rapidamente inattivati tramite la ricattura e la degradazione enzimatica, che avviene mediante due enzimi specifici: la FAAH (*fatty acid amide hydrolase*) e MAGL (*mono acil gliceride lipasi*). Il sistema endocannabinoide è coinvolto in molteplici funzioni, tra le quali la modulazione delle risposte immunitarie ed infiammatorie. Il CB2 infatti regola il sistema immunitario attraverso la soppressione dell'attivazione cellulare, la modulazione del rapporto Th1/Th2, l'inibizione della produzione di citochine pro-infiammatorie. Il ben noto ruolo immuno-modulatore del CB2 è stato inoltre recentemente confermato da alcuni studi di associazione tra una variante comune del gene CNR2 e diverse malattie autoimmuni e infiammatorie.⁸⁻¹⁰ Alla luce delle ben note proprietà

immunoregolatorie ed anti-infiammatorie del CB2 e delle più recenti evidenze della presenza del sistema cannabinoide su cellule staminali sia murine che umane, scopo del nostro studio è stato dimostrare per la prima volta - mediante un approccio multidisciplinare - la presenza di questo sistema neurotrasmettitoriale su MSCs umane ed evidenziare il ruolo del CB2 nella regolazione della loro sopravvivenza ed attività.

METODI: Le MSC sono state ottenute dal midollo osseo di 10 donatori sani, dopo consenso informato. Le MSC sono state isolate per centrifugazione su Ficoll e diluite in D-Minimal Essential Medium, 10% FBS, 100 IU/mL penicillina, 100 g/mL streptomycina e 10% L-glutamina. Le MSC - aderenti alle piastre di coltura e caratterizzate mediante citofluorimetria a flusso ed analizzate al FACS - venivano espanse e tripsinizzate per 9 volte, al fine di ottenere per ogni passaggio (da P0 a P9) sia il relativo mRNA che lisato proteico. Le MSC al P6 sono state inoltre sottoposte o no a trattamento farmacologico per 24 ore con un agonista e/o con un antagonista selettivi per il recettore CB2, in presenza o no di LPS. Dopo estrazione dell'RNA totale mediante Trizol, è stata valutata l'espressione dei geni CB1 e CB2 rispetto al costituente beta-actina mediante RT-PCR e real-time PCR. Dopo estrazione proteica mediante RIPA buffer sono stati valutati i livelli proteici di CB2, IL10, p-AKT, p-ERK2 rispetto alla beta-actina, mediante Western Blot e con una doppia marcatura CB2-CD105, mediante immunocitochimica. I livelli degli EC AEA, 2-AG, PEA e OEA sono stati misurati mediante HPLC seguita da spettrometria di massa. Infine è stato effettuato un saggio MULTI-ELISA per valutare i livelli di citochine infiammatorie rilasciate dalle MSC in presenza o no di stimolo infiammatorio (LPS) con o senza trattamento farmacologico con agonista selettivo CB2. Alle cellule in coltura veniva somministrato 2-AG in maniera localizzata e veniva quindi analizzato l'homing cellulare dopo un'ora. I dati relativi ai livelli di espressione molecolare e biochimica sono mostrati come media±deviazione standard. Il test di Student-Neuman-Keuls è stato utilizzato per determinare la significatività statistica tra i gruppi a confronto. È stata considerata statisticamente significativa una p value <0.05.

RISULTATI: 1. I recettori cannabinoidi sono differentemente espressi nelle MSC in relazione ai diversi passaggi in coltura. In particolare il CB2 aumenta a partire da P3, mentre il CB1 diminuisce (Figura 1).

2. Sia il gene che la proteina del recettore CB2 sono maggiormente espressi a P6 e l'aumento dell'espressione del CB2 correla con la maturazione delle MSC, come evidenziato dalla morfologia cellulare e dall'aumento del CD105 (Figura 3).

3. Gli endocannabinoidi sono significativamente diminuiti a P6 (non mostrato).

4. La stimolazione selettiva del CB2 reverte l'aumento delle citochine pro-infiammatorie e la diminuzione delle citochine anti-infiammatorie indotti dallo stimolo infiammatorio LPS (Figura 3 e 4).

5. L'applicazione localizzata del 2-AG richiama le cellule verso il sito di somministrazione (Figura 5)

6. La fosforilazione di ERK2, che attiva segnali anti-apoptotici ed anti-infiammatori, è inversamente correlata al numero di passaggi in piastra ed aumenta significativamente con la stimolazione del CB2 a 30 minuti e 24 ore dall'esposizione al farmaco (Figura 6).

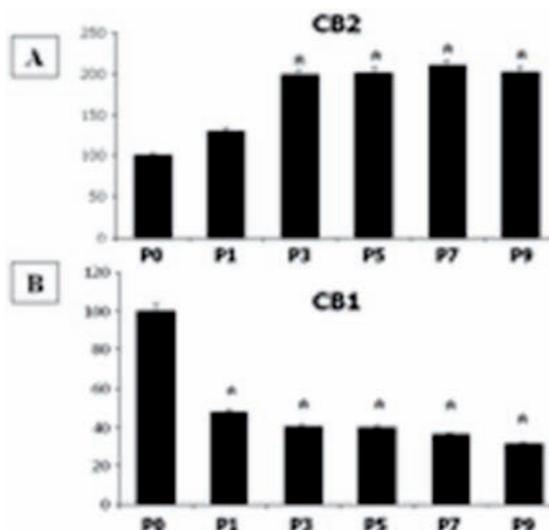


Figura 1.

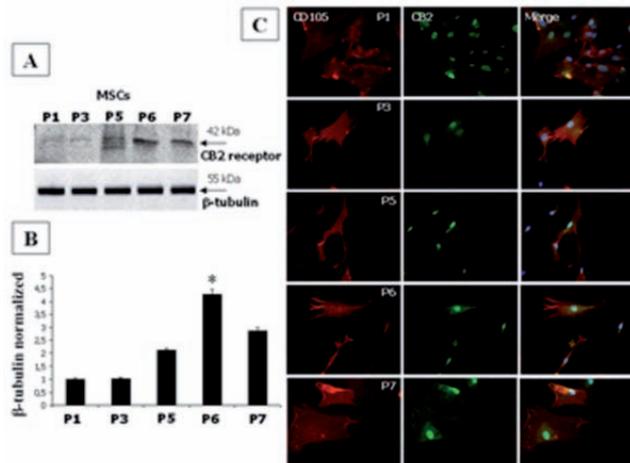


Figure 2.

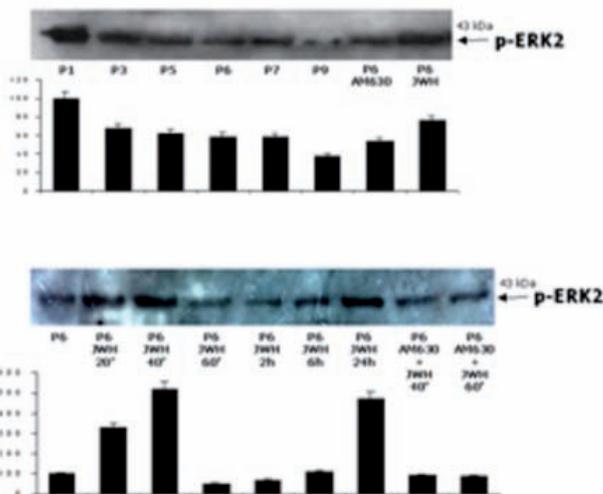


Figure 5.

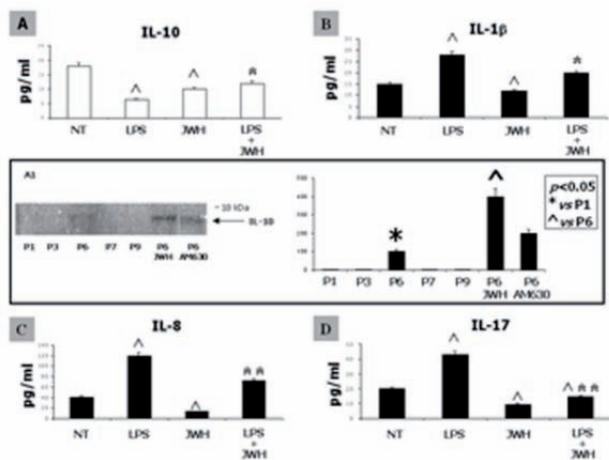


Figure 3.

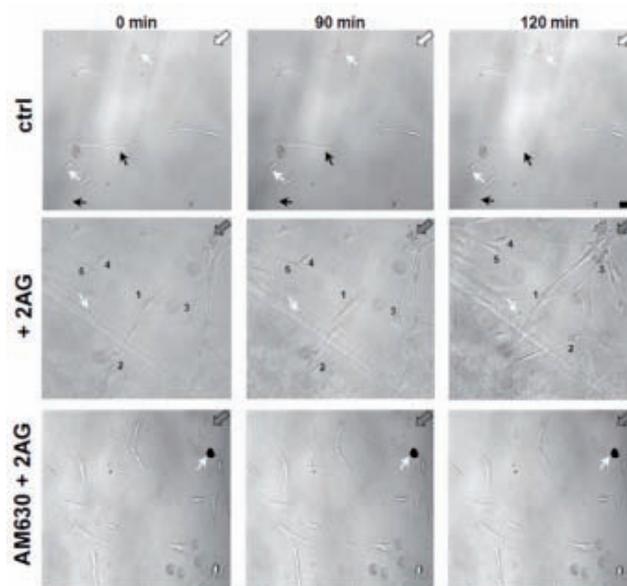


Figure 6.

CONCLUSIONI: In questo studio dimostriamo per la prima volta che il sistema cannabinoide è presente nelle cellule mesenchimali stromali umane ed è attivo. In particolare la stimolazione selettiva del CB2 è in grado di favorire l'homing e la capacità immunomodulatoria ed anti-infiammatorie delle MSC.

Bibliografia:

- Bernardo ME et al. Mesenchymal stromal cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Sep;1176:101-17.
- Bernardo ME et al. Ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2011 Mar;24(1):73-81 Feb 23 1
- Comite P et al. Immunomodulatory properties of porcine, bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells and comparison with their human counterpart. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2011 Oct 15;57 Suppl:OL1600-5.
- Le Blanc K et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet.* 2008 May 10;371(9624):1579-86.
- Tanasescu R, Constantinescu CS. Cannabinoids and the immune system: an overview. *Immunobiology.* 2010 Aug;215(8):588-97.
- Bari M et al. Characterization of the endocannabinoid system in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 2011 Jan;20(1):139-47.
- Jiang S et al. Cannabinoid receptor 2 and its agonists mediate

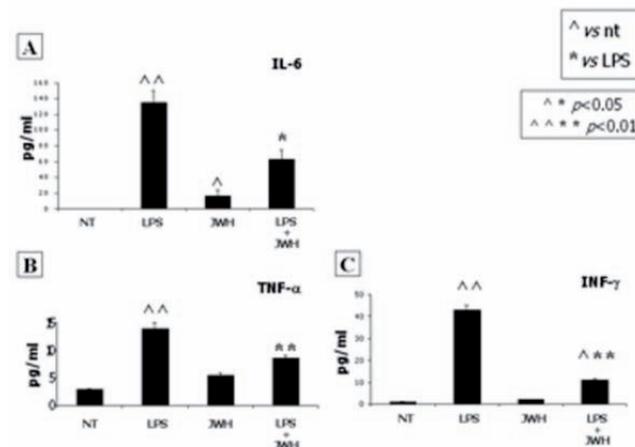


Figure 4.

- hematopoiesis and hematopoietic stem and progenitor cell mobilization. *Blood*. 2011 Jan 20;117(3):827-38.
8. Rossi F et al. The cannabinoid receptor type 2 Q63R variant increases the risk of celiac disease: implication for a novel molecular biomarker and future therapeutic intervention. *Pharmacol Res*. 2012 Jul;66(1):88-94.
 9. Rossi Fet al. CNR2 functional variant (Q63R) influences childhood immune thrombocytopenic purpura. *Haematologica*. 2011 Dec;96(12):1883-5.
 10. Rossi F et al. Cannabinoid receptor type 2 functional variant influences liver damage in children with non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One*. 2012;7(8):e42259.

C010

RICERCA DI SIGNIFICATO ED EMOTIVITÀ NEGATIVA: LE DUE CHIAVI DI VOLTA PER UNA CRESCITA POST-TRAUMATICA

M. Scignaro,¹ G. Masera,² F. Nichelli,³ M. Jankovic⁴

¹Università degli Studi di Milano-Bicocca, Milano; ²Università degli Studi di Milano-Bicocca, Monza (MB); ³Servizio Psico-sociale; ⁴UO Day Hospital Ematologia Pediatrica, Ospedale San Gerardo di Monza, Monza (MB), Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La maggior parte delle ricerche psico-sociali in ambito di promozione della salute in condizione di malattia cronica, sono state guidate da un modello *impairment* (Carver, 1998), che definisce l'adattamento quale assenza di disordini di natura psicologica, di emotività negativa e di limitazioni nel funzionamento fisico (Stanton, Reverson, and Tennen, 2007). Tuttavia, in anni piuttosto recenti, alcuni ricercatori hanno incominciato a concentrare i propri sforzi per uno studio ed una comprensione degli esiti positivi connessi all'esperienza di malattia, dando vita ad un modello *thriving* (Carver, 1998). Tale spostamento di focus è stato favorito da tre importanti esiti di ricerca che evidenziano come: a) un buon adattamento alla condizione di malattia non corrisponde all'assenza di distress psicologico, b) emotività positiva e negativa rappresentano dimensioni indipendenti del benessere legate a differenti determinanti e conseguenze (cfr. Pressman and Cohen 2005 per una rassegna), c) molte persone che vivono una malattia cronica manifestano un adattamento positivo (Mols et al., 2005). Di particolare interesse, in quest'ambito, è il costrutto di crescita *post-traumatica*. Il termine si riferisce ad una maturazione psicologica, conseguente alla personale lotta con l'esperienza di malattia, che attiva una rivalutazione profonda del sé, delle priorità e degli obiettivi di vita, nonché delle qualità delle relazioni interpersonali (Joseph, 2011; Joseph and Linley, 2009; Tedeschi and Calhoun, 2004). Gli studi sulla crescita post-traumatica in ambito oncologico sono letteralmente fioriti in quest'ultimo decennio e hanno evidenziato il potenziale promozionale di tale processo per il benessere sia sul piano psico-sociale che fisiologico-clinico (cfr. Park, Lechner, Antoni, Stanton, 2009 per una rassegna). L'interrogativo che guida l'attuale ricerca in quest'ambito, pertiene l'individuazione delle condizioni chiave per favorire tale processo rivelatosi cruciale per il benessere bio-psico-sociale del paziente e del suo contesto di appartenenza, condizioni che il clinico può sostenere od ostacolare con il suo operato. Due fattori emergono come elementi chiave dalle ricerche più attuali in tema: i *processi cognitivi di ricerca di significato* e la possibilità di condividere ed *esprimere l'emotività negativa* connessa alla condizione di malattia (Calhoun and Tedeschi, 2006). Il presente contributo si inserisce in questo filone di indagine ed ha inteso verificare se e in che misura esiste un nesso tra la presenza di processi di crescita post-traumatica e la presenza di processi cognitivi di elaborazione di significato nonché di emozioni negative

METODI: L'indagine ha previsto la raccolta di 18 storie di vita di genitori (61% madri) di bambini (età media=6.7 anni; DS=3.35) con diagnosi di leucemia di tipo linfoide (87.5%) o di tipo mieloide (12.5%) in stop terapia da almeno un anno. L'età media delle madri è di 38 anni (DS=5.3), quella dei padri di 41 anni (DS=6). Il livello medio di istruzione è di 14 anni (DS=3). Tutte le narrazioni raccolte sono state innanzitutto codificate sia attraverso un'analisi del contenuto attuata ad un livello riga per riga, per cui ad ogni frase riconducibile ad una categoria è stato assegnato punteggio di +1. In secondo luogo tutti i testi raccolti sono stati analizzati con il Linguistic Inquiry Word Count (LIWC) di Pennebaker, Francis e Booth (2001). Il LIWC è un software per l'analisi degli indicatori linguistici che permette di individuare all'interno dei testi la frequenza di presenza di: emozioni positive, emozioni negative, nessi causali (perché, dal momento che...), insight (comprendere, imparare, pensare).

RISULTATI: L'analisi del contenuto riga per riga ha permesso di verificare la presenza di crescita post-traumatica nel 67% dei partecipanti. Coerentemente al modello teorico di crescita post-traumatica di Tedeschi e Calhoun (2004), sono state classificate come crescita post-traumatica frasi quali: "ore interminabili che pian piano hanno aperto la strada ad un diverso uso della sensibilità, all'ascolto più ampio possibile"; "ci ha dato ricchezze interiori apprezzando ogni momento della vita". L'analisi con il software LIWC ha evidenziato la presenza di tre stili narrativi: uno stile a prevalenza di emozioni positive (POS), uno a prevalenza di emozioni negative, uno con un utilizzo bilanciato di emozioni positive e negative. L'analisi della varianza (ANOVA) ha permesso di verificare l'esistenza di un differente utilizzo dei processi cognitivi nei tre stili narrativi. Come si evince dalla Figura 1, la maggioranza degli indicatori linguistici che indicano la presenza di *processi cognitivi di ricerca di significato* sono presenti nelle narrazioni che evidenziano una prevalenza di utilizzo di emozioni negative. Si è proceduto, pertanto, ad un incrocio tra i tre stili narrativi e le aree tematiche relative alla crescita connessa con l'evento malattia. Come si evince dalla Figura 2 lo stile narrativo che permette la scoperta di nuove regole, il recupero di una quotidianità interrotta e una ricerca di senso, è lo stile narrativo che presenta una prevalenza di indicatori linguistici di emozioni negative.

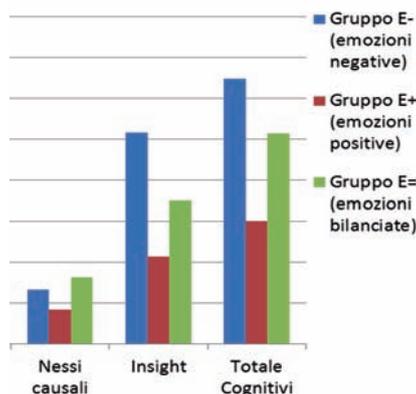


Figura 1.

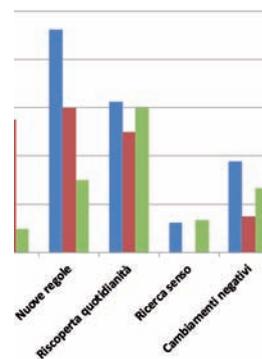


Figura 2.

CONCLUSIONI: Lo studio ha permesso di confermare quanto la letteratura in tema di crescita post-traumatica evidenzia: la domanda di significato e il carico emotivo negativo sembrerebbero strettamente connessi alla possibilità di un affronto positivo dell'evento malattia. Da un punto di vista applicativo questi risultati, benché preliminari, suggeriscono l'importanza che il clinico sostenga, attraverso la sua azione terapeutica, la drammatica domanda di significato che l'evento malattia scatena, accogliendo e offrendo spazi di condivisione del carico emotivo negativo che la condizione di malattia comporta, al fine di favorire una promozione del benessere bio-psico-sociale della famiglia e del bambino affetto da leucemia.

Bibliografia:

- Calhoun, L. G., & Tedeschi, R. G. (2006). *Handbook of posttraumatic growth: Research and practice*. Mahwah, NJ: Erlbaum.
- Carver, C.S. (1998). Resilience and thriving: Issues, models, linkages. *Journal of Social Issues*, 54, 245-266.
- Joseph, S. (2011). *What doesn't kill you. The new psychology of post-traumatic growth*. New York: Basic Books.

- Joseph, S., Linley, A. (edited by) (2009). *Trauma recovery and growth. Positive psychological perspectives on posttraumatic stress*. Hoboken, New Jersey: Wiley & Sons.
- Mols, F., Vingerhoets AJJM, Coebergh, JW, van Poll-Franse, LV. (2005). Quality of life among long-term breast cancer survivors: a systematic review. *European Journal of Cancer*, 41, 2613-2619.
- Pennebaker, J., Francis, M.E., and Booth, R.J. (2001). *Linguistic Inquiry and Word Count (LIWC): A computerized text analysis program* (2nd ed.). Mahwah, NJ: Lawrence Erlbaum.
- Pressman, S. D., & Cohen, S. (2005). Does positive affect influence health? *Psychological Bulletin*, 131, 925-971.
- Stanton, A.L., Revenson, T.A., Tennen, H. (2007). Health psychology: Psychology adjustment to chronic disease. *Annual Review of Psychology*, 58, 565-592.
- Park, C.L., Lechner, S.C., Antoni, M.H., Stanton, A.L. (edited by) (2009). *Medical Illness and positive change. Can crisis lead to personal transformation?* Washington: American Psychological Association.
- Tedeschi, R. G., & Calhoun, L. G. (2004). The foundations of posttraumatic growth: New considerations. *Psychological Inquiry*, 15, 1-18.

P078

LA MANCANZA DELLA PENTRAXINA LUNGA (PTX3) NELLE CELLULE MESENCHIMALI STAMINALI DERIVATE DA MIDOLLO OSSEO RIDUCE NOTEVOLMENTE LA LORO CAPACITÀ DI GUARIGIONE DELLE FERITE IN MODELLI MURINI

C. Cappuzzello,¹ A. Doni,² E. Dander,¹ F. Pasqualini,² M. Nebuloni,³ B. Bottazzi,² A. Mantovani,² A. Biondi,¹ C. Garlanda,² G. D'Amico¹

¹Centro di Ricerca M. Tettamanti, Clinica Pediatrica, Università Milano-Bicocca, Monza (MB); ²Istituto Clinico Humanitas, IRCCS, Rozzano (MI); ³Pathology Unit, L. Sacco Department of Clinical Sciences, L. Sacco Hospital, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Nonostante diversi studi dimostrino la capacità delle cellule mesenchimali staminali (MSCs) di riparare e rigenerare differenti tessuti, i meccanismi alla base di questi processi non sono ancora completamente chiariti. Abbiamo dimostrato come le MSCs, in presenza di stimoli infiammatori, producano elevati livelli di Pentraxina lunga (PTX3), una componente dell'immunità umorale innata implicata nell'infiammazione e nella deposizione della matrice extracellulare. Lo scopo di questo studio è stato quello di caratterizzare le MSCs derivate dal midollo di topi knockout per PTX3 e valutare la loro abilità di riparazione della ferita in un modello murino.

METODI: Le MSCs PTX3^{-/-} sono state isolate dal midollo osseo di topi PTX3^{-/-}. Dopo 5 passaggi di coltura, l'espressione dei marcatori di superficie è stata analizzata mediante citometria di flusso e la loro capacità di differenziazione osteogena ed adipogena è stata rilevata mediante colorazione con alizarin red ed oil red O, rispettivamente. La capacità delle MSCs PTX3^{-/-} di abrogare la proliferazione delle cellule T è stata valutata mediante co-cultura delle MSCs con PBMCs attivati con fitoemoagglutina (PHA). Infine, MSCs PTX3^{-/-} e WT sono state impiantate in ferite escissionali create mediante punch da biopsia sul dorso di topi allogeneici WT e PTX3^{-/-}. L'area della ferita è stata misurata giornalmente fino al giorno +14 e rielaborata con un programma di analisi di immagine. I campioni di tessuto sono stati prelevati a 2, 7 e 14 giorni e processati per l'analisi istologica ed immunocitochimica. La produzione di alpha D-Dimero è stata dosata nei surnatanti dei tessuti lesionati prelevati a 2 e 7 giorni dal danno, mediante esperimenti di ELISA. Infine l'abilità fibrinolitica delle MSCs PTX3^{-/-} e WT è stata verificata mediante inoculo delle cellule in un gel di fibrina e plasminogeno con e senza aggiunta di PTX3 esogena e i prodotti di degradazione degli alpha polimeri ad alto peso molecolare sono stati quantificati nei surnatanti delle colture mediante esperimenti di SDS-PAGE.

RISULTATI: Analizzando le MSCs ottenute dal midollo osseo di topi PTX3^{-/-} abbiamo dimostrato che, analogamente alle MSCs ottenute da topi di tipo WT (MSC WT), presentano una tipica morfologia fibroblastoide ed esprimono i marcatori comuni delle cellule mesenchimali. Inoltre, queste cellule sono in grado di differenziare in adipociti ed osteoblasti e ridurre drasticamente la proliferazione dei linfociti T indotta da mitogeni, in maniera dose-dipendente. Al contrario, le MSCs PTX3^{-/-} hanno mostrato una drastica riduzione della capacità di ripara-

zione della ferita rispetto alle MSCs WT, ad ogni tempo analizzato. Molto importante, la valutazione istologica dei campioni di cute di topi trattati con le MSCs PTX3^{-/-} ha mostrato una riduzione del tessuto di granulazione, indispensabile per un'opportuna guarigione e rimodellamento della lesione. L'analisi dell'infiltrato infiammatorio ha rivelato un aumento significativo delle cellule polimorfonucleate (GR-1⁺) nel letto della ferita dopo due giorni dall'induzione della lesione. Inoltre è stato osservato un notevole aumento del deposito di fibrina rispetto alla ferita trattata con MSC WT. In accordo, l'analisi dei surnatanti ottenuti dalle ferite trattate con MSCs PTX3^{-/-} mostrano livelli più bassi di un prodotto di degradazione della fibrina, quale l'alpha D-Dimero.

È stata quindi analizzata l'abilità di degradare la fibrina *in vitro* da parte delle MSCs PTX3^{-/-} ed è stato dimostrato che è significativamente ridotta rispetto alle cellule WT. Infine, la diminuita capacità delle MSCs PTX3^{-/-} di riparare la ferita viene confermata anche in topi PTX3^{-/-}.

CONCLUSIONI: In questo studio, abbiamo dimostrato che la mancanza di PTX3 nelle MSCs, sebbene non alteri il loro fenotipo, la loro abilità di differenziare nei lineages mesenchimali e la loro attività immunosoppressiva, di rilevanza, causa una drastica riduzione della loro capacità di riparare le ferite. Questo studio dimostra che PTX3 prodotta dalle MSCs rappresenta un requisito essenziale per la loro abilità di riparazione e rimodellamento dei tessuti danneggiati.

P079

RISCHIO DI SINDROME METABOLICA IN PAZIENTI PEDIATRICI TRATTATI PER TUMORI LIQUIDI O SOLIDI NON CENTRALI

V. Morsellino,¹ F. Ceroni,¹ M. Giaccardi,¹ S. Noli,¹ B. Roviglione,¹ M. Faraci,² S. Caruso,³ R. Haupt,³ N. Di Iorgi,¹ M. Maghnie¹

¹Clinica Pediatrica, Centro di Auxoendocrinologia; ²Oncematologia Pediatrica; ³Epidemiologia e Biostatistica, IRCCS Istituto G. Gaslini, Genova, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Si definisce sindrome metabolica (SM) una condizione clinica caratterizzata dalla contemporanea presenza di disfunzioni metaboliche che rappresentano fattori di rischio per la patologia cardiovascolare e per il diabete tipo 2.¹ In letteratura sono presenti diverse definizioni di SM: in ognuna di esse vengono riconosciuti quali criteri fondamentali la presenza di obesità, alterato metabolismo glucidico, dislipidemia e ipertensione.² Nella popolazione pediatrica la definizione è resa più difficile perché i parametri considerati devono essere modificati tenendo conto della crescita e dello sviluppo puberale; in assenza di dati definitivi, i criteri aderiscono ai valori assoluti dell'adulto presenti nella definizione della International Diabetes Federation (IDF), ad eccezione dell'uso dei percentili per esprimere la circonferenza vita ed il cut-off usato per il colesterolo HDL (Tabella 1).^{3,4} Negli ultimi 30 anni circa, il miglioramento delle cure dei bambini affetti da patologia oncologica ha portato un aumento della percentuale di sopravvivenza permettendo il raggiungimento della fine dei trattamenti previsti e dell'età giovane-adulta o adulta; parallelamente è anche cresciuta la possibilità di riscontrare effetti a lungo termine dovuti ai pregressi trattamenti, tra cui assumono particolare importanza quelli endocrino-metabolici. Queste alterazioni vanno a delineare i tratti della SM e possono quindi essere fattori di rischio per patologia cardiovascolare in età precoce.^{5,6} I meccanismi sono molteplici e non ancora chiari ma sono state formulate alcune ipotesi secondo cui possono assumere importanza sia il tumore stesso che le terapie utilizzate. Studi svolti hanno confermato che individui con SM hanno un elevato tasso di mortalità dovuto a problemi cardiovascolari, in particolare se non modificano abitudini di vita scorrette (attività fisica, dieta, alcol e fumo); è verosimile, inoltre, che questo rischio aumenti ulteriormente se il quadro di SM è già insorto in età adolescenziale. In considerazione di tali aspetti, il razionale dello studio è valutare se pazienti, esclusivamente pediatrici, con storia di patologia oncologica, presentino precocemente SM e/o fattori predisponenti ad essa al fine di attuare tempestivamente prevenzione primaria o secondaria. Obiettivo primario dello studio è valutare la prevalenza della sindrome metabolica in adolescenti (10-16 anni) fuori terapia da almeno 2 anni dopo diagnosi e trattamento di tumore in età pediatrica. Obiettivo secondario è l'identificazione di eventuali fattori di rischio per la sindrome metabolica.

METODI: Studio di coorte trasversale monocentrico. Sono stati arruolati 100 pazienti (55 maschi) trattati per tumore non centrale in età pediatrica; tutti sono stati valutati per BMI, circonferenza vita, pressio-

ne sistolica e diastolica e sottoposti ad un prelievo ematochimico per la valutazione di indici infiammatori (PCRhs) di metabolismo lipidico (colesterolo totale, HDL, LDL, TG), glucidico (insulina, glicemia, HbA1c) e marcatori metabolici "nuovi" adiponectina e NEFA. L'insulino-resistenza è stata valutata mediante il calcolo dell'HOMA IR. La diagnosi di Sindrome Metabolica (SM) veniva effettuata sulla base delle più recenti linee guida (IDF 2007) (Tabella 1).⁴ Sulla base dei risultati ottenuti i soggetti sono stati quindi categorizzati in base alla presenza o meno di SM secondo i seguenti gruppi: normale: BMI <90° centile e nessuno fattore di rischio (FR); moderato rischio di SM: BMI ≥90° e nessun fattore di rischio; oppure: BMI <90° centile e ≥1 fattore di rischio; alto rischio di SM: BMI ≥90° e 1 fattore di rischio; SM: BMI ≥90° e ≥2 fattori di rischio.

RISULTATI: è stata riscontrata una prevalenza di SM del 15% (80% maschi, P0,07), di cui il 33,3% era stata trattata per neuroblastoma, il 33,3% per tumori ossei, il 20% per LLA. Nel 60% dei soggetti i FR associati a SM erano 2 (CV+ iperglicemia, 44,4%), nel 26,7% erano 3 (CV, HDL e TG). Nel 93,3% dei soggetti con SM era presente una CV >90°. Non è stata riscontrata influenza da parte di trapianto o di specifici protocolli terapeutici. Considerando la coorte in toto una CV >90° centile è emersa nel 55% dei casi, un alto rischio di SM nel 40% (CV >90° centile 95% dei pz) e una condizione di Obesità nel 62% dei casi (maggiore prevalenza nei tumori solidi). Endocrinopatie secondarie non influivano sulla prevalenza né di SM né di obesità mentre alchilanti più antraciclinici, la radioterapia cranica, addominale e TBI mostravano una influenza tendenzialmente negativa sul metabolismo rispetto ad altri trattamenti (P non significativo). In nessuno è stata riscontrata ipertensione.

CONCLUSIONI: Nella nostro studio analisi preliminari hanno dimostrato che il 15% dei pazienti fuori terapia dopo tumore pediatrico è affetto da sindrome metabolica e ben il 40% rientra nella categoria ad alto rischio di SM. I soggetti più a rischio sembrano essere quelli di sesso maschile che avevano avuto un tumore solido. Il 62% della popolazione presentava inoltre obesità mentre il 55% adiposità viscerale. Pur senza confermare l'impatto di protocolli terapeutici sul rischio metabolico e significatività per alcune alterazioni riportate in letteratura - discrepanze forse attribuibili ad un campione ancora troppo giovane o numericamente ridotto- tali rilievi devono sensibilizzare l'attenzione sull'inquadramento precoce della problematica e sull'attuazione di provvedimenti di prevenzione primaria.

Tabella 1. Definizione di sindrome metabolica nella fascia di età 10-16 anni secondo IDF 2007

Fattori di rischio	IDF (2007)
Requisiti	BMI ≥90° percentile + ≥2 dei seguenti
Pressione Sanguigna	Sistolica ≥130mmHg Diastolica ≥85mmHg
Trigliceridi	≥150mg/dL
Colesterolo HDL	<40mg/dL
Obesità centrale	W >90° percentile
Glucosio/Insulina	Glicemia a digiuno ≥100mg/dL (OGTT raccomandato) o DM tipo 2

Bibliografia:

- Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT. JAMA. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. 2002 Dec 4;288(21):2709-16.
- Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. Diabetes. 1988 Dec;37(12):1595-607.
- de Haas EC, Oosting SF, Lefrandt JD, Wolfenbutter BH, Sleijfer DT, Gietema JA. Lancet Oncol. The metabolic syndrome in cancer survivors. 2010 Feb;11(2):193-203. doi: 10.1016/S1473-2045(09)70287-6.
- Zimmet P, Alberti G, Kaufman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S, Wong G, Bennett P, Shaw J, Caprio S; International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention of Diabetes. The metabolic syndrome in children and adolescents. Lancet. 2007 Jun 23;369(9579):2059-61.
- Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue?. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999 Apr;19(4):972
- Matsuzawa Y, Shimomura I, Kihara S, Funahashi T. Importance of

adipocytokines in obesity-related diseases. Horm Res. 2003;60 Suppl 3:56-9. Review.

P080

CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA, FUNZIONALE E GENETICA DI CELLULE STROMALI MESENCHIMALI ISOLATE DA MIDOLLO OSSEO DI PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA

A. Conforti, S. Biagini, F. Del Bufalo, P. Sireto, A. Angioni, N. Starc, G. Li Pira, F. Moretta, A. Proia, B. Contoli, S. Genovese, C. Ciardi, F. Lo-Coco, F. Locatelli, M.E. Bernardo

Dipartimento di Onco-Ematologia, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La leucemia linfoblastica acuta (LAL) è una patologia linfoproliferativa del midollo osseo in cui i progenitori linfoidi vanno incontro ad espansione clonale sostituendo le cellule emopoietiche normali. Numerosi studi hanno indagato le alterazioni del microambiente midollare dei pazienti affetti da LAL, ma ad oggi non sono ancora stati ben caratterizzati i componenti dello stroma di questi pazienti. In questo studio, abbiamo caratterizzato le cellule stromali mesenchimali (MSCs) isolate da pazienti pediatrici affetti da LAL (LAL-MSCs) dal punto di vista fenotipico, funzionale e genetico.

METODI: Le MSCs sono state isolate ed espanse *ex vivo* dal midollo osseo di 45 pazienti pediatrici affetti da LAL (età media: 5 anni; range: 1-17) a diversi tempi: all'esordio, definito come tempo 0, ed ai giorni +15, +33 e +78 dall'inizio del protocollo chemioterapico dell'Associazione Italiana Ematologia ed Oncologia Pediatrica, AIEOP per le LAL pediatriche (Tabella 1). Le LAL-MSCs sono state successivamente caratterizzate per morfologia, capacità proliferativa (espressa come *population doublings*, PDs), immunofenotipo (mediante citofluorimetria), potenziale differenziativo, proprietà immunomodulatorie e profilo genetico. I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli ottenuti dalle MSCs isolate da midollo osseo di 41 donatori sani (HD-MSCs, MSCs da *healthy donors*; età media: 21 anni; range: 5-34). Inoltre le LAL-MSCs isolate al tempo 0 sono state paragonate alle LAL-MSCs ottenute ai tempi successivi.

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti affetti da LAL al momento della diagnosi.

Num. totale di pazienti LAL	45
Età media (range)	5 anni (1-17)
Maschi	22
Femmine	23
Immunofenotipo LAL	
Pro-B	3
Pre-B common	38
Mature B	1
T	3
Aberrazioni genetiche	
Nessuna	31
t(4;11) – MLL/AF4	2
t(12;21) – TEL/AML1	9
t(1;19) – E2A/PBX1	1
t(8;14)	1
SIL/TAL	1
Localizzazione della malattia alla diagnosi	
Midollo osseo	45
Sistema nervoso centrale	1
Mediastino	1

RISULTATI: È stato possibile isolare ed espandere le LAL-MSCs sia all'esordio sia ai tempi successivi del trattamento. La morfologia e la capacità differenziativa delle MSCs isolate dai pazienti affetti da LAL a tutti i tempi non differiscono da quelle delle MSCs isolate da donatori sani; infatti, le LAL-MSCs mostrano la caratteristica forma

affusolata e sono in grado di differenziare sia in senso adipogenico sia osteogenico. Le colture di LAL-MSCs sono state mantenute fino al passaggio 19 senza osservare alcuna alterazione nella morfologia o nel fenotipo, a qualsiasi tempo della malattia considerato. Al termine di questo periodo le LAL-MSCs sono andate incontro a senescenza, come confermato dall'arresto della crescita cellulare e dalla positività per la colorazione specifica per b-Gal. Per quanto concerne i tipici marcatori di superficie delle MSCs (positività per CD90, CD73, CD13 e CD105 e negatività per CD34, CD45 e CD31), l'immunofenotipo delle LAL-MSCs a tutti i tempi considerati e quello delle HD-MSCs sono risultati del tutto sovrapponibili. Le LAL-MSCs hanno mostrato, invece, una capacità proliferativa, espressa in termini di PDs, inferiore rispetto alle HD-MSCs ($p < 0.001$), sia all'esordio di malattia sia durante il trattamento chemioterapico (Figura 1). Le proprietà immunomodulatorie delle MSCs sono state valutate in un contesto allogeneo (LAL-MSCs/HD-peripheral blood mononuclear cells, HD-PBMCs) analizzando la proliferazione dei PBMCs di donatori sani indotta da un mitogeno (fitoemagglutina, PHA, 4 microgrammi/ml) in presenza o assenza di LAL-MSCs o HD-MSCs. Mentre le LAL-MSCs isolate all'esordio della malattia (38 pazienti considerati) si sono dimostrate in grado di ridurre la proliferazione dei PBMCs indotta da PHA fino al 62% (rapporto MSCs:PBMCs 1:2) e fino al 30% (rapporto MSCs:PBMCs 1:10), le MSCs isolate da donatori sani hanno ridotto la proliferazione dei PBMCs fino al 65% (rapporto MSCs:PBMCs 1:2) e fino al 40% (rapporto MSCs:PBMCs 1:10) ($p = N.S.$). Risultati comparabili sono stati ottenuti con MSCs isolate ai successivi tempi della malattia; in particolare sono stati testati 25 pazienti al giorno +15, 31 pazienti al giorno +33 e 27 pazienti al giorno +78 ($p = N.S.$ nel confronto con le HD-MSCs). Infine, lo studio del profilo genetico, ottenuto mediante le tecniche di citogenetica classica, di analisi con FISH e QT-PCR e di tipizzazione molecolare con array-Comparative Genomic Hybridization, non ha mostrato alterazioni cromosomiche o geniche a carico delle LAL-MSCs. Infatti, non sono state rilevate né le alterazioni cromosomiche tipiche del clone leucemico (t(4;11) – MLL/AF4 rilevata in 2 pazienti; t(12;21) – TEL/AML1 presente in 3 pazienti) né aberrazioni comparse durante la fase di espansione *ex vivo* delle cellule. Risultati sovrapponibili sono stati ottenuti per le LAL-MSCs isolate all'esordio e per le LAL-MSCs isolate dai pazienti sottoposti a chemioterapia.

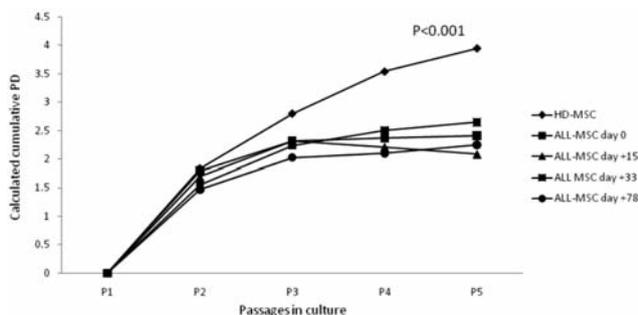


Figura 1. PDs (population doublings) cumulativi medi, calcolati dal passaggio 1 al passaggio 5, per 10 HD-MSCs e per 10 LAL-MSCs, isolate all'esordio ed ai tempi successivi della malattia (giorno +15, +33 e +78).

CONCLUSIONI: Questo lavoro dimostra che le MSCs isolate da midollo osseo di pazienti pediatriche affette da LAL all'esordio e a diversi tempi del trattamento chemioterapico mantengono la morfologia, l'immunofenotipo, la capacità differenziativa e le proprietà immunomodulatorie tipiche delle MSCs isolate da soggetti sani, mentre la loro capacità proliferativa risulta ridotta rispetto alle HD-MSCs. Pur tenendo conto dei limiti delle tecniche utilizzate, il profilo genetico delle LAL-MSCs non mostra alterazioni cromosomiche. Inoltre, le LAL-MSCs isolate all'esordio di malattia non differiscono dalle LAL-MSCs ottenute durante il trattamento chemioterapico.

P081

HYPER IGE SYNDROME (HIES): ASSOCIAZIONE GENOTIPO-FENOTIPO

L.A. Baselli,¹M. Raimondi,¹ R.M. Dellepiane,¹ R. Badolato,² P. Pavesi,¹ B. Grimbacher,³ M.C. Pietrogrande¹

¹Clinica Pediatrica 2, Università di Milano, Fondazione CàGranda IRCCS, Milano, Italy; ²Clinica Pediatrica, Istituto di Medicina Molecolare A. Nocivelli, Università di Brescia, Brescia, Italy; ³Centre for Chronic Immunodeficiency, University Medical Center Freiburg - University of Freiburg, Freiburg, Germany

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La S. da Iper IgE (HIES) o S. di Giobbe è una rara immunodeficienza sindromica caratterizzata da elevati livelli serici di IgE, grave dermatite cronica, frequenti infezioni da *S. aureus* della cute e dei polmoni con formazione di pneumatoceci, candidiasi mucocutanea cronica, facies caratteristica, anomalie scheletriche e dentarie. Sono state identificate una forma autosomica dominante (mutazioni del gene STAT3) e forme più rare autosomiche recessive con mutazione nel gene TYK2 e DOCK8, responsabili di fenotipi differenti. Obiettivo del nostro studio è stato un'attenta rivalutazione dell'associazione genotipo-fenotipo nei pazienti con diagnosi clinica e molecolare di Sindrome da Iper IgE, seguiti presso la nostra U.O.S. di Immunologia pediatrica.

METODI: Sono stati sottoposti ad indagini genetiche 9 pazienti con diagnosi clinica e immunologica di HIES (età alla diagnosi tra 2 e 37 anni); in 2 casi l'identificazione della mutazione è avvenuta post-mortem. È stato utilizzato il punteggio proposto da Grimbacher et al.¹ che valuta la probabilità che la diagnosi clinica venga confermata dalla diagnosi molecolare, attribuendo un punteggio alle caratteristiche principali della sindrome.

RISULTATI: La mutazione del gene STAT3, localizzato sul cromosoma 17, è stata individuata in 8 pazienti (6 M, 2F) e del gene DOCK8,² localizzato sul cromosoma 9, in un paziente (Tabella 1). Nel gruppo STAT3 (Tabella 2), 6 presentavano una mutazione classica, in uno era assente tutto l'esone 12. La maggior parte di questi pazienti presentavano score clinici NHI¹ superiori a 60, valore indicativo di diagnosi certa. In questi pazienti erano presenti facies tipica, anomalie dentarie (ritenzione dei denti decidui, ritardo nell'eruzione dei denti permanenti, malocclusione, prognatismo), dermatite dal primo anno di vita, ripetuti ascessi freddi, infezioni respiratorie ricorrenti e formazione di pneumatoceci. Uno di questi pazienti, con diagnosi all'età di 37 anni, è deceduto per patologia neoplastica. Nel paziente C.V., score 58 e fenotipo "mild", è stata identificata una nuova mutazione missense nell'esone 22. Del gruppo STAT 3 con mutazione classica solo il paziente R.F. (età 13 anni), presentava score clinico di 45, indicativo di diagnosi probabile, ma presentava familiarità per la sindrome (padre affetto, con mutazione STAT 3). Mutazione del gene DOCK8 è stata riscontrata in un solo paziente con score NHI 49 e caratteristiche cliniche differenti: lievi anomalie facciali e dentarie, interessamento polmonare prevalentemente interstiziale con assenza di pneumatoceci e leucoencefalopatia multifocale progressiva da infezione da JC virus con exitus all'età di 8 anni.

Tabella 1.

Pz	Anno di nascita	Età alla diagnosi	Score*	Mutazione
A.G.	1961	37 (1997)	66	STAT3
A.J.	1993	3 (1996)	63	STAT3
I.G.	1979	25 (2004)	76	STAT3
C.M.	1969	12 (1981)	68	STAT3
M.S.	1983	11 (1994)	65	STAT3**
C.V.	1985	12 (1997)	58	STAT3***
R.L.	1966	17 (1983)	73	STAT3
R.F.	1999	13 (2012)	45	STAT3
S.F.	1991	6 (1997)	49	DOCK8

*The aged normalized nih-hies scoring system - Grimbacher et al, Am J Hum Genet, 1999; **Assente tutto l'esone 12; ***Mutazione missense nell'esone 22 (fenotipo mild).

CONCLUSIONI: Le differenti mutazioni geniche responsabili della HIES hanno finalmente fornito una spiegazione patogenetica delle diverse caratteristiche cliniche dei nostri pazienti, in particolare delle infezioni da piogeni nei pazienti con mutazione STAT3 e delle gravi infezioni virali nei pazienti con mutazione DOCK8. Lo score recentemente proposto dalle linee guida per i pazienti HIES³ sarà di ausilio al clinico per individuare i pazienti con mutazione STAT3.

Tabella 2.

Caratteristiche cliniche e di laboratorio dei pazienti con mutazione di STAT3	C.M.	C.V.	A.J.	I.G.	M.S.	A.G.	R.L.	R.F.
IgE > 2000 UI/ml	+	+	+	+	+	+	+	+
IgE totali UI/ml	13100	43020	9298	3211	90744	5040	8117	4725
Eosinofilia	+	+	+	+	+	+	+	-
Ascessi cutanei	+	+	+	+	+	+	+	-
Infezioni respiratorie ricorrenti	+	+	+	+	+	+	+	+
Pneumatoceci	+	+	-	+	+	+	+	+
Eczema	+	+	+	+	+	+	+	+/-
Candidiasi mucocutanea	+	+	+	+	+	+	+	+
Ritenzione denti primari	+	+	+	+	+	+	+	+
Facies tipica	+	+	+	+	+	+	+/-	+
Mutazione STAT3	Classica	Mutazione missense nell'esone 22	Classica	Classica	Assente tutto l'esone 12	Classica	Classica	Classica
Età (anni)	40	24	16	31	26	Dec 37	46	13
NHI Score*	68	58	63	76	65	66	7	45

*Scoring system descritto in Grimbacher et al. Am J Hum Genet 1999; 65:735-44; 0-15: paziente non affetto; 16-39: diagnosi possibile; 40-59: diagnosi probabile; ≥60: paziente affetto.

Bibliografia:

1. Grimbacher B et al: N Engl J Med 1999; 340:692-702.
2. Engelhardt KR et al: J Allergy Clin Immunol. 2009; 124:1289-302.
3. Woellner C et al: J Allergy Clin Immunol 2010; 125:424-32.

P082

LA QUALITÀ DELLA VITA NEI PAZIENTI PEDIATRICI IN TERAPIA PER PATOLOGIE ONCOEMATOLOGICHE

L. Bonadies, M. Montanaro, E. Viscardi, M.C. Putti, G. Basso

Clinica di Oncoematologia Pediatrica, Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino, Ospedale Universitario di Padova, Padova, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La misurazione dello stato di salute e della qualità di vita (QdV) ha assunto quindi negli ultimi anni un significato clinico di notevole rilievo, in particolare nei pazienti pediatrici affetti da patologie oncoematologiche. Dalla maggior parte delle ricerche condotte in tale ambito, emerge che in media i pazienti guariti sperimentano una QdV pari a quella dei soggetti sani; sono stati comunque individuati molti fattori che sembrano correlare con una QdV inferiore in alcuni dei domini indagati. Pochi risultano, invece, gli studi, che valutano la QdV durante le diverse fasi del trattamento.¹ Lo scopo principale di questo studio è quello di valutare la QdV di un campione di 30 pazienti in età pediatrica (2-18 anni), affetti da patologie oncoematologiche e ricoverati presso il Reparto della Clinica di Oncoematologia Pediatrica del Dipartimento della Salute della Donna e del Bambino dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova. In particolare, hanno preso parte allo studio i pazienti dagli 8 ai 18 anni, entrambi i genitori dei pazienti dai 2 ai 18 anni e gli infermieri di questi nel corso di un ricovero, per eseguire le terapie o per altri motivi. Scopi secondari sono invece: osservare la concordanza tra le diverse prospettive indagate e valutare l'influenza di variabili sociodemografiche e cliniche sulla QdV.

METODI: Sono stati somministrati ad ogni famiglia un questionario anamnestico per la raccolta delle variabili socio demografiche, un questionario generico per la valutazione della QdV versione bambino (EQ-5D)² ed un questionario specifico (PedsQL® Cancer Module),³ sempre per la valutazione della QdV, nella versione genitori, infermiere e bambino (se di età maggiore di 8 anni). Il questionario EQ-5D è composto da 2 sezioni, la prima studia 5 dimensioni della qualità della vita del soggetto valutato, sia esso malato o meno. Precisamente: Mobilità, Cura della Persona, Attività Abituali, Dolore e/o Fastidio, Ansia e/o Depressione, permettendo di descriverle con 5 modalità di risposta da "Non ho alcuna difficoltà" a "Non sono in grado". La seconda sezione include una scala visuoanalogica tramite cui il soggetto può valutare la sua salute attuale su di una scala da 0 a 100. Il questionario PedsQL valuta invece 4 subscale della QdV (Funzionamento Fisico,

Funzionamento Emotivo, Funzionamento Scolastico e Funzionamento Sociale) utilizzando 27 items specifici per la situazione del paziente oncoematologico. Ogni item prevede una valutazione secondo una scala da 0 a 4, dove 0 corrisponde a mai e 4 a quasi sempre. I punteggi sono stati successivamente convertiti in una scala da 0 a 100 (dove 0 corrisponde al paziente deceduto e 100 al paziente con una perfetta QdV). Per i pazienti minori di 5 anni sono state rimosse 2 domande dal questionario dei genitori poiché difficilmente valutabili in tale fascia di età. L'analisi statistica è stata condotta mediante il programma SPSS ver. 20.0.

RISULTATI: Sono stati arruolati 38 pazienti con le loro famiglie ed i loro infermieri; hanno accettato di partecipare e riconsegnato i questionari 30 famiglie (di cui due mancanti del questionario paterno, uno di quello materno e uno del PedsQL del paziente), soli 12 infermieri hanno riconsegnato la loro versione del questionario compilata. Il campione è risultato essere equamente diviso tra maschi e femmine, con un'età media di 8,49 anni alla valutazione, un'età media alla diagnosi di 7,94 anni e quindi una durata media di malattia pari a 0,55 anni. 13 pazienti erano affetti da tumori di tipo solido, 17 da tumori di origine linfoemopietica. 24 erano stati trattati con la sola chemioterapia, 6 anche con chirurgia e 4 anche con radioterapia. I risultati emersi dall'EQ-5D evidenziano una buona QdV in generale, secondo la prospettiva dei pazienti. Data la ridotta numerosità di soggetti maggiori di 8 anni, non si sono raggiunte correlazioni significative per i domini di questo questionario, ma si sono evidenziati dei trend interessanti illustrati nella Tabella 1.

Tabella 1.

Subscala EQ-5D	Correlazioni	Trend
Capacità di movimento	nessuna	Peggiora se sottoposto a chirurgia (p=0,063)
Cura della persona	nessuna	Peggiora nelle femmine (p=0,09)
Attività abituali	nessuna	Peggiora per sottoposti a chirurgia (p=0,07) e per i tumori solidi (p=0,098)
Dolore o fastidio	nessuna	Peggiora nelle femmine (p=0,10)
Ansia o depressione	nessuna	Nessuna

Per quanto riguarda invece il questionario PedsQL (Tabella 2), il dominio maggiormente compromesso risulta essere quello relativo al *Funzionamento Fisico*, mentre nel *Funzionamento Scolastico* e *Sociale* i pazienti sembrano ottenere i punteggi più elevati secondo tutti i valutatori. In generale, i pazienti attribuiscono dei punteggi migliori rispetto alle valutazioni di entrambi i genitori in tutti i domini della QdV.

Tabella 2.

	N	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
PedsQL madri funz. FISICO	29	18,75	87,50	53,1866	17,93818
PedsQL madri funz. EMOTIVO	29	15,63	100,00	63,5618	22,64164
PedsQL madri funz. SCOLASTICO	29	45,00	100,00	74,8262	14,46933
PedsQL madri funz. SOCIALE	29	30,00	100,00	69,2794	18,56345
PedsQL madri funz. TOTALE	29	29,00	90,38	63,6423	14,60744
PedsQL padri funz. FISICO	28	25,00	90,63	56,6325	19,27114
PedsQL padri funz. EMOTIVO	28	15,63	100,00	65,9182	20,58939
PedsQL padri funz. SCOLASTICO	28	45,00	100,00	78,3014	15,95294
PedsQL padri funz. SOCIALE	28	37,50	100,00	73,7780	18,72540
PedsQL padri funz. TOTALE	28	32,00	93,52	66,4525	15,16428
PedsQL infermieri funz. FISICO	12	21,88	96,88	57,5521	23,13568
PedsQL infermieri funz. EMOTIVO	12	9,38	84,38	55,9896	26,26279
PedsQL infermieri funz. SCOLASTICO	12	25,00	100,00	68,4025	21,79307
PedsQL infermieri funz. SOCIALE	12	25,00	91,66	69,7883	20,26599
PedsQL infermieri funz. TOTALE	12	33,00	87,50	60,6027	20,62660
PedsQL pazienti funz. FISICO	16	37,50	90,63	61,7187	15,07360
PedsQL pazienti funz. EMOTIVO	16	40,63	96,88	72,9734	16,54894
PedsQL pazienti funz. SCOLASTICO	16	50,00	100,00	81,2500	18,11997
PedsQL pazienti funz. SOCIALE	16	37,50	100,00	74,9985	20,06977
PedsQL pazienti funz. TOTALE	16	48,15	88,46	71,3189	11,98134

I punteggi attribuiti dai padri alla QdV dei propri figli risultano essere migliori rispetto a quelli delle madri, mentre gli infermieri hanno una peggior percezione della QdV dei piccoli pazienti. Si sono evidenziate diverse correlazioni tra i domini della QdV e le variabili socio-demografiche (soprattutto con sesso e reddito familiare) e le variabili cliniche (come tipo di patologia e trattamento).

Inoltre, si è dimostrata una buona concordanza tra le rilevazioni dei pazienti e quelle dei genitori (soprattutto con il care-giver principale), non con quelle degli infermieri (Tabella 3). Sono state infine valutate le concordanze tra le diverse subscale dei due questionari, mostrando come spesso le subscale che valutano la stessa dimensione risultino correlate tra loro (Tabella 4).

Tabella 3.

	Correlazioni	Prospettive	Trend	Prospettive
Funzionamento totale	Peggior nel sesso femminile	I		
	Peggior per i T. solidi	M	Peggior per i T. solidi	P
	Migliore se padre più anziano	P	Migliore se madre più anziana	P
	Migliore nei redditi più alti	M, P, B		
	Peggior nei sottoposti a chirurgia	M	Peggior nei sottoposti a chirurgia	B
Funzionamento fisico	Peggior nel sesso femminile	I		
	Peggior per i T. solidi	M		
	Peggior nei sottoposti a chirurgia	M	Peggior nei sottoposti a chirurgia	P
Funzionamento emotivo	Peggior nel sesso femminile	I	Migliore se padre più anziano	P
	Migliore nei redditi più alti	M, P	Migliore nei redditi più alti	B
Funzionamento scolastico	Peggior nel sesso femminile	I	Migliore nel sesso femminile	B
	Migliore se padre più anziano	P		
	Migliore nei redditi più alti	P		
Funzionamento sociale	Peggior nel sesso femminile	I	Peggior per i T. solidi	M
	Migliore nei redditi più alti	M, P, B	Migliore se maggior tempo trascorso dalla Dgn	B
	Peggior nei sottoposti a chirurgia	M	Peggior nei sottoposti a chirurgia	B

I=infermieri; M=Madri; P=padri; B=bambini.

Tabella 4.

Domini EQ-5D (Punteggi maggiori=funz. peggiore)	Subscale PedsQL correlate (Punteggi maggior=funz. migliore)	Tipo di correlazione
Capacità di movimento	Funzionamento TOTALE	Indiretta
	Funzionamento FISICO	Indiretta
Cura della persona	Funzionamento EMOTIVO	Indiretta
Svolgimento delle attività abituali	Funzionamento SOCIALE	Indiretta
Dolore e/o fastidio	Funzionamento SCOLASTICO	Diretta
Ansia e/o depressione	Funzionamento EMOTIVO	Indiretta

CONCLUSIONI: Lo studio ha mostrato come la QdV dei pazienti pediatrici in trattamento per patologie oncoematologiche sia nel complesso discreta. Risulta quindi utile studiare la QdV di questi pazienti, adottando diverse prospettive di valutazione (bambino, genitori, infermieri), per comprendere i possibili fattori influenti e attuare gli interventi più adeguati per migliorarla. Per quanto riguarda le modalità di rilevazione della QdV, quando possibile, è sempre preferibile valutare la prospettiva dei pazienti. La rilevazione da parte dei genitori risulta fondamentale, sia per completare l'autovalutazione fornita dai pazienti in età scolare che per stimare la QdV nei bambini più piccoli, non dotati delle competenze linguistiche e cognitive, necessarie per compilare autonomamente un questionario. Le madri, essendo più spesso deputate alla "care" del paziente, rappresentano un punto di vista importante da considerare nella misurazione della QdV in età pediatrica. Per quanto riguarda la prospettiva degli infermieri, data la bassa numerosità di rilevazioni ottenute, non si possono trarre conclusioni affidabili sulla loro validità, per cui si rende necessario approfondire lo studio in tale ambito. Nonostante negli ultimi anni la ricerca abbia fatto numerosi progressi in campo medico e psicologico, le ricerche sulla QdV non si possono ancora considerare ultimate, per cui sembrerebbe importante includere una valutazione di routine della QdV all'interno dei diversi studi clinici, per consentire di individuare ed affrontare precocemente le problematiche causate dalla malattia e dal trattamento, mediante l'attuazione di interventi psico-sociali adeguati.

Bibliografia:

1. McDougall J and Tsonis M.: *Quality of life in survivors of childhood cancer: a systematic review of the literature (2001-2008)*. Support.Care Cancer 2009 17: 1231-1246.
2. Ravens-Sieberer U, Wille N, Badia X, Bonsel G, Burstrom K, Cavrini G, Devlin N, Egmar AC, Gusi N, Herdman M, Jelsma J, Kind P, Olivares PR, Scalone L, Greiner W.: *Feasibility, reliability, and validity of the EQ-5D-Y: results from a multinational study*. Qual.Life Res. 2010 19: 887-897.
3. Varni JW, Burwinkle TM, Katz ER, Meeske K, Dickinson P.: *The PedsQL in pediatric cancer: reliability and validity of the Pediatric Quality of Life Inventory Generic Core Scales, Multidimensional Fatigue Scale, and Cancer Module*. Cancer 2002 94: 2090-2106.

P083

QUALITÀ DI VITA PERCEPITA IN 148 PAZIENTI GUARITI DA TUMORE AVUTO IN ETÀ PEDIATRICA

M. Tremolada,¹ S. Schiavo,¹ S. Bonichini,² D. Aloisio,² G. Basso,¹ M. Pillon¹

¹Dipartimento della Salute della Donna e del Bambino, Clinica di Oncoematologia Pediatrica; ²Dipartimento di Psicologia dello Sviluppo, Università di Padova, Padova, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: L'efficacia dei protocolli terapeutici per i tumori in età pediatrica è gradualmente e progressivamente migliorata negli ultimi 20 anni e le possibilità di guarigione globale delle patologie emato-oncologiche dell'infanzia è superiore al 70% (Ries et al., 2005). Questo dato positivo solleva, però, una preoccupazione sulla possibile influenza negativa delle diverse patologie tumorali e delle cure associate sullo sviluppo fisico, emotivo, psicologico e sociale dei giovani pazienti. La letteratura

sull'argomento non è concorde: ci sono studi che mostrano come i ragazzi guariti dichiarino meno problematiche di fatigue, di sintomi depressivi e una miglior benessere psico-sociale rispetto alle norme (Goordijn et al., 2013; Harila et al., 2010); mentre altri studi sottolineano come la qualità di vita percepita dai ragazzi fuori terapia sia significativamente inferiore rispetto a gruppi di controllo (Kanellopoulos et al., 2013; Zeltzer et al., 2008). Fattori di rischio predisponenti possono essere: genere femminile, basso livello educativo ed economico, radioterapia, percezione negativa del proprio stato di salute, effettive problematiche fisiche, tra cui perdite funzionali dovute alla malattia (Zeltzer et al., 2009). La mancanza nel contesto italiano di studi relativi a questo argomento ha portato alla realizzazione del presente studio focalizzato su uno screening riguardante un'eventuale sintomatologia da trauma e sulla percezione della propria salute nei ragazzi guariti.

METODI: Partecipanti e procedura. In occasione delle visite di controllo annuali presso il Day-Hospital dell'Oncoematologia Pediatrica dell'Ospedale di Padova a 148 pazienti maggiorenni (range 18-25 anni) guariti da tumore avuto in età pediatrica sono stati proposti, previo firma del consenso informato, dei questionari da compilare a casa e restituire via posta tramite busta pre-affrancata. L'età media dei pazienti fuori terapia è 20.98 (DS=2.14), 82 maschi e 66 femmine. L'età media alla diagnosi è 9.02 (DS=4.50), 71 curati per tumore ematologico e 77 per tumore solido, con una media di anni passati dallo stop terapia di 10.25 (DS=4.54). **Strumenti.** 1. Questionario socio-demografico: è utilizzato per la rilevazione di informazioni utili a capire il livello socio-economico e culturale del giovane fuori terapia e della sua famiglia; 2. SF-36 (Ware & Sherbourne, 1992; vers. ital. Apolone et al., 2000): L'SF-36 è un questionario sullo stato di salute dell'adolescente e del giovane adulto che è multi-dimensionale articolato attraverso 36 domande che permettono di assemblare 8 differenti scale: Funzionamento fisico, Limitazioni di ruolo dovute alla salute fisica, Benessere emotivo, Limitazioni di ruolo dovute al benessere emotivo, Energy/fatigue, Funzionamento sociale, Dolore e Benessere generale. È possibile individuare i dati normativi per ogni singola scala e successivamente confrontare le norme con i punteggi ottenuti dal nostro campione: ciò permette di rilevare, anche mediante calcolo dei percentili, come si collocano i partecipanti allo studio rispetto alla media del 50° percentile e rispetto al campione normativo in generale; 3. SCALA PTSD (CCSS): è un questionario composto da 17 items che misurano la sintomatologia del Disturbo Post-traumatico da Stress, che può insorgere dopo un evento stressante. Questo questionario è stato adattato dal LTFU Study, metodologia usata nel CCSS Childhood cancer survivor study e l'affidabilità è buona (Tremolada et al., 2012).

RISULTATI: I giovani guariti presentano una media di 3.56 (DS=3.31) sintomi legati al disturbo post traumatico da stress (DPTS) (minimo 0, massimo 15). Sono stati poi calcolati gli indici di rischio tenendo conto dei seguenti punteggi di Cut-off: ≤5=non disordine conclamato, 6-8=moderata presenza del disturbo e ≥9=marcata severità (Frederick, 1985). Le frequenze mostrano come 117 non abbiano sintomatologia conclamata (79.1%), 15 abbiano una sintomatologia subclinica (10.1%) e 16 una sintomatologia clinica (10.8%). I sintomi totali di DPTS sono associati in modo significativo (Correlazione di Pearson a due code) con molte scale dell'SF-36, sottolineando la validità convergente dei due strumenti. I risultati relativi allo stato di salute percepito nei 148 giovani adulti sono inseriti nella Tabella 1.

Tabella 1.

Scala SF-36	N(%) < 25° percentile	N(%) 25° percentile	N(%) 50° percentile	N(%) 75° percentile	TOT
Funzionamento fisico	28 (18.9)	30 (20.3)	0	90 (60.8)	147
Limitazioni di ruolo dovute alla salute fisica	41 (27.9)	0	0	106 (72.1)	148
Benessere emotivo	59 (42.8)	22 (15.9)	11 (8)	46 (33.3)	138
Limitazioni di ruolo dovuto al benessere emotivo	55 (37.7)	14 (9.6)	0	77 (52.7)	146
Energy/fatigue	89 (60.5)	21 (14.3)	17 (11.6)	20 (13.6)	147
Funzionamento sociale	59 (40.1)	22 (15)	19 (12.9)	47 (32)	147
Dolore	57 (38.8)	9 (6.1)	0	81 (55.1)	147
Benessere generale	110 (74.8)	0	0	37 (25.2)	147

Per analizzare le differenze di genere fra le percentuali di giovani con punteggi nelle 4 categorie (< 25° percentile, 25° percentile, 50° percentile e 75° percentile) nelle diverse scale dell'SF-36 è stato utilizzato il test non parametrico Chi Quadrato. Il test è risultato statisticamente significativo per la scala Limitazioni di ruolo dovute al benessere emotivo [$X^2(2)=23.86$; $p=0.0001$], per la scala Benessere emotivo [$X^2(3)=11.95$; $p=0.008$] e del Funzionamento sociale [$X^2(3)=14.74$; $p=0.002$] con le ragazze che riportano maggiori problematiche in queste aree rispetto ai ragazzi. Non sono emerse invece altre differenze significative in tali scale utilizzando le variabili mediche come indipendenti.

CONCLUSIONI: I giovani adulti guariti da una patologia tumorale avuta in età pediatrica dichiarano importanti difficoltà nel loro stato di salute soprattutto per quel che riguarda il loro benessere emotivo e le limitazioni legate ad esso, l'affaticamento, il funzionamento sociale e il benessere generale. Nonostante questo, solo una ristretta minoranza (10.8%) riporta in maniera rilevante sintomi da trauma post-traumatico. Le femmine rispetto ai maschi sono maggiormente a rischio soprattutto nel benessere emotivo e nelle limitazioni legate ad esso e nel funzionamento sociale. Nessuna variabile di tipo medico (come anni passati dallo stop terapia, età alla diagnosi, tipo di diagnosi) è predittiva dello stato di salute percepito dai giovani guariti. L'intento finale è quello di utilizzare tali informazioni per fornire un'assistenza più mirata e funzionale ai ragazzi fuori terapia che sono stati curati per malattie ematologiche, individuando quei fattori che possano agevolare una buona percezione della loro vita.

P084

CARATTERIZZAZIONE DELL'EFFETTO IMMUNOMODULATORIO DELLE MICROVESCICOLE ISOLATE DA CELLULE MESENCHIMALI STROMALI MIDOLLARI UMANE SULLE CELLULE DEL SISTEMA IMMUNE

A. Conforti, M. Scarsella, E. Giorda, S. Biagini, N. Starc, G. Li Pira, A. Proia, R. Carsetti, F. Locatelli, M.E. Bernardo

Dipartimento di Onco-Ematologia, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Le cellule mesenchimali stromali (MSCs) sono cellule multipotenti che possono essere isolate da diversi tessuti umani e che sono in grado di differenziarsi in vari tipi cellulari, tra cui osteoblasti, adipociti e cellule muscolari. Tra le varie caratteristiche oggetto di molteplici studi, le MSCs hanno la capacità di esercitare uno spiccato effetto immuno-regolatorio su vari compartimenti del sistema immunitario, ad esempio inibendo la proliferazione delle cellule T indotta da allo-antigeni e mitogeni, favorendo la differenziazione di cellule T regolatorie, e modulando la proliferazione e la funzione delle cellule B. Tuttavia, ad oggi non risultano ancora completamente chiariti i meccanismi mediante i quali le MSCs esercitano il loro effetto sulle cellule del sistema immune sia *in vitro* sia *in vivo*, ed in particolare quanto questo effetto sia mediato da meccanismi di contatto cellula-cellula o da un effetto paracrino. Obiettivo del presente studio è confrontare *in vitro* le proprietà immunomodulatorie delle MSCs isolate da midollo osseo di donatori sani con quelle delle microvescicole (MVs) rilasciate dalle stesse MSCs nel surnatante.

METODI: Le MSCs sono state isolate ed espanse *ex vivo* da midollo osseo di 12 donatori sani (età media: 17 anni; range: 4-34); successivamente le MVs sono state isolate dal surnatante delle MSCs mediante ultracentrifugazione seriale e concentrazione finale. Sia le MSCs sia le MVs sono state caratterizzate mediante citofluorimetria prima di allestire gli esperimenti di co-cultura con cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) isolate da donatori sani (12 esperimenti totali con dodici donatori diversi, ogni condizione in triplicato) e stimolate con fitoemagglutina (PHA, 4 microgrammi/ml) o CpG-ODN (2,5 microgrammi/ml) per lo studio delle cellule T e B, rispettivamente. Oltre all'effetto sulla proliferazione delle cellule T e B, sono stati quantificati i fattori di crescita e le citochine rilasciate nei surnatanti delle rispettive co-culture con saggi ELISA. Risultati: Mediante citofluorimetria le MVs, isolate dal surnatante delle MSCs, sono state caratterizzate come particelle delle dimensioni di circa 1 μ m positive per CMFDA e per gli antigeni di superficie tipici delle MSCs CD107 e CD13. Mentre la positività per la colorazione con CMFDA ci ha consentito di dimostrare che le MVs sono costituite da porzioni di citoplasma delimitate da membrana e non da semplici frammenti cellulari, la positività dei marcatori CD107 e CD13 suggerisce che MVs gemmano dalla membrana delle MSCs secondo un meccanismo di estroflessione della membrana stessa.

A confronto con le MSCs isolate da donatori sani che hanno determinato un'importante riduzione della proliferazione PHA-indotta delle cellule T (inibizione dell'80% con rapporto MSCs:PBMCs 1:2; inibizione del 60% con rapporto MSCs:PBMCs 1:10), le MVs isolate dalle stesse MSCs hanno ridotto in misura minore la proliferazione delle cellule T (inibizione del 30% con le MVs diluite 1:2 nella co-cultura con PBMCs). Le MSCs si sono dimostrate in grado di inibire sia la proliferazione CpG-indotta delle cellule B (inibizione del 70%) sia l'attivazione delle plasmacellule (inibizione del 50%) con un rapporto MSCs:PBMCs 1:10; mentre le MVs hanno ridotto la proliferazione delle cellule B e l'attivazione delle plasmacellule fino ad una percentuale massima del 60% e del 30%, rispettivamente (in entrambi i casi con le MVs diluite 1:2 nella co-cultura con PBMCs). L'analisi dei fattori solubili rilasciati nel surnatante ed effettuata mediante ELISA ha mostrato la presenza di elevati livelli di IL-6, IL-10, IL-17, TGF β , GM-CSF e HGF e di bassi livelli di IL-2 e IFN γ nei surnatanti delle co-culture MSCs-PBMCs stimolati con PHA, mentre dall'analisi dei fattori solubili rilasciati dalle MVs nella co-cultura è risultata una minor produzione delle citochine inibitorie (IL-10 e TGF β) ed un aumento di IFN γ rispetto alla controparte cellulare. Risultati comparabili sono stati ottenuti dalla quantificazione delle citochine nei surnatanti delle co-culture MSCs-PBMCs e MVs-PBMCs stimolati con CpG. Conclusioni: Questo studio dimostra una minore efficacia delle MVs isolate da MSCs umane di origine midollare nell'indurre un'inibizione della proliferazione T-cellulare *in vitro* rispetto alla controparte cellulare. I nostri dati suggeriscono che, per quanto i fattori solubili rilasciati dalle MSCs nel surnatante e nelle MVs siano importanti nell'indurre l'effetto immunomodulatorio *in vitro* su cellule T e B, questo effetto si basa anche su meccanismi di contatto cellula-cellula.

P085

LA BIOBANCA BIT-AIEOP: NUOVE PROSPETTIVE PER LA PROGNOSI E TRATTAMENTO DEL NEUROBLASTOMA

F. Blengio,¹ M.V. Corrias,² A. Pezzolo,² P. De Filippi,³ R. Amendola,⁴ M. Conte,⁵ A. Garaventa,⁵ M. Izzo,¹ C. Gambini,⁶ V. Pistoia,² L. Varesio¹

¹Laboratorio Biologia Molecolare; ²Laboratorio Oncologia, IRCCS, Istituto Giannina Gaslini, Genova; ³Università di Torino, Centro di Bioteologie Molecolari, Torino; ⁴ENEA, UT Biorad-Rab, Roma; ⁵UOC Ematologia e Oncologia Pediatrica; ⁶UO Anatomia Patologica, IRCCS, Istituto Giannina Gaslini, Genova, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La Biobanca BIT dell'Istituto Gaslini è la prima biobanca di tessuto impegnata nella conservazione e caratterizzazione di campioni di tessuto e derivati genomici, nella caratterizzazione molecolare di tale materiale a livello di RNA e DNA, nella diffusione dei risultati e nelle applicazioni di bioinformatica clinica. La Biobanca BIT è il prototipo della moderna Biobanca Integrata finalizzata all'acquisizione e diffusione dell'informazione. La collaborazione tra la Biobanca BIT e i centri AIEOP ha portato alla costituzione di una biobanca BIT-AIEOP ed all'analisi centralizzata di oltre 200 campioni di tessuto di Neuroblastoma primario nonché di dati clinici, biologici e molecolari che appropriatamente analizzati e condivisi, hanno portato a numerosi ed interessanti risultati alcuni dei quali sono qui ripostati.

METODI: Il materiale biologico e le informazioni cliniche sono centralizzate nella biobanca BIT-AIEOP e nel registro Neuroblastoma grazie ad un accordo e alla collaborazione tra centri AIEOP. DNA e RNA vengono estratti dopo la caratterizzazione istopatologica. Il DNA è analizzato tramite CGH array e l'RNA messaggero tramite microarray sulla piattaforma Affymetrix U133p2, ed i miRNA mediante RT-qPCR nel ViiA7 LifeTechnology. I dati sono elaborati tramite apposito software o con approcci bioinformatici dall'Unità di Bioinformatica Clinica. I dati sono raccolti in banche dati di nuova generazione adatte ad essere condivise tra utenti diversi e disponibili per progetti scientifici.

RISULTATI: La biobanca in 3 anni di attività ha raccolto un ingente quantità di materiale. Abbiamo completa caratterizzazione (Patologia, CGH array, espressione genica) di circa 200 campioni di tessuto tumorale primario. Stiamo procedendo all'analisi dell'espressione di 377 miRNA in 80 campioni di sangue midollare ed 80 di sangue periferico di pazienti con NB stadio 4. Le informazioni relative a pazienti e campioni sono stati archiviati su un database MySQL, accessibile ad utenti autorizzati tramite applicazione web. Dati e file relativi alla caratterizzazione genomica sono archiviati e condivisi in

maniera distribuita su un data Grid,¹ gestito dal software iRODS.² Un approccio distribuito permetterà di connettere i centri AIEOP per condividere sia i dati grezzi che le applicazioni per successive analisi. Un prototipo di data Grid tra l'Istituto Gaslini e l'Università di Genova è stato eseguito e verrà presentato al congresso. Questo sistema permette di condividere non solo i dati ma anche il potenziale di analisi associato alla biobanca. L'attività della BIT intesa come raccolta, caratterizzazione ed analisi molecolare del campione associata al gruppo di Bioinformatica Clinica ha permesso di realizzare interessanti progressi nel campo della biologia del Neuroblastoma e di identificare nuovi fattori prognostici per stratificare i pazienti in gruppi di rischio. Analisi di oltre 200 tumori caratterizzati per espressione genica tramite microarray, hanno permesso di validare e definire il valore prognostico della signature di 32 geni che definisce l'ipossia tumorale del Neuroblastoma e permette la sua quantificazione a livello di tessuto.³ L'analisi informatica è stata estesa ad algoritmi in grado di tradurre i risultati in regole facilmente condivisibili e questo processo ha portato all'individuazione di un gruppo di pazienti ad alto rischio che possono essere stratificati in base al contenuto ipossico del tumore. Studi collaborativi sono stati effettuati sulla Spermine oxidase (SMOX), il solo enzima capace di ossidare la spermina a produrre spermidina e H₂O.⁴ Studi su linee cellulari, confermati dai profili di espressione sui tumori primari centralizzati in biobanca, hanno dimostrato che SMOX è un nuovo biomarcatore di progressione, capace di individuare i pazienti a maggior rischio. L'analisi del DNA è stata essenziale per definire le alterazioni cromosomiche ascrivibili a cambiamenti numerici o strutturali da cui dipende in alcuni casi la scelta della strategia terapeutica. Sono stati analizzati i geni localizzati nei punti di rottura cromosomica ottenendo interessanti risultati di potenziale valore prognostico. Ad esempio, la proteina 140Cap è codificata dal gene SRCIN1 localizzato sul cromosoma 17q12.1.⁵ Il gain del cromosoma 17q costituisce un fattore di rischio e i risultati degli studi indicano come l'inattivazione di SRCIN1 e/o altri geni localizzati nella rottura, possano ridurre l'attività di p140Cap, che è un gene oncosoppressore, e favorire la crescita del neuroblastoma. Un'estensione di questa analisi ha messo in evidenza ulteriori geni localizzati in zone di alterazioni cromosomica di potenziale interesse per la biologia del neuroblastoma, quali STAT5A presente nel punto di rottura in 17q21.2. Recentemente, abbiamo iniziato l'analisi delle potenziali relazioni prognostiche dell'espressione di MYCN, C-MYC e valutazione istopatologica.⁶

CONCLUSIONI: Abbiamo caratterizzato oltre duecento tumori primari, un numero di tutto rispetto, soprattutto se relative ad un tumore raro quale il Neuroblastoma. L'analisi integrata di questo materiale secondo il modello proposto dalla biobanca BIT ha portato ad interessanti scoperte e a nuovi filoni di ricerca. Specificamente abbiamo validato il valore prognostico della signature genomica dell'ipossia ed identificato numerosi candidati come potenziali biomarcatori e/o fattori prognostici del neuroblastoma (SMOX, SRCIN1). Risulta evidente come la biobanca BIT sia stata un importante elemento per coagulare gli sforzi dei centri AIEOP ed abbia proposto un valido modello per il progresso della ricerca clinica. La condivisione dei dati e della loro analisi tramite la rete Grid sarà strumentale per un ulteriore slancio nella ricerca clinica e biologica sul neuroblastoma e per validare e tradurre nella pratica clinica nuovi fattori prognostici.

Bibliografia:

1. Bote-Lorenzo ML, Dimitriadis YA and Gomez-Sanchez E (2004) Grid characteristics and uses: a grid definition, Proceedings of the First European Across Grids Conference, ACG'03, Springer-Verlag, LNCS 2970, 291-298. doi:10.1007/978-3-540-24689-3_36
2. Rajasketar A, Moore R, Hou C et al. (2010) iRODS Primer: Integrated Rule-Oriented Data Systems. Morgan & Claypool. doi:10.2200/S00233ED1V01Y200912ICR012
3. Fardin P, Barla A, Mosci Set al (2010) A biology-driven approach identifies the hypoxia gene signature as a predictor of the outcome of neuroblastoma patients. *Molecular Cancer* 9: 185.
4. Amendola R, Cervelli M, Fratini E et al (2009) Spermine metabolism and anticancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 9: 118-130
5. Repetto D, Aramu S, Boeri EE et al (2013) Mapping of p140Cap Phosphorylation Sites: The EPLYA and EGLYA Motifs Have a Key Role in Tyrosine Phosphorylation and Csk Binding, and Are Substrates of the Abl Kinase. *PLoS One* 8: e54931.
6. Suganuma R, Wang LL, Sano Het al (2013) Peripheral neuroblastic tumors with genotype-phenotype discordance: a report from the Children's Oncology Group and the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Pediatr Blood Cancer* 60: 363-370.

P086

IRRADIAMENTO E CARENZA DI NUTRIENTI NON MODIFICANO IL FENOTIPO, LA FUNZIONALITÀ ED IL PROFILO GENETICO DELLE CELLULE MESENCHIMALI STROMALI ISOLATE DA MIDOLLO OSSEO DI DONATORI SANI

S. Biagini, A. Conforti, N. Starc, G. Li Pira, A. Proia, F. Locatelli, M.E. Bernardo

Dipartimento di Onco-Ematologia, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Le cellule mesenchimali stromali (MSCs) sono cellule multipotenti localizzate in vari tessuti umani, incluso il midollo osseo, in cui sostengono la componente emopoietica regolandone crescita e funzioni. È ormai dimostrato che l'esposizione del midollo osseo a radiazioni ionizzanti provoca la rapida deplezione dei progenitori emopoietici, ma ad oggi non sono ancora stati chiariti gli effetti dell'irradiamento sulla componente stromale del midollo. Inoltre, pur essendo stati pubblicati alcuni studi sulla capacità proliferativa delle MSCs in condizioni di carenza nutritiva, non è stato ancora approfondito il comportamento delle MSCs sottoposte a tale stress chimico. Nel presente studio abbiamo esaminato il fenotipo, il potenziale differenziativo, le proprietà immunomodulatorie ed il profilo genetico delle MSCs isolate da midollo osseo di donatori sani e sottoposte a irradiazione e condizioni di carenza nutritiva.

METODI: Le MSCs sono state isolate da midollo osseo di 10 donatori sani (età media: 16 anni; range: 5-32) ed espanso in presenza di terreno DMEM-LG addizionato di lisato piastrinico al 5% fino al passaggio 2. Successivamente le cellule sono state sottoposte sia a dosi crescenti di irradiazione (3.000, 10.000 e 20.000 rad) sia a condizioni di carenza nutritiva (terreno di coltura addizionato con lisato piastrinico all'1%, anziché al 5%). Sono stati quindi analizzati morfologia, capacità proliferativa, immunofenotipo (mediante citofluorimetria), potenziale differenziativo, proprietà immunomodulatorie e profilo genetico.

RISULTATI: La morfologia e la capacità proliferativa delle MSCs irradiate e poi sottoposte a carenza di fattori di crescita risultano modificate dall'induzione di stress fisici e chimici. In particolare, a dosi crescenti di irradiazione corrispondono un aumento della sofferenza cellulare (le MSCs assumono una forma più allargata, il citoplasma diventa vacuolizzato e i contorni cellulari sono meno regolari) ed un rallentamento (nel caso delle MSCs irradiate con dosi di 3.000 rad) o addirittura un arresto (nel caso delle MSCs irradiate con dosi di 10.000 e 20.000 rad) della crescita cellulare. Tuttavia abbiamo osservato che, in presenza di lisato piastrinico all'1%, pur riscontrando un rallentamento/arresto nella crescita cellulare rispetto alle MSCs non irradiate, questi effetti risultano meno accentuati, suggerendo che la carenza di fattori di crescita possa rallentare il processo di senescenza delle MSCs sottoposte a irradiazione. Le MSCs irradiate e poi sottoposte a stress da carenza di nutrienti mantengono, a tutte le dosi di irradiazione, la capacità di differenziare in senso osteogenico ed adipogenico. Per quanto riguarda l'espressione in citofluorimetria dei marcatori di superficie delle MSCs, l'immunofenotipo delle MSCs non irradiate e quello delle MSCs sottoposte a stress sono risultati sovrapponibili. Le proprietà immunomodulatorie delle MSCs sono state poi valutate in un contesto allogenico analizzando la proliferazione delle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) di donatori sani indotta dalla fitoemagglutinina (PHA, 4 microgrammi/ml) in assenza di MSCs o in presenza di MSCs irradiate e non. Le MSCs prima irradiate (3.000 rad) e poi sottoposte a carenza di fattori di crescita sono in grado di ridurre la proliferazione PHA-indotta dei PBMCs fino al 65% (rapporto MSCs:PBMCs 1:2) e fino al 20% (rapporto MSCs:PBMCs 1:10), mentre le MSCs non irradiate hanno ridotto la proliferazione dei PBMCs fino all'80% (rapporto MSCs:PBMCs 1:2; p=N.S.) e fino al 20% (rapporto MSCs:PBMCs 1:10; p=N.S.). Risultati comparabili sono stati ottenuti con MSCs irradiate con dosi maggiori (10.000 e 20.000 rad). Infine, mediante array-Comparative Genomic Hybridization (array-CGH) e studio del cariotipo con tecniche di citogenetica classica, non sono state rilevate traslocazioni sbilanciate né altre alterazioni nel corredo cromosomico. Questi risultati suggeriscono che lo stress indotto da radiazioni ionizzanti e carenza di fattori nutritivi non sembra alterare il profilo genetico delle MSCs midollari, limitatamente alle tecniche di indagine impiegate.

CONCLUSIONI: Questo studio dimostra che le MSCs umane isolate da midollo osseo e sottoposte a stress quali le radiazioni ionizzanti e condizioni di carenza di fattori di crescita, pur mostrando una morfo-

logia alterata ed un rallentamento/arresto nella capacità proliferativa, mantengono immunofenotipo, proprietà immunomodulatorie e profilo genetico tipici delle MSCs non sottoposte a stress fisico/chimico. Inoltre, tali cellule mostrano un normale profilo genetico e non vanno incontro a trasformazione neoplastica.

P087

UTILIZZO DI MICALFUNGINA PER LA PROFILASSI DELLE INFEZIONI FUNGINE INVASIVE NEI PAZIENTI RICOVERATI PER CHEMIOTERAPIA

D. Caselli,¹ A. Tondo,² D. Cuzzubbo,² E. Sieni,² T. Casini,² A. Tamburini,² F. Tucci,² M. Aricò²

¹Cure Domiciliari; ²Oncematologia Pediatrica, AOU Meyer, Firenze, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Le infezioni fungine invasive costituiscono una delle più severe complicanze infettive nei pazienti sottoposti a chemioterapia. Mentre l'incidenza delle infezioni da lieviti è in progressiva riduzione, l'aspergillosi invasiva (AI) è in aumento nei pazienti ematologici sottoposti in particolare a TCSE. L'incidenza nei bambini italiani sottoposti a chemioterapia viene riportata compresa tra 6% e 11% (Caselli Br J Haematol. 2012; Cesaro Mycoses. 2012) La mortalità è particolarmente elevata nei pazienti adulti, mentre è più limitata nei pazienti pediatrici. Nel nostro centro abbiamo riscontrato, a partire da ottobre 2012, un cluster di 12 nuove diagnosi di Infezione fungina invasiva (IFI), di cui 10 in pazienti ricoverati. Questa incidenza è molto elevata rispetto al passato (2010: 2 casi di IFI; 2011: 1 caso). Oltre agli opportuni accertamenti e bonifiche ambientali abbiamo considerato appropriato instaurare una profilassi con un farmaco antifungino dotato di uno spettro esteso che copra non solo i lieviti ma anche i funghi filamentosi in particolare l'aspergillo. La micafungina è un'echinocandina che ha indicazione della profilassi delle infezioni fungine da lieviti nei pazienti sottoposti a TCSE, ma possiede uno spettro esteso anche verso i funghi filamentosi. Sulla base di queste considerazioni le linee guida americane NCCN 2011 assegnano alla micafungina il miglior livello di evidenza (1) per la profilassi delle infezioni fungine nel paziente sottoposto ad allo-trapianto; anche le linee guida per la profilassi delle infezioni nei pazienti sottoposti a TCSE assegnano un buon livello di evidenza (B1). La nostra scelta cade quindi su questo farmaco perché: indicato in età pediatrica, indicato in profilassi, con ampio spettro di azione. L'obiettivo di questo studio è valutare: l'incidenza delle infezioni fungine da lieviti e funghi filamentosi; l'uso della terapia antifungina empirica; l'impiego della TC per la diagnosi precoce

METODI: Dal 1.12.2012 al 18.02.2013 è stata adottata la profilassi con micafungina (Mycamine®) in tutti i pazienti ricoverati nel reparto di degenza per chemioterapia e con neutropenia (<500/mm³) prevista per almeno 7 giorni. In questi pazienti la micafungina è stata somministrata alla dose giornaliera di 1 mg/kg (dose tetto 50 mg) e.v. in 1 h dall'ingresso in reparto fino alla dimissione. Eventuali altre profilassi antifungine sono state sospese durante il ricovero. Tutti i pazienti ricoverati in reparto sono stati monitorati con dosaggio del Galattomannano (GM) 2 volte/settimana e, dopo la dimissione, 1 volta/settimana. In caso di positività confermata del GM su 2 prelievi veniva eseguita TC toracica; in caso di presenza di lesioni suggestive per Aspergillosi veniva iniziata terapia con voriconazolo.

RISULTATI: In 80 giorni sono stati posti in profilassi 21 pazienti di età compresa tra 2 mesi e 21 anni (mediana: 14 anni), affetti da Leucemia (LLA 4, LMA 3), Linfoma (3) o tumore solido (NB 1, MB 2, S.Ewing 3, OS 5). Valutabili 19 pazienti per 25 ricoveri; 1 paziente viene escluso per diagnosi di IFI al 2° giorno di profilassi, 1 paziente ancora in corso. Durata del ricovero: range 2-23 gg, media 8 gg, mediana 7 gg. GM negativo in tutti i pazienti tranne tre dosaggi risultati positivi ad un punto singolo ma poi risultati falsi positivi da interferenza con altri farmaci concomitanti. Dopo un follow-up compreso tra 7 e 73 gg (mediana: 47 gg), nessun paziente ha sviluppato IFI. In 1 paziente con sintomatologia polmonare GM positivo su 2 controlli è stata eseguita TC torace risultata negativa, si è iniziata una terapia con Voriconazolo, sospesa alla positività per H1N1 e negatività GM. In nessun paziente si è ricorsi a terapia empirica. Non sono stati registrati effetti collaterali riportabili alla somministrazione di micafungina.

CONCLUSIONI: La micafungina si è dimostrata nella nostra esperienza ben tollerata, di facile utilizzo ed efficace per la profilassi delle micosi invasive in pazienti neutropenici in un contesto a rischio.

P088

RISULTATI DI UNO STUDIO DI FASE II PER VALUTARE L'EFFICACIA DEL DESAMETASONE SODIO FOSFATO INTRA-ERITROCITARIO SUI SINTOMI NEUROLOGICI DEI PAZIENTI CON ATASSIA TELEANGECTASIA

C. Donati,¹ M. Maffei,¹ A. Molinaro,² L. Palumbo,¹ G. Zani,¹ C. Mingotti,¹ M. Milanese,¹ A. Mantovani,¹ P. Ferremi,³ M. Marini,³ S. Martino,⁴ M.C. Pietrogrande,⁵ F. Specchia,⁶ R. Micheli,² A. Soresina,¹ A. Plebani¹

¹Immunologia Pediatrica, Clinica Pediatrica; ²Servizio di Neuropsichiatria Infantile; ³Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, Spedali Civili di Brescia, Brescia; ⁴Clinica Pediatrica, Università di Torino, Torino; ⁵Clinica Pediatrica II, Università di Milano, Milano; ⁶Clinica Pediatrica, Università degli Studi di Bologna, Bologna, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: L'Atassia Teleangectasia (AT) è una rara sindrome autosomica recessiva, geneticamente determinata, causata da un difetto del gene ATM, localizzato sul cromosoma 11, contraddistinta da atassia cerebellare progressiva, telangectasie oculocutanee, suscettibilità ai tumori e infezioni ricorrenti. Attualmente non esiste una terapia curativa ma soltanto terapia di supporto e adeguato follow up multidisciplinare. Nel 2006 è riportato il caso di un paziente con AT trattato con betametasona per bronchite asmatica che ha migliorato la sua sintomatologia neurologica. Studi successivi hanno confermato il miglioramento dei sintomi neurologici dopo somministrazione di terapia steroidea (betametasona) in particolare a carico dei disturbi del linguaggio, della postura e dell'atassia cerebellare. Tale miglioramento è stato messo in relazione all'effetto dei glucocorticoidi nella riduzione dei radicali liberi dell'ossigeno a livello del sistema nervoso centrale, struttura particolarmente sensibile al danno ossidativo. Sulla base dei risultati degli studi successivi che confermavano il miglioramento neurologico dopo assunzione di terapia steroidea abbiamo partecipato allo "Studio di fase II, multicentrico, a singolo braccio, in aperto della durata di 6 mesi per valutare l'efficacia del Desametasone Sodio Fosfato intra-eritrocitario sui sintomi neurologici in pazienti con Atassia Teleangectasia" coordinato dalla Prof.ssa L. Chessa dell'Università degli Studi di Roma "La Sapienza".

METODI: A Marzo 2011, al momento dello studio, sono stati valutati i 14 pazienti con AT seguiti presso l'Unità di Immunologia Pediatrica della Clinica Pediatrica dell'Università degli Studi di Brescia. Insieme al nostro gruppo di pazienti sono stati valutati 4 pazienti della Unità di Immunologia della Clinica De Marchi di Milano, un paziente dell'Unità di Immunologia della Clinica Pediatrica di Torino ed un paziente della Clinica Pediatrica di Bologna per un totale di 20 pazienti affetti da Atassia Teleangectasia tra cui individuare i pazienti idonei al nostro studio. Sono stati arruolati i pazienti che rispondevano ai seguenti criteri: Evidenze neurologiche di AT (mancanza di coordinazione di testa e occhi nella deviazione dello sguardo, atassia nell'andatura associata a base stretta inadatta); Pazienti con andatura autonoma o aiutati da supporto; Provata diagnosi molecolare di AT (minimo una mutazione ATM e/o deficit di proteina ATM al Western Blot); Maschi e Femmine di età>3 anni; Peso corporeo>15 kg; Livelli plasmatici di linfociti CD4+/mm³>=500 (per pazienti di età compresa tra 3-6 anni) o >=200 (per pazienti di età superiore ai 6 anni); Consenso informato scritto a partecipare firmato dal paziente o dai genitori (o dal tutore legale), rispettivamente se in grado o meno di comprendere lo scopo dello studio. I pazienti che hanno soddisfatto tali Criteri di Inclusion sono entrati allora nel Periodo di Trattamento di 6 mesi. Durante questo periodo si sono svolte 6 visite in ognuna delle quali è stato infuso il farmaco e una visita finale a distanza di 30 giorni dall'ultima infusione di farmaco. Del gruppo di 20 pazienti con Atassia Teleangectasia sulla base dei risultati dello screening sono stati arruolati 11 pazienti di cui 3 femmine e 8 maschi. L'età dei pazienti al momento dell'arruolamento era compresa tra i 4 e i 18 anni. Gli 11 pazienti arruolati hanno contribuito a costituire la casistica definitiva di 22 pazienti partecipanti allo studio multicentrico, raccolti insieme al Dipartimento di Neuropsichiatria infantile dell'Università degli Studi "La Sapienza" di Roma, coordinato dal Prof. V. Leuzzi. Come steroide, sulla base delle ultime ricerche farmacologiche e molecolari riguardo l'azione dei glucocorticoidi è stato scelto il Desametasone, per la somministrazione si è utilizzata una nuova modalità a lento rilascio di corticosteroidi: la veicolazione del farmaco mediata dai globuli rossi autologhi. Al paziente viene effettuato un prelievo di 50 cc di sangue in una siringa contenente eparina, successivamente, tramite l'utilizzo di un'apparecchiatura specifica, i globuli rossi del campione di sangue prelevato vengono caricati

con il Desametasone (nella sua forma inattiva); al termine del processo di caricamento il sangue viene reinfuso nel paziente in modo tale che il farmaco nei globuli rossi sia liberato in modo continuo e a basse concentrazioni nella circolazione sanguigna.

RISULTATI: Con il nostro lavoro presentiamo i risultati ottenuti dalla valutazione dei pazienti che sono stati seguiti presso il nostro Centro. Degli 11 pazienti arruolati consideriamo i risultati degli 8 che hanno completato il protocollo (01, 02, 03, 04, 05, 07, 08, 09). Innanzitutto riguardo l'obiettivo di monitorare i possibili effetti collaterali della terapia, vista anche l'innovativa modalità di somministrazione, valutando il BMI, la pressione arteriosa, la tolleranza glicemica, il quadro immunologico e i livelli di α -fetoproteina, abbiamo osservato che per nessuno dei parametri considerati ci sono state alterazioni significative nei soggetti sottoposti a trattamento con Desametasone Sodio Fosfato intra-eritrocitario. Ancora più rilevante è stato osservare che durante il periodo di studio non sono stati registrati problemi infettivi per nessuno dei pazienti arruolati. La terapia steroidea è risultata ben tollerata e non ha aumentato il rischio infettivo per i nostri pazienti AT, nonostante la loro condizione di immunodeficienza. Sicuramente, però, il risultato principale del nostro lavoro è stato quello di aver dimostrato l'efficacia del Desametasone intra-eritrocitario nell'ambito degli aspetti neurologici. Per la valutazione neurologica nelle diverse fasi dello studio è stata utilizzata la International Cooperative Rating Scale (ICARS), una scala semiquantitativa che offre una compartmentalizzata quantificazione dei disordini della postura e dell'equilibrio, dell'atassia degli arti, della disartria e dei disordini della funzione oculomotoria. I pazienti 01, 04 e 08 hanno presentato dei miglioramenti importanti nelle performance neurologiche durante il trattamento con Desametasone intra-eritrocitario, il paziente 08 ha raggiunto anche la significatività dal punto di vista statistico. Il total score del paziente 08 ha avuto un miglioramento del 14% del suo score totale, il paziente 01 del 7%, il paziente 04 del 5% e il paziente 05 del 3%. La terapia con Desametasone per via intra-eritrocitaria sembra aver ridotto in modo particolare i disturbi neurologici riguardanti la postura e la deambulazione, come è evidente per i pazienti 01, 04 e 08. Anche per la cinetica e la disartria si osservano dei miglioramenti in particolare per i pazienti 01, 02, 04, 05, 09 (Figura 1). Molto importante è anche considerare l'impatto della nostra terapia sperimentale sulla qualità di vita dei pazienti con AT e delle loro famiglie. Utile a tal proposito si è rivelata la Vineland Adaptive Behavior Scale, valutazione che permette di esplorare le abilità adattive e il loro eventuale modificarsi nel tempo. Lo steroide sembra essere efficace: in ognuno degli ambiti della VABS sono evidenti dei progressi, anche notevoli (soprattutto nell'ambito della comunicazione). I pareri dei genitori dei piccoli pazienti nella maggior parte dei casi sono stati positivi riguardo il trattamento (Figura 2).

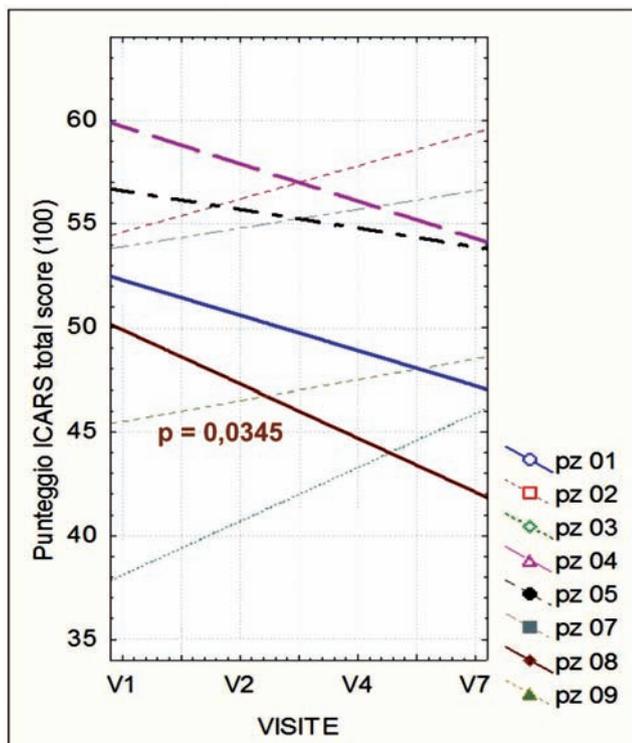


Figura 1. ICARS Total Score.

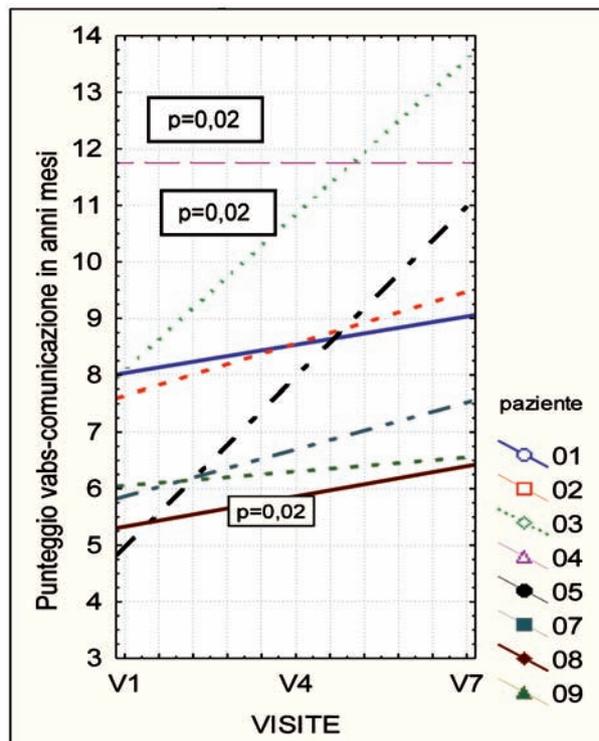


Figura 2. VABS Comunicazione.

CONCLUSIONI: In conclusione, considerando la cronicità della malattia e il suo carattere evolutivo e progressivo nel tempo, questi risultati appaiono molto incoraggianti. Pur non raggiungendo sempre la significatività statistica, il nostro studio ha però permesso di dimostrare che lo steroide è efficace e lo è principalmente sull'atassia, non sul disturbo extrapiramidale/neuropatia periferica, forse sull'aprassia oculomotoria, che è probabilmente una forma di Atassia della motilità oculare. La via di somministrazione intra-eritrocitaria del Desametasone sembra essere un sistema sicuro, ben tollerato che ha il vantaggio rispetto alla somministrazione di steroide per os di non comportare gli effetti collaterali classici di una terapia steroidea a lungo termine. I limiti principali di questa metodica sono: per i pazienti con AT e le loro famiglie, la necessità di recarsi in Ospedale ogni 21 – 28 giorni per una intera mattina, di reperire un accesso venoso ed eseguire un'autotrasfusione; per le Strutture e le Aziende Ospedaliere, i costi di acquisto e gestione del macchinario e la complessità della procedura con necessità di personale ben addestrato.

P089

DIFFERENZE CLINICHE E DI LABORATORIO NELLE Iper-IgE LEGATE A MUTAZIONI IN STAT3 E DOCK8

L. Guadrini,¹ S. Negri,¹ M. Giacomelli,² D. Moratto,¹ R. Kumar,² C. Bertulli,¹ A. Prandini,² O. Scomodon,² A. Plebani,³ R. Badolato³

¹Dipartimento di Scienze Cliniche e Sperimentali, IMM Laboratorio A. Nocivelli, Università degli Studi di Brescia, Brescia; ²Scuola di Dottorato in Scienze della Riproduzione e dello Sviluppo, Università degli Studi di Trieste, Trieste; ³Clinica Pediatrica, Dipartimento di Scienze Cliniche e Sperimentali, IMM Laboratorio A. Nocivelli, Università degli Studi di Brescia, Ospedali Civili di Brescia, Brescia, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La sindrome da Iper-IgE, sia nella forma a trasmissione autosomica dominante (AD-HIES) che autosomica recessiva (AR-HIES), è un'immunodeficienza primitiva caratterizzata da elevati livelli sierici di IgE. La forma più comune è l'AD-HIES (60-70%), dovuta a mutazioni in eterozigosi del gene codificante per la proteina signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), mentre la forma AR-HIES è legata a mutazione in omozigosi del gene codificante per il dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8); recentemente è stata identificato un ulteriore gene responsabile di un solo caso di AR-HIES: Tyrosine Kinase 2 (TYK2).

Lo studio si propone di analizzare le differenze cliniche e di laboratorio tra le due principali forme della malattia all'interno della nostra casistica.

METODI: Sono stati analizzati 20 pazienti con diagnosi di Iper-

IgE: 13 con AD-HIES e 7 con AR-HIES. Nelle Tabelle 1 e 2 sono riportate le caratteristiche cliniche e genetiche dei 13 pazienti mutati in diversi domini della proteina codificata dal gene STAT3 e dei 7 pazienti con mutazione a carico del gene DOCK8.

Tabella 1. Caratteristiche cliniche e genetiche dei pazienti con mutazione a carico di STAT3.

Età	Mutazione (aa)	Dominio	IgE U/ml	Eczema	Candidiasi	Infezioni polmonari	Ascessi	Alterazioni muscolo-scheletriche
38	V637M	SH2	1290	+	+	++	++	+
16	M660R	SH2	2000	++	++	++	++	++
3	V637M	SH2	1590	+	+	NO	+	NO
26	G342D	DNA-bi	2000	++	NO	++	++	+
3	V432L	DNA-bi	5000	++	NO	+	NO	NO
deced	R382Q	DNA-bi	na	na	na	na	na	na
37	V463del	DNA-bi	>5000	++	++	+	+	+
5	R382W	DNA-bi	3000	+	+	++	NO	NO
9	Y705H	TRAN	13600	+	++	++	++	+
45	P639L	SH2	na	na	na	na	na	na
13	P639L	SH2	na	na	na	na	na	na
1	V637M	SH2	na	na	+	+	na	na
na	V637M	SH2	na	+	++	na	++	na

Tabella 2. Caratteristiche cliniche e genetiche dei pazienti con forma AR-HIES associata a mutazione di DOCK8.

Età	Mutazione	IgE U/ml	Eczema	Micosi	Malattie cerebrali	Infezioni polmonari	Allergie	Neoplasie
30	c.3193delA	na	+	NO	NO	+	++	B cell Ly
19	c.3193delA	171	+	NO	SI	+	++	NO
16 Deced.	c.3193delA	>5000	+	NO	NO	++	++	T cell Ly
7	c.3804_3805delAT	>5000	+	SI	NO	NO	++	NO
10	c.325_1664del	>5000	++	++ (Aspergillo)	NO	++	NO	Neuroblastoma
7 Deced	c.325-?-1475?del	6510	+	+	SI	++	++	NO
3	c.1-?-624+7del	35200	+++	NO	NO	++	+	NO

RISULTATI: Dallo studio della nostra casistica abbiamo riscontrato che tutti i pazienti con malattia a trasmissione autosomica dominante presentano un'anamnesi patologica positiva per infezioni respiratorie ricorrenti (IRR) e candidiasi muco cutanea; 11 pazienti hanno presentato broncopolmoniti ricorrenti, causate nella maggior parte dei casi dall'agente eziologico *S. aureus*. Inoltre indagini radiologiche evidenziano la presenza di bronchiectasie in solo 5 di loro. Sui 13 pazienti con AD-HIES, 6 hanno manifestato eczema neonatale e 7 soggetti accessi cutanei. La mutazione a

carico del gene STAT3 determina alterazioni a carico di diversi organi e apparati, incluse anomalie muscolo-scheletriche (scoliosi, osteopenia, fratture e iperestensibilità) osservate in 6 casi da noi analizzati, dimorfismi facciali (4 casi) e anomalie dentali, che si manifestano tipicamente come ritenzione della dentizione decidua (3 soggetti), sella nasale larga, fronte prominente e palato ogivale. L'analisi genetica evidenzia che tutti i 13 soggetti presentano mutazioni di tipo puntiforme a carico dei diversi domini della proteina codificata dal gene STAT3 (Figura 1).

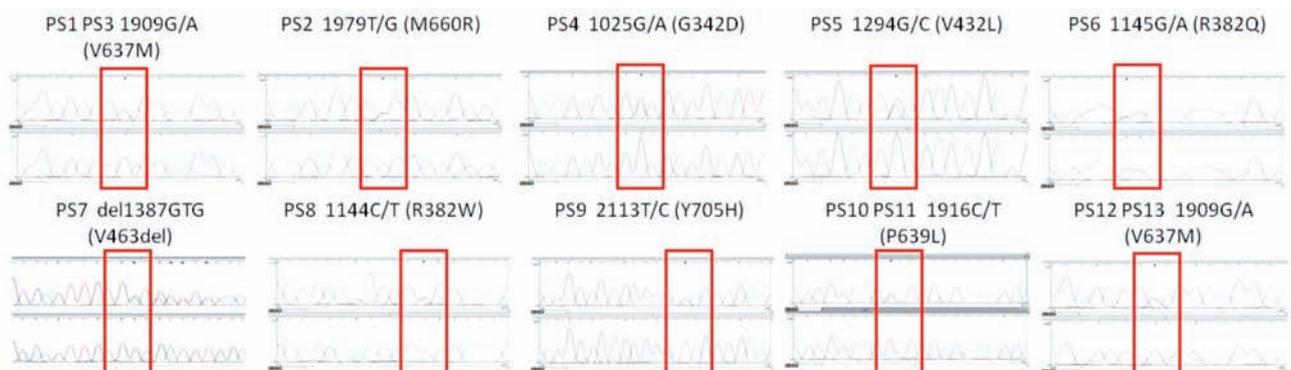


Figura 1. Elettroferogrammi a carico del gene STAT3.

Tutti i pazienti con alterazione genetica a carico di DOCK8 hanno mostrato rash eczematiforme di entità severa, IRR e la maggior parte ha sofferto di infezioni polmonari acute, candidiasi mucocutanea e infezioni cutanee a eziologia virale (Molluscum contagiosum e virus erpetici). Due dei 7 pazienti hanno sviluppato linfomi B e T cellulari e altri due sepsi. La caratteristica distintiva di questo gruppo è l'elevata

incidenza di allergia alle proteine del latte vaccino e ai comuni allergeni inalanti. L'analisi genetica della regione codificante del gene DOCK8 ha permesso di identificare diverse delezioni che comportano la formazione di prematuri stop-codon che causano la perdita totale dell'espressione della proteina come mostrato dall'immagine sottostante (Figura 2).

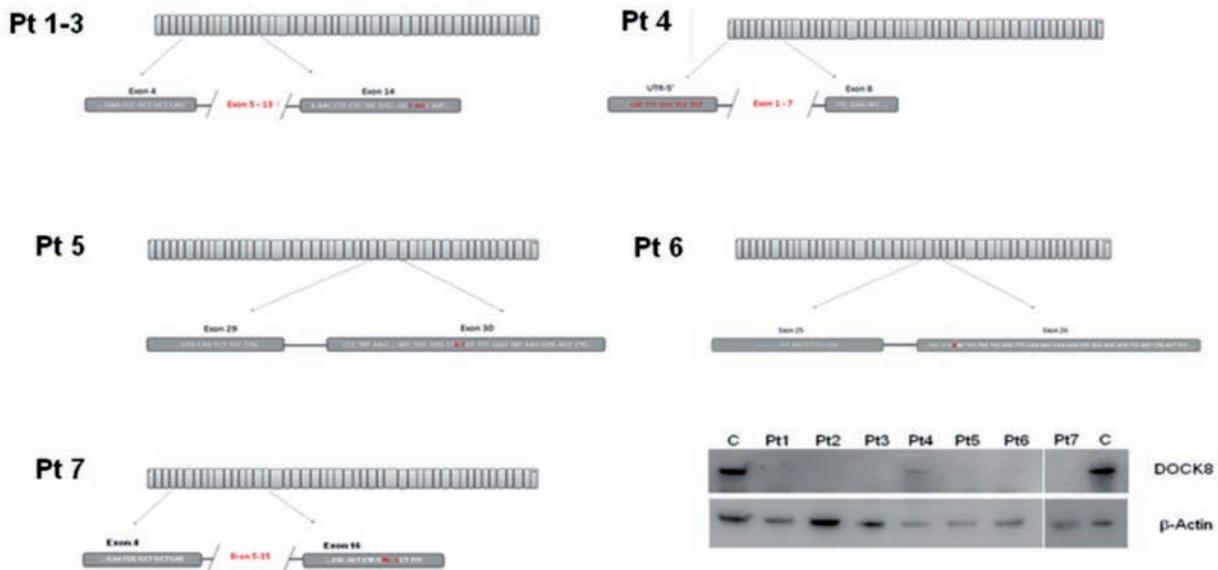


Figura 2. Delezioni ed espressione della proteina nei pazienti mutati in DOCK8.

CONCLUSIONI: Dal nostro studio si può concludere che entrambe le forme di Iper-IgE presentano a livello clinico rash eczematoidi severi, IRR e candidiasi, anche se con incidenza diversa all'interno dei nostri due gruppi. Una differenza rilevante fra le due forme è la spiccata propensione dei pazienti AR-HIES a manifestare sintomatologia allergica verso le proteine del latte vaccino e verso gli allergeni inalanti.

P090

RISCHIO PSICOSOCIALE NELLE FAMIGLIE DI BAMBINI AFFETTI DA TUMORE: USO E VALIDAZIONE DEL PAT2.0 (PSYCHOSOCIAL ASSESSMENT TOOL) IN UN CAMPIONE ITALIANO MULTICENTRICO

J.M.C. Blom,¹ S. Di Giuseppe,² P. Apolloni,³ C. Spirindei,² A. Pinto³
F. Camera,³ R. Capasso,³ V. Galimberti,⁴ D. Caprino⁴

¹Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche Materno-Infantili e dell'Adulto, UO Oncematologia Pediatrica, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena; ²Centro Regionale AIEOP Oncematologia Pediatrica, Dipartimento Materno Infantile, DISCO UNIVPM, Ospedale Salesi, Ancona; ³Dipartimento di Oncologia Pediatrica, Servizio di Psicologia Ospedaliera, Napoli, AORN "Santobono-Pausilipon", Napoli; ⁴Dipartimento Ematologia Oncologia Pediatrica, Istituto G. Gaslini, Genova, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: I grandi progressi dell'oncologia pediatrica hanno permesso degli straordinari traguardi che hanno permesso, mediante l'uso di nuove strategie terapeutiche, di migliorare i tassi di sopravvivenza rendendo possibile per bambini ed adolescenti una vita sana e produttiva. Purtroppo questo quadro di grandi successi ha oscurato il fatto che la malattia tumorale e il suo trattamento rimangono delle sfide fisiche e psicologiche molto difficili da affrontare e grandi fonti di distress. Mentre nel complesso, le famiglie dei bambini malati di tumore reagiscono abbastanza bene, alcune possono sviluppare significative difficoltà a livello psicossociale, cognitivo, emotivo e comportamentale, che necessitano di un intervento e, ove possibile di prevenzione. Di conseguenza, lo screening per i problemi psicossociali e lo stress in oncologia pediatrica è ormai riconosciuto come una componente essenziale del trattamento completo e il disagio è stato descritto come il sesto segno vitale.

Infatti, è stato affermato che il 'distress dovrebbe essere riconosciuto, documentato, e trattato tempestivamente in tutte le fasi della malattia e in tutti gli ambienti' e che 'tutti i pazienti devono essere sottoposti a screening'. Tuttavia, la cura psicosociale fornita a bambini e famiglie non è standardizzata ed è spesso variabile tra le istituzioni. Pertanto, uno screening psicosociale precoce, dopo la diagnosi, è un primo passo necessario, che può aiutare a identificare i comportamenti prevenibili che aggravano il rischio dei bambini, degli adolescenti e delle loro famiglie. Detto questo, è diventato estremamente importante per identificare rapidamente ed efficacemente il sottoinsieme dei bambini e delle famiglie a maggior rischio di andare incontro a difficoltà. Attualmente l'unico strumento specifico è il PAT (Psychosocial Assessment Tool) che è uno strumento recentemente sviluppato per una valutazione rapida del rischio psicosociale in oncologia pediatrica. Il PAT si basa su un quadro sociale ed ecologico e fornisce una valutazione dei fattori di contesto associati all'adattamento ai tumori pediatrici. Il modello concettuale alla base è il "Pediatric Psychosocial Preventative Health Model" (PPPHM), un contesto di sanità pubblica per la concettualizzazione dell'adattamento psicosociale alla malattia pediatrica. Lo scopo principale di questo studio osservazionale, multicentrico, è di valutare la vulnerabilità delle famiglie e loro figli malati di tumore studiando i fattori psicosociali associati alla malattia e al trattamento. L'insieme dei dati ottenuti per ogni singola famiglia ci permetterà di individuare degli indicatori oggettivi del rischio psicosociale e d'intervenire tempestivamente con programmi specifici di supporto. Più specificamente lo scopo di questo studio è stato duplice: 1 convalidare il PAT2.0 in un campione italiano di bambini con diagnosi di tumore pediatrico in tre diverse realtà cliniche, 2 studiare il ruolo critico delle influenze ambientali che modificano in modo differenziale i bisogni psicosociali di famiglie che si occupano di un bambino con tumore.

METODI: Hanno partecipato allo studio le famiglie di 120 bambini provenienti da tre centri (Napoli – Ospedale Santobono Pausilipon; Genova – Istituto Giannini Gaslini; ed Ancona – Ospedale Salesi Centro Regionale Oncematologia Pediatrica) con una nuova diagnosi di un tumore. I criteri di inclusione sono stati (a) una diagnosi confermata di una neoplasia pediatrica (b) età inferiore ai 18 anni, (c) assenza di altre malattie croniche gravi, (d) pertinente capacità di comprensione della lingua italiana. Il PAT è un breve strumento di screening del rischio psicosociale delle famiglie con un bambino in oncologia pediatrica; è rivolto ai genitori e può essere completato in 5-10 minuti. Il

PAT2.0 è composto da 15 elementi e complessivamente si ottiene un punteggio totale (range possibile 0-7) e sette punteggi delle sottoscale (gamma possibile 0-1) che includono: Struttura e risorse della famiglia (8 elementi), Sostegno sociale (4 elementi), Problemi familiari (8 elementi), Reazioni del genitore allo stress (3 elementi), Convinzioni della famiglia (4 elementi), Problemi del bambino (il paziente) (15 elementi) e Problemi dei fratelli (15 elementi). Per ricavare i punteggi totali del PAT2.0, punteggi delle sottoscale del PAT2.0 aggiustati sono stati calcolati dividendo il numero di elementi ad alto rischio riportato in ogni sottoscala per il numero totale di domande nel dominio corrispondente. Con questo calcolo, il risultato aggiustato per ogni sottoscala può variare tra 0,00-1,00. Questi punteggi aggiustati per le sette sottoscale sono stati poi sommati per creare una punteggio PAT2.0 totale per ogni famiglia. L'Alpha di Cronbach è 0,81 per il punteggio totale e varia tra 0,62-0,81 per le sottoscale. Le caratteristiche demografiche e della malattia dei pazienti e le loro famiglie appartenenti ai tre centri sono stati confrontati usando i t-test o test di Mann-Whitney per le variabili continue e il test χ^2 di Pearson per le variabili categoriali.

RISULTATI: I pazienti hanno un'età compresa tra 4 settimane e 18 anni, così divisi: 15% sotto l'età di due anni; 32% tra 2-5 anni; 20% tra 6-10 anni; e 33% sopra 10 anni. Cinquantacinque percento è maschio. Tipi di diagnosi: leucemia (ALL, AML, CML) 54%, tumore cerebrale (6,0%), tumori solidi (lymphoma, neuroblastoma, sarcomas, Hodgkin's Disease, germ cell tumors, Wilm's tumor, and carcinoma; 29%); altro 11%. Il pat2.0 suddivide il rischio psicosociale delle famiglie in tre livelli. Questa suddivisione è in accordo con i dati degli autori della scala, ma la proporzione di famiglie appartenenti ad ogni livello di rischio è diversa. Il quarantadue per cento delle famiglie si colloca nel livello di rischio di base o universale. Sorprendentemente, un numero considerevole di famiglie - il 49% - appartiene al livello di rischio intermedio o "targetted", mentre solo il 9% cade nel range clinico della scala. È interessante notare che la maggior parte delle famiglie a rischio mostrava un pattern particolare di punteggi nelle sottoscale. La reattività allo stress della famiglia e i problemi del paziente pesavano significativamente di più in famiglie nel targeted range. Inoltre, quando si confrontano le famiglie nel range intermedio con le famiglie nel range clinico emergono ulteriori criticità che includono la resilienza familiare (problemi familiari e convinzioni della famiglia).

CONCLUSIONI: Il nostro studio sostiene l'estrema necessità di una diagnosi precoce di problemi psicosociali. I tre centri riportano una bassa percentuale di famiglie e pazienti che hanno un punteggio PAT che cade nella categoria di rischio di base o universale avendo a disposizione più risorse sociali e relativamente pochi fattori di rischio. Queste famiglie indicano angoscia come esperienza transitoria di fronte alla diagnosi, le sfide, o alle crisi associate alla malattia del loro figlio. Si ritengono in genere resistenti e in grado di adattarsi in modo efficace alla situazione se accompagnati con un giusto ed adeguato sostegno. Al contrario, una parte significativamente più consistente di famiglie ha necessità di una assistenza più mirata indicando di esperire maggior sofferenza acuta e la presenza di alcuni fattori di rischio psicosociali. Questa marcata tendenza, osservata nell'oncologia pediatrica italiana è in netto disaccordo con quanto osservato in ambito anglosassone e americano o con quanto osservato in altre particolari popolazioni pediatriche in presenza di malattia cronica. Infine, un numero relativamente piccolo di pazienti si collocava nella categoria di ad alto rischio clinico. I pazienti nella categoria di rischio clinico devono far fronte a più fattori di rischio (ad esempio, la sintomatologia psicologica del bambino malato o di un suo familiare, limitate risorse finanziarie, ecc) con una probabilità alta di sperimentare momenti di disagio e di stress intensi e persistenti, e / o di difficoltà crescente. Degno di nota è il forte impatto osservato in tutti i centri di due sottoscale sul punteggio totale del PAT: problemi del bambino/paziente e la reattività allo stress della famiglia. Differenze tra i tre centri sono state trovate nei fattori comportamentali e cognitivi specifici del bambino e nei fattori legati alle credenze familiari. Pertanto, la disponibilità di uno strumento di valutazione come il PAT2.0 di facile somministrazione potrebbe semplificare e razionalizzare l'erogazione di assistenza e facilitare la fornitura di servizi psicosociali su misura, soprattutto in oncologia pediatrica in cui la sofferenza e lo stress legato alla malattia e al trattamento sono molto alti e le risorse psicosociali sono troppo spesso limitate.

Bibliografia:

- Kazak A.E. et al. 2007. Journal of Pediatric Psychology, 32:1099-1110.
 Pai A.L.H. et al 2008. Journal of pediatric Psychology, 33:50-62.
 McCarthy M.C. et al. Pediatric Blood Cancer, 53:78-83. Kazak A.E. et al. 2011. J Pediatric Hematol Oncol, 33:289-294.

P091

SARCOMA INDIFFERENZIATO DEL FEGATO: AGGIORNAMENTO DELL'ESPERIENZA DEL GRUPPO DI LAVORO SUI SARCOMI DEI TESSUTI MOLLI DELL'AIEOP

E. Cavaliere,¹ G. Cecchetto,² A. Cavaliere,³ P. Dall'Igna,² C. Manzitti,⁴ M. Provenzi,⁵ G.M. Milano,⁶ R. Alaggio,⁷ I. Zanetti,¹ G. Bisogno¹

¹Dipartimento per la Salute della Donna e del Bambino; ²Divisione di Chirurgia Pediatrica, Azienda Ospedaliera-Università di Padova, Padova; ³Unità di Oncologia Pediatrica, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano; ⁴Dipartimento di Oncoematologia Pediatrica, Istituto Giannina Gaslini-IRCCS, Genova; ⁵Dipartimento di Pediatria, Ospedali Riuniti, Bergamo; ⁶Dipartimento di Oncoematologia Pediatrica, Ospedale "S. Maria della Misericordia", Perugia; ⁷Dipartimento di Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliera-Università di Padova, Padova, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il sarcoma indifferenziato del fegato (UESL) è il terzo tumore più frequente in età pediatrica e si presenta tipicamente tra i 5 e i 10 anni di età. Nel 2002 abbiamo pubblicato l'esperienza maturata su 17 bambini trattati con lo stesso approccio multi disciplinare adottato nei pazienti con sarcoma ottenendo una sopravvivenza libera da malattia del 70%. In considerazione di questo risultato sono state identificate delle linee guida di trattamento. In questo studio si descrivono i risultati ottenuti.

METODI: Nove pazienti arruolati nei protocolli RMS 96 and RMS 2005 tra il 1996 e il 2012. In questi pazienti è stato adottato lo stesso approccio terapeutico: chirurgia iniziale/biopsia all'esordio, chemioterapia neoadiuvante, valutazione della malattia, chirurgia differita, chemioterapia adiuvante.

RISULTATI: 9 sono stati i pazienti arruolati, di cui 6 maschi con un'età mediana alla diagnosi di 8.3 anni (range 3.7-14.3). La presentazione clinica includeva: massa addominale (n=4), addominalgia acuta (n=4), distensione addominale (n=4) con associata febbre in 3. 1 paziente ha presentato dolore alla spalla con febbre serotina, 1 infezione respiratoria e 1 con gastroenterite. La lesione coinvolgeva il lobo destro in 7 casi (con estensione al lobo adiacente in 1), il lobo sinistro in 1, entrambi i lobi in 1. Le dimensioni tumorali erano comprese tra 5-10 cm in 2 casi, e superiore ai 10 in 7. Metastasi polmonari erano evidenti in 1. Alla diagnosi sono state eseguite 4 biopsie e 5 resezioni radicali: 3 complete (1 in un paziente metastatico), 1 con residui micro e 1 con residui macro. La chemioterapia è stata somministrata secondo schema IVA più doxorubicina in 8 pazienti e CEVAIA in 1. La risposta dopo primi 3 cicli di chemioterapia era valutabile in 5 pazienti: 3 hanno mostrato massa stabile, 2 una minima risposta e 2 una buona risposta. 6 pazienti sono stati sottoposti a chirurgia differita completa. 2 pazienti sono stati irradiati. All'ultimo follow-up (3-13 anni) 7 pazienti sono in prima remissione completa e due in seconda completa dopo secondo tumore (Sarcoma di Ewing, Emangioendoteloma).

CONCLUSIONI: Le linee guida hanno permesso di ottenere un risultato molto soddisfacente migliorando le possibilità di guarigione di questi pazienti. Una risposta in termini volumetrici alla chemioterapia iniziale non sembra avere un valore prognostico in una neoplasia come l'UESL che spesso presenta aspetti cistici. L'aumentata incidenza di secondi tumori riscontrata nella nostra limitata esperienza va verificata in studi futuri.

P092

GRAVE TOSSICITÀ DA HDMTX IN SOGGETTO CON OSTEOSARCOMA METASTATICO: EFFICACIA DI EMODIALISI E CARBOSSIEPTIDASI

F. Leone,¹ M. D'Alessandro,² P. Farruggia,³ F. Di Marco,³ A. Trizzino,³ S. Maringhini,² C. Mosa,³ P. D'Angelo³

¹Scuola di Specializzazione in Pediatria, Università di Palermo, Palermo; ²UO di Nefrologia Pediatrica; ³UO di Oncoematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera Civico, Di Cristina e Benfratelli, Palermo, Italy

INTRODUZIONE: Il Methotrexate (MTX), è stato introdotto in clinica nei primi anni '50 ed è l'antifolato più impiegato in oncologia. È un potente inibitore della diidrofolato reductasi, enzima chiave nel metabolismo del folato intracellulare e nella sintesi del DNA.¹ L'alcalinizzazione delle urine, l'abbondante idratazione e l'impiego dell'acido folinico hanno ridotto l'incidenza di tossicità legata all'uso

di questo farmaco dal 10% all'1% circa.² I pazienti con ridotta clearance di MTX, possono presentare vari effetti tossici: vomito, mucosite gastrointestinale, tossicità epatica, mielosoppressione, disfunzione renale e disturbi neurologici acuti e cronici (cefalea, perdita di memoria, letargia, afasia, ipoacusia, allucinazioni, leucoencefalopatia). La tossicità acuta è solitamente transitoria e non lascia danni permanenti. Nei pazienti con osteosarcoma e funzionalità renale normale, la tossicità renale indotta da HD-MTX si presenta approssimativamente nel 2% dei pazienti arruolati in trials clinici.³ Descriviamo un bambino con osteosarcoma metastatico con funzionalità renale normale, trattato con HD-MTX, che, in seguito ad una ridotta clearance del farmaco, ha accusato severa tossicità renale e conseguentemente sistemica.

CASO CLINICO: G.B., 11 anni, è giunto alla nostra osservazione per una grossa tumefazione della coscia dx e, dopo biopsia e staging, è stata posta diagnosi di osteosarcoma del femore destro con metastasi polmonari multiple. Dopo inserzione di CVC è stata intrapresa chemioterapia secondo protocollo ISG/OS-1, con la somministrazione del 1° ciclo di HD-MTX (18 gr e.v.) in quattro ore, preceduta da idratazione con 3 l/m²/die ed alcalinizzazione con sodio bicarbonato da circa 24 ore. La funzionalità renale pre-chemioterapia era nella norma. La MTXemia della 24° h. ha mostrato valori molto elevati (556,3 µM/L); nelle 24 ore successive, contestualmente all'incremento dei livelli sierici di MTX (944,9 e 1009,5 µM/L rispettivamente alle 36° e 48° ora) (Figura 1), il bambino ha cominciato ad accusare progressivo decadimento delle condizioni generali, febbre, dispnea, contrazione della diuresi con segni di insufficienza renale acuta, epatomegalia, ed a seguire mucosite di II grado al cavo orale e moderata mielosoppressione (Tabella 1). Si è provveduto pertanto ad aumentare il dosaggio dell'acido folinico, intensificare l'alcalinizzazione delle urine ed iniziare trattamento emodialitico. Tali provvedimenti, tuttavia, non sono risultati efficaci nella riduzione della MTXemia o nel prevenire la tossicità sistemica. Dopo 5 giorni dall'inizio del MTX, persistendo l'insufficienza renale, nonostante una buona efficienza del trattamento dialitico (Figura 2), ed alla luce dei livelli di MTXemia persistentemente elevati, è stata somministrata una singola dose di 3.000 U.I. di carbosiopeptidasi (Voraxaze), che ha determinato una riduzione dei livelli sierici di MTX da 66,8 a 8,59 µM/L. Le condizioni cliniche sono peggiorate ulteriormente, aggravate dalla com-

parsa di insufficienza respiratoria, mucosite grado II-III e segni di colestasi. La determinazione della MTXemia è stata proseguita fino alla 312° ora, insieme alla rescue con acido folinico alla dose di 250 mg e.v. ogni sei ore, poi secondo nomogramma, fino a MTXemia <0,20 µM/L. Dopo venti giorni dall'inizio del MTX, 14 sedute di emodialisi e vigorosa terapia di supporto, il paziente ha mostrato un recupero completo clinico e degli esami di laboratorio. Purtroppo, nonostante la ridotta clearance del farmaco e l'importante tossicità sistemica, non abbiamo registrato alcuna risposta alla chemioterapia. La scadente risposta e la progressione della malattia, dopo la somministrazione del previsto ciclo con Cisplatino e Adriamicina ed uno schema di seconda linea, ci hanno obbligato ad un intervento di amputazione dell'arto inferiore destro.

CONCLUSIONI: Un'attenta revisione della letteratura ci ha consentito di verificare che i casi di tossicità severa da MTX in età pediatrica sono 58 (il primo pubblicato nel 1976),⁴ ma in nessuno di questi sono stati raggiunti livelli di MTXemia tanto alti come nel nostro paziente. Abbiamo potuto verificare nel nostro caso una buona efficacia del trattamento emodialitico e della carbosiopeptidasi, che hanno concorso nella riduzione dei livelli di MTXemia al punto di consentirci successivamente di somministrare senza alcun problema altri farmaci potenzialmente nefrotossici come cisplatino ed ifosfamide. Purtroppo l'esposizione del paziente a livelli molto elevati di MTX per un periodo estremamente lungo non ha comportato alcun vantaggio in termini di risposta al trattamento, con successiva progressione di malattia locale e metastatica.

Bibliografia:

1. Mc Guire JJ. Anticancer Antifolates: Currents Status and Future Directions. *Curr Pharmacol Des* 2003, 9: 2593 – 2613.
2. Peyriere H et al. Optimal management of Methotrexate intoxication in a child with osteosarcoma. *Ann Pharmacother* 2004, 38: 422-7.
3. Muller J et al. Toxic Encephalopathy end delayed MTX clearance after High-dose methotrexate. Therapy in a child homozigous for the MTHFR C677T Polymorphism. *Anticancer research* 2008, 28:3051-3054.
4. Green AA, et al. Immunotherapy of osteosarcoma patients with virus-modified tumor cells. *Ann Ny Acad Sci*, 1976, 277: 396-411.

Tabella 1

PARAMETRI	Parametri di laboratorio del paziente durante il I ciclo di HD-MTX									
	Prima	1°	2°	5°	6°	7°	15°	16°	20°	
Creatinina (mg/dL)	0,6	2,5	3	3,7	3	2,5	3,2	2,08	0,9	
Azotemia (mg/dL)	22	36	33	40	20	25	28	24	7	
Uricemia (mg/dL)	8,3	4,5	0,7	1,6	1,6	0,8	1	1,5	1,5	
AST (U/L)	37	34	29	36	34	31	23	24	21	
ALT (U/L)	37	51	50	46	37	29	17	15	13	
Piastrine (µl)	421.000	230.000	205.000	63.000	59.000	17.000	96.000	143.000	595.000	
Leucociti (µl)	22.300	14.900	14.830	3.680	1.680	1.920	2.300	2.460	6.510	
Hb (g/dL)	9,5	7,6	9,7	8,6	7,4	7,4	9	9,2	9	
MTXemia (M/L)	-	944,9	1009,5	67,6	8,4	8,6	2,4	2	0,2	

Figura 1.

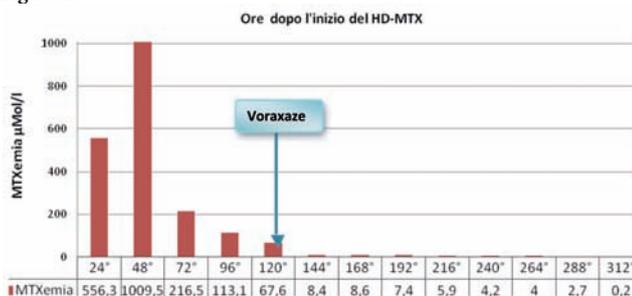
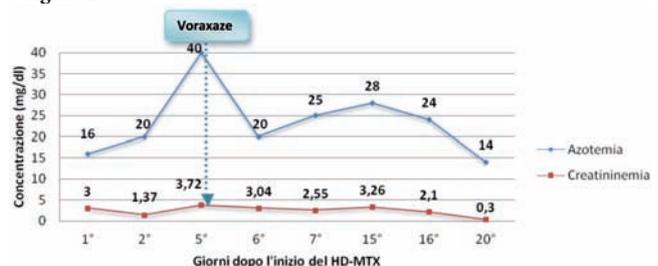


Figura 2.



P093

STUDIO DELLA TRASDUZIONE DEL SEGNALE DI CXCR4 IN PAZIENTI AFFETTI DA SINDROME WHIM

R. Kumar,¹ L. Tassone,¹ D. Moratto,² A. Prandini,¹ M. Giacomelli,¹ S. Negri,³ O. Scomodon,¹ A. Plebani,³ R. Badolato³

¹*Scuola di Dottorato in Scienze della Riproduzione e dello Sviluppo, Università degli Studi di Trieste, Trieste;* ²*Dipartimento di Scienze Cliniche e Sperimentali, Istituto di Medicina Molecolare "Angelo Nocivelli", Spedali Civili, Brescia;* ³*Dipartimento di Scienze Cliniche e Sperimentali, Istituto di Medicina Molecolare "Angelo Nocivelli", Università degli Studi di Brescia, Brescia, Italy*

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La sindrome WHIM è una malattia autosomica dominante rara caratterizzata dalla presenza di verruche (*Warts*), ipogammaglobulinemia (*Hypogammaglobulinemia*), infezioni ricorrenti (*Infections*) e ritenzione ed una incrementata apoptosi dei neutrofili nel midollo (*Myelokathexis*). La maggior parte dei pazienti si presentano anche con linfopenia, monocitopenia, deficit di cellule dendritiche circolanti e malformazioni cardiache. La patologia è riconducibile a mutazioni in eterozigosi a carico degli ultimi 10-19 aminoacidi nella regione C-terminale del gene *CXCR4*, che causano la formazione di forme tronche del recettore chemochinico *CXCR4*. *CXCR4* ed il suo ligando *CXCL12* (*SDF-1 α*) sono infatti regolatori essenziali nello sviluppo e omeostasi degli organi linfoidi e ematopoietici. Dal punto di vista funzionale la perdita della coda citoplasmatica porta alla mancata down regolazione di *CXCR4* e la costante attivazione del recettore. Ciò comporta una iper-fosforilazione delle proteine ERK (pERK1/2) ed un aumentato flusso del calcio intracellulare in risposta allo stimolo mediato da *SDF-1*. In questo studio è stato identificato e caratterizzato un paziente affetto da WHIM che presentava una delezione di 32 aminoacidi della coda citoplasmatica di *CXCR4*. Successivamente sono stati valutati i meccanismi biologici e molecolari di tale mutazione.

METODI: In pazienti con caratteristiche cliniche, biologiche ed immunologiche compatibili con WHIM è stata effettuata analisi genetica di *CXCR4* mediante sequenziamento diretto. La valutazione dell'effetto delle mutazioni identificate sul signalling delle MAPK e sul flusso del calcio è stata effettuata mediante saggi in vitro che prevedevano l'attivazione di *CXCR4* da parte di *SDF-1 α* . Nello specifico, sono state trasfettate stabilmente le cellule HEK293T con il plasmide pCDNA 3.1 *CXCR4* nella sua forma *wild type* (352aa) e con due diverse varianti tronche corrispondenti alla mutazione da noi identificata (*CXCR4-rj*) e della mutazione che più frequentemente è associata alla sindrome WHIM (334aa). L'analisi del calcio è stata effettuata mediante un saggio citofluorimetrico che prevede il contemporaneo utilizzo di due fluorocromi chelati dal calcio; il signaling delle MAPK è stato invece valutato mediante western blot utilizzando anticorpi anti-pERK1/2.

RISULTATI: È stata identificata in tre pazienti una nuova mutazione che causa la delezione di 32 aminoacidi a livello della coda citoplasmatica di *CXCR4* e comporta, al contrario di tutte le mutazioni identificate finora, la perdita di tutti i siti di fosforilazione ad eccezione di una treonina e una serina nella posizione, 312 e 313 rispettivamente. L'analisi immunofenotipica del paziente ha evidenziato le caratteristiche immunologiche comuni alla sindrome, tra cui si segnala una marcata linfopenia del comparto B e un deficit di cellule dendritiche circolanti. Dal punto di vista funzionale la mutazione è stata caratterizzata mediante valutazione del flusso del calcio a livello delle cellule HEK293T stabilmente trasfettate. L'analisi citofluorimetrica realizzata misurando la variazione del rapporto del segnale di due fluorocromi Fluo-4/Fura Red in seguito a stimolazione con *SDF-1 α* ha evidenziato nelle cellule trasfettate con il plasmide mutato *CXCR4-rj* una riduzione del flusso del calcio pari alla metà di quello riscontrato sia nelle cellule trasfettate con il plasmide *wild type* che con quello mutato *CXCR4-334*. L'analisi delle pERK1/2 in seguito a stimolazione con *SDF-1 α* ha mostrato nelle cellule trasfettate con il plasmide mutato *CXCR4-rj* un'aumentata fosforilazione rispetto alle cellule trasfettate con il plasmide *wild type*, indicando così una maggiore attivazione del recettore *CXCR4* mutato.

CONCLUSIONI: In questo lavoro è stata caratterizzata una nuova mutazione nel locus *CXCR4* che si differenzia da quelle identificate in precedenza per l'estensione della porzione deleta. Questa sua caratteristica, seppur non comporti una sostanziale differenza dal punto di vista immunologico né della fosforilazione delle proteine ERK rispetto alle mutazioni fin qui descritte, mostra un peculiare comportamento del flusso del calcio in seguito ad ingaggio con il ligando *SDF-1 α* . Questo fenomeno potrebbe essere riconducibile ad una ridotta attivazione dei canali del calcio in conseguenza alla perdita della maggior parte dei siti di fosforilazione nella coda citoplasmatica di *CXCR4*.

P094

EFFICACIA DI INTERFERON-ALFA E RIBAVIRINA NEL TRATTAMENTO DELLA PAPPILLOMATOSI DA HPV NEL SOGGETTO IMMUNODEPRESSO

C. Mosa, A. Trizzino, P. Farruggia, F. Di Marco, S. Tropia, A. Trizzino
UO di Oncoematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera Civico, Di Cristina e Benfratelli, Palermo, Italy

INTRODUZIONE: Le verruche genitali, definite anche condilomi acuminati sono le più frequenti infezioni sessualmente trasmesse nella popolazione generale, ed ancor di più nei soggetti immunodepressi. Sono molto contagiose, e nelle femmine sono localizzate perlopiù sulle grandi e piccole labbra e vagina, con possibile estensione alla regione perianale. I trattamenti utilizzati (escissione chirurgica, cauterizzazione, crioterapia, laserterapia) danno raramente risultati poco soddisfacenti, per i risultati estetici e le frequenti recidive. Descriviamo un caso di infezione da Papillomavirus (HPV) perianale e genitale sviluppatosi in una paziente affetta da anemia aplastica moderata, trattata con successo con Interferone alfa e ribavirina.

CASO CLINICO: C.M., è affetta dall'età di 11 anni da anemia aplastica moderata, con una cellularità midollare stabilmente intorno al 30%, senza variazioni di rilievo nel corso degli anni; mai trasfusa o sottoposta a trattamento immunosoppressivo; PLTS < 100.000/mmc solo occasionalmente (in corso di episodi febbrili) e mai < 20.000/mmc, PMN in genere fra 1.000 e 1.500 e mai < 500/mmc; Hb stabilmente fra 8,5 e 12 gr/dl. Nel Giugno 2011 la ragazza (22 anni) inizia a presentare lesioni verrucoidi sulla vulva, sul clitoride e zona perianale. L'analisi del DNA su tampone cervicale eseguita con primers specifici per la regione genomica L1 ed E6/E7 conferma che le lesioni sono causate dall'HPV. Viene iniziato trattamento topico con Imiquimod con lieve e transitorio beneficio. L'analisi del genotipo dell'HPV mostra che le lesioni sono causate da tre genotipi, due dei quali ad alto rischio (31-52) ed uno a basso rischio (6). Nel Dicembre 2011 le verruche vengono rimosse chirurgicamente. La diagnosi istopatologica è di "condilomatosi florida" senza evidenza di malignità. Due mesi dopo la exeresi, la paziente manifesta una recidiva a rapida crescita che è causa di intenso dolore irradiato alla regione posteriore della coscia sinistra. La colonoscopia rivela la presenza di verruche multiple che si estendono fino alla linea pettinata del canale rettale. La rimozione chirurgica, vista l'estensione, si presenta particolarmente difficoltosa e non viene escluso un intervento demolitivo: si inizia così terapia a base di mesalazina e steroide topico cui segue un lieve miglioramento della sintomatologia. Poche settimane dopo compaiono, però, iperemia, intenso edema vulvare ed una lesione ulcerativa sul lato sinistro della parete rettale (Figura 1) che la RM mostra essere una fistola transferrica.



Figura 1.

Viene quindi intrapresa, su prescrizione dermatologica una nuova terapia con permanganato di potassio ed antibiotico locale; viene iniziata anche terapia con G-CSF, allo scopo di innalzare il numero di neutrofili e favorire la guarigione delle lesioni. Questi trattamenti determinano un miglioramento dell'infiammazione ed una riduzione dell'ulcera, ma i condilomi permangono inalterati. Alla ragazza viene pertanto proposta una terapia a base di Interferone alfa, che aveva mostrato qualche efficacia nel trattamento delle verruche genitali,¹ e Ribavirina, la cui efficacia era stata provata nel trattamento della papillomatosi laringea giovanile.² Un report aveva anche segnalato un'inaspettata risoluzione delle verruche plantari in un paziente affetto da HIV durante la somministrazione di Interferone e Ribavirina per il trattamento dell'epatite C³ ed un'altra segnalazione aveva descritto l'efficacia dei suddetti farmaci nel trattamento di un'infezione disseminata da HPV.⁴ Nel Giugno 2012 la paziente iniziava dunque trattamento con Interferone Alfa-2b (10 milioni UI sottocute una volta a settimana) e Ribavirina (400 mg per os due volte al giorno) con proseguimento del G-CSF (inizialmente giornaliero e poi ridotto fino a 1-2 volte/settimana, in modo da mantenere il numero dei neutrofili stabilmente > 1.500/mm³). La risposta al trattamento è stata drammatica: infatti dopo 2 settimane le verruche si sono notevolmente ridotte in dimensione e dopo 2 mesi sono del tutto scomparse (Figura 2). La fistola transfinterica è stata poi trattata chirurgicamente con successo.



Figura 2.

DISCUSSIONE: L'associazione Interferone-Ribavirina ha dimostrato una grande efficacia nel nostro caso di papillomatosi da HPV, non responsivo ai trattamenti convenzionali.³ L'efficacia dell'Interferone è probabilmente legata ad un triplice meccanismo d'azione: agisce come agente antivirale, ha un effetto antiproliferativo e stimola la risposta immunitaria dell'ospite.

Bibliografia:

1. Yang J, Pu YG, Zeng ZM, Yu ZJ, Huang N, Deng QW. Interferon for the treatment of genital warts: a systematic review. *BMC Infect Dis* 2009; 9:156.
2. McGlennen RC, Adams GL, Lewis CM, Faras AJ, Ostrow RS. Pilot trial of ribavirin for the treatment of laryngeal papillomatosis. *Head Neck* 1993; 15: 504-512.
3. Pavan MH, Velho PE, Vigan AG, Goncalves FL Jr, Aoki FH. Treatment of human papillomavirus with peg-interferon alfa-2b and ribavirin. *Braz J Infect Dis* 2007; 11:383-384.
4. Nabin K, Shrestha, David J, Hamrock. Successful treatment of disseminated Human Papillomavirus Infection with Pegylated Interferon and Ribavirin. *CID* 2010;51 1 July.

P095

REGOLAZIONE EPIGENETICA DEL COMPLESSO POLYCOMB PRC2 NELLA INVASIVITÀ E NELLA CHEMIORESISTENZA DEI TUMORI SOLIDI PEDIATRICI

M. Ramaglia, A. Iannotta, V. D'Angelo, G. Pecoraro, S. Perrotta, C. Ficociello, I. Martinelli, D. Di Pinto, E. Pota, M.C. Affinita, C. Indolfi, G. Bottigliero, F. Casale, P. Indolfi

Servizio di Onco-Ematologia, Dipartimento della Donna, del Bambino e della Chirurgia Generale e Specialistica, Seconda Università degli Studi di Napoli, Napoli, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Le mutazioni genetiche sono considerate responsabili della formazione del cancro, ma oggi sta diventando sempre più chiaro che squilibri nell'epigenoma forniscono un contributo ugualmente importante nella patogenesi del cancro nell'uomo. È possibile considerare che la tolleranza e la diffusione di lesioni genetiche, che iniziano la trasformazione maligna, dipendono dalla plasticità epigenetica della cellula target e il cancro nei bambini supporta fortemente questo modello. PRC2 è responsabile della metilazione sulla lisina 27 dell'istone H3, che ha un effetto di repressione dell'espressione genetica. Il complesso core di PRC2 è formato da quattro componenti: EZH1/2, SUZ12, EED e RbAp46/48. L'aumento di espressione della istone lisina metiltransferasi EZH2 nella formazione e nella progressione del cancro è stato ampiamente studiato in diversi tipi di tumori dell'adulto, che però rappresentano un'entità biologica differente dal tumore pediatrico dove anomalie dello sviluppo ontogenetico costituiscono, con la loro origine mesenchimale embrionale e neuro-ectodermica, un "fenotipo staminale".^{1,2} È stato dimostrato che l'espressione di EZH2 può essere attivata dalla proteina di fusione EWS-FL11 nel Sarcoma di Ewing e ciò ha un ruolo chiave nel differenziamento endoteliale/neuroectodermale e nella crescita del tumore. Inoltre NGFR (nerve growth factor receptor), gene della staminalità descritto come un marker essenziale delle cellule staminali neuro-ectodermiche, risulta fortemente regolato da EZH2 riducendone notevolmente i livelli come dimostrato in uno studio condotto su linea cellulare di sarcoma di Ewing.³ Le "cellule staminali tumorali" presentano molte proprietà in comune con le normali cellule staminali e sono state definite come un sottogruppo di auto-sostentamento cellulare con la capacità esclusiva di supportare il tumore. Poiché l'espressione di EZH2 è attesa essere bassa nelle cellule dei tessuti differenziati, la sua maggiore espressione potrebbe rinforzare o promuovere, in progenitori inattivi o cellule maggiormente differenziate, uno stato aggressivo stem cell-like. I dati presenti in letteratura circa il coinvolgimento di EZH2 nei tumori dell'età pediatrica sono ancora scarsi. Pertanto, l'obiettivo del nostro studio è stato quello di analizzare il ruolo delle proteine del complesso PRC2 nella invasività e nella chemioresistenza dei tumori solidi pediatrici analizzati.

METODI: Sono stati studiati 28 campioni di tumore solido pediatrico, di cui 12 metastatici (10 rhabdomyosarcomi (RMS), 7 sarcomi di Ewing, 6 tumori di Wilms e 5 tumori neuroectodermici primitivi (PNET)) trattati presso il Servizio di Oncologia Pediatrica della Seconda Università di Napoli. L'RNA totale è stato estratto da biopsie alla diagnosi con reagente Triazol e sono stati utilizzati esameri random per la retrotrascrizione. I livelli di espressione di EZH2, SUZ12, EED e NGFR sono stati analizzati mediante Real Time PCR e l'analisi Western Blot utilizzando anticorpi verso EZH2, SUZ12 e EED.

RISULTATI: I risultati ottenuti hanno dimostrato un aumento dei livelli di espressione di EZH2 nei tumori solidi pediatrici analizzati rispetto ai campioni-controllo mentre non è stato osservato un aumento di espressione di SUZ12 e EED. In particolare, i livelli di EZH2 erano mediamente più alti nei campioni di tumore solido metastatico rispetto ai tumori localizzati come anche nei pazienti che hanno presentato recidiva di malattia (11/28). Nei campioni analizzati in cui EZH2 è risultato iperespresso, sono stati trovati anche livelli molto elevati di NGFR. Inoltre è stata rilevata un'espressione a livello proteico di EZH2 in 19/28 (67,8%) campioni, di SUZ12 in 9/28 (25%) e di EED in 23/28 (82%). In particolare dei 19 tumori solidi che esprimevano EZH2 7 (37%) sono Rhabdomyosarcomi, 5 (27%) sarcomi di Ewing, 4 (21%) tumori di Wilms e 3 (15%) PNET mentre dei 9 campioni che esprimono la proteina SUZ12 3 (34%) sono Rhabdomyosarcomi, 1 (11%) è un sarcoma di Ewing, 3 (34%) sono tumori di Wilms e 2 (21%) PNET. Infine dei 23 campioni che esprimevano EED 10 (43%) sono Rhabdomyosarcomi, 5 (23%) sarcomi di Ewing, 4 (17%) tumori di Wilms e 4 (17%) PNET.

CONCLUSIONI: Dai dati preliminari del nostro studio sembra evincersi che alti livelli di espressione di EZH2 siano associati ad una maggiore aggressività della malattia e ad una maggiore chemioresistenza. Pertanto alti livelli di espressione di EZH2 hanno indotto alla ricerca

di molecole che possano bloccare la sua attività metiltransferasica ed essere quindi potenzialmente utilizzati nel trattamento mirato di tipo epigenetico delle neoplasie che presentano tali alterazioni.

Bibliografia:

1. Chang CJ, Hung MC. The role of EZH2 in tumour progression. *British J of Cancer* (2012), 106: 243-247.
2. Chang CJ, Yang JY, Xia W, et al. EZH2 promotes expansion of breast tumor initiating cells through activation of RAF1-beta-catenin signalling. *Cancer Cell*. (2011), 19: 86-100.
3. Richter G, Plehma S, Fasana A, et al. EZH2 is a mediator of EWS/FLI1 driven tumor growth and metastasis blocking endothelial and neuro-ectodermal differentiatin. *PNAS*. (2009), 106: 5324-5329.

P096

IRF1 E NF-KB: DALL'IMMUNOEVASIONE AL RICONOSCIMENTO IMMUNOLOGICO

S. Lorenzi,¹ L. Cifaldi,¹ A. Citti,² R. Boldrini,² V. Russo,³ A. Castellano,¹ F. Locatelli,¹ D. Fruci¹

¹Dipartimento di Oncologia ed Ematologia; ²Dipartimento di Patologia, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma; ³Cancer Gene Therapy Unit, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il neuroblastoma (NB) è un tumore pediatrico che origina dalle cellule della cresta neurale e rappresenta il secondo tumore solido più comune nei bambini. Le forme più aggressive sono caratterizzate da un'alta espressione di MYCN ed una bassa espressione di MHC di classe I. Per quest'ultima caratteristica il NB non è un candidato ottimale per protocolli di immunoterapia. Recentemente abbiamo dimostrato che il fattore di trascrizione NF-kB regola l'espressione delle molecole MHC di classe I e delle aminopeptidasi del reticolo endoplasmatico, ERAP1 ed ERAP2, nel NB. Tuttavia l'azione di NF-kB non è sufficiente a ripristinare l'espressione delle molecole MHC di classe I in alcune linee cellulari di NB più aggressive, suggerendo che altri fattori oltre NF-KB sono coinvolti nella regolazione di questi geni. Nel presente lavoro abbiamo studiato l'effetto dei fattori di trascrizione IRF1 e IRF2, oltre ad NF-kB sulla regolazione delle molecole MHC di classe I nelle cellule di NB più aggressive.

METODI: Le linee cellulari di NB ed i tumori primari di NB sono state analizzate per l'espressione dei fattori di trascrizione IRF1, IRF2 ed NF-kB. Tali fattori sono stati overespressi singolarmente o in combinazione per verificare gli effetti sulla modulazione dei componenti del pathway di processamento e presentazione dell'antigene a molecole MHC di classe I.

RISULTATI: IRF1 ed IRF2 sono espressi ad alti livelli nel nucleo delle cellule di NB esprimenti MHC di classe I, ERAP1 ed ERAP2, e viceversa, a bassi livelli nel nucleo delle cellule di NB più aggressive e meno immunogeniche. Nei tumori primari, la subunità p65 di NF-kB, IRF1 ed IRF2 sono espressi esclusivamente nel nucleo delle cellule gangliari (cellule più differenziate) che esprimono molecole MHC di classe I. L'overespressione di IRF1 e di IRF2 singolarmente o in combinazione determina solo un modesto incremento dell'espressione delle molecole MHC di classe I, ERAP1 ed ERAP2. La co-trasfezione di IRF1 ed NF-kB risulta in un sostanziale aumento dei geni target nelle cellule di NB testate. Cellule di NB, ricostituite con IRF1 e NF-kB, con alti livelli di espressione di MHC-I, sono lisate efficientemente da linfociti T tumore-specifici (specifici per l'antigene tumorale MAGE-A3, espresso dalle cellule di NB).

CONCLUSIONI: Questi risultati dimostrano che le forme più aggressive di NB, se opportunamente manipolate, possono essere riconosciute e lisate dai linfociti T. L'identificazione di farmaci in grado di potenziare l'attività trascrizionale sia di IRF1 che di NF-kB potrebbe semplificare l'applicabilità in ambito clinico di un protocollo di immunoterapia.

P097

RUOLO DELLA PROCALCITONINA NELLA VALUTAZIONE DEL BAMBINO ONCOLOGICO FEBBRILE

G. Zanazzo,¹ M. Minute²

¹Centro di Emato Oncologia Pediatrica, Istituto di Ricerca e Cura a Carattere Scientifico Materno Infantile "Burlo Garofolo", Trieste;

²Scuola Specializzazione in Pediatria, Università degli Studi di Trieste, Trieste, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La procalcitonina (PCT), proteina della fase acuta prodotta dal fegato, dai macrofagi e da molti altri tessuti dell'organismo in risposta alle citochine e ai lipopolisaccaridi prodotti dalla flogosi, è un marker di infezione che presenta una buona sensibilità e specificità nell'identificazione di processi settici, con un'accuratezza diagnostica superiore a quella della Proteina C Reattiva (PCR).¹ Di contro, il suo costo risulta essere molto elevato (circa 15euro per singola determinazione) rispetto al costo della PCR (1euro a determinazione). Nella valutazione delle neutropenie febbrili in pazienti oncologici la PCT risulta avere una rilevanza diagnostica maggiore rispetto ad altri marcatori,² e sembra in grado di differenziare i quadri di sepsi da quelli di shock settico.³ Considerando che la gestione empirica degli episodi febbrili in questi pazienti è standardizzata in attesa del risultato dell'emocoltura, ci siamo posti il problema di poter individuare più precocemente quei soggetti la cui emocoltura risulterà positiva, che potrebbero giovare di un approccio terapeutico più aggressivo sia dal punto di vista antibiotico, agendo con una terapia di associazione, sia da quello delle terapie complementari come, per esempio, le IgM pentameriche.

METODI: Abbiamo analizzato retrospettivamente tutti i pazienti febbrili ricoverati dal 1 Gennaio 2011 al 30 Settembre 2012 presso la struttura di Oncoematologia Pediatrica dell'IRCCS Burlo Garofolo di Trieste, che avevano eseguito almeno due emocolture nel corso dell'episodio febbrile. Di questi abbiamo raccolto al tempo zero (nel momento in cui, cioè, è stata richiesta l'emocoltura): PCT, PCR, numero totale dei leucociti e numero dei neutrofilari, natremia, d-dimero, fibrinogeno e antitrombina III. I dati relativi a PCR e PCT sono stati poi raccolti anche per i tre giorni successivi al primo invio del campione per emocoltura. In base al risultato dell'emocoltura abbiamo classificato i pazienti nel gruppo sepsi (emocoltura positiva) e nel gruppo FUO (emocoltura negativa).

RISULTATI: Gli episodi febbrili nel corso dei quali i pazienti hanno eseguito almeno due emocolture sono stati complessivamente 61. Il gruppo sepsi è risultato composto da 13 pazienti, mentre quello FUO da 48. I dati relativi alla procalcitonina misurata al tempo zero erano disponibili per 10/13 pazienti del gruppo sepsi e per 38/48 pazienti del gruppo FUO. Il valore mediano nel gruppo sepsi è stato 3.27 ng/ml, mentre nel gruppo FUO è risultato essere 0.26 ng/ml. Considerando il cut-off di 0.5 ng/ml (metodo Elettro Chemio Luminescens Immuno Assay) come ad elevato rischio di sepsi, è emerso che tutti i 10 pazienti con emocoltura positiva erano positivi al tempo zero; risultavano inoltre positivi anche 15 pazienti appartenenti al gruppo FUO. La sensibilità della PCT risultava quindi essere pari al 100%, con una specificità del 60%. Analizzando i dati con un cut-off di 1 ng/ml, si è vista una riduzione della sensibilità, risultata pari all'80%; la specificità è risultata in questo caso del 78%. La misurazione a tempo zero della proteina C reattiva ha evidenziato una sensibilità pari al 78% e una specificità del 17%, entrambe nettamente inferiori a quelle della procalcitonina. Non sono emerse differenze significative tra i due gruppi per quanto riguarda i restanti dati analizzati (leucociti, neutrofilari, sodio, antitrombina III, D-dimero, fibrinogeno).

CONCLUSIONI: Pur su un piccolo campione, questa revisione della nostra casistica ha permesso di evidenziare alcune caratteristiche che dovrebbero essere poi valutate su gruppi più ampi di pazienti:

1. la procalcitonina è un marker estremamente sensibile, anche se non altrettanto specifico, nell'individuare i pazienti con sepsi rispetto a quelli con affezioni febbrili di altra natura;
2. la procalcitonina è un marker estremamente precoce, dal momento che la sua positività si ha sempre al tempo zero;
3. anche alla luce del costo dell'esame, il dosaggio della procalcitonina può essere eseguito solo all'esordio, ricorrendo ad altri parametri per il follow-up.

P098

PROTOCOLLO EpSSG RMS2005: UN'INDAGINE SULLE MODALITÀ ORGANIZZATIVE PER LA RACCOLTA DATI PRESSO I CENTRI AIEOP

I. Zanetti,¹ G.L. De Salvo,² A. De Paoli,² G. Bisogno¹

¹Dipartimento per la Salute della Donna e del Bambino, Azienda Ospedaliera-Università di Padova, Padova, ; ²Servizio Sperimentazioni Cliniche e Biostatistica, Istituto Oncologico Veneto, IRCCS, Padova, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La raccolta dati riguardante i pazienti inseriti nel protocollo internazionale EpSSG

RMS2005 si basa sulla compilazione di schede informatizzate presenti nel database, realizzata in collaborazione con il CINECA. I referenti dei Centri AIEOP partecipanti, accedono al database via internet attraverso il sito web del protocollo (<https://epssg.cineca.org>) con un'utenza personale fornita dall'International Data Centre (IDC, IOV Padova). Con tale utenza il referente del Centro può inserire e visualizzare i dati dei propri pazienti ma non modificarli una volta inviati. I Centri partecipanti allo studio sono 33, di cui 29 hanno arruolato almeno un paziente dall'inizio dello studio (ottobre 2005) fino a febbraio 2013, per un totale di 250 casi. Scopo di questo lavoro è quello di indagare le modalità di utilizzo del sistema presso i Centri e di valutare eventuali problematiche connesse al suo uso.

METODI: è stata svolta una breve intervista telefonica contattando il referente di ciascun centro AIEOP.

RISULTATI: Sono stati intervistati i 29 referenti dei Centri. Sette (24%) non hanno mai utilizzato il sistema, delegandone l'uso ad altri colleghi specialisti (5 casi) o medici specializzandi (2 casi); per questi 7 centri l'intervista è stata quindi condotta con gli utilizzatori del sistema. Quattordici referenti (48%) si sono sempre occupati in prima persona dell'inserimento dei dati, mentre i rimanenti 8 (28%) sono stati coadiuvati da altre persone: 2 da data manager, 3 da medici specializzandi e 3 da medici specialisti. Complessivamente le persone che hanno avuto accesso al sistema sono state 53 (da 1 a 5 per Centro).

Su una scala di gradimento da 1 a 10 il giudizio mediano è stato 8 (range 7-10) sottolineando la sua efficienza anche se 2 (7%) hanno espresso la preferenza per le schede cartacee utilizzate per protocolli precedenti.

Fra le osservazioni più frequenti: In positivo: a) apprezzamento per la possibilità di poter accedere al sistema in qualsiasi momento e da qualsiasi luogo grazie al collegamento internet b) non sono stati segnalati episodi di mancato collegamento o malfunzionamento del sistema; un solo centro afferma di non avere un collegamento internet affidabile e di non avere un computer sempre disponibile, aspetti che rendono difficile questa modalità di raccolta dati. In negativo: a) il sistema, pur essendo di facile apprendimento ed utilizzo, non ammette che l'input dei dati avvenga durante "ritagli di tempo" o "a memoria": la quantità di dati richiesti e i controlli implementati nel sistema richiedono concentrazione e disponibilità della cartella del paziente b) i dati richiesti in merito alla chemioterapia e alla tossicità per i pazienti High Risk, vengono ritenuti troppo dettagliati pur riconoscendo che si tratta di pochi pazienti per centro e che tali dati sono necessari nell'ambito di uno studio randomizzato c) la scheda relativa al trattamento radioterapico viene ritenuta troppo specifica con la necessità di doversi rivolgere ai colleghi radioterapisti per la corretta compilazione. Alcuni referenti hanno sottolineato la possibilità di utilizzare i dati raccolti anche ai fini della stesura di relazioni cliniche o più in generale per la sintesi della storia clinica del paziente (ad esempio a fine terapia o all'eventuale ripresa di malattia). I controlli insiti nel sistema, che spesso bloccano l'inserimento di dati successivi se "non coerenti" con quelli precedentemente immessi, vengono apprezzati perché si ritiene possano garantire la qualità dei dati inseriti, e contemporaneamente criticati perché rendono il sistema rigido, costringendo l'investigatore a rivedere quanto precedentemente inserito con dispendio di tempo e, in caso di errore di input, a rivolgersi all'IDC per la modifica del dato. L'IDC viene apprezzato per la disponibilità e celerità nelle risposte, per l'assistenza in fase di input e per il caricamento dei referti nel sistema. Più referenti apprezzerebbero la disponibilità di poter visualizzare a sistema in modo rapido ed efficiente la situazione della raccolta dati riferita alle schede e referti mancanti per singolo paziente inserito. Tale mancanza è compensata dall'invio periodico dei reports di monitoraggio da parte dell'IDC.

CONCLUSIONI: Il giudizio sul sistema di raccolta dati per il protocollo EpSSG RMS2005 e l'assistenza offerta dall'IDC sono giudicate in maniera favorevole. La compilazione delle schede presso i centri AIEOP è in gran parte a carico dei medici, in assenza di personale dedicato (data manager). Questo aspetto può rappresentare un problema per la qualità e la raccolta tempestiva dei dati, e andrebbe considerato nella pianificazione e conduzione dei protocolli di ricerca clinica.

P099

DEFINIZIONE DELL'ENTEROPATIA IN PAZIENTI AFFETTI DA SINDROME DEL22

G. Giardino, E. Cirillo, F. Maio, T. Esposito, R. Naddei, V. Gallo, F. Grasso, C. Di Lillo, C. Pignata

Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Unità Operativa

Complessa di Immunologia Pediatrica, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La Sindrome Del22 rappresenta la più comune sindrome da microdelezione nella specie umana. Anche se in tali pazienti è noto che vi possa essere un coinvolgimento gastrointestinale tuttavia a tutt'oggi manca in letteratura uno studio sistematico del coinvolgimento intestinale in tale sindrome. In particolare sono riportati difficoltà nell'alimentazione, costipazione, atresia esofagea e morbo di Hirschprung. Inoltre è stata osservata un'augmentata prevalenza di malattia celiaca (2,1%) rispetto a quella della popolazione pediatrica italiana (0,54%). Scopo di questo studio è valutare dal punto di vista clinico e laboratoristico la natura del coinvolgimento dell'apparato gastrointestinale nei pazienti affetti da sindrome Del22.

METODI: Ventisei pazienti Del22 con età media di 7.6 anni (range 0.6-20.7 anni), rapporto M/F: 1.4:1 seguiti presso l'Area Funzionale di Immunologia Pediatrica di Napoli sono stati inclusi nello studio. La diagnosi di Del22 è stata confermata mediante l'indagine FISH. Per ciascun paziente è stata effettuata una valutazione antropometrica e sono stati raccolti dati anamnestici, con particolare attenzione ai sintomi e segni gastroenterici (diarrea cronica ricorrente, storia di vomito, nausea, dolori addominali, costipazione cronica, calo ponderale, epigastralgia, afte orali, candidiasi orale, carie multiple, reflusso gastroesofageo e difficoltà di deglutizione). In ciascun paziente sono stati valutati parametri laboratoristici nutrizionali ed infettivologici, anticorpi anti-gliadina (AGA), anti-transglutaminasi (anti-TGasi) e anti-endomisio (EMA).

RISULTATI: In 15/26 pazienti (58%) erano presenti sintomi gastroenterici. L'età media d'esordio dei sintomi gastroenterici era di 3 anni (range 0-7 anni). I sintomi gastroenterici più frequenti erano: dolori addominali (9/15), vomito (8/15), reflusso gastroesofageo (8/15) e stipsi (6/15). Diarrea, calo ponderale ed epigastralgia erano presenti in 4/15. In 8/26 vi era distrofia. Per quanto riguarda le indagini di laboratorio in 5/26 era presente ipoproteinemia. In 13/26 pazienti era presente un'anemia sideropenica. Per quanto riguarda la sierologia per celiachia in 9/26 soggetti erano presenti AGA IgA positivi e in 5 di questi anticorpi anti-Tgasi positivi. In nessun caso gli anticorpi anti-endomisio risultavano positivi. In un singolo paziente, era indicata la biopsia duodenale che mostrava atrofia dei villi e iperplasia delle cripte intestinali non responsiva alla dieta priva di glutine.

CONCLUSIONI: In conclusione i nostri dati indicano che nella maggior parte dei pazienti Del22 vi è un coinvolgimento gastroenterico e che vi può essere positività degli AGA dissociata dagli EMA. Inoltre da segnalare che la non responsività dell'atrofia dei villi alla dieta senza glutine, dimostrata in un soggetto, indica una patogenesi differente di tale patologia rispetto alla celiachia.

P100

DIVENTARE GRANDI. STORIE DI RAGAZZI E RAGAZZE GUARITI DALLA LEUCEMIA: UNA PROPOSTA METODOLOGICA

L. Pomcino, G.A. Zanazzo

SC Oncoematologia pediatrica, Istituto di Ricerca e Cura a Carattere Scientifico Materno-Infantile "Burlo Garofolo", Trieste, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il numero di bambini, bambine e adolescenti che oggi possono dirsi guariti dopo una diagnosi di tumore e un percorso di terapia, sta aumentando sempre più. Dall'analisi dei dati del Registro Off-Therapy (ROT) italiano curato dall'Associazione Italiana di Emato oncologia Pediatrica (AIEOP) emerge che nel 2003 erano 14.531 i pazienti guariti da leucemia-tumore, con un incremento annuo pari a 900-1000 casi (ISS, 2008). Questa evidenza ha portato all'emergere di nuovi quesiti clinici e alla necessità di potenziare differenti ambiti di intervento. Nel 2007 un gruppo di specialisti del settore ha tracciato, nella cosiddetta "Dichiarazione di Erice" (Haupt et al., 2007) alcune indicazioni per garantire la corretta assistenza dei guariti e la promozione del loro benessere psicofisico oltre l'esperienza di malattia. Uno dei punti essenziali è che nei programmi di assistenza venga data voce ed espressione anche ai bisogni psicosociali del paziente e della sua famiglia. Per comprendere come l'esperienza di malattia abbia influito sulla vita dei bambini guariti dalla leucemia abbiamo scelto di costruire un progetto di ricerca che prevede la raccolta delle loro narrazioni. Finalità ultima è quella di poter definire progetti di sostegno psicosociali maggiormente individualizzati in un'ottica preventiva.

METODI: Dai registri dei casi di LLA prese in carico dal 1979 ad oggi dal Centro di Emato Oncologia Pediatrica di Trieste sono stati selezionati tutti i soggetti con un'età pari o superiore a 18 anni e fuori terapia da almeno 5 anni. Sono stati individuati 114 casi. È stata preparata una lettera a firma del direttore del Centro per richiedere l'invio, entro due mesi dalla ricezione, di una narrazione scritta della propria vita a partire dai due-tre anni di terapia e in relazione ad essa. Prima dell'invio della lettera ogni guarito è stato contattato telefonicamente dalla psicologa per verificare la correttezza dei riferimenti anagrafici, presentare la ricerca, richiedere l'assenso alla partecipazione al progetto narrativo. Assieme alla lettera è stato inviato un questionario per raccogliere informazioni sociodemografiche e sulla qualità della vita da reinviare unitamente alla narrazione. Ogni soggetto è stato inoltre informato che al termine dei due mesi avrebbe ricevuto un ulteriore sollecito telefonico.

RISULTATI: Fra le 50 persone fino ad oggi contattate telefonicamente, solo una ha espresso il proprio disaccordo rispetto al progetto. In tutti gli altri casi, è emerso dal colloquio telefonico un forte desiderio di condivisione sia da parte del soggetto che del nucleo familiare. In 5 casi, su

richiesta degli interessati, la narrazione è stata raccolta attraverso un'intervista in profondità effettuata al domicilio del ragazzo. Ad oggi 6 persone hanno risposto all'invito inviando una narrazione scritta della propria storia o, in un caso, solo il questionario compilato. Dal materiale finora ricevuto è possibile evidenziare alcuni nodi centrali, che potranno essere articolati in seguito alla raccolta di ulteriori storie: il rapporto con i coetanei, le relazioni con la famiglia di origine, il rapporto con i fratelli e le sorelle, il bisogno di sostegno psicologico, la scuola.

CONCLUSIONI: Dato che lo studio, avviato a metà gennaio, è ancora in fase preliminare, è possibile solo sottolineare che i soggetti guariti conservano nitidamente i ricordi diretti o indiretti di quanto avvenuto anche in tenera età e che nella quasi totalità dei casi, hanno dimostrato un grande desiderio di parlarne e di poter esprimere il proprio punto di vista. Abbiamo l'impressione che il contatto preliminare telefonico abbia favorito l'accoglienza della proposta alla narrazione instaurando una diversa relazione con il Centro rispetto al semplice invio della richiesta e aprendo la porta a ulteriori futuri contatti.

DATI PER LETTI

L001

HERBY: UNO STUDIO COMPARATIVO DI FASE II CON UNA TERAPIA BASATA SUL BEVACIZUMB IN BAMBINI CON GLIOMA MALIGNOM. Massimino,¹ J. Grill,² D. R. Hargrave,³ T. Jaspán,⁴ P. Varlet,⁵ C. Jones,⁶ A.A. Azizi,⁷ A. Cañete,⁸ L. Bubeishvili-Pacaud,⁹ J. Vassal²¹Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano, Italy; ²Institut Gustave Roussy, Villejuif, Paris, France; ³Great Ormond Street Hospital, London, UK; ⁴University Hospital, Nottingham, UK; ⁵Sainte-Anne Hospital, Paris, France; ⁶Institute of Cancer Research, Sutton, UK; ⁷Univ. Klinik für Kinder und Jugendheilkunde, Vienna, Austria; ⁸H.U. LA FE, Valencia, Spain; ⁹F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Malgrado i miglioramenti terapeutici, il destino dei bambini con glioma maligno (HGG) rimane sfavorevole. Lo studio di fase I (Glade-Bender et al., J Clin Oncol 2008) ha indicato che bevacizumab (Bv) è ben tollerato nei bambini con tumori solidi e pertanto vale la pena proseguire studi nell'età pediatrica.

METODI: 120 pazienti valutabili (coorte principale) di età compresa tra 3 e 18 anni con diagnosi centralmente confermata di glioma di grado III e IV secondo la classificazione WHO saranno randomizzati per ricevere il trattamento cosiddetto standard con o senza il bevacizumab. Il trattamento consiste di 6 settimane di radioterapia locale con temozolomide (TMZ) concomitante, seguito da un intervallo di 4 settimane e 48 settimane di TMZ adiuvante con o senza Bevacizumab ogni 2 settimane. Il primo obiettivo è la sopravvivenza libera da eventi (EFS). La valutazione radiologica si basa sui criteri RANO (Revised Assessment in Neuro-Oncology). Gli obiettivi secondari sono overall survival (OS), sicurezza, fattibilità, e tolleranza. Tutti i pazienti che ricevono il bevacizumab avranno un campionamento per la farmacocinetica dopo il 1° e il 4° ciclo della fase adiuvante. La qualità di vita, le funzioni neurocognitive e lo stato di metilazione di MGMT, ed i cambiamenti funzionali del tumore valutati dalla MR con diffusione, dall'imaging con perfusione e dalla spettroscopia, e la correlazione dei biomarker con l'attività clinica e gli effetti collaterali, fanno parte degli studi ancillari. In aggiunta, verrà valutata una coorte di 10 pazienti di età ≥ 6 mesi e < 3 anni con glioma di grado 3 e 4 in progressione evolutiva, anche metastatica trattata con temozolomide e bevacizumab senza radioterapia. L'obiettivo esplorativo è di stabilire la sicurezza, la farmacocinetica e il beneficio del bevacizumab (valutato con la PFS). Tutti i bambini saranno seguiti per ≥ 3 anni. Gli obiettivi per entrambe le coorti saranno analizzati dopo che i 120 pazienti saranno stati seguiti per almeno 1 anno. L'imaging multimodale aiuterà lo sviluppo di nuovi criteri di valutazione per la risposta ai trattamenti in neurooncologia pediatrica. Un aggiornamento dell'analisi relativa alla sopravvivenza globale e alla sicurezza verrà eseguito a 3 anni dalla randomizzazione dell'ultimo paziente.

RISULTATI: Il primo paziente è stato randomizzato nell'Ottobre 2011, il completamento dello studio è previsto per il 2016.

CONCLUSIONI: Non sono al momento disponibili dati tali da spingere a conclusioni. Il trattamento è aperto in Italia presso i Centri di Milano (INT), Torino (Regina Margherita), Genova (Ist. G Gaslini), Padova, Firenze (Osp Meyer), Roma (Osp Gemelli), a breve a Bologna.

L002

UNA STRANA DISSEMINAZIONE LEPTOMENINGEA...S. Viale,¹ C. Pizzato,¹ P. Grotto,¹ E. Opocher,² G. Bisogno,² G. Basso,² L. Da Dalt¹¹UOC Pediatria, Ospedale Cà Foncello, Treviso; ²Oncoematologia Pediatrica, Università degli Studi di Padova, Padova, Italy

INTRODUZIONE: Il rhabdomyosarcoma è il più comune sarcoma delle parti molli in età pediatrica e rappresenta il 3-4 % dei tumori in questa fascia d'età. Le sedi più frequenti sono testa e collo (40%), apparato genitourinario (23%) e arti (15%). Il coinvolgimento secondario del Sistema Nervoso Centrale è una complicanza frequente di rhabdomyosarcoma parameningeo (per contiguità), più rara del rhabdomyosarcoma

come localizzato agli arti. Si manifesta come disseminazione leptomeningea diffusa, con prognosi sfavorevole. Di seguito presentiamo il caso clinico di un bambino di 4 anni con disseminazione leptomeningea di rhabdomyosarcoma, a sede primitiva ignota.

CASO CLINICO: La storia clinica ha inizio a fine settembre 2012, quando il piccolo ha presentato cefalea al vertice, responsiva a paracetamolo, associata ad un episodio di vomito, senza febbre. Il quadro clinico è stato interpretato inizialmente come virale. Per il persistere della sintomatologia il bambino è stato ricoverato dopo una settimana presso un ospedale di rete per accertamenti. All'EEG è stato riscontrato un quadro di sofferenza encefalica frontotemporale sinistra; la TAC cerebrale, eseguita senza mdc, è risultata negativa. Il bambino è stato quindi trasferito presso l'U.O.C. di Pediatria dell'Ospedale di Treviso nel sospetto di una patologia infettiva. All'arrivo, in considerazione delle condizioni cliniche (bambino sofferente ed irritabile) e del riscontro alla rachicentesi esplorativa di leucorachia, sono state avviate terapia antibiotica a largo spettro e antivirale. Inoltre, in seguito alla visualizzazione all'RMN cerebrale di patologica iperintensità leptomeningea a livello sottotentoriale (coinvolgimento vermiano, delle cisterne della base, della lamina quadrigemina) e sovratentoriale frontotemporale, con estensione lungo il midollo e quadro di iniziale idrocefalo triventricolare, si è instaurata anche terapia antiedemigena, con rapido miglioramento delle condizioni generali. In considerazione dell'assenza di febbre e della negatività degli indici di flogosi, oltre agli accertamenti infettivologici, sono stati eseguiti, nel contempo, approfondimenti diagnostici mirati ad escludere una patologia di natura non infettiva. Gli accertamenti infettivologici, eseguiti su sangue e liquor, sono risultati negativi eccetto PCR virale per virus neurotropi su liquor positiva per Enterovirus (risultato aspecifico). L'esame citologico del liquor ha mostrato la presenza di piccole cellule monomorfe, deponendo per una neoplasia maligna non linfomatosa. La diagnostica molecolare su liquor ha mostrato un'elevata positività del trascritto MyoD1 in assenza di traslocazioni. Negativi sono risultati i marcatori neoplastici e lo studio del trascritto MyoD1 su sangue periferico. Nel sospetto di disseminazione leptomeningea di origine tumorale, sono stati avviati ulteriori accertamenti strumentali al fine di individuare la sede del tumore primitivo. Tali indagini sono risultate tutte negative. Il bambino è stato quindi trasferito, dopo un ricovero di dodici giorni, presso il Reparto di Oncoematologia Pediatrica di Padova per approfondimento diagnostico. Alla luce delle indagini strumentali, citologiche ed ematologiche, si è concluso per disseminazione leptomeningea di rhabdomyosarcoma con tumore primitivo ignoto. È stata avviata la chemioterapia sistemica secondo protocollo EpSSG RMS 2005 per i rhabdomyosarcomi metastatici associata a rachicentesi medicata con Topotecan a cadenza settimanale. Si è assistito alla negativizzazione citologica e molecolare del liquor dopo due settimane dall'inizio della terapia e alla scomparsa della diffusa impregnazione leptomeningea dopo un mese.

DISCUSSIONE: In letteratura, nei pochi casi descritti di disseminazione leptomeningea di sarcoma,¹⁻³ viene sempre identificata una lesione primitiva intra o extracerebrale aggredibile chirurgicamente. Nel nostro caso la diagnosi si è basata esclusivamente sulla diagnostica citologica e molecolare, oltre al reperto neuroradiologico. La buona risposta alla terapia intrapresa secondo protocollo per i rhabdomyosarcomi metastatici, al momento, supporta la diagnosi. La chemioterapia locoregionale con iniezioni intratecali settimanali di Topotecan ha confermato gli incoraggianti risultati già descritti in letteratura.^{4,6} È necessario tuttavia uno stretto follow-up per valutare la prognosi a distanza.

Bibliografia:

1. Ji Yeoun Lee et al. *Primary meningeal rhabdomyosarcoma associated with chronic subdural effusion*. J Neurosurg Pediatrics 5:000-000, 2010; 167-171.
2. Pravin Salunke et al. *Middle ear rhabdomyosarcoma infiltrating the petrous with diffuse leptomeningeal spread in a child*. J. Pediatr Neurosci 2012 May-Aug; 7(2): 103-105.
3. Arush MW et al. *Unusual leptomeningeal dissemination in a child with extracranial metastatic alveolar rhabdomyosarcoma*. Pediatr Hematol Oncol. 2009 Sep 26(6): 473-8.
4. Patrick Beauchesne, *Intrathecal chemotherapy for treatment of leptomeningeal dissemination of metastatic tumours*. Lancet Oncol 2010; 11: 871-79.
5. Susan M. Blaney et al. *Phase I Clinical Trial of Intrathecal Topotecan in Patients With Neoplastic Meningitis*. J Clin Oncol 2003, 21:143-147.
6. Potter SL et al. *Phase 2 clinical trial of intrathecal topotecan in children with refractory leptomeningeal leukemia: a Children's Oncology Group trial (P9962)*. Pediatr Blood Cancer. 2012 Mar;58(3):362-5.

L003

PREVENZIONE DEL RETINOBLATOMA TRILATERALE: SOLO UNA QUESTIONE DI CHEMIOTERAPIA?

M.A. De Ioris,¹ P. Valente,² F. Randisi,³ A. Serra,¹ M.D. De Pasquale,¹ A. Romano,² G.S. Colafati,³ F. del Bufalo,¹ A. Cacchione,¹ M.P. Cefalo,¹ B. Bernardi,³ A. Mastronuzzi,¹ R. Cozza¹

¹Dipartimento di Oncoematologia e Medicina Trasfusionale;

²Dipartimento Chirurgico, Oculistica; ³Dipartimento di Diagnostica per Immagini, Neuroradiologia, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS, Roma, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il retinoblastoma (RTB) trilaterale è caratterizzato dalla presenza di un tumore intracranico neuroblastico associato a RTB bilaterale o meno frequentemente, monolaterale. Si presenta nel 3% circa dei pazienti affetti da RTB e può essere sincro o metacrono rispetto al tumore retinico. La chemioterapia sistemica sembrerebbe prevenire il rischio di sviluppare una forma trilaterale di RTB. Lo scopo di questo studio retrospettivo è quello di verificare la frequenza di RTB trilaterale in una casistica monocentrica.

METODI: Dal database dedicato ai pazienti affetti da RTB, sono stati identificati i pazienti con RTB trilaterale; le cartelle cliniche e le RMN cerebrali eseguite dai pazienti con RTB trilaterale sono state revisionate in occasione di questo studio.

RISULTATI: Tra il 1999 e il 2012 sono stati diagnosticati e trattati presso l'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma 107 pazienti affetti da RTB, sex ratio 58/49, età media di 10 mesi (range 0,5-73,5 mesi). Sessantadue pazienti presentavano un RTB monolaterale e 45 un RTB bilaterale. In tre pazienti (2,8%) è stato diagnosticato un RTB trilaterale, metacrono in un caso e sincro negli altri due pazienti diagnosticati, peraltro, più recentemente. L'età alla diagnosi era pari a 18, 16 e 10 mesi rispettivamente; in tutti i pazienti la lesione cerebrale era associata a un RTB bilaterale; in un caso si trattava di un RTB familiare. In tutti i pazienti è stata identificata un'alterazione di RB1. Nessuno dei tre pazienti aveva eseguito chemioterapia prima della diagnosi di RTB trilaterale. Il paziente con RTB trilaterale asincrono e familiare aveva eseguito alla diagnosi l'enucleazione dell'occhio sinistro (RTB gruppo D) e il trattamento focale sull'occhio destro (RTB gruppo A).

CONCLUSIONI: Nella nostra casistica la prevalenza di RTB trilaterale si è confermata essere pari al 3% in accordo con i dati della letteratura. Nessuno dei nostri pazienti aveva eseguito precedentemente un trattamento chemioterapico ma è necessario sottolineare che in due casi si trattava di RTB trilaterali sincroni. Pur su una casistica limitata, i nostri dati sembrano suggerire un rischio di RTB trilaterale in pazienti con RTB bilaterale indipendentemente dall'aver eseguito un trattamento chemioterapico. Sarà necessario confermare in studi epidemiologici cooperativi internazionali su campioni più numerosi se il rischio di sviluppare un RTB trilaterale sia effettivamente ridotto nei pazienti che hanno eseguito chemioterapia come ipotizzato dai dati della letteratura, questo soprattutto alla luce delle nuove prospettive terapeutiche per le forme bilaterali che non prevedono la chemioterapia endovenosa.

L004

FIBROSARCOMA INFANTILE COMPLICATO DALLA PRESENZA DI FISTOLE ARTERO-VENOSE INTRATUMORALI

F. Pierri,¹ M. Scalzone,² I. Russo,² D. Rizzo,² P. Maurizi,² I. Lazzareschi,² A. Pedicelli,³ A. Ruggiero,² J. De Ville,⁴ R. Riccardi²

¹Divisione di Onco-Ematologia Pediatrica, Università Cattolica del Sacro Cuore; ²Divisione di Oncologia Pediatrica; ³Divisione di Diagnostica per Immagini, Policlinico A. Gemelli, Roma; ⁴Divisione di Chirurgia Pediatrica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy

RAZIONALE: Il fibrosarcoma infantile colpisce più frequentemente le estremità e le regioni assiali, raramente interessa il retroperitoneo. La terapia di scelta è l'escissione completa. In presenza di tumori non resecabili, la chemioterapia pre-operatoria si è dimostrata utile nell'evitare interventi chirurgici radicali mutilanti. Il ruolo della chemioterapia post-operatoria, anche in pazienti con margini positivi dopo l'intervento chirurgico, è ancora controverso.

METODI E RISULTATI: Lattante nato a termine giunto alla nostra osservazione a 9 settimane di vita per la presenza di una massa retroperitoneale (7,5 cm x 8,5 cm) infiltrante la vena cava inferiore, senza evidenza di diffusione metastatica (Figura 1). La biopsia del tumore poneva diagnosi di fibrosarcoma infantile. La neoplasia veniva considerata non rese-

cabile e veniva iniziata chemioterapia con Vincristina e Actinomomicina D (regime VA). Alla settimana +7 di trattamento, il bambino ha presentato improvviso distress respiratorio ed edemi generalizzati, nonostante la riduzione della lesione addominale agli esami di rivalutazione di malattia. L'ecocardiografia ha mostrato insufficienza cardiaca congestizia ad alta gittata, associata a dilatazione della vena cava inferiore (Figura 2). Una ecografia Doppler (Figura 3) dei vasi addominali ha evidenziato la presenza di fistole artero-venose multiple lungo la parete del vaso. Il paziente ha pertanto iniziato terapia con diuretici ed è stato sottoposto ad embolizzazioni multiple delle lesioni vascolari, senza miglioramento delle sue condizioni cliniche. Si è perciò deciso di intensificare la chemioterapia, aggiungendo ai farmaci precedentemente utilizzati la ciclofosfamide (schema VAC, 3 cicli), con ulteriore riduzione della massa addominale e degli shunts artero-venosi e conseguente miglioramento dei segni e sintomi di insufficienza cardiaca. Il tumore residuo è stato infine asportato completamente, la vena cava inferiore asportata e ricostruita con due protesi di Goretex. All'esame istologico i margini sono risultati microscopicamente positivi e il bambino ha pertanto ricevuto chemioterapia adiuvante secondo protocollo EpSSG 2005 NRSTS. Gli ultimi esami radiologici di follow up, eseguiti a 6 mesi dalla fine della chemioterapia, hanno mostrato assenza di malattia (Figura 4).



Figura 1.



Figura 2.

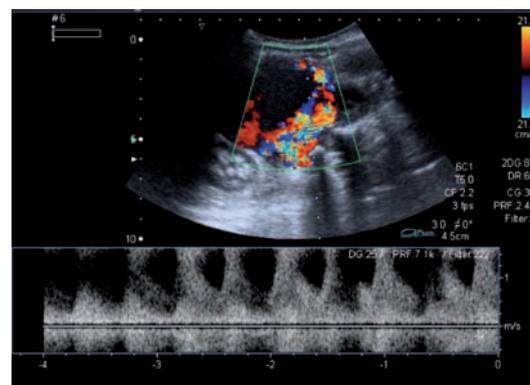


Figura 3.



Figura 4.

CONCLUSIONI: La gestione clinica del paziente è stata complicata dalla presenza di fistole artero-venose multiple nel contesto della lesione. In letteratura non sono segnalati casi di bambini affetti da fibrosarcoma infantile con fistole artero-venose nel contesto della lesione tumorale. La complessità del quadro clinico del nostro paziente ha richiesto un approccio gestionale di tipo multidisciplinare, che si è avvalso di procedure di radiologia interventistica combinate al trattamento chemioterapico per permettere l'asportazione radicale della lesione. In particolare, l'intensificazione della chemioterapia mediante l'aggiunta della ciclofosfamide ai farmaci precedentemente utilizzati, si è rivelata fondamentale per il successo terapeutico.

L005

RABDOMIOSARCOMA ANAPLASTICO PLEOMORFO PRIMITIVO INTRAOCULARE METASTATIZZATO: UN CASO CLINICO RARO

F. Carra, D.C. Rodriguez, S. Giomi, L. Farneschi, G. Coriolani, M. Caini, D. Galimberti, D.F. Guglielmucci, A. D'Ambrosio, P. Balestri

Clinica Pediatrica, Azienda Universitaria Ospedaliera Senese, Siena, Italy

INTRODUZIONE: Il rhabdomyosarcoma (RMS) è uno dei più frequenti tumori maligni dei tessuti molli ed è il più frequente tumore maligno dell'orbita, ma può svilupparsi anche in altre sedi come a livello di capo, collo, tratto urogenitale, muscolo scheletrico. I RMS primitivi intraoculari, a differenza dei RMS orbitari, sono molto rari e poco descritti in letteratura: finora sono stati riportati in età pediatrica solo tre casi di RMS dell'iride¹⁻³, un caso di RMS embrionale del corpo ciliare⁴ e un caso di RMS pleomorfo intraoculare⁵. Due dei RMS dell'iride sono stati trattati prima con radioterapia ed escissione locale, tutti sono stati infine enucleati. Il RMS del corpo ciliare è stato trattato prima con escissione parziale, poi enucleazione. Il RMS pleomorfo intraoculare è stato trattato con enucleazione e successivamente con radioterapia locale e chemioterapia adiuvante (ciclofosfamide, vincristina, dactinomicina, adriamicina). Al follow-up i pazienti erano vivi e senza recidive rispettivamente a 20 anni, 5 anni, 14 mesi, 2 anni e 35 mesi dalla diagnosi. In nessun caso descritto erano presenti metastasi alla diagnosi.

CASO CLINICO: E. è giunta presso la nostra Clinica Pediatrica all'età di 4 anni e 10 mesi per neoplasia del bulbo oculare sinistro, già enucleato in altra sede. E. è nata a 39 settimane di EG, dopo gravidanza normodecorsa, da taglio cesareo elettivo per macrosomia fetale (peso alla nascita 4,120 Kg). Anamnesi familiare positiva per patologie tumorali: madre deceduta a 39 anni per adenocarcinoma metastatico polmonare, nonno materno operato a 70 anni per neoformazione del midollo cervicale. All'età di 18 mesi diagnosticato nefroblastoma cistico di I grado, stadio I, al rene sinistro, trattato con chemioterapia (4 cicli con Vincristina e Actinomicina-D) e nefrectomia parziale. A 23 mesi comparsa di leucocoria in occhio sinistro: posta diagnosi di "cataratta", è stato effettuato intervento di facoemulsificazione e diatermizzazione di "tunica vascolosa lentis". All'età di 26 e 28 mesi effettuati altri due interventi all'occhio sn per "rimozione di sinechie anteriori in campo pupillare". Successivamente sono state effettuate periodiche valutazioni oculistiche che hanno dimostrato progressivo

peggiore del quadro oculare fino a comparsa di dolore oculare, lacrimazione, episodi febbrili e buftalmo. All'età di 4 anni e 9 mesi è stata evidenziata "emovitreo con distacco totale di retina" all'ecografia oculare e alla visita oculistica "in occhio sinistro, camera anteriore di profondità notevolmente ridotta, con tessuto neovascolarizzato, secluzio pupillare e ampia deformazione del profilo irideo". Pertanto la bimba è stata sottoposta ad enucleazione del bulbo oculare sinistro. All'esame istologico il bulbo oculare mostrava un profilo deformato con presenza lesione rilevata e ulcerata in sede corneo-sclerale che ricopriva parte della cornea e in sezione di taglio, in continuità con neoformazione che occupava pressoché totalmente la cavità vitreale estendendosi fino al polo posteriore; in sede intravitreale la massa occupava totalmente la camera anteriore, distruggeva massivamente i corpi ciliari, distaccava e infiltrava la retina e la coroid; inoltre infiltrava in più punti la metà interna della sclera anche a livello del polo posteriore e il nervo ottico oltre la lamina cribrosa ma con margine di resezione libero. All'esame istologico e immunohistochimico: rhabdomyosarcoma nella variante anaplastica, pleomorfa. La stadiazione di malattia (Rx torace, TC collo e torace, TC cerebrale, scintigrafia ossea, mieloaspirato, RM encefalo e orbite) non ha evidenziato metastasi a distanza. Dopo circa un mese dall'enucleazione, appena terminati gli esami di stadiazione, in attesa di definire il più appropriato iter terapeutico, è comparsa una lesione nodulare a livello parotideo sn, che all'esame biptico si è rivelata essere metastasi linfonodale della neoplasia mesenchimale nota. Si è pertanto resa necessaria nuova stadiazione, con TC toraco-addominale, rachicentesi e mieloaspirato, che non ha evidenziato ulteriori secondarismi. In considerazione dell'evoluzione clinica è stato deciso di intraprendere trattamento chemio e radioterapico secondo il protocollo AIEOP RMS 2005, optando per il braccio più intensivo di cure IVADo (ifosfamide, vincristina, actinomicina D e doxorubicina). Al termine delle somministrazioni delle prime dosi di ifosfamide (3g/m² in 3 ore), la bambina ha presentato un episodio convulsivo generalizzato. Esclusa la presenza di secondarismi cerebrali (TC cranio encefalo negativa) l'episodio critico è stato attribuito a neurotossicità da ifosfamide. La chemioterapia è stata pertanto ripresa sostituendo l'ifosfamide con la ciclofosfamide, come previsto dal Protocollo. Dopo il secondo ciclo di chemioterapia la bambina ha presentato una grave mucosite vaginale e al cavo orale (grado G4) associata a iperipressia in neutropenia e intensa sintomatologia dolorosa. Trattata con terapia antibiotica ev (ceftazidime e successivamente amikacina e fluconazolo), idratazione ev, nutrizione parenterale, terapia antalgica con morfina e applicazione locale di gel piastrinico in corrispondenza delle ulcere al cavo orale, con miglioramento progressivo della sintomatologia. In considerazione della importante mucosite al cavo orale (tossicità grado G4), secondo il protocollo è stata ridotta la dose di Dactinomicina del 25% al successivo ciclo chemioterapico. Allo stato attuale la bambina ha effettuato 4 cicli CVADo. In programma RT loco-regionale su orbita sn e linfonodo parotideo sn (sede di metastasi). La metastasi linfonodale parotidea si è ridotta fino a scomparire, clinicamente e radiologicamente (effettuata secondo protocollo RM nelle sedi di malattia dopo 3 cicli di chemioterapia) e non è stata evidenziata progressione di malattia in altre sedi. È in corso lo studio genetico per Sindrome di Li Fraumeni.

CONCLUSIONI: Il rhabdomyosarcoma intraoculare è un tumore molto raro. I casi descritti in letteratura in epoca infantile hanno mostrato un comportamento relativamente benigno, con lenta progressione di malattia intraoculare e nessun caso di localizzazione secondaria sia prima che dopo l'intervento di enucleazione. Il nostro è il primo caso di rhabdomyosarcoma intraoculare infantile metastatizzato. La terapia è tuttora in corso e sarà necessario seguirne l'evoluzione nel tempo con stretto follow-up clinico-strumentale.

Bibliografia:

1. Naumann G, Font RL and Zimmerman LE. "Electron microscopic verification of primary rhabdomyosarcoma of the iris" *Am J Ophthalmol* 1972;74:110-117.
2. Woyke S and Chwirot R. "Rhabdomyosarcoma of the iris." *Br J Ophthalmol* 1972;56:60-64.
3. Elsas FJ et al. "Primary rhabdomyosarcoma of the iris" *Arch Ophthalmol* 1991;109:982-984.
4. Wilson ME, McClatchey SK and Zimmerman LE. "Rhabdomyosarcoma of the ciliary body" *Ophthalmology* 1990;97:1484-1488.
5. Davidson A. et al. "Intraocular rhabdomyosarcoma in the sibling of a patient with a cerebellar medulloblastoma." *J Pediatr Hematol Oncol* 2006;28(7):476-478.

L006

GLIOMI OTTICI IN NEUROFIBROMATOSI DI TIPO 1: ANALISI RETROSPETTIVA MONOCENTRICA

L. Miglionico,¹ L. De Santis,² R. De Santis,¹ M. Foglia,² G.M. Giannatempo,² A. Maggio,¹ M. Maruzzi,¹ G. Nardella,² E. Poli,² A. Romondia,¹ A. Spirito,¹ A. Ciliberti,¹ S. Ladogana¹

¹IRCCS, Ospedale Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG); ²Università degli Studi di Foggia, Foggia, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La Neurofibromatosi di tipo 1 (NF1) è una malattia genetica a trasmissione autosomica dominante presente nell'età pediatrica con un'incidenza di 1:3.500. Si tratta di un disordine multisistemico che coinvolge principalmente la Cute e il Sistema Nervoso. I soggetti affetti da NF1 hanno un rischio da 3 a 4 volte maggiore di un individuo sano di sviluppare, oltre ai neurofibromi, altri tipi di tumori a carico del Sistema Nervoso, come meningiomi e gliomi. I Gliomi delle vie ottiche (Optic Pathway Glioma - OPG), tipicamente Astrocitomi Pilocitici di basso grado, sono i più comuni tumori maligni endocranici nei pazienti con NF1. Si presentano nel 15% dei bambini affetti, compaiono usualmente nella prima decade di vita e determinano un quadro radiologico caratterizzato da rigonfiamento o tortuosità a carico del nervo ottico con possibile coinvolgimento del chiasma ottico o del nervo controlaterale. Sebbene nella maggior parte dei casi abbiano un decorso benigno, da un terzo alla metà dei pazienti possono manifestare sintomi quali proptosi, deficit visivo, pubertà precoce o altri disordini a carico dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. Secondo le attuali linee guida, tutti i bambini affetti da NF1 devono essere sottoposti a screening oftalmologico annuale (misurazione dell'acuità visiva, valutazione del campo visivo, fundus oculi, motilità oculare, ecc.) fino all'età di 7 anni. Per i bambini di età compresa tra 8 e 18 anni lo screening oftalmologico può essere effettuato ogni 2 anni in considerazione della significativa riduzione del rischio di insorgenza di OPG. In presenza di un deficit visivo, è raccomandata l'esecuzione di RM encefalo con studio dettagliato delle orbite. Fatta diagnosi di OPG, il follow-up prevede un controllo oftalmologico ogni 3 mesi nel primo anno, mentre si rimanda ad ogni Centro di Riferimento la scelta circa la frequenza dell'imaging strumentale. Considerando il fatto che solo un terzo degli OPGs progrediscono, le attuali raccomandazioni divulgate dalla SIOP-LGG 2004 (Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique - Low Grade Glioma) prevedono la sola osservazione clinica in tutti i casi di glioma non sintomatico e non evolutivo; diversamente la terapia oncologica viene indicata solo in presenza di segni e sintomi clinici e neuroradiologici di progressione. Il trattamento di prima linea è shiftato dalla radio alla chemioterapia. (Figura 1). Il trial SIOP-LGG 2004 per i pazienti di età inferiore agli 8 anni affetti da NF1, prevede la somministrazione di Vincristina e Carboplatino per 18 mesi, con controllo oftalmologico e neuroradiologico a 24 e a 85 settimane.

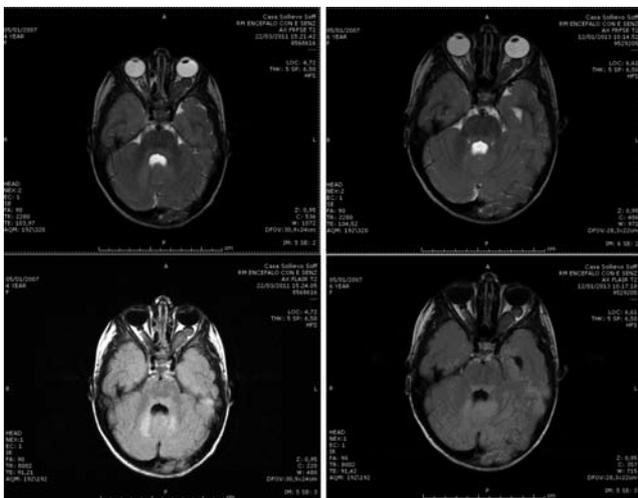


Figura 1. Gliomi dei nervi ottici prima (immagini a sinistra) e dopo (destra) trattamento chemioterapico.

METODI: Abbiamo condotto uno studio retrospettivo sui casi di OPGs in pazienti con NF1, diagnosticati dal 1999 al 2012 presso il nostro Centro AIEOP. Nel periodo di studio abbiamo identificato com-

pletivamente 14 nuovi casi (5 maschi e 9 femmine), di cui abbiamo valutato il decorso clinico-radiologico.

RISULTATI: Nella nostra casistica, gli OPGs si localizzavano esclusivamente a livello dei nervi ottici nel 43% dei pazienti, e con uguale frequenza a livello ipotalamo-ottico-chiasmatico, del chiasma o dei tratti ottici (19%). Di questi 14 bambini, 8 (57%) hanno necessitato di trattamento chemioterapico secondo il Protocollo Low Grade Glioma per peggioramento del visus, esoftalmo o rapido aumento delle dimensioni della lesione cerebrale. L'età media d'inizio della chemioterapia è stata di 4.6 anni con un range compreso tra 23 mesi e 7 anni.

CONCLUSIONI: Dei 14 bambini trattati, in 2 casi si è assistito ad una netta riduzione delle dimensioni del glioma, mentre negli altri casi il quadro radiologico si è confermato stazionario allo Stop-Therapy. Riguardo l'evoluzione clinica, il trattamento chemioterapico ha consentito di stabilizzare il deficit visivo presente all'esordio, migliorando nel 50% dei casi l'ampiezza del campo visivo. Tali dati risultano sovrapponibili a quelli riportati in letteratura,¹⁻³ secondo cui il trattamento chemioterapico per OPG nella maggior parte dei casi risulta ancora insoddisfacente ai fini dell'outcome visivo senza correlazione tra la risposta radiologica alla terapia e la performance visiva.

Bibliografia:

1. Fisher MJ, Loguidice M, Gutmann DH, Listerick R, Ferner RE et al. Visual Outcomes in children with Neurofibromatosis type 1-associated optic pathway glioma following chemotherapy: a -multicenter retrospective analysis. *Neuro-Oncology* 2012; 14(6): 790-797.
2. Shofty B, Ben-Sira L, Freedman S, Yalon M, Dvir R, Weintraub M, Toledano H, Constantini S and Kesler A. Visual Outcome Following Chemotherapy for Progressive Optic Pathway Gliomas. *Pediatric Blood Cancer* 2011; 57: 481-485.
3. Segal L, Darvish-Zargar D, Dilenge ME, Ortenberg J and Polomeno RC. Optic pathway gliomas in patients with Neurofibromatosis type 1: Follow-up of 44 patients. *Journal of AAPOS* 2010; 14: 155-158.

L007

UN RARO CASO DI FIBROSI RETROPERITONEALE IN ETÀ PEDIATRICA

E. Rossi,¹ R. Mamone,¹ L. Castelli,¹ A. Basilicata,¹ M. Zeccolini,¹ B. De Bernardi²

¹Azienda Ospedaliera Santobono-Pausilipon-Annunziata, Ospedale Pausilipon, Napoli; ²Osp. Gaslini, Genova, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Gli autori descrivono un raro caso di fibrosi retroperitoneale idiopatica in età pediatrica studiato con ECO e TC e confermato poi da biopsie.

METODI: La fibrosi retroperitoneale è una rara malattia vascolare del collagene che interessa la popolazione adulta; raramente si manifesta in età pediatrica. Nella complessa diagnosi CT ed RM rappresentano le tecniche d'imaging ottimali sia nella valutazione dell'estensione che di eventuali complicanze.

RISULTATI: Bimba di anni 6 giunge alla nostra osservazione per la presenza di una massa palpabile ai quadranti addominali inferiori. Esegue in prima istanza un'ecografia addominale che evidenzia una formazione espansiva a sede paramediana dx di verosimile pertinenza retroperitoneale ad ecostruttura mista (Figura 1) con segni di disordinata vascolarizzazione al color-Doppler (Figura 2). Successivamente la TC conferma la voluminosa massa solida localizzata in sede retroperitoneale dx con aree emorragiche e colliquate contestuali che disloca contralateralmente i vasi addominali (Figura 3A), cranialmente il rene dx e s'interpone tra addome e muscolo psoas dx stirato verso l'esterno (Figura 3B). Il reperto TC orienta in prima istanza per lesione eteroplastica neurogena del retroperitoneo. Viene effettuata una prima biopsia che evidenzia aspetti compatibili con lesione mesenterica fibroblastica non potendo, però, escludere la possibilità di un tumore neurogenico. Un secondo esame istologico conferma definitivamente la diagnosi di fibrosi retroperitoneale idiopatica.

CONCLUSIONI: La fibrosi retroperitoneale è un raro disordine infiammatorio idiopatico o secondario a neoplasie, infezioni o insulti locali. Sia TC che RM permettono un'ottimale valutazione della sede, dell'estensione, dei rapporti anatomici e di eventuali complicanze, ma la conferma diagnostica rimane affidata all'esame istologico.

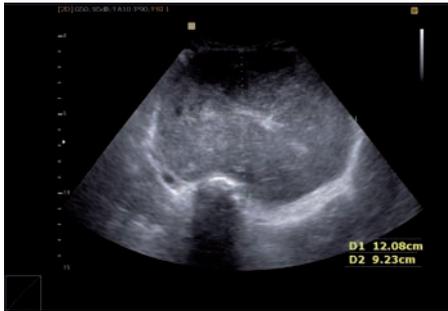


Figura 1. ECO: massa solida disomogenea a sede mediana e paramediana dx localizzata anteriormente alla colonna vertebrale.

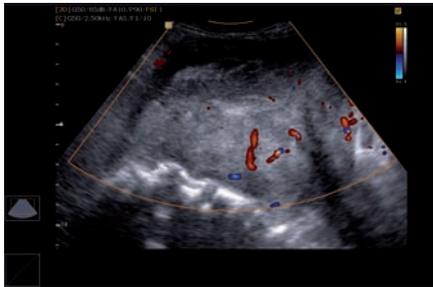


Figura 2. ECO color Doppler: anarchica vascularizzazione intralesione della massa.

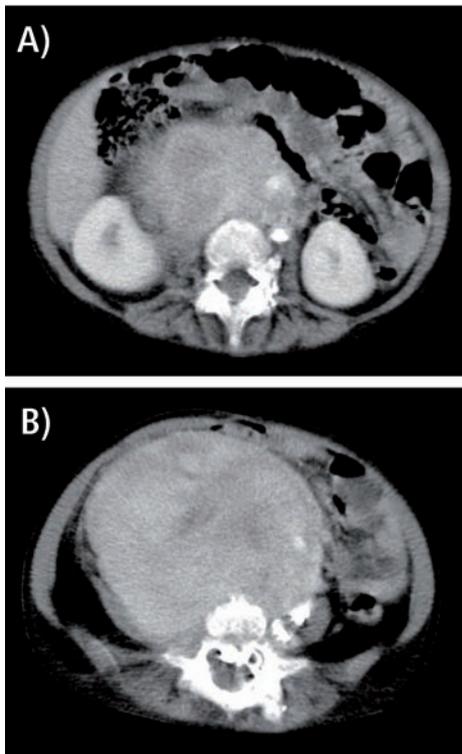


Figura 3. TC con mdc ev: a sede retroperitoneale presenza di massa a densità disomogenea con aree necrotiche emorragiche contestuali che si interpongono tra i grossi vasi addominali (A) ed il muscolo psoas dx stirato all'esterno (B)

Bibliografia:

1. Retroperitoneal fibrosis: Vaglio A, Salvarani C, Buzio C. *Lancet* 2006 Jan 21; 367 (9506): 241-51.
2. Retroperitoneal fibrosis: Typical and atypical manifestations. Vivas I, et al. *Br.J. Radiol* 2000 Feb ; 73(866): 214-22.

3. Retroperitoneal fibrosis: role of imaging in diagnosis and follow-up. Caiafa RO et al. *Radiographics* 2013 Mar ; 33(2). 535-52.

L008

FDG-PET NEL MONITORAGGIO DELLA RISPOSTA ALLA CHEMIOTERAPIA IN UN CASO DI RECIDIVA DI TUMORE DI WILMS (TW)

M. Provenzi,¹ E. Giraldi,¹ F. Saettini,¹ C. Foglia,¹ L. Cavalleri,¹ L. Cattaneo,¹ P. Vai,² A. Bruno,² D. Chinaglia,³ A. Gianatti,³ A. Allegrini,¹ F. Spreafico,⁴ P. Collini,⁵ M. Cheli⁶

¹*Oncematologia Pediatrica;* ²*Medicina Nucleare;* ³*Anatomia Patologica, Ospedale Giovanni XXIII, Bergamo;* ⁴*SC Pediatrica Oncologica;* ⁵*Anatomia Patologica, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori Milano, Milano;* ⁶*Chirurgia Pediatrica, Ospedale Papa Giovanni XXIII, Bergamo, Italy*

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: In numerose neoplasie pediatriche l'utilizzo della FDG-PET è in incremento, in particolare è ormai consolidato il suo ruolo nel management dei linfomi. Tuttavia le potenzialità di questa metodica nel monitorare la risposta al trattamento in alcuni tumori solidi non sono ancora ben definite. Descriviamo un caso di recidiva toracica di TW in cui le tecniche di imaging convenzionali non hanno evidenziato una riduzione dimensionale della neoplasia. La FDG-PET ha consentito di monitorare andamento della neoplasia durante il trattamento metronomico prolungato e evidenziare l'incremento delle aree ad alto metabolismo alla sua sospensione. Inoltre ha documentato l'efficacia della successiva chemioterapia attraverso la riduzione della captazione del radiofarmaco. Il dato istologico ottenuto dopo chirurgia differita ha permesso di correlare le differenti componenti tissutali della neoplasia con l'eterogenea attività metabolica evidenziata attraverso esami seriatî di FDG-PET.

METODI: Nel 2006 diagnosi di TW monolaterale in bambino di 3 anni. Trattato secondo protocollo AIEOP TW/2003 con chemioterapia preoperatoria per giudizio di in operabilità. Dopo nefrectomia diagnosi di TW epiteliale e stromale, senza anaplasia. L'indice mitotico è risultato pari a 3/HPF nelle aree più attive, alcune delle quali con cellule atipiche ma senza mitosi multipolari. La terapia adiuvante si è basata su un regime chemioterapico a 3 farmaci (Regime C: Vincristina Actinomicina-D e Adriamicina) per 35 settimane e radioterapia al fianco (1440 cGy). Una TAC torace effettuata a 9 mesi dallo stop terapia per comparsa di improvvisa dispnea ha evidenziato due masse intratoraciche: una alla base dell'ematotace sinistro (12 cm) ed una all'apice dell'ematotace destro (5 cm). La biopsia ha confermato la presenza di metastasi di TW epiteliale (20%) e stromale (80%), quest'ultima con aspetti regressivi quali fibrosi e reazione linfo-istiocitaria per il 70% senza anaplasia. L'indice di proliferazione è stato valutato del 3% nella componente epiteliale e del 4% nella residua componente stromale vitale. Il trattamento di seconda linea ha previsto 2 cicli Carboplatino-Etoposide e 2 cicli ICE (Ifosfamide - Carboplatino - Etoposide). Le TAC di controllo hanno evidenziato dopo una iniziale risposta parziale e quindi stazionarietà della malattia in termini dimensionali. Successivamente è stata eseguita toracotomia esplorativa che ha permesso di valutare la non operabilità per estesa disseminazione neoplastica. È stata quindi intrapresa chemioterapia di terza linea con Topotecan - Vincristina - Adriamicina. Il controllo TAC ha evidenziato malattia stabile con assenza di modificazione dimensionale delle lesioni. Nel febbraio 2008 il paziente è stato sottoposto a radioterapia su entrambe le lesioni toraciche (1200 cGy) ed ha iniziato una terapia metronomica con Vinorelbina e Ciclofosfamide. Dopo 20 mesi circa di terapia è stato eseguito il primo esame FDG-PET/TC che ha evidenziato malattia dimensionalmente stabile con basso SUV (Figura 1). Si è proseguito con la stessa terapia eseguendo annualmente esami FDG-PET/TC. La terapia metronomica è stata somministrata complessivamente per 45 mesi, quando è stata interrotta su decisione dei genitori del ragazzo. A 4 mesi dall'interruzione della terapia a causa di dispnea e dolore toracico il paziente è stato sottoposto ad un nuovo esame FDG-PET/TC che ha evidenziato progressione di malattia con nuove aree ipercaptanti (Figura 2). Si è deciso di riprendere chemioterapia con Irinotecan e VCR somministrati per 8 cicli totali. Nel luglio e nell'ottobre 2012 (Figura 3) si è valutata una minima regressione dimensionale e metabolica (SUV 8,2 versus 9,2) nell'aria paracardiaca mentre una marcata riduzione dell'attività metabolica si è riscontrata nella regione basale dell'ematotace sinistro (SUV 2 rispetto al precedente 7,4) e nella regione apicale destra (SUV 2 rispetto al precedente 2,5). Nel novembre 2012 e Febbraio 2013 sono stati eseguiti interventi chirurgici per asportazione dapprima della lesione basale

sinistra e successivamente della massa in sede apicale destra. La neoplasia è stata asportata senza residui macroscopici. Il confronto tra la FDG-PET e l'istologia ha evidenziato una correlazione tra le aree ipercaptanti all'imaging e le aree a maggior indice proliferativo (maggiore espressione di Ki67). Come si può vedere nella Figura 4 le regioni a più intensa attività metabolica corrispondono nella massa asportata ad aree di tumore residuo vitale per l'80% con componente epiteliale (30%) e stromale (70%), con marcata componente eterologa di tipo cartilagineo e neurogliale. Solo il 20% del tessuto in questa area presenta alterazioni involutive post terapeutiche. Le regioni a minori attività metabolica alla FDG-PET corrispondono invece ad alterazioni post-terapiche rappresentate da necrosi emorragica con microcalcificazioni, reazione fibroistiocitica con emosiderina e sideromacrofagi e scleroalinosi. Qui la quota di tessuto vitale è pari al 30%.

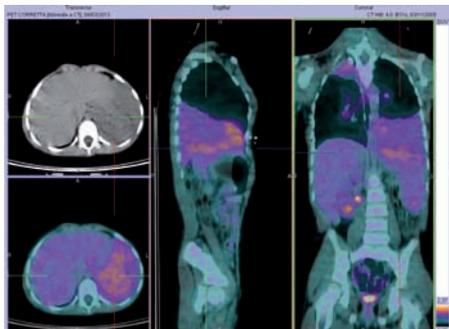


Figura 1. Sede polmonare basale sx SUV max 1,84. Sede apicale dx SUV max 1,91.

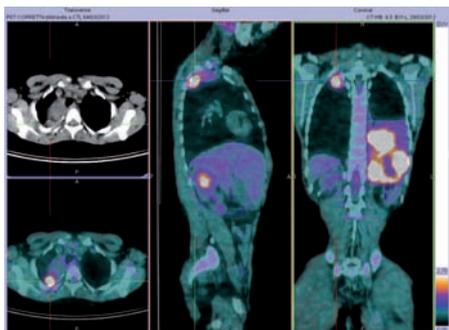


Figura 2. Lesione in regione paracardiaca sx (diametro massimo 50mm; SUV 9,2) e lesione in regione apicale del lobo dx (diametro massimo 25mm; SUV 5,5).

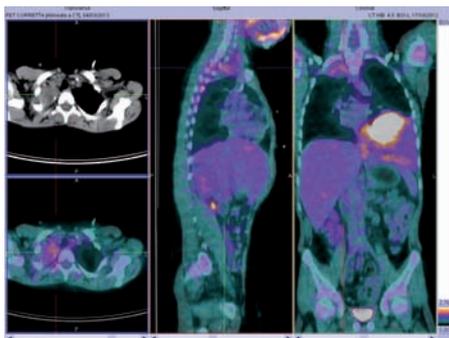
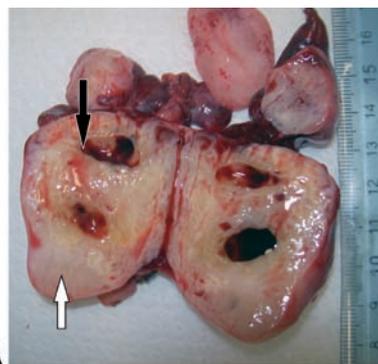
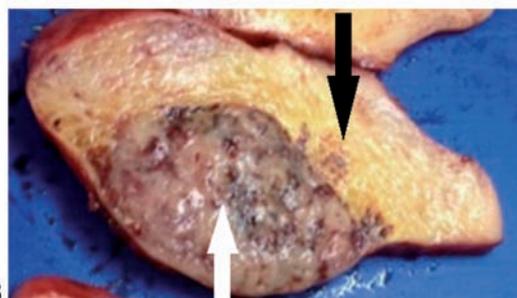


Figura 3. Immagine PET dopo chemioterapia con Irinotecan e Vincristina.



A



B

Figura 4. A) Immagine istologica della lesione apicale dx. B) Immagine istologica della lesione basale sx. La freccia bianca indica area con tumore vitale nell'80% delle cellule, la freccia nera area con tessuto vitale nel 30% delle cellule esaminate.

CONCLUSIONI: L'utilizzo prolungato di una terapia metronomica ha consentito di tenere sotto controllo una recidiva neoplastica caratterizzata da basso indice proliferativo. In assenza di significative variazioni dimensionali all'imaging convenzionale la FDG-PET ci ha consentito di monitorare l'efficacia della terapia documentando il permanere di una bassa attività metabolica. La sospensione della chemioterapia metronomica dopo un periodo di 3 anni e 9 mesi ha portato ad una progressione della neoplasia. Accanto ad un lieve incremento dimensionale la FDG-PET ha mostrato una elevata variazione metabolica correlata clinicamente con la ricomparsa del dolore toracico e della dispnea. L'esame istologico delle masse asportate dopo l'intervento chirurgico ha consentito di documentare la concordanza tra l'eterogeneità tissutale della neoplasie e i differenti SUV riscontrati alle FDG-PET. Il nostro caso dimostra come la metodica FDG-PET sia quindi di estremo valore nel monitorare l'efficacia di un trattamento metronomico prolungato anche in assenza del riscontro di significative variazioni volumetriche della neoplasia fornendo informazioni aggiuntive di carattere funzionale in tumori solo apparentemente non chemioresponsivi alla valutazione con imaging convenzionale.

L009

SECONDI TUMORI DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE IN PAZIENTI AFFETTI DA RETINOBLASTOMA

M.A. De Ioris,¹ R. Cozza,¹ A. Romano,² G.M. Milano,¹ F. Randisi,³ P. Valente,² G.S. Colafati,³ R. De Vito,⁴ A. Angioni,⁵ G. D'Elia,⁵ S. Grotta,⁵ G. Persano,¹ B. Bernardi,³ F. Locatelli,¹ A. Mastronuzzi¹

¹Dipartimento di Onco-Ematologia e Medicina Trasfusionale; ²Dipartimento Chirurgico, SC di Oculistica; ³Dipartimento di Diagnostica per Immagini - SC di Neuroradiologia; ⁴Dipartimento dei Laboratori, SC di Anatomia Patologica; ⁵Dipartimento dei Laboratori, SC di Anatomia Patologica, SS di Citogenetica e Genetica Molecolare, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy

SCOPO: I pazienti affetti da retinoblastoma (RTB) presentano un rischio aumentato di secondo tumore, specialmente se hanno eseguito radioterapia e/o presentano forme ereditarie. I secondi tumori più frequentemente riscontrati sono osteosarcomi, melanomi, tumori cerebrali, sarcomi delle parti molli e tumori epiteliali. Lo scopo di questo studio retrospettivo è quello di verificare la frequenza di secondi tumori a carico del Sistema Nervoso Centrale (SNC) in pazienti affetti da RTB.

METODI: Dal database dedicato ai pazienti affetti da RTB, abbiamo verificato i secondi tumori a carico del SNC. Le cartelle cliniche e le RMN cerebrali dei pazienti identificati sono state revisionate per questo studio.

RISULTATI: Tra il 1999 e il 2011 sono stati diagnosticati e trattati presso l'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma 93 pazienti affetti da RTB, sex ratio 53/40, età media 10 mesi (range 0,8-73,5 mesi). Cinquantatré pazienti presentavano una RTB monolaterale e 40 un RTB bilaterale. Due pazienti (2%) hanno presentato un secondo tumore a carico del SNC. Entrambi i pazienti non avevano mai eseguito RT e, le lesioni SNC, sono state riscontrate a una RMN di follow-up. In entrambi i pazienti, le lesioni SNC erano a carico della regione talamica e suggestive per lesioni gliali di basso grado. Il primo paziente, maschio con età alla diagnosi 7 mesi, presentava un RTB bilaterale trattato con terapia conservativa basata su 6 cicli di chemioterapia con carboplatino ed etoposide e terapia focale. Dopo 38 mesi dalla fine del trattamento conservativo, è stata evidenziata una lesione SNC considerata inoperabile e avviata a stretto follow-up. Dopo sette mesi di malattia stabile il paziente ha presentato una progressione asintomatica di malattia ed è stato quindi avviato a radioterapia stereotassica; il paziente è vivo in remissione completa di malattia a 11 anni dalla diagnosi. Il secondo paziente, femmina con età alla diagnosi 29 mesi, presentava un RTB monolaterale trattato con enucleazione e successivamente con 4 cicli di carboplatino ed etoposide per presenza di fattori di rischio istologici. Dopo 12 mesi dalla fine del trattamento chemioterapico, è stata evidenziata la lesione SNC; la biopsia ha confermato trattarsi di un astrocitoma pilocitico. Dopo 13 mesi di malattia stabile la paziente ha presentato una progressione asintomatica di malattia ed è stata quindi avviata a chemioterapia con bevacizumab e irinotecan; la paziente è viva in trattamento a 8 mesi dall'inizio della terapia.

CONCLUSIONI: Dalla nostra esperienza i secondi tumori a carico del SNC possono presentarsi anche in pazienti che non hanno eseguito radioterapia. Il follow-up con RMN è fondamentale nei pazienti con RTB nei primi 5 anni dalla fine del trattamento.

L010

IL PAZIENTE STRANIERO IN ITALIA: L'IMPORTANZA DEGLI ASPETTI CLINICI NELLA GESTIONE DEL PIANO DI CURA

G. Robustelli,¹ S. Chiaravalli,² F. Spreafico,² M. Marinoni,¹ A. Negri,¹ L. Nespoli,¹ M. Massimino²

¹UO di Pediatria, Ospedale Filippo Del Ponte, Varese; ²SC di Pediatria, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Una realtà crescente nel contesto oncologico pediatrico Italiano è rappresentata da pazienti che lasciano il Paese di origine per sottoporsi alle cure nei centri oncologici pediatrici italiani. Questo tipo di "immigrazione" pone l'equipe medica di fronte a problematiche di gestione dei pazienti che non riguardano solo la sfera dell'assistenza socio-sanitaria e della gestione economica, ma anche quella decisionale clinica. La difficoltà oggettiva ad acquisire l'anamnesi oncologica prossima del paziente straniero, che spesso risulta incompleta o difficile da decifrare per problemi anche linguistici, pone i clinici di fronte a scelte talvolta complesse e non in continuità con il trattamento ricevuto nel Paese di origine.

METODI: descriviamo il caso di una bambina di 20 mesi, affetta da tumore di Wilms (TW) del rene destro, originaria della Moldavia, che ha lasciato il Paese natale, dove aveva già eseguito alcune fasi della terapia, per proseguire l'iter terapeutico in Italia.

RISULTATI: La piccola GDT, bambina di origine moldava giunge in Italia all'età di 20 mesi con visto per cure mediche, accompagnata dalla madre. Dall'analisi della cartella clinica si evinceva che la piccola era affetta da TW del rene destro diagnosticato in seguito ad episodi di addominalgia che avevano spinto il curante ad eseguire valutazione ecografica addominale. In seguito a tale riscontro la bambina è stata sottoposta, presso l'Ospedale di Chisinau, a chemioterapia neoadiuvante con vincristina, actinomomicina e doxorubicina, senza che potessimo acquisire ulteriori informazioni su dosi e numero di somministrazioni. Anche le motivazioni della scelta di iniziare un trattamento preoperatorio con tre farmaci, che normalmente nel TW è impiegata per la presentazione metastatica, non sono chiarificate. Nessuna informazione su eventuale tossicità indotta da tali farmaci è riportata, in quanto non disponibili i risultati dei prelievi ematici. Dopo la fase di chemioterapia pre-chirurgica, alla quale non sembra vi sia stata risposta clini-

co-radiologica (ma mancano immagini radiologiche per confermare questo dato riportato verbalmente dalla madre), sempre nel paese natale, GDT è stata sottoposta ad intervento chirurgico di nefrectomia destra eseguito apparentemente senza complicazioni. La diagnosi istologica era di TW (non è presente descrizione del sottotipo istologico come avviene normalmente nei tumori pretrattati) senza anaplasia e senza metastasi linfonodali. Fortunatamente la famiglia è riuscita a mettere a disposizione un numero esiguo di preparati istologici che hanno permesso una conferma centralizzata della diagnosi di TW. Tuttavia la mancata descrizione dell'intervento chirurgico e l'assenza delle immagini pre-intervento non hanno permesso di definire con certezza l'attribuzione di stadio. Dai documenti messi a disposizione non sembrava che l'intervento chirurgico fosse stato gravato da rottura della massa tumorale, ma ciò non era certo. La scelta della terapia complementare, non potendosi basare su fattori standardizzati quali stadio e tipo istologico post-chemioterapia, si è basata sui seguenti criteri: età della piccola, assenza di anaplasia, dati del protocollo SIOIP 2001 relativi alle aree di impiego della doxorubicina: è stato deciso di iniziare il trattamento chemioterapico secondo quanto previsto dal protocollo AIEOP-TW 2003 per lo stadio II (associazione di vincristina/actinomomicinaD per 25 settimane). Da un lato non vi erano infatti dati certi su cui basare la definizione di stadio III (che avrebbe significato proseguire doxorubicina e radioterapia sul fianco/addome), dall'altro non ci era possibile distinguere tra stadio I e II. Basandoci sui risultati dello studio randomizzato SIOIP 2001 (non superiorità della sopravvivenza nello stadio III con l'aggiunta di doxorubicina) abbiamo ritenuto ragionevole comunque omettere l'utilizzo della doxorubicina. Per l'assenza di dati che non ci permettevano di classificare con certezza il tumore allo stadio III, in considerazione dell'età del paziente, è stata omessa la radioterapia sul fianco. La distinzione tra stadio I e II è stata ritenuta meno rilevante dal punto di vista della decisione terapeutica, in quanto in entrambe queste situazioni di malattia è standardizzato l'impiego di due farmaci, con durate differenti della terapia a seconda dello stadio. Avendo ritenuto la scelta delle sole 6 settimane di chemioterapia (come è per lo stadio I nel protocollo AIEOP vigente) meno convenzionale rispetto ad altri protocolli internazionali, si è ritenuto più prudente decidere per 25 settimane di chemioterapia complementare, come previsto per lo stadio II. GDT è stata sottoposta a due cicli di actinomomicina/vincristina (il primo precauzionalmente con dosaggio calcolato sul peso corporeo), il secondo in accordo con la superficie corporea) e due cicli con sola vincristina (dose calcolata in base alla superficie corporea). Il giorno successivo la somministrazione di vincristina, a +8 giorni dalla somministrazione di actinomomicina, la piccola ha sviluppato un quadro clinico di VOD risolto con supporto trasfusionale intensivo (plasma, concentrati di piastrine e di emazie), terapia diuretica e cortisonica ed infusione di defibrotide. La famiglia alla scadenza del permesso di soggiorno ha modificato le precedenti decisioni manifestate, rientrando in Moldavia dove ha presumibilmente proseguito il trattamento chemioterapico impostato.

CONCLUSIONI: Negli ultimi anni l'incremento dei flussi migratori verso l'Italia per cure mediche è andato aumentando e l'attenzione è stata focalizzata sulle problematiche di natura socio-assistenziale di tali pazienti. Lo stesso Sistema Sanitario Nazionale ha dovuto affrontare e regolamentare tale questione ma l'accento è sempre stato posto sugli aspetti economici da un lato e sulle necessità giustamente primarie dell'assistenza globale al piccolo paziente ed alla sua famiglia dall'altro. Minor attenzione tuttavia è stata posta sulle problematiche cliniche che il medico si trova ad affrontare tutte le volte che deve prendere in cura un paziente straniero, che spesso ha già iniziato l'iter diagnostico e terapeutico nel Paese di origine, per lo più con protocolli terapeutici non in uso in Italia. La mancanza delle informazioni cliniche necessarie per la corretta definizione di stadio o del gruppo prognostico di appartenenza (vedi dati istologici, radiologici e biologici) impedisce l'applicazione del piano di cura più adeguato al livello di rischio individuale che dovrebbe garantire al paziente le migliori possibilità di guarigione. Queste mancanze portano il rischio sia di sovra-trattamenti che di cure non sufficientemente intense. Nel nostro caso il trattamento è stato gravato da una complicità quale la VOD, legata all'utilizzo di actinomomicina, di ausilio in tal senso sarebbe potuta essere la conoscenza del trattamento chemioterapico eseguito in Moldavia e della sua tossicità sulla piccola paziente. Un recente studio AIEOP ha dimostrato una significativa minore overall-survival dei pazienti stranieri giunti in Italia per le cure rispetto ai cittadini italiani a parità di patologia e rischio; tale differenza è sicuramente da attribuirsi ad un'ampia serie di fattori, ma di certo gli aspetti clinici che ci si trova ad affrontare quando si sceglie di curare un paziente affetto da tumore sono primari alla pari dei bisogni economici e socio-assistenziali del paziente stesso.

Bibliografia:

Rondelli R. et al. Foreign children with cancer in Italy. Italian Journal of Pediatrics 2011, 37:44

L011

PUBERTÀ PRECOCE SECONDARIA AD EPATOBLASTOMA

S. Marino,¹ M. Caruso,² S. D'Amico,¹ M. La Spina,¹ G. Russo,¹ M.G. Scuderi,³ V. Di Benedetto,³ S. Scarvaglieri,³ R. Iacona,³ A. Di Cataldo,¹

¹UO Ematologia ed Oncologia Pediatrica; ²Clinica Pediatrica; ³UO di Chirurgia Pediatrica, Azienda Policlinico, Università degli Studi di Catania, Catania, Italy

INTRODUZIONE: La pubertà precoce (PP) consiste nella comparsa dei primi segni di sviluppo sessuale ad un'età inferiore a più di 2,5 DS rispetto alla media di riferimento, cioè prima degli 8 anni nella femmina e prima dei 9 anni nel maschio, in associazione ad un aumento della velocità di crescita e della maturazione ossea. Essa può essere dovuta ad attivazione precoce dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonade (GnRH dipendente, PP vera o centrale) oppure ad un'eccessiva produzione periferica di steroidi sessuali (estrogeni o androgeni) non conseguente ad aumento di gonadotropine (GnRH indipendente, PP periferica o pseudoPP). La più frequente è la PP GnRH dipendente che interessa il 90% delle femmine e il 50% dei maschi con pubertà precoce.^{1,2} L'epatoblastoma (HB) è la neoplasia epatica primitiva maligna più comune in età pediatrica, e rappresenta circa l'1% di tutti i tumori dell'infanzia. L'età media alla diagnosi è di 1 anno e, nella maggior parte dei casi insorge in bambini di età inferiore a 3 anni. Tipicamente si associa a secrezione afinalistica di α fetoproteina (AFP) e talvolta, di β HCG, utilizzate per il monitoraggio della patologia.³

CASO CLINICO: Un bambino di 18 mesi è inviato presso il nostro centro per l'evidenza clinica di una massa addominale confermata anche dall'ecografia. Le sue condizioni generali erano discrete e i dati significativi alla visita erano la presenza di tre macchie caffè latte, in sede poplitea, ipocondrio sinistro e gamba sinistra, l'addome globoso, il fegato aumentato di volume e consistenza, e infine un pene di 5,5 cm, con borse scrotali iperpigmentate, aumentate di volume e rugosità, ed entrambi i testicoli con volume di 3 cc (stadio Tanner G II-III) (Figura 1 e 2). Le indagini di laboratorio evidenziavano alcuni parametri alterati: conta piastrinica di 840000/mm³, transaminasi modicamente aumentate (GPT 91 U/L e GOT 59 U/L), latticodeidrogenasi aumentata (1978 U/L), proteina C reattiva 8,18 mg/dl (vn 0,1-0,8), AFP >50 000 ng/ml (vn 0-5,8), β HCG 15,4 mUI/mL (vn 0-4). Gli esami ormonali mostravano testosterone 3,75 ng/mL (vn <0,1), FSH ed LH rispettivamente di 0,31 mUI/ml (vn 1-8) e di 0,07 mUI/ml (vn 2-12). Sono state escluse le cause di PP centrale e altre cause di PP secondaria come l'iperplasia surrenalica congenita. È stata eseguita anche una radiografia delle mani e dei polsi che ha messo in evidenza un'età ossea secondo Greulich&Pyle pari a 1 anno e 9 mesi. L'ecografia e la TC dell'addome mostravano una voluminosa massa epatica che coinvolgeva quasi tutto il lobo epatico di sinistra e il settore paramediano del fegato di destra per un diametro approssimativo di 9 cm, mentre la TC del torace non mostrava localizzazioni secondarie. Una biopsia incisionale della neoformazione ha permesso di porre diagnosi di epatoblastoma puro epiteliale, di tipo fetale ed embrionale. Il bambino è stato inserito nel protocollo SIOPEL 6-HB-SR, dopo firma del consenso informato, randomizzato nel braccio che prevedeva solo cisplatino. Sono stati somministrati cinque cicli di cisplatino prima dell'intervento chirurgico, con un progressivo regolare decremento dei livelli di AFP. È stata eseguita una epatectomia sinistra allargata ed è stato poi somministrato il sesto ed ultimo ciclo di chemioterapia. Tre mesi dopo l'intervento il bambino è in buone condizioni generali, in remissione completa, e l'esame clinico dell'apparato genitale evidenzia pene di lunghezza pari a 5 cm, dimensioni e pigmentazione dello scroto ridotte, volume testicolare di 3 cc bilateralmente. I livelli di testosterone sierico, AFP e β HCG sono rientrati nella norma (<0,02 ng/mL, 4,9 ng/mL, <0,1 mIU/mL).

DISCUSSIONE: La pubertà precoce isossessuale in pazienti con epatoblastoma è stata descritta per la prima volta nel 1963 in un bambino di 3 anni.⁴ Da allora ne sono stati riportati 20 casi. Dalla letteratura emerge che sono due le ipotesi che potrebbero spiegare l'eccesso di testosterone che è alla base della virilizzazione: una secrezione diretta da parte delle cellule neoplastiche, oppure la stimolazione secondaria dei testicoli da parte della β HCG, biologicamente simile all'LH, in grado di stimolare le cellule di Leyding a secernere testosterone.⁵⁻⁷ È

possibile che entrambe le teorie siano valide in casi diversi. Di certo parte dei casi descritti riguardano bambini con epatoblastoma e livelli elevati di β HCG, ma sarebbe interessante verificare se le cellule di epatoblastoma possono essere in grado di produrre testosterone. Nel nostro paziente, nel quale stiamo assistendo alla progressiva normalizzazione del quadro, riteniamo probabile che la virilizzazione sia stata dovuta all'eccesso di β HCG.



Figura 1.



Figura 2.

Bibliografia:

1. Lee PA, Houk CP. Puberty and Its Disorders. In: Lifshitz F, editor. Pediatric Endocrinology. New York: Informa Healthcare; 2007. pp. 273-303.
2. Boepple PA, et al. Precocious puberty. In: Adashi, EY, Rock, JA, Rosenwaks, editors. Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p. 989
3. Braunstein GD, et al. In vivo and in vitro production of human chorionic gonadotropin and alpha-fetoprotein by a virilizing hepatoblastoma. J Clin Endocrinol Metab. 1972;35(6):857-862.
4. Behrle FC, et al. Virilization Accompanying Hepatoblastoma. Pediatrics. 1963;32:265-271
5. Galifer RB, Sultan C, Marguerite G, Barneon G. Testosterone-producing hepatoblastoma in a 3-year-old boy with precocious puberty. J Pediatr Surg. 1985;20(6):713-714. doi: 10.1016/S0022-3468(85)80030-0.
6. Kumar EV, et al. Clinical, hormonal and ultrastructure studies of a virilizing hepatoblastoma. Acta Paediatr Scand. 1978;67(3):389-392.
7. Nakagawara A, et al. Hepatoblastoma producing both alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotropin. Clinicopathologic analysis of four cases and a review of the literature. Cancer. 1985;56(7):1636-1642

L012

RABDOMIOSARCOMA A LOCALIZZAZIONE RENALE: UNA RARA CAUSA DI MACROEMATURIA NEL BAMBINO

G. Vergine, B. Filippini, R. Pericoli, S. Brocchi, A. Lavacchini, A. Marsciani, V. Vecchi

UO Pediatria, Ospedale Infermi, Rimini, Italy

CASO CLINICO: M.D., maschio di 9 anni giunge alla nostra osservazione per episodio di macroematuria terminale, con urine color rosso vivo, preceduto da dolore addominale intermittente nelle due settimane

precedenti. Una prima ecografia renale eseguita all'ingresso evidenzia reni di normali dimensioni in assenza di calcoli, vie urinarie non dilatate e vescica a contenuto finemente corpuscolato. Gli accertamenti ematologici ed urinari di primo livello hanno permesso di escludere le più comuni cause di macroematuria del bambino, in particolare la glomerulonefrite post-infettiva, la calcolosi renale e l'infezione urinaria. Dopo 2 giorni, per il persistere della macroematuria, ripetiamo un'ecografia renale che mette in evidenza una "idroureteronefrosi dx con materiale ipocogeno non vascolarizzato a livello del calice inferiore, della pelvi e del tratto iniziale dell'uretere", interpretati dal radiologo come possibile coagulo ematico. Tuttavia le ecografie ripetute nei giorni successivi hanno mostrato una sostanziale stabilità del quadro, rendendo poco probabile l'ipotesi formulata. Il riscontro di una iper eosinofilia periferica (E 1200/mmc) ci ha fatto ipotizzare una infezione da Schistosoma, che raramente può causare nel bambino lesioni polipoidi sanguinanti di pelvi ed uretere; tuttavia la ricerca del parassita nelle urine è risultata negativa. Decidiamo quindi di eseguire una Uro-angio-RM che ha permesso di evidenziare a livello della regione papillare del calice inferiore dx una formazione rotondeggiante del diametro di 15 mm ampiamente protrudente nel calice inferiore, con spiccata impregnazione di mdc. L'agobiopsia percutanea ecoguidata e la successiva nefrectomia hanno permesso di porre diagnosi di rhabdomyosarcoma embrionale, variante botrioidale. La massa neoplastica ha dimensioni di 5x2.5 cm, il restante parenchima renale, il tessuto adiposo ed i linfonodi sono indenni da neoplasia. Gli accertamenti strumentali e le biopsie ossee sono risultati negativi per localizzazioni secondarie di malattia.

DISCUSSIONE: Sebbene il rhabdomyosarcoma rappresenti il più comune sarcoma dei tessuti molli al di sotto dei 15 anni, costituendo il 5-10% di tutti i tumori solidi nel bambino, il rhabdomyosarcoma a localizzazione renale è estremamente raro, rappresentando circa l'1% di tutti i tumori renali del bambino, con un picco di incidenza a 9 anni. Rari casi aneddotici sono riportati in letteratura. Recentemente è stata descritta una serie di 12 pazienti pediatrici con sarcoma renale, derivante dai dati dei protocolli dell'Italian Soft Tissue Sarcoma Committee. Dal 1979 al 2011 sono stati registrati 2138 bambini con sarcomi dei tessuti molli, di cui 12 a localizzazione renale. In prevalenza si trattava di pPNET (7/12) e di sarcomi indifferenziati (2/12), mentre solo in un caso si trattava di rhabdomyosarcoma, tumore desmoplastico a piccole cellule ed emangioendoteloma kaposiforme. Nove pazienti sono vivi in prima remissione completa dopo un follow-up medio di 6 anni, due sono deceduti in seguito a ricaduta precoce ed uno è attualmente vivo con malattia metastatica. Il Children's Oncology Group ha riportato nel 2008 una serie di 10 pazienti con sarcoma renale su 5746 pazienti con sarcoma dei tessuti molli arruolati dal 1972 al 2005. 6/10 erano rhabdomyosarcomi e 4/10 sarcomi indifferenziati. Tre pazienti presentavano metastasi alla diagnosi e 4/10 sono deceduti per recidiva (3/10) o per infezione (1/10). Gli autori concludono che i pazienti con localizzazione renale di rhabdomyosarcoma dovrebbero ricevere un trattamento più aggressivo in quanto potrebbero non avere la stessa prognosi dei rhabdomyosarcomi a localizzazione favorevole. Il nostro paziente, secondo protocollo Epssg RMS 2005, sarebbe stato classificabile come "low risk group" (istologia favorevole, localizzato, resezione completa, linfonodi negativi, età < 10 aa, dimensione < 5 cm) e destinato a ricevere chemioterapia secondo schema VA per una durata complessiva di 22 settimane. Alla luce dei dati emersi dalla revisione della letteratura abbiamo però ritenuto opportuno, in accordo con il coordinatore nazionale del protocollo, trattare il nostro paziente secondo il protocollo previsto per i pazienti a rischio standard, ovvero 4 cicli IVA seguiti da 5 cicli VA per un totale di 25 settimane di terapia che il bambino ha completato da circa un mese. Il numero limitato di casi clinici descritti in letteratura rende difficile identificare la scelta terapeutica ottimale per questi pazienti.

L013

SARCOMA A CELLULE CHIARE DEL RENE: ESPERIENZA MONOCENTRICA

A. Serra,¹ M.A. De Ioris,¹ A. Jenkner,¹ M.D. De Pasquale,¹ L. De Sio,¹ R. Cozza,¹ A. Crocoli,² G.M. Milano,¹ G. Persano,¹ F. Diomedes Camassei,³ A. Insera,² F. Locatelli¹

¹Dipartimento di Onco-Ematologia e Medicina Trasfusionale;

²Dipartimento Chirurgico, SC Chirurgia Generale e Toracica;

³Dipartimento Laboratori, SC Anatomia Patologica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy

SCOPO: Il Sarcoma a Cellule Chiare del Rene (*Clear Cell Sarcoma of the Kidney*, CCSK) rappresenta il 5% dei tumori primitivi del rene

nell'età pediatrica; questa neoplasia è associata solitamente ad un prognosi più sfavorevole, essendo gravata da rischio di metastasi a carico del sistema nervoso centrale e dell'osso. Lo scopo di questo studio retrospettivo è quello di verificare la frequenza di CCSK in pazienti affetti da tumori primitivi renali diagnosticati presso l'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù.

METODI: Dal database dedicato ai pazienti affetti da tumore renale, abbiamo verificato i pazienti la cui istologia deponesse per CCSK. Le cartelle cliniche dei pazienti identificati sono state revisionate per questo studio.

RISULTATI: Tra il 1981 e il 2010 sono stati diagnosticati e trattati presso l'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma 208 pazienti affetti da Tumore Renale. Cinque (2.5 %) pazienti presentavano una diagnosi istologica di CCSK, sex ratio 1 / 4 (M/F), età media 40 mesi (range 12-99 mesi). Un'estensione metastatica era presente in un solo paziente. Quattro pazienti hanno ricevuto trattamento chemioterapico pre-operatorio, mentre il successivo trattamento chemioterapico in tutti i pazienti è stato deciso in funzione della stadiazione post operatoria secondo Protocollo SIOP WT 2001 e SIOP WT 93. Ad un follow-up medio di 56 mesi (range 4-134 mesi), 3 pazienti sono viventi senza evidenza di malattia. Una paziente (età alla diagnosi di 12 mesi e metastasi polmonari all'esordio) è deceduta a 5 mesi dalla diagnosi dopo rapida progressione metastatica della malattia; la seconda paziente (nefrectomizzata alla diagnosi presso altro centro) ha presentato una recidiva toraco-addominale a 48 mesi dalla diagnosi ed è deceduta dopo una seconda recidiva toraco-addominale a 134 mesi dalla diagnosi.

CONCLUSIONI: dalla nostra esperienza i CCSK sono relativamente rari ed associati ad una prognosi sfavorevole rispetto ai tumori di Wilms. La malattia recidivata e/o metastatica alla diagnosi presenta un andamento aggressivo e scarsamente chemioresponsivo.

L014

RECIDIVE TARDIVE IN PAZIENTI AFFETTI DA TUMORE DI WILMS

A. Serra,¹ M.A. De Ioris,¹ A. Jenkner,¹ M.D. De Pasquale,¹ A. Mastronuzzi,¹ A. Castellano,¹ A. Crocoli,² F. del Bufalo,¹ A. Cacchione,¹ A. Insera,² F. Locatelli¹

¹Dipartimento di Oncoematologia e Medicina Trasfusionale;

²Dipartimento Chirurgico, Chirurgia Generale e Toracica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS, Roma, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il tumore di Wilms rappresenta il principale tumore primitivo del rene in età pediatrica ed è associato ad una sopravvivenza superiore all'80%, considerando sia le forme con malattia localizzata sia le forme con malattia metastatica. Le recidive -locali e/o metastatiche- si presentano solitamente entro i primi due anni dalla diagnosi. Lo scopo di questo studio retrospettivo è quello di verificare la frequenza di recidive tardive nei pazienti affetti da tumori di Wilms diagnosticati presso l'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù.

METODI: Dal database dedicato ai pazienti affetti da tumore renale, abbiamo identificato le recidive tardive. Abbiamo valutato esclusivamente i pazienti con almeno tre anni di follow-up dal termine del trattamento. Le cartelle cliniche dei pazienti identificati sono state revisionate per questo studio.

RISULTATI: Tra il 1981 e il 2008 sono stati diagnosticati e trattati presso l'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma 168 pazienti affetti da Tumore di Wilms. Due (1.2 %) pazienti hanno presentato una recidiva tardiva, rispettivamente a 6.6 e 8.3 anni dalla diagnosi iniziale. In entrambi i casi si trattava di recidive locali addominali. La prima paziente presentava un nefroblastoma bilaterale diagnosticato all'età di 18 mesi. La seconda paziente presentava un nefroblastoma monolaterale stadio I, rischio intermedio, diagnosticato a 16 mesi; la bambina aveva presentato una 1° recidiva su residuo renale (eminefrectomia alla diagnosi) a 4.2 anni dalla diagnosi -raggiungendo una 2° remissione completa- ed una successiva recidiva locale a 8.3 anni dalla diagnosi. Entrambe le pazienti erano state avviate a trattamento di prima linea secondo Protocollo SIOP WT 2001. Ad un follow-up di 10 e 9.3 anni dalla diagnosi, entrambe le pazienti sono in remissione completa di malattia.

CONCLUSIONI: Dalla nostra esperienza le recidive tardive di nefroblastoma si confermano essere estremamente rare e prevalentemente locali. Queste recidive sembrano essere associate alla presenza di tumori bilaterali alla diagnosi o a precedenti recidive. Per tale motivo un follow-up più prolungato, con la sola ecografia dell'addome, potrebbe essere consigliato nei pazienti con tumori bilaterali e/o precedenti recidive.

L015

TUMORE DI KRUKENBERG IN UNA ADOLESCENTE DI 11 ANNI

S. Ruotolo,¹ M.E. Errico,² L. Castelli,³ E. Rossi,³ L. Quaglietta,⁴
G. Zanotta,⁴ M. Capasso,⁴ R. Migliorati,⁴ S. Vetrella⁴

¹SC di Pediatria Oncologica, Dipartimento di Oncoematologia;

²Servizio di Anatomia Patologica; ³Servizio di Radiologia; ⁴SC
Pediatria Oncologica, AORN Santobono Pausilipon, Napoli, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: I tumori di Krukenberg sono rare neoplasie metastatiche dell'ovaio caratterizzate dalla presenza preminente di "signet ring cells".^{1,2} Gli autori descrivono il caso più giovane della letteratura medica, che è stato caratterizzato da estesa metastatizzazione ossea e polmonare, assenza di risposta alla chemioterapia ed decorso clinico rapidamente evolutivo.

METODI E RISULTATI: Una ragazza di 11 anni veniva riferita alla nostra struttura in buone condizioni cliniche per una storia di edema sovrapubico della durata di due mesi. Ecografia e risonanza magnetica nucleare documentavano due masse solide rotondeggianti (15x10x6,5 e 10,5x5,5x4 cm), occupanti pressoché interamente lo scavo pelvico (Figura 1a). Si riscontrava elevazione di *CA 19.9* (38,9 U/ml; normale 0,0-37,0), *CA 125* (73,26 U/ml; normale 0,0-37,0) e *cromogranina A* (48,0 U/L; normale 2,0-18,0). La ragazza veniva sottoposta ad intervento chirurgico di salpingo-ooforectomia bilaterale. Le ovaie si presentavano macroscopicamente come masse di cm 13 x e 10 x, rispettivamente, a superficie esterna bozzuta, che in sezione, apparivano solide, multinodulari, di consistenza duro-elastica e colorito giallastro. L'esame istologico mostrava, in entrambi i campioni, una neoplasia costituita da nidi e cordoni di cellule epiteliali con nucleo eccentrico e citoplasma chiaro ("signet ring cells") o debolmente eosinofilo, immerse in stroma fibroso cellulare o lasso; si osservavano focali emorragie, necrosi ed emboli neoplastici endovasali. Veniva pertanto posta diagnosi di carcinoma mucinoso con aspetti a "signet ring cell" verosimilmente metastatico, ovvero di tumore di Krukenberg (Figura 2). Nel postoperatorio venivano eseguite indagini per identificare la sede del tumore primitivo tra cui ecografia mammaria e tiroidea, esofago-gastro-duodenoscopia ed ileo-colonscopia, isteroscopia, laparoscopia esplorativa con appendicectomia. Tali indagini risultavano negative per quanto concerne la ricerca del tumore primitivo, ma positive per lesioni scheletriche multiple e adenopatie mediastiniche. In analogia con i protocolli utilizzati nelle neoplasie ovariche dell'adulto, venivano somministrati due cicli dell'associazione di carboplatino e taxolo. Nel corso di questa terapia, si assisteva a rapido peggioramento clinico con comparsa di dolore osseo diffuso, documentato alla TC da aumento delle adenopatie e comparsa di micronodularità polmonari, suggestive di linfangite carcinomatosa (Figura 1b). Nei giorni successivi si instaurava un quadro ingravescente di deficit multi-organo, che portava al decesso della paziente a tre mesi dalla diagnosi. L'autopsia non veniva eseguita per mancato consenso parentale.

CONCLUSIONI: Il tumore di Krukenberg interessa pressoché esclusivamente l'età adulta, con età mediana alla diagnosi di 45 anni.¹ Pochi casi sono stati descritti nella seconda decade di vita,² il più giovane dei quali avente 13 anni.³ Il caso da noi descritto aveva 11 anni alla diagnosi ed è quindi il più giovane della letteratura medica. Gli esami di inquadramento diagnostico documentavano un enorme aumento dimensionale di entrambe le ovaie, associato ad incremento degli indicatori di neoplasia carcinomatosa. L'ovaio di rado può essere sede di tumore epiteliale primitivo, anche in giovane età. Tuttavia, il coinvolgimento bilaterale deponiva per la natura metastatica della lesione. Il trattamento del tumore di Krukenberg include l'asportazione del tumore primitivo, non identificato in questo caso (come si verifica in un terzo dei casi in età adulta), e delle masse ovariche metastatiche, seguita da chemioterapia. Tale approccio è solitamente inefficace nel lungo termine, dato che la sopravvivenza mediana del tumore di Krukenberg è di circa 12 mesi e i casi di guarigione sono aneddotici.^{1,2} Il decorso clinico del nostro caso è stato particolarmente rapido, sollevando l'ipotesi, già espressa da altri autori, che la giovane età sia un fattore favorente l'aggressività della neoplasia e l'assenza di risposta alla chemioterapia.⁴ Il nostro caso, insieme agli altri descritti, suggerisce che il tumore di Krukenberg possa essere incluso nella diagnostica differenziale delle masse ovariche bilaterali.

Bibliografia:

1. Young RH. From Krukenberg to today: the ever present problems posed by metastatic tumors in the ovary. Part II. *Adv Anat Pathol* 2007; 14:149-77.
2. Kiyokawa T, Young RH and Scully RE. Krukenberg tumors of the ovary: a clinicopathologic analysis of 120 cases with emphasis on their variable pathologic manifestation. *Am J Surg Pathol* 2006; 30:277-299.

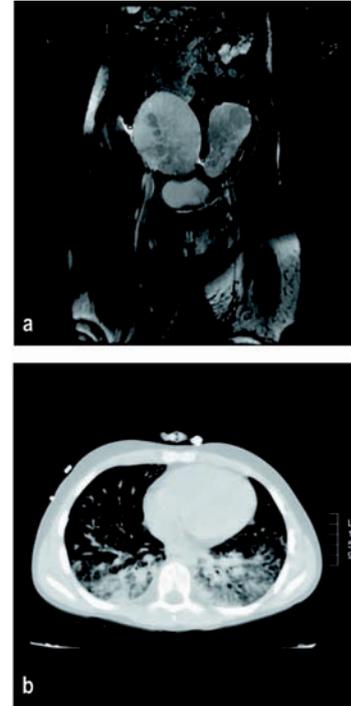


Figura 1. a) RM coronale T2 fat - sat: masse ovoidali iperintense con multipli noduli ipointensi contestuali. b) Scansione TC assiale con finestra per parenchima: opacità a vetro smerigliato con ispessimento del compartimento broncovascolare e dei setti interlobari, noduli peribronchiali, e versamento pleurico destro.

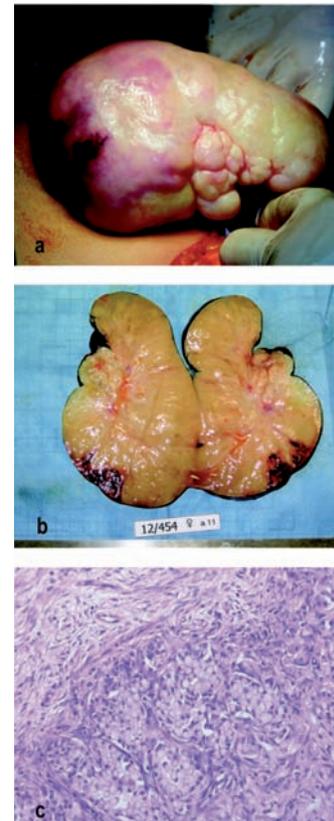


Figura 2. a) Aspetto macroscopico della massa ovarica destra con superficie bozzuta. b) In sezione, la massa è solida, multimodulare, di colorito giallastro, con aree emorragiche. c) La neoplasia è caratterizzata da nidi di cellule epiteliali con aspetto ad "anello con castone" immerse in stroma fibroso (H&E, X200).

3. Khurana P, Sachdev R, Uppal S, Bisaria D. Krukenberg tumor in a 13-year-old girl: a rare occurrence. *Indian J Pathol Microbiol* 2010; 53:874-875.
4. Gupta P, Snebold MA, oDonnelly S. Krukenberg's tumor in the young population. *J Am Osteopath Assoc* 1989; 89:500-502.

L016

MALATTIA FUNGINA INVASIVA (MIF) IN PAZIENTI PEDIATRICI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE: STUDIO RETROSPETTIVO MONOCENTRICO DELL'UO DI ONCOEMATOLOGIA PEDIATRICA DI PISA

E. Chiocca, M. Menconi, S. Bernasconi, G. Casazza, E. Dati, C. Favre
UO Oncoematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Pisa, Italy

PREMESSA: Le infezioni fungine invasive rappresentano un cruciale problema nei pazienti onco-ematologici sottoposti a trapianto di cellule staminali Emopoietiche (TCSE). Nonostante il miglioramento dell'assistenza medica e l'introduzione di nuovi farmaci antifungini, l'impiego di terapie citostatiche aggressive e la prolungata neutropenia cui vanno incontro i pazienti incrementano notevolmente la possibilità di sviluppare un'infezione fungina. Secondo la più recente definizione di Malattia Fungina Invasiva (MIF), formulata dall'EORTC-MSG nel 2008, la classificazione delle infezioni si basa su tre livelli di certezza diagnostica (certa, probabile, possibile) e viene riferita a pazienti ematologici, immunocompromessi sottoposti a TCSE. I criteri presi in esame per definire i tre livelli di certezza diagnostica comprendono: fattori inerenti alle caratteristiche di base del paziente (es. immunocompromissione), dati clinici e radiologici ed esami microbiologici (colture da siti non sterili, test di ricerca di antigeni circolanti nel siero o su un liquido di lavaggio broncoalveolare-BAL). I dati clinici ed epidemiologici disponibili derivano soprattutto da studi condotti su pazienti adulti e sono stati condotti pochi studi retrospettivi per valutare incidenza, eziologia, presentazione clinica, fattori di rischio e mortalità associati alla MIF nei pazienti pediatrici affetti da patologie onco-ematologiche e sottoposti a TCSE.

SCOPI DELLO STUDIO: Scopo principale del presente studio è stata l'analisi retrospettiva dell'epidemiologia, delle caratteristiche cliniche e radiologiche-laboratoristiche, dei fattori di rischio, del trattamento e dell'*outcome* della Malattia Fungina Invasiva (MIF) nei pazienti pediatrici sottoposti a Trapianto di Cellule Staminali Ematopoietiche presso il centro di Oncoematologia Pediatrica di Pisa dal Gennaio 2002 al Dicembre 2012.

PAZIENTI E METODI: Sono stati valutati retrospettivamente tutti i soggetti sottoposti a TCSE dal 2002 al 2012 presso la U. O. Di Oncoematologia Pediatrica di Pisa, per un totale di 225 pazienti. Di questi: 14 pazienti hanno sviluppato una Malattia Fungina Invasiva certa o probabile con un tasso di incidenza complessiva del 6,2%.

RISULTATI: Nella casistica valutata (n 14) il 71% (n=10) dei pazienti era di sesso maschile e il 29% (n=4) di sesso femminile. 4 pazienti presentavano come malattia di base una Leucemia Mieloide Acuta, 4 una Leucemia Linfoblastica Acuta, 2 una Leucemia Acuta Bifenotipica, 2 un'Anemia Aplastica, 1 una Leucemia Acuta Promielocitica ed 1 un Linfoma a cellule T periferico. Per il 71% (n 10) dei pazienti si trattava del primo trapianto, per il 29% (n 4), il secondo o il terzo trapianto. 13 pazienti sono stati sottoposti a TCSE allogenico (da donatore familiare, 5 da donatore MUD), mentre 1 a TCSE autologo. Al momento del trapianto 6 pazienti presentavano una stato di malattia in progressione, mentre 8 una malattia in remissione completa. Nell'86% dei casi le infezioni si sono verificate nei primi 100 giorni dal trapianto. Il 36% dei pazienti ha avuto una MIF con diagnosi certa (n 5), mentre il 64% (n 9) una diagnosi probabile. Il 79% delle infezioni ha presentato un interessamento polmonare, che è risultato il sito più frequentemente coinvolto nelle infezioni fungine. In 2 casi c'è stato un coinvolgimento dei seni nasali e paranasali, in 1 caso un interessamento cutaneo e disseminato e in 1 caso una forma di sepsi fungina. Nei casi di MIF certa i patogeni isolati sono stati: 3 casi *Aspergillus fumigatus*, 1 caso di *Aspergillus flavus* ed 1 caso di *Fusarium spp.* Nei pazienti con interessamento polmonare (n= 12), i reperti radiologici più frequentemente riscontrati alla TC del torace sono stati: addensamenti singoli o multipli (75%), micronoduli (25%), versamento pleurico (33%), lesioni cavitate con "air crescent sign" (33%) e "halo sign" (17%). Sei pazienti (43%) sono andati incontro a riattivazione del CMV nei primi 100 giorni dal trapianto, 5 di questi consensualmente allo sviluppo della MIF. Al momento dell'insorgenza della MIF, il 36% dei pazienti presentava GVHD, il 71% neutropenia, il 57% stava assumendo terapia corticosteroidea (metilprednisolone > 1 mg/kg/die per un periodo > di 7 giorni) e il

93% profilassi antifungina (fluconazolo). Mediante l'analisi univariata, alcuni fattori sono risultati significativamente correlati allo sviluppo di MIF e alla mortalità nel gruppo dei pazienti esaminati. In particolare il numero di trapianti eseguiti in precedenza è risultato essere un fattore prognostico negativo ($p .031$), così come lo stato di malattia non in remissione al momento dell'inizio del trapianto ($p .010$) e l'impiego di terapia corticosteroidea per un periodo maggiore di 7 giorni precedente alla MIF ($p .026$). Nella casistica valutata il 57% dei pazienti è andato incontro a decesso. La mortalità si è verificata maggiormente nei primi 100 giorni dal trapianto (intervallo medio trapianto-decesso: 104 giorni), e tutti i casi di decesso erano entro i 6 mesi dal TCSE.

CONCLUSIONI: Nonostante i progressi diagnostici ottenuti e l'impiego tempestivo di terapie antifungine efficaci, la MIF rimane ad oggi una grave complicanza con elevato rischio di mortalità nei pazienti sottoposti a TCSE. L'attenta valutazione di alcuni fattori di rischio, e dove possibile la loro eliminazione, associata ad accertamenti diagnostici appropriati e tempestive misure terapeutiche devono essere attuate il più precocemente possibile per cercare di ridurre la mortalità legata alla MIF.

L017

STABILE PRODUZIONE DI EMOGLOBINA FETALE DOPO RIGETTO DI TRAPIANTO DI MIDOLLO ALLOGENICO: GENETIC BACKGROUND

K. Paciaroni,¹ G. De Angelis,¹ M. Marziali,¹ C. Gallucci,¹ A. Isgrò,¹ C. Alfieri,¹ A. Roveda,¹ L. Cardarelli,¹ M. Ribersani,¹ J. Gaziev,¹ P. Sodani,¹ E.R. Nuzzolo,² M.G. Iachinotò,² F. Martelli,³ M.R. Migliaccio,³ G. Lucarelli¹

¹International Centre for Transplantation in Thalassaemia and Sickle Cell Anaemia, Istituto Mediterraneo di Ematologia, Policlinico "Tor Vergata", Roma; ²Dipartimento di Ematologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma; ³Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Elevati livelli di emoglobina fetale (HbF) migliorano la morbilità e la mortalità nella Sickle Cell Anaemia (SCA) and β -talassaemia major. La variabilità dei livelli di HbF è geneticamente controllata da multipli geni in diversi cromosomi e recenti studi ricostruiscono i meccanismi molecolari che regolano la produzione di HbF. Il nostro gruppo ha osservato un evento assolutamente inusuale: la stabile ed elevata produzione di HbF è stata documentata in 3 pazienti affetti da disordini del gene della β -globina dopo il rigetto di trapianto di midollo osseo e ricostituzione midollare autologa. In questo studio è stato studiato il background genetico dei pazienti che hanno manifestato la riattivazione della sintesi dell' HbF.

METODI E RISULTATI: Due casi di β^0 -thlassaemia major sono stati candidati al trapianto di midollo: il primo paziente talassemico ha rigettato il midollo allogenico a +40 giorni e il secondo a +90 giorni dopo il trapianto. La ricostituzione del midollo autologo è stata documentata mediante l'analisi molecolare del DNA che rivelava 0% cellule del donatore in entrambi i casi. Il supporto trasfusionale è stato necessario per sostenere l'anemia fino a +118 e +162 giorno dopo il trapianto nel primo e nel secondo caso rispettivamente. Dopodiché i livelli di emoglobina sono stati stabilmente sopra 11.8 e 10.2 g/dl rispettivamente senza l'uso del supporto trasfusionale e l'elettroforesi dell'Hb ha rivelato HbF 99.8% in entrambi i casi. Al momento siamo a +84 and +72 mesi rispettivamente di follow-up dopo il rigetto ed entrambi i pazienti mantengono una piena e persistente produzione di HbF (99.8%) e sono liberi da trasfusione. Il terzo caso è un paziente affetto da SCA e sottoposto a trapianto allogenico aploidentico che è stato rigettato +48 giorni dopo il trapianto con ricostituzione autologa (0% documentato all'analisi del DNA). Diciannove mesi dopo il rigetto, sono stati rilevati aumentati livelli di HbF (49.2%) e sino ad oggi a 32 mesi dal rigetto, il paziente mantiene stabili livelli di Hb sopra 11.4 gr/dl e non ha più sofferto senza episodi di crisi vaso-occlusive. L'analisi genetica ha documentato che tutti i 3 pazienti sono carriers per la forma non-delezionale di persistenza ereditaria di HbF. Entrambi i pazienti talassemici sono omozigoti per la mutazione puntiforme -158 (C->T) nella sequenza del G- γ promoter. Il DNA dei pazienti talassemici è stato analizzato per le varianti genetiche presenti a 3 diversi loci e implicati nelle variazioni interindividuali dei livelli di HbF: *HBSIL-MYB*, *BCL11A* e *KLF1*. Un plototipo legato ad alti livelli di HbF, la mutazione CT è stato rilevata al locus *MYB-HMIP2* in uno dei due pazienti talassemici.

CONCLUSIONI: In la riattivazione della sintesi dell' HbF può avvenire anche in età adulta e alti livelli di HbF danno un beneficio terapeutico ai pazienti affetti da difetti genetici del gene β dell'emoglobina rendendoli trasfusione indipendenti o liberi da crisi vaso-occlusive. è probabile che il

Risultati: 5 bambini hanno ricevuto due trapianti, uno ha presentato un quadro di alterazione neurologica severa e di progressione neurologica della malattia, un paziente non ha trovato un donatore compatibile volontario ed i suoi genitori hanno rifiutato la procedura. Due bambini sono deceduti, uno all'età di 16 mesi di sepsi ed il secondo all'età di 10 mesi di insufficienza respiratoria. Solo un paziente affetto da difetto di CLCN7 che ha ricevuto trapianto allogenico da fratello compatibile è deceduto con un attecchimento del 100% per grave compromissione neurologica. Tutti i bambini hanno mostrato una normalizzazione dei radiogrammi ed una normalizzazione della situazione ossea. Nessun paziente ha avuto un peggioramento o miglioramento della funzione visiva dopo TMO. Alcuni pazienti hanno sviluppato un moderato ritardo nelle acquisizioni psicomotorie con atteggiamenti autistici che non erano presenti prima del trapianto. Un bambino ha presentato episodi critici 10 anni dopo il trapianto. 10 bambini hanno sviluppato GVHD tra lieve e moderata, solo 2 hanno presentato GVHD cronica di cui una estensiva ed una limitata. In due casi si è presentato, a distanza di anni, un carcinoma tiroideo, trattato con successo, probabilmente legato alla terapia con busulfano.

CONCLUSIONI: La probabilità di sopravvivenza libera da malattia è per questi bambini dell'80% se vi è un donatore HLA identico familiare, del 33% nel caso del trapianto aploidentico, del 66% se vi è un donatore volontario compatibile.

L020

YOLK SAC TUMOR: UNA RARA PRESENTAZIONE

M. di Martino, C. Fusco, E.Pota, C. Barone, P. Fiano, C. Indolfi, G. Gualdiero, G. Pecoraro, C. Ficociello, I. Martinelli, S. Perrotta, F. Casale, P. Indolfi

Dipartimento della Donna, del Bambino e della Chirurgia Generale e Specialistica, Seconda Università, Napoli, Italy

INTRODUZIONE: I tumori a cellule germinali maligni (TCGM) dell'età pediatrica sono tumori rari costituendo appena il 3% di tutte le neoplasie maligne diagnosticate in tale fascia di età. Diverse possono essere le sedi di insorgenza e la regione sacro-coccigea, seguita dall'ovaio, costituiscono i siti di più frequente interessamento. Rarissima però risulta una presentazione esclusivamente paravertebrale quale quella occorsa ad una lattante giunta alla nostra osservazione.

CASO CLINICO: La piccola è venuta alla nostra osservazione nel marzo 2005, all'età di 17 mesi, per l'insorgenza, in circa 3 settimane, di paraplegia. Una TC spinale D5-L2 ed una RMN spinale hanno evidenziato una voluminosa lesione paravertebrale dx con invasione intracanalare. Nella norma le catecolamine urinarie. La piccola è stata sottoposta in urgenza ad intervento di laminotomia dorso-lombare su 4 livelli con rimozione parziale della componente extra durale. L'esame istologico ha consentito di porre diagnosi di TCGM con aspetti di tumore del seno endodermico. Elevato il valore dell'alfa1-fetoproteina (24331.8). La paziente è stata pertanto arruolata nel protocollo AIEOP TCGM 2004 effettuando 4 cicli PEB e, alla sospensione, intervento chirurgico di asportazione della massa residua paravertebrale. All'esame istologico si apprezzava solo focalmente residua neoplasia vitale <5%. Nella norma la valutazione dell'alfa1-fetoproteina (8.8). Si è deciso pertanto di inserire la paziente in uno stretto follow-up (mensile) clinico-laboratoristico ed ecografico. A 3 mesi dallo stop-therapy la piccola ha presentato una recidiva locale testimoniata dall'imaging (massa di circa 2 cm) e dalla risalita dell'alfa1 (30.3), trattata con intervento chirurgico di exeresi (alfa1 post-intervento 11.5), terapia di 2° linea (3 cicli ICE) e consolidamento con alte dosi e reinfusione di midollo e cellule staminali periferiche. La piccola è attualmente viva, in II remissione completa, con deambulazione corretta, a 7 anni dal trapianto.

COMMENTO: Ci è sembrato interessante segnalare questa rara presentazione di TCGM nell'ottica di considerarla, pur se infrequente, in diagnosi differenziale nei casi di neoplasia paravertebrale non secernente.

L021

PROFILO DI RICOSTRUZIONE IMMUNOLOGICA DOPO TRAPIANTO ALLOGENICO DI CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE DA DONATORE FAMILIARE E NON

C. Nastasi,¹ D. Zama,² M. Franzoni,² R. Masetti,² A. Prete,² A. Pession²

¹Unità di Oncologia ed Ematologia Pediatrica "Lalla Seragnoli", Ospedale S. Orsola-Malpighi, Università di Bologna, Bologna;

²Oncologia ed Ematologia Pediatrica "Lalla Seragnoli", Ospedale S. Orsola-Malpighi Bologna, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (TCSE) è una procedura potenzialmente curativa in bambini affetti da malattie oncologiche e non oncologiche. Le infezioni severe e la Graft versus Host Disease (GVHD) rappresentano le principali complicanze che limitano l'utilizzo di questa procedura. Il sistema immunitario (SI) gioca un ruolo essenziale nella velocità della ripresa post-trapianto e nella protezione dalle infezioni, tale da condizionare l'outcome finale.¹ Pochi studi hanno valutato il recupero del sistema immunitario nei primi 100 giorni dopo TCSE in età pediatrica, periodo durante il quale il paziente può incorrere nelle suddette complicazioni; per questa ragione, il nostro obiettivo è stato quello di descrivere il recupero di diverse sottopopolazioni linfocitarie in relazione al tipo di donatore durante i primi 100 giorni dopo TCSE.

METODI: Da Aprile 2012 sono stati arruolati i bambini candidati a TCSE allogenico presso l'Unità Trapianto dell'Oncematologia Pediatrica dell'Ospedale S.Orsola-Malpighi di Bologna. Le caratteristiche cliniche e trapiantologiche dei 17 pazienti pediatrici sono riportate nella Tabella 1. Per ogni paziente sono stati raccolti campioni ematici in tempistiche prestabilite: pre-TCSE, all'attecchimento, ed ogni 10-15 giorni per un periodo di monitoraggio complessivo di 100 giorni dopo il TCSE. La tipizzazione delle sottopopolazioni linfocitarie è stata condotta su sangue periferico mediante analisi al FACS CantoII, usando diverse combinazioni di anticorpi fluorescenti per: CD3+CD4+ CD3+CD8+ , naive (CD45RA+4+, CD45RA+8+), memory (CD45R0+4+, CD45R0+8+), B (CD19+), Tregs (CD4+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3+), NK (CD16+CD56+). Al fine di analizzare le Th17 (CD3+CD4+ IL-17+), Th1 (CD3+ CD4+ INF-g+), Th2 (CD3+ CD4+ IL-4+) le PBMC sono state isolate da campioni di sangue periferico tramite differenza di gradiente di densità Ficoll-mediato e coltivate in terreno RPMI 1640 prima di essere stimolate e marcate extracellulamente per gli antigeni di superficie e, poi, internamente per gli antigeni intracellulari.

Tabella1. Caratteristiche cliniche e trapiantologiche dei pazienti analizzati.

N° pazienti	17
M/F	11/6
Età (anni), [range]	9 [2-17]
Diagnosi	
Onco	13
Non-onco	4
Donatore	
Relati	7
Non-relati	10
HLA matching	
match	12
mismatch	5
SSC	
Midollo osseo	15
PBSC	1
Sangue cordonale	1
Regime di condizionamento	
TBI	2
Busulfano	15
Profilassi anti-GVHD	
CSA	7
CSA+MTX	9
CSA+prednisolone	1
GVHD	
I-II	5
III-IV	3

RISULTATI: La tipizzazione leucocitaria nel primo periodo post-TCSE mostra un lento recupero di tutte le popolazioni esaminate, la cui conta assoluta di ciascuna popolazione oscilla nel range di 5-200 (cell/uL), sia nei pazienti ricevuti MUD che sibling; si nota un più

veloce recupero delle NK nei riceventi MUD rispetto ai sibling e dal 30° giorno in poi un incremento delle cellule citotossiche CD3+CD8+ in entrambi i gruppi (Figura 1). Non è stata osservata nessuna differenza nella ricostruzione delle cellule T memory e naïve, sia CD4+ che CD8+, tale che mostrano un recupero simile fra i MUD e i sibling, sebbene l'andamento risulti più lento nei MUD (Figura 1). Suddividendo gli stessi pz in base all'insorgenza o meno della GVHD, 8 hanno manifestato la GVHD acuta: 5 di grado I-II e 3 di

grado III-IV. Due pz sono deceduti: 1 per sepsi da Klebsiella in corso di GVHD intestinale di IV grado in giornata +95 dopo TCSE da MUD HLA-mismatch per LAL, 1 per infezione polmonare in giornata + 90 dopo TCSE MUD da sibling per AAS. I pz con GVHD presentano un aumento rilevante delle cellule Th1 ed una concomitante riduzione delle cellule Tregs (Figura 1). Nei pazienti con GVHD non è stato trovato un aumento delle cellule Th17 rispetto a chi non ha presentato GVHD (Figura 1).

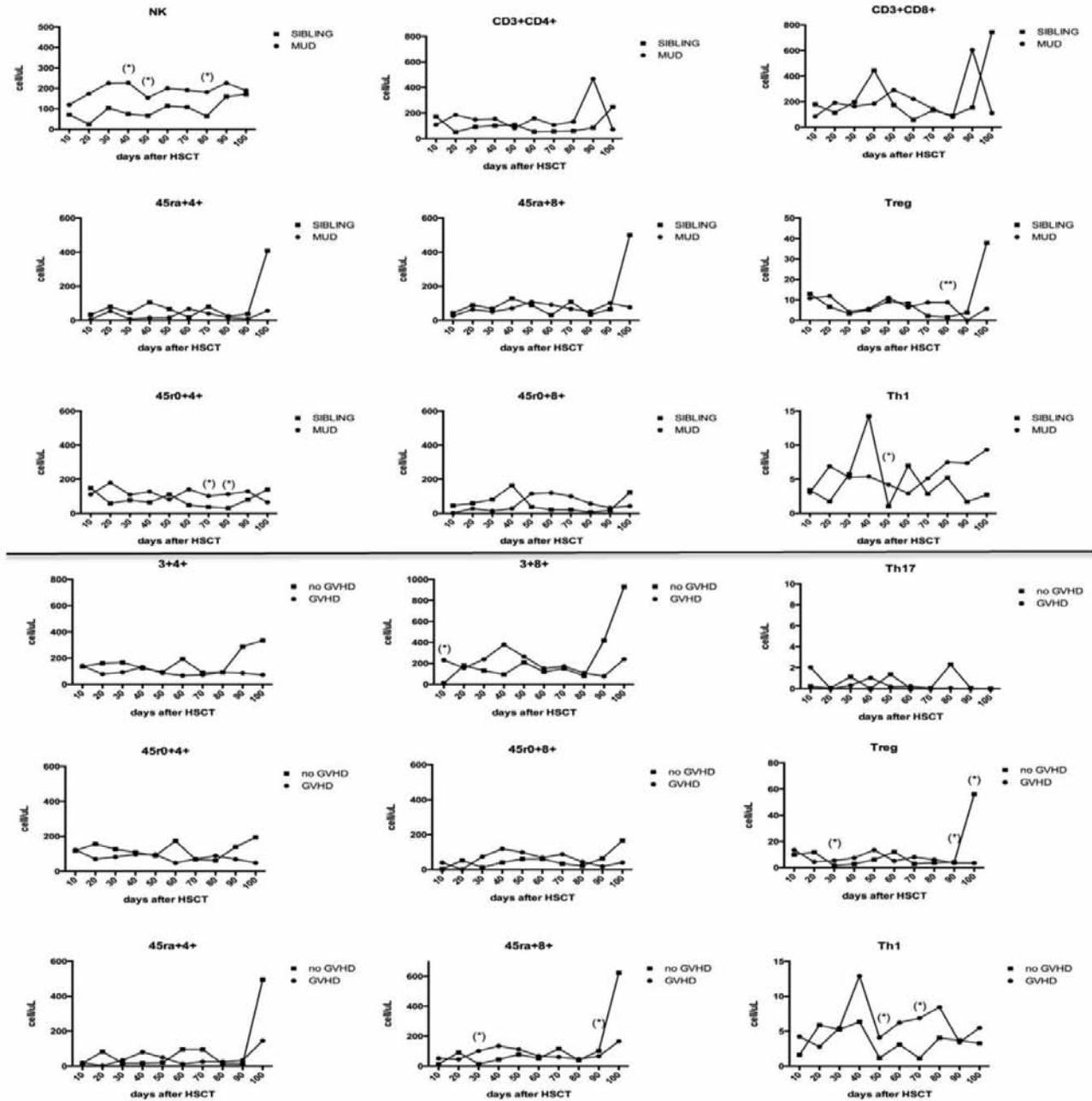


Figura 1. La ricostruzione nei primi 100 giorni dopo TCSE delle sottopopolazioni linfocitarie è illustrata in Tabella 1. I pazienti sono stati classificati in base al tipo di TCSE ricevuto e alla presenza di GVHD. (*): $p < .05$, (**): $p < .005$.

CONCLUSIONI: Questo è uno dei pochi studi che analizza tutte le popolazioni del SI nel primo periodo post-HSCT allogenico in pazienti pediatriche per comprendere come esso reagisce e condiziona la ripresa finale. Da questo emerge che nei primi 30 giorni la conta assoluta delle popolazioni esaminate è molto scarsa, tale da non superare valori compresi fra i 5-200 cell/uL, sia nei riceventi MUD che sibling. Come noto in letteratura, le cellule NK recuperano più velocemente dei linfociti T e, inoltre, si nota un loro più veloce incremento nei riceventi MUD che nei sibling.¹ Come negli adulti, si riscontra

una lentissima ricostruzione delle cellule T naïve CD45RA+ in tutti i gruppi.² Solo dal 90° giorno in poi si rileva una ripresa di tutte le popolazioni esaminate, che continua progressivamente.³ Nei pazienti con GVHD non si è osservato un incremento delle cellule Th17 a livello periferico bensì delle Th1, con concomitante riduzione delle Tregs; ciò viene supportato da precedenti studi che affermano un ruolo importante, ma non necessario, delle Th17 nell'insorgenza della aGVHD⁴ e l'esistenza di un regolare bilancio fra le popolazioni Th e le Tregs.

Bibliografia:

1. I.H. Bartelink et al. – Immune reconstitution Kinetics as an early predictor for mortality using various hematopoietic stem cell sources in children. *Biol Blood Marrow Transplant* (2013), 1-9;
2. E. de Vries et al. – Reconstitution of lymphocyte subpopulations after paediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* (2000), 25, 267-275;
3. Krzysztof Kalwak et al. – *British Journal of Haematology*, 2002, 118, 74-89;
4. E. Ersvaer et al – Future perspectives: should Th17 cells be considered as a possible therapeutic target in LAM patients receiving allogeneic HSCT?. *Cancer Immunol Immunother* (2011) 60:1669-1681.

L022

CONVULSIONI DURANTE CONDIZIONAMENTO CON BUSULFANO IN BAMBINI SOTTOPOSTI SCT

D. Caselli,¹ A. Rosati,² M. Podda,³ D. Longoni,⁴ F. Nesi,⁵ S. Cesaro,⁶ L. Lo Nigro,⁷ N. Maximova,⁸ M. Menconi,⁹ O. Paolicchi,¹⁰ M.P. Cicalese,¹¹ M. Ripaldi,¹² O. Ziino,¹³ S. Santarone,¹⁴ M. Aricò,¹⁵ F. Locatelli,¹⁶ A. Prete¹⁷

¹Cure Domiciliari; ²Neurologia Pediatrica, AOU Meyer, Firenze; ³Oncologia Pediatrica, Istituto Nazionale Tumori, Milano; ⁴Oncoematologia Pediatrica, Fondazione MBBM, Monza (MB); ⁵Oncoematologia Pediatrica, ORIM, Torino; ⁶Oncoematologia Pediatrica, AOUI, Verona; ⁷Oncoematologia Pediatrica, Azienda Policlinico OVE, Catania; ⁸Unità TMO, Burlo Garofalo, Trieste; ⁹Oncoematologia Pediatrica, Università di Pisa, Pisa; ¹⁰Oncoematologia Pediatrica, AOU Meyer, Firenze; ¹¹Unità TMO, Istituto San Raffaele, Milano; ¹²Oncoematologia Pediatrica, Ospedale Pausilipon, Napoli; ¹³Oncoematologia Pediatrica, ARNAS Ospedale Civico, Palermo; ¹⁴Centro TMO, Ospedale Civile, Pescara; ¹⁵Oncoematologia Pediatrica, AOU Meyer, Firenze; ¹⁶Oncoematologia Pediatrica, Ospedale Bambin Gesù, Roma; ¹⁷Oncoematologia Pediatrica, Policlinico sant'Orsola-Malpighi, Bologna, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Da oltre 30 anni il Busulfano è utilizzato come componente in molteplici regimi di condizionamento sia per il trapianto di cellule staminali (TCSE) sia autologo che allogenico. La neurotossicità di questo farmaco è ben nota, in particolare per la capacità di indurre convulsioni; è quindi consuetudine utilizzare una profilassi anticonvulsiva durante la somministrazione del busulfano come regime di condizionamento. Fattori di rischio per le convulsioni sono la somministrazione endovenosa, l'alto dosaggio e l'età adulta. La maggior esperienza e letteratura su questo argomento riguarda pazienti in età adulta. Scopo del presente studio è la definizione della incidenza di convulsioni in bambini sottoposti a TCSE in Italia.

METODI: 13 centri AIEOP hanno aderito ad uno studio retrospettivo, riportando i dati relativi a tutti i bambini che hanno ricevuto Busulfano come parte di un regime di condizionamento dal 2005 al 2012. Sono stati raccolti dati su: via di somministrazione del Busulfano, monitoraggio dei livelli ematici, fattori anamnestici di rischio per lo sviluppo di convulsioni, alterazioni neurologiche associate, profilassi anticonvulsiva applicata ed eventuale comparsa di convulsioni.

RISULTATI: Sono stati raccolti i dati relativi a 663 trapianti in 659 pazienti. Il 55% dei pazienti ha assunto Busulfano per os e tutti sono stati sottoposti a profilassi antiepilettica; lo schema di profilassi era variabile da centro a centro. 12 pazienti (7 maschi e 4 femmine, età mediana 11 anni) hanno sviluppato convulsioni (1,8%), in un intervallo di tempo compreso tra il giorno -6 e il giorno +15 dall'infusione di CSE autologhe (n=4) o allogeniche (n=8). Il busulfano era stato assunto per bocca in 6 casi ed e.v. negli altri 6. Alla rivalutazione critica di questi casi, 3 presentavano fattori di rischio personali (diagnosi di epilessia o pregresse convulsioni), 3 mostravano lesioni radiologiche suggestive di altre cause per le convulsioni, 1 ha sviluppato le convulsioni a seguito di iposmolarità iatrogena. Complessivamente solo 5 pazienti hanno presentato crisi che potrebbero essere riconducibili alla somministrazione di Busulfano, mentre tutti i pazienti sono stati sottoposti a profilassi.

CONCLUSIONI: La comparsa di crisi convulsive in corso di terapia con Busulfano è estremamente rara (1,8%) nella nostra casistica, senza correlazione con la via di somministrazione e il tipo di trapianto. Alcuni di questi casi hanno spiegazioni alternative, legate a fattori di rischio pre-esistenti o ad altre complicanze. L'utilizzo generalizzato della profilassi per tutti i pazienti che ricevono regimi di condizionamento contenenti Busulfano appare quindi probabilmente eccessivo.

Un trial prospettico per la valutazione del rischio di convulsioni in bambini che ricevono un condizionamento contenente Busulfano senza profilassi anticonvulsiva sembra giustificato.

L023

IPERTIROIDISMO POST TRAPIANTO DI MIDOLLO OSSEO ALLOGENICO: CASO CLINICO

A. Spirito,¹ G. Nardella,² L. De Santis,² M. Foglia,² R. De Santis,¹ A. Maggio,¹ M. Delvecchio,¹ S. Ladogana¹

¹IRCCS, Ospedale Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG); ²Università degli Studi di Foggia, Foggia, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Le disfunzioni tiroidee sono le complicanze tardive più frequenti nei pazienti oncologici pediatrici sottoposti a trattamenti chemio-radioterapici. La terapia radiante (RT), in particolare la Total Body Irradiation (TBI) che precede il Trapianto di Midollo Osseo (TMO), è considerata la causa principale per lo sviluppo di tireopatie come ipotiroidismo, tiroiditi, ipertiroidismo e patologia nodulare. La tiroide sembra più sensibile agli effetti dell'irradiazione se questa avviene in età precoce, soprattutto al di sotto dei 10 anni. La prevalenza di alterazioni tiroidee in soggetti trattati solo con chemioterapia (CT) non è ben determinata, ma ad oggi la CT sembra non aumentare il rischio di disturbi autoimmuni della tiroide. Nel follow-up di pazienti trattati con CT e RT è importante monitorare la funzionalità tiroidea per lungo tempo, in quanto le alterazioni possono comparire anche a distanza di anni. Il rischio aumenta in caso di TBI pre-TMO. Anche il TMO aumenta, di per sé, il rischio di patologia autoimmune.

METODI: MP, maschio, diagnosi di LLA B a rischio intermedio all'età di 7 aa e 4 mesi, trattato secondo protocollo AIEOP LLA 2000, con raggiungimento della RC. Stop-therapy a 9 aa e 4 mesi. A 62 mesi dall'esordio si riscontra recidiva midollare ed extramidollare (testicolare) di LLA, per cui viene inserito nel protocollo AIEOP LLA REC 03 randomizzato braccio A – Gruppo di rischio S2, con ottenimento della seconda RC. Si esegue tipizzazione familiare che documenta la presenza di donatore HLA-identico. All'età di 13 aa e 1 mese, il paziente viene sottoposto ad allo-TMO dalla sorella previa terapia di condizionamento con RT boost sui testicoli, con TBI 2Gy per 2/die gg -7,-6,-5, Thiotepa 10 mg/kg g -4, Ciclofosfamide 60 mg/kg/die gg -3,-2; profilassi GVHD con Ciclosporina 1 mg/kg e MTX short course, ricostituzione ematologica al g+20 per PLT e al g+24 per WBC. A 6 mesi dal TMO il chimerismo risulta 100% donatore. All'età di 14 aa e 2 mesi, un anno dopo il TMO, il paziente presenta esoftalmo, tachicardia (FC 116 bpm) e calo ponderale (indice di massa corporea: 18 kg/m²).

RISULTATI: Si esegue valutazione della funzionalità tiroidea con i seguenti risultati: fT4 2.93 ng/dl (v.n. 0.7-1.9 ng/dl), fT3 11.32 pg/ml (v.n. 2-4.4 pg/ml), TSH soppresso (<0.005 µUI/ml, v.n. 0.2-4 µUI/ml), anticorpi anti-tireoperossidasi 141.4 UI/ml (v.n. <10 UI/ml) e anti-tireoglobulina 195.6 UI/ml (v.n. <29 UI/ml). Viene effettuata valutazione ultrasonografica che evidenzia aumento di dimensioni della tiroide alla base di sinistra, disomogeneità strutturale e ipervascolarizzazione bilaterale. In precedenza, la funzionalità tiroidea era sempre risultata nella norma e l'autoimmunità specifica negativa. Dopo un mese si esegue nuova valutazione della funzionalità tiroidea (risultati sovrapponibili al precedente) e dosaggio degli anticorpi anti-recettore del TSH che risultano positivi (66.90 U/l, v.n. <14 U/l). Viene formulata diagnosi di Morbo di Graves e il ragazzo, per la presenza di tachicardia, insonnia e un modesto stato ansioso, inizia terapia con Metimazolo 7.5 mg per 3/die (pari a 0.5 mg/kg/die). Dopo il primo mese di terapia, il paziente presenta normalizzazione dei parametri di funzionalità tiroidea (vedi figura) e della frequenza cardiaca (72 batt/min). Si riduce la terapia a 7.5 mg/die (pari a 0.17 mg/kg/die). I livelli di TSH, fT3 ed fT4 sono risultati nella norma per tutto il follow up, con frequenza cardiaca nei limiti e progressivo aumento dell'indice di massa corporea. In occasione dell'ultimo controllo (settimana +146 dopo il trapianto), il peso è 65 kg, l'altezza 164 cm (indice di massa corporea 24.1 kg/m²) e la frequenza cardiaca 70 batt/min. In considerazione dell'aumento del TSH e della negativizzazione degli anticorpi anti-recettore del TSH all'ultimo controllo, si scala la dose di Metimazolo a 2.5 mg/kg/die (0.04 mg/kg/die), con ottimo controllo dei valori ormonali a distanza di 1 mese (vedi grafico). Si ripete ecografia tiroidea che evidenzia una ghiandola nella norma per dimensioni e con ecostruttura finemente disuniforme. Durante il trattamento con metimazolo, non sono state riscontrate reazioni avverse gravi quali agranulocitosi o ipertransaminemia, né effetti indesiderati più comuni come rash cutanei. L'andamento degli ormoni tiroidei è riportato nel grafico.

CONCLUSIONI: Il Morbo di Graves è una possibile complicanza dei pazienti oncologici sottoposti a RT della regione cervicale. Anche il TMO predispone l'organismo ricevente allo sviluppo di patologie autoimmuni dovute alla produzione di anticorpi contro gli antigeni del ricevente da parte dei linfociti del midollo osseo. Il trattamento del Morbo di Graves consiste nella soppressione della funzionalità tiroidea mediante tre alternative: chirurgica, ablativa con radio-iodio, o farmacologica. In età pediatrica, il trattamento di questa patologia è ancora controverso, sebbene generalmente il primo approccio sia spesso di natura farmacologica. I farmaci a disposizione sono 2: il metimazolo e il propiltiouracile. A differenza del secondo, il primo è autorizzato per l'uso in Italia, va somministrato in 2-3 dosi giornaliere (il secondo ha un'emivita più breve e richiede 4 somministrazioni/die) e presenta un maggior rischio di effetti collaterali quali ipertransaminasemia e agranulocitosi. Il nostro paziente è stato trattato con metimazolo con ottima risposta della funzionalità tiroidea anche con una dose molto bassa (0.17 mg/kg/die, bassa rispetto a quanto si utilizza nella pratica clinica). La condizione di portatore di TMO sconsigliava l'utilizzo di un farmaco che potesse in qualche modo agire sull'eritropoiesi midollare, ma il persistere del quadro clinico ha posto la necessità di un trattamento specifico. Vista l'indisponibilità in Italia del propiltiouracile, che non presenta effetti collaterali sul midollo e il cui profilo di sicurezza appare migliore, il paziente è stato trattato con metimazolo con un'ottima risposta clinica e biomorale e senza presentare effetti collaterali. Al momento il paziente è in ottime condizioni cliniche, eutiroideo ed assume un dosaggio molto basso (0.04 mg/kg/die). Questo caso clinico presenta 2 peculiarità: 1) la disponibilità in Italia del propiltiouracile avrebbe consentito di affrontare il trattamento con meno rischi potenziali per il midollo. Soprattutto per certe categorie di pazienti, la legislazione vigente in Italia dovrebbe consentire l'utilizzo di farmaci sebbene non commercializzati sul territorio nazionale; 2) il trattamento del Morbo di Graves, come detto, è un argomento dibattuto. Non abbiamo riscontrato in letteratura casi di Morbo di Graves in pazienti oncologici portatori di TMO trattati con metimazolo. Il nostro caso ha avuto, ad oggi, un esito decisamente positivo ma il trattamento è stato seguito dai clinici con molta attenzione. Il quadro clinico, la funzionalità epatica e l'emocromo sono stati controllati con cadenza mensile, cosa resa possibile dalla fortunosa vicinanza del centro AIEOP di riferimento al domicilio del paziente. Sarebbe utile, in considerazione della non disponibilità del propiltiouracile in Italia e della sporadicità della complicanza tiroidea, raccogliere la casistica di questi pazienti a vantaggio della pratica clinica.

L024

SINDROME DI WISKOTT-ALDRICH; ESPERIENZA VENTENNALE DI UN CENTRO

F. Ricci,¹ V. Grassi,¹ P. Poli,¹ V. Medeghini,¹ V. Bennato,¹ E. Soncini,¹ S. Cavagnini,¹ C. D'Ippolito,¹ L.D. Notarangelo,¹ A. Lanfranchi,² F.R. Schumacher,¹ F. Porta¹

¹Oncoematologia Pediatrica e TMO; ²Laboratorio4Cellule Staminali, Presidio Ospedale dei Bambini, Spedali Civili Brescia, Brescia, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La Sindrome di Wiskott Aldrich è una rara malattia ereditaria legata al cromosoma X e causata dalla mutazione del gene WAS con alterazione dell'espressione della proteina WASP. Tale patologia è caratterizzata da piastrinopenia, eczema ed autoimmunità.

METODI: Nel nostro centro dal 1990 sono stati trapiantati 36 pazienti affetti da WAS. 27 pazienti hanno ricevuto CSE da sangue midollare, 7 da aferesi periferica e 2 da sangue cordonale.

RISULTATI: 28 pazienti sono stati trapiantati da donatore volontario compatibile, 6 da donatore HLA identico e 2 da donatore aploidentico. Di questi 36 pazienti, 7 sono deceduti, e la sopravvivenza è dell'80.5%. La terapia di condizionamento utilizzata è stata nella maggior parte dei casi busulfano ciclofosfamide e ATG, in 3 casi è stato utilizzato il treosulfano al posto del busulfano, ma nel 100% di questi casi vi è stata una graduale perdita dell'attecchimento e vi è stata la necessità di ritrapiantare i pazienti previa terapia di condizionamento con Busulfano. Negli ultimi anni la ciclofosfamide è stata progressivamente sostituita con la fludarabina negli schemi di condizionamento per limitare la tossicità del condizionamento. Inoltre dal 2010 in questi pazienti viene utilizzata la formulazione endovenosa del busulfano.

CONCLUSIONI: L'attecchimento degli stipiti ematopoietici donati è del 95%. In alcuni casi si è assistito ad una progressiva riduzione del chimerismo, ma abbiamo comunque verificato che è sufficiente una percentuale di attecchimento su PMN di almeno il 30% per garantire un'adeguata produzione piastrinica.

L025

RAZIONI IMMUNOLOGICHE DOPO IL TMO: DALLA GVHD ALLA PATOLOGIA AUTOIMMUNE, UN UNICO SPETTRO DI MALATTIA? DESCRIZIONE DI UN CASO

A. Miniaci, M. Piacentini, E. Tronconi, S. Bonetti, R. Masetti, A. Prete, A. Pession

UO Pediatria Specialistica, Ospedale Sant'Orsola-Malpighi, Università di Bologna, Bologna, Italy

RAZIONALE: Il trapianto allogenico (TMOa) di cellule staminali emopoietiche (CSE), è un approccio terapeutico utilizzato per il trattamento di patologie autoimmuni dell'adulto quali LES, sclerodermia sistemica ed artrite reumatoide, in fase avanzata o farmaco resistenti. Tale approccio terapeutico in alcuni casi è in grado di determinare un rallentamento della progressione di malattia ed un miglioramento della qualità di vita del paziente grazie alla risoluzione della sintomatologia. Nel corso degli anni, vari case reports hanno documentato la comparsa di patologie auto ed alloimmuni a distanza di anni dopo un TMOa eseguito per patologie oncoematologiche con quadri completamente o parzialmente sovrapponibili ad una graft-versus-host disease (GVHD).

PATOLOGIE PREGRESSE: AF all'età di 18 mesi viene sottoposta a chemioterapia secondo protocollo AIEOP LAL 9502 per LAL-preB. Un mese dopo aver completato la fase di reinduzione del protocollo, l'aspirato midollare di controllo evidenziava una recidiva midollare di malattia per cui veniva sottoposta ad ulteriore ciclo di chemioterapia di II linea secondo il protocollo CCG 1941. Contestualmente, essendocene l'indicazione ed in assenza di un donatore familiare HLA compatibile, veniva iniziata la ricerca di un donatore volontario non consanguineo per TMOa. All'età di 3 anni la piccola, dopo condizionamento con Busulfano Tiotepa e Ciclofosfamide, veniva sottoposta a TMOa utilizzando quale fonte di CSE, il sangue periferico. A 10 mesi dal trapianto, in concomitanza con la riduzione della terapia immunosoppressiva, la piccola ha presentato manifestazioni compatibili con GVHD cronica limitata alla cute, per cui riprendeva la terapia immunosoppressiva (tacrolimus e micofenolato mofetile), sospesi definitivamente dopo 4 anni dal loro inizio. I controlli successivi hanno evidenziato la comparsa di una sindrome respiratoria di tipo restrittivo, insufficienza ovarica in terapia sostitutiva, e di un quadro ecografico tiroideo compatibile con tiroidite in assenza di anticorpi specifici e di alterazioni della funzionalità tiroidea.

QUADRO ARTICOLARE: All'età di 14 anni (11 anni dopo il TMO) la paziente presentava comparsa di dolore e tumefazione delle articolazioni IFP di 2 e 3 dito della mano ds, dolore all'IFP del 3° dito della mano sn, associate a rigidità mattutina e tumefazione di mani, polsi e ginocchia. Gli esami eseguiti dimostravano positività aspecifica degli ANA (+++- pattern omogeneo) e negatività del fattore reumatoide. La RM delle mani eseguita in data 24-08-2011 dimostrava versamento articolare bilaterale a livello delle ossa carpali ed in sede radio-ulnare, segni di sinovite aspecifica a livello delle ossa carpali ed in sede radio-ulnare bilateralmente, a livello delle articolazioni MCF di 2,3,4 dito sn e 2,3 a ds, IFP di 3 dito sn e 2,3 ds, carpo-metacarpale del 1 dito bilateralmente. Tale quadro soddisfa i criteri ILAR per la diagnosi di Artrite Idiopatica Giovanile Poliarticolare FR-. Veniva pertanto iniziata terapia con Naprossene a dosaggio antinfiammatorio con beneficio parziale quindi sostituita da terapia steroidea che ha portato ad una risposta ottimale, seguita da ripresa della sintomatologia (dolore alle gambe e alle braccia, senza rigidità mattutina) al tapering. La piccola è stata quindi posta in terapia con Methotrexate in data 9-10-12 che ha portato a miglioramento delle condizioni cliniche e del dolore fino alla remissione clinica completa a distanza di 2 mesi.

CONCLUSIONI: Il nostro caso dimostra come sia importante, soprattutto nei pazienti che presentino un quadro di GVHD cronica un attento follow-up a lungo termine post TMOa anche sul versante immuno-reumatologico al fine di diagnosticare e trattare precocemente le possibili complicazioni immunologiche correlate al trapianto. Nel nostro caso non è chiaro quale possa essere il meccanismo fisiopatologico responsabile del quadro clinico. I processi patogenetici che sono stati ipotizzati in letteratura, singolarmente o in concerto, come responsabili dello sviluppo di patologie immunologiche sono:

- Il danno cellulare secondario alle chemioterapie usate per la terapia primaria della patologia di base, od all'immunosoppressione del regime di condizionamento.
- Lo sviluppo di cloni reattivi causato dal trasferimento di un sistema immunitario eterologo
- Il mimetismo antigenico con antigeni virali il cui contatto è favorito dall'immunosoppressione seguente al trapianto.

- L'espansione di cloni autoreattivi dovuta ad un deficit di cellule T-reg che può accompagnare la ricostituzione del sistema immunitario.

Bibliografia:

- Bohgaki T, Atsumi T, Koike T. Autoimmune disease after autologous hemetopoietic stem cell transplantation. *Autoimmun Rev.* 2008 Jan;7(3):198-203.
- Sherer Y, Shoenfeld Y. Autoimmune diseases and autoimmunity post-bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1998 Nov;22(9):873-81.
- Daikeler T, Tyndall A. Autoimmunity following haematopoietic stem-cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007 Jun;20(2):349-60.
- Barnabe CCM, LeClercq. The Development of Inflammatory Arthritis and other rheumatic diseases following stem cell transplantation. *Semin Arthritis Rheum.* 2009 Aug;39(1):55-60.
- Bohgaki T, Atsumi T, Koike T. Multiple autoimmune diseases after autologous stem-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2007 Dec 27;357(26):2734-6.
- D-Y Kim, J-H Lee, J-H Lee, S-H Kim, S-N Lim, S-D Kim, Y Choi, Y-S Lee, Y-A Kang, S-I Kang, M Seol, S-G Ryu and K-H Lee. Reevaluation of the National Institutes of Health criteria for classification and scoring of chronic GVHD Bone Marrow Transplant. 2010 Jul;45(7):1174-80.
- Alexandra H. Filipovich. Diagnosis and manifestations of chronic graft-versus-host disease. *Best Practice & Research Clinical Haematology Vol. 21, No. 2, pp. 251-257, 2008.*

L026

STRATEGIE FARMACOLOGICHE PER LA PERSONALIZZAZIONE DELLA TERAPIA NEL TRATTAMENTO DELLA LEUCEMIA LINFATICA ACUTA NEL BAMBINO

M. Rabusin,¹ R. Franca,² P. Reborà,³ D. Favretto,² A. Zanut,² P. Tamaro,¹ F. Verzeognassi,¹ G. Stocco,² G. De Corti,² M.G. Valsecchi³

¹Unità Operativa di Emato-Oncologia Pediatrica, Istituto per l'Infanzia IRCCS Burlo Garofolo, Trieste; ²Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi Trieste, Trieste; ³Centro di Biostatistica per l'Epidemiologia Clinica, Università di Milano-Bicocca, Monza (MB), Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Con gli attuali schemi polichemioterapici utilizzati nel trattamento della Leucemia linfatica Acuta (LLA) in età pediatrica, statificati in base al rischio, la guarigione raggiunge l'85 % dei casi trattati. Nonostante gli ottimi risultati ottenuti, i pazienti recidivati affrontano una significativa riduzione della possibilità di guarigione attraverso le strategie farmacologiche di seconda linea comprendenti anche l'utilizzo del trapianto di cellule staminali ematopoietiche. Inoltre la tossicità correlata ai farmaci rappresenta una delle maggiori complicanze durante il programma terapeutico, determinando attraverso la riduzione dei dosaggi o la sospensione delle terapie una possibile compromissione dell'outcome finale. In quest'ottica la possibilità di una maggiore personalizzazione delle terapie basata su parametri farmacologici potrebbe limitare gli effetti collaterali severi e quindi migliorare ulteriormente la sopravvivenza.

METODI: Abbiamo quindi avviato uno studio prospettico, focalizzato principalmente sugli antimetaboliti methotexate e mercaptopurina, integrando numerose variabili farmacologiche (farmacogenetiche, farmacocinetiche e farmacodinamiche) in una coorte di pazienti affetti da LLA ed arruolati nel protocollo BFM-ALL 2009. La variabili farmacogenomiche analizzate comprendono i polimorfismi a singolo nucleotide in TPMT (rs1142345, rs1800462,rs1800460) ITPA (rs1127354, rs7270101,rs6051702) PACSIN2 (rs2413739) SLCO1B1 (rs4149056) e la delezione dei geni di GST-M1 e GST-T1 e sono analizzate sia sul DNA leucemiche che su quello germinale dei pazienti. La misurazioni farmacocinetiche includono la clearance del methotexate durante la fase di consolidamento, la valutazione dei principali metaboliti attivi della mercaptopurina (nucleotidi tioguaninici TGN e nucleotidi metilati della metilmercaptopurina MMPN) associati all'analisi dell'attività enzimatica di TPMT e ITPA studiati durante la fase di consolidamento e mantenimento del programma terapeutico previsto dal protocollo. Infine i parametri farmacodinamici sono valutati misurando l'effetto citotossico dei farmaci antileucemici mediante il saggio MTT in vitro eseguito sui blasti alla diagnosi.

La sensibilità in vitro al metil-Prednisolone, Vincristina, Daunorubicina e Asparaginasi è descritto da uno score cumulativo (PVDA score). Le analisi statistiche valutano l'eventuale associazione tra i parametri farmacologici ottenuti in vitro e la risposta clinica alla terapia valutandone il possibile effetto prognostico.

RISULTATI: Sin'ora sono stati arruolati 22 pazienti seguiti presso il Nostro Centro. Le analisi preliminari eseguite utilizzando il test di correlazione di Pearson rivelano una possibile correlazione tra il livello di malattia residua minima misurata al gg + 15 sul sangue midollare e la sensibilità in vitro al metil-Prednisolone ($p = 0.086$) così come una correlazione tra MRM al gg. 15 ed il PVDA score ($p = 0.099$). La variante rs1127354 di ITPA è significativamente correlata ad un aumento di concentrazione di nucleotidi metilati della mercaptopurina ($p = 0.025$) e quindi potenzialmente responsabile di maggiore tossicità ematologica legata all'utilizzo del farmaco.

CONCLUSIONI: Questi risultati preliminari, sebbene necessitano di un'estensione ad un maggior numero di pazienti sono incoraggianti e confermano il potenziale ruolo della farmacologia nel fornire indicazioni finalizzate ad una maggior personalizzazione del trattamento dei pazienti affetti da LLA.

L027

VALUTAZIONE CON METODICA NON INVASIVA DELLA FUNZIONALITÀ CARDIACA IN PAZIENTI LUNGO-SOPRAVVIVENTI TRATTATI PER LINFOMA DI HODGKIN IN ETÀ PEDIATRICA

C. Della Cuna,¹ L. Ragni,² M. Bonvicini,² R. Masetti,³ A. Pession,³ R. Burnelli⁴

¹Oncematologia Pediatrica, S. Anna, Ferrara; ²Cardiologia Pediatrica e dell'Età Evolutiva, Azienda Ospedaliera-Universitaria S. Orsola-Malpighi, Bologna; ³Oncologia ed Ematologia Pediatrica "Lalla Seragnoli", Azienda Ospedaliera-Universitaria S. Orsola-Malpighi, Bologna; ⁴SSD Oncematologia Pediatrica, S. Anna, Ferrara, Italy

Le antracicline, appartenenti alla categoria degli antibiotici citotossici, sono impiegate nel trattamento di un ampio spettro di neoplasie di interesse pediatrico, sia solide che ematologiche. Tuttavia, la loro diffusione clinica è limitata dalla comparsa di una cardiotoxicità dose dipendente che può manifestarsi sia in forma acuta che in forma tardiva, caratterizzata da un'insufficienza cardiaca, ad evoluzione spesso fatale. Tale problematica assume particolare importanza in età pediatrica, se si considera che un sempre più elevato numero di bambini guarisce e quindi sopravvive molte decadi ad una neoplasia contratta durante l'infanzia o l'adolescenza. Nella cardiotoxicità da antracicline sono implicati numerosi meccanismi molecolari che, nonostante decenni di studi, sono ancora in parte sconosciuti. Il meccanismo principale e meglio descritto è rappresentato dallo stress ossidativo, che con la produzione di radicali liberi danneggia il cardiomiocita. L'incidenza della cardiotoxicità da antracicline varia in rapporto alla presenza o meno di alcuni fattori di rischio associati, quali la dose cumulativa del farmaco, l'età, il sesso femminile, una preesistente cardiopatia, un'ipertensione arteriosa non trattata, l'associazione con altri farmaci antitumorali (ciclofosfamide, alcaloidi della vinca, methotexate), una concomitante o precedente terapia radiante mediastinica. Dosi cumulative elevate di antracicline sono state identificate tra i primi fattori di rischio di cardiotoxicità; pur non esistendo una dose cumulativa cardiaca sicura, il rischio aumenta notevolmente con dosi cumulative superiori a 300 mg/m². Gli effetti acuti sono più frequentemente rappresentati da alterazioni elettrofisiologiche e pericarditi, meno frequentemente insufficienza cardiaca. Gli effetti cronici delle antracicline sul cuore sono rappresentati da una cardiopatia dose-dipendente che può portare ad una disfunzione del ventricolo sinistro sia sistolica che diastolica, quest'ultima frequentemente asintomatica, fino allo scompenso cardiaco congestizio. I moderni strumenti diagnostici e terapeutici hanno portato ad alti tassi di sopravvivenza nei pz trattati per neoplasia in età pediatrica; in questo gruppo di pz, se si escludono secondarismi, le complicanze cardiache rappresentano la prima causa di malattia. Il rischio di compromissione cardiaca si mantiene per anni dal completamento della terapia e diventa statisticamente significativo a distanza di 5-10 anni; tuttavia, si può manifestare anche a distanza di 20 anni. In letteratura emerge la mancanza di linee guida per il monitoraggio cardiaco per prevenire gli effetti tardivi nei lungo-sopravvissuti asintomatici. Si è tuttora alla ricerca del sistema migliore di monitoraggio del paziente chemiotrat-

tato, sistema che sia sensibile, specifico, ripetibile, non invasivo, poco costoso. Attualmente l'ecocardiografia rappresenta lo strumento più utilizzato per lo studio della funzione cardiaca. Sembra che la metodica più affidabile per determinare un precoce rilevamento di danno miocardio (inizialmente disfunzione diastolica) sia l'indagine ultrasonografica ed in particolare la rilevazione delle velocità tissutali miocardiche mediante la metodica del Tissue Doppler Imaging (TDI). Il TDI è una metodica ecocardiografica che attraverso il Doppler è in grado di misurare la velocità dei vari segmenti miocardici che correla con la funzionalità cardiaca, valutando sia la contrattilità segmentaria che complessiva del ventricolo sinistro. La valutazione della funzione sistolica è data dalla misura del picco di velocità dell'onda sistolica (S), mentre la funzionalità diastolica dalla misura del picco di velocità dell'onda diastolica precoce (E) e tardiva (A), dal rapporto E/A e dal tempo di rilasciamento isovolumetrico regionale (IVRT). Ha un'elevata sensibilità nella diagnosi della disfunzione ventricolare sia sistolica che diastolica e si è rilevata un'indagine più sensibile dell'ecocardiografia convenzionale per identificare tale quadro patologico.

MATERIALI E METODI: Abbiamo valutato retrospettivamente, mediante indagini non invasive, 10 pz (6 M e 4 F) trattati per Linfoma di Hodgkin secondo con il prot.AIEOP MH'96 con antracicline associate o meno a RT mediastinica (mRT). I pz sono stati trattati presso il Reparto di Oncologia ed Ematologia Pediatrica "Lalla Seragnoli" dell'Azienda Ospedaliera S. Orsola - Malpighi di Bologna nell'intervallo di tempo compreso tra il 1996 ed il 2004. La valutazione cardiologica è stata eseguita mediante anamnesi personale e familiare cardiovascolare, visita clinica completa, elettrocardiogramma, ecocardiografia convenzionale e mediante TDI. A completamento sono state eseguite indagini laboratoristiche ematochimiche: es.emocromocitometrico completo, funzionalità epato-renale, profilo lipidico, CPK, troponina, BNP.

RISULTATI: In Tabella 1 sono riportate le caratteristiche dei pz. Nessuno ha presentato durante la terapia e nelle epoche successive sintomi indicativi di scompenso cardiocircolatorio. 2 pz avevano una debole familiarità per coronaropatia, 2 familiarità per ipertensione arteriosa sistemica. Alla valutazione anamnestica recente tutti i pz riferivano una normale tolleranza allo sforzo. Di 10 pz 1 era un forte fumatore con uso ripetuto di cannabinoidi, 3 erano fumatori occasionali. 2 pz assumevano contraccettivi estrogenici. All'esame obiettivo non sono stati riscontrati segni o sintomi di scompenso cardiocircolatorio. In 2 pz si riscontrava un soffio sistolico di 1/6L. In entrambi i casi il dato veniva giudicato funzionale, dato che un paziente non presentava patologia cardiaca strutturale né valvolare,

mentre l'altro aveva un'insufficienza aortica di grado lieve-moderato accreditata alla presenza di una valvola aortica bicuspidica senza stenosi. 2 pz presentavano ipercolesterolemia totale ed ipercolesterolemia LDL, 1 ipetrigliceridemia. L'es. emocromocitometrico completo, la funzionalità epato-renale ed i biomarcatori cardiaci (troponine, pro-BNP) sono risultati nella norma in tutti i pz. Alla valutazione elettrocardiografica 1 pz presentava tachicardia sinusale (FC 100 bpm), 1 blocco di branca destra incompleto. I restanti tracciati sono risultati nella norma, così come gli intervalli calcolati di QTc. Alla valutazione ecocardiografica morfologica tutti i pz presentavano normali strutture cardiache con normali dimensioni degli spessori e delle cavità cardiache. Un solo pz presentava un'insufficienza aortica lieve-moderata, già nota ai tempi della diagnosi, su un'aorta bicuspidica. Alla valutazione ecocardiografica tutti i pz, hanno mostrato una funzione sistolica globale del ventricolo sinistro conservata con valori di frazione di eiezione (FE) e frazione di accorciamento (FS) assolutamente normali; in un solo caso si sono registrati valori ai limiti inferiori, ma sempre nell'intervallo di normalità. Analizzando i dati al TDI si nota come tutti i soggetti presentano una funzione sistolica globale del ventricolo sinistro normale, seppure 3/10 pz presentino valori dell'onda S (uno al segmento basale del setto, due alla parete laterale basale) ai limiti inferiori della norma per età. La valutazione della funzione diastolica del ventricolo sinistro con TDI attraverso la misurazione della velocità dell'onda E, dell'onda A, E/A, IVRT, è risultata normale. Se tali pz con risultati ai limiti della norma progrediranno verso una franca insufficienza cardiocircolatoria sarà confermato solo da un più lungo periodo d'osservazione.

CONCLUSIONI: L'assenza di significative alterazioni ecocardiografiche nei nostri pz potrebbe essere giustificata dal fatto che tutti hanno ricevuto dosi cumulative di antracicline ampiamente inferiori a 300 mg/m², con un valore massimo pari a 210 mg/m². Il nostro studio si affianca alle pochissime esperienze riportate in letteratura sull'impiego dell'ecocardiografia con TDI in pz lungo-sopravvissuti da neoplasia in età pediatrica: ha purtroppo il limite della ridotta numerosità di pz che non permette alcuna valutazione statistica e dall'assenza di un gruppo di controllo, ma il prossimo l'arruolamento di altri pz in futuro potrebbe validarne la significatività anche su di un piano statistico e consolidarlo come indagine non invasiva per una precoce diagnosi della disfunzione sisto-diastolica cardiaca.

Bibliografia:

1. D. Alehan, M. Sahin, A.Varan et al: Tissue Doppler evaluation of systolic and diastolic cardiac function in long-term survivors of Hodgkin's lymphoma. *Pediatr Blood Cancer* 58: 250, 2012.

Tabella 1.

PZ sesso	Stadio	GT	Cicli	Età dg	Età studio	Remissione aa	Dose cumulativa di doxorubicina (mg/m ²)	mRT Gy
1. M	IIA	1	3 ABVD	11	22	11	150 mg/m ² (200 mg)	36
2. F	IIA	3	6 COPP/ABV	15	23	8	210 mg/m ² (330 mg)	36
3. M	IIIB	3	6 COPP/ABV	14	26	12	210 mg/m ² (320 mg)	20
4. M	IIA	1	3 ABVD	10	22	12	150 mg/m ² (210 mg)	20
5. M	IIB	3	6 COPP/ABV	10	26	16	210 mg/m ² (254 mg)	20
6. M	IV	3	6 COPP/ABV	14	22	8	210 mg/m ² (270 mg)	36
7. M	IIA	1	3 ABVD	12	29	17	150 mg/m ² (200 mg)	NO
8. F	IA	1	3 ABVD	13	29	16	150 mg/m ² (260 mg)	NO
9. F	IIA	3	6 COPP/ABV	15	26	11	210 mg/m ² (310 mg)	36
10. F	IIA	3	6 COPP/ABV	13	26	13	210 mg/m ² (310 mg)	20

L028

TERAPIA DI SALVATAGGIO CON POLICHEMIOTERAPIA IGEV (IFOSFAMIDE, GEMCITABINA, VINORELBINA) E TRAPIANTO AUTOLOGO IN PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA LINFOMA DI HODGKIN IN RECIDIVA O REFRATTARI

A. Sau,¹ V. Cecinati,¹ G. La Barba,¹ D. Onofrillo,¹ S. Falorio,² G. Fioritoni,² F. Angrilli²

¹Unità Operativa di Oncoematologia Pediatrica, Dipartimento di Ematologia, Ospedale Civile 'Spirito Santo', Pescara; ²Dipartimento di Ematologia, Ospedale Civile 'Spirito Santo', Pescara, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il Linfoma di Hodgkin (LH) costituisce il 6% circa delle neoplasie pediatriche. Le attuali strategie di cura consentono di raggiungere sopravvivenze globali comprese tra l'80 e il 90 %, a seconda dello stadio e della stratificazione prognostica. Tuttavia, il 10-20% di questi pazienti presenta una malattia refrattaria o va incontro a recidiva. Ancora oggi, anche a causa della loro esiguità numerica, non è definito con certezza quale sia il gold standard terapeutico dei pazienti pediatrici affetti da LH refrattario o in recidiva. Il presente studio si propone la valutazione retrospettiva dell'efficacia del regime chemioterapico di salvataggio IGEV seguito da trapianto autologo di cellule staminali periferiche (PBSCT) in pazienti pediatrici affetti da LH in recidiva o refrattari dopo terapia di prima linea. In particolare i parametri di valutazione presi in considerazione comprendono la capacità di induzione della risposta, la tossicità ematologica ed extra-ematologica e la capacità di mobilizzazione di cellule staminali periferiche (CSP).

METODI: La casistica oggetto dello studio è stata estrapolata dal gruppo di pazienti pediatrici con LH trattati presso il nostro Centro dal Gennaio 2005 al Dicembre 2012, secondo protocollo AIEOP LH-2004. Il programma di salvataggio impiegato nei pazienti refrattari/recidivati ha compreso la polichemioterapia IGEV seguita da PBSCT. Lo schema IGEV comprende Ifosfamide 2000 mg/mq dal giorno 1 al giorno 4, gemcitabina 800 mg/mq i giorni 1 e 4, vinorelbina 20 mg/mq il giorno 1. Il regime di condizionamento al PBSCT impiegato è stato il BEAM. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a raccolta di CSP dopo il secondo-terzo ciclo IGEV. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a profilassi primaria della neutropenia febbrile con fattore di crescita granulocitario.

RISULTATI: Dal Gennaio 2005 al Dicembre 2012 abbiamo trattato secondo protocollo AIEOP LH-2004 20 pazienti. Di essi, 6 hanno presentato refrattarietà (3 pazienti) o recidiva di malattia (3 pazienti). Le loro caratteristiche cliniche sono riportate in Tabella 1. Sono stati somministrati complessivamente 17 cicli IGEV (range 2-4). Quattro pazienti hanno raggiunto una Remissione Completa (RC) documentata da PET/TAC negativa. I 2 pazienti con persistenza di malattia dopo IGEV hanno ricevuto 2 cicli di salvataggio Platinum-Based prima del PBSCT. Tutti i 6 pazienti sono risultati in RC dopo PBSCT. Un paziente, refrattario alla terapia di prima linea e recidivato dopo 10 mesi dal PBSCT, ha ricevuto un nuovo regime terapeutico di salvataggio costituito da 4 cicli BEACOPP seguiti da trapianto di midollo osseo allogenico (Allo-SCT). Questo stesso paziente ha successivamente presentato una recidiva di malattia 12 mesi dopo Allo-SCT. Ad oggi, dopo un follow-up mediano di 48 mesi (range 24-60) tutti i pazienti sono vivi e 5 di essi risultano in RC continuativa. Per quanto riguarda la mobilizzazione delle CSP, il timing mediano di raccolta, calcolato dal giorno 1 del ciclo IGEV, è stato di 14 giorni (range 12-15). Il numero mediano di sedute di aferesi è stato pari a 1 (range 1-2), mentre, il numero mediano di cellule CD34+ raccolte è stato di $5 \times 10^6/\text{Kg}$ (range 4,6-17,3 $\times 10^6/\text{Kg}$). Nessuno dei pazienti ha manifestato tossicità extra-ematologica di grado 3-4, ad eccezione dell'alopecia. Per quanto riguarda la tossicità ematologica solo 2 pazienti hanno manifestato una neutropenia di grado IV e di questi 1 ha ricevuto supporto trasfusionale piastrinico, dopo 1 ciclo IGEV, per piastrinopenia severa.

CONCLUSIONI: Nella nostra esperienza, l'incidenza di malattia refrattaria e di recidiva è stata del 30%, in linea con quanto si riscontra in pazienti pediatrici con LH a rischio intermedio/alto. Il regime di salvataggio IGEV seguito da PBSCT si è dimostrato efficace e ben tollerato in pazienti adulti affetti da LH refrattari/recidivati (). Almeno secondo la nostra conoscenza, ad oggi non sono disponibili in letteratura dati sulla sua efficacia e sicurezza in pazienti in età pediatrica. La nostra esperienza, anche se condotta su un numero limitato di pazienti, sembra evidenziare l'efficacia e la maneggevolezza dello schema IGEV seguito da PBSCT anche in età pediatrica. In particolare, la capacità di indurre risposta, l'efficacia nella mobilizzazione delle CSP e la tossicità contenuta, sono sovrapponibili a quanto descritto nei pazienti adulti. Questi risultati

preliminari, particolarmente incoraggianti, inducono a proseguire l'esperienza in una coorte di pazienti più ampia, al fine di meglio definirne il ruolo nella terapia di salvataggio dei pazienti pediatrici.

Tabella 1.

Pazienti	6 (5 M, 1 F)	100 %
Età media (range)		
Alla diagnosi	14,8 (11-17)	
Al trapianto autologo	16,3 (12-18)	
Stadio alla diagnosi		
II	3	50%
III. IV	3	50%
Rischio (sec. protocollo)		
Gruppo 2	2	33
Gruppo 3	4	66
Chemioterapia di I Linea		
4 COPP/ABV	2	33
6 COPP/ABV	4	66
Stato alla terapia con IGEV		
Refrattario	3	50
Recidivato	3	50

Bibliografia:

1. Daw S, Wynn R, Wallace H. Management of relapsed and refractory classical Hodgkin lymphoma in children and adolescents. *Br J Haematol.* 2011 ;152:249-6.
2. Santoro A, Magagnoli M, Spina M, Pinotti G, Siracusano L, Michieli M, Nozza A, Sarina B, Morengi E, Castagna L, Tirelli U, Balzarotti M. Ifosfamide, gemcitabine, and vinorelbine: a new induction regimen for refractory and relapsed Hodgkin's lymphoma. *Haematologica.* 2007 ;92:35-41
3. Metzger ML, Hudson MM, Krasin MJ, Wu J, Kaste SC, Kun LE, Sandlund JT, Howard SC. Initial response to salvage therapy determines prognosis in relapsed pediatric Hodgkin lymphoma patients. *Cancer.* 2010 18:4376-84.

L029

INCIDENZA E PATOMORFOSI DELL'INFEZIONE DA PARVOVIRUS DURANTE LA FASE DI MANTENIMENTO PER LA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA (LLA) IN ETÀ PEDIATRICA

G.M. Ferrari, S. Casagrande, C. Rizzari, F. Dell'Acqua, G. Gotti, V. Leoni, M. Pasetti, V. Conter, A. Colombini

Clinica Pediatrica, Ospedale San Gerardo, Università degli Studi di Milano Bicocca, Monza (MB), Italy

INTRODUZIONE: L'infezione da Parvovirus B19 è un'infezione frequente nel bambino e nell'adolescente e può presentarsi con sintomatologia variabile a seconda dello stato immunologico ed ematologico del paziente. Nei pazienti immunocompromessi l'infezione può causare anemia, reticolocitopenia e occasionalmente trombocitopenia. Nella maggior parte dei pazienti affetti da LLA l'infezione da Parvovirus si manifesta durante la fase di mantenimento con un quadro di citopenia severa mimando spesso una recidiva di malattia; generalmente sono necessari la sospensione della chemioterapia, trasfusioni, ricoveri e l'esecuzione di uno o più aspirati midollari. Descriviamo qui di seguito le caratteristiche biologiche, cliniche e terapeutiche dei pazienti affetti da LLA con documentata infezione da Parvovirus B19 in corso di trattamento chemioterapico secondo protocollo AIEOP-BFM ALL 2009 e seguiti presso il Centro di Onco-Ematologia Pediatrica di Monza.

METODI: è stata eseguita un'analisi retrospettiva degli episodi di citopenia associati a sintomatologia riscontrati durante la fase di mantenimento in cui è stato ricercato il Parvovirus. La diagnosi di infezione è stata posta mediante ricerca del genoma virale in PCR (polymerase chain reaction).

RISULTATI: Dal settembre 2010 al febbraio 2013 nel centro di Monza 36 pazienti hanno completato la fase di mantenimento mentre 52 sono in fase di mantenimento. In 10 di questi pazienti che avevano presentato un episodio di citopenia è stato ricercato il Parvovirus e 5/88 (5.7%) sono risultati positivi. Tutti i 5 pazienti hanno presentato anemia

grave e 2/5 trombocitopenia grave. 2/5 pazienti hanno presentato al momento della diagnosi astenia e pallore mentre 3/5 un'infezione delle vie respiratorie con febbre. In tutti i pazienti è stata interrotta la chemioterapia (con una mediana di 11 giorni) e non si è reso necessario alcun trattamento terapeutico aggiuntivo. 3/5 pazienti hanno necessitato di supporto trasfusionale. Le caratteristiche dettagliate di questi pazienti sono riassunte nella Tabella 1.

CONCLUSIONI: Da questa analisi preliminare, peraltro condotta

su un numero limitato di pazienti con LLA nella fase di mantenimento, emerge come l'insorgenza di pancitopenia sembri essere discretamente frequente (20% dei pazienti) e che nella metà di questi casi la causa sia riconducibile ad una infezione sintomatica da parvovirus. In tutti i casi la citopenia si è risolta senza trattamento specifici (ad esempio immunoglobuline, il cui uso è peraltro controverso). In caso di pancitopenia insorta in pazienti affetti da LLA nella fase di mantenimento è opportuno valutare con test appropriati la presenza del parvovirus B19.

Tabella 1. Pazienti con infezione da Parvovirus B19 in corso di trattamento chemioterapico per LLA .

Variabili	Pazienti				
	1	2	3	4	5
Sesso	Femmina	Maschio	Maschio	Maschio	Maschio
Età (anni)	4	4	6	5	14
Immunofenotipo	LLA BII	LLA BII	LLA BII	LLA BII	LLA BII
Fascia di rischio	Standard	Alto	Medio	Medio	Medio
Emocromo alla diagnosi di infezione					
Emoglobina (g/dL)	6.6	9.7	7.4	8.7	7.8
Piastrine (x 10 ³ /mcl)	203	37	302	239	50
Globuli bianchi (x 10 ³ /mcl)	2	1.1	2.8	2	2
Nadir					
Emoglobina (g/dL)	6.6	9.7	7.3	8.7	7.8
Piastrine (x 10 ³ /mcl)	203	37	188	239	39
Globuli bianchi (x 10 ³ /mcl)	2	1.1	2.8	2	1.7
Numero di trasfusioni di emazie concentrate	1	0	1	0	2
Numero di giorni di sospensione di terapia	11	34	5	10	28
Sintomi alla diagnosi	Astenia, pallore	Febbricola, tosse, rinite	Astenia, pallore	Febbricola, tosse, rinite	Febbre, tosse
Outcome	Remissione completa	Remissione completa	Remissione completa	Recidiva SNC isolata di LLA in mantenimento, sottoposto a TMO	Recidiva combinata midollare e testicolare in mantenimento, sottoposto a TMO

L030

TERAPIA DI SALVATAGGIO IN PAZIENTI DI ETÀ < 20 ANNI AFFETTI DA LINFOMA DI HODGKIN. ESPERIENZA DAL 1990 AL 2010 PRESSO LA EMATOLOGIA PEDIATRICA DELLA SAPIENZA DI ROMA

T. Ceglie, M.L. Moleti, A.M. Testi, F. Giona, G. Meloni, S. Capria, A. Polino, G. Palumbo, M. D'Angiò, D. Marzella, A. De Vellis, U. La Rocca, R. Foà

Dipartimento Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università Sapienza, Roma, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Con le moderne strategie terapeutiche la sopravvivenza a lungo termine dei bambini e degli adolescenti affetti da Linfoma di Hodgkin (LH) è intorno al 90%; tuttavia il 10-15% sviluppa una malattia refrattaria o recidiva^{1,2}. Tra le diverse strategie terapeutiche attualmente disponibili per il trattamento di seconda linea, quella più utilizzata include l'associazione di schemi di polichemioterapia, comprensivi di farmaci ad alte dosi, seguiti da trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche (ASCT). Obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare i risultati ottenuti con una strategia di seconda linea (chemioterapia di salvataggio seguita da ASCT) nei pazienti pediatrici affetti da LH diagnosticati e trattati presso il Dipartimento di Ematologia dell'Università "Sapienza" di Roma.

METODI: è stata condotta un'analisi retrospettiva su 301 pazienti consecutivi di età <20 anni affetti da LH diagnosticati e trattati tra Gennaio 1990 e Dicembre 2010. Quarantatré/301 (14%) hanno fallito la terapia di prima linea; 39 sono stati avviati a terapia di salvataggio seguita da ASCT e sono risultati eleggibili per l'analisi. Quattro sono stati esclusi per i seguenti motivi: 2 trattati presso altro centro, 1 che-

mioterapia standard per recidiva tardiva localizzata, uno CD20 positivo trattato con Rituximab. La Tabella 1 illustra le caratteristiche dei 39 pazienti in studio e le terapie effettuate. In 34 casi è stato possibile raccogliere e criopreservare le cellule staminali autologhe; la raccolta è stata effettuata dopo 1 o 2 cicli di chemioterapia intensiva mediante procedura aferetica previa stimolazione con fattore di crescita granulocitario in 31 casi e mediante espianto di midollo in 3. La terapia di condizionamento maggiormente utilizzata è stata lo schema BEAM.

RISULTATI: Dei 39 pazienti, 6 (15%) non hanno eseguito l'ASCT (5 refrattari, 1 rispondente con grave complicanza trombotica); 33 (85%) (21 recidivati e 12 in progressione o con risposta insufficiente alla terapia di prima linea) hanno eseguito l'ASCT. Alla valutazione pre-trapianto: 23 avevano ottenuto una risposta completa, 8 una risposta parziale, 1 malattia stabile e 1 era in progressione. Alla valutazione post-trapianto: 30 pazienti hanno ottenuto una risposta completa, 2 una risposta parziale, il paziente in progressione non ha ottenuto risposta. In 5 casi è stata effettuata una radioterapia di consolidamento dopo il trapianto. Dei 33 pazienti che hanno completato la terapia di salvataggio con ASCT, 6 sono deceduti (2 per progressione di malattia a 10 e 50 mesi, 2 per complicanze infettive a 3 e 5 mesi e 2 per tossicità d'organo tardiva a 5 e 7 anni dal trapianto); 27 sono vivi (24 in remissione completa, 2 con malattia, 1 perso al follow up dopo recidiva di malattia post trapianto). Sei pazienti sono recidivati dopo ASCT con tempo mediano di 5,72 mesi. Per tutti i 39 pazienti la Sopravvivenza (OS) e la Sopravvivenza libera da eventi (EFS), calcolate a partire dalla data della terapia di salvataggio, sono rispettivamente del 66% e 54% a 10 anni (follow-up mediano 73 mesi; range 2-180). Escludendo i 6 pazienti che non sono stati sottoposti a ASCT, la OS e la EFS sono rispettivamente di 78% e 64% a 10 anni. È stata effettuata l'analisi univariata della EFS in base allo stato di malattia alla terapia di salvataggio

(PRO/RP/NR vs Recidiva: 40% vs 63% a 10 anni ($p=0.0519$)), e allo stato di malattia pre-trapianto (RC vs RP/PRO/NR: 70.4% vs 48% a 10 anni ($p=0.06$)).

CONCLUSIONI: I nostri risultati (OS 78%, EFS 64% a 10 anni) concordano con quelli riportati in letteratura, sia in casistiche di adulti che pediatriche¹⁻⁴. Anche nel nostro studio lo stato di malattia e la chemiosensibilità alla terapia di salvataggio influiscono sulla EFS; l'esiguità della popolazione non consente tuttavia di raggiungere risultati statisticamente significativi.

Bibliografia:

1. Daw S, Wynn R, Wallace H. Management of relapsed and refractory classical Hodgkin lymphoma in children and adolescents. *Br J Haematol* 2011;152:249-60.
2. Gorde-Grosjean S, Oberlin O, Leblanc T, et al. Outcome of children and adolescents with recurrent/refractory classical Hodgkin lymphoma, a study from the Société Française de Lutte contre le Cancer des Enfants et des Adolescents (SFCE). *Br J Haematol* 2012;158:649-56.
3. Greaves P, Wilson A, Matthews J, et al. Early relapse and refractory disease remain risk factors in the anthracycline and autologous transplant era for patients with relapsed/refractory classical Hodgkin lymphoma: a single centre intention-to-treat analysis. *Br J Haematol* 2012;157:201-4.
4. Metzger ML, Hudson MM, Krasin MJ, et al. Initial response to salvage therapy determines prognosis in relapsed pediatric Hodgkin lymphoma patients. *Cancer* 2010;116:4376-84.

Tabella 1. Caratteristiche della popolazione in studio.

Esordio di malattia		Caratteristiche dei pazienti	
		N°	%
Sesso M/F	M/F	21/18	54/46
Età mediana (range) in anni	16,44 (7-20)		
Istologia	SN	34	87
	CM + PL	5	13
Stadio	I,IIA/IIIB,IV	10/29	26/74
Sintomi B	23	59	
Bulky	15	38	
Malattia extranodale:	polmone	5	13
	infiltrazione midollare	1	2.5
	polmone e massa paravertebrale	1	2.5
Terapia di prima linea:	ABVD	32	82
	ABVD + BEACOPP	1	2.5
	MOPP/ABVD	3	8
	COPP/ABV; OPPA/COPP/COP	2	5
	Radioterapia EF	1	2.5
Chemioterapia + radioterapia	26	67	
Alla terapia di salvataggio			
Progressioni/NR/RP<50%	15	38	
Recidive	Prima/Seconda	21/3	87.5/12.5
Tempo mediano I recidiva (range) in mesi	18.2 (2.9-96)		
Recidive	<12 mesi/>12 mesi	9/15	37.5/62.5
Terapia:	IEV	32	82
	IGEV	2	5
	IEV/IGEV + altro	3	8
	MOPP	2	5
Condizionamento:	BEAM/CBV	25/8	76/24

L031

CARATTERISTICHE CLINICHE E OUTCOME DEL LINFOMA FOLLICOLARE IN ETÀ PEDIATRICA: ESPERIENZA AIEOP

M. Pillon,¹ L. Mussolin,¹ E. Carraro,¹ A. Garaventa,² D. Russo,³ R.M. Mura,⁴ S. Buffardi,⁵ I. Capolsini,⁶ E.S.G. d'Amore,⁷ F. Gregucci,¹ A. Rosolen¹

¹Clinica di Oncoematologia Pediatrica, Dipartimento della Salute della Donna e del Bambino, AO di Padova, Università degli Studi di Padova, Padova; ²Istituto G. Gaslini, Dipartimento di Ematologia ed Oncologia Pediatrica, Genova; ³UO Oncoematologia Pediatrica A.R.N.A.S., Civico di Cristina e Benfratelli, Palermo;

⁴Oncoematologia Pediatrica, Ospedale Regionale per le Microcitemie, Cagliari; ⁵Dipartimento di Oncologia, AO Santobono-Pausilipon, Napoli; ⁶SC di Oncoematologia Pediatrica, Ospedale S.M. della Misericordia, Perugia; ⁷UO di Anatomia Patologica, Ospedale San Bortolo, Vicenza, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il linfoma follicolare (LF) costituisce una rarità nel bambino e nell'adolescente, rappresentando il 2% di tutti i linfomi non Hodgkin (LNH) a cellule B. Pochi sono inoltre gli studi pubblicati su LF in casistiche pediatriche. Proprio per questa peculiarità il trattamento dei LF costituisce spesso una sfida per i curanti. Lo scopo di questo studio è quello di valutare l'incidenza dei LF nella casistica nazionale AIEOP, ed analizzarne le caratteristiche cliniche, istopatologiche ed outcome.

METODI: Abbiamo valutato retrospettivamente i pazienti con età inferiore ai 18 anni affetti da LF e registrati nel protocollo nazionale AIEOP LNH-97 da ottobre 1997 a febbraio 2012. I pazienti sono stati considerati con almeno 12 mesi di follow-up. Per la peculiarità istologica, i pazienti con LF sono stati registrati nel protocollo ma analizzati separatamente. Tutti i reperti istologici della diagnosi sono stati centralmente rivisti e classificati in base alla classificazione WHO 2008, con attribuzione del relativo grado.

RISULTATI: Su un totale di 487 pazienti affetti da LNH a cellule B, sono stati registrati complessivamente 8 pazienti (1.6%) con nuova

diagnosi di LF, tutti di sesso maschile, con età mediana alla diagnosi di 11.3 anni (range 4.6-17.1). Sede alla diagnosi: linfonodi sovraclavari (n=2), testicolo (n=2), linfonodi laterocervicale (n=2), linfonodo sottomandibolare (n=1), e parotide (n=1). Il valore mediano di LDH è 528 UI/L (range 206-550 UI/L). La revisione istologica ha confermato la diagnosi di LF in tutti i casi, in aggiunta 7/8 presentavano grado G3 e un paziente grado G2. Sette pazienti sono stati assegnati allo stadio I per resezione completa della malattia e un paziente è stato considerato in stadio II per resezione parziale della malattia. Tre pazienti hanno effettuato chemioterapia: 2 pazienti in stadio I hanno eseguito 2 cicli di terapia (ciclo A e ciclo B) secondo il protocollo AIEOP LNH-97, con utilizzo di Methotrexate a 1 gr/mq, e 1 paziente in stadio II ha eseguito 4 cicli di terapia (2 cicli A alternati a 2 cicli B). Gli altri 5 pazienti in stadio I non hanno eseguito alcuna terapia ed hanno effettuato uno stretto follow-up. Con un tempo mediano di osservazione di 1.7 anni (range 0.2-8.7 anni), tutti i pazienti sono vivi in prima remissione completa.

CONCLUSIONI: Nella nostra casistica, il LF nel bambino e nell'adolescente sembra essere associato al sesso maschile, a uno stadio localizzato di malattia, a un basso valore di LDH e all'interessamento dei linfonodi periferici alla diagnosi. L'outcome è eccellente, anche per i pazienti trattati con la sola chirurgia. I gruppi internazionali EICNHL e i-BFM stanno elaborando un protocollo comune per la diagnosi, il trattamento e il follow-up dei LF del bambino e dell'adolescente.

L032

STUDIO DI POLIMORFISMI DI GENI COINVOLTI NEL METABOLISMO DEL FOLATO IN BAMBINI CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA

R. Tesse,¹ E. Orioli,² P. Muggeo,¹ R. Pavone,¹ R.M. Daniele,¹ F. Centrone,¹ D. Gemmati,² N. Santoro¹

¹Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Clinica Pediatrica "F. Vecchio", Azienda Ospedaliero-Universitaria Consorziale Policlinico di Bari, Bari; ²Centro di Emostasi e Trombosi, Unità di Ematologia, Università di Ferrara, Ferrara, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: I folati svolgono un ruolo decisivo nei processi di divisione e crescita cellulare. Questi metaboliti devono essere completamente ridotti dall'enzima diidrofolato reductasi (DHFR) prima di entrare nel metabolismo cellulare. DHFR contribuisce nella generazione di forme parzialmente ridotte di folato quali metilene-tetraidrofolic (THF) e formil-tetraidrofolic (THF), particolarmente importanti per un'ottimale sintesi di DNA. La forma completamente attiva di folato, il metil-THF, è sintetizzata dall'enzima metilentetraidrofolato reductasi (MTHFR). Alterazioni nelle funzioni di questi enzimi possono avere effetti negativi sulla stabilità del DNA e sull'attivazione di proto-oncogeni, con effetti sulla suscettibilità al cancro e ad agenti chemioterapici quali il Methotrexate. L'analisi di polimorfismi dei geni correlati al ciclo del folato può essere di aiuto negli studi di suscettibilità per le neoplasie ematologiche e per ottimizzarne la terapia antitumorale. Abbiamo pertanto indagato un possibile ruolo di varianti genetiche di geni DHFR e MTHFR nella patogenesi e prognosi della LLA in età pediatrica.

METODI: Sono stati reclutati 83 bambini (età media 4.9 anni, 46 maschi) affetti da LLA e 41 pazienti pediatrici non oncologici (età media 4.5 anni, 23 maschi), ai quali è stato prelevato un campione di sangue periferico per l'estrazione del DNA e per le analisi di biologia molecolare (Polymerase Chain Reaction, Restriction Fragment Length Polymorphism Assays, Sequenziamento genico). È stata valutata la presenza di una delezione polimorfica di 19 paia di basi, D-allele, all'interno dell'introne 1 del gene DHFR e la sostituzione del nucleotide citosina con una timina, C677T, all'interno dell'esone 4 del gene MTHFR (che comporta la sostituzione alanina-223-valina (A223V) nel dominio catalitico della regione N-terminale della catena proteica enzimatica) nei pazienti oggetto di studio e nella popolazione pediatrica sana di controllo.

RISULTATI: La percentuale di espressione del genotipo DHFR omozigote per la doppia delezione (DD) e di quello wild-type (WW) è risultata minore nei casi rispetto ai controlli (DD: 16% vs 18%, WW: 40% vs 48%) mentre il genotipo eterozigote WD era più espresso nei pazienti oncologici, ma in assenza di una differenza statisticamente significativa (41% vs 31%, p=NS). Analogamente, le percentuali di espressione dei genotipi CT e TT della variante genetica MTHFR C677T sono risultati inferiori nei casi rispetto ai controlli (35% e 15% vs 46% e 19% rispettivamente), invece il genotipo wild-type CC era più espresso nei bambini affetti, in maniera statisticamente non significativa (47% vs 34%, p=NS).

CONCLUSIONI: Questi dati preliminari suggeriscono l'assenza di una prevalenza dei polimorfismi dei geni DHFR e MTHFR in pazienti pediatrici affetti da LLA rispetto alla popolazione pediatrica di controllo. Pertanto non sembrerebbe esserci una diretta correlazione tra variazioni genetiche determinate dell'attività degli enzimi studiati coinvolti nel metabolismo dei folati e la patogenesi dell'LLA infantile.

L033

STUDIO CON TROMBOELASTOMETRIA (FIBTEM TEST) DELLA DISCOAGULOPATIA DA PEG-ASPARAGINASI IN BAMBINI CON LLA

G. Geranio,¹ L. Spiezia,² S. Maggiolo,² M. Pillon,³ B. Buldini,³ M.G. Petris,³ A. Todesco,³ L. Sainati,³ S. Varotto,³ C. Messina,³ E. Calore,³ M. Tumino,³ M.C. Putti,³ G. Basso³

¹Clinica di oncoematologia pediatrica, Padova, Padova; ²Clinica Medica II, AO di Padova; ³Clinica di Oncoematologia Pediatrica, DAIS, Az. Osp. di Padova, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il trattamento della leucemia linfoblastica acuta (LLA) con L-asparaginasi (L-ASP) è frequentemente associato ad alterazioni della coagulazione che favoriscono diatesi sia trombotica che emorragica. Gli esami ematochimici di routine non sono spesso sufficienti ad identificare il rischio clinico, avendo come unico indicatore affidabile di trombofilia i livelli plasmatici di antitrombina (AT). La tromboelastometria (ROTEM) con l'utilizzo del FIBTEM test è test valido per quantizzare l'ipofibrinogenemia e la diatesi emorragica. Scopo dello studio. Studiare nei bambini con LLA trattata secondo protocollo AIEOP-BFM-ALL 2009 l'effetto della PEG-ASP sulla discoagulopatia, tramite valutazione dei profili tromboelastometrici con test FIBTEM e della AT con test classico.

METODI: In 24 pazienti con LLA (età 20 mm-17 aa; M/F 13/11) trattati secondo protocollo AIEOP 2009 con PEG-L-ASP presso la Clinica Oncoematologica di Padova da giugno a dicembre 2012, abbiamo misurato con test classico i parametri coagulativi (AT, fibrinogeno plasmatico) e conta piastrinica e con FIBTEM test il Maximum Clot Firmness (MCF, VN 9-25mm), misura indiretta del fibrinogeno presente dopo inibizione delle piastrine con Cytocalasina D.

RISULTATI: Sono stati analizzati 222 test in 24 pazienti. È stata identificata una correlazione lineare tra i valori di MCF in FIBTEM e i livelli plasmatici del fibrinogeno misurati con il metodo di Clauss (p<0.001). I risultati dei test coagulativi standard non erano sempre sovrapponibili a quelli del ROTEM. Bassi livelli plasmatici di AT non sembrano invece influenzare i risultati delle tromboelastometrie. Novantadue MCF erano alterati (<9mm; 41 % dei test). Dieci casi (4,5% dei test) con MCF <2mm sono stati supplementati con concentrati ev di fibrinogeno. Valori di AT<50% sono stati riscontrati in 50 determinazioni (20% dei test). L'AT è stata supplementata in 12 casi (5,4% dei test), in presenza di AT<35%. Alterazioni della coagulazione sono stati osservati fino a 20 giorni dopo la somministrazione di PEG-ASP. Due bambini trattati con prolungate somministrazioni di PEG ASP (R-1 e R-HR) non hanno mostrato effetto cumulativo prolungato su MCF e solo modesta riduzione di AT. Nella nostra coorte di pazienti non si sono mai verificate complicanze emorragiche maggiori. Un bambino di 6 anni ha presentato una trombosi venosa cerebrale durante fase di discoagulopatia caratterizzata da PT 36%, MCF=0mm, AT 76% ma in presenza di recupero della conta piastrinica (piastrine 83000/mm3).

CONCLUSIONI: Nei bambini con LLA, MCF in FIBTEM test sembra più accurato dei test classici nella misurazione della ipofibrinogenemia, in particolare nell'identificare i livelli di rischio emorragico. L'estensione ad un maggior numero di pazienti potrà chiarire il ruolo della tromboelastometria nel monitoraggio della discoagulopatia da PEG-ASP per guidare la supplementazione con emoderivati.

L034

AUTOFAGIA COME BIOINDICATORE E COME TARGET NEL LINFOMA

M. Marconi,¹ P. Matarrese,¹ F. Cocca,² G. Palumbo,² R. De Vito,³ D. Del Principe,¹ F. Locatelli,² W. Malorni¹

¹Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ²Reparto di Oncoematologia Pediatrica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma; ³Unità Operativa Anatomia Patologica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: L'autofagia è un processo catabolico geneticamente regolato attraverso il quale la cellula rimuove selettivamente componenti citoplasmatici alterati (membrane, organelli, componenti proteiche e lipidiche) che possono così essere riciclati fornendo alla cellula energia e consentendo la sua sopravvivenza in condizioni ambientali sfavorevoli. Pur esistendo diversi tipi autofagia, in tutti casi si ha la degradazione, all'interno dei lisosomi, del materiale cellulare danneggiato o alterato da riciclare. Nell'autofagia propriamente detta o macroautofagia, si osserva la formazione di vescicole a doppia membrana, che inglobano, isolano e separano dal resto del citoplasma il materiale da eliminare che viene poi degradato nei lisosomi nelle sue componenti fondamentali che possono essere nuovamente utilizzate dalla cellula. L'autofagia interviene in diversi processi, inclusi la rimozione di agenti patogeni, la presentazione degli antigeni, la tumorigenesi e la resistenza intrinseca di cellule tumorali alla terapia. L'autofagia costituisce quindi un meccanismo di difesa che consente alle cellule, specie quelle neoplastiche, di sopravvivere e moltiplicarsi in condizioni energetiche sfavorevoli e di riparare i danni indotti dai farmaci utilizzando i prodotti della degradazione autofagica come fonti energetiche alternative. In tal senso, l'autofagia può rappresentare un biomarcatore diagnostico e un target terapeutico di interesse nel controllo della crescita neoplastica. I nostri studi, prevedono l'analisi del processo autofagico sia come marcatore di progressione tumorale o di risposta alla terapia, sia come possibile target terapeutico innovativo. I principali obiettivi delle nostre ricerche sono: 1. verificare la possibilità di utilizzare alcuni

marcatori biochimici dell'autofagia come biomarcatori di progressione della malattia o di risposta alla terapia; e 2. verificare la possibilità di modulazione farmacologica dell'autofagia per regolare il destino cellulare durante la terapia o, in altre parole, utilizzare il macchinario biochimico autofagico come bersaglio terapeutico.¹

METODI: Per quanto riguarda il primo obiettivo del nostro studio, sono state effettuate analisi biochimiche (mediante Western blot) su lisati tissutali ottenuti da prelievi biotipici provenienti da 13 pazienti pediatrici (Tabella 1) affetti da diverse forme di linfoma per verificare l'espressione dei due più importanti marcatori del processo autofagico: LC3 e P62. Parallelamente, gli stessi marcatori autofagici sono stati analizzati mediante tecniche di microscopia a fluorescenza e istopatologia su sezioni di tessuto tumorale incluso in paraffina proveniente dagli stessi pazienti pediatrici.

RISULTATI: Nelle biopsie dei pazienti affetti da diversi tipi di linfoma fino ad ora analizzati abbiamo riscontrato una grande variabilità nei livelli autofagici, come dimostrato dalla variabilità dei livelli di espressione delle proteine LC3 e P62. Solo nelle biopsie di tre di questi pazienti, unici tre del gruppo analizzato ad essere affetti da un particolare tipo di linfoma, il PTLD (Post Transplant Lymphoproliferative Disorder), riscontravamo però livelli elevatissimi di P62 e un basso rapporto LC3II/LC3I (le due forme derivate dal taglio enzimatico di LC3 durante l'autofagia). Questo quadro è riconducibile ad un blocco del processo autofagico. Questa ipotesi è supportata dalle osservazioni microscopiche che evidenziano un accumulo di grandi strutture vacuolari positive a LC3 e P62 (Figura 1B).

Tabella 1.

Paz.	Età	Sesso	Istologia	Caratterizzazione	Stadio	Trattamento	Risposta
1	15	M	ALCL	CD30 ⁺ ; Alk1 ⁺ ; Alk ⁺ t(2;5)	IV	AIEOP ALCL 99	RC
2	4	M	Burkitt	CD20 ⁺ , CD10 ⁺ , CD38 ⁺ Tc11 ⁺ Ki67 ⁺ (> 95%) bcl2 ⁺ , CD40 ⁺ , CD44 ⁺ , CD83 ⁺ t(8;14) - c-myc ⁺	IV	AIEOP LNH97	RC
3	9	F	Burkitt	CD20 ⁺ , CD79a ⁺ , CD38 ⁺ , CD3 ⁺ , CD10 ⁺ TdT ⁺ Mib1 100%	II	EURO-LB 02	RC
4	8	F	Linfoblastico T	CD20 ^{+/+} , CD79a ^{+/+} , CD3 ^{+/+} , CD5 ^{+/+} , CD7 ^{+/+} , CD10 ^{+/+} , TdT ^{+/+} , CD34 ^{+/+} , CD99 ^{+/+} CD1a ⁻	IV	EURO-LB 02	RC
5	23	F	PTLD Burkitt	CD20 ⁺ , CD79a ⁺ , CD10 ⁺ , CD38 ⁺ , Bcl6 ^{+/+} , CD44 ⁺ , CD3 ⁺ , Bcl2 ⁺ , MUM1 ⁺ , CD138 ⁺ , Mib1: 99%	IV	R-CHOP	RC
6	12	M	PTLD Burkitt	CD20 ⁺ , CD23 ⁺ , Bcl2 ⁺ , Mum1 ⁺ (focale), CD3 ⁺ , CD10 ⁺ , CD15 ⁺ , CD30 ⁺ , CD38 ⁺ , Bcl6 ⁺ , TdT ⁺	III	R-CHOP	RC
7	18	M	Linfoblastico B	CD79a ⁺ , CD19 ⁺ , Pax5 ⁺ , CD10 ⁺ , TdT ⁺ , CD34 ⁺ , CD20 ⁺ , CD3 ⁺ , CD2 ⁺ , CD7 ⁺ , CD5 ⁺	II	AIEOP LLA REC 2003	Recidiva
8	16	M	Linfoblastico a grandi cellule B	CD20 ⁺ , CD23 ⁺ , Bcl2 ⁺ , Mum1 ⁺ (focale), CD3 ⁺ , CD10 ⁺ , CD15 ⁺ , CD30 ⁺ , CD38 ⁺ , Bcl6 ⁺ , TdT ⁺	II	AIEOP LNH97	Recidiva
9	10	F	Linfoblastico B	CD45 ⁺ , CD79a ⁺ , TdT ⁺ , CD10 ⁺ , CD99 ⁺ , FLI1 ⁺ , CD20 ⁺ , CD3 ⁺ , CD5 ⁺ , CD7 ⁺ , CD34 ⁺ , Mib1: 90%	IV	EURO-LB 02	RC
10	14	M	Burkitt	CD20 ⁺ , CD79a ⁺ , CD10 ^{+/+} , CD3 ⁺ , CD38 ⁺ , CD34 ⁺ , TdT ⁺ Mib1: 100%, t(8;14) (q24;32)	IV	AIEOP LNH 97	RC 2° tumore (LMA)
11	11	M	Burkitt	CD20 ⁺ , CD79a ⁺ , CD10 ⁺ , CD3 ⁺ , CD99 ⁺ , CD34 ⁺ , TdT ⁺	III	AIEOP LNH97	RC
12	13	M	Linfoblastico a grandi cellule B	CD20 ⁺ , CD79a ⁺ , Pax5 ⁺ , bcl6 ⁺ , mum1 ⁺ , ciclina D1 ⁺ , CD3 ⁺ , CD30 ⁺ , CD10 ⁺ , TdT ⁺ , CD138 ⁺ , CD34 ⁺ , ALK ⁺ , CD5 ⁺ , bcl2 ⁺	III	AIEOP LNH97	RC
13	22	M	PTLD Linfoblastico a grandi cellule B	CD45 ⁺ , CD38 ⁺ , MUM1 ⁺ , CD20 ^{+/+} , CD79a ^{+/+} , CD30 ^{+/+} , CD19 ^{+/+} , Pax5 ^{+/+} , CD3 ⁺ , ALK1 ⁺ , CD10 ⁺ , Bcl6 ⁺ , CD138 ⁺ , CD15	IV	R-CHOP	RC

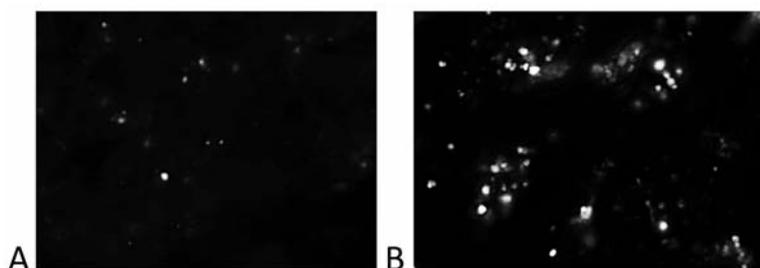


Figura 1. È possibile osservare la distribuzione di LC3-II in due sezioni linfonodali prelevate da pazienti. Il paziente A era affetto da un NHL ALK⁺ mentre il paziente B era affetto da NHL-PTLD. La situazione (A) corrisponde a livelli "normali" di autofagia. Notare come siano numerosi e grandi i vacuoli autofagici presenti in (B). Questa morfologia è riconducibile ad una alterazione dei processi degradativi che determinano un accumulo di materiale non degradato all'interno delle cellule.

CONCLUSIONI: I dati preliminari finora ottenuti sembrano supportare l'ipotesi secondo la quale l'autofagia potrebbe rappresentare un marcatore diagnostico e predittivo. Si tratta, infatti, di comprendere se il quadro citopatologico da noi osservato nelle biopsie di questi pazienti sia legato al tipo di patologia o possa essere considerato indicativo della risposta alla terapia somministrata.

Bibliografia:

- Guidetti A, Carlo-Stella C, Locatelli SL, Malorni W, Pierdominici M, Barbati C, Mortarini R, Devizzi L, Matteucci P, Marchianò A, Lanocita R, Farina L, Dodero A, Tarella C, Di Nicola M, Corradini P, Anichini A, Gianni AM. Phase II study of sorafenib in patients with relapsed or refractory lymphoma. *Br J Haematol.* 2012 Jul;158(1):108-19.

L035

VALIDATION OF FLOW CYTOMETRIC p-STAT5 AS DIAGNOSTIC TOOL FOR JUVENILE MYELOMONOCYTTIC LEUKEMIA

C. Bugarin,¹ M. Giordan,² S. Bresolin,² D. Longoni,³ C. Micalizzi,⁴ U. Ramenghi,⁵ A. Bertaina,⁶ G. Basso,² F. Locatelli,⁶ A. Biondi,³ G. te Kronnie,² G. Gaipa¹

¹Centro Ricerca Tettamanti, Clinica Pediatrica Università Milano Bicocca, Monza (MB); ²Laboartorio di Oncoematologia Pediatrica, Dipartimento di Pediatria Università di Padova, Padova; ³Fondazione MBBM, Clinica Pediatrica Università Milano Bicocca, Monza (MB); ⁴Dipartimento di Ematologia Pediatrica e Oncologia, Istituto Giannina Gaslini, Genova; ⁵Dipartimento di Pediatria Università di Ematologia, Università di Torino, Torino; ⁶Dipartimento di Ematologia Pediatrica e Oncologia, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Internationally accepted diagnostic criteria for juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) are based on clinical features and laboratory findings, including detection of molecular abnormalities affecting RAS-MAPK pathway. However, around 15% of patients do not have diagnostic molecular lesions and other diseases, such as CMV infection, can mimic clinical signs of JMML. Aim of this study was to validate a phospho-specific flow cytometry assay assessing phospho-STAT5 (p-STAT5) as a new diagnostic tool for JMML.

METODI: Cell samples were obtained from 22 patients at time of diagnosis of JMML, and from 47 children without hematological malignancies. All samples included in this study were used after obtaining written informed consent from parents or legal guardians. Samples were prepared using a density gradient separation of bone marrow or peripheral blood. Freshly isolated or thawed mononuclear cells were starved in serum-free medium (X-VIVO; Lonza Walkersville.) at a concentration of 1-2 million per mL and rested at 37°C for 1 hour, then stained with anti-CD14 APC-H7 in order to avoid non-specific staining after fixation and permeabilization. Cells were stimulated with escalating doses (from 0.01 to 10 ng/mL) of GM-CSF for 15 minutes at 37°C. Stimulations were performed in duplicate. Cells were then fixed with 1.5% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) and permeabilized with 90% ice-cold methanol (Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, France). Samples were incubated with anti-phospho-STAT5 antibody and surface markers. Response to stimulation at each GM-CSF dose was calculated as proportion (%) of p-STAT5 expressing cells within the CD33+/CD34+ subset, and then quantified by scaling the maximum % of p-STAT5+ cells at 100 and the unstimulated p-STAT5+ cells to 0. The comparisons between two independent groups were performed using Wilcoxon's test. Multiplicity corrections were adopted to control false positives using Holm's method. The adjusted p-values were deemed to be significant if below the alpha level 0.05. We used two independent series of patients JMML and non-JMML samples were randomly assigned to the training and validation sets in a balanced way. Using the training set, JMML and non-JMML samples were compared at each dose of GM-CSF in order to identify the dose with the lowest significant adjusted p-value. At such dose, a threshold was determined as the mean between the lowest p-STAT5 value of the JMML samples and the highest of the non-JMML samples.

RISULTATI: Cells with CD33+/CD34+ phenotype from the 22 confirmed JMML patients showed hyperphosphorylation of STAT5 induced by GM-CSF. Using a training set of samples (11 JMML and 23 controls), we identified a threshold for p-STAT5-positive responding cells after stimulation with 0.1 ng/mL GM-CSF (17.17%) that discrimi-

nates JMML from control samples. This threshold was subsequently validated in an independent series (11 JMML and 24 controls), where we demonstrated that patients with JMML could be distinguished from other subjects with a sensitivity of 91% [confidence interval (CI) 59%-100%], and a specificity of 87% [CI 70% 96%]. Positive and negative predictive values were 71% [CI 42%-92%] and 96% [CI 82%-100%], respectively.

CONCLUSIONI: In conclusion, flow cytometric p-STAT5 profiling is a reliable diagnostic tool for identifying patients with JMML and can contribute to consistency of current diagnostic criteria.

L036

SINDROME DI ERDHEIM-CHESTER IN UN BAMBINO AFFETTO DA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA IN STOP TERAPIA: PATOGENESI E TERAPIA

C. De Angelis,¹ M. Spinelli,¹ F. Pagni,² G. Cazzaniga,³ A. Colombini,¹ G. Cattoretti,² V. Conter,¹ M. Jankovic¹

¹Clinica Pediatrica; ²Dipartimento di Patologia Clinica; ³Unità di Biologia Molecolare, AO San Gerardo, Fondazione MBBM, Monza (MB), Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La sindrome di Erdheim-Chester (ECD) è una rara forma di istiocitosi a cellule non Langherans ad eziologia poco nota. Negli ultimi anni pochi studi in letteratura hanno documentato rari casi di istiocitosi (soprattutto a cellule di Langherans) successivi ad una diagnosi di leucemia linfoblastica acuta, le cui ipotesi eziopatogenetiche sostengono il fatto che l'ematopoiesi, da sempre intesa come maturazione unidirezionale di cellule pluripotenti in cellule specializzate (linfoidi, mieloidi...), sia in realtà un processo più flessibile. Descriviamo il caso di un bambino affetto da leucemia linfoblastica acuta (LLA) in stop terapia con quadro radiologico ed istopatologico a livello epatico e scheletrico compatibile con ECD, le ipotesi eziopatogenetiche formulate e la strategia di trattamento considerata.

METODI E RISULTATI: M.B., bambino di 10 anni affetto da LLA common, trattato secondo protocollo AIEOP LLA R 2006 (gruppo HR per quota blastica > 10% all'immunofenotipo dell'aspirato midollare del giorno +15) ed in remissione completa morfologica e molecolare dal g+33 senza complicanze o eventi avversi degni di nota, a 3 mesi dallo stop terapia presentava tumefazione ed iperemia a livello del terzo distale della gamba, caviglia e piede sinistro, associate a modesto dolore. La RMN arti inferiori mostrava lesioni ossee compatibili con infarti ossei versus aree di osteonecrosi. Nelle settimane successive il bambino evidenziava un miglioramento clinico nelle aree sopracitate, mentre compariva gonalgia destra con tumor, calor, dolor e importante functio lesa, motivo per il quale ripeteva una RMN arti inferiori che mostrava aree focali rotondeggianti di alterato segnale, diametro max 1.5 cm, compatibili con localizzazione di malattia. (Figura 1) Per tale motivo si eseguivano un aspirato midollare ed una biopsia ossea, risultate negative. Si effettuava pertanto la biopsia di una lesione a livello del ginocchio destro, anche se con caratteristiche non osteolitiche, con riscontro di tessuto fibrocartilagineo. A distanza di qualche settimana, all'esame obiettivo si apprezzava il margine epatico a 2 cm dall'arcata costale, per cui si eseguiva un'ecografia addome con il riscontro di multiple lesioni epatiche ipoecogene, una di esse successivamente sottoposta ad agobiopsia con evidenza di cellule istiocitoidi non Langherans CD68⁺ e CD45⁺, con indice di proliferazione (Ki67) del 1-2%. Le indagini infettive risultavano negative. Il complesso reperto istopatologico era genericamente inquadrabile nell'ambito dei disordini istiocitari del distretto gastroenterico: malattia di Erdheim-Chester. Si eseguiva pertanto una TAC dei segmenti ossei total body, con l'evidenza di multiple lesioni osteolitiche a livello della teca cranica, dei corpi vertebrali, del bacino e degli arti superiori e inferiori, (Figura 2) ed una agobiopsia ossea a livello sacrale, non valutabile però perché presente solo materiale cartilagineo. La RMN encefalo e rachide in toto, la TAC torace/addome e l'ecocardiogramma non mostravano alterazioni organiche morfostrutturali. L'analisi molecolare sui cloni istiocitari mostrava gli stessi due riarrangiamenti clonali presenti sui cloni linfoblastici all'esordio della LLA. Il bambino veniva pertanto sottoposto nuovamente ad aspirato midollare, che mostrava una remissione morfologica completa, e veniva analizzata la malattia residua minima (MRD) confrontata con l'MRD ricavata dal materiale midollare dello stop terapia (9 mesi antecedente), con riscontro rispettivamente dei seguenti risultati: marker 1 = 1.7x10⁻⁴ vs 3.2x10⁻⁴; marker 2 = 1.4x10⁻⁴ vs 4.2x10⁻⁴. Il bambino si mantiene in buone condizioni generali e mostra un progressivo miglioramento della motilità attiva e passiva a livello degli arti inferiori, in particolare a livello del ginocchio destro.



Figura 1. Immagini RMN arti inferiori.

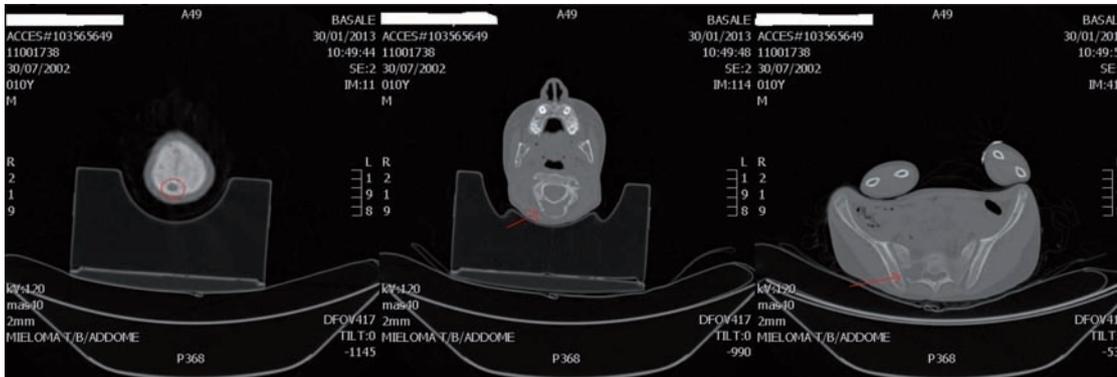


Figura 2. Immagini TAC scheletrica total body.

CONCLUSIONI: Questo caso mostra un'inattesa manifestazione e/o evoluzione della LLA. Vi sono documentati in letteratura altri casi di istiocitosi, sebbene non di ECD, successivi ad una diagnosi di LLA. Le ipotesi eziopatogenetiche sono più di una: 1. il precursore leucemico era una cellula così immatura da poter avere ora una evoluzione su lineage diverso; 2. il clone leucemico (o pre-leucemico) può aver subito un de-differenziamento prima di procedere verso altro lineage; 3. non è possibile escludere con certezza la possibilità che fin dall'esordio il bambino presentasse due cloni (linfoblastico e istiocitoidi) con gli stessi riarrangiamenti, dei quali è stato trattato solamente il primo perché il secondo non era noto. Alla luce della clinica, dei dati ematologici, biopatici e molecolari, e della stazionarietà del quadro nel periodo di osservazione (9 mesi circa) si mantiene un atteggiamento conservativo ("wait and see"), monitorando lo stato della malattia di base a livello molecolare e rivalutando radiologicamente l'eventuale evoluzione delle note lesioni.

Questo caso, analogamente ad altri pubblicati in letteratura, potrebbe essere un interessante esempio di flessibilità del processo di ematopoiesi non più strettamente inteso come processo unidirezionale.

Bibliografia:

- Detlefsen S et al. "Histiocytic disorders of the gastrointestinal tract". Human Pathology 2012 in press.
- Castro EC et al. "Clinicopathologic features of histiocytic lesions following ALL, with a review of the literature". *Pediatr Dev Pathol*. 2010 May-Jun;13(3):225-37.
- Neto ID et al. "Erdheim-Chester disease: a unique presentation with liver involvement and vertebral osteolytic lesions". *Arch Pathol Lab Med*. 2003 Aug;127(8):e337-9.
- Emile JF et al. "BRAF mutations in Erdheim-Chester disease". *J Clin Oncol*, 2013 Jan; 20;31(3):398.
- Ratei R et al. "Common clonal origin of an acute B-lymphoblastic leukemia and a Langerhans' cell sarcoma: evidence for hematopoietic plasticity". *Haematologica*. 2010 Sep;95(9):1461-6.
- Trebo MM et al. "Histiocytosis following T-acute lymphoblastic leukemia: A BFM study". *Leuk Lymphoma*, 2005 Dec; 46(12): 1735-1741.

L037

VALORI ELEVATI DI FERRITINA PRETERAPIA SONO PREDITTIVI DI PIÙ BREVE SOPRAVVIVENZA LIBERA DA EVENTI NEI PAZIENTI CON LINFOMA DI HODGKIN TRATTATI NEL PROTOCOLLO LH-2004

P. Bulian,¹ P. Farruggia,² M. Aricò,³ M. Bianchi,⁴ S. Buffardi,⁵ M. Caniglia,⁶ M. Cellini,⁷ S. Cesaro,⁸ C. Conсарino,⁹ V. Conter,¹⁰ S. D'Amico,¹¹ G. Iaria,¹² C. Favre,¹³ G. Fioritoni,¹⁴ A. Garaventa,¹⁵ P. Indolfi,¹⁶ F. Locatelli,¹⁷ M. Mascarin,¹⁸ G. Murgia,¹⁹ R. Pericoli,²⁰ A. Pession,²¹ P. Pierani,²² F. Porta,²³ A. Sala,²⁴ N. Santoro,²⁵ D. Sperli,²⁶ A. Todesco,²⁷ G.A. Zanazzo,²⁸ M. Zecca,²⁹ R. Burnelli³⁰

¹Onco-Ematologia, IRCCS Centro di Riferimento Oncologico, Aviano; ²Onco-Ematologia Pediatrica, Ospedale dei Bambini, "G. Di. Cristina, Palermo; ³Onco-Ematologia Pediatrica, Ospedale Meyer, Firenze; ⁴Onco-Ematologia, Ospedale Regina Margherita, Torino; ⁵Onco-Ematologia Pediatrica, AORN, Sanbono-Pausilipon, Napoli; ⁶Onco-Ematologia Pediatrica, Ospedale Santa Maria della Misericordia, Perugia; ⁷Onco-Ematologia Pediatrica, Il Policlinico di Modena, Modena; ⁸Onco-Ematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata Verona, Verona; ⁹Onco-Ematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera Pugliese Ciaccio, Catanzaro; ¹⁰Onco-Ematologia, Ospedali Riuniti di Bergamo, Bergamo; ¹¹Ematologia ed Oncologia, Azienda Ospedaliero Universitaria, Catania; ¹²Ematologia ed Oncologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera Bianchi-Melacrino-Morelli, Reggio Calabria; ¹³Onco-Ematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera Pisa, Pisa; ¹⁴Ematologia, Ospedale di Pescara, Pescara; ¹⁵Ematologia ed Oncologia Pediatrica, Istituto G. Gaslini, Genova; ¹⁶Oncologia Pediatrica, Seconda Università degli Studi di Napoli, Napoli; ¹⁷Onco-Ematologia, Ospedale Bambin Gesù, Roma; ¹⁸Radioterapia Pediatrica e Area Giovani, IRCCS Centro di Riferimento Oncologico, Aviano; ¹⁹Oncoematologia Infantile, Ospedale Microcitemico, Cagliari; ²⁰Onco-Ematologia Pediatrica, Ospedale Infermi di Rimini, Rimini; ²¹Pediatria, Policlinico Sant'Orsola - Malpighi, Bologna; ²²Onco-Ematologia Pediatrica, Ospedale Pediatrico G. Salesi, Ancona; ²³Onco-Ematologia, Ospedale Civile

Brescia, Brescia; ²⁴Pediatria, Ospedale San Gerardo, Monza; ²⁵Biomedicina della Età Evolutiva, I Policlinico, Bari; ²⁶Pediatria, Ospedale Annunziata di Cosenza, Cosenza; ²⁷Pediatria, Università degli Studi di Padova, Padova; ²⁸Onco-Ematologia Pediatrica, IRCCS Burlo Garofolo, Trieste; ²⁹Onco-Ematologia Pediatrica, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia; ³⁰Onco-Ematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara, Ferrara, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Alcuni autori hanno segnalato che livelli elevati di ferritina sono riscontrabili a diverse neoplasie ematologiche, con valori particolarmente elevati nel linfoma di Hodgkin (HL). Sono state osservate correlazioni con lo stadio di malattia e con la risposta clinica. In particolare livelli elevati preterapia si normalizzavano al raggiungimento della risposta completa, per elevarsi nuovamente nei pazienti in ricaduta o progressione. In generale si può ipotizzare che valori elevati di ferritina siano correlati alle citochine infiammatorie secrete direttamente dalle cellule di Hodgkin o da cellule del contesto tissutale o microambientale dei tessuti coinvolti, risultando così la ferritina un indicatore di flogosi analogo alla VES. Tuttavia la maggior precisione della misura della ferritinemia e la sua rapidità di variazione, possono far ipotizzare un ruolo più importante ed indipendente da quello della VES e di altri fattori prognostici. Non esistono studi clinici specifici sul valore prognostico e predittivo di livelli elevati di ferritina in casistiche di HL in età pediatrica o adulta. Tale è l'obiettivo di questo studio, condotto retrospettivamente sulla serie consecutiva di casi arruolati nel protocollo LH2004.

METODI: 703 pazienti risultavano arruolati nel protocollo LH2004 a febbraio 2013. Sono stati selezionati i casi con determinazione preterapia di ferritina (543 casi) e con data di diagnosi precedente al 01.01.2011 e con follow-up aggiornato a fine 2012 (455 casi). La relazione tra sopravvivenza libera da eventi (event free survival, EFS) e ferritinemia è stata valutata mediante curve di Kaplan-Meier e test di log-rank e mediante modelli di regressione di Cox con aggiustamenti per gruppo terapeutico ed altri fattori prognostici. La ferritinemia è stata trattata sia come variabile continua che come variabile dicotomica; in questo caso il valore discriminante tra ferritina elevata e bassa è stato identificato mediante analisi del grafico dei residui della martingala con sovrapposizione di una linea di regressione locale (lowess fit: locally weighted scatterplot smoothing), che mostra la relazione tra eccesso di eventi e valori di ferritinemia. La presenza sulla linea di regressione di un punto di flesso o a scalino identifica il punto ottimale di dicotomizzazione della variabile ferritina.

RISULTATI: L'età mediana era 14 anni (range interquartile da 11 a 15). Il follow up mediano era 4 anni (range 1-8), con 79 eventi osservati. L'EFS complessivo a 4 anni risultava 88.7%. La suddivisione per gruppo terapeutico era la seguente: 88 casi (19%) gruppo 1, 110 (24%) gruppo 2, 257 (56%) gruppo 3. La mediana di ferritinemia era 92 ng/mL (range 2-3724), e la distribuzione risultava asimmetrica (log-normale). Suddividendo per gruppo terapeutico la ferritinemia mediana risultava 37, 67 e 147 ng/mL rispettivamente nei gruppi 1, 2, 3. Analogamente, la mediana risultava 53, 75, 126, 155 rispettivamente negli stadi I, II, III, IV. L'analisi grafica dei residui della martingala mostrava un chiaro punto di flesso attorno al valore di 150 ng/ml. Complessivamente 32% dei pazienti aveva ferritina >150, in particolare nei gruppi 1, 2, 3 rispettivamente 4%, 17%, 48%, negli stadi I, II, III, IV rispettivamente 23%, 21%, 45%, 51%. Il log-rank test nei due gruppi di pazienti con valori elevati e bassi di ferritina risultava significativo (chiquadro 14.2, p=0.0001). Tuttavia suddividendo per gruppo terapeutico la significatività del log-rank test risultava rispettivamente 0.37, 0.76 e 0.0017. Nell'ambito del gruppo terapeutico 3 (257 pazienti), la ferritina come variabile continua risultava non significativamente correlata all'EFS (modello di Cox), mentre come variabile dicotomica (ferritina >150) risultava un predittore significativo, con hazard ratio (HR) di 2.4 per EFS più corto nei pazienti con ferritina >150 (p=0.0023). Il valore predittivo veniva mantenuto in modelli di Cox aggiustati per stadio, presenza di sintomi, ves >30 o ves >50, presenza di bulky o di malattia in sedi extranodali.

CONCLUSIONI: La ferritina elevata (>150 ng/mL) misurata all'esordio risulta un promettente predittore di EFS nella serie di HL arruolati nel protocollo LH2004. In particolare l'effetto è concentrato nell'ambito del gruppo terapeutico 3, dove i pazienti con ferritina elevata (48%) risultano essere un subset a prognosi peggiore, con effetto indipendente da ves elevata, sedi extranodali e presenza di bulky. Sono in corso ulteriori analisi per conferma su una casistica indipendente.

L038

DIAGNOSI E TRATTAMENTO DEI BAMBINI AFFETTI DA LLA ARRUOLATI NEI PROTOCOLLI AIEOP LLA-2000 E AIEOP R-2006: ESPERIENZA DEL CENTRO DI CATANIA

E. Cannata, P. Samperi, S. Munda, L. Lo Valvo, E. Mirabile, D. Bottino, S. D'Amico, A. Poli, A. Di Cataldo, M. La Spina, V. Miraglia, G. Russo, L. Lo Nigro

Centro di Riferimento Regionale di Ematologia ed Oncologia Pediatrica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico OVE, Catania, Italy

ABSTRACT: Il trattamento della Leucemia Linfoblastica Acuta (LLA) del bambino negli ultimi 10-15 anni ha ottenuto notevoli progressi, grazie al miglioramento della definizione delle fasce di rischio, all'ottimizzazione dell'uso in combinazione dei farmaci già esistenti, al trapianto di cellule staminali ematopoietiche nei pazienti ad alto rischio.

Obiettivi. L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di verificare che l'applicazione di protocolli nazionali ed internazionali in un Centro medio come quello di Catania offre identiche aspettative di sopravvivenza e che specifiche variabili quali l'età alla diagnosi, la risposta dopo 7 giorni di terapia steroidea, la fascia di rischio per malattia residua minima, la fascia di rischio finale, la presenza della traslocazione t(12;21) possano aver influito sull'event free survival (EFS) e sull'Overall Survival (OS) anche nel Centro di Catania.

MATERIALI E METODI: Dal 1° Settembre 2000 al 30 Settembre 2010 abbiamo studiato 196 bambini (range età 1-17 anni) affetti da LLA, arruolati nei Protocolli AIEOP LLA-2000 e R-2006. Sono state eseguite analisi bivariante per verificare l'associazione delle variabili con l'evento avverso e ne è stata calcolata la significatività statistica mediante il test del chi-quadrato di Pearson. Le curve di EFS e OS sono state calcolate mediante il metodo di Kaplan-Meier. Il rapporto delle curve nei vari sottogruppi è stato effettuato usando il test di Mantel Cox (long rang test); P-values significativo al di sotto di 0.05 (Figura 1 e 2).

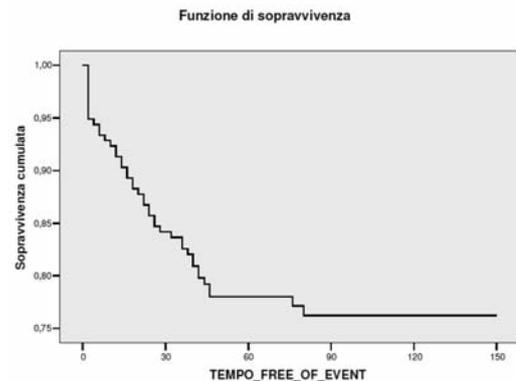


Figura 1. Curva di EFS relativa ai 196 bambini affetti da LLA, diagnosticati e trattati presso il Centro di Catania dal Settembre 2000 al Settembre 2010, utilizzando i protocolli AIEOP LLA 2000 e R-2006.

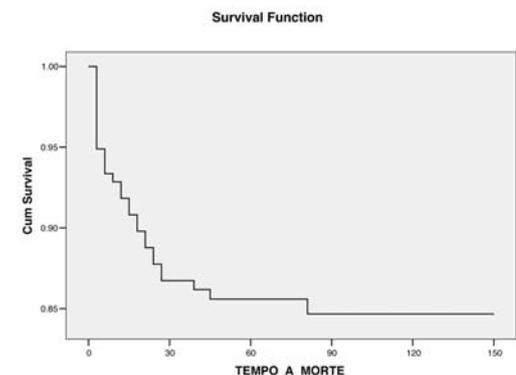


Figura 2. Curva di sopravvivenza (Overall Survival) relativa ai 196 bambini affetti da LLA, diagnosticati e trattati presso il Centro di Catania dal Settembre 2000 al Settembre 2010, utilizzando i protocolli AIEOP LLA-2000 e R-2006.

RISULTATI: Dalle nostre analisi è emersa una percentuale elevata di eventi mortali in induzione nel periodo 2000-2006 (5 morti su 114 casi) relativo al protocollo AIEOP2000; di contro, abbiamo riscontrato solo 1 evento (registrato nel 2006) mortale in induzione nel periodo compreso tra Agosto 2006 e Settembre 2010, relativo al protocollo AIEOP-R-2006. I nostri dati hanno mostrato una percentuale di EFS del 77.6% e OS dell'85.2%. I seguenti parametri hanno avuto un impatto statisticamente significativo sull'EFS e sull'OS: l'età alla diagnosi (1-9 anni 83,7% - 91,2% vs 10-17 anni 59,2% - 67,3%), la risposta al cortisone (PGR 79,9% - 87,2% vs PPR 56,3% - 68,8%), la fascia di rischio per malattia residua minima (SR 96% - 100% vs MR 79%- 91,2% vs HR 50% - 50%), la fascia di rischio finale (SR 98% - 100% vs MR 81%- 92% vs HR 60%-68%), la presenza alla diagnosi della traslocazione (12;21) (*TEL-AML1* positivi 97%-100% vs negativi 78%-85%). Abbiamo registrato 32 recidive di malattia: 22 nel protocollo AIEOP-2000; 10 nel AIEOP-R-2006.

CONCLUSIONI: Nonostante un'incidenza di eventi mortali in induzione nelle prime fasi di applicazione del protocollo AIEOP 2000, i dati di EFS e OS del centro di Catania sono pertanto risultati sostanzialmente in linea con quelli generali dell'AIEOP, come anche dimostrato da un'analisi ad interim del CORS (pazienti arruolati dal settembre 2000 a luglio 2006 EFS altri centri AIEOP 77,8% vs EFS Catania 76,2%) e con quelli pubblicati in letteratura dai principali gruppi cooperativi; in più è stata confermata anche presso il Centro di Catania, la validità dell'impatto prognostico di specifiche variabili relative al bambino (età), alla biologia della malattia [t(12;21)], e soprattutto alla risposta al trattamento (Risposta al PDN e MRD).

L039

LE TRASFUSIONI DI EMOCOMPONENTI HANNO UN IMPATTO SULLA SOPRAVVIVENZA GLOBALE DEI PAZIENTI AFFETTI DA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA?

V. Cecinati,¹ A. Quaglietta,² D. Onofrillo,¹ G. La Barba,¹ A. Sau,¹ A. Nicolucci,³ V. Catinella,² P. Accorsi,² G. Fioritoni⁴

¹Unità Operativa di Oncoematologia Pediatrica, Dipartimento di Ematologia; ²Servizio di Medicina Trasfusionale, Ospedale Civile 'Spirito Santo', Pescara; ³Consorzio Mario Negri Sud, Centro di Ricerche Farmacologiche e Biomediche, Santa Maria Imbaro (CH); ⁴Dipartimento di Ematologia, Ospedale Civile 'Spirito Santo', Pescara, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La trasfusione di emocomponenti è una terapia di supporto a cui spesso si ricorre durante la chemioterapia per la cura della leucemia linfoblastica acuta (LLA) soprattutto nelle fasi intensive di trattamento. I pazienti affetti da LLA presentano una immunodepressione secondaria sia alla malattia stessa che alla chemioterapia. Le trasfusioni possono contribuire all'immunodepressione attraverso un effetto di immunomodulazione che determina una alterazione dell'immunità umorale e cellulare del paziente diminuendo la capacità di sorveglianza immunitaria e la probabilità di eradicazione del clone leucemico. Abbiamo voluto valutare se esiste una relazione tra le trasfusioni di emocomponenti, in termini quantitativi e qualitativi, e l'impatto che queste hanno sull'outcome del trattamento di pazienti affetti da LLA.

METODI: Abbiamo condotto uno studio retrospettivo valutando i pazienti con diagnosi di LLA trattati presso il nostro Centro con i protocolli terapeutici AIEOP a partire dall'anno 2000. Per ogni paziente è stata valutata la storia trasfusionale durante il periodo di due anni relativo alla durata del ciclo chemioterapico completo (numero e tipologia di trasfusioni), le caratteristiche cliniche dei pazienti (età alla diagnosi, immunofenotipo, fascia di rischio secondo protocollo, e stato di malattia all'ultimo follow-up). È stata valutata inoltre la sopravvivenza globale in relazione al numero ed alla tipologia di emocomponenti utilizzati. I predittori indipendenti di mortalità sono stati valutati utilizzando il modello multivariato di Cox. Le covariate includevano età, sesso, categoria di rischio, immunofenotipo, storage dei concentrati di eritrociti, numero di trasfusioni di concentrati eritrocitari maggiore o uguale al valore mediano, numero di trasfusioni di concentrati piastrinici maggiore o uguale al valore mediano.

RISULTATI: Sono stati valutati complessivamente 81 pazienti, 50 di sesso maschile (61,7%) con una età media alla diagnosi di 5 anni (range:1-16 anni) ed una mediana di sopravvivenza di 10,7 anni. Sette pazienti (9%) presentavano una LLA con immunofenotipo T. Secondo i criteri di stratificazione delle fasce di rischio 54 pazienti apparteneva-

no alle fasce di rischio standard ed intermedio e 27 all'alto rischio. Degli 81 pazienti 15 (18,5%) risultavano deceduti. Tutti i pazienti hanno ricevuto trasfusioni di concentrati di eritrociti leucodepleti ma non irradiati. Il 94% dei pazienti ha ricevuto concentrati piastrinici leucodepleti e irradiati. Il numero mediano di unità di concentrati eritrocitari trasfusi era di 12 (range: 4-71), il numero mediano di concentrati piastrinici da aferesi era di 5 (range: 0-144) e il plasma fresco congelato è stato trasfuso nel 37% dei pazienti con una mediana di 0 (range 0-6). All'analisi multivariata la trasfusione di 12 o più unità di eritrociti concentrati era associato con un rischio aumentato di mortalità di 14 volte (HR = 14.8, 95% CI 3-73.8), mentre l'immunofenotipo T era associato ad un rischio aumentato di mortalità di 18 volte (HR = 18.4, 95% CI 5,1-66,6). Rimuovendo dal modello il numero di trasfusioni di concentrati eritrocitari si conferma l'eccesso di rischio di morte associato all'immunofenotipo (HR=11.0; IC95% 3.4-45.1) mentre subentra come fattore di rischio la presenza di un'alta fascia di rischio (HR=6.3, IC95% 2.0-19.6). Nessun altro fattore considerato era associato ad un aumentato rischio di mortalità.

CONCLUSIONI: Il nostro studio, oltre a confermare il ruolo predittivo dell'immunofenotipo, evidenzia un sostanziale incremento del rischio di morte associato al numero di trasfusioni di concentrati eritrocitari. Parte di questo effetto è da imputare al maggior ricorso alle trasfusioni nei soggetti ad alto rischio. Questo dato è evidenziato dalla comparsa della severità di malattia, come fattore di rischio indipendente, una volta rimosso dal modello il numero di trasfusioni di eritrociti. D'altra parte, l'eccesso di rischio legato alle trasfusioni è circa doppio rispetto a quello associato alla severità della malattia, a suggerire che ulteriori elementi entrano in gioco nel determinare l'effetto delle terapie di supporto con concentrati eritrocitari sulla sopravvivenza globale.

Bibliografia:

- Jaime-Pérez JC, Colunga-Pedraza PR, Gómez-Almaguer D. Is the number of blood products transfused associated with lower survival in children with acute lymphoblastic leukemia? *Pediatr Blood Cancer*. 2011 ;57:217-23
- Freiberg A, Hancock M, Kunkel K. Transfusions and risk of failure in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1994;8: 1220-1223.

L040

OSPEDALE CHIAMA SCUOLA. IL RITORNO A SCUOLA DOPO LE CURE ONCOLOGICHE: UN INTERVENTO DI VALUTAZIONE, SUPPORTO E RECUPERO DELLE ABILITÀ SCOLASTICHE

S. Masneri,¹ S. Coppini,¹ E. Cò,¹ F. Porta,²

¹ABE (Associazione Bambino Emopatico), Spedali Civili, Brescia; ²Reparto Oncoematologia Pediatrica, Spedali Civili, Brescia, Italy

PREMESSA: Gli studi internazionali si interrogano sugli effetti neuro cognitivi e neuropsicologici a lungo termine delle cure oncologiche, concentrando la loro attenzione sulle abilità neuropsicologiche quali l'attenzione e concentrazione,¹⁻⁴ la memoria a breve termine^{3,5,6} la memoria di lavoro^{2,7} la velocità di elaborazione delle informazioni,⁴ il funzionamento visuo-spaziale e integrazione visuo-motorio,^{1,4,8,9,10} le funzioni esecutive¹¹ le abilità di problem solving⁴ e le abilità strumentali dell'apprendimento.^{2,8,9,12} La diagnosi di cancro in età evolutiva impone una deviazione dal normale percorso scolastico e di socializzazione con il gruppo dei pari. Le interruzioni necessarie per la cura, condizionano infatti il mantenimento delle relazioni e la frequenza scolastica. "Il cerchio degli amici può ridistribuirsi ed escludere il bambino che può anche tornare a scuola cambiato, nell'aspetto e nel carattere. Un sentimento di isolamento può ridurre il senso di appartenenza del bambino alla scuola e alla partecipazione nelle attività".¹³ L'esperienza di malattia interviene, dunque, nel percorso di crescita sociale e psicologica dei bambini e degli adolescenti, modificando le priorità, inducendo a riflessioni, attivando preoccupazioni, difficili da condividere con i coetanei.

IL RAZIONALE DEL PROGETTO: Obiettivo del seguente progetto è quello di poter garantire ai bambini/ ragazzi seguiti dal reparto di onco-ematologia pediatrica degli Spedali Civili di Brescia un supporto concreto nel rientro scolastico. All'interno del Reparto è stato attivato uno Sportello Scuola rivolto ai bambini in fase di reinserimento e ai bambini che hanno riscontrato alcune difficoltà nelle performance scolastiche e nella ri-socializzazione dopo il ritorno a scuola. Lo sportello si attiva su richiesta della famiglia o su segnalazione degli insegnanti, la fascia d'età considerata è quella scolare dai 6 ai 18 anni. All'interno

del reparto sono stati distribuiti due opuscoli (per fascia d'età) esplicativi del Servizio (Figura 1). Il Progetto si articola in: una fase di valutazione e; una fase di riabilitazione delle aree che appaiono deficitarie, una fase di consulenza alle scuole rispetto ai percorsi riabilitativi di apprendimento e alla facilitazione della risocializzazione.

METODOLOGIA: Il focus dell'attenzione del progetto sono l'apprendimento e la socializzazione. I campi d'azione del progetto sono molteplici perché si rivolgono al paziente, agli insegnanti della scuola di appartenenza e agli insegnanti dell'ospedale. Prima fase del progetto: Fase di valutazione Prevede la somministrazione di tests specifici di valutazione cognitiva, neuropsicologica (memoria, attenzione, abilità visuo-spaziali), delle abilità strumentali dell'apprendimento (lettura, scrittura e calcolo) e psicologica. Sono previsti 3-4 incontri della durata di un'ora. Seconda fase del progetto Fase di intervento. Sulla base delle valutazioni effettuate nella prima fase si attuano:

- incontri con la scuola per offrire indicazioni didattiche precise agli insegnanti della scuola che permettano al bambino a l'adolescente di ricominciare il processo di apprendimento senza frustrazioni;
- incontri di verifica e/o monitoraggio con gli insegnanti della scuola d'appartenenza;
- 3-4 incontri con il bambino/adolescente per incrementare abilità di studio, comprensione o organizzazione del materiale di studio;
- incontri con insegnanti ed educatori che seguono il minore nello svolgimento dei compiti;
- incontri con insegnanti in ospedale per rendere più efficaci gli interventi che spesso si svolgono in tempi limitati.

Sono previsti anche interventi di risocializzazione con il gruppo classe attraverso:

- contatti con il responsabile psicopedagogico o con gli insegnanti per pianificare attività ludiche per migliorare la condivisione;
- contatti con la classe o i compagni attraverso "il diario di bordo" o attività descritte nel modello di Hacker, Klemm e Bopple "Un ponte per la vita".

Bibliografia:

1. Butler RW, Mulhern RK. Neurocognitive interventions for children and adolescents surviving cancer. *J Pediatr Psychol* 2005; 30: 65-78.
2. Mulhern RK, Phipps S, White H. Neuropsychological outcome. In Wallace H, Green D. Late effects of childhood cancer.

London:Arnold Publication 2004: 18-33.

3. Carey MW, Haut SL, Reminger JJ, Hutter R, Theilmann KL, Kaeming K. Reduced Frontal White Matter Volume in Long-Term Childhood Leukemia Survivors: AVoxel-Based Morphometry Study. 2008 www.ajnr.org
4. Lofstad GE, Reinfjell T, Hestad K, Diseth TH. Cognitive outcome in children and adolescents treated for acute lymphoblastic leukaemia with chemotherapy only. *Acta Paediatr* 2009; 98: 180-6.
5. Gross-King M, Booth-Jones M, Couluris M. Neurocognitive impairment in children treated for cancer: how do we measure cognitive outcome? *J Pediatr Oncol Nurs* 2008; 25: 227-32.
6. Alvarez JA, Scully RE, Miller TL, Daniel Armstrong F, Constine LS, Friedman DL, Lipshultz SE. Long-term effects of treatments for childhood cancers. *Hematology and Oncology Curr Opin Pediatr* 2007 19: 23-31.
7. Kirschen MP, Davis-Ratner MS, Milner MW, Annabel SH, Chen Sha, Schraedley-Desmond P, Fisherc PG, Desmond JE. Verbal memory impairments in children after cerebellar tumor resection. *Behav Neurol* 2008; 20: 39-53.
8. Lafay-Cousin L, Bouffet E, Hawkins C, Amid A, Huang A, Mabbot DJ. Impact of radiation avoidance on survival and neurocognitive outcome in infant medulloblastoma. *Curr Oncol* 2009; 16: 21-8. *G Ital Med Lav Erg* 2011; 33:1, Suppl A, Psicol
9. von Hoff K, Kieffer V, Habrand JL, Kalifa C, Dellatolas G, Grill J. Impairment of intellectual functions after surgery and posterior fossa irradiation in children with ependymoma is related to age and neurologic complications. *BMC Cancer* 2008; 8: 15.
10. Moore BD. Neurocognitive outcomes in survivors of childhood cancer. *J Pediatr Psychol* 2005; 30: 51-63.
11. Palmer SL, Reddick WE, Gajjar A. Understanding the cognitive impact on children who are treated for medulloblastoma. *J Pediatr Psychol* 2007; 32: 1040-9.
12. Buizer AI, de Sonneville LMJ, van den Heuvel-Eibrink MM, Veerman AJP. Behavioral and educational limitations after chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia or Wilms tumor. *Cancer* 2006; 106: 2067-75.
13. Eiser C and Lansdown R. Retrospective study of intellectual development in children treated for acute lymphoblastic leukaemia, *Archives of Disease in Childhood*, 1977, 52, 525-529; adc.bmj.com on August 11, 2012 - Published by group.bmj.com.

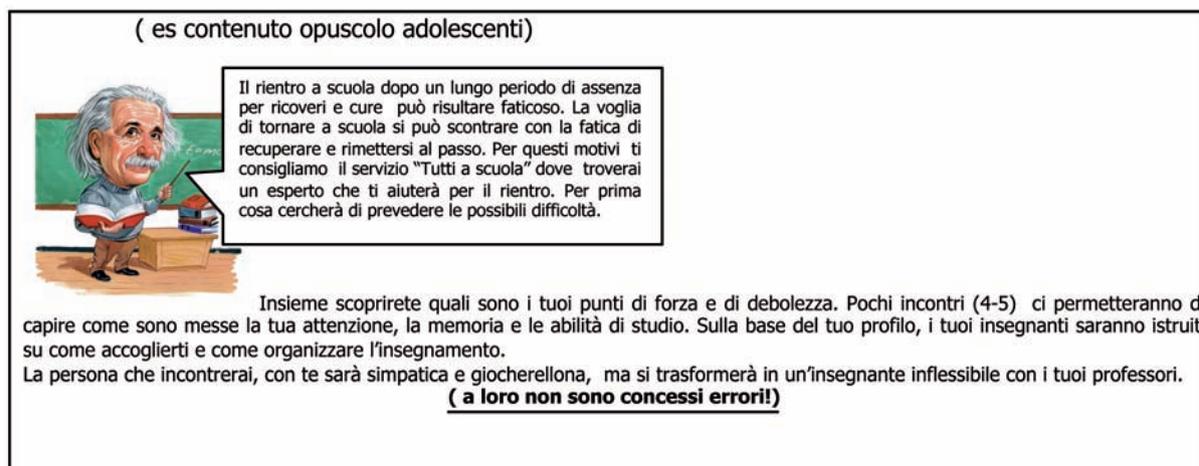


Figura 1.

L041

IPERTRIGLICERIDEMIA MOLTO SEVERA IN CORSO DI TRATTAMENTO CON PEG-ASPARAGINASI E STEROIDE PER LEUCEMIA LINFATICA ACUTA: QUALE IL MANAGEMENT OTTIMALE?

E. Giraldi,¹ M. Provenzi,¹ C. Foglia,¹ R. Poma,² L. Cavalleri,¹ A. Allegrini,¹ L. Cattaneo,¹ E. Celega,² V. Conter,³ L. D'antiga¹

¹Pediatria; ²Immunematologia e Medicina Trasfusionale, Azienda Ospedaliera Papa Giovanni XXIII, Bergamo; ³Clinica Pediatrica, Ospedale San Gerardo, Università Bicocca di Milano, Monza (MB), Italy

INTRODUZIONE: L'asparaginasi è un agente chemioterapico essenziale nel trattamento della leucemia linfoblastica acuta (LLA). Il suo impiego è tuttavia associato ad un ampio spettro di effetti collaterali tra cui i più comuni sono le reazioni allergiche (20%), gli eventi tromboembolici (2-11%), le pancreatiti severe (4-7%), l'epatotossicità, ed i disordini del metabolismo glucidico¹. Più recentemente con l'uso più intensivo del farmaco, ed in particolare se associato a terapia steroidea, sta emergendo l'ipertrigliceridemia come significativa complicanza metabolica. L'incidenza dell'ipertrigliceridemia modesta (<1000 mg/dl) è stimata attorno al 67% ma raramente costituisce un problema clinico; solitamente è infatti asintomatica e transitoria, risolvendosi spontaneamente dopo la sospensione del farmaco.

Tuttavia, una ipertrigliceridemia più marcata (> 1000 mg/dl), seppur osservata più raramente (19% dei casi), espone ad un aumentato rischio di complicanze severe, quali pancreatite acuta e disturbi neurologici da iperviscosità ematica^{1,2}. I meccanismi sottesi allo sviluppo della iperlipidemia da asparaginasi sono diversi ed includono l'aumentata sintesi endogena di lipoproteine a bassa densità (VLDL), l'incremento dei chilomicroni e, soprattutto, la riduzione dell'attività della lipoprotein lipasi (LPL), enzima chiave nella rimozione dal torrente ematico dei trigliceridi, grazie alla loro degradazione in acidi grassi e glicerolo. In presenza di trigliceridemia superiore ai 2000 mg/dl o segni di pancreatite acuta la migliore strategia terapeutica non è ancora ben definita; si va da un approccio conservativo (sospensione dell'asparaginasi, osservazione, dieta alipidica) a terapie più aggressive tra cui la plasmaferesi, e più recentemente, l'insulina in infusione continua. Quest'ultima si è dimostrata in grado di ridurre il livello sierico dei trigliceridi attraverso la stimolazione dell'attività della LPL¹⁻⁵. Descriviamo un caso di ipertrigliceridemia molto severa insorta durante la chemioterapia di induzione per LLA e trattata con successo con plasmaferesi ed insulina in infusione endovenosa continua.

CASO CLINICO: Un bambino di origine asiatica (Bangladesh) di 4 anni alla diagnosi di LLA, ad immunofenotipo common, presentava una colesterolemia di 172 mg/dl e trigliceridemia di 177 mg/dl. Iniziato il trattamento antitumorale di induzione IA, secondo *Protocollo AIEOP-BFM ALL 2009*, durante la prefase steroidea si è osservata una modesta e transitoria ipercolesterolemia (fino a 247 mg/dl) ed ipertrigliceridemia (fino a 745 mg/dl), regredite spontaneamente. Al G+8 *prednisone good responder*, *DNA index* 1.14 ed al G+15 *MMR 0%*, per cui è stato eseguito random R1 con sua allocazione nel braccio sperimentale (2 Daunorubicine). Al G+ 33 è stata raggiunta la remissione completa di malattia. All'inizio della fase di Induzione IB, a distanza di 11 giorni dalla somministrazione della 2° dose di PEG-Asparaginasi e di 1 giorno dalla sospensione completa della terapia steroidea, si è assistito alla comparsa, in pieno benessere, di siero lattescente per campione lipemico con una rilevante ipertrigliceridemia (16.620 mg/dl) associata ad ipercolesterolemia (totale 1.148 mg/dl, HDL 20 mg/dl). In anamnesi familiare è emersa solo in quel momento una ipercolesterolemia paterna in trattamento con statine. Quale provvedimento terapeutico immediato si è proceduto ad iperidratazione con soluzione glucosalina associata ad insulina per via sottocutanea oltre che all'inizio di una dieta alipidica. Dopo 12 ore, non essendo stato possibile proseguire il trattamento con insulina, per la marcata tendenza ad ipoglicemie, e non essendosi osservato un soddisfacente calo della trigliceridemia (15600 mg/dL), si è deciso di sottoporre il bambino ad una seduta di plasmaferesi: mediante separatore cellulare COMTEC FRESENIUS-KABI è stato scambiato 1 volume di plasma con albumina in soluzione fisiologica al 4%. La procedura è stata nel complesso ben tollerata, eccezion fatta per la tendenza ad ipoglicemia. A distanza di sole 24 ore si è assistito ad un significativo calo del livello ematico di trigliceridi (5080 mg/dl) e di colesterolo (549 mg/dl) ma, visto la persistenza di marcata trigliceridemia, si è iniziata terapia con insulina in infusione continua endovenosa. La dose iniziale di insulina è stata pari 0,04 U/kg/h per le prime 24 ore ed a scalare nelle ore successive e si è associata soluzione glucosalina ad una concentrazione di glucosio compresa tra il 10 ed il 17%, a seconda del profilo glicemico (target glicemico superiore a 60 mg/dl). Tale terapia è stata sospesa dopo 36 ore essendosi verificato un rapido calo dei livelli ematici di trigliceridi e colesterolo, rispettivamente a 890 mg/dl e 390 mg/dl. Durante il ricovero il bambino non ha mai presentato sintomatologia di rilievo, in particolare non addominalgia né alterazione degli enzimi pancreatici. A distanza di 6 giorni dall'ingresso i livelli ematici di trigliceridi e colesterolo sono risultati pari rispettivamente a 431 mg/dl e 342 mg/dl. La chemioterapia è stata continuata secondo il protocollo di Induzione IB. Le prove di emocoagulazione, non effettuabili per campione lipemico per i primi giorni, hanno mostrato a distanza di 3 giorni dal ricovero una modesta ipofibrinogenemia (121 mg/dl) con severa deplezione di antitrombina III (24%) e PT ed aPTT nella norma. Il bambino ha proseguito anche a domicilio una rigorosa dieta ipolipidica e 20 giorni dopo l'evento si è ottenuta la normalizzazione del profilo lipemico.

CONCLUSIONI: Seppur siano già stati riportati in letteratura casi di ipertrigliceridemia indotta da asparaginasi/steroidi non vi è finora nessuna segnalazione di rialzo così marcato del livello ematico di trigliceridi (>10.000 mg/dl). Per il nostro caso si può ipotizzare che una predisposizione genetica abbia potuto giocare un ruolo favorente (familiarità positiva per iperlipemia). Tale livello di trigliceridemia non si è tuttavia associato ad alcuna sintomatologia clinica, in particolare non addominalgia né alterazione degli enzimi pancreatici. Di fronte a livelli

così elevati rimane da definire quale sia l'approccio terapeutico ottimale. In letteratura è descritto l'uso di plasmaferesi quale metodo efficace nel rimuovere rapidamente i trigliceridi dal torrente ematico (riportata una riduzione del 66% del livello ematico dei trigliceridi dopo 1 sola procedura) in pazienti con severa ipertrigliceridemia non responsivi ad altri trattamenti e/o critici e spesso sintomatici. Nel nostro caso la procedura plasmaferetica si è confermata sicura ed efficace, avendo determinato un immediato e significativo calo della trigliceridemia (dell'ordine di 10.000 mg/dl), per cui, a nostro avviso, dovrebbe essere presa in considerazione in tutti i casi con ipertrigliceridemia severa (>10000 mg/dl). Un'ulteriore notevole riduzione della trigliceridemia (da 5080 a 890 mg/dl in 36 ore) è stata successivamente ottenuta con l'impiego di insulina in infusione continua; quest'ultima potrebbe, quindi, rappresentare la terapia di prima scelta nelle condizioni di ipertrigliceridemie con livelli ematici <10.000 mg/dl. Un attento monitoraggio del profilo lipidico durante il trattamento con asparaginasi, soprattutto se associata a terapia steroidea, rimane fondamentale per poter intervenire tempestivamente.

Bibliografia:

1. V Ridola, PS Buonomo, P. Maurizi, et al. Severe acute hypertriglyceridemia during acute lymphoblastic leukemia induction successfully treated with plasmapheresis. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 50:378-380
2. G Scaturro, F Di Marco, A Grigoli et al. L'ipertrigliceridemia da L-asparaginasi e steroidi in bambini affetti da LLA e LNH. *Pediatric Reports* 2012; 4:s1, 66.
3. EM Kfoury-Baz, RA Nassar, RF Tanios, et al. Plasmapheresis in asparaginase-induced hypertriglyceridemia. *Trasfusion* 2008;48: 1227-1230.
4. P Solano-Pàez, JA Villegas, I Colomer et al. L-Asparaginase and steroids-associated hypertriglyceridemia successfully treated with plasmapheresis in a child with acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2011; 33: 122-124.
5. EB Lawson, M Gottschalk, DE Schiff. Insulin infusion to treat severe hypertriglyceridemia associated with pegasparaginase therapy A case report. *J Pediatr Hematol Oncol* 2011; 33: 83-86.

L042

RECIDIVE ISOLATE EXTRAMIDOLLARI DI LEUCEMIA LINFOLASTICA ACUTA IN SEDI INUSUALI. DESCRIZIONE DI TRE CASI

F. Di Marco, S. Tropia, A. Grigoli, D. Russo, Ottavio Ziino, P. D'angelo

UO di Oncoematologia Pediatrica, Arnas Civico e Di Cristina, Palermo, Italy

Le recidive extramidollari isolate di Leucemia Linfoblastica Acuta (LLA) sono rare e, nella maggior parte dei casi, localizzate a livello del sistema nervoso centrale o in sede testicolare. Descriviamo i casi di tre bambini con LLA che hanno presentato recidive extramidollari isolate tardive in sedi inusuali: una in sede renale, una nella loggia parotidea ed una in sede ovarica e paravertebrale.

PAZIENTE 1: Maschio, all'età di 6 anni diagnosi di LLA common, trattato secondo il protocollo AIEOP-BFM-LLA 2000 fascia MR (assenza di traslocazioni, prednisone good responder (PGR), MRM positiva a gg + 78 <5x10⁻⁴). Dopo un anno dallo stop terapia un'ecografia addominale evidenzia tre formazioni in sede renale sinistra la maggiore delle quali di 5.5 cm di diametro ed una quarta formazione in sede pelvica di 6.8 cm. La biopsia della massa renale documenta la presenza di una recidiva locale isolata (BM e PL negative). Viene quindi iniziata chemioterapia secondo il protocollo LLA REC 2003. Allo scopo di consolidare la seconda remissione, in assenza di un donatore familiare HLA-identico ed in considerazione della natura extramidollare della recidiva, il paziente viene sottoposto a trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche (condizionamento con Ara-c 3 gr/m² e TBI); successivamente il paziente viene avviato a chemioterapia di mantenimento a 4 farmaci secondo protocollo AIEOP LLA 9503 per una durata totale di due anni dalla recidiva. A distanza di un mese dal II stop terapia nuova recidiva isolata documentata in sede paravertebrale sinistra. Il paziente inizia chemioterapia con etoposide, vincristina e desametasone ed ottiene una terza remissione. Ma dopo 8 mesi presenta una terza recidiva questa volta midollare e muore dopo 6 mesi per progressione di malattia.

PAZIENTE 2: Femmina, all'età di 14 anni diagnosi di LLA com-

mon trattata secondo Protocollo AIEOP-BFM-LLA 2000 fascia MR (no traslocazioni, PGR, MRM positiva a gg + 78 <5x10⁻⁴). Dopo 29 mesi di remissione presenza di recidiva midollare che viene trattata, in accordo con il protocollo LLA REC 2003 S2, con chemioterapia e trapianto di midollo dalla sorella HLA-identica (condizionamento con TBI, thio-tepa e ciclofosfamide). Profilassi della GVHD: ciclosporina. Attecchimento in 12 giornata. Subito dopo l'attecchimento presenza di GVHD epatica di grado II, assenza di GVHD cronica. Chimerismo a 1, 3, 6 e 12 mesi dal trapianto 100% donatore. A distanza di 2 anni dal trapianto presenza di tumefazione della loggia parotidea sinistra; delle dimensioni di 6 cm. La biopsia ecoguidata documenta una recidiva locale di LLA (BM e PL: negativi). Chimerismo sul midollo: full donor. Viene quindi ripresa chemioterapia secondo il protocollo LLA REC 2003 S2, la paziente viene, inoltre, sottoposta a radioterapia locale (dose totale 12 Gy). A distanza di 7 mesi dalla seconda recidiva la paziente presenta dolori articolari, l'aspirato midollare documenta la terza recidiva di LLA, viene quindi iniziata chemioterapia, ma muore per sepsi dopo il primo ciclo di terapia.

PAZIENTE 3: Femmina, all'età di 7 anni diagnosi di LLA common, trattata secondo protocollo AIEOP-BFM-LLA 2000 fascia MR (PGR; R1 DXM; R2 Prot II; MRD Tp1: Neg; Tp2 Neg). Dopo 43 mesi di remissione continua, la paziente presenta tumefazione palpabile in sede pelvica. La massa viene asportata chirurgicamente, l'esame istologico ed immunostochimico documentano la recidiva di LLA isolata (BM e PL negative). La paziente inizia chemioterapia e radioterapia locale secondo protocollo AIEOP REC 2003 S2. Per consolidare la seconda remissione la paziente viene sottoposta a trapianto autologo di cellule staminali periferiche (condizionamento con Busulfano e Ciclofosfamide) e successivamente a terapia di mantenimento. Dopo 16 mesi di mantenimento si rileva la presenza di tumefazione in sede paravertebrale destra. La RMN e la PET confermano la presenza di una massa fusiforme con estensione cranio-caudale di circa 13 cm. La biopsia documenta la seconda recidiva isolata. L. Per tale motivo è stato somministrato un ciclo CLOVE, un ciclo R1 e R2 senza risposta clinica. La rivalutazione radiologica della massa eseguita in RMN ha mostrato un ulteriore incremento volumetrico della quota tissutale recidivata. Al momento la paziente sta praticando chemioterapia secondo protocollo Ia modificato (VP16 150 mg/mq in sostituzione della Daunomicina) e ha effettuato radioterapia a livello del tratto lombosacrale (dose totale di 24 Gy).

CONCLUSIONI: Le recidive isolate extramidollari in sedi inusuali di LLA sono eventi rari che pongono oggettivi difficoltà di trattamento. I nostri casi sono stati trattati con strategie terapeutiche aggressive, ma la risposta clinica è insoddisfante per l'alta tendenza alla recidiva anche in altre sedi. Anche dal punto di vista biologico non ci sono elementi noti che conferiscono ai blasti leucemici una specifica attitudine all'invasione in sedi extramidollari. Dall'analisi dei casi riportati nella letteratura internazionale si conferma la rarità delle recidive isolate extramidollari in sedi diverse da SNC e testicolo, la loro eterogeneità biologica ed aggressività clinica. Sarebbe utile una raccolta di questi casi su larga scala per ricercare eventuali caratteri biologici specifici al fine di individuare gli approcci terapeutici ottimali per questo tipo di recidive che si presentano a prognosi severa.

L043

METODICHE DI MISURAZIONE DEI LIVELLI PLASMATICI DI METHOTREXATE: QUALI E QUANDO UTILIZZARLE?

L.Di Maio,¹ S. Casagrande,¹ G.M. Ferrari,¹ M.V. Perlangeli,² M. D'Incalci,³ M. Zucchetti,³ S. Castiglioni,⁴ E. Brivio,¹ M. Pasetti,¹ L. Longoni,¹ A. Sala,¹ C. Rizzari¹

¹Clinica Pediatrica, Ospedale San Gerardo, Università degli Studi di Milano Bicocca, Monza (MB); ²Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Settore Cromatografia-Tossicologia-Farmaci, Ospedale San Gerardo, Monza; ³Dipartimento di Oncologia; ⁴Dipartimento Ambiente e Salute, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, IRCCS, Milano, Italy

INTRODUZIONE: L'infusione di alte dosi di methotrexate (HD-MTX), definite come dosi >1gr/m², può essere associata a tossicità in più del 10% dei pazienti. La gravità di tali effetti dipende sia dal dosaggio che dalla durata dell'esposizione al farmaco. Il tasso di mortalità tra i soggetti con tossicità grave è riportato essere fino al 6%¹ e prevalentemente legato alla mancata eliminazione del MTX ed al suo conseguente accumulo a livello corporeo. Per tale motivo viene sempre asso-

ciata una rescue con acido levo-folinico, che favorisce la metabolizzazione del MTX limitandone l'effetto sulle cellule sane. Recentemente l'enzima ricombinante carbosiopeptidasi G2 (CPDG2) è stato autorizzato all'utilizzo anche in età pediatrica per i casi in cui si determinino livelli plasmatici tossici di MTX, in particolare se concomita insufficienza renale acuta (creatinina ≥ 1.5 x UNL). La CPDG2, enzima di derivazione batterica, idrolizza rapidamente il farmaco nel metabolita inattivo acido 2,4-diamino-N10-metilptericoico (DAMPA).²

CASO CLINICO: Viene riportato il caso di un paziente di 16 anni, obeso (kg 120, altezza 183 cm 90°percentile, BMI reale 35,83; superficie corporea: reale 2,46 mq, ideale 2,2 mq), affetto da leucemia linfoblastica acuta (LLA), t(9;22) positiva, trattato secondo il protocollo EsPhALL (European Intergroup Study on postinduction treatment of Philadelphia positive ALL). All'inizio del primo blocco HR1 il paziente si presentava in buone condizioni generali e con esami ematochimici nella norma. Veniva iniziata iperidratazione con alcalinizzazione delle urine prima della somministrazione di HD-MTX (5 gr/mq in 24 ore). L'infusione del farmaco veniva sospesa dopo 20 ore dall'inizio per comparsa di addominalgia, vomito ed incremento della creatinina a 1.9 mg/dl (somministrati 8.5 gr di MTX dei 10 gr previsti). La methotrexemia alla 21° ora era pari a 96.85 µmol/L. Veniva incrementata l'idratazione (da 3000 a 4000 ml/mq/die e veniva associata terapia diuretica; il dosaggio dell'acido levo-folinico veniva modificato sulla base del nomogramma suggerito dal protocollo (45 mg/m²/dose ogni 6 ore). La methotrexemia della 42° ora era pari a 40 µmol/L (Tabella 1). In considerazione dei livelli plasmatici di MTX persistentemente elevati e dell'insufficienza renale, veniva somministrata CPDG2 (30 unità/Kg ev). La methotrexemia della 69° ora era 7.41 µmol/L e per tale motivo veniva somministrata una seconda dose di CPDG2 (15 unità/kg ev). Poiché i livelli di methotrexemia della 132° ora (4,74 µmol/L) non mostravano ulteriori riduzioni e nonostante il proseguimento della rescue con acido levo-folinico alla dose di 50 mg/m² ogni 6 ore, si decideva di misurare il livello plasmatico di MTX non utilizzando ulteriormente il dosaggio immunologico tramite fluorescenza polarizzata (FPIA), metodica abitualmente usata nel nostro laboratorio. Con questo metodo viene misurata la quantità di analiti mediante formazione di complessi anticorpo - antigene, (costituito quest'ultimo dal MTX o dal suo metabolita DAMPA). È noto infatti che dopo la somministrazione di CPDG2, il DAMPA determina cross-reattività con conseguenti interferenze di lettura e sovrastima del livello di MTX. Nel nostro caso si decideva di utilizzare la cromatografia liquida interfacciata alla spettrometria di massa (LC-MS/MS) che misura invece piccole molecole a differenti masse ed è in grado di discriminare MTX dai suoi metaboliti attivi ed inattivi (7OH-MTX, DAMPA, idrossiDAMPA) legati alla CPDG2. L'applicazione di tale metodica permetteva, nel nostro caso, di ottenere un valore di methotrexemia di 0.765 µmol/L. Per tale motivo veniva ridotta e sospesa la somministrazione di acido levo-folinico.

Tabella 1.

Ora	MTXemia	CPDG2	MTXemia	7idrossiMTXemia
Metodo	FPIA		LC-MS/MS	LC-MS/MS
21°	96.85			
31°	81.82			
42°	40.06	30 U/kg		
48°	10.72			
54°	7.39			
69°	7.41	15 U/kg		
81°	7.32			
93°	6.89			
102°	5.98			
114°	5.81		0.355	0.41
132°	4.74			

CONCLUSIONI: Il caso riportato evidenzia l'importanza di poter ricorrere a metodiche analitiche più specifiche dopo somministrazione di CPDG2. La FPIA è una metodica affidabile in caso di rescue con acido levo-folinico, ma non è in grado di distinguere, dopo utilizzo di CPDG2, il metabolita inattivo DAMPA dal metabolita attivo; la LC-

MS/MS, invece, è invece in grado di discriminare i due metaboliti e permettere pertanto la rescue più adeguata.

Bibliografia:

1. Patterson DM, Lee SM. Glucarpidase following high-dose methotrexate: update on development. *Expert Opin Biol Ther.* 2010 Jan;10(1):105-11.
2. Widemann BC, Adamson PC. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist.* 2006 Jun;11(6):694-703

L044

SINDROME EMOFAGOCITICA IN PAZIENTE IN CORSO DI TRATTAMENTO PER LLA PHILADELFA POSITIVA

F. Corongiu, L. Gaudi Megnetto, A. Nonnis, R. Mura

SC di Oncoematologia Pediatrica, Ospedale Microcitemico ASL8, Cagliari, Italy

PREMESSA: Le sindromi emofagocitiche sono immunodeficienze con severa sindrome iperinflammatoria caratterizzate da febbre, citopenia, epatosplenomegalia ed emofagocitosi associate ad una varietà di condizioni: infezioni, malattie autoimmuni, neoplasie. Le forme familiari riconoscono alla loro base mutazioni genetiche eterogenee (PRF1, UNC13D, STX11, STXBP2) che risultano in un difetto della citotossicità cellulare.

CASO CLINICO: M.I., femmina, 15 anni, affetta da LLA Common, riarrangiamento molecolare per la t(9;22) breakpoint m-Bcr p190, viene arruolata nel protocollo CA 180-372. Prednisone good responder, inizia terapia con Dasatinib a 60mg/m² al giorno +15 in associazione a chemioterapia di Induzione. Non eleggibile a TMO (MRD negativa alla fine della Induzione), prosegue il trattamento con Dasatinib e chemioterapia a blocchi. Al termine del blocco HR3 la ragazza presenta enterocolite grado 3 (coprocultura positiva per Candida albicans, ricerca Mannano sierico positiva) e sepsi polimicrobica con concomitante versamento ascitico e pleurico bilaterale, deficit di attività protidosintetica epatica, coagulopatia e importante enterorragia. Sospende la somministrazione di Dasatinib, inizia terapia antibiotica, antifungina e terapia di supporto. Nonostante rapida negativizzazione delle emocolture e lento miglioramento del quadro generale e addominale, presenta iperpiressia persistente con indici di flogosi elevati, aumenti di gamma GT e fosfatasi alcalina. Gli esami strumentali eseguiti evidenziano ispessimento della parete intestinale, micronoduli polmonari e minute ipodensità spleniche ed epatiche che suggeriscono diagnosi di Candidiasi disseminata probabile. Si prosegue con terapia antifungina, ma dopo 2 mesi la paziente continua a presentare iperpiressia, compromissione delle condizioni generali (sintomatologia dolorosa addominale con irregolarità dell'alvo e sintomatologia osteoarticolare diffusa), progressiva citopenia trilineare, aumento della ferritina (6272 ng/ml) ed elevati valori di IL 2-solubile (2396 U/l). Alla TC si osserva miglioramento del quadro toracico con scomparsa delle lesioni nodulari polmonari e riduzione del numero delle lesioni spleniche ed epatiche. L'aspirato midollare (sempre negativa l'analisi molecolare del riarrangiamento Ig/TCR) mostra figure di emofagocitosi. Nel sospetto di sindrome emofagocitica viene effettuato studio funzionale sui linfociti che mostra ridotta espressione di perforina (41%). L'analisi molecolare rivela la presenza della mutazione in eterozigosi del gene PRF1 c601C>ApP201T. Considerato il quadro generale, dopo iniziale uso di solo steroide, si inizia terapia con desametasone e VP16 in associazione alla terapia antimicotica. La risposta alla terapia appare al momento soddisfacente. La febbre è scomparsa, con netto miglioramento delle condizioni cliniche, riduzione degli indici di flogosi e della ferritinemia, miglioramento della citopenia (persiste piastrinopenia). Non sono attualmente più visibili le lesioni spleniche alla diagnostica per immagini; le localizzazioni epatiche sono in ulteriore riduzione. Il programma previsto è riprendere terapia con Dasatinib in associazione a chemioterapia di Reinduzione.

CONCLUSIONI: Questo caso ha presentato aspetti peculiari sia dal punto di vista patogenetico che della gestione diagnostica e terapeutica, in considerazione anche della comparsa in paziente in trattamento con inibitore della tirosin-chinasi per LLA Ph+. A fronte di migliaia di pazienti trattati con Dasatinib sono attualmente segnalati due soli casi di Sindrome Emofagocitica, uno dei quali secondario ad infezione virale. Appare rilevante, in relazione alla sindrome da iperattivazione macrofagica associata all'infezione fungina, la presenza di mutazione eterozigote per deficit di perforina.

L045

CURE DI FINE VITA IN OSPEDALE: VISSUTI E DIFFICOLTÀ DELL'EQUIPE

I. Rosini

Ospedale Civile "Santo Spirito", Pescara, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Gli infermieri curano e fanno terapia: una terapia che non è fatta di sole tecniche: gli infermieri forniscono infatti, molteplici interventi terapeutici, manipolando l'ambiente, educando, dando conforto, mettendo in atto interventi fisici e stando accanto al paziente. Tutto ciò comporta un enorme impegno, che si amplifica quando tale attività è svolta in reparti come quello di Oncoematologia Pediatrica, poiché la condizione già difficile di per sé aumenta con la giovane età del paziente. In questi centri si prevede personale infermieristico notevolmente qualificato e motivato, con elevato livello di conoscenze tecnico-assistenziali, in grado di prendersi cura di bambini, adolescenti, ma anche dei genitori che li accompagnano in questa difficile esperienza di malattia. Da molti studi vi evince come l'esaurimento emozionale coinvolga l'infermiere che assiste il paziente nelle cure di fine vita. L'obiettivo dello studio è quello di individuare se gli infermieri che assistono in fase terminale i bambini affetti da patologie tumorali riescano a percepire i loro bisogni e quelli delle loro famiglie.

METODI: Studio spontaneo prospettico, sperimentale, no profit, rivolto al personale infermieristico. Lo studio è stato condotto mese di Agosto 2011, presso l'Unità Operativa di Onco-Ematologia Pediatrica.

CARATTERISTICHE DEL CAMPIONE: Al Focus group hanno partecipato dieci infermieri con un'età anagrafica media di 39 anni e 8 mesi, un'anzianità lavorativa media di 15 anni e 2 mesi e un'anzianità media di servizio presso la U.O. di 9 anni e 4 mesi. Al fine di indagare in maniera specifica le emozioni, la percezione dei bisogni dei piccoli pazienti e delle loro famiglie, e le difficoltà degli infermieri nell'assistenza al bambino terminale, è stato condotto un focus group di due ore, a cui hanno partecipato dieci infermieri dedicati all'assistenza in oncoematologia pediatrica. L'osservatore è stato uno psicologo. Si è scelta la strada del coinvolgimento diretto degli operatori facendoli sentire soggetti attivi, esperti e protagonisti del mondo che vivono quotidianamente. L'analisi dei dati ha previsto, secondo quanto definito dalla Grounded Theory, la trascrizione delle registrazioni, seguita da procedimenti di codifica e definizione di categorie concettuali cui ha seguito la stesura del resoconto (Cataldi, 2009). Per condurre la discussione è stata predisposta una traccia d'intervista semi-strutturata che prevedeva di indagare le emozioni e i vissuti degli infermieri, i bisogni del bambino terminale e della sua famiglia percepiti dagli infermieri, i bisogni formativi del personale infermieristico ed eventuali proposte per migliorare l'assistenza.

RISULTATI: La trascrizione è stata analizzata sul piano contenutistico-informativo secondo un procedimento circolare induttivo, che partendo dal confronto continuo delle singole citazioni ha permesso di individuare blocchi concettuali o categorie interpretative. Il resoconto è stato redatto secondo il metodo etnografico riportando le citazioni più rilevanti.

Dall'indagine che è stata trascritta e verbalizzata sono state create sette categorie concettuali:

1. Vissuti ed emozioni
 2. Criticità
 3. Buone prassi
 4. Bisogni del bambino percepiti dagli infermieri
 5. Bisogni della famiglia percepiti dagli infermieri
 6. Bisogni degli infermieri
 7. Proposte
- *I vissuti e le emozioni* prevalenti degli infermieri che si occupano dei bambini come: l'impotenza, l'identificazione, la fuga/distacco, la solitudine, il senso di inadeguatezza. Il frequente contatto con la morte dell'altro e con la sua sofferenza, producono quindi nell'operatore un logorio psicologico rilevante che spesso si concretizza in forme di grave malessere con ripercussioni sulla qualità dell'assistenza prestata.
 - *Le criticità emergenti* classificate in tre livelli: assistenziali, strutturali e formative.
 - *Le buone prassi:* riferite alle buone pratiche attuate o da attuare, e quanto sia fondamentale che l'infermiere ponga la sua attenzione alla relazione come processo che si sviluppa sin dall'ingresso in reparto, inoltre egli configura la fase terminale come ultimo atto di un percorso di cura.

- Nella discussione è stata posta particolare attenzione ai bisogni di tutti gli attori della relazione di cura.

è stata evidenziata una particolare difficoltà nel riconoscere i bisogni dei bambini. La difficoltà più grande è stata di rispondere al bisogno di comprensione del bambino di ciò che sta avvenendo

è d'estrema importanza, tener conto delle reazioni dei genitori che di riflesso possono influire sul comportamento del bambino (paura, ansia, sensazioni di colpa, ...etc). Naturalmente i genitori sono tanto più in grado di sostenere il bambino, quanto più sono "accolti" in reparto, solo in questo modo secondo gli infermieri si riesce a dare sostegno ai genitori nel difficile momento che segue la morte.

è risultata chiara la necessità di apprendere ed acquisire le conoscenze e gli atteggiamenti che consentono all'infermiere di personalizzare l'intervento al piccolo paziente terminale.

CONCLUSIONI: è appropriato che i professionisti approfondiscano la conoscenza scientifica dei fattori che più frequentemente caratterizzano i bisogni di assistenza infermieristica nel malato terminale, ma soprattutto che sviluppino la capacità di riconoscere e rispettare l'individualità di manifestazione del bisogno. La formazione di base non sempre è integrata con le conoscenze teoriche sulle cure di fine vita. A questo proposito sarebbe utile e prioritaria la valutazione dei bisogni di formazione per le cure di fine vita, al fine di ottenere quella professionalità più idonea per curare con efficacia i malati terminali. È stato provato come l'assistenza al piccolo paziente ematologico comprometta lo stato emotivo dell'operatore nella sua sfera psichica, con sentimenti di demoralizzazione e sconfitta, pur non emergendo in modo chiaro quale sia la ragione principale. Si è visto come gli infermieri pur identificando i bisogni del bambino e della loro famiglia, non si sentono preparati ad affrontare situazioni emotivamente stressanti come l'assistenza al bambino oncologico, avvertendo sensazioni di impotenza e desiderio di fuga. Le proposte di cambiamento mirano ad una formazione comunicativa, professionale, etica e sociale più incisiva, riunioni periodiche, progetti che tendono ad incrementare la motivazione professionale e una politica mirata a gestire lo stress che colpisce gli operatori sanitari.

Bibliografia:

- Axia, V. (2004) *Elementi di Psico-Oncologia Pediatrica*. Roma: Carocci Faber.
- Beckstrand, R.L., Callister, L.C. & Kirchoff, K.T. (2006) "Providing a "good death": critical care nurses' suggestions for improving end-of-life care". *American Journal Critical Care*, vol. 15, no. 1, pp. 38-45.
- Bressi, C., Manenti, S., Porcellana, M., Cevales, D., Farina, L., Felicioni, I., Meloni, G., Milone, G., Miccolis, I. R., Pavanetto, M., Pescador, L., Poddigue, M., Scotti, L., Zambon, A., Corrao, G., Lambertenghi-Deliliers, G. & Invernizzi, G. (2008) "Haemato-oncology and burnout: an Italian survey". *British Journal of Cancer*, vol. 98, pp. 1046-1052.
- Cataldi, S. (2009) *Come si analizzano i focus group*. Franco Angeli.
- Elperin, E., Covert, B. & Kleinpell, R. (2005) *Moral distress of staff nurses in a medical intensive care unit*. *American Journal of Critical Care*, vol. 14 no. 6, pp. 523-530.
- Epstein, E. & Delgado, S. (2010) "Understanding and addressing moral distress". *The Online Journal of Issues in Nursing*, vol. 15, no. 3, man 01.
- Epstein, E. G. & Hamric, A. B. (2009) "Moral distress, moral residue, and crescendo effect". *Journal of Clinical Ethics*, vol. 20, no. 4, pp. 330-342.
- Krueger, R. A. & Casey, M. A. (2009) *Focus Groups. A practical Guide for Applied Research*. 4th Edition. Thousand Oaks: Sage Publications.
- Lee, K.J. & Dupree, C. (2008). "Staff experiences with end-of-life care in the pediatric intensive care unit". *Journal of Palliative Medicine*, vol. 11, no. 7, pp. 986-90.
- Robinson, R. (2010) "Registered nurses and moral distress". *Dimensions Critical Care Nursing*, vol. 29, no. 5, pp. 197-202.
- Watts, R., Botti, M. & Hunter, M. (2010) "Nurses' perspectives on the care provided to cancer patients". *Cancer Nursing*, vol. 33, no 2, pp. 1-8.
- Wenzel, J., Shaha, M., Klimmek, R. & Krumm, S. (2011) "Working through grief and loss: oncology nurses' perspectives on professional bereavement". *Oncology Nursing Forum*, vol. 38, no. 4, pp. 272-282.

L046

NEUTROPENIA AUTOIMMUNE: CASISTICA DEGLI ULTIMI 10 ANNI DEL CENTRO AIEOP DI PALERMO

A. Macaluso,¹ G. Puccio,² P. Farruggia,³ A. Trizzino,³ F. Di Marco,³ C. Mosa,³ P. D'Angelo³

¹Scuola di Specializzazione in Pediatria, Università di Palermo, Palermo; ²Clinica Pediatrica, Università degli Studi, Palermo; ³UO di Oncoematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera Civico, Di Cristina e Benfratelli, Palermo, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La neutropenia è un disordine ematologico caratterizzato dalla riduzione nel numero assoluto di neutrofili (ANC) al di sotto del limite previsto secondo età e razza. Nella razza caucasica il limite inferiore di ANC nei pazienti di età < 1 anno è 1000/mmc. Al di sopra dell'anno di vita è 1500/mmc. La neutropenia viene classificata come lieve se ANC è 1000-1500/mmc; moderata se 500-1000, e grave se < 500/mmc. Quella autoimmune è la forma di neutropenia primitiva più frequente in età pediatrica, ma non esiste ancora una nomenclatura universalmente accettata. Abbiamo, pertanto, individuato tre sottogruppi: 1) la neutropenia autoimmune primitiva dell'infanzia o di tipo pediatrico (AIN-PT), che si caratterizza per esordio precoce (quasi sempre prima dei 4 anni), carico infettivologico medio-lieve e risoluzione spontanea in più del 95% dei casi; 2) la neutropenia autoimmune tipo adulto (AIN-AT) che si presenta in genere nei bambini più grandi (oltre che negli adulti) e si associa a un carico infettivologico più "pesante" e, nella gran parte dei casi, ad altre manifestazioni autoimmuni; tale neutropenia è spesso indicata in letteratura come "neutropenia secondaria", ma, a nostro parere, tale definizione è inadeguata in quanto non permette di distinguerla da altre e più frequenti, "neutropenie secondarie" (da farmaci, in corso di neoplasie, postinfettive etc); 3) la neutropenia idiopatica dell'infanzia (IN), cioè quella neutropenia "isolata", che, secondo le LG AIEOP, si accompagna a negatività, verificata almeno 4 volte, del test indiretto per la ricerca degli anticorpi anti-neutrofilo; in larghissima parte si tratta di casi di AIN-PT in cui, a causa della bassa sensibilità dei test diagnostici (ovvero per l'alto numero di falsi negativi) non si riesce a fare diagnosi (e la diagnosi di AIN-PT verrà poi in qualche modo definita a posteriori, dopo, cioè, l'avvenuta guarigione). In passato questa neutropenia era anche definita "neutropenia cronica benigna". Abbiamo eseguito uno studio retrospettivo sui pazienti con diagnosi di neutropenia autoimmune (AIN-PT + AIN-AT) o idiopatica seguiti presso l'U.O. di Oncoematologia Pediatrica dell'A.R.N.A.S. Civico di Palermo dall'1.1.2002 al 31.12.2012. L'obiettivo dello studio è descrivere ed analizzare i più importanti parametri epidemiologici relativi alla presentazione e al decorso nonché di verificare l'efficacia dei test diagnostici disponibili e le modalità di guarigione.

METODI: La neutropenia è stata classificata come autoimmune (AIN-PT ovvero AIN-AT) in presenza di un test indiretto positivo per anticorpi anti-neutrofilo ed idiopatica in presenza di almeno 4 test indiretti negativi. Come *data di esordio della neutropenia* è stata identificata quella del primo emocromo patologico. La *data di diagnosi* è stata identificata come quella di positività del test indiretto (nel caso delle AIN) o quella di negatività del 4° test indiretto (per le IN). In tutti i pazienti la ricerca di anticorpi anti-neutrofili è stata effettuata mediante citofluorimetria. Abbiamo escluso tutti i pazienti con neutropenia congenita, neutropenia ciclica, e i casi di neutropenia secondaria a infezioni o somministrazioni di farmaci. Abbiamo valutato la presenza di episodi infettivi e abbiamo considerato rilevanti solo quelli che hanno comportato l'ospedalizzazione. La remissione è stata definita come normalizzazione della conta dei neutrofili circolanti per più di tre mesi.

RISULTATI: Abbiamo analizzato una popolazione di 59 pazienti affetti da neutropenia: 24 femmine (40.68%) e 35 maschi (59.32%), di cui 40 (67,8%) presentavano una AIN-PT, 8 (13,56%) una AIN-AT e 11 (18,64%) una IN. Distribuzione per sesso: nella AIN-PT 13 maschi e 27 femmine; nella AIN-AT 4 maschi e 4 femmine, nella IN 5 maschi e 6 femmine. Abbiamo valutato l'età di insorgenza per singola popolazione: nella AIN-PT l'insorgenza è precoce con una età media di circa nove mesi e range compreso fra i 9 giorni e 3 anni e mezzo (dato perfettamente in linea con quanto riportato in letteratura); nelle AIN-AT l'età di esordio è significativamente più elevata con una media di 9 anni e un range da 20 mesi a 17 anni; infine per le IN l'età media d'insorgenza è 16 mesi con un range da 54 giorni a 41 mesi. Abbiamo valutato il numero di neutrofili all'esordio nei diversi gruppi, senza rilevare sostanziali differenze: nella AIN-PT la media è 603/mmc (range 110-1490), nella AIN-AT è 547/mmc (range 300-850), e nella IN è 420/mmc (range 260-600). La durata media della malattia in anni, intesa come

intervallo di tempo dall'esordio all'ultimo controllo o alla risoluzione, è di 1 anno (range 0,12 - 3,9) nelle AIN-PT. Le AIN-AT presentano una durata significativamente maggiore, con una media di 8 anni (range 2,8 - 20), mentre le IN hanno una durata media di 1,13 anni (range 0,15 - 3,7). La risoluzione della neutropenia è avvenuta nel 68% della popolazione in studio: il restante 32% presenta ancora ANC patologica. Abbiamo verificato come una certa quota dei pazienti affetti da AIN-PT o IN guarisce in modo "improvviso", mentre una quota inferiore, dopo aver presentato un emocromo normale, presentava un periodo (mediamente inferiore ai 3 mesi) in cui i valori della ANC si potevano presentare sia normali che patologici. In letteratura non è mai stato descritto prima d'ora questo fenomeno. Abbiamo definito il primo tipo di guarigione "improvvisa" e il secondo "graduale". Su 11 pazienti con IN 8 (72%) hanno presentato una risoluzione, 5 di tipo improvviso e 3 di tipo graduale. Dei 40 pazienti affetti da AIN-PT 32 (80%) sono andati incontro a risoluzione, il 66% (22) in modo improvviso ed il restante 34% (11) in modo graduale. Un dato significativo ($p = 0.00052$), mai riportato in letteratura, è risultato essere il numero dei linfociti all'esordio nelle tre sottocategorie. La AIN-AT infatti presenta infatti un numero di linfociti notevolmente più basso rispetto alle altre due neutropenie, mentre, a conferma che si tratta della stessa patologia, non sono state riscontrate differenze tra AIN e IN. Nella AIN-AT la media dei linfociti all'esordio è 1104/mmc (range 300 - 3000), nella AIN-PT è 5290/mmc (range 2150 - 13000), nella IN è 3627/mmc (range 900 - 5490). A riprova del fatto che si tratta di una patologia differente, tutte le AIN-AT si associano ad altre manifestazioni autoimmuni (Tabella 1), mentre questa associazione non è mai stata riscontrata nelle AIN-PT. Fra le 8 AIN-AT ben 6, peraltro, soddisfano i criteri per essere definiti Sindromi di

Evans; da sottolineare che, pur se 5/6 presentavano un test di Coombs positivo, solo in un caso, abbiamo rilevato emolisi clinicamente evidenti (nell'ambito di una citopenia trilineare). Per quanto riguarda le infezioni, nella popolazione affetta da AIN-AT sono stati segnalati 3 accessi sottocutanei (in 2 pazienti), mentre 3 (27%) dei pazienti affetti da IN e 26 (65%) dei pazienti affetti da AIN-PT hanno presentato almeno un'infezione che ne ha reso necessaria l'ospedalizzazione. La maggior parte di questi quadri infettivi era legata a flogosi delle alte vie, gastroenteriti, otiti e piodermiti; segnalate anche 2 polmoniti. In 5 pazienti (di cui 4 erano nati pretermine con neutropenia esordita precocemente) si è verificato un episodio di sepsi.

CONCLUSIONI: La AIN-PT è una malattia quasi sempre non grave, cui però bisogna pensare, soprattutto quando bambini piccoli (quasi sempre < 4 anni di vita) presentano infezioni ricorrenti; l'unica eccezione, riguardo il rischio infettivologico, sembra interessare, in questo gruppo di pazienti, i nati pretermine che, per lo più durante il prolungato ricovero in UTIN, possono andare incontro a sepsi (ed è verosimile che la neutropenia costituisca un fattore di rischio che si aggiunge a quelli già normalmente associati alla prematurità). L'AIN-PT non differisce praticamente in nessun aspetto dalle IN, a riprova del fatto che le IN sono in realtà solo AIN-PT in cui non è possibile trovare una positività degli autoanticorpi. Le AIN-AT presentano invece caratteristiche cliniche che le differenziano notevolmente dalle altre due forme. Infine, prima di considerare il bambino guarito da una AIN-PT è bene ripetere l'emocromo almeno 2-3 volte a distanza di qualche settimana in quanto circa 1/3 dei pazienti presenta una fase transitoria, in cui la neutropenia può riapparire dopo un primo emocromo "normalizzato".

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti con Neutropenia Autoimmune tipo adulto (AIN-AT).

Pz	Sex	Data nascita	Data esordio	Manifestazioni cliniche	Terapia	Autoimmunità
1	F	26/08/2004	26/08/2006	Fisher Evans (PP+GB), epatite autoimmune	Steroidi, CSA	Coombs+
2	M	02/12/1993	04/05/1997	Fisher-Evans (PP+GB)	IGEV, Steroidi, Rituximab	Coombs+
3	F	26/04/2004	28/01/2008	Fisher-Evans (PP+GB), Encefalite autoimmune	IGEV, Steroidi, MMF	Coombs+; ANA 1:80
4	M	23/01/2001	26/11/2002	Fisher-Evans (PP+GB+GR)	IGEV, Steroidi, MMF	Coombs+ASMA 1:40
5	M	16/02/1993	15/04/2010	Fisher-Evans (PP+GB)	IGEV, Steroidi	Coombs+
6	M	18/11/1991	09/09/2002	Fisher-Evans (PP+GB)	IGEV, Steroidi	ANA 1:160
7	F	06/07/1976	20/12/1992	Tiroidite autoimmune	G-CSF, Steroidi	ANA 1:1280, Anti-Tg, AntiTpo
8	F	03/07/2001	13/09/2008	Neutropenia autoimmune isolata	Nessuna	ANA 1:1280

L047

VALUTAZIONE DELL'ANSIA E DEL DOLORE IN PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA PATOLOGIE ONCO-EMATOLOGICHE SOTTOPOSTI A SEDAZIONE PER PROCEDURE INVASIVE

M. Kouakou,¹ M.L. Moleti,¹ G. Rosa,¹ A.M. Testi,¹ F. Giona,¹ A. De Vellis,¹ D. Marzella,¹ G. Palumbo,¹ T. Ceglie,¹ M. Rea,¹ W. Barberi,¹ F. Bilotta²

¹Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università, Roma; ²Anestesia e Rianimazione, Policlinico Umberto I, Roma, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: I pazienti pediatrici con patologie oncoematologiche vengono sottoposti a ripetute procedure invasive diagnostiche e terapeutiche (agoaspirati midollari, ago biopsie osteo-midollari, punture Lombari, biopsie linfonodali). Tali procedure causano dolore e ansia, al punto che il dolore da procedura viene descritto come l'aspetto più sgradevole nella storia di un paziente oncologico. Nella Unità di Ematologia pediatrica della Sezione di Ematologia del Policlinico Umberto I di Roma, sono impiegate tecniche farmacologiche e non farmacologiche allo scopo di evitare per quanto possibile sofferenze psico-fisiche al bambino e ai suoi genitori. Obiettivo di questo studio è valutare l'efficacia del protocollo di gestione di ansia e dolore da procedura invasiva adoperato nel nostro centro.

METODI: A partire dall'Aprile 2012, fino a Febbraio 2013, 62 pazienti pediatrici sono stati seguiti e monitorizzati durante lo svolgimento di un totale di 162 procedure diagnostiche e/o terapeutiche invasive. Il trattamento farmacologico di sedo-analgesia viene effettuato da parte di

un medico specialista in Anestesia e Rianimazione in sala operatoria. Vengono utilizzate due diverse strategie anestesiolgiche: solo sevoflurano (anestetico inalatorio) o propofol (anestetico endovenoso) in associazione a sevoflurano. Alla prima procedura la scelta della strategia anestesiolgica dipende dalla presenza di un accesso venoso centrale o periferico: ai pazienti con ago cannula o catetere venoso centrale vengono somministrati propofol e sevoflurano; per le procedure successive la scelta dell'una o dell'altra viene anche effettuata tenendo conto delle preferenze del bambino, per mantenere alto il livello di compliance. Ai genitori è permesso accedere alla sala operatoria e restare con il bambino, confortarlo fino a quando non si sia addormentato. Terminata la procedura, il bambino è monitorizzato per alcuni minuti in sala operatoria e in un secondo momento ricondotto in reparto o in day hospital, dove potrà risvegliarsi accanto ai genitori. Accanto alla sedo-analgesia è previsto anche l'impiego di tecniche non farmacologiche di terapia/prevenzione dell'ansia e del dolore che coinvolge tutto il personale medico e paramedico e altre figure professionali (terapisti occupazionali, terapisti della psico e neuro motricità, insegnanti, clown) che hanno sviluppato tecniche specifiche al riguardo (distrazione, gioco, rilassamento, respirazione). Prima della procedura e al risveglio è stata compilata da un medico una scheda per la rilevazione oggettiva di distress, la OSBD (Behavioral Observation Scales for Measuring Children's Distress), scala validata composta da 11 categorie comportamentali, a ciascuna delle quali corrisponde un punteggio che va da 0 a 4, dove 4 rappresenta il massimo livello di distress. Dopo il risveglio è stato somministrato al paziente ed al genitore un questionario per la rilevazione soggettiva di ansia, dolore o altri sintomi eventualmente presentati prima o dopo la procedura

RISULTATI: Sono stati arruolati 62 pazienti, di cui 40 maschi e 22

femmine, di età dai 9 mesi ai 16 anni (età mediana 7,5). Dei 62 pazienti arruolati: 44 affetti da LAL in trattamento, 7 affetti da LAL e fuori terapia (in follow-up), 2 affetti da LMC, 1 affetto da Sarcoma Mieloide, 1 affetto da Leucemia Mieloide Acuta, 1 affetto da Leucemia Promielocitica, 2 affetti da Linfoma di Hodgkin, 4 in diagnosi. Per ognuno dei pazienti è stata valutata la storia clinica e il numero di anestesie precedentemente effettuate per procedure diagnostico-terapeutiche e non. I bambini sono stati sottoposti ad agoaspirato midollare, ago biopsia osteo-midollare, puntura lombare singolarmente o contemporaneamente durante la stessa seduta anestesiológica. La rilevazione oggettiva del distress comportamentale preoperatorio effettuata attraverso la OSBD ha riportato un valore medio di 3,75 su una scala da 0 a 28 e su un totale di 162 procedure. Il 34% dei bambini ha riferito di provare ansia/paura prima della procedura medica invasiva. È risultato più alto invece livello di ansia riferita dai genitori (55%). L'85% dei genitori ha giudicato molto utile il trattamento dell'ansia e del dolore con tecniche farmacologiche e non farmacologiche da parte di medici, paramedici e delle altre figure professionali attive in reparto e day-hospital.

CONCLUSIONI: Le linee guida internazionali suggeriscono l'impiego di varie tecniche per il trattamento del dolore da procedura: dalla sedazione superficiale all'anestesia generale. Secondo la nostra esperienza per un ottimale controllo del dolore, è necessaria l'induzione di una sedazione profonda di brevissima durata. Nella nostra esperienza allo scopo di minimizzare il rischio per il paziente i farmaci anestetici sono stati somministrati da un medico specialista in Anestesia e Rianimazione in sala operatoria, per poter disporre di tutte le apparecchiature di monitoraggio cardio-respiratorio. Un programma che miri al contenimento del dolore da procedura non può tuttavia prescindere dal trattamento dell'ansia ad esso associata; l'ansia anticipatoria nella nostra esperienza è stata rilevata in un terzo circa dei bambini; per attenuare l'ansia da procedura, anche se svolta in sedazione, le tecniche non farmacologiche sono un necessario complemento. Il protocollo di gestione dell'ansia e del dolore da procedura invasiva nel paziente pediatrico adoperato nel nostro centro si è dimostrato efficace nel ridurre il fenomeno dell'ansia anticipatoria, con un elevato livello di gradimento da parte di pazienti e genitori. La preparazione alla procedura con il coinvolgimento di altre figure professionali impegnate nella rassicurazione è importante per creare un le condizioni migliori per ridurre al massimo non solo il dolore ma anche l'ansia legata alle procedure ambiente accogliente e familiare per il bambino.

Bibliografia:

- Coté CJ, Wilson S, the Work Group on Sedation AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS and AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY *Guidelines for Monitoring and Management of Pediatric Patients During and After Sedation for Diagnostic and Therapeutic Procedures: An Update*. PEDIATRICS 2006; Volume 118, Number 6.
- Zelter LK, Altman A, Cohen D, et al. *Report of the subcommittee on the management of pain associated with procedures in children with cancer*. Pediatrics 1990; 86:826-31.
- Ellis J, Spanos N. *Cognitive-behavioral interventions for children's distress during bone marrow aspirations and lumbar punctures: A critical review*. Journal of Pain and Symptom Management 1994; 9, 96-108.
- Broome M, Rehwaldt M, Fogg L, *Relationships Between Cognitive Behavioral Techniques, Temperament, Observed Distress, and Pain Reports in Children and Adolescents During Lumbar Puncture* Journal of Pediatric Nursing, Vol 13, No 1 (February), 1998.
- Benini F, Manfredini L, Papacci P, Fanelli F, Barbi E, *Il dolore nel bambino. Strumenti pratici di valutazione e terapia*. Roma 2010.
- Benini F, Trapanotto M, Callegaro A, et al. *Sedation and analgesia for invasive diagnostic and therapeutic procedures: 13 years at the Pain Service of the Padua Pediatric Department*. Ital J Pediatr 2007; 33:183-7.

L048

"TI PRESENTO L'EMOFILIA", IL PROGETTO ENTRA NELLE SCUOLE: PERCORSO DI FORMAZIONE PER GLI INSEGNANTI

E. Cavagna,¹ M. Dotti,¹ L.D. Notarangelo,² S. Cavagnini,² V. Bennato,² S. Guarisco,² F. Porta²

¹Associazione Bambino Emopatico, UO Oncoematologia Pediatrica; ²UO Oncoematologia Pediatrica, Spedali Civili, Brescia, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: L'emofilia è una

condizione cronica a grande impatto emotivo. Gli strumenti di intervento dovrebbero riguardare sia la sfera medica che la vita di relazione del bambino (famiglia, gioco, scuola) al fine di garantirgli una buona qualità di vita. A tale scopo, presso il day hospital di Oncoematologia pediatrica dell'Ospedale dei Bambini, presidio Spedali Civili di Brescia, è stato avviato nel 2009 il progetto pilota "Ti presento l'emofilia", rivolto ai pazienti emofilici e alle loro famiglie. Uno degli obiettivi del progetto è stato quello di promuovere un corso di formazione rivolto agli insegnanti e agli studenti quali interlocutori privilegiati di bambini e adolescenti in età evolutiva, con l'intento di migliorare la qualità di vita dei bambini con emofilia in età scolare implementando un patrimonio di competenze educative in relazione alle problematiche psicologiche riguardanti questa malattia. Un secondo obiettivo è quello di realizzare un lavoro interattivo con gli studenti per comprendere meglio i loro sentimenti, emozioni, pensieri e comportamenti di fronte ad una situazione nuova ed emotivamente pregnante.

METODI: Incontri strutturali della durata di due ore con insegnanti e studenti con l'ausilio di materiale didattico (libretti, DVD); gli incontri sono previsti in ambienti e momenti separati per insegnanti e studenti in modo da dare la possibilità ad entrambe le figure di esprimere al meglio dubbi o problematiche circa l'emofilia e la sua gestione.

RISULTATI: Sono state condotte le prime due esperienze presso due scuole dell'infanzia frequentate da due pazienti del day hospital del Reparto di Oncoematologia Pediatrica, su richiesta delle famiglie e previo consenso delle stesse. La formazione si è articolata in due incontri rivolti agli insegnanti:

- I incontro: "Ti presento l'emofilia: conoscerla per non temerla!"
- II incontro: "Ti presento l'emofilia: non ci spaventi più, sappiamo cosa fare!"

Agli incontri, promossi dal dirigente scolastico, hanno partecipato in maniera attiva gli insegnanti della scuola dell'infanzia, ma anche altre insegnanti di diversi ordini. Da un'analisi qualitativa dei feedback ricevuti dagli insegnanti alla fine degli incontri è emersa la necessità di fornire un ambiente vigile e sicuro ma non iperprotettivo dove il bambino possa sperimentare le proprie competenze ed esplorare l'ambiente senza correre rischi ma senza sentirsi diverso dagli altri bambini. È emersa anche l'importanza di implementare la rete famiglia-scuola-servizi che si occupa dei bambini emofilici e la costante collaborazione tra la famiglia e la scuola.

CONCLUSIONI: L'esperienza finora condotta ha permesso di registrare interesse verso questa iniziativa ed è risultata efficace nel favorire un normale inserimento scolastico. A seguito di questa prima esperienza sono stati avviati, in altre scuole dell'infanzia, analoghi percorsi di formazioni rivolti agli insegnanti per i quali si procederà con una successiva verifica dell'efficacia.

Bibliografia:

- Bertocchi, S., Emiliani, F., Potì, S., Palareti, L. (in press). Diversi regimi terapeutici nel trattamento di bambini affetti da malattia emorragica congenita: processi di scelta e ricadute sul benessere psico-sociale del paziente e della sua famiglia. Psicologia della Salute.
- Bertocchi, S., Potì, S., Emiliani, F., Palareti, L. (submitted). Process of Normalization in Families with Children Affected by Congenital Hemorrhagic Diseases. Haemophilia. Deatrick, J.A., Knafel, K.A., & Murphy-Moore, C. (1999). Clarifying the concept of normalization. Journal of Nursing Scholarship, 31 (3), 209-214.
- Emiliani, F., Palareti, L., & Melotti, G. (2010). Famiglie con bambini affetti da malattia cronica: prospettive di studio e ricerca. Psicologia Clinica dello Sviluppo; 2.
- Goldstein, G., & Kenet, G. (2002). The impact of chronic disease on the family. Haemophilia, 8, 461-465.
- Lancia, F. (2004) Strumenti per l'analisi dei testi. Roma: Franco Angeli.
- Markova, I. (2009). Dialogicità e conoscenza. In A. Polmonari e F. Emiliani (a cura di), Paradigmi delle rappresentazioni sociali. Bologna: Il Mulino.

L049

PRESENTAZIONE INUSUALE DI DUE CASI DI EMOFILIA IN PAZIENTI PEDIATRICI

M. Luciani,¹ G. De Felice,² V. Coletti,² F. Ippolita,² M. Cirillo,² M. Acquila,² M.P. Bicocchi,² P. D'argenio²

¹Dipartimento di Oncoematologia Pediatrica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma; ²Dipartimento Pediatrico Universitario-Ospedaliero, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: L'emofilia è un

raro disordine coagulativo causato da una mutazione genetica X-linked recessiva, che provoca un difetto a carico del fattore VIII della coagulazione.

METODI: Di seguito descriviamo due casi di emofilia A in cui la diagnosi è risultata difficoltosa a causa di una presentazione inusuale.

RISULTATI: Il primo è il caso di una bambina di 10 mesi, condotta presso il nostro ospedale per la comparsa nelle 24 ore precedenti l'osservazione clinica, di una tumefazione latero-cervicale sinistra. In anamnesi venivano riportati ematomi ricorrenti dal II mese di vita, con una negatività dell'anamnesi familiare per disordini della coagulazione. Gli esami ematici mostravano un allungamento del tempo di tromboplastina parziale e una carenza grave di FVIII. In assenza di una diagnosi eziologica nonostante le ripetute indagini radiologiche eseguite (TC ed ecografia) si procedeva all'asportazione chirurgica della lesione che, all'esame istologico appariva compatibile con un ematoma. Le indagini genetiche eseguite su sangue periferico hanno confermato un normale cariotipo XX, ma hanno messo in evidenza una mutazione a livello dell'introne 22 del gene codificante per il fattore VIII, associata a una inattivazione diseguale dei cromosomi X. La mutazione era assente nella madre e nel padre, per cui è stata definita come mutazione de novo. Il secondo caso si riferisce a un neonato che ha presentato convulsioni in terza giornata di vita e che, per tale motivo, è stato sottoposto a una risonanza magnetica dell'encefalo. Quest'ultima ha mostrato la presenza di una lesione vascolare a livello della cisterna quadrigemina di sospetta natura malformativa, che causava compressione del cervelletto e idrocefalo. A causa del progressivo peggioramento delle condizioni cliniche del bambino e associata all'evidenza di un deficit di fattore VIII agli esami ematochimici, è stata eseguita una rivalutazione delle indagini radiologiche, che ha permesso di escludere l'ipotesi di un'anomalia vascolare e ha posto diagnosi di versamento ematico. L'anamnesi familiare del bambino era negativa per difetti coagulativi. Lo studio del cariotipo ha rivelato anche in questo paziente un riarrangiamento a carico dell'introne 22 del gene codificante per il FVIII.

CONCLUSIONI: La diagnosi di emofilia può risultare in alcuni casi complessa; la mancanza di una storia familiare, la difficoltà delle strumentazioni radiologiche di rilevare con certezza l'eziologia ematica delle lesioni, il genere femminile e l'età neonatale rappresentano elementi fuorvianti che possono ritardare la diagnosi.

L050

TRATTAMENTO CON RITUXIMAB DELLE PIASTRINOPENIE CRONICHE IMMUNI IN ETÀ PEDIATRICA: EFFICACIA, EFFETTI COLLATERALI E DECORSO A LUNGO TERMINE

R. Di Concilio, G. d'Urso, M. Amendolara, A. Aurino, L. Esposito, C. Romano, G. Pinto, E. Acampora, G. Amendola

UOC Pediatria-TIN, UOS Ematologia-Oncologia Pediatrica, Ospedale "Umberto I", Nocera Inferiore (SA), Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La porpora trombocitopenica immune si manifesta in età pediatrica per lo più in modo acuto con sanguinamenti muco-cutanei e bassa conta piastrinica. La condizione è benigna e si risolve spontaneamente in alcuni mesi, il 30% dei pazienti però evolve verso una forma cronica e di questi il 5-10% necessita di terapie alternative tra cui, oltre alla splenomegalia, il Rituximab. Trattasi di un anticorpo monoclonale chimerico capace di indurre una completa deplezione dei linfociti B ed ampiamente utilizzato nella terapia delle malattie linfoproliferative e di molti disordini autoimmunitari, inclusa la porpora trombocitopenica autoimmune cronica (PTIc). Gli Autori riportano i dati di uno studio condotto presso il Centro di Ematologia pediatrica dell'Ospedale di Nocera Inferiore su una ampia casistica di pazienti, affetti da PTIc e trattati con Rituximab.

METODI: Dal 2005 al 2007 sono stati arruolati nello studio 22 pazienti affetti da PTIc (definita come PTI ≥ 6 mesi), diagnosticati e seguiti nel nostro D.H.: 8 maschi e 14 femmine, età media alla diagnosi di PTI 8 anni e 5/12 (range 3 a. - 17 a. 7/12), durata media PTI all'arruolamento 2 anni e 6/12 (range 6 mesi - 12 a. e 4/12), età media al trattamento 12 anni e 5/12 (range 3 a. e 6/12 - 18 a.); tutti erano risultati refrattari a precedenti terapie (in media 3 - range 3 - 6). I pazienti hanno ricevuto 4 infusioni di Rituximab alla dose di 375mg/mq e premedicati con cortisone, antistaminico e paracetamolo; al termine della terapia sono stati trattati con immunoglobuline e v. (IVIg), 400mg/Kg ogni 21 giorni, fino alla ricostituzione della popolazione B cellulare. I pazienti sono stati sottoposti ad una completa

valutazione immunologica prima del trattamento (T0), al termine della terapia (T1), a 3 mesi (T2), a 6 mesi (T3), ad un anno (T4), e poi annualmente, indipendentemente dalla risposta. La risposta al trattamento è stata definita completa (RC) se la conta delle piastrine (PLT) era $\geq 150 \times 10^9/L$, parziale (RP) se $PLT \leq 150 \times 10^9/L$ ma $\geq 50 \times 10^9/L$, nulla (NR) se $PLT \leq 50 \times 10^9/L$. Il protocollo fu approvato dal locale comitato etico e per ogni paziente fu ottenuto il consenso informato scritto dei genitori.

RISULTATI: Tutti i pazienti hanno completato il protocollo. Il farmaco è stato ben tollerato, con minimi effetti collaterali (cefalea e febbre), alla prima infusione, in 5 pazienti. La ricostituzione dei B linfociti è avvenuta dopo 6-8 mesi, tranne in 1 paziente che presenta ipogammaglobulinemia e deplezione B linfocitaria persistente a 6 anni dalla terapia. Una risposta globale (CR o PR) è stata osservata entro 3 mesi dalla prima infusione del farmaco in 10 pazienti (7CR e 3PR), pari al 45% della coorte, e persistente ad 1 anno dal trattamento. In seguito si sono verificate 3 recidive: 2 in pazienti con CR, rispettivamente dopo 18 mesi e 3 anni e 7 mesi, e 1 in una paziente con PR dopo 13 mesi. Attualmente, dopo un follow-up minimo di 6 anni, 7 pazienti (32%) continuano a presentare una CR (5) o PR (2).

CONCLUSIONI: La splenectomia rappresenta tuttora l'opzione terapeutica più efficace nelle PTIc dell'infanzia (60-70% di risposte persistenti a 5 anni). Trattasi però di una procedura irreversibile e ciò, unitamente ai rischi ad essa connessi quali sepsi e trombosi, rende la splenectomia poco gradita ai genitori e ai pediatri curanti. Il Rituximab costituisce una valida alternativa terapeutica, come dimostrano i dati della letteratura e quelli del nostro studio in cui un terzo circa dei pazienti trattati presenta remissione della malattia dopo un follow-up molto lungo (6-8 anni). Rimangono però ancora molti interrogativi: la dose del farmaco da utilizzare, la necessità o meno della terapia sostitutiva con IVIg, la possibilità di ipogammaglobulinemia persistente, come nel caso da noi descritto, e del possibile sviluppo della Leucoencefalopatia progressiva multifocale.

Bibliografia:

Liang Y, Zhang L, Gao J, Hu D, Ai Y. *Rituximab for children with immune thrombocytopenia: a systematic review.* PLoS One. 2012;7(5):e36698.
Journeycake JM. *Childhood immune thrombocytopenia: role of rituximab, recombinant thrombopoietin, and other new therapeutics.* Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2012;2012:444-9.

L051

SIDEROPENIA: UN CAMPANELLO D'ALLARME DI PATOLOGIE GASTROINTESTINALI

M. Laurino,¹ F. Giona,¹ M. Barbato,² G. Palumbo,¹ D. Marzella,¹ M.L. Moleti,¹ B. Siniscalchi,¹ S. Leoni,³ R. Foà¹

¹Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia;

²Dipartimento di Clinica Pediatrica, Università Sapienza Roma,

Roma, Italy; ³Dipartimento di Clinica Pediatrica, Università Sapienza Roma, Roma, Jersey

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: L'anemia sideropenica è la più comune forma di anemia e, secondo un rapporto del WHO del 2008,¹ la sideropenia colpisce circa 2 miliardi di persone. I bambini e gli adolescenti sono a maggior rischio di sviluppare un deficit di ferro a causa di un' aumentata richiesta fisiologica. Fattori nutrizionali sono frequentemente causa della carenza di ferro nei bambini, in particolare nei lattanti il cui fabbisogno di ferro non è soddisfatto da una dieta a base di latte, soprattutto nei bambini nutriti con latte vaccino, il cui ferro è assorbito in scarsa quantità. Inoltre, alcuni componenti del latte, come il calcio e il caseinfosfopeptide, possono interferire direttamente con l'assorbimento del ferro. Nei bambini più grandi, in cui velocità di crescita è minore e la dieta più varia, l'anemia da carente apporto alimentare di ferro è meno frequente, mentre prevalgono altre eziologie, tra cui alcune patologie gastrointestinali frequenti in età pediatrica quali malattia celiaca, intolleranze alimentari, infezione da *Helicobacter Pylori*, malattia da reflusso gastroesofageo, malattie infiammatorie croniche intestinali. L'obiettivo di questo studio retrospettivo è stato quello di valutare l'incidenza e il tipo di patologie gastrointestinali in pazienti di età inferiore ai 20 anni con un quadro di sideropenia e/o anemia sideropenica ed il sospetto di patologia gastrointestinale.

METODI: Dal gennaio 1997 al luglio 2011, sono stati identificati 122 pazienti di età inferiore ai 20 anni, osservati presso l'Ematologia

Pediatria dell'Ematologia "Sapienza" di Roma con il quesito di sideropenia e/o anemia sideropenica ed il sospetto di patologia gastroenterostinale. Lo studio è stato condotto in collaborazione con la Gastroenterologia Pediatrica della Clinica Pediatrica della "Sapienza" di Roma. Lo stato di sideropenia è stato definito sulla base dei limiti di normalità della ferritina e della saturazione della transferrina per fasce di età secondo il Center for Disease Control and Prevention.² L'anemia sideropenica è stata definita come combinazione di sideropenia e bassi livelli di emoglobina (Hb) e del Volume Corpuscolare Medio (MCV) rispetto agli intervalli di riferimento per sesso ed età secondo quanto riportato in Hematology of Infancy and Childhood.³ Sono stati esaminati i dati ematologici (emocromo e bilancio marziale) alla visita iniziale, a 7-10 giorni, a 3-4 settimane e, periodicamente, fino alla risoluzione del quadro ematologico e sono state considerate le indagini di approfondimento per la definizione dell'eventuale concomitante patologia gastroenterologica, eseguite dai pazienti sia prima che durante il periodo di osservazione. I dati riguardanti gli esami di approfondimento gastroenterologico sono stati ricavati anche dalla consultazione dell'archivio delle valutazioni specialistiche eseguite presso la Gastroenterologia pediatrica, mentre quelli relativi alla dieta prescritta, se non disponibili dall'archivio cartaceo, sono stati ottenuti tramite intervista telefonica. Per quanto riguarda l'analisi statistica, le caratteristiche dei pazienti sono state descritte tramite tabelle di frequenza per le variabili qualitative ed indicatori di posizione per le variabili quantitative; le differenze in distribuzione dei fattori prognostici sono state analizzate tramite χ^2 o Fisher's exact test (qualitative) e Wilcoxon o Kruskal-Wallis test (quantitative). Sono state considerate statisticamente significative le differenze con $p < 0.05$.

RISULTATI: Dei 122 pazienti (67 maschi e 55 femmine, con un'età mediana 4.7 anni), 26 (21.3%) avevano un'età < 2 anni, 42 (34.4%) un'età compresa tra 2 e 6 anni, 8 (6.5%) un'età compresa tra 6 e 10 anni e 46 (37.7%) un'età >10 anni. Alla prima valutazione ematologica, 84 pazienti (68.9%) presentavano un quadro ematologico di anemia sideropenica, mentre i restanti 38 (31.1%) una condizione di sideropenia. Nella Figura 1, è riportata la distribuzione dell'emoglobina, MCV e ferritina per fasce d'età. Un'attenta valutazione anamnestica ha identificato quale causa dell'anemia un inadeguato apporto alimentare in 13 dei 25 bambini di età < 2 anni. Dopo un'anamnesi accurata e una valutazione del tipo di sintomo, in 36 soggetti (29,5%) è stato ritenuto opportuno l'invio in Gastroenterologia Pediatrica per un approfondimento. In 30 dei 36 soggetti esaminati (83%) sono state riscontrate patologie gastroenterostinali, quali: intolleranze alimentari (15 casi), infezione da *Helicobacter Pylori* (HP) (6 casi), gastriti HP correlate (2 casi), malattia celiaca (3 casi), malattia celiaca e infezione da HP (1 caso), malattia da reflusso gastroesofageo (2 casi), diverticolo di Meckel (1 caso). Nella Figura 2 è rappresentato la distribuzione delle patologie gastroenterostinali in base all'età. A tutti è stata somministrata terapia marziale, nella maggior parte dei casi (28/30=93%) sale ferroso. Ai 15 pazienti con intolleranza alimentare è stata prescritta, inoltre, una dieta di eliminazione priva di proteine di latte vaccino, uova e soia per un periodo variabile da 2 a 24 mesi. Dei 14 pazienti valutabili per il follow-up, 6 (43%) hanno ottenuto una risoluzione completa della condizione ematologica (Hb, MCV e ferritina) e 8 (67%) hanno raggiunto livelli di Hb e ferritina compresi nel range di normalità, pur mantenendo la condizione di microcitosi. 8 dei 9 pazienti con infezione da HP hanno eseguito una terapia eradicante che ha portato alla risoluzione del quadro ematologico (Hb, MCV e ferritina) in soli 3 pazienti.

CONCLUSIONI: In questo studio, circa un quarto dei pazienti con sideropenia ha una patologia gastroenterostinale che sottende la problematica ematologica. L'identificazione di un probabile problema gastroenterostinale è utile per un approccio combinato ematologico e gastroenterologico. Un'intolleranza alimentare è prevalente nei bambini di età <6 anni, mentre è sporadica nei bambini di età >10 anni (1 su 74). L'infezione da HP è prevalente nei bambini di età >10 anni e la terapia eradicante non sempre è sufficiente a normalizzare il quadro ematologico. Non è stato riscontrato alcun caso di malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI).

Bibliografia:

1. WHO/UNICEF/UNU. Iron deficiency Anemia Assesment, preve of anemia 1993-2005:WHO Global Database on Anemia. De Benoist; McLean E, Egli I.; Cogswell, M editors. WHO Press: Geneva: Switzerland:2008.
2. Center for Disease Control and Prevention 2002.
3. Stuart H. Orkin, David G. Nathan, MD. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood.

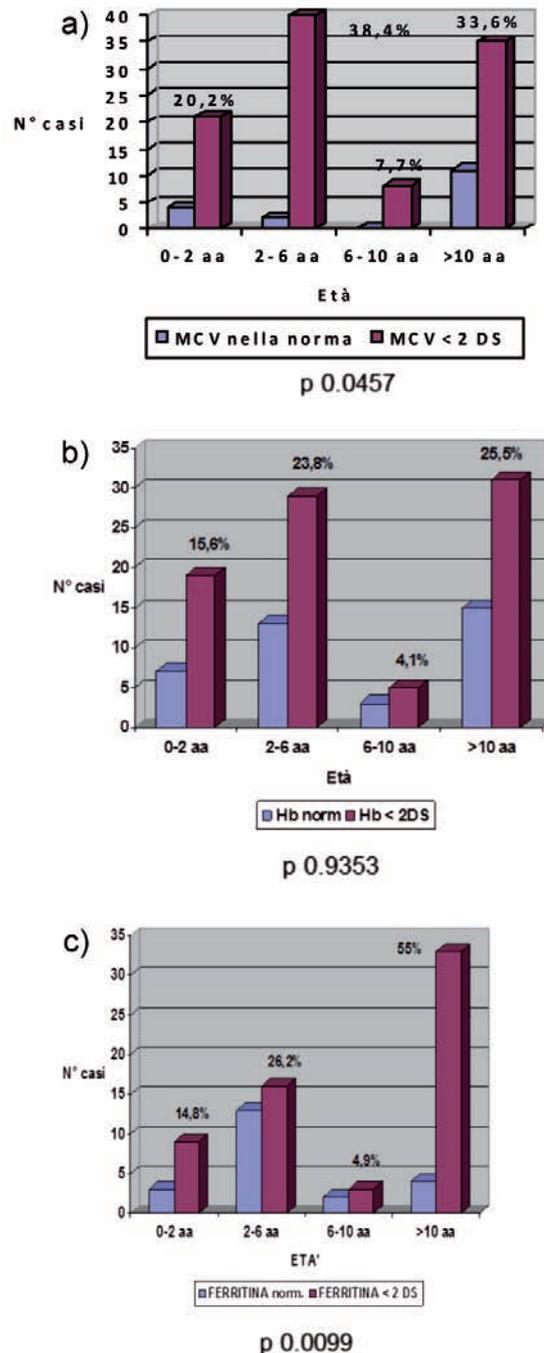


Figura 1. Distribuzione dell'Hb (a), dell'MCV (b) e della ferritina (c) per fasce d'età.

PATOLOGIE GASTROENTEROSTINALI	ETA'			
	0-2 aa	2-6 aa	6-10 aa	>10 aa
Infezione da <i>Helicobacter pylori</i>	-	1	-	8
Gastrite	-	-	-	2
Celiachia	1	2	1	-
Reflusso gastroesofageo	1	-	-	1
Diverticolo di Meckel	-	1	-	-
Intolleranza alimentare non definita	4	8	2	1

Figura 2. Patologie gastroenterostinali per fasce d'età.

L052

STROKE IN ETÀ PEDIATRICA: 2 CASI CLINICI

L. Ceriello,¹ L. Papetti,² S. Mingione,¹ M.P. Smacchia,¹ A. Schiavetti,² M. Iacobini¹¹UOS di Diagnostica Ematologica Speciale Pediatrica, Dipartimento di Pediatria; ²Clinica Pediatrica, Policlinico Umberto I, "Sapienza" Università di Roma, Roma, Italy

INTRODUZIONE: Le patologie cerebrovascolari in età pediatrica hanno un'incidenza di circa 2,7 per 100.000 bambini all'anno, di poco inferiore a quella dei tumori cerebrali nella stessa fascia d'età e in costante aumento negli ultimi anni. La mortalità è del 29% negli icus emorragici e del 16% nelle forme ischemiche. L'evoluzione e la prognosi sono molto variabili: deficit motori e/o cognitivi, crisi epilettiche e/o disturbi psichici sono descritti nel 30-70% dei bambini. Il rischio di ricorrenza è intorno al 20-30%. I fattori eziologici sono diversi da quelli responsabili di tale patologia nell'adulto: i più frequenti sono le cardiopatie, le vasculopatie, i disordini ematologici e le infezioni. Tuttavia, nell'11-25% dei pazienti la causa rimane sconosciuta. Riportiamo 2 casi di stroke ischemico, presentatisi presso il Dea della nostra clinica pediatrica.

CASI CLINICI: M.C., 3 aa e 4 mesi, accedeva al Dea per deviazione della rima buccale verso sx e afasia insorta in condizioni di pieno benessere circa un'ora prima. I genitori riferivano in anamnesi l'assenza di traumi recenti e la comparsa di un rash scarlattiniforme circa un mese prima, trattato con amoxicillina e acido clavulanico per 5 giorni e seguito da un episodio di gastroenterite ad eziologia non determinata. All'esame obiettivo non si rilevava nulla di patologico e l'esame neurologico non metteva in evidenza ulteriori alterazioni. P.D., 2 aa e 11 mesi, presentava al momento dell'accesso in Dea, avvenuto 7 giorni dopo quello di M.C., la stessa sintomatologia a carico del distretto facciale sinistro associata a paresi dell'arto superiore omolaterale e disartria, insorte poche ore prima. In anamnesi si evidenziava familiarità per ischemia cerebrale in età giovanile, assenza di traumi recenti e un episodio di bronchite asmatica nel mese precedente. All'esame obiettivo generale e neurologico non si evidenziavano altri segni patologici. Gli esami di laboratorio eseguiti in urgenza mettevano in evidenza soltanto una lieve linfocitosi in entrambi i casi, con indici di infiammazione e prove di coagulazione (PT, PTT, D-dimero, Fibrinogeno, ATIII) nella norma. All'angio-RM si evidenziava un'area di sofferenza tissutale acuta su base cerebrovascolare ischemica, localizzata in sede fronto-insulare cortico-sottocorticale sinistra con riduzione del calibro dell'arteria cerebrale media omolaterale nel caso di M.C. e in corrispondenza della testa del nucleo caudato di dx, del putamen e del pallido in assenza di alterazioni vasali stenotomanti, nel caso di P.D. Entrambi i pazienti sono stati sottoposti ad approfondite indagini al fine di porre una diagnosi eziologica. Il profilo coagulativo era nella norma e lo screening per vasculiti e connettiviti (VES, C3, C4, fattore reumatoide, ANA) ha avuto esito negativo, così come la ricerca di emoglobine patologiche. La valutazione ecocardiografica non ha evidenziato la presenza di difetti interatriali o interventricolari, ed una valutazione ecocolor Doppler di tutti i distretti vascolari esplorabili ha evidenziato l'assenza di immagini riferibili a trombosi o tromboflebiti. L'analisi dei fattori di rischio trombofilici congeniti e acquisiti (proteina C, proteina S, fattore VIII, protrombina, lipoproteina (a), anticorpi antifosfolipidi) non ha evidenziato anomalie, né non sono stati rilevati polimorfismi genetici dei fattori V e II e del PAI-1. Nell'ambito dello screening trombofilico si repertava soltanto uno stato di mutazione dell'MTHFR (C677T), in eterozigosi nel caso di M.C. e in omozigosi nel caso di P.D., e valori di omocisteinemia rispettivamente di 11,1 micromol/L e di 11,7 micromol/L (vn 3,3-8,3). Gli altri aminoacidi plasmatici e gli acidi organici urinari erano nella norma, così come i lipidi sierici. Lo screening per la celiachia, patologia che secondo recenti studi può essere considerata fattore di rischio per stroke, ha avuto esito negativo. Le indagini microbiologiche (ricerca di CMV, EBV, HSV 1-2, VZV, echovirus, coxsackie B, parvovirus B19, virus influenzali, mycoplasma e chlamydia pn, SBEGA) hanno evidenziato una sospetta infezione da coxsackievirus B4 in P.D. Urinocoltura e coprocultura erano negative per entrambi i pazienti. I due bambini sono stati trattati con eparina a basso peso molecolare, cortisonici endovenosi, acido folico e fisiochinesiterapia giornaliera con progressivo miglioramento della sintomatologia. Entrambi, al momento della dimissione, non presentavano reliquati neurologici. Continuano tuttora la terapia antiaggregante e con acido folico.

DISCUSSIONE: Lo stroke è molto meno comune nell'età pediatrica rispetto a quella adulta. Come per gli adulti, la sede più frequentemente coinvolta è il territorio di irrorazione dell'arteria cerebrale media, ma la presentazione clinica varia in relazione all'età del pazien-

te. Nel lattante e nei bambini più piccoli la sintomatologia è spesso aspecifica, con convulsioni, febbre, irritabilità o cefalea, distonie, alterazione del sensorio e scarsi segni focali, che invece rappresentano il più frequente segno di esordio nella seconda infanzia. Tra questi, la paralisi del VII nervo cranico è di frequente riscontro (circa il 20% dei casi secondo recenti studi), e può essere erroneamente interpretata, se non associata ad altri deficit focali, come una paralisi di Bell. Al fine di effettuare una corretta diagnosi differenziale, è utile valutare la motilità volontaria del distretto facciale superiore: nelle paralisi di origine centrale, quali quelle secondarie a stroke, essa è generalmente conservata, poiché le fibre innervanti tale regione provengono dalle aree motorie di entrambi gli emisferi cerebrali. In età pediatrica, lo stroke è spesso associato a particolari condizioni cliniche predisponenti. Numerosi studi hanno indagato il ruolo dei fattori protrombotici nella eziopatogenesi dello stroke ischemico. Anomalie protrombotiche sono riscontrabili nel 20-50% dei bambini con stroke, spesso in associazione ad altri fattori di rischio. Le alterazioni più frequentemente osservate sono deficit di fattore V Leiden, deficit di proteina C ed elevati livelli di lipoproteina(a). Nel nostro caso, l'unica alterazione trombofilica riscontrata era la mutazione del MTHFR. In letteratura, l'associazione tra tale mutazione e la comparsa di stroke è la più controversa, e il rischio sembra essere correlato ai livelli plasmatici di omocisteina piuttosto che alla mutazione in sé. Pertanto, è importante nella pratica clinica valutare i livelli di omocisteina piuttosto che la presenza della mutazione del MTHFR: i nostri due pazienti infatti avevano valori di omocisteinemia sovrappubbili, nonostante uno dei due fosse portatore di una mutazione in eterozigosi e l'altro in omozigosi. C'è ormai accordo nel definire la patologia cerebrovascolare in età pediatrica come un disordine multifattoriale in cui, su un substrato genetico predisponente, possono agire differenti fattori ambientali, prime tra tutti le infezioni. La stretta associazione temporale tra i nostri due casi ci ha spinti ad estendere le indagini microbiologiche a patogeni non unanimemente riconosciuti come possibile causa di stroke. Non si può escludere infatti che una certa percentuale dei casi definiti come idiopatici siano in realtà forme a eziologia infettiva causate da patogeni non comunemente ricercati. L'impatto della trombofilia sull'insorgenza, sull'outcome e sul rischio di recidiva dello stroke in età pediatrica merita ulteriori studi, tantopiù in considerazione del fatto che, se è vero che agenti microbiologici possono funzionare da trigger, in età pediatrica si verifica la maggiore esposizione a patologie infettive. Inoltre, l'impatto della trombofilia da una parte e delle infezioni dall'altra necessita di essere investigato al fine di valutare l'utilità clinica e il rapporto costi-benefici di un pannello esteso di indagini infettivologiche e di uno screening trombofilico nei bambini con familiarità per tali patologie. Ribadiamo inoltre l'importanza di un'attenta diagnosi differenziale, attraverso un approfondito esame neurologico, in un bambino che si presenti con deficit focali a volte limitati ad un solo distretto, come l'emiparesi del volto, soprattutto in un'età in cui un segno aspecifico come il deficit del linguaggio può non essere riconosciuto, al fine di effettuare una pronta diagnosi ed instaurare precocemente una corretta terapia.

Bibliografia:

1. Acute childhood arterial ischemic and hemorrhagic stroke in the emergency department. Yock-Corrales A, Mackay MT, Mosley I, Maixner W, Babl FE. *Ann Emerg Med.* 2011 Aug;58(2):156-63.
2. Arterial ischemic stroke risk factors: the International Pediatric Stroke Study. Mackay MT et al; International Pediatric Stroke Study Group; *Ann Neurol.* 2011 Jan;69(1):130-40.
3. Impact of thrombophilia on risk of arterial ischemic stroke or cerebral sinovenous thrombosis in neonates and children: a systematic review and meta-analysis of observational studies. Kenet G et al; *Circulation.* 2010 Apr 27;121(16):1838-47.
4. A clinical approach to arterial ischemic childhood stroke: increasing knowledge over the last decade. Steinlin M.; *Neuropediatrics.* 2012 Feb;43(1):1-9.
5. The importance of MTHFR polymorphisms in pediatric cerebral stroke. Unal E, Mutlu FT, Karakukcu M.; *Childs Nerv Syst.* 2012 Jan;28(1):13.
6. Predictors of cerebral arteriopathy in children with arterial ischemic stroke: results of the International Pediatric Stroke Study. Amlie-Lefond C et al; International Pediatric Stroke Study Group; *Circulation.* 2009 Mar 17;119(10):1417-23.
7. Diagnosis and management of pediatric arterial ischemic stroke. Lopez-Vicente M et al; *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2010 May;19(3):175-83.Review.
8. Neurophysiological evaluation of acute facial paralysis in children. Qiu WW, Yin SS, Stucker FJ, Hoasjoe DK.; *Int J Pediatr*

- Otorhinolaryngol. 1997 Apr 11;39(3):223-36.
9. Delayed recognition of initial stroke in children: need for increased awareness. Srivivasan J, Miller SP, Phan TG, Mackay MT.; *Pediatrics*. 2009 Aug;124(2):e227-34.
 10. Ischemic stroke associated with adenoviral infection in a 4-year-old boy. Kutlesa M, Tesović G, Knezović I, Visković K, Barisić N.; *Wien Klin Wochenschr*. 2009;121(23-24):776-9.
 11. Antithrombotic treatments, outcomes, and prognostic factors in acute childhood-onset arterial ischaemic stroke: a multicentre, observational, cohort study. Goldenberg NA et al; International Pediatric Stroke Study Group; *Lancet Neurol*. 2009 Dec;8(12):1120-7.

L053

SCREENING NEONATALE: 10 ANNI DI ESPERIENZA DI UN CENTRO AIEOP

A. Pusiol, M. Guerra, A. Nocerino, E. Passone, A. Rosolen
Clinica Pediatrica, Azienda Ospedaliero Universitaria, Udine, Italy

Nel 1986 Gaston et al. dimostravano una riduzione del 84% nell'incidenza di infezioni da *Streptococcus pneumoniae* nei bambini con SCD in profilassi orale con penicillina, rispetto a quelli che non avevano ricevuto il trattamento: questo lavoro rappresenta il primo e più numeroso studio che documenti, in modo randomizzato controllato, l'efficacia della diagnosi precoce nel miglioramento dell'outcome e della prognosi. In Clinica Pediatrica abbiamo iniziato a operare lo screening neonatale dal 2003. Lo screening prevede un sistema di counseling prenatale, in cui sono coinvolti anche i colleghi ginecologi del distretto sanitario. Il ginecologo seleziona, sulla base dell'emocromo e dello studio delle emoglobine patologiche, le madri a rischio che vengono successivamente a colloquio in pediatria con il partner, nei primi mesi della gravidanza. Il nuovo nato, già conosciuto quindi dalla struttura, eseguirà la cromatografia in HPLC e la genetica alla nascita, o entro i primi due mesi di vita, così da iniziare la profilassi antibiotica al secondo mese di età. Nella nostra esperienza di 15 anni, non siamo a conoscenza di nessun caso nato nella Azienda Ospedaliero Universitaria di Udine sfuggito allo screening. In 10 anni sono state effettuate 85 indagini genetiche che hanno permesso di diagnosticare 16 bambini con malattia drepanocitica (2 con fenotipo Sβ+, 3 con fenotipo SC e 11 SS). Come dato ancillare segnaliamo che lo screening neonatale favorisce anche una migliore compliance della famiglia rispetto a quanto avviene nei casi diagnosticati in età successive. Abbiamo osservato, infatti, come i genitori dei bambini identificati alla nascita siano in grado, molto meglio, di palpare la milza e di rilevare precocemente segni o sintomi suggestivi di infezione, crisi dolorosa ossea, sequestro splenico. Tutto ciò porta ad arginare ritardi di trattamento e ad outcome migliori.

L054

VARIABILITÀ DEL FENOTIPO CLINICO ED EMATOLOGICO IN SOGGETTI ETEROZIGOTI COMPOSTI TRIPLO ALFA/BETA TALASSEMIA

S. Puzone,¹ G. Amendola,² M.R. Storino,¹ C. Di Mauro,¹ R. Sessa,¹ R. Di Concilio,² A.M. Aurino,² L. Esposito,² E. Acampora,² P. Izzo,³ M. Grosso¹

¹Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli; ²UOC Pediatria, TIN e Ematologia-Oncologia Pediatrica, Ospedale Umberto I, Nocera Inferiore (SA); ³Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche e CEINGE Biotecnologie Avanzate, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La beta-talassemia intermedia è una forma di beta-talassemia con anemia lieve-moderata, che richiede trasfusioni occasionali. In queste forme di talassemia il genotipo può essere costituito dall'omozigosi per un difetto beta-talassemico lieve, da una doppia eterozigosi per un difetto grave e uno lieve o da una doppia eterozigosi per un difetto beta-talassemico e la triplicazione o quadruplicazione dei geni alfa-globinici. Nell'ambito delle talassemie intermedie diagnosticate e seguite presso l'UOC Pediatria - T.I.N. - Oncoematologia Pediatrica dell'Ospedale Umberto I di Nocera Inferiore (SA) sono stati individuati 15 soggetti appartenenti a 7 diversi nuclei familiari in cui era stata identificata la presenza in eterozigosi di un solo difetto beta-talassemico. In questi casi è stato ipotizzato che la

condizione di talassemia intermedia potesse essere dovuta all'associazione con la triplicazione dei geni alfa-globinici (triplo alfa³⁻⁷).

METODI: L'analisi della triplicazione dei geni alfa-globinici è stata effettuata mediante Hot-Start PCR di tipo Allele-Specifica ASA-PCR) utilizzando un termociclatore My Cycler (Bio-Rad Laboratories). L'analisi delle mutazioni beta-talassemiche è stata effettuata mediante sequenziamento diretto dei frammenti di DNA amplificato del gene beta-globinico ottenuti mediante reazione di PCR. L'analisi di sequenza è stata condotta mediante sequenziamento automatico su una strumentazione 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). La presenza del polimorfismo -158 (CZT) nel gene Ggamma-globinico è stata determinata mediante analisi di restrizione con l'enzima XmnI dopo amplificazione del DNA mediante reazione di PCR.

RISULTATI: Nel corso della caratterizzazione molecolare di pazienti con sospetto di beta-talassemia intermedia sono stati individuati 15 soggetti appartenenti a 7 diversi nuclei familiari in cui la presenza di un difetto beta-talassemico è stata trovata in associazione con la triplicazione dei geni alfa-globinici (triplo alfa³⁻⁷). In sei di questi nuclei familiari era presente più di un soggetto affetto. In queste famiglie, nell'ambito dello stesso nucleo familiare, e quindi in soggetti affetti con la stessa combinazione di difetti talassemici, abbiamo osservato una notevole variabilità delle manifestazioni cliniche che vanno da condizioni di talassemia intermedia lieve, non trasfusione dipendente, a forme cliniche più severe con più frequenti richieste trasfusionali. In una famiglia la variabilità fenotipica è stata associata alla presenza del polimorfismo -158 Ggamma che era presente in omozigosi nei soggetti con fenotipo ematologico lieve e livelli di HbF più elevati (10-12%).

CONCLUSIONI: Molteplici fattori di tipo sia genetico (associati al cluster beta-globinico o esterni ad esso) che epigenetico (età, sesso, condizioni di stress eritropoietico) contribuiscono a regolare nella vita adulta il diverso grado di sbilanciamento delle catene globiniche determinando quindi una variabilità fenotipica anche nella stessa famiglia. L'identificazione di fattori modificatori nelle altre famiglie oggetto di questo studio potrà contribuire a definire le basi molecolari della variabilità clinica nelle sindromi talassemiche.

L055

ENCEFALITE AUTOIMMUNE IN SINDROME DI FISHER EVANS

A. Trizzino,¹ P. Farruggia,¹ G. Santangelo,² M.C. Iaquina,³ G. Nuara,⁴ R. Pitino,² A. Mazzola,⁴ P. D'Angelo¹

¹UO di Oncoematologia Pediatrica; ²UO di Neuropsichiatria Infantile; ³UO di Rianimazione e Terapia Intensiva Pediatrica; ⁴UO di Medicina Immunotrasfusionale, Azienda Ospedaliera Civico, Di Cristina e Benfratelli, Palermo, Italy

INTRODUZIONE: La Sindrome di Fisher-Evans (ES) è una rara malattia autoimmune caratterizzata dalla combinazione (simultaneamente o in sequenza) di almeno 2 fra anemia emolitica, trombocitopenia e neutropenia. La malattia è spesso caratterizzata da un decorso cronico con periodi di remissione e ricattizzazione. Terapie di prima linea sono steroidi e/o immunoglobuline endovena, cui risponde la maggior parte dei pazienti; la recidiva è tuttavia frequente ed in seconda linea si usano in genere altri immunosoppressori (rituximab, micofenolato mofetile, ciclosporina etc), chemioterapici (ciclofosfamide, vincristina) o la splenectomia. La ES frequentemente si associa ad altre malattie autoimmuni, ma, fino ad oggi, anche nell'adulto, non sono mai stati descritti associazioni con encefalopatia autoimmune, una entità nosologica rara, recentemente descritta e di difficile diagnosi (spesso all'inizio indistinguibile da una encefalite virale). Tra le encefaliti autoimmuni la encefalite da anticorpi anti-NMDAR rappresenta la forma più frequente e colpisce soprattutto le giovani donne (il 40% dei casi si verifica in età pediatrica). I sintomi d'esordio consistono spesso in modificazioni del carattere e del comportamento, disturbi del sonno, disturbi del linguaggio e difficoltà alla deambulazione con posture distoniche. La malattia è poi caratterizzata dalla comparsa di crisi epilettiche (80% dei casi), movimenti involontari a carico del distretto oro-facciale e degli arti (90% dei casi) ed iponatriemia; la depressione del livello di coscienza, associata all'instabilità disautonomica e agli episodi di ipoventilazione, comporta spesso la necessità di ricoverare il paziente in terapia intensiva per garantire l'assistenza di tipo ventilatorio. Descriviamo un caso di encefalite autoimmune in una bambina di 8 anni affetta da ES.

CASO CLINICO: MC, femmina, si presenta all'età di 4 anni con una neutropenia transitoria; dopo 2 anni comparsa di piastrinopenia, lieve anemia (Hb 9-10 g/dl) con test di Coombs diretto (TCD) positivo

e neutropenia persistente (con positività degli anticorpi anti-neutrofilo indiretti). L'aspirato midollare era nella norma e veniva esclusa la presenza di autoimmunità "altra" (ANA, ENA, anti-DNA, anti-cardiolipina, anti-transglutaminasi, anti-tireoglobulina ed anti-tireoperoxidasi negativi). Nel tentativo di risolvere la piastrinopenia (sintomatica a livello cutaneo e mucosale per frequenti epistassi e gengivorragie), veniva intrapresa terapia di prima linea con steroidi e immunoglobuline endovena. La risposta alle IGEV era estremamente transitoria, mentre il prednisone per os si dimostrava efficace, ma ad ogni sospensione o riduzione al di sotto di 1 mg/kg/die si verificava immediata ricaduta della citopenia. Senza somministrazione di steroide, peraltro, la piccola continuava a presentare una piastrinopenia sintomatica senza che, invece, alla neutropenia si accompagnasse un significativo incremento delle infezioni o che alla positività del TCD facesse seguito una emolisi clinicamente evidente. I genitori rifiutavano la terapia con Rituximab o la splenectomia e pertanto veniva iniziata terapia con Micofenolato Mofetile (MMF), associato a prednisone per os (a dosaggio rapidamente decrescente). Il MMF si dimostrava immediatamente efficace sul conteggio delle piastrine e, successivamente, dei neutrofili e ciò consentiva l'interruzione definitiva dello steroide. Dopo circa 10 mesi, in corso di terapia con MMF ed in coincidenza di un episodio febbrile si registrava una recidiva della piastrinopenia (sempre sintomatica) e per tale motivo veniva praticata di nuovo terapia con IGEV unitamente a prednisone per os (il MMF veniva sospeso): le piastrine registravano un transitorio incremento ma, come in passato, si registrava dopo poche settimane una nuova ricaduta. Veniva ripresa la terapia con MMF e, ancora una volta, questa si dimostrava immediatamente efficace. Circa 3 mesi dopo la reintroduzione del MMF la piccola iniziava a presentare subdoli segni di alterazione della personalità (crisi di pianto, deficit di memoria a breve termine, disturbi del sonno ed episodi di aggressività) che non venivano però riportati allo staff medico dai genitori; un paio di settimane dopo la piccola presentava brusca, completa e persistente compromissione della vigilanza e successiva comparsa di clonie all'emilato sinistro. La bambina veniva ricoverata in stato di male focale motorio in terapia intensiva dove veniva sedata e tenuta in ventilazione artificiale per 48 ore. Dopo estubazione la piccola rimaneva in stato soporoso, accompagnato da clonie del distretto oro-facciale alternate a movimenti afinalistici (coreici, balistici, distonici) di capo, tronco e arti per circa 30 giorni. Le diverse indagini strumentali (neuroradiologiche, elettroencefalografiche, chimico-fisiche e microbiologiche su siero e liquor) consentivano di formulare la diagnosi di encefalopatia autoimmune: all'EEG veniva riscontrato un rallentamento diffuso dell'attività di fondo con prevalenza sulle derivazioni centro-temporali, maggiormente a destra; la RM encefalo era sostanzialmente nella norma a parte una lieve iperintensità di segnale a carico del talamo di destra; sul liquor, infine, si registrava una lieve pleiocitosi (14 cellule/mmc, tutti piccoli linfociti senza segni di attivazione) e la presenza di bande oligoclonali, mentre le indagini in PCR volte a svelare la presenza di DNA virale erano tutte negative. È ancora in corso la ricerca di anticorpi anti-NmDA ma la diagnosi è da considerarsi certa, qualsiasi sia il risultato, alla luce del quadro clinico e delle informazioni fornite sia dalla RM encefalica che dalle indagini microbiologiche, le quali permettono di escludere sia una meningoencefalite su base infettiva che una leucoencefalopatia multifocale progressiva da MMF. La paziente, durante il ricovero in terapia intensiva, è stata sottoposta a terapia con: 1) antivirali ed antibiotici (poi sospesi); 2) Dintoina, Benzodiazepine, Barbiturici e Topiramato, per lo stato di male; 3) aloperidolo, biperamide, piracetam e baclofen per il controllo dei movimenti involontari. Posta, dopo circa 5 giorni, la diagnosi di encefalite autoimmune, veniva inizialmente intrapresa una terapia con steroidi ad alte dosi ed IGEV a 2 gr/kg; tali farmaci si dimostravano del tutto inefficaci e, pertanto, la bambina veniva sottoposta, a partire dal decimo giorno dall'esordio e con cadenza bi o trisettimanale, a 14 plasmaferesi. Tale terapia si dimostrava efficace seppure il recupero della paziente, all'inizio, sia apparso molto graduale. Si assisteva comunque ad una lenta ripresa dello stato di coscienza, cui seguivano una ricomparsa del linguaggio, della deambulazione e della coordinazione motoria. A distanza di 3 mesi dall'esordio la piccola ha riacquisito normali funzioni verbali e neurocognitive ed è nuovamente in grado di deambulare seppure con appoggio. Persistono ancora brevi crisi focali a frequenza plurisettimanale. La bimba prosegue il suo programma di FKT ed è in atto in trattamento con topiramato e carbamazepina e non effettua nessuna terapia per la citopenia autoimmune: la piccola presenta, infatti, solo una lieve anemia (Hb in media intorno a 9 gr/dl) con leucopenia e neutropenia (GB in media intorno a 2-3.000/mmc e neutrofili in genere fra 300 e 1.000/mmc); le piastrine, che durante la fase acuta della encefalite autoimmune hanno presentato costantemente valori normali (200-

300.000/mmc) si mantengono in atto su livelli compresi fra 50 e 100.000/mmc.

CONCLUSIONI: In letteratura sono descritti pochissimi casi di encefalite autoimmune in età pediatrica e nessuno di questi è associato a ES. È interessante peraltro notare come l'encefalite si sia verificata in una fase di remissione completa della citopenia autoimmune. Il nostro caso conferma l'eterogeneità clinica della ES e sottolinea l'importanza del precoce riconoscimento di una eventuale rara complicanza come l'encefalite autoimmune, il cui trattamento tempestivo in fase acuta con plasmaferesi permette, verosimilmente, di ridurre al minimo i rischi di complicanze e di gravi esiti neurocognitivi e comportamentali.

L056

UN CASO DI PTT IN ETÀ PEDIATRICA

C. Cerchione, V. Russo, F. Tucci, G. Loffredo, N. Marra, R. Parasole, F. Petruzzello, V. Poggi

Dipartimento di Oncematologia Pediatrica, AORN "Santobono-Pausilipon", Napoli, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La Porpora Trombotica Trombocitopenica (PTT) costituisce una patologia in cui risulta fondamentale un corretto inquadramento diagnostico ed un inizio precoce della terapia

METODI: Il piccolo Giuseppe è giunto alla nostra osservazione all'età di 12 anni, con anemia (Hb: 6,7 g/dL), piastrinopenia (6.000/mm³) e pregressa storia di ematuria, febbre e alvo diarroico. L'anamnesi familiare invece mostrava positività per patologie autoimmuni, con madre, zia materna e zia paterna affette da tiroidite autoimmune, zia materna affetta da diabete di tipo 1 e una cugina affetta da celiachia. La anamnesi personale era apparentemente negativa fino al momento del primo ricovero, figlio di genitori non consanguinei e nessun problema di natura ematologica. Le condizioni generali apparivano mediocri con ecchimosi al tronco e petecchie diffuse agli arti inferiori. L'anemizzazione è stata progressiva, con reticolocitosi (491.000/mmc) ed presenza degli altri indici di emolisi (aumento di LDH, Bilirubina Totale ed Indiretta e riduzione di aptoglobina), test di Coombs diretto ed indiretto negativi, AntiDNA ed ANA negativi, funzione renale nella norma. Allo striscio periferico si evidenziava la presenza di schistociti, mentre l'aspirato midollare mostrava iperplasia megacariocitaria ed eritroide. Abbiamo pertanto preso in considerazione in diagnosi differenziale le varie cause di trombocitopenia ed emolisi microangiopatica, come la Porpora Trombotica Trombocitopenica, Sindrome emolitico-uremica, Coagulazione Intravasale disseminata, le vasculiti, assunzione di alcuni farmaci (come la ciclosporina), protesi malfunzionanti di valvole cardiache, le endocarditi, e la microangiopatia associata al trapianto di midollo osseo. Per escludere una Sindrome emolitico-uremica classica, abbiamo effettuato la ricerca citofluorimetrica della tossina SHIGA, che è risultata negativa. Abbiamo praticato lo studio dell'attività dell'ADAMTS13 (<3%, v.n. 46-120), gli anticorpi anti-ADAMTS13 (positivi), il vWF:Ag, (250%, v.n. 60-150) i multimeri vWF (aumentati), dati che hanno confermato la diagnosi di PTT. La mortalità in assenza di terapia è del 90%, e il plasma exchange, basato sulla rimozione di UL-VWF ed autoanticorpi col ripristino di ADAMTS13, costituisce terapia di prima scelta con risposta variabile dal 60% all'80% dei pazienti, con una efficacia maggiore del plasma nell'episodio acuto ma inefficace sulla produzione anticorpale, su cui sembra utile la terapia con glucocorticoidi. Nei pazienti non-responders inizia a farsi strada il Rituximab, con rare evidenze di efficacia in letteratura anche in età pediatrica.

RISULTATI: Il nostro paziente, ha iniziato terapia con plasma exchange (con sedute giornaliere) e con metilprednisolone alla dose di 50 mg x 2/die con buona risposta ematologica iniziale, ma riduzione della piastrinemia dopo i tentativi di sospensione della PEX (Figura 1).

È stata pertanto avviata la terapia con rituximab alla dose di 375 mg/mq settimanale per un totale di quattro somministrazioni, con risposta completa già dopo la prima somministrazione, mantenuta nel tempo senza perdite di risposta fino a oggi da 16 mesi (Figura 1 e 2)

CONCLUSIONI: La diagnosi di PTT può essere considerata come una grossa sfida diagnostico-terapeutica per l'oncoematologia pediatrica. Il rituximab si propone anche nel bambino come alternativa terapeutica efficace nei casi di PTT refrattaria alle più comuni e classiche linee terapeutiche. Occorrono, comunque, studi con un numero più elevato di pazienti per validare questo risultato.

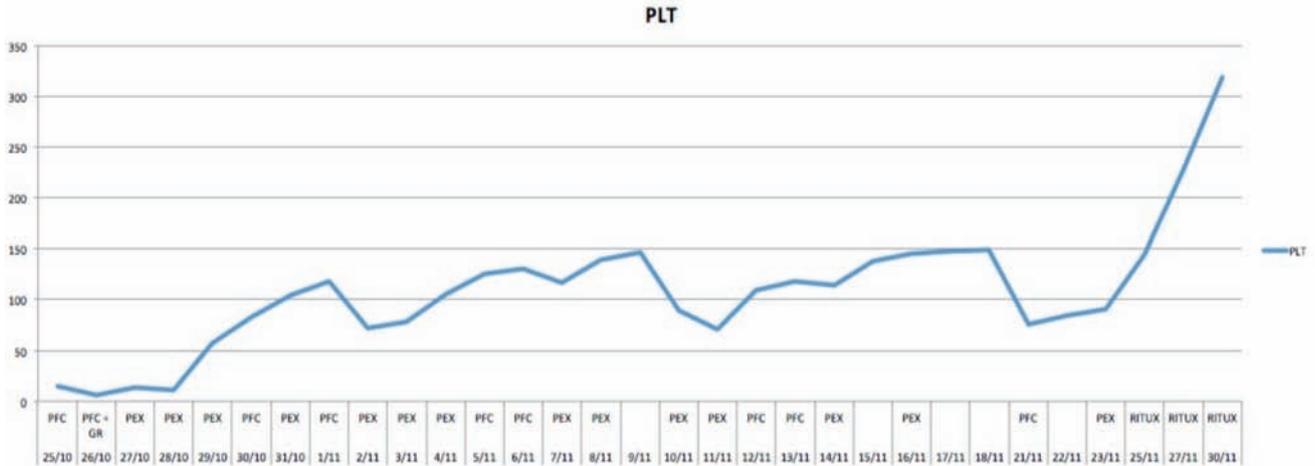


Figura 1.



Figura 2.

Bibliografia:

- Narayanan P et al. "Rituximab in a child with autoimmune thrombotic thrombocytopenic purpura refractory to plasma exchange." *Int J Hematol.* 2012 Jul;96(1):122-4
- Bredlau AL, et al. "Management of immune thrombocytopenic purpura in children: potential role of novel agents". *Paediatr Drugs.* 2011 Aug 1;13(4):213-23
- Loirat C, et al. "Thrombotic thrombocytopenic purpura in children". *Curr Opin Pediatr.* 2013 Apr;25(2):216-224.

L057

IDENTIFICAZIONE DELLA SINDROME LINFOPROLIFERATIVA AUTOIMMUNE (ALPS) IN PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA SINDROME DI EVANS (ES): RISULTATI DI UNO STUDIO CLINICO OSSERVAZIONALE MONOCENTRICO

R. Di Concilio,¹ G. d'Urso,¹ M. Amendolara,¹ A. Aurino,¹ L. Esposito,¹ C. Romano,¹ G. Pinto,¹ A. Doria,² G. Scala,³ E. Acampora¹ G. Amendola¹

¹UOC Pediatria-TIN, UOS Ematologia-Oncologia Pediatrica, Ospedale "Umberto I", Nocera Inferiore (SA); ²Ematologia, Dipartimento di Scienze Pediatriche, Università di Torino, Torino; ³Centro di Citometria Clinica e Sperimentale, Istituto CEINGE - Biotecnologia Avanzata, Napoli, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: L'ALPS è una malattia genetica legata ad un difetto primitivo dell'apoptosi linfocitaria. La triade clinica patognomonica è rappresentata da: citopenie autoimmuni (anemia emolitica autoimmune, più frequente, trombocitopenia o neutropenia), sindrome linfoproliferativa (linfadenopatie multifocali, splenomegalia e, più raramente, epatomegalia) e aumentata suscettibilità a neoplasie maligne (soprattutto linfomi Hodgkin e non-Hodgkin). Alterazioni cliniche simili si osservano anche nella ES, patologia autoimmune primitiva o secondaria ad altre malattie (malattia linfoproliferativa, immunodeficienze, ecc.) che coinvolge almeno due linee cellulari del sangue. Abbiamo valutato l'incidenza di ALPS nei nostri pazienti affetti da ES. Per la diagnosi si sono seguiti i criteri dia-

gnostici fissati nel primo Workshop internazionale sull'ALPS del 2009 (Oliveira et al. - *Blood*, 2010).

METODI: Dal 2003 al 2010 è stata posta diagnosi di citopenia autoimmune in 198 pazienti e in 15 (7M,8F) è stata diagnosticata ES primitiva. All'esordio o in tempi diversi, erano presenti in 7 piastrinopenia, anemia emolitica e neutropenia, in 7 piastrinopenia e anemia emolitica, in 1 piastrinopenia e neutropenia autoimmune. Nessuna obiettività clinica in 6 pazienti, in 1 linfadenomegalia, in 1 epatosplenomegalia, in 6 splenomegalia e in 1 linfadenomegalia e splenomegalia. A fine 2011 è stato iniziato uno studio osservazionale conclusosi nel 2012 comprendente valutazione clinica, ematologica, immunologica, ricerca dei marcatori dell'ALPS (DNT o popolazione linfocitaria T negativa sia per CD4 che per CD8 e il test di sensibilità dei linfociti all'apoptosi) ed ecografica.

RISULTATI: Dei 15 pazienti, in 6 (4M, 2F), positivi alla ricerca dei DNT ed al test dell'apoptosi, è stata posta diagnosi di ALPS; età media alla prima osservazione 7 anni (range 2-13). Degli altri 9 con ES, l'età media era 9 anni (range 1-15): i pazienti con ALPS avevano presentato quindi una insorgenza più precoce della patologia autoimmune. Tutti avevano all'ecografia segni di linfoproliferazione cronica (epatosplenomegalia e/o linfadenopatia) presenti solo in 3 pazienti con ES. Le Ig sieriche erano aumentate in 2 pazienti, 1 dei quali aveva anche un aumento della vitamina B12 e 1 positività per i LAC; in tutti gli ANA erano negativi. Due pazienti hanno sviluppato patologie autoimmuni non ematologiche, uno ha presentato LNH di tipo plasma cellulare, trattato con successo con protocollo R-CHOP. È stata praticata terapia con Ig e cortisone in 1, Ig in 2 e cortisone in 1, nessuna in 2.

CONCLUSIONI: In conclusione su 15 pazienti con ES in 6 (40%) è stata posta diagnosi di ALPS, confermando i dati del lavoro di Seif e coll. (*Blood*, 2010). Ciò è importante per la prognosi e la terapia: nella ES la prognosi è severa, la mortalità elevata e il Rituximab consente di ottenere remissioni e/o guarigioni della malattia. L'ALPS invece ha un andamento più benigno, anche se con aumentata incidenza di neoplasie. Il Rituximab potrebbe essere controindicato nei pazienti con ALPS, nei quali invece farmaci come il Micofenolato e il Sirolimus si rivelano efficaci (Rao and Oliveira - *Blood*, 2011).

Bibliografia:

Oliveira JB, Bleesing JJ, Dianzani U, Fleisher TA, Jaffe ES, Lenardo

- MJ, Rieux-Laucat F, Siegel RM, Su HC, Teachey DT, Rao VK. *Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop*. Blood. 2010 Oct 7;116(14):e35-40.
- Seif AE, Manno CS, Sheen C, Grupp SA, Teachey DT. *Identifying autoimmune lymphoproliferative syndrome in children with Evans syndrome: a multi-institutional study*. Blood. 2010 Mar 18;115(11):2142-5.
- Rao VK, Oliveira JB. *How I treat autoimmune lymphoproliferative syndrome*. Blood. 2011 Nov 24;118(22):5741-51.

L058

SFEROCITOSI EREDITARIA E GRAVIDANZA: UN CASO EMBLEMATICO DELLE POSSIBILI COMPLICANZE

L. Luti, E. Dati, C. Domenici, E. Chiocca, M. Nardi, C. Favre

UO Oncoematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Pisa, Italy

G.B., ragazza di 16 anni affetta da sferocitosi ereditaria, diagnosticata un anno prima c/o la nostra UO a seguito di crisi emolitica. Nell'anamnesi, ricovero ospedaliero nel 2011 (?) per "anemia", con esecuzione di terapia trasfusionale. Nel novembre 2012 la pz., gravida alla 24° sett gestazionale, ci venne trasferita da un ospedale locale per intenso pallore e astenia. In tale presidio ospedaliero erano state eseguite trasfusioni per un totale di 9 U di emazie concentrate, con scarsa efficacia. All'ingresso nel nostro reparto la ragazza presentava condizioni generali discrete, ittero e pallore cutaneo, milza palpabile a +2 cm dall'AC, all'emocromo Hb 7 g/dl, reticolociti 236.000/mcl, bilirubina totale di 7 mg/dl, nella norma il resto degli esami. Per il persistere di bassi valori di Hb (Hb 6.0- 7.0 gr/dL) ed in considerazione dello stato di gravidanza, venne inizialmente proseguita l'infusione di concentrati eritrocitari con scarsa resa ed incremento dei valori di bilirubinemia. Nei giorni successivi al ricovero, la ragazza presentava crisi emolitiche subentranti, con DAT positivo. La ricerca di una eventuale isoimmunizzazione evidenziava la presenza di anticorpi anti Jka, con titolo crescente (max 1:256). Il padre del feto mostrava un fenotipo eritrocitario Jka e Jkb positivo. Venne pertanto intrapreso un attento monitoraggio ecografico fetale e una regolare titolazione degli anticorpi anti Jka materni, nel sospetto di isoimmunizzazione materno-fetale. A 5 giorni dal ricovero comparve intenso dolore all'ipocondrio sx ed una ecografia addome mostrava un aumento della splenomegalia (diametro interpolare 18 cm) con numerose ed estese aree infartuali spleniche. Una RMN addome conferma la splenomegalia con multiple aree di ischemia e marcato quadro di emosiderosi, particolarmente evidente a livello di fegato e milza. Test di screening per trombofilia neg. Venne dunque iniziata terapia con LMWH. Vista la inadeguata resa della terapia trasfusionale, il grado elevato di ittero, la situazione di permanente e grave ipossia (livelli di Hb persistentemente intorno a 6 g/dl), si decideva dunque di eseguire una splenectomia alla 25°-26° settimana gestazionale. L'intervento è stato eseguito per via laparotomica, considerando l'asportazione in laparoscopia rischiosa. L'intervento non ha presentato complicanze né per la paziente né per il feto. Nei giorni successivi alla splenectomia i valori di Hb, inizialmente stabili, hanno iniziato progressivamente ad aumentare fino a valori di 12,5 g/dl nel terzo trimestre. Contemporaneamente si è avuta una progressiva riduzione della bilirubinemia e del titolo anticorpale anti Jka (1:4 dopo circa 2 mesi). Gli esami strumentali eseguiti sul feto (biometrie e flusso arteria cerebrale media) hanno sempre mostrato una buona salute fetale. Il parto è avvenuto per via naturale alla 40° settimana di e.g. La bambina, del peso di 2700 gr, APGAR 5° 9/10, ha mostrato Hb alla nascita di 16 g/dl con ipobilirubinemia in 2° giornata (24 mg/dL), trattata con fototerapia.

DISCUSSIONE: La sferocitosi ereditaria è una malattia emolitica congenita ad espressione clinica eterogenea a causa della varietà del fenotipo della membrana eritrocitaria che sottende la malattia. Questa eterogeneità clinica si manifesta in particolare modo in gravidanza, quando l'emivita media degli sferociti può variare da 30 a 90 giorni, con variabili ripercussioni sui livelli di emoglobinemia. Ciò spiega il motivo per il quale in molti casi (la maggioranza) la gravidanza decorre regolarmente senza particolare anemizzazione, mentre in altre donne, in bassa percentuale, le crisi di emolisi ed anemia si susseguono rendendo così necessaria la splenectomia. Ad esempio, in una casistica di Moore (1976) in 26 donne con sferocitosi e gravidanza, cinque arrivarono alla splenectomia, mentre in una casistica riportata da Macberry di 50 gravidanze avvenute in 23 donne con sferocitosi, nessuna gravidanza mostrava complicanze tali da necessitare la splenectomia. Durante la

gravidanza la sferocitosi ha una maggior espressività clinica a causa dell'aumento della fragilità osmotica dei globuli rossi che avviene gradualmente nel corso della gestazione e si esprime particolarmente nel terzo trimestre. La gestione del nostro caso è stata problematica sotto diversi aspetti. Innanzitutto la paziente mostrava crisi emolitiche subentranti, esacerbate dalle trasfusioni di concentrati eritrocitari, rendendo quindi impossibile mantenere nella gestante valori di emoglobina tali da scongiurare una ipossia fetale. Lo sviluppo, a seguito del regime trasfusionale, di autoanticorpi anti Jka rendeva ancora più difficile la selezione dei donatori di sangue compatibile. Infine, l'insorgenza di infarti splenici multipli è inusuale. Questi sono riportati in letteratura in donne affette da sferocitosi in associazione a deficit di G6PD o deficit di proteina C o S: a nostra conoscenza in un solo caso vengono descritti infarti multipli splenici in donna gravida con sferocitosi in assenza di altre patologie concomitanti (Charles F. 2002). Si può ipotizzare che, con il succedersi degli episodi di emolisi, si possa essere determinata una congestione splenica tale da alterarne il microcircolo e portare così ad aree ipossiche/ischemiche; inoltre lo stato di gravidanza, in soggetto con emolisi da sferocitosi, può costituire un fattore di rischio aggiuntivo per ischemia splenica. La decisione di procedere alla splenectomia, in una tale situazione, si è configurata come la sola possibilità di migliorare le condizioni cliniche della paziente, pur a fronte dei rischi che un intervento di chirurgia maggiore comporta in una fase già avanzata di gravidanza. D'altra parte, il fatto di non poter garantire livelli adeguati di emoglobina alla paziente (prima dell'intervento i valori di Hb variavano tra 5,5 e 7 g/dl) faceva temere che il feto potesse subire conseguenze legate all'ipossia; inoltre il feto è stato monitorizzato fino alle ultime settimane di gravidanza per il temuto passaggio transplacentare di anticorpi anti Jka (presenti fino a un titolo di 1:256 all'ingresso della ragazza nel nostro reparto) tali da poter causare anemia fetale da emolisi. La presenza, nel fenotipo eritrocitario paterno, dell'antigene Jka aumentava la probabilità che anche il feto lo esprimesse. I controlli ecografici seriati eseguiti sul feto hanno sempre mostrato una normalità del flusso cerebrale, e quindi indirettamente escluso una anemizzazione. Ciò ha trovato conferma dopo la nascita, con una neonata in buone condizioni, senza segni di anemia.

L059

ALLUNGAMENTO DELL'aPTT IN BAMBINI ASINTOMATICI E RISCONTRO DI LUPUS ANTICOAGULANT (LAC) POSITIVO

S. Fasoli, M.L. Casciana, F. Buzi

Unità Operativa di Pediatria, Ospedale Carlo Poma, Mantova, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Gli anticorpi antifosfolipidi (APS) costituiscono un gruppo eterogeneo di autoanticorpi che reagiscono con gli antigeni fosfolipidici di membrana. Essi comprendono: il lupus anticoagulante (LAC), gli anticorpi anticardiolipina IgG e IgM e gli anti-beta 2 glicoproteina 1. Gli anticorpi antifosfolipidi sono presenti nella sindrome da anticorpi antifosfolipidi associati a eventi trombotici e aborti ricorrenti, oppure possono essere associati a: lupus eritematoso sistemico, altre malattie autoimmuni, neoplasie, farmaci e infezioni. La presenza del Lupus Anticoagulante (LAC) è una causa importante dell'allungamento dell'aPTT nel bambino e il suo riscontro in pazienti asintomatici è di solito casuale e generalmente determinata solo in presenza di aPTT allungato o durante test di screening prima di un intervento chirurgico. Questo studio ha lo scopo di comprendere l'incidenza e la presenza di Lupus Anticoagulante (LA) riscontrato dopo rilevazione di aPTT allungato, in bambini con infezioni ricorrenti.

METODI: è stato scelto di confrontare la nostra casistica con i dati presenti in letteratura, elaborando i dati relativi ai pazienti afferiti presso l'Ambulatorio in Ematologia Pediatrica negli ultimi 5 anni (2008-2012) con presenza di aPTT allungato.

RISULTATI: Tali pazienti nell'arco dei 5 anni erano 62 senza significativa differenza tra maschi e femmine con un'età media di 5.1 anni. Lo screening coagulativo veniva eseguito in occasione di un intervento chirurgico programmato e la storia clinica era significativa per presenza di infezioni ricorrenti delle alte vie aeree. Lo screening coagulativo era eseguito in occasione di un intervento chirurgico programmato e la storia clinica era significativa per presenza di infezioni ricorrenti delle alte vie aeree. Lo studio dei fattori della coagulazione in relazione all'allungamento dell'aPTT era nella norma. Le analisi ematologiche effettuate hanno permesso di isolare 8 bambini con presenza di LAC positivo. Tale dato riconfermato dopo sei mesi sia era negattizzato e l'aPTT era tornato nella norma.

CONCLUSIONI: I dati riportati nella nostra analisi corrispondono a quanto riportato in letteratura dove viene descritta la comparsa temporanea di anticorpi antifosfolipidi nel bambino in seguito ad un'infezione. Gli anticorpi anti fosfolipidi sono conosciuti come un'importante causa di trombosi nell'adulto e sono spesso presenti in pazienti con lupus eritematoso sistemico. Molti bambini sono invece asintomatici e quindi sottodiagnosticati. La prevalenza di anticorpi antifosfolipidi transitori associati alle infezioni virali nei bambini è molto più alta di quanto atteso. Vengono infatti descritti APS positivi in corso di infezioni virali: EBV, CMV, HIV, varicella, Parvovirus B19, Adenovirus, epatite C come pure in corso di infezioni batteriche quali Salmonella, Streptococco, Stafilococco. La complicità trombotica è estremamente rara. Sono stati descritti diversi meccanismi per spiegare il ruolo dei virus e dei batteri nell'induzione di un meccanismo autoimmune, come la somiglianza molecolare tra le strutture dei patogeni e i self antigeni in associazione con una predisposizione genetica. La possibile positività di APS in presenza di valori della coagulazione alterati va sempre considerata nei bambini con storia di infezioni recenti batteriche o virali. L'istituzione di due registri internazionali di bambini e neonati con APS (Ped-APS Register) può fornire una buona opportunità di condurre studi prospettici di ampie dimensioni sul significato clinico di aPL.

Bibliografia:

1. Incidence and Clinical Importance of Lupus Anticoagulant in Children With Recurrent Upper Respiratory Tract. Erdal Peker, Kaan Kavakli, Can Balkan, Deniz Karapinar and Baran Aydemir. *THROMB HEMOST* 2011.
2. Antiphospholipid antibodies in pediatric systemic lupus erythematosus and the antiphospholipid syndrome. T. Avcin and ED Silverman *Lupus* 2007.
3. Transient antiphospholipid antibodies associated with acute infections in children: a report of three cases and a review of the literature. H. Mizumoto, T. Maihara, et al. *European Journal of Pediatrics* - July 2006.

L060

PEDIATRIC PNH CLONES: REPORT ON 17 CASES FROM ClonePNH ARCHIVE

E. Cannizzo,^{1,2} D. Susca,³ A. Casati,³ A.M. Triolo,⁴ C. Lo Pardo,⁵ F. Buccisano,⁶ E. Tedone,⁷ A. Santoro,⁸ B.M. Oliva,⁹ V. Ottaviano,^{1,2} G. Carulli,¹ M. Rosetti,¹⁰ S. De Propriis,¹¹ A. Stacchini,¹² L. Vanelli,¹³ O. Perbellini,¹⁴ M. Arpinati,¹⁵ C. Bartocci,¹⁶ F. Gervasi,¹⁷ C. Armentano Conte,¹⁸ D. Tanca,¹⁹ P. Doretto,²⁰ F. Lanza,²¹ M. Geuna,²² L. Del Vecchio^{23,24}

¹Unità di Ematologia, Dipartimento di Oncologia, dei Trapianti e delle Nuove Tecnologie in Medicina, Università di Pisa; ²Unità Operativa Analisi Chimico-Cliniche, Ospedale Campo di Marte, ASL2 Lucca; ³Emmedi srl, Divisione Solaris, Milano; ⁴Divisione di Ematologia e Trapianto di Midollo, Policlinico Vittorio Emanuele – Ferrarotto Alessi, Catania; ⁵Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, AO A. Cardarelli, Napoli; ⁶Divisione di Ematologia, Policlinico Tor Vergata, Roma; ⁷Divisione Ematologia e Trapianto di Midollo Osseo, Ospedale San Martino, Genova; ⁸Divisione di Ematologia, Laboratorio di Diagnostica Integrata Oncoematologica e Manipolazione Cellulare, Ospedali Riuniti Villa Sofia Cervello, Palermo; ⁹Divisione di Ematologia, AO Bianchi Melacrinò Morelli, Reggio Calabria; ¹⁰Laboratorio Unico Area Vasta Romagna, Pievesestina (FC); ¹¹Divisione di Ematologia, Università La Sapienza, Roma; ¹²II Servizio di Anatomia Patologica, AO S. Giovanni Battista, Torino; ¹³Divisione di Ematologia, Policlinico San Matteo, Pavia; ¹⁴Sezione di Ematologia, Dipartimento di Medicina, Università di Verona; ¹⁵Unità Operativa di Ematologia, Policlinico Sant'Orsola Malpighi, Bologna; ¹⁶Immunologia Clinica e Tipizzazione Tissutale, AO Umberto I, Ancona; ¹⁷Divisione di Ematologia, Arnas Civico, Palermo; ¹⁸Divisione di Ematologia e Trapianto di Cellule Staminali, AO San Camillo Forlanini, Roma; ¹⁹Settore Ematologia, Citometria e Coagulazione, ASL 4 Chiavarese, Lavagna; ²⁰SOC di Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera "S. Maria degli Angeli", Pordenone; ²¹Unità Operativa di Ematologia, Istituti Ospitalieri di Cremona; ²²Laboratorio di Immunopatologia, Ospedale Mauriziano Umberto I, Torino; ²³Centro di Citometria Clinica e Sperimentale, CEINGE, Napoli; ²⁴Dipartimento

di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, Napoli, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is characterized by intravascular hemolysis variously associated with bone marrow failure and atypical thrombosis. There are three types of PNH; classic PNH, PNH associated to an other bone marrow disorder (AA or MDS) and subclinical PNH. It is a rare disease in children and little information is available. Subclinical PNH (i.e. small PNH clone in association with bone marrow failure in the absence of overt hemolysis) seems most often observed in children, particularly in the context of AA and MDS. To characterize the flow cytometry (FCM) features of PNH clone and to assess the main reasons for testing (RFT), we performed an analysis of pediatric records collected in ClonePNH Italian cytometric Archive from 2001 to February 2013.

METODI: We reviewed FCM records of 90 pediatric cases (<18 years) collected from 14 Regions. Seventeen cases were positive for a PNH clone. On these 17 PNH+ clones we evaluated size at first observation and during follow-up as well as the main RFT reported in the records. Data refer to analysis registered in Clone PNH Archive up to 21/02/2013.

RISULTATI: The median age reported in PNH+ pediatric records was 15.5 years (1-18). Four clones were found in Campania, 2 in Emilia-Romagna, 2 in Lazio, 5 in Lombardia, 1 in Friuli Venezia Giulia and 3 in Veneto. RFT included: *Aplastic Anemia* (AA, N=10), *Hemoglobinuria* (N=4), *Idiopathic Cytopenia* (N=1), *MDS* (N=2). All 17 pediatric pts were also categorized into 11 classes according to PNH clones sizes (Figure 1): 0.1-1%=4 clones; 1.1-10%=3 clones; 10.1-20%=4 clones; 20.1-30%=2 clones; 30.1-40%=0 clone; 40.1-50%=1 clone; 50.1-60%=0 clone; 60.1-70%=0 clone; 70.1-80%=0 clone; 80.1-90%=2 clones; 90.1-100%=1 clone. Of interest, most clones belonged to 80.1%-100% category (N=3) or 0.1-20% category (N=11). Just 3 clones showed a size ranging between 20.1% and 70%. Thus most of the clones belonged to the class ranging between 0.01-30%. Among these 17 pediatric records, 4 were sequentially analyzed with more than 2 determinations: 2 clones had a small size and the follow-up study resulted in no change of category (1.1%-10% and 10.1-20% respectively; RFT was AA); 1 clone had a small size with a follow-up resulting in a slight decrease of category (from 10.1%-20% to 1.1%-10% (RFT was AA); 1 clone had a small size with a follow-up resulting in a slight increase of category (from 1.1%-10% to 10.1%-20% (RFT was HEM).

CONCLUSIONI: We observed that most of pediatric cases had a small clone (0.01%-30%). AA was the most frequent RFT where a PNH clone was detected. By contrast, in adults *Hemoglobinuria* was the most frequent RFT, followed by AA. Two PNH clones in follow-up had no change in category, (1.1%-10% and 10.1-20% respectively; RFT was AA), while other two, one with a slight increase and one with a slight decrease respectively (RFT was AA and HEM respectively).

L061

LA SINDROME AUTOIMMUNE LINFOPROLIFERATIVA (ALPS): ESPERIENZA DEL NOSTRO CENTRO AIEOP

C. Cerchione, V. Russo, F. Tucci, G. Loffredo, N. Marra, R. Parasole, F. Petruzzello, N. Crescenzo, G. Menna, V. Poggi

Dipartimento di Oncoematologia Pediatrica, AORN "Santobono-Pausilipon", Napoli, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Le ALPS sono caratterizzate da linfoproliferazione e citopenia autoimmune (anemia emolitica e/o piastrinopenia e/o neutropenia). Frequentemente, la prima manifestazione clinica è la linfadenopatia cronica (> 6 mesi) e/o la splenomegalia, associate a citopenie e ipergammaglobulinemia policlonale. Multipli autoanticorpi, tra cui il test di Coombs diretto positivo, elevati livelli di IL-10 sierica, FAS ligando solubile e vitamina B12, presenza di linfociti TCRαβ+ CD3+ CD4- CD8- (DNT o doppi negativi) in citometria e le mutazioni dei genidiel pathwaydel FAS, coinvolti nei complessi meccanismidella morte cellulare, rappresentano biomarker molto utili ai fini diagnostici. In particolare, pazienti con mutazioni che bloccano la funzione del dominio intracellulare del FAS sono

a maggiore rischio di sviluppo di linfomi e, pertanto, richiedono monitoraggio a vita

La diagnosi di ALPS viene fatta in base ad uno score secondo i criteri diagnostici proposti dal "National Institutes of Health". Il trattamento consigliato è l'immunosoppressione e vari schemi di terapia sono correntemente utilizzati, dai corticosteroidi al micofenolato, e più recentemente la rapamicina (sirolimus), inibitore dell'mTOR. Nei casi con citopenie gravi refrattarie agli immunosoppressori è indicato il trapianto di midollo osseo. Nel nostro Dipartimento di Oncoematologia Pediatrica dell'A.O.R.N. "Santobono-Pausilipon", centro AIEOP, abbiamo analizzato con uno studio retrospettivo un gruppo di 6 pazienti con diagnosi di ALPS, tutti seguiti dalla fase diagnostica a quella di osservazione presso la nostra struttura.

METODI: Abbiamo analizzato con uno studio retrospettivo un gruppo di 6 pazienti con diagnosi di ALPS, di età media di 52,5 mesi (range 19 mesi - 11 anni), 1 maschio e 5 femmine (Tabella 1). Le citopenie all'esordio erano costituite dalla piastrinopenia in 5/6 (83%), l'anemia in 4/6 (66%) e la neutropenia in 2/6 (33%). L'83% (5/6) dei bambini presentava familiarità per patologie autoimmuni, verificate nel padre o nella madre, soprattutto tiroidee. Nella storia clinica, abbiamo notato un'importante prevalenza dell'opacità del cristallino, presente in 3/6 (50%), un paziente aveva ricevuto diagnosi di Rosai-Dorfman, e un paziente era affetto da Sindrome di Down. All'esordio, 3/6 dei pazienti (50%) presentavano contemporaneamente sia epatosplenomegalia che linfadenopatie multiple, 5/6 (83%) splenomegalia, 5/6 (83%) epatomegalia e 5/6 (83%) linfadenopatie multiple. All'analisi del sangue midollare, si è evidenziato un aumento della cellularità nel 50% dei pazienti, con un aumento dei megacariociti in 2/6 (33%). All'analisi dello striscio periferico si è evidenziata anisocitosi delle emazie in 3/6 (50%). L'analisi citogenetica e citofluorimetrica non ha fornito particolari informazioni, così come il dosaggio degli anticorpi anti-piastrine (positivo in 1/6) e anti-granulociti (negativo in tutti i pazienti). La valutazione dei linfociti doppio negativi ha mostrato un aumento in tutti i 6 pazienti. Lo studio dell'apoptosi indotta da attivazione dell'antigene FAS ha mostrato linfociti sopravvissuti e resistenti all'apoptosi indotta da attivazione dell'antigene FAS con anticorpo monoclonale specifico in tutti i pazienti analizzati (6/6). In uno dei sei pazienti (16%) si è riscontrata una mutazione C165G del gene TNFRSF6 nell'esone 5 codificante per FAS in eterozigosi, mentre questo tipo di mutazioni sono state escluse in tutti gli altri 5 pazienti. In uno dei sei pazienti (16%) è stato riscontrato anche un aumento dell'attività funzionale di ADAMTS13, con anticorpi Anti-ADAMTS13 assenti. Per quanto riguarda gli altri markers di autoimmunità, in 5/6 pazienti c'è stata la positività del test Coombs diretto e in 1/6 la positività degli ANA. Inoltre, in 3/6 pazienti si è riscontrato un aumento degli anticorpi antitireoglobulina. Un aumento dell'LDH si è evidenziato nella metà dei pazienti (3/6), mentre in 2/6 (33%) una riduzione delle IgA (Tabella 2).

RISULTATI: Tutti i pazienti analizzati sono stati trattati, 5/6 a diagnosi e solo uno dopo 5 anni di osservazione. La terapia di prima linea è stata IgG endovena + steroidi nei 3/6 dei pazienti (50%), con una risposta completa durata sette mesi, una risposta parziale che dura da 6 anni e un caso di non risposta, IgG endovena in monoterapia in 1/6 dei pazienti (16%) con una risposta parziale mantenuta per 18 mesi, e Ciclosporina + steroidi in 1/6 dei pazienti (16%) con una risposta par-

ziale durata 4 mesi (Tabella 3). Pertanto, 5 dei 6 pazienti (83%) sono passati a una terapia di seconda linea. In 1/6 (16%) si è passati a una terapia steroidea che ha portato a una risposta completa stabile mantenuta da 34 mesi e ancora presente. In 2/6 (33%) la seconda linea è stata effettuata con il Rituximab a dose standard per un totale di 4 somministrazioni col risultato di due risposte complete: in un caso seguita da mantenimento con IgG endovena da 6 anni e mantenuta fino a oggi, e nell'altro caso, paziente che aveva perso la risposta alla prima linea dopo 6 anni, la risposta completa è stata seguita da Allotraspianto di midollo osseo, che ha avuto ottimi risultati, visto che la paziente è ancora in risposta completa a 34 mesi dal trapianto. Nel 33% dei pazienti (2/6) si è passati a una terapia di seconda linea con il Sirolimus, con attento e continuo monitoraggio del dosaggio plasmatico del farmaco e opportune modifiche della dose al bisogno, con l'ottenimento di una risposta completa che dura da 16 mesi e una risposta parziale che dura da 18 mesi. I pazienti descritti hanno ricevuto diagnosi di ALPS tutti presso la nostra struttura trail 2000 ed il 2013, sono attualmente tutti vivi ed in buona salute e l'Overall Survival media è risultata di 58,8 mesi (range 20 - 154 mesi). Attualmente, tutti continuano i controlli e mantengono la risposta ottenuta.

CONCLUSIONI: La diagnosi e il trattamento delle ALPS e delle malattie ALPS-associate costituiscono una grande sfida diagnostica terapeutica, non solo per lo specialista oncoematologo ma anche e soprattutto per il pediatra che si trova per la prima volta di fronte a questi pazienti. Occorre considerare sempre questa patologia in diagnosi differenziale per tutti quei pazienti affetti da citopenia refrattaria con linfoproliferazione, organomegalia e linfadenopatie e presenza markers di autoimmunità. Nella nostra casistica sono risultati fondamentali ai fini diagnostici l'aumento dei linfociti doppi negativi e lo studio dell'apoptosi indotta da attivazione dell'antigene FAS. La terapia è stata indispensabile nella totalità dei pazienti e quasi tutti hanno richiesto almeno una seconda linea di terapia. Il rituximab e il sirolimus sono risultate terapie molto efficaci in seconda linea nei pazienti recidivati e refrattari e valide alternative alle classiche terapie con corticosteroidi ed IgG vena. Le ALPS, poiché esse costituiscono una patologia cronica, curabile ma non guaribile, e pertanto resta da chiarire ulteriormente il ruolo dell'unica strategia terapeutica che permette la guarigione, l'allotraspianto di midollo osseo, considerata anche la possibile evoluzione linfomatosa e la necessità di monitoraggio da continuare per tutta la vita.

Bibliografia:

- Campagnoli et al. "The broad spectrum of autoimmune lymphoproliferative disease: molecular bases, clinical features and long-term follow-up in 31 patient" *Haematologica* 2006; 91:538-541.
- Alix E.Seif et al. "Identifying autoimmune lymphoproliferative syndrome in children with Evans syndrome: a multi-institutional study" *Blood* 2010 115: 2142-2145.
- V. Konecni Rao et al. "How I treat autoimmune lymphoproliferative syndrome" *Blood* 2011 118: 5741-5751.
- Kennichi C. Dowdell et al. "Somatic FAS mutations are common in patients with genetically undefined autoimmune lymphoproliferative syndrome" *Blood* 2010 115: 5164-5169.

Tabella 1.

Pz	Età	Gr	Plt	N	Familiarità Autoimmunità	Milza	Fegato	Adeno	Apoptfas	Linf. Dn.
Rmp	11		X	X	X	X	X	X	Resist	↑
Sa	19	X	X		X	X	X	X	Resist	↑
Sk	36		X	X	X			X	Resist	↑
Mc	20	X	X		X	X	X	X	Resist	↑
Gs	84	X	X		X	X	X		Resist	↑
Da	24	X			No	X	X	X	Resist	↑

GR: ANEMIA, PLT: PIASTRINOPENIA, N: NEUTROPENIA, MILZA: SPLENOMEGALIA, FEGATO: EPATOMEGALIA, ADENO: LINFOADENOPATIA, APOPT FAS: STUDIO LINFOCITI SOPRAVVIVENTI E RESISTENTI ALL'APOPTOSI INDOTTA DA ATTIVAZIONE DELL'ANTIGENE FAS, LINF DN: LINFOCITI TCR + CD3+ CD4- CD8- (DNT o doppi negativi).

Tabella 2.

Pz	Anamnesi personale	IG	Coombs dir	Tiroide	Ldh	Mutaz TNFRSF6
RMP	Down	↓ IGG	Pos	ANTITG	NN	NO
SA	Rosai-dorfman, opacità cristallino		Pos	ANTITG	NN	C165G
SK	Opacità cristallino		Nn	NEG	NN	NO
MC	Opacità cristallino	↓ IGA	Pos	NEG	↑	NO
GS	Sintomi neurologici, assunzione cronica di aspirina		Pos	ANTITG	↑	NO
DA	Broncopneumite, febbre e rash	↓ IGA	Pos	NEG	↑	NO

IG: Dosaggio immunoglobuline sieriche, COOMBS DIR: Test di Coombs diretto, TIROIDE: Anticorpi tiroidei (AntiTG: antitiroglobulina), MUTAZ TNFRSF6: mutazione del gene TNFRSF6 nell'esone 5 codificante per FAS in eterozigosi

Tabella 3.

	1 linea	2 linea	3 linea/mantenim
RMP	IG VENA	PDN	
SA	IG VENA + STEROIDI	RITUXIMAB	ALLOBMT
SK	IG VENA + PDN	IG VENA + PDN + SIROLIMUS	
MC	SIROLIMUS		
GS	IGVENA + URBASON	RITUXIMAB	IG VENA
DA	PDN + CICLORPORINA	SIROLIMUS	

L062

NUOVI ASPETTI CLINICI IN DUE FAMIGLIE ITALIANE AFFETTE DALLA SINDROME EREDITARIA IPERFERRITINEMIA-CATARATTA

K. Perruccio,¹ F. Arcioni,¹ R. La Starza,² C. Cerri,¹ D. Romanelli,³ I. Capolsini,¹ M. Caniglia¹

¹SC di Oncoematologia Pediatrica, Ospedale Santa Maria della Misericordia, Perugia; ²SC di Ematologia ed Immunologia Clinica, Università degli Studi di Perugia, Perugia; ³SC di Oculistica, Ospedale Santa Maria della Misericordia, Perugia, Italy

La Sindrome Ereditaria Iperferritinemia-Cataratta, una rara malattia autosomica dominante, è caratterizzata da un aumento della produzione di L-ferritina, non associata ad accumulo di ferro, ma a cataratta bilaterale.¹ L'iperproduzione di L-ferritina è dovuta a più di 25 note mutazioni puntiformi del "iron responding element" (IRE) del gene dell'L-ferritina, localizzato sul cromosoma 19, che alterano l'interazione dell'IRE con le proteine citoplasmatiche che regolano l'omeostasi del ferro (IRP).^{2,3} Gli aggregati proteici di L-ferritina, chiamati corpi inclusi, si accumulano in modo preferenziale nel cristallino (3-5) causando la cataratta bilaterale: questo è l'unico danno d'organo conosciuto in questa sindrome.¹⁻⁵ L'Emocromatosi Ereditaria (EE) è invece una malattia autosomica recessiva associata a mutazioni del gene HFE localizzato sul cromosoma 6. In particolare, la mutazione C282Y è fortemente associata con EE, dal momento che circa il 90% dei pazienti con questo genotipo presentano accumulo di ferro.⁷ La mutazione H63D è un'altra frequente alterazione del gene HFE, che predispone alla EE, ma è associata a danno d'organo da sovraccarico di ferro solo nel 30% dei casi ed in presenza di fattori scatenanti, quali l'età adulta, comorbidità, alcolismo o assunzione di farmaci.^{7,8} In questo lavoro descriviamo i membri di due diverse famiglie non imparentate con disordini del metabolismo marziale.

CASO 1: Due fratelli di 8 e 9 anni giungevano alla nostra attenzione a causa di epilessia. L'elettroencefalogramma mostrava epilessia notturna frontale nel fratello maggiore ed epilessia Rolandica nel fratello minore. La RMN dell'encefalo era normale in entrambi. Gli esami ematologici mostravano iperferritinemia (1380 e 1461 ng/ml rispettivamente). I bambini presentavano entrambi cataratta bilaterale. L'analisi genetica mostrava la compresenza della mutazione del gene IRE C33T e della mutazione H63D del gene HFE. Quest'ultima era eterozigote nel fratello maggiore ed omozigote nel minore. Gli esami strumentali non hanno documentato danno d'organo e i bambini non hanno ricevuto alcun trattamento procedendo al solo monitoraggio della cataratta e delle manifestazioni neurologiche (Figura 1).

CASO 2: Un bambino di 7 anni giungeva alla nostra attenzione a motivo di iperferritinemia (653 ng/dl). Gli esami strumentali eseguiti

documentavano la presenza di cataratta monolaterale. Le analisi genetiche per le mutazioni del gene HFE erano negative mentre risultava positiva la mutazione del gene IRE C29G. L'anamnesi familiare documentava che la madre era inoltre affetta da iperferritinemia e carata ed era in salasso-terapia a motivo di accumulo marziale splenico documentato mediante RM; già dopo i primi due salassi si verificava una grave anemia ferrocarenziale, a causa della quale le procedure venivano sospese. Le indagini genetiche estese a tutta la famiglia permettevano di porre diagnosi di Sindrome Iperferritinemia Cataratta Familiare (Figura 2).



Figura 1. Albero genealogico familiare del Caso 1.

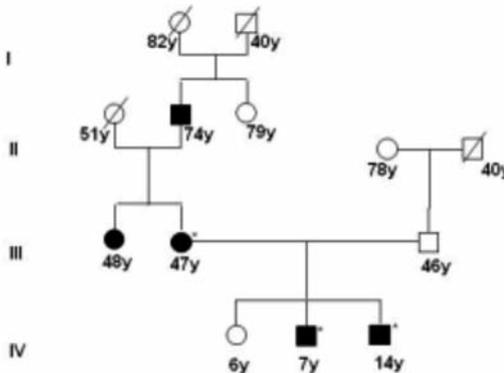


Figura 2. Albero genealogico familiare del Caso 2.

DISCUSSIONE: In presenza di bambini con caratta, soprattutto se bilaterale ed in relazione alla estrema rarità di tale fenomeno patologico nei pazienti pediatrici, risulta necessario procedere al dosaggio della ferritinemia in modo da potere escludere la presenza della Sindrome Iperferritinemia-Cataratta. D'altro canto in presenza di iperferritinemia la diagnosi differenziale con l'emocromatosi è fondamentale in termini terapeutici e prognostici, poiché un trattamento di ferro-deplezione in pazienti con Sindrome Iperferritinemia Cataratta non risulta indicato, ma anzi può provocare il cetoemoglobinemico da carenza marziale. Inoltre in questi casi per la prima volta vengono descritti danni d'organo associati alla Sindrome Iperferritinemia-Cataratta: l'epilessia e l'accumulo splenico. Tali casi aneddotici possono quindi rappresentare un input per la meglio definizione degli aspetti fisiopatologici di questa rara malattia genetica.

Bibliografia:

1. Antonella Roetto, Sandra Bosio, Enrico Gramaglia, Maria Rosa Barilaro, Gabriella Zecchina, and Clara Camaschella. Pathogenesis of Hyperferritinemia Cataract Syndrome. *Blood Cells Mol Dis.* 2002; 29: 532-535.
2. Junji Kato, Yoshiro Niitsu. Recent advance in molecular iron metabolism: translational disorders of ferritin. *Int J of Hematology.* 2002; 76: 208-212.
3. Gilles Hetet, Isabelle Devaux, Nadem Soufir, Bernard Grandchamp and Carole Beaumont. Molecular analyses of patients with hyperferritinemia and normal serum iron values reveal both L-ferritin IRE and 3 new ferroportin (slc11A3). *Blood.* 2003; 102: 1904-1910.
4. Malgorzata Goralska, Benjamin L. Holley, and M. Christine McGahan. Identification of a mechanism by which lens epithelial cells limit accumulation of overexpressed ferritin H-chain. *The Journal of Biological Chemistry.* 2003; 44: 42920-42926.
5. Malgorzata Goralska, Steven Nagar, Lloyd N. Fleisher, and M. Christine McGahan. Differential degradation of ferritin H- and L-chains: accumulation of L-chain-rich ferritin in lens epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2005; 46: 3521-3529.
6. Balas A, Aviles MJ, Garcia-Sanchez F, et al. Description of a new mutation in the L-ferritin iron responsive element associated with hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome in a Spanish family. *Blood.* 1999; 93: 4020-4021.
7. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al. A novel MHC class I like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. *Nat Genet.* 1996; 13: 399-408.

L063

MUTAZIONI SOMATICHE COME CAUSA DI SINDROME AUTOIMMUNE LINFOPROLIFERATIVA

A. Mondino,¹ S. Pagliano,¹ N. Crescenzo,¹ A. Doria,¹ L. Foglia,¹ E. Boggio,² A. Chiocchetti,² U. Dianzani,² U. Ramenghi¹

¹Ematologia, Dipartimento di Scienze della Salute Pubblica e Pediatriche, Ospedale Infantile Regina Margherita, Università di Torino, Torino; ²Dipartimento di Scienze della Salute, Università del Piemonte Orientale, Novara, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa (ALPS) è una patologia legata ad un disordine dell'apoptosi linfocitaria (Fisher GH et al, 1995; Rieux-Laucat et al, 1995). È caratterizzata da linfoproliferazione cronica non neoplastica (a livello linfonodale e splenico), determinata dall'accumulo di linfociti non andati incontro a una corretta apoptosi, da un incremento dei linfociti T TCR $\alpha\beta$ CD4-CD8- (DN: doppi negativi) nel sangue periferico e da manifestazioni autoimmuni più frequentemente ematologiche (citopenia multilineare) (Oliveira JB et al, 2010). Nella maggior parte dei casi il difetto è dovuto a una mutazione a carico del gene che codifica per Fas o di altri geni coinvolti nella trasduzione del segnale Fas-dipendente (geni delle CASPASI) (Rieux-Laucat F et al, 2003; Teachey DT, 2012). Nel 2004 venne dimostrata per la prima volta l'esistenza di mutazioni somatiche in soggetti con ALPS senza mutazione germinale (Holzelova E. et al, 2004). Queste mutazioni interessano i linfociti circolanti DN. MP è un bambino nato nel 1997, in cui, in base ai criteri del NIH formulati nel 2009, si diagnostica una sindrome autoimmune linfoproliferativa. Oltre ad una rilevante splenomegalia (polo inferiore splenico palpabile in fossa iliaca) e linfadenopatia (linfo-

centri in sede laterocervicale del diametro di oltre 5 cm) il bambino presenta un livello di cellule DN superiore al 13%. Inoltre i linfociti sono resistenti ai test di apoptosi linfocitaria Fas-mediata, e nel sangue si rilevano elevate concentrazioni di Fas ligando solubile, interleuchina 10 e vitamina B12. Negli anni si osservano ricorrenti episodi di anemia emolitica autoimmune, neutropenia e piastrinopenia, tutti responsivi al trattamento con steroidi. Si osserva inoltre un'importante riduzione del livello di immunoglobuline (deficit grave di IgA e IgM e riduzione dei valori di IgG). Tutte le indagini molecolari volte ad identificare la causa del deficit di apoptosi danno esito negativo. Viene quindi eseguita la ricerca di mutazioni selettivamente sulla popolazione di DN, che evidenzia una alterazione di sequenza nella regione codificante (c.843_844insCAG). La mutazione, pur non alterando la cornice di lettura, determina l'inserzione di una glutammina.

METODI: L'analisi dei geni Fas, FasL e caspasi 10 è stata effettuata mediante sequenza previa amplificazione. Il dosaggio di Fas-L e IL-10 valutati con ELISA (DuoSet R&D System). Il dosaggio della vitamina B12 con metodica LIA (Luminescence immunoassay) e kit Roche Diagnostics. La popolazione di cellule T TCR $\alpha\beta$ CD4-CD8- è stata separata con Double-negative T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec).

RISULTATI: Descriviamo un paziente ALPS con un quadro massivo di adenopatia e splenomegalia, che, pur avendo un livello di linfociti T "doppi negativi" molto elevato, non presenta alterazioni di sequenza alle indagini "standard". La successiva analisi di sequenza condotta sui DN, evidenzia una mutazione causale. Il paziente inoltre sviluppa ipogammaglobulinemia, confermando l'esistenza di pazienti ALPS, il cui quadro clinico si sovrappone a quello dei pazienti con immunodeficienza comune variabile (CVID), in particolare al sottogruppo che sviluppa complicanze autoimmuni e presenta linfoproliferazione.

CONCLUSIONI: Il nostro caso suggerisce di eseguire la ricerca di mutazioni nella popolazione di cellule TCR $\alpha\beta$ CD4-CD8- in quei soggetti con valori di DN elevati (specie se superiori al 5%), risultati negativi all'analisi di mutazione germinale. Il riscontro di una mutazione somatica permette la corretta classificazione della patologia, consente di escludere l'interessamento di altri famigliari evitando loro costose indagini. Riteniamo inoltre importante raccogliere questi casi per consentire una correlazione con il fenotipo e con la prognosi e per valutare le eventuali indicazioni ad approcci terapeutici differenti.

L064

ANALISI RETROSPETTIVA DI UNA COORTE DI 21 PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA LINFOISTIOCITOSI EMOFAGOCITICA CON MUTAZIONE GENETICA SCONOSCIUTA: CARATTERISTICHE CLINICHE ED OUTCOME

G. Giardino,¹ C. Veropalumbo,¹ E. Cirillo,¹ V. Gallo,¹ F. Maio,¹ T. Esposito,¹ R. Naddei,¹ F. Grasso,¹ C. Di Lillo,¹ V. Poggi,² C. De Fusco,² C. Pignata¹

¹Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Unità Operativa Complessa di Immunologia Pediatrica, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli; ²Azienda Ospedaliera di Riferimento Nazionale, Pausilipon, Napoli, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La linfoistiocitosi emofagocitica (HLH) è una patologia rara associata a diverse alterazioni genetiche, anche se, in molti casi, non è possibile riscontrare alcuna anomalia. Scopo dello studio è descrivere le caratteristiche cliniche e gli outcome di una coorte di pazienti pediatrici con HLH con mutazione genetica sconosciuta.

METODI: 21 pazienti sono stati inseriti nello studio. La diagnosi di linfoistiocitosi emofagocitica veniva posta sulla base dei criteri HLH-2004. Per ciascun paziente sono stati raccolti dati clinici e laboratoristici alla diagnosi e dopo 2 settimane di terapia.

RISULTATI: Il rapporto maschio-femmina è 1,6:1. Comorbidità sono state trovate nel 52% dei pazienti (leishmaniosi viscerale, 9.5%; neoplasie ematologiche, 18.9%; altre malattie genetiche del metabolismo, il 18.9%; artrite reumatoide, 4.7%). Tutti i pazienti avevano febbre ed anemia all'esordio ed il 95% anche trombocitopenia. Rispetto alle forme familiari, l'età media di insorgenza era più avanzata (3.7 anni), solo 3 pazienti mostravano citopenia trilineare e solo il 9% dei pazienti presentava coinvolgimento neurologico con negatività dei parametri liquorali. Il 90% dei pazienti aveva tutte le principali alterazioni di laboratorio (citopenia bilineare, ipertrigliceridemia e/o ipofibrinogenemia, aumento della ferritina sierica). Il 71% dei pazienti mostrava segni di emofagocitosi alla biopsia osteomidollare. Per quanto concerne l'

outcome, in 2 pazienti con leishmaniosi si osservava la remissione a seguito di terapia con amfotericina-b e steroidi, in 3 pazienti a causa della ricorrenza di HLH veniva praticato con successo il trapianto di midollo osseo, in 2 casi si osservava una remissione spontanea. In 7 pazienti si osservava la remissione a seguito di terapia con 3 farmaci (ciclosporina, steroidi, etoposide), 4 necessitavano di trattamento con 2 farmaci ed in 2 casi si osservava la remissione a seguito di terapia con steroide.

CONCLUSIONI: Il decorso clinico della HLH pediatrica con alterazione genetica sconosciuta è più favorevole della FHLH, come suggerito da un esordio più tardivo, minore coinvolgimento neurologico ed un migliore outcome. Poiché in questo gruppo l'HLH è costituita da diverse entità cliniche, la definizione del meccanismo patogenetico responsabile è dirimente per una migliore gestione dei pazienti.

L065

UN RARO CASO DI PIATRINOPENIA EREDITARIA

G.Vergine, M.E. Guerzoni, R. Pericoli, B. Filippini, P. Sacchini, V. Vecchi

Unità Operativa di Pediatria, Sezione Oncoematologia Pediatrica, Ospedale Infermi, Rimini, Italy

CASO CLINICO: G.S. è giunto alla nostra osservazione presso l'UO di Pediatria dell'Ospedale Infermi di Rimini all'età di 9 mesi per piastrinopenia di grado lieve (90-100000/mmc). Fin dalla nascita è stato regolarmente monitorato per la conta piastrinica per la presenza di una storia familiare singolare: madre affetta da PTI diagnosticata all'età di 22 anni trattata con steroidi ed immunoglobuline senza beneficio; nonna zio materni affetti da trombocitopenia documentate in età adulta quale riscontro occasionale (valori intorno ai 50000/mmc); in nessuno dei familiari affetti venivano riferite manifestazioni emorragiche. Il numero delle piastrine è risultato normale fino al 7° mese di vita. Successivamente il persistere di una moderata piastrinopenia (intorno ai 100.000/mmc) associata ad incostante e modesta neutropenia (PMN > 1000 < 1500/mmc) hanno suggerito ulteriori accertamenti. All'ingresso: buone condizioni generali, non sanguinamenti mucocutanei, anamnesi patologica prossima negativa per episodi infettivi, assunzione di farmaci. Accertamenti eseguiti: ANA, anticorpi anti-piastrine, anti-leucociti negativi. Valutazione citomorfologica dello striscio di sangue periferico: assenza di corpi di inclusione citoplasmatici abitualmente presenti nella maggior parte dei neutrofilii, eosinofili e monociti (simili a corpi di Dohle) caratteristici dell'anomalia di May-Hegglin. La maggior parte delle piastrine appaiono di grandi dimensioni. Aspirato midollare: striscio di sangue a cellularità normale e polimorfa; ben rappresentate le tre serie citoevolutive nei diversi stadi maturativi e differenziativi; megacariociti di forma e numero normali. Analisi dell'immunofenotipo piastrinico: riduzione dell'espressione della glicoproteina Ib, compatibile con sindrome di Bernard-Soulier. Studio genetico: presenza in eterozigosi di sostituzione nucleotidica missense C171>A, determinante la sostituzione aminoacidica dell'asparagina in posizione 41 con Lisina (N41K) nella glicoproteina Ib alfa, compatibile con variante di sindrome Bernard Soulier eterozigote a trasmissione autosomica dominante. La diagnosi di variante di Sindrome di Bernard Soulier è stata confermata anche nella madre.

CONCLUSIONI: La sindrome di Bernard-Soulier è una rara patologia ereditaria causata dall'assenza o riduzione dell'espressione sulla superficie piastrinica del complesso glicoproteico GPIb-IX, sito di legame del fvW tappa importante nel processo emostatico. Inoltre la GPIb è il sito d'attacco della trombina, potente attivatore fisiologico piastrinico. I pazienti affetti presentano piastrinopenia, di grado variabile da caso a caso con piastrine di grandi dimensioni all'osservazione dello striscio di sangue periferico. La membrana piastrinica appare più deformabile del normale, verosimilmente perché si vengono ad alterare i rapporti tra GPIb ed il citoscheletro della piastrina. Tali piastrine mostrano difetti funzionali multipli, inclusa un'alterata risposta alla stimolazione con trombina ed incapacità di legare il fvW con conseguente fallimento nell'adesione piastrinica all'endotelio vascolare danneggiato e formazione di trombi anomali nei siti di danno vascolare. La sindrome di Bernard-Soulier non è una diagnosi sempre agevole, talora erroneamente trattata come PTI con steroidi e splenectomia senza successo. Utile ricordare che la diatesi emorragica nei pazienti con tale sindrome è sproporzionata rispetto all'entità della piastrinopenia e ciò conferma la coesistenza di un'alterata funzionalità piastrinica. Per tale motivo di fronte ad un caso di piastrinopenia moderata persistente è importante raccogliere un'anamnesi accurata per poter distinguere le forme fami-

liari dalle forme ereditarie e ovviamente escludere le forme acquisite ben più frequenti come le post-infettive e quelle da farmaci o vaccini. Tuttavia la presenza di un'anamnesi familiare muta non esclude la possibile presenza di una forma genetica, dato che è possibile la trasmissione recessiva e la presenza di casi sporadici. L'aspetto laboratoristico specifico della sindrome è l'assenza di aggregazione piastrinica in risposta alla ristocetina; reazione che necessita l'interazione GPIb-vWF. Decisivi ai fini diagnostici, oltre la valutazione citomorfologica delle piastrine nel sangue periferico e la misurazione del loro volume, sono lo studio dell'immunofenotipo piastrinico ed in particolare lo studio genetico che consente di definire in modo preciso l'anomalia alla base del difetto piastrinico.¹

Bibliografia:

1. P Noris, C Klersy, M Zecca et al. Platelet size distinguishes between inherited macrothrombocytopenia and immune thrombocytopenia; *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2009; 7: 2131-2136.

L066

ATROFIA CEREBRALE DA DEFICIT DI VITAMINA B-12 IN UN BAMBINO DI 11 MESI ALLATTATO ESCLUSIVAMENTE AL SENO

P. Corti, C. Rigotti, A. Lazzarotti, F. Zucchetti, A. Cattoni, A. Brambilla, N. Maserà

Clinica Pediatrica, MBBM, S. Gerardo, Università degli Studi Milano Bicocca, Monza (MB), Italy

PRESENTAZIONE DEL CASO: L'anemia microcitica sideropenica è la forma più comune di anemia in età pediatrica. A fronte delle molteplici cause acquisite di sideropenia, esistono rare forme geneticamente determinate. Tra queste l'anemia ferro-carente ferro-refrattaria (IRIDA) è una rara anemia microcitica a trasmissione autosomica recessiva dovuta a mutazioni nel gene *TMPRSS6*. Questo gene codifica per la proteina matriptasi-2 implicata nella regolazione di epcidina, ormone chiave nella regolazione del metabolismo del ferro, che agisce inibendo la ferroportina, unico esportatore del ferro cellulare, sia a livello intestinale che macrofagico. Mutazioni di *TMPRSS6* determinano livelli di epcidina inappropriatamente elevati rispetto allo stato del ferro e quindi, un ridotto assorbimento di ferro a livello intestinale ed un ridotto rilascio dai depositi. I soggetti affetti sviluppano un'anemia ferro-carente che non risponde al trattamento marziale orale e solo parzialmente al trattamento parenterale. L'anemia può essere da moderata a severa, la microcitosi è spiccata ed il quadro marziale è caratteristico con livelli di ferritina normali o bassi e percentuale di saturazione della transferrina molto bassa. La prevalenza e l'incidenza di questa patologia non è nota. Riportiamo lo screening eseguito in un centro pediatrico di secondo livello per l'identificazione delle rare forme congenite di anemia sideropenica. Riportiamo il caso di un bambino di 11 mesi, nato a termine da parto eutocico in gravidanza normodecorsa, ricoverato per sonnolenza, pallore ed ipotono progressivo con mancata acquisizione delle ultime tappe dello sviluppo psicomotorio (passaggio in statica assente), non evidenza di organomegalia. Il bambino, che presentava un accrescimento staturale-ponderale ai limiti superiori di norma (peso 75° percentile, altezza 50°-75°percentile), aveva presentato uno sviluppo psicomotorio nella norma fino al 10° mese. La dieta era costituita esclusivamente di latte materno per rifiuto dello svezzamento. La valutazione neurologica ha evidenziato un moderato ritardo neuromotorio (passaggi posturali non eseguiti, passaggio in statica assente) pur senza segni di compromissione centrale; la RMN encefalo ha mostrato ampliamento dei solchi corticali in sede fronto-temporo-parietale bilaterale (Figura 1).

Gli esami eseguiti evidenziavano una moderata anemia normo/macrocitica con reticolocitopenia ed importante anisocitosi (Hb 8,5 g/dL; MCV 84 fL; reticolociti 12,8 x 10⁴/mL; RDW 25,8%), restanti serie ematiche nella norma (leucociti 4,5 x 10⁹/L; piastrine 363 x 10⁹/L). La morfologia eritrocitaria confermava la spiccata anisocitosi ed evidenziava importante anisopoichilocitosi (presenza di dacriociti, schistociti, ellisociti). In considerazione dell'anamnesi alimentare (allattamento esclusivo al seno) è stato eseguito uno screening nutrizionale che ha evidenziato un quadro marziale e folati nei limiti di norma (sideremia 132ug/dL, ferritina 35ng/mL, transferrina 264 mg/dL, saturazione della transferrina 35%; folati 29,24 ng/mL), ma un franco deficit di vitamina B12 (78 pg/mL, v.n. >190). Per il rialzo degli indici di emolisi (LDH 1097 U/L, bilirubina totale 1,3 mg/dL; bilirubina indiretta: 0,9

mg/dL) sono stati eseguiti anche test di Coombs diretto e indiretto, resistenze osmotiche eritrocitarie con Pink test e test di lisi al glicerolo, dosaggio del G6PDH eritrocitario risultati tutti nella norma; l'elettroforesi dell'emoglobina è parsa compatibile con l'età del paziente (emoglobina A2 3,2% ed emoglobina F 1,7%). È stata quindi posta diagnosi di deficit di vitamina B12. È stata quindi intrapresa una terapia parenterale con idrossicobalamina (1000 mcg im per 5 giorni), indi orale (1000 mcg/die) per 3 mesi; una profilassi marziale orale alla dose di 2,5 mg/Kg/die è stata associata. Un programma di fisioterapia è stato impostato. Gli accertamenti eseguiti per determinarne l'origine eziologica, hanno evidenziato un deficit subclinico presente anche nella madre (Hb 9,5 g/dL; MCV 76 fl; B-12 87 pg/mL) che è tuttora in accertamento e follow-up presso un centro dell'adulto per l'eziopatogenesi ed il trattamento del caso. Il follow-up nei mesi successivi ha mostrato normali livelli di vitamina B12 (dopo 1 mese vitamina B12 2190 pg/mL) e delle conte ematiche (dopo 1 mese Hb 13,5 g/dL, MCV 75 fL) con progressivo recupero sul piano neuromotorio del bambino fino a completa normalizzazione a distanza di 6 mesi dall'evento.

pari circa al 33% della concentrazione ematica della madre; inoltre bambini nati da madri carenti di vitamina B12 hanno depositi ridotti già alla nascita) hanno prodotto un grave quadro neurologico con evidente atrofia corticale. Sintomi neurologici, regressione delle tappe psicomotorie precedentemente acquisite, rifiuto dello svezzamento (presente nel 50-80% dei bambini) sono spia di possibile carenza di vitamina B12. La sorveglianza dei pediatri di base sul territorio per un adeguato allattamento e svezzamento insieme ad una attenzione rivolta anche alla madre ed al suo stato nutrizionale (situazioni simili si sviluppano con madri vegane) appaiono di primaria importanza al fine di evitare quadri neurologici anche gravi e, se non corretti, potenzialmente permanenti.

L067

NEUTROFILIA CRONICA IDIOPATICA IN DUE GEMELLE.

F. Altomare,¹ G.A. Mazza,¹ F. Parisi,¹ C. Giancotta,¹ C. Fusaro,² R. Miniero³

¹Cattedra di Pediatria, Università "Magna Graecia", Catanzaro;

²Pediatra di Famiglia, ASP Cosenza, Cosenza; ³Direttore Scuola di

Specializzazione in Pediatria "Università Magna Graecia" - Catanzaro, Italy

Per CIN (*chronic idiopathic neutrophilia*) si definisce una condizione di leucocitosi neutrofila primaria, asintomatica e persistente in cui l'incremento della conta totale dei granulociti neutrofili risulta essere superiore a 7500 cellule per μL .¹ Tale condizione è epifenomeno clinico di un *disequilibrium* tra la funzione linfopoietica midollare, commissionata verso la filiera granulocitaria e quella emocateretica a cui consegue un maggiore *rate* di produzione midollare e sopravvivenza periferica dei granulociti neutrofili.^{2,3} L'eziologia è ancora sconosciuta e al momento non sono stati individuati geni responsabili. La diagnosi differenziale è mirata ad escludere altre forme primarie in cui sono chiamate in causa anomalie dei meccanismi cellulari di adesione e motilità (sindrome LAD: *leukocyte adhesion deficiency*), alterazioni recettoriali a carico dei fattori citochinici quali G-CSF-R: *granulocyte colony-stimulating factor receptor*, implicati nei meccanismi di proliferazione e differenziazione midollare nonché responsabili di una forma di neutrofilia cronica familiare congenita,⁴ fenomeni di alterata emarginazione periferica,^{1,5} nonché possibili sindromi mieloproliferative, di cui lo status neutrofilico ne può rappresentare la fase prodromica: *Chronic myelogenous leukemia* (CML), *Familial cold autoinflammatory syndrome* (FCAS), *Ph- chromosome-negative myeloproliferative neoplasms* (Ph-MPN).⁶ Un quadro neutrofilico reattivo si registra in corso di iposplenismo o asplenia congenita, anemia emolitica cronica, PTI, sindrome di Down, stress, tabagismo ed obesità.⁷ Si documentano cause infettive o infiammatorie croniche-ricorrenti: *Acute febrile neutrophilic dermatosis* (AFND), *Juvenile Idiopathic Arthritis* (JIA), Tiroidite di Hashimoto, psoriasi, asma.⁸ Alcuni farmaci sono implicati nel determinare un maggiore indice di rilascio di progenitori polimorfonucleati dalle riserve midollari: corticosteroido-terapia sistemica protratta (idrocortisone, prednisone), litio, tetracicline, G-CSF.⁹ In tutte queste condizioni la clinica non è mai muta. Presentiamo il caso di due gemelle monocoriali N.C e A.C di 22 anni, giunte alla nostra osservazione a seguito di un persistente incremento della conta neutrofila presente fin dai primi mesi di vita. Eventi perinatali riferiti nella norma. L'anamnesi risulta negativa per eventi infettivi ricorrenti o infezioni croniche ricorrenti, non vengono documentate malattie infiammatorie croniche pregresse o intercorrenti. Non episodi di febbri ricorrenti. Non alterazioni spleniche né a carico dei linfonodi. Vengono escluse inoltre eventuali cause iatrogene. Non obesità. L'anamnesi familiare risulta negativa per neutrofilia cronica; non vi è evidenza di consanguineità. Entrambe le pazienti si presentano in buone condizioni di salute, asintomatiche e apiretiche, non segni di infezioni in atto. L'esame obiettivo risulta negativo. I parametri laboratoristici confermano l'incremento nei granulociti neutrofili normali per morfologia ed assenza di alterazioni quantitative/qualitative a carico delle altre linee emopoietiche. Indici di flogosi nella norma. L'*imaging* ecografico non ha mostrato segni di iposplenismo o asplenia. Non abbiamo ritenuto necessario effettuare aspirato midollare né l'analisi citogenetica.

CONCLUSIONI: La persistente neutrofilia riscontrata negli anni in assenza di sintomatologia clinica ci ha fatto escludere forme di leucocitosi reattiva o secondaria e ci ha indirizzato verso una forma di neutrofilia cronica idiomatica: CIN. A nostra conoscenza è la prima volta che una simile forma viene descritta in una coppia di gemelli monocoriali. L'andamento del tutto sovrapponibile nel tempo del quadro ematologi-

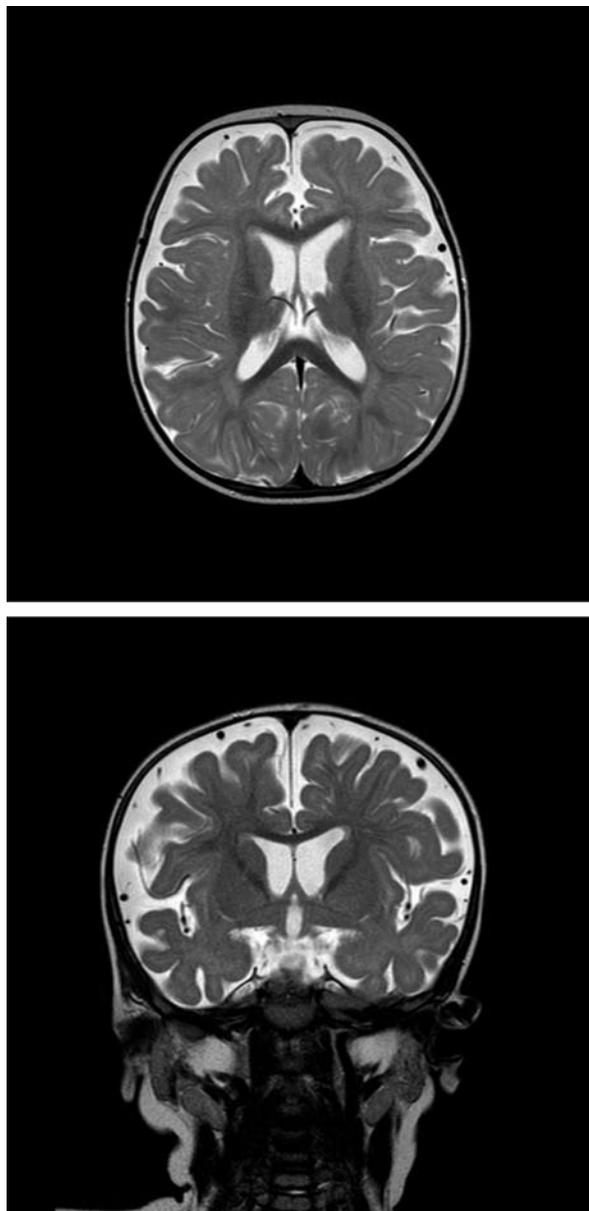


Figura 1.

CONCLUSIONI: La carenza di vitamina B-12 materna insieme all'allattamento esclusivo al seno (l'approvvigionamento di vitamina B-12 avviene esclusivamente tramite la dieta con alimenti di origine animale; peraltro la concentrazione di vitamina B12 nel latte materno è

co (Figura 1) nelle due pazienti è fortemente indicativa per un meccanismo genetico della forma morbosa.

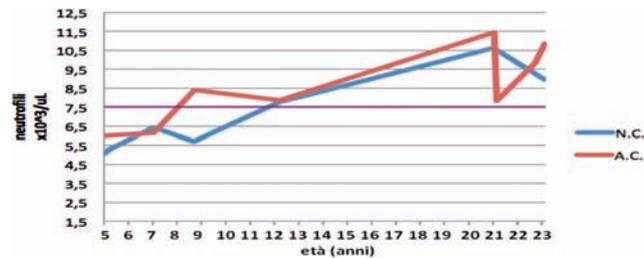


Figura 1. Andamento temporale del valore assoluto dei neutrofili nelle due pazienti.

Bibliografia:

- Orkin & Nathan & Ginsburg & Look & Fisher & Lux "Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood", 7th Edition Saunders- Elsevier 2008
- John P. Greer, John Foerster, et al. "Wintrobès Clinical Hematology", Lippincott Williams & Wilkins (LWW), 2009
- R. M. Kliegman, B. F. Stanton et al. "Nelson Textbook of Pediatrics", 19th Edition Saunders- Elsevier 2011
- I. Plo, Y.Zhang et al. "An activating mutation in the CSF3R gene induces a hereditary chronic neutrophilia" J. Exp. Med Vol 206, 1701-1707- 2009
- R.I.Handin, S. E.Lux et al. "Blood: Principles & Practice of Hematology", Lippincott Williams & Wilkins, 2003
- A.B.Weir, J.B.jr Lewis et al. "Chronic idiopathic neutrophilia: experience and recommendations." South Med Journal. Vol 104, 499-504, 2011
- R.A.Joyce, J. O' Donnell et al. "Asplenia and abnormal neutrophil kinetics in chronic idiopathic neutrophilia" M.J.Med Vol 69, 633-636, 1980
- M. Saeed, G.E. Brown et al. "Autoimmune clustering: sweet syndrome, Hashimoto thyroiditis and psoriasis." J.Clin.Rheumatol. Vol. 17, 76-78, 2011
- D. C. Dale, A.S. Fauci et al. "Comparison of agents producing a Neutrophilic leukocytosis in man" J. Clin. Invest. Vol 56, 808-813, 1975

L068

LA DAPTOMICINA RISULTA EFFICACE E CONSENTE IL SALVATAGGIO DEL CVC NELLE INFEZIONI DA GERMI MULTIRESISTENTI

R. Ortolano,¹ F. Di Marco,² A. Grigoli,² A. Trizzino,² S. Tropia,² L. Fonte,² A. Guerriero,² R. Mattei,² O. Ziino,² P. D'angelo²

¹Scuola di Specializzazione in Pediatria, Università degli Studi di Palermo, Palermo; ²UO di Oncoematologia Pediatrica, ARNAS Ospedale Civico e Di Cristina, Palermo, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il Catetere Venoso Centrale (CVC) rappresenta un ausilio irrinunciabile nella cura dei pazienti pediatrici affetti da neoplasie maligne. Le infezioni CVC correlate tuttavia sono complicanze severe e rappresentano spesso un'indicazione alla rimozione del dispositivo vascolare. Lo *Stafilococcus aureus* è l'agente infettivo più frequente isolato, ma sono sempre più numerose le segnalazioni di ceppi di *Stafilococcus* diversi e con profili di resistenza agli antimicrobici sempre più ampi. Nel nostro Centro abbiamo documentato negli ultimi anni un incremento della frequenza delle infezioni dei CVC (dati non pubblicati) non responsive ai trattamenti convenzionali di prima linea (teicoplanina). La daptomicina è un antibiotico lipopeptidico di recente introduzione che ha dimostrato di essere efficace nei confronti dei batteri GRAM + meticillino-resistenti. Tuttavia l'esperienza dell'uso di questa molecola sulla popolazione pediatrica è ridotta ed in letteratura esistono solo rare segnalazioni. Al fine di evitare la generalizzazione dell'infezione e di evitare la rimozione del CVC abbiamo utilizzato la daptomicina per via endovenosa per la sterilizzazione del sito e l'eradicazione dell'infezione.

METODI: Sette pazienti (età media di 11,9 anni, range, 3,2- 14,8 anni) affetti da neoplasie maligne seguiti presso l'U.O. di Oncoematologia pediatrica dell'Ospedale Civico di Palermo con infe-

zioni CVC correlate resistenti a trattamenti convenzionali sono stati sottoposti a terapia con daptomicina endovena (dose media 6 mg/Kg/die, range 5,5-6,5). Tre pazienti erano affetti da leucemia linfoblastica acuta, tre da neuroblastoma e un paziente da carcinoma desmoide. Cinque pazienti erano in fase di trattamento chemioterapico secondo il loro protocollo di cura, due pazienti erano ricoverati per il trapianto di cellule staminali emopoietiche. Tutti i pazienti erano portatori di CVC: in cinque pazienti di tipo Groshong, in due pazienti un Porth a Cath.

RISULTATI: Cinque pazienti presentavano coltura del tampone CVC positiva per *Stafilococchi* coagulasi-negativi produttori di β -lattamasi meticillino-resistenti, una coltura del tampone CVC positiva per *Stafilococcus aureus* produttore di β -lattamasi; una emocoltura positiva per *Stafilococcus coagulasi-negativo* produttore di β -lattamasi meticillino-resistente. Non erano presenti evidenze microbiologiche di resistenza alla daptomicina (tutti sensibili con MIC tra 0,5 e 1). Un solo paziente presentava sintomi sistemici (FUO). Cinque pazienti presentavano sintomi locali al punto di emergenza del CVC (iperemia, secrezione purulenta). In due pazienti con FUO durante la fase di aplasia in corso di TMO la terapia è stata somministrata in modo empirico sulla scorta di un precedente isolamento dal CVC. In una paziente era presente emocoltura positiva per *Stafilococcus* meticillino resistente. Nei restanti quattro pazienti la terapia è stata somministrata sulla scorta dei segni locali di infezioni e degli isolamento colturali. I cinque pazienti non TMO non presentavano neutropenia e la terapia è stata somministrata in regime di DH.

CONCLUSIONI: I due pazienti TMO non hanno sviluppato segni clinici o di infezione da *Stafilococcus* CVC correlata né isolamenti di *Stafilococchi* da altri siti o in fasi successive della procedura trapiantologica. L'uso nel setting del trapianto si è dimostrata pertanto efficace. Tutti gli altri 5 pazienti sono stati considerati clinicamente guariti dopo la fine del trattamento con daptomicina (efficacia 100%). L'eradicazione microbiologica (colture negative) dal punto di emergenza del CVC è stata raggiunta in 6/7. Nessuno degli episodi infettivi considerati ha costituito un'indicazione clinica alla rimozione del CVC. La tollerabilità al farmaco è stata buona e non si sono osservati effetti collaterali degni di nota. La daptomicina si è quindi rivelato un farmaco sicuro ed efficace nel trattamento di pazienti pediatrici con infezioni da *Stafilococcus* CVC correlati anche nei casi di multi resistenza agli antibiotici e ha consentito il mantenimento in sito del CVC.

L069

LA GESTIONE DEL BAMBINO ONCOLOGICO NELL'AMBITO DELLA RETE INTERREGIONALE DI ONCOEMATOLOGIA PEDIATRICA DEL PIEMONTE E DELLA VALLE D'AOSTA: ESPERIENZA DELLE S.C. PEDIATRIA DI SAVIGLIANO E IVREA

N. Sardi,¹ A. Barbara,² C. Nasi,¹ S. Fungi,¹ A. Bonomi,² L. Besenon,¹ E. Frulio,¹ F. Fagioli³

¹SC Pediatria, Ospedale S.S. Annunziata, Savigliano (CN); ²SC Pediatria, Ospedale di Ivrea, Ivrea (TO); ³SC Oncoematologia e Centro Trapianti, Ospedale Regina Margherita, Torino, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La Rete Interregionale di Oncologia e Oncoematologia pediatrica, nell'ambito del progetto organizzativo della Rete Oncologica del Piemonte e della Valle d'Aosta, è stata approvata dalla Giunta della Regione Piemonte con delibera n. 30-14272 del 6 dicembre 2004 e successivamente modificata con la delibera n. 25-13769 del 29 marzo 2010. La Rete Pediatrica è stata creata al fine di fornire risposte immediate, più vicine alle esigenze della popolazione e garantire le cure appropriate per le patologie oncologiche del bambino, in accordo con quanto previsto dalle Linee Guida Nazionali per l'oncologia e l'oncoematologia pediatrica, pubblicate sulla G.U. del 07.10.1999, n. 236. La Rete di Oncologia e Oncoematologia pediatrica è composta dal Centro di Riferimento Interregionale, identificato nel Polo Oncologico di Torino, con sede presso l'ASO OIRM/Sant'Anna (responsabile: dott.ssa Franca Fagioli - direttore S.C. Oncoematologia e Centro Trapianti) e sette Unità Satellite, dislocate sul territorio del Piemonte e della Valle d'Aosta, attivate nelle Aziende sedi di Polo o nelle Aziende afferenti. Nel Centro di Riferimento sono effettuate la diagnosi, la stadiazione e viene impostata la terapia, compresa quella di supporto e palliativa, secondo i protocolli di diagnosi e cura, nazionali ed internazionali. Sono effettuati i cicli chemioterapici complessi, la radioterapia e i trapianti di cellule staminali emopoietiche; viene organizzato il follow-up

dei pazienti in terapia e off-therapy. Nelle Unità Satellite si ha la definizione del sospetto diagnostico, l'effettuazione di cicli di chemioterapia, i controlli pre e post chemioterapia, la terapia di supporto e palliativa, il follow-up dopo il termine della terapia, il coordinamento con i Pediatri di famiglia e le strutture territoriali; tutte queste attività vengono svolte in collaborazione con il Centro di Riferimento Interregionale. Le Unità Satellite sono le seguenti: Ospedale di Ivrea (ASL TO4) nel Polo Oncologico Nord-Ovest, Ospedale di Aosta (AUSL di Aosta) nel Polo Oncologico Nord-Ovest, Ospedale di Pinerolo (ASL TO3) nel Polo di Torino, A.O.U. Maggiore della Carità di Novara nel Polo Nord-Est, Ospedale di Biella (ASL BI) nel Polo Nord-Est, Ospedale di Savigliano (ASL CNI) nel Polo Sud-Ovest, A.O. SS. Antonio e Biagio e C. Arrigo di Alessandria nel Polo Sud-Est. Le Unità Satellite sono individuate in strutture complesse di pediatria, dotate di: personale medico ed infermieristico con formazione ed esperienza in oncematologia pediatrica; posti letto dedicati, sia per la degenza ordinaria, sia per il Day-hospital, in spazi riservati al paziente pediatrico oncologico; locali per la preparazione dei farmaci antitumorali. Gli obiettivi delle Unità Satellite sono: garantire la maggiore accessibilità da parte dell'utenza; razionalizzare il percorso di diagnosi, cura e follow-up del paziente; decongestionare, per le prestazioni di loro competenza, le attività del Centro di Riferimento Interregionale; coprire le diverse aree geografiche della Regione Piemonte, evitando concentrazioni in uno o più ambiti regionali, con riferimento alla suddivisione in Poli Oncologici ed in Quadranti. L'obiettivo di questo lavoro è di presentare l'esperienza di due Unità Satellite, le S.C. Pediatria di Savigliano e di Ivrea, che dal 2000 operano nell'ambito della Rete Interregionale. Tale modello di cooperazione è al momento l'unico attivo sul territorio italiano in ambito oncematologico pediatrico.

METODI: In questo lavoro viene descritta la casistica di pazienti seguiti dal 2000 ad oggi presso le Unità Satellite di Savigliano e di Ivrea nell'ambito della Rete Interregionale di Oncologia e Oncoematologia pediatrica del Piemonte e Valle d'Aosta. La distanza tra il Centro di Riferimento Interregionale e Savigliano è di 64 km, con un tempo di percorrenza di circa 60 minuti; Ivrea dista da Torino 53 km, con un tempo medio di percorrenza di circa 50 minuti. Viene inoltre presentato il numero di accessi annuali di tali pazienti presso le due Unità Satellite in regime di Ricovero ordinario, Day-hospital ed ambulatoriale negli anni 2011 e 2012. Gli ambiti di intervento sono stati: la definizione del sospetto diagnostico, l'effettuazione di cicli di chemioterapia diurna in regime di Day-hospital ma anche blocchi complessi in ricovero ordinario, i controlli pre e post chemioterapia, la terapia di supporto, le cure palliative e del dolore in pazienti in fase terminale di malattia, il follow-up esteso dei pazienti fuori-terapia.

RISULTATI: Nel periodo 2000-2013 sono stati seguiti in modo coordinato dal Centro di Riferimento Interregionale dell'OIRM di Torino e dalle Unità Satellite di Savigliano e di Ivrea, 161 pazienti con patologia oncologica (89 maschi ed 72 femmine, dei quali 107 a Savigliano e 54 ad Ivrea) di età compresa tra 15 giorni e 20 anni. La distribuzione dei tipi istologici è molto simile alla normale incidenza dei tumori pediatrici (Tabella 1). I pazienti attualmente in trattamento sono 10 a Savigliano e 7 ad Ivrea. Questi bambini sono stati seguiti in regime di Ricovero ordinario, Day-hospital ed ambulatoriale per tutte le attività che competono alle Unità satellite in base a quanto stabilito dalla delibera della Regione Piemonte n. 25-13769 del 29 marzo 2010. Tale attività, relativamente agli ultimi 2 anni 2011 e 2012, è così sintetizzabile: per quanto riguarda l'Unità Satellite di Savigliano si sono avuti nel 2011: 35 Ricoveri ordinari (185 giorni di degenza), 125 accessi di Day-hospital e 276 accessi ambulatoriali; nel 2012 sono stati registrati: 53 Ricoveri ordinari (293 giorni di degenza), 186 accessi di Day-hospital e 311 accessi ambulatoriali; per quanto riguarda l'Unità Satellite di Ivrea si sono avuti nel 2011: 13 Ricoveri ordinari (45 giorni di degenza), 35 accessi di Day-hospital e 166 accessi ambulatoriali; nel 2012 sono stati registrati 13 Ricoveri ordinari (58 giorni di degenza), 23 accessi di Day-hospital e 149 accessi ambulatoriali.

CONCLUSIONI: Con l'attuazione della Rete Interregionale di Oncologia e Oncoematologia pediatrica di Piemonte e Valle d'Aosta è stata ufficializzata la gestione del bambino oncologico sul territorio attraverso l'individuazione di Unità Satellite con specifiche competenze che, coordinate con il Centro di Riferimento Interregionale, hanno permesso un notevole miglioramento dell'assistenza del paziente nei suoi diversi aspetti (diagnosi, cura, terapia palliativa). I principali risultati della gestione territoriale del bambino oncologico sono quindi così riassumibili: la riduzione dei disagi del paziente legati allo spostamento per le terapie ed i controlli effettuabili in regime di Day-hospital, ambulatorio e ricovero ordinario; la creazione di un riferimento qualificato sul territorio per il paziente oncologico, con uno standard qualitativo

sovrapponibile a quello del Centro di Riferimento Interregionale; il migliore coordinamento con i pediatri di famiglia e le strutture territoriali; la forte motivazione del personale medico ed infermieristico coinvolto, che ha reso possibile questa collaborazione; la piena soddisfazione da parte di bambini e genitori.

Tabella 1. Casistica delle SC di Pediatria di Ivrea e Savigliano.

Istotipi	SC Pediatria Ivrea	SC Pediatria Savigliano
Leucemia Linfoblastica Acuta	19	44
Leucemia Mieloide Acuta	3	2
Leucemia Mieloide Cronica		1
Tumori Cerebrali	11	18
Retinoblastoma	1	2
Tumore di Wilms	1	8
Neuroblastoma	2	7
Osteosarcoma		4
Sarcoma di Ewing	2	3
Linfoma di Hodgkin	3	2
Linfoma non Hodgkin	2	6
Rabdomiosarcoma	2	3
Carcinoma rinofaringeo		1
Tumori gonadici	4	1
Epatoblastoma		1
Epatocarcinoma		1
T. rabdoide renale		1
Istiocitosi maligna	1	2
Melanoma	1	
PNET extraosseo	1	
Tumore di Dabska	1	
Totale	54	107

Sesso (M/F)	29/25	60/47
Età alla diagnosi (range)	1-18 anni	15 giorni-20 anni
Pazienti in trattamento	7	10
Ricoveri 2011 (giorni di degenza)	13 (45)	35 (185)
DH 2011	35	125
Accessi ambulatoriali 2011	166	276
Ricoveri 2012 (giorni di degenza)	13 (58)	53 (293)
DH 2012	23	186
Accessi ambulatoriali 2012	149	311

L070

UTILIZZO DI PIPERACILLINA TAZOBACTAM IN INFUSIONE CONTINUA COME TERAPIA EMPIRICA NELLA FEBBRE DI ORIGINE SCONOSCIUTA IN BAMBINI IN CHEMIOTERAPIA

D. Caselli,¹ F. Tucci,² A. Tondo,² D. Cuzzubbo,² A. Tamburini,² O. Paolicchi,² T. Casini,² E. Sieni,² M. Aricò²

¹Cure Domiciliari; ²Oncoematologia Pediatrica, AOU Meyer, Firenze, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Nel bambino neutropenico per chemioterapia e quindi soggetto ad infezioni potenzialmente letali, la febbre può essere l'unica manifestazione iniziale e deve quindi essere prontamente valutata e trattata con antibiotico terapia endovenosa. La scelta dello schema di terapia antibiotica empirica iniziale avviene su dati epidemiologici locali che riguardano i tipi di patogeno più frequentemente isolati e la loro suscettibilità agli antibiotici. Sulla scorta di questi dati, a parità di efficacia clinica, l'opzione tera-

peutica di minor tossicità e minor costo sarebbe da privilegiare adeguando la scelta alle esigenze del singolo paziente. Presso il nostro centro, in base ai rilevamenti epidemiologici, abbiamo modificato la terapia empirica sostituendo cefepime con piperacillina/tazobactam in infusione continua. L'infusione continua di antibiotici tempo-dipendenti permette di migliorare l'efficacia riducendo i dosaggi. Presentiamo un confronto delle due esperienze.

METODI: Sono stati valutati l'esito, la durata dei ricoveri e gli isolamenti batterici relativi a due periodi di 18 mesi in pazienti in chemioterapia. Periodo 1: 1.1.2009-30.6.2010, terapia empirica Cefepime 50 mg/Kg x 2 volte/die, dose max: 2 gr/die; Periodo 2: 1.1.2011-30.6.2012, terapia empirica PIPERACILLINA/TAZOBACTAM 80 mg/kg in bolo 15-30', seguito a 4 h di distanza da 320 mg/kg in infusione e.v. di 24 h (dose massima giornaliera 18 grammi). Il costo della terapia per un paziente di 30 Kg è di 40 Euro/die.

RISULTATI: Nel periodo 1 le giornate di degenza per febbre in neutropenia sono state 1.593 con una degenza media di 7,89 giorni, gli isolamenti sono stati 151 (118 Gram+, 33 Gram-) in 90 pazienti. Nel periodo 2, 1681 giornate, degenza media 7,78 giorni, 96 isolamenti batterici in 56 pazienti (64 Gram+ e 32 Gram-). Nessun paziente è deceduto per sepsi. Non sono segnalati effetti collaterali.

CONCLUSIONI: Nella nostra esperienza l'utilizzo di piperacillina tazobactam in infusione continua si è rivelato una alternativa ragionevolmente economica, pratica, ed adeguata dal punto di vista della efficacia clinica anche nel ridurre la durata media dei ricoveri per febbre in neutropenia.

L071

PARENTING STRESS E STRATEGIE DI COPING NEI GENTORI DI BAMBINI CON NEOPLASIA

F.G. Naselli,¹ F. Riccardi,¹ E. Casari,² D. Caprino¹

¹Dipartimento di Ematologia Oncologia Pediatrica, Istituto G. Gaslini, Genova; ²Istituto di Psicologia Clinica, Università di Genova, Genova, Italy

PSICO-ONCOLOGIA. METODI: Sono stati coinvolti 25 genitori (14 madri e 11 padri) con figli di età compresa tra 1 mese e 12 anni. Per

misurare le strategie di coping e lo stress genitoriale. Sono stati somministrati, in un'unica seduta, 2 questionari: 1) *Coping Inventory for Stressful Situation* (CISS) 2) *Parenting Stress Index* (PSI-SF).

Ai fini dell'analisi del *Parenting Stress* il campione è stato diviso in 4 gruppi sulla base dell'età del figlio: 1) da 1 mese a 2 anni e 11 mesi (N.8), 2) da 3 anni a 5 anni e 11 mesi (N.4), 3) da 6 anni a 8 anni e 11 mesi (N.8), 4) dai nove anni in su (N.5).

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Quando un bambino o un ragazzo si ammala di tumore, tutta la famiglia è coinvolta. I genitori hanno il compito di preservare il loro essere famiglia e l'infanzia del proprio figlio mantenendo le loro funzioni educative in modo tale da dare al bambino un'immagine di "normalità" o quanto meno di "stabilità" nonostante la malattia. Durante la fase di trattamento i genitori non sempre riescono a fronteggiare in modo efficace lo stress e assolvere il proprio compito sia di assistenziale che genitoriale. Obiettivo di questo studio è una maggiore comprensione degli stili e delle strategie di coping adottati al fine di una progettazione di interventi psicologici individualizzati sulla base di eventuali disfunzioni.

RISULTATI: Dall'analisi del campione di genitori risultano capacità medie di coping. Le strategie utilizzate sono 1) la razionalizzazione intesa come organizzazione, programmazione che a volte può arrivare ad alterare/modificare la situazione stessa per trovare la soluzione al problema. 2) L'utilizzo di reazioni emotive rivolte verso il Sé (per esempio ci si rimprovera di essere troppo emotivi); questo tipo di reazione può portare anche a un aumento dello stress per cui i genitori diventano molto tesi e agitati. 3) L'evitamento volto ad evitare la situazione stressante che può essere attivato mediante la distrazione con altre situazioni. Dall'analisi delle strategie utilizzate risulta che, al contrario di quanto descritto in letteratura, i padri e le madri utilizzano modalità pressoché identiche per far fronte allo stress fatta eccezione per l'utilizzo più frequente, da parte delle madri dell'evitamento. Anche nell'analisi del Parenting Stress (Figura 1) non sono emerse differenze significative legate al genere. Si è osservato un andamento pressoché uguale tra il campione di studio e il campione normativo sul quale è stata validata la versione italiana dello strumento per quanto riguarda le sottoscale Distress genitoriale, Interazione genitore bambino disfunzionale e Risposta difensiva. Non emergono inoltre, dati allarmanti riguardo il punteggio di Stress Totale.

%ile	1 MESE - 2,11 ANNI					3 ANNI - 5,11 ANNI					6 ANNI - 8,11 ANNI					9 ANNI E ALTRE					%ile
	PD	P-CDI	DC	DIF	Stress totale	PD	P-CDI	DC	DIF	Stress totale	PD	P-CDI	DC	DIF	Stress totale	PD	P-CDI	DC	DIF	Stress totale	
100	45-50	37-42	41-47	27-30	115-128	46-50	44-55	45-47	27-28	127-150	37-40	32-35	47-57	24-26	106-118	46-53	36-40	40-44	30-34	107-113	100
95	38-44	30-36	34-40	22-26	97-114	40-45	31-43	40-44	24-26	101-126	34-36	28-31	35-46	21-23	92-105	38-45	31-35	35-39	24-29	98-106	95
90	36-37	27-29	31-33	21	90-96	37-39	29-30	36-39	22-23	95-100	33	27	33-34	20	88-91	36-37	29-30	33-34	22-23	93-97	90
85	35	26	29-30	20	85-89	35-36	28	33-35	21	92-94	31-32	26	31-32	19	85-87	33-35	26-28	31-32	21	88-92	85
80	33-34	25	28	20	81-84	34	27	32	20	89-91	30	25	30	18	82-84	31-32	25	30	19-20	84-87	80
75	32	24	26-27	19	78-80	32-33	26	31	19	86-88	29-30	24	29	18	80-81	30	25	29	18	80-83	75
70	30-31	23	25	18	76-77	31	25	30	18	84-85	28	23	28	17	78-79	28-29	23-24	27-28	17	77-79	70
65	29	22	25	17	74-75	29-30	24	29	18	81-83	27	22	27	17	76-77	27	22	26	16	75-76	65
60	28	21	24	16	72-73	28	23	27-28	17	78-80	26	21	26	16	73-75	26	21	25	15	73-74	60
55	27	20	23	16	70-71	27	22	26	16	76-77	25	20	26	1	72	25	20	24	15	70-72	55
50	26	19	22	15	68-69	26	21	25	16	74-75	24	20	25	14	70-71	24	19	23	14	68-69	50
45	25	18	21	15	65-67	26	20	25	15	72-73	23-24	19	24	14	68-69	23	18	22	14	64-67	45
40	24	17	20	14	63-64	25	19	24	15	70-71	22	18	23	13	65-67	22	17	21	13	61-63	40
35	24	16	19	14	60-62	24	17-18	23	14	67-69	21-22	17	22-23	13	62-64	21	16	20	12	58-60	35
30	23	15	18	13	58-59	24	16	21-22	14	64-66	20	16	21	12	59-61	20	15	19	12	55-57	30
25	21-22	14	17	13	55-57	23	16	19-20	14	61-63	18-19	15	20	12	56-58	18-19	15	17-18	11	52-54	25
20	20	14	16	12	53-54	22	15	18	13	57-60	17	15	19	11	53-55	17	14	16	10	49-51	20
15	18-19	14	15	11	50-52	20-21	14	17	12	53-56	16-17	14	17-18	9-10	49-52	15-16	14	15	8-9	45-48	15
10	16-17	13	14	9-10	46-49	18-19	14	15-16	10-11	48-52	14-15	13	15-16	8	43-48	13-14	13	14	7	41-44	10
5	14-15	13	13-14	8	41-45	15-17	13	14	8-9	41-47	13	12	13-14	7	38-42	12	12	13	7	38-40	5
1	12-13	12	12	7	38-40	12-14	12	13	7	36-40	12	12	12	7	36-37	12	12	12	7	36-37	1

30,5	20,5	32,6	19,5	83,6	30	26,7	31,2	17,5	88	28,5	19,2	25,6	17	73,4	23,8	31,2	21,2	14,8	76,2
PD	P-CDI	DC	DIF	Stress totale	PD	P-CDI	DC	DIF	Stress totale	PD	P-CDI	DC	DIF	Stress totale	PD	P-CDI	DC	DIF	Stress totale

Figura 1. Profilo gruppo clinico "Genitori di bambini oncologici in trattamento". Foglio di profilo.

CONCLUSIONI: Secondo la letteratura le reazioni dei genitori variano secondo l'età del bambino. Se la diagnosi riguarda un neonato, i genitori potrebbero non percepirlo come normale, se il bambino è molto piccolo potrebbero sentirlo come molto fragile e indifeso, con gli adolescenti il senso della perdita può essere aggravato dal fatto che essi hanno già una propria collocazione e un proprio temperamento. L'analisi della varianza del *Parenting Stress* diviso per fasce d'età ha dimostrato, infatti, che i genitori del gruppo 1 hanno difficoltà a mettersi in relazione e comprendere i bisogni del loro figlio. Nei genitori dei gruppi 2 e 3 si sono ottenuti valori che richiedono attenzione per quanto riguarda l'interazione genitore-bambino e lo stress totale. Nel gruppo 4 si evidenziano punteggi patologici nella sottoscala dell'interazione genitore-bambino che possono essere spiegati con la difficoltà dei genitori di rapportarsi con i figli adolescenti che sono comuni in tale fascia d'età e che, di fronte ad una diagnosi di tumore, potrebbero accentuarsi. In questo gruppo si rileva anche un maggior timore di rapportarsi con i propri figli in una comunicazione aperta e veritiera riguardo il trattamento, la prognosi e l'angoscia di morte.

In considerazione di quanto riscontrato la conoscenza delle strategie di *coping* di ogni genitore permette un miglior inquadramento della situazione e l'individuazione di strategie più funzionali per affrontare il percorso di cure e la malattia del proprio figlio. Utilizzare in modo sinergico nella coppia genitoriale strategie anche diverse, facilita il processo di adattamento permettendo di costruire fattori protettivi essenziali per sé e per i vari membri del nucleo familiare aiutando i genitori ad affrontare difficoltà reali e non attraverso strategie più funzionali e meno dispendiose.

L072

ETEROGENEITÀ CLINICA E BASI PATOGENETICHE DELLA SUSCETTIBILITÀ ALLE INFEZIONI DA MICOBATTERI NON TUBERCOLARI

O. Scomodon,¹ M. Caironi,² D. Vairo,² L. Tassone,¹ S. Negri,² A. Prandini,¹ R. Kumar,¹ M. Giacomelli,¹ S. Stefini,³ T. Bazzana,³ A. Matteelli,⁴ A. Plebani,⁵ R. Badolato⁵

¹*Scuola di Dottorato in Scienze della Riproduzione e dello Sviluppo, Università degli Studi di Trieste, Trieste;* ²*Dipartimento di Scienze Cliniche e Sperimentali IMM Laboratorio A. Nocivelli, Università degli Studi di Brescia, Brescia;* ³*Reparto di Otorinolaringoiatria Pediatrica, Ospedale Civile di Brescia, Brescia;* ⁴*Dipartimento di Infettivologia, Ospedale di Brescia, Brescia;* ⁵*Clinica Pediatrica Università degli Studi di Brescia e Laboratorio di Medicina Molecolare A. Nocivelli, Università degli Studi di Brescia, Ospedale Civile di Brescia, Brescia, Italy*

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: In questo studio è stato analizzato un gruppo di 26 pazienti affetti da infezioni croniche sostenute da Micobatteri non Tubercolari (MNT). È stata valutata l'eterogeneità delle manifestazioni cliniche delle varie forme di micobatteriosi ed è stata ricercata la presenza di correlazioni tra la storia clinica dei pazienti ed eventuali immunodeficienze. La risposta immunitaria naturale nei confronti di questi patogeni, è garantita dalla funzionalità dello specifico *pathway* regolato dalle citochine IL-12 ed IFN- γ , le cui alterazioni possono causare forme della cosiddetta Suscettibilità Mendeliana alle infezioni da MNT (MSMD). Il nostro studio si è focalizzato sulla ricerca di eventuali alterazioni a livello di tale asse, al fine di caratterizzare le basi patogenetiche della suscettibilità alle infezioni da MNT e di fornire indicazioni per impostare le migliori strategie terapeutiche.

METODI: È stata effettuata la revisione delle cartelle cliniche di tutti i pazienti da noi presi in considerazione affetti da infezioni ricorrenti sostenute da Micobatteri non Tubercolari. Abbiamo valutato la produzione di IFN- γ da parte di cellule PHA-T BLASTI a seguito della stimolazione con IL-12 ed abbiamo effettuato il sequenziamento diretto con metodo Sanger della regione codificante del gene IL-12R β 1.

RISULTATI: Dalla valutazione clinica e microbiologica è emersa una correlazione fra la sede colpita dall'infezione e le specie di micobatterio coinvolta. In particolare in 2 pazienti affetti da forma intestinale è stato isolato il *M. Genavense*, in un paziente con forma polmonare è stato isolato *M. Kansasii* ed in tutti i pazienti affetti da forma di linfadenopatia a livello del distretto testa/collo è stato ritrovato *M. Avium*. Esclusivamente nei pazienti affetti da forme gravi e disseminate è stato possibile osservare un deficit dei parametri immunologici. In uno dei pazienti affetti da una forma disseminata d'infezione di MNT è stata riscontrata una ridotta produzione di IFN- γ da parte di cellule PHA-T

Blasti a seguito della stimolazione con IL-12. Dal sequenziamento del gene IL-12R β 1 abbiamo verificato la presenza di due mutazioni in eterozigosi composta: una porta alla formazione di un codone STOP prematuro nell'esone 7 (ereditata dalla madre), l'altra coinvolge un sito di splicing, con eliminazione dell'esone 11 (ereditata dal padre) portando così alla formazione di una proteina non biologicamente attiva. Sono stati selezionati 5 pazienti con caratteristiche cliniche di maggiore aggressività e ricorrenza di linfadeniti del distretto testa/collo causata da MNT; dall'indagine genetica del gene IL-12R β 1 sono stati riscontrati diversi polimorfismi.

CONCLUSIONI: Dalla valutazione clinica è emerso che esiste una notevole eterogeneità di presentazione delle micobatteriosi spaziando da forme localizzate a livello del distretto testa/collo a forme gravi e disseminate. In un paziente abbiamo potuto trovare una forma di MSMD confermata dall'analisi genetica di IL-12R β 1. Infine, considerando che nei pazienti affetti dalla forma interessante il distretto testa/collo non è stato possibile identificare delle alterazioni genetiche, queste manifestazioni patologiche vengono classificate come micobatteriosi idiopatiche. Pertanto ad oggi l'unica terapia efficace è rappresentata dall'asportazione chirurgica delle lesioni linfonodali.

L073

VALUTAZIONE COGNITIVA DI BAMBINI ITALIANI AFFETTI DA MALATTIA DREPANOCITICA

C. Esposito, C. Favara Scacco, V. De Giovanni, P. Samperi, G. Russo
Unità Operativa Ematologia Oncologia Pediatrica, Azienda Ospedaliero Universitaria Policlinico Vittorio-Emanuele, Catania, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La malattia drepanocitica (SCD, sickle cell disease) è una emoglobinopatia ereditaria. Questa malattia può essere causa di deficit cognitivi e problemi scolastici provocati da infarti cerebrali silenti e non. Lo scopo di questa ricerca è valutare la funzione cognitiva del bambino con SCD.

METODI: I pazienti con SCD reclutati per il nostro studio sono 14 (9M e 5F), di età compresa tra i 4 anni e 4 mesi e 16 anni e 11 mesi, di nazionalità italiana, provenienti dalla Sicilia Orientale. Allo screening con TCD (transcranial doppler), tutti i pazienti hanno avuto un risultato normale. Gli strumenti di valutazione utilizzati sono stati: la scala WPPSI-III e la WISC-III. La scelta degli strumenti è stata determinata dall'esigenza di conoscere sia il loro funzionamento cognitivo globale attraverso la valutazione del quoziente intellettivo (QI) che la loro prestazione nelle diverse aree cognitive specifiche. I tests sono strutturati per la WISC-III in due Scale, Performance e Verbale, ognuna delle quali è costituita rispettivamente 7 e da 6 subtest; per la WPPSI-III da 4 Scale (QI verbale, QI performance, Q velocità procesamiento, linguaggio generale), costituite rispettivamente da 5, 5, 2, e 2 subtests.

RISULTATI: Dall'analisi dei test è emerso che un paziente ha un QI di 74 (v.n. 90-110), mentre gli altri 13 presentano un QI totale nella norma e che in tutti i profili vi è una elevata variabilità tra i subtests. In particolare, i subtests verbali rivelano risultati più bassi della norma mentre i subtests di performance rivelano risultati al di sopra della norma. I 13 pazienti che evidenziano un Quoziente Intellettivo nella media, hanno un alto QI di Performance che compensa il basso livello riscontrato al QI verbale.

CONCLUSIONI: I nostri risultati mostrano che la funzione verbale è al di sotto della media. Questa peculiarità non è attribuibile a difficoltà linguistiche o culturali dal momento che i pazienti coinvolti nello studio sono tutti italiani. Rimane evidente l'abilità compensatoria del funzionamento cognitivo del campione.

L074

LA "COMUNICAZIONE DELLA DIAGNOSI" IN PAZIENTI AFFETTI DA LLA/ LM IN UN CENTRO ONCOLOGICO INFANTILE QUALE INTERVENTO SPECIALISTICO DELLO PSICOLOGO CLINICO

A. Pinto, B. Palmentieri, E. Tarantino, A. Cadoni, L. Morieri
AORN Santobono-Pausilipon, Ospedale, Napoli, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: L'odierna letteratura ed in speciale modo quella anglo-statunitense vuole che l'ammalato neoplastico - sia adulto che adolescente - sia informato dal medico della patologia di cui è affetto nel modo più veritiero possibile al fine di corri-

spondere alle istanze etico-legali e umanitarie che la relazione medico-paziente impone. Comunicare però "la verità" è spesso tradotto dai medici in una medicalizzazione e standardizzazione della diagnosi che trascura l'importanza del modo in cui viene comunicata e soprattutto dello *status* del paziente nel momento in cui tale comunicazione viene effettuata, privilegiando la prassi scientifica e l'efficacia quale parte fondamentale dell'atto medico. La specifica formazione universitaria e post-universitaria, nonché il diffondersi di master di I e II livello in psico-oncologia quale ulteriore specializzazione dello psicologo clinico, individuano sempre più nella figura dello psicologo - di fatto inseriti nei Centri AIEOP- il compito di affiancare il medico e la famiglia nella delicata fase di accettazione della malattia e della cura ad esso legata. L'équipe di Psico-Oncologia del Dipartimento di Oncologia dell'Ospedale Pausilipon di Napoli, sta utilizzando (Pinto, 2006) ormai da anni per le leucemie (LLA e LM) una specifica procedura di "comunicazione assistita" a supporto sia dei genitori che del bambino stesso, nella fase immediatamente successiva alla diagnosi ufficiale, comunicata in prima battuta dall'oncologo del Centro ai genitori del bambino stesso. L'équipe che normalmente prende in carico tutte le famiglie dopo aver stabilito con i genitori una prima relazione d'aiuto offre agli stessi il sostegno psicologico del loro figlio/a durante tutto l'iter successivo, con modalità e mezzi documentabili e condivisibili, tra cui appunto: "la comunicazione assistita".

METODI: Questa procedura estesa, quando possibile ai bambini/e di 4 anni, parte dal considerare vari aspetti sia cognitivi che psicologici riguardanti il paziente stesso, per arrivare a modulare una comunicazione finalizzata ad una proficua alleanza. La procedura consta dei seguenti strumenti:

- Una osservazione della relazione madre-bambino ed un colloquio esplorativo preliminare, mirato ad individuare il livello di maturazione cognitiva e affettivo del paziente stesso;
- Un questionario semi-strutturato (questionario di auto-percezione dai sei anni) teso a evidenziare sia la percezione che il bambino ha del suo stato fisico, sia le informazioni oggettive di cui è in possesso, nonché i meccanismi di difesa posti in essere al momento del ricovero al fine di accogliere il mondo emozionale del bambino, le sue osservazioni, le sue paure ma anche e soprattutto i nessi causa-effetto che nella sua mente si sono creati e da cui ripartire;
- Un percorso a fumetti elaborato dall'équipe psicologica - denominato i Globemon - aperto attraverso il software di grafica PAINT in cui si sviluppa appunto il percorso interattivo a fumetti (di cui sopra) che a seconda del livello di conoscenza e di maturazione del bambino lo informa *step by step* della finalità curativa delle azioni svolte intorno a lui o su di lui, con il fine primario di renderlo partecipe senza spaventarlo, di indurlo ad una corretta profilassi, di aiutarlo ad assorbire meglio nel suo linguaggio la prassi medica, rinforzando sin dai primi momenti la volontà di guarire.

RISULTATI: Dal 2005 ad oggi, si registra il 100% di accettazione e di gradimento da parte dei genitori presi in carico dal Servizio e ciò è tanto più evidente quanto più i genitori hanno un basso livello culturale. E' stato possibile osservare inoltre che l'accettazione di tale procedura, aiuta spesso gli stessi a mettere maggiormente a fuoco o in "ordine" quanto dovuto assorbire traumaticamente ed in fretta. Ancora è stato osservato che tale comunicazione ha reso possibile la condivisione di un linguaggio più adeguato a quello di un bambino o di un adolescente, ma soprattutto a comprendere che il bambino più dell'adulto ha diritto a tempi e luoghi commisurati alla sua struttura affettiva. L'efficacia del metodo sul bambino, è stata supportata invece dai seguenti risultati:

- stabilirsi di un rapporto di fiducia con gli operatori;
- interesse all'acquisizione di strumenti multimediali, specie nei bambini piccoli, a partire dai 4 anni;
- interesse nella comprensione delle finalità curative;
- miglioramento della *compliance* alle cure;
- ridursi dei tempi di accettazione della profilassi (mascherina, igiene dentale e personale);
- maggiore accettazione della perdita momentanea dei capelli negli adolescenti;
- maggiore condivisione della diagnosi con i fratelli stessi;
- delega da parte dei medici di firma del modulo di consenso informato per gli adolescenti.

CONCLUSIONI: Si ritiene dunque che la buona prassi nella comunicazione può favorire sin dal primo momento la percezione di una migliore qualità di vita, anche nei momenti più critici come quando esplode una malattia oncologica. E' allo studio, da parte dell'équipe l'elaborazione di una procedura simile per altre tipologie oncologiche.

Bibliografia:

Bragard I, Razavi D, Marchal S et al. (2006), *Teaching communication*

and stress management skills. Support Care Cancer (2006) 14:454-461

- Buckman R.(2003), *La comunicazione della diagnosi in caso di malattie gravi*. Cortina, Milano.
- Delvaux N, Merckaert I, Marchal S et al. (2005), *Physicians' communication with a cancer patient and a relative: a randomized study assessing the efficacy of consolidation workshops*. Cancer 103:2397-2411
- Pinto et al.(2006); *La comunicazione della Diagnosi*; in Haematologica, the hematology journal, 91, 4.
- Razavi D, Merckaert I, Marchal S et al. (2003), *How to optimize physicians' communication skills in cancer care: results of a randomized study assessing the usefulness of post training consolidation workshops*. J Clin Oncol 21:3141-3149
- Ripamonti, C.A., & Clerici, C.A. (2008). *Psicologia e salute, introduzione alla psicologia clinica in ambito sanitario*. Bologna : Il Mulino.
- Weisman A (1979), *Coping with cancer*. McGraw- Hill, Book Company ed. New York

L075

RUOLO DI CRKL NEL DEFICIT IMMUNOLOGICO DELLA SINDROME DI DIGEORGE

M. Giacomelli, R. Kumar, A. Soresina, A. Prandini, T. Lorenzini, L. Palumbo, C. Donati, M. Maffei, A. Mantovani, M. Milanese, L. Guadrini, D. Moratto, S. Negri, O. Scomodoni, A. Plebani, R. Badolato

Dipartimento di Pediatria, e Istituto di Medicina Molecolare "Angelo Nocivelli", Università di Brescia, Brescia, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: La sindrome di DiGeorge, o sindrome velocardiofaciale, è causata da una delezione in eterozigosi a carico del braccio corto del cromosoma 22 (del22q11.2). Essa si caratterizza con anomalie del cuore e dell'arco aortico, tra cui la tetralogia di Fallot, ipoplasia/aplasia del timo e delle paratiroidi, anomalie craniche e da ricorrenti infezioni batteriche e virali. Le infezioni coinvolgono sia le alte che le basse vie aeree, e in un 25% circa dei pazienti si sviluppano anche sintomi di autoimmunità. La sintomatologia nei pazienti DiGeorge è assai variabile, anche fra individui appartenenti allo stesso gruppo familiare. La maggior parte dei pazienti (80%) è portatore di una delezione di circa 3 Mb, in cui sono deleti circa una trentina di geni fra cui il gene *CRKL*. *CRKL* codifica per una proteina adattatrice di 39 Kd con un dominio SH2 e due domini SH3, appartenente alla famiglia Crk.¹ E' coinvolta nel signaling intracellulare di svariati fattori di crescita e chemochine e in alcune forme di leucemie mieloide ove appare iperfosforilata dal prodotto del cromosoma Philadelphia, BCR-ABL.^{2,3} Alcuni studi avevano evidenziato come topi, portatori di mutazioni a carico di *CRKL* sviluppavano un fenotipo simil-DiGeorge, con alterazioni dell'arco aortico, ipoplasia del timo e delle paratiroidi, alterazioni craniche e immunodeficienza.^{4,5} Il nostro gruppo ha analizzato le funzioni biologiche dei linfociti T in quattro pazienti con sindrome di DiGeorge, e con linfopenia assente o lieve, tutti portanti la delezione 22q11.2 classica. L'intento era quello di valutare una eventuale relazione fra la delezione del gene *CRKL* e le alterazioni funzionali dei linfociti T, nella sindrome di DiGeorge.

METODI: In 4 pazienti con sindrome di Di George abbiamo analizzato la risposta proliferativa, l'apoptosi e l'espressione di CD25 e CD69 su linfociti CD4 stimolati con IL-2 da sola o con una combinazione di stimoli come IL-2 più anticorpi anti-CD3 e anti-CD28 (per mimare l'ingaggio del T cell Receptor). In aggiunta su linfolasti T (PHA-T), esposti ad IL-2 è stata valutata l'espressione della proteina *CRKL* e la sua fosforilazione, in pazienti e relativi controlli, nonché i livelli di mRNA. In fine, sempre sotto stimolazione con IL-2, abbiamo valutato la fosforilazione di ERK1/2, STAT3, STAT5 e Akt.

RISULTATI: L'immunofenotipo dei pazienti affetti da sindrome di DiGeorge da noi analizzati non ha evidenziato un deficit evidente dei linfociti T. Solo il pt 4 era lievemente linfopenico, mentre i pazienti pt 1, pt 2 e pt 3 avevano livelli di linfociti T nella norma. In questi pazienti abbiamo osservato un marcato difetto della proliferazione, misurata con marcatura al CFSE e metodica citofluorimetrica. L'indagine è stata eseguita su PBMC stimolati con anticorpi anti-CD3 e anti-CD28 per 72 h. Nei linfoblasti dei suddetti pazienti, stimolati con IL-2 per 15 minuti, dopo 24 ore di deprivazione abbiamo osservato un basso livello di fosforilazione di *CRKL* mentre nei soggetti di controllo *CRKL* era for-

temente fosforilato. Inoltre, l'analisi dei livelli di espressione di CRKL ha evidenziato una decisa riduzione dei livelli proteici nei pazienti rispetto ai soggetti di controllo. Non sono state invece trovate differenze nella fosforilazione di Akt ne di ERK1/2. La stimolazione con IL-2 di linfoblasti di soggetti sani comporta una riduzione dell'espressione di CRKL sia in termini di mRNA che di proteina, suggerendo la capacità di IL-2 di modulare i livelli di espressione di CRKL. Oltre ad aver evidenziato una forte attivazione dei fattori trascrizionali STAT3 e STAT5.

CONCLUSIONI: Il nostro studio dimostra che CRKL è coinvolto nel signaling di IL-2, il principale fattore proliferativo dei linfociti T. Poiché i livelli della proteina CRKL e la sua fosforilazione sono marcatamente ridotti nei soggetti sani affetti da sindrome di DiGeorge e IL-2 a sua volta modula i livelli trascrizionali di CRKL i nostri risultati suggeriscono che CrKL possa giocare un ruolo funzionale nei difetti biologici dei linfociti T, e in particolare nel difetto proliferativo e/o nella linfopenia osservati nella sindrome di Di George.

Bibliografia:

1. Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles. Feller SM. *Oncogene*. 2001 Oct 1;20(44):6348-71.
2. Tyrosine phosphorylation of CRKL in Philadelphia+ leukemia. J ten Hoeve, RB Arlinghaus, JQ Guo, N Heisterkamp and J Groffen. *Blood* 1994 84: 1731-1736.
3. Crkl is complexed with tyrosine-phosphorylated Cbl in Ph-positive leukemia. de Jong R, ten Hoeve J, Heisterkamp N, Groffen J. *J Biol Chem*. 1995 Sep 15; 270 (37):21468-71.
4. Dose-dependent interaction of Tbx1 and Crkl and locally aberrant RA signaling in a model of del22q11 syndrome. Guris DL, Duester G, Papaioannou VE, Imamoto A. *Dev Cell*. 2006 Jan;10(1):81-92.
5. Mice lacking the homologue of the human 22q11.2 gene CRKL phenocopy neurocristopathies of DiGeorge syndrome. Guris DL, Fantes J, Tara D, Druker BJ, Imamoto A. *Nat Genet*. 2001 Mar;27(3):293-8.

L076

USO DEL PROPANOLOLO NEL TRATTAMENTO DELL'EMANGIOMATOSI PROFONDA MULTIPLA INFANTILE: DESCRIZIONE DI 3 CASI CLINICI

I. Sani, G. Cerchiara, D. Rizzo, A. Battista, R. Arena, S. Triarico, G. Trombatore, G. Attina, S. Mastrangelo, R. Riccardi

Divisione di Onco-Ematologia Pediatrica, Policlinico Universitario "A. Gemelli", Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italy

RAZIONALE: Gli emangiomi infantili sono i più frequenti tumori dei tessuti molli nel primo anno di vita. Nella maggior parte dei casi le lesioni interessano la superficie cutanea, regrediscono spontaneamente e non richiedono alcun intervento terapeutico. Tuttavia il trattamento è mandatorio in tutti quei casi in cui le lesioni coinvolgono sedi a rischio di sviluppare gravi complicanze quali scompenso cardiaco, sequestro piastrinico, insufficienza respiratoria acuta, sanguinamenti endocranici e deficit visivi. La terapia medica convenzionale prevede l'utilizzo dei corticosteroidi e, nelle forme resistenti, si avvale dell'interferon alfa. Negli ultimi anni è stata descritta l'efficacia terapeutica del propranololo.

METODI E RISULTATI: Presso il nostro Centro sono stati seguiti tre casi di emangiomasosi profonda multipla a rischio di gravi sanguinamenti.

PAZIENTE 1: Lattante di 50 giorni di vita con comparsa acuta di esoftalmo dell'occhio sinistro associato alla presenza di tumefazione duro elastica della palpebra superiore omolaterale. La RM cranio-orbite documentava la presenza di tessuto espansivo con caratteristiche emangiomatose a livello della cavità orbitaria di sinistra, della loggia cavernosa omolaterale e anteriormente al III ventricolo. Non erano presenti lesioni emangiomatose cutanee ne' addominali. Sulla base del quadro clinico-radiologico si decideva di intraprendere trattamento con Propranololo alla dose di 1 mg/Kg/die raggiungendo la dose terapeutica di 2 mg/kg/die in 3 dosi per os, senza effetti avversi e con rapido miglioramento del quadro clinico. La paziente ha eseguito un follow-up radiologico trimestrale che ha mostrato una progressiva riduzione volumetrica fino alla scomparsa delle lesioni cerebrali e orbitaria. La lesione a livello della loggia cavernosa si è inoltre ridotta progressivamente nel tempo. La terapia è stata proseguita per un totale di 2 anni ed è stata ben tollerata.

PAZIENTE 2: Lattante di 40 giorni di vita, con angiomasosi cuta-

nea diffusa congenita. Una prima ecografia addominale eseguita nel periodo neonatale risultava nella norma. Una successiva ecografia addominale, eseguita a 30 giorni di vita per sospetta ipertrofia pilorica, ha evidenziato la presenza di numerose formazioni angiomatose a livello epatico. Venivano pertanto eseguiti esami di approfondimento diagnostico (ecocolor-doppler addominale e angio-RM addome). Tali indagini confermavano la presenza di angiomi epatici e documentavano, nel lobo epatico di destra, multipli shunt arterovenosi con afferenze dall'arteria epatica, che appariva ipertrofica e con drenaggio nelle vene sovraepatiche, lievemente ectasiche. L'ecocardiogramma mostrava minima discinesia settale e lieve insufficienza mitralica. Il dosaggio del pro-BNP era risultato elevato per l'età. La RM cranio eseguita aveva escluso la presenza di angiomi intracranici. In considerazione delle alterazioni emodinamiche causate dalle lesioni epatiche, e dei segni iniziali di compromissione della funzionalità cardiaca, veniva intrapreso trattamento con Propranololo fino al dosaggio massimo di 2mg/Kg/die in 3 somministrazioni. Non si sono registrati episodi di bradicardia, dispnea o ipotensione sintomatica. I successivi controlli eco-color doppler hanno evidenziato riduzione delle lesioni epatiche e degli shunts artero-venosi. L'esame ecocardiografico eseguito a 3 settimane dall'inizio della terapia ha mostrato normalizzazione della cinetica settale e la scomparsa dell'insufficienza mitralica precedentemente segnalata. Inoltre i livelli plasmatici di pro-BNP si sono progressivamente ridotti. La paziente prosegue stretto follow-up clinico radiologico presso il nostro centro in buone condizioni generali.

PAZIENTE 3: Lattante di 10 mesi, ex pretermine (30 EG), con angioma piano a livello della base del collo e a livello della tonsilla palatina, dell'arco palatino e del palato molle di sinistra. La RM mostrava una formazione espansiva pluriconcamerata a livello sopra e sottoioideo laterocervicale sinistro con riduzione dell'ampiezza della colonna aerea dell'ipofaringe e del seno piriforme omolaterale. Non era presente alcuna compromissione della componente vascolare. Lo studio ecografico dell'addome aveva escluso ulteriori lesioni angiomatose. In considerazione della localizzazione delle lesioni la paziente è stata sottoposta a trattamento con Propranololo alla dose di 1 mg/Kg/die raggiungendo la dose terapeutica di 2 mg/kg/die in 3 dosi per os, senza effetti avversi. La paziente è in attesa di eseguire controllo radiologico a tre mesi.

CONCLUSIONI: L'utilizzo del propranololo, in monoterapia o in associazione con altri farmaci si è dimostrato efficace nel trattamento dell'emangiomasosi infantile a rischio di complicanze. La nostra esperienza dimostra una notevole efficacia del trattamento esclusivo con propranololo; la terapia si è, infatti, rivelata efficace nella totalità dei casi, con rapida risposta ed effetto stabile e duraturo nel tempo, in assenza di effetti collaterali significativi.

L077

CARATTERIZZAZIONE IMMUNOLOGICA, MOLECOLARE E NEUROPSICOLOGICA DI UN PAZIENTE CON SINDROME DIGEORGE-LIKE FIGLIO DI MADRE DIABETICA

F. Grasso, E. Cirillo, M. Marino, M. Rosa, G. Giardino, V. Gallo, T. Esposito, F. Maio, R. Naddei, C. Di Lillo, C. Bravaccio, C. Pignata
Dipartimento di Medicina Traslazionale Unità Operativa Complessa di Immunologia Pediatrica, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: L'anomalia di DiGeorge (DGA) è una condizione caratterizzata dalla presenza di almeno 2 malformazioni tra immunodeficienza legata ad ipo/aplasia timica, ipocalcemia/ipoparatiroidismo e cardiopatia congenita, derivanti da anomalie di sviluppo della 3° e 4° tasca branchiale. La delezione 22q11.2 rappresenta la causa più frequente di anomalia di DGA, responsabile di circa il 90% dei casi, sebbene fenotipi DGS (DiGeorge syndrome) like siano stati associati anche ad altre cromosomopatie, quali delezione 10p13, 17p13, 4q34.1q35.2, sindrome di Fraser e CHARGE o ad esposizione a teratogeni (acido retinoico, embriopatia fetto-alcolica), quasi ad indicare che pathway genetici comuni o funzionalmente correlati possano essere coinvolti nell'espressione del fenotipo clinico tipico della DGA. Il gene oggi maggiormente implicato nel controllo della morfogenesi faringea è considerato il *TBX1*, membro della famiglia dei fattori di trascrizione T-box. Attualmente, la maggior parte delle caratteristiche fenotipiche del disordine sono state ricondotte ad alterazioni di tale gene, anche se è nella regione deleta del cromosoma 22 sono contenuti più di 35 geni. Recentemente sia mutazioni di

tipo "gain of functions" che "loss of functions" di TBX1 sono state riportate in alcuni soggetti affetti da DGA. Scopo dello studio è la caratterizzazione immunologica, neuropsicologica e molecolare di un bambino figlio di madre diabetica con DGA e assenza di delezione 22q11.2.

METODI: La caratterizzazione immunologica è stata effettuata mediante dosaggio delle Ig sieriche, valutazione citofluorimetrica dell'immunofenotipo e test di stimolo con i comuni mitogeni. Lo sviluppo psicomotorio è stato valutato mediante le scale per la valutazione dello sviluppo mentale tipo Griffith (GMDS-ER) e del comportamento adattivo tipo Vineland (VABS). La caratterizzazione molecolare è stata realizzata mediante fluorescenza in situ Hybridization (FISH) array-CGH e sequenziamento del gene TBX1.

RISULTATI: Riportiamo il caso di un bambino di 2 anni nato da madre affetta da diabete gestazionale trattata con insulina e ipoglicemizzanti orali con fenotipo DiGeorge-like caratterizzato da agenesia del timo, ipoparatiroidismo, forame ovale pervio, agenesia renale unilaterale, cisti del setto pellucido, stenosi del dotto lacrimale. La valutazione ORL permetteva di escludere anomalie del palato o insufficienza velofaringea. Lo screening audiologico risultava negativo. La valutazione immunofenotipica evidenziava riduzione dei linfociti T: CD3+ 16% (373 cell/mmc), CD3+CD4+ 7% (163 cell/mmc), CD3+CD8+ 6% (388 cell/mmc), CD3+CD4+CD45+RA+ 2% (47 cell/mmc), CD3+CD4+CD45+RO+ 5% (116 cell/mmc). I linfociti B CD19+ risultavano aumentati (58%; 1351 cell/mmc); i linfociti CD16+CD56+ risultavano nella norma (18%; 419 cell/mmc). La risposta proliferativa ai comuni mitogeni risultava nella norma per ConA, PMA e crosslinking del CD3, mentre risultava patologica per PHA (45% del ctr) e Pockweed (39% del ctr). I livelli sierici di Ig totali risultavano costantemente nei range di riferimento. Lo sviluppo psicomotorio valutato mediante GMDS-ER evidenziava un quoziente di sviluppo nei limiti della norma (QS 86), difficoltà di sintesi visiva e organizzazione percettiva. La valutazione del comportamento adattivo tipo Vineland (VABS) evidenziava ritardo del linguaggio di espressione. L'indagine citogenetica FISH critica per la regione 22q11.2 e l'Array-CGH non evidenziavano alterazioni. L'indagine molecolare per TBX1 risultava nella norma.

CONCLUSIONI: Segnaliamo un caso di DGA con severo deficit dell'immunità cellulo-mediata non legata ad alterazioni del gene TBX1 in bambino figlio di madre diabetica. È plausibile che modificazioni epigenetiche nel DNA fetale indotte dall'esposizione ad anormali livelli glicemici e/o insulinemici possano essere causa del fenotipo clinico del paziente. In aggiunta la presenza di severo deficit isolato del linguaggio in assenza di anomalie del palato risultano peculiari se comparate con quelle dei pazienti con sindrome da delezione 22q11.2.

L078

PROTIDODISPERSIONE INTESTINALE SECONDARIA A IPERPLASIA NODULARE LINFATICA INTESTINALE: INSOLITO ESORDIO DI IMMUNODEFICIENZA COMUNE VARIABILE

A. Trizzino,¹ S. Leone,² G. Bruno,¹ C. Mosa,¹ A. Trizzino,¹ P. D'Angelo¹

¹UO di Oncoematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera Civico, Di Cristina e Benfratelli, Palermo; ²Scuola di Specializzazione in Pediatria, Università degli Studi, Palermo, Italy

INTRODUZIONE: L'Immunodeficienza Comune Variabile (CVID) è la seconda immunodeficienza in ordine di frequenza dopo il deficit di IgA. La sintomatologia di esordio è caratterizzata nella maggior parte dei casi da infezioni ricorrenti delle vie aeree superiori, otiti o polmoniti. Circa il 20% dei casi di CVID esordisce in età pediatrica.

I criteri diagnostici, codificati dalla società europea di immunodeficienze (www.esid.org) comprendono: età superiore ai due anni, ipogammaglobulinemia (riduzione al di sotto delle 2 deviazioni standard dalla norma dei valori di immunoglobuline sieriche) e scarsa o assente risposta alle vaccinazioni con antigeni polisaccaridici. In fase di inquadramento diagnostico è necessario escludere forme secondarie di ipogammaglobulinemia legate a protidodispersione (ad es. sindromi da malassorbimento intestinale, sindrome nefrosica ed ustioni estese).

CASO CLINICO: Il piccolo Leonardo è un bambino che giunge alla nostra osservazione all'età di 8 anni, per il riscontro occasionale di ipogammaglobulinemia in corso di un episodio di gastroenterite: IgG 290 mg/dl (vn 636-1916), IgA <5 Mg/dl (vn 41-315), IgM <16 mg/dl (vn 56-261). Fino ad allora era cresciuto bene e non aveva presentato una storia significativa di infezioni. Il numero dei linfociti B era risultato nella norma (CD19+ 15.6%). Nel corso del work-up dia-

gnostico si era osservata una spontanea risalita dei valori di immunoglobuline sino al raggiungimento del valore massimo di IgG di 432 mg/dl. Successivamente Leonardo aveva iniziato a presentare sintomatologia intestinale cronica caratterizzata da diarrea e dolori addominali ricorrenti, associata a febbricola, e contemporaneamente si era osservata una nuova discesa dei valori di immunoglobuline e, questa volta anche di albumina (2.8 g/L). Avviate quindi le indagini diagnostiche per il malassorbimento, erano state escluse la giardiasi, la celiachia ed erano risultati negativi gli esami colturali delle feci. Per il riscontro di alti livelli di calprotectina fecale (277 mg/Kg) il piccolo veniva sottoposto a screening degli ASCA e colonscopia. Alla luce della positività degli ASCA, si era ipotizzata una diagnosi di morbo di Crohn, non confermata all'esame istologico, che invece metteva in evidenza una iperplasia linfatica nodulare intestinale. L'associazione di ipogammaglobulinemia ed ipoalbuminemia ci aveva fatto inizialmente orientare verso una forma secondaria a protidodispersione intestinale. La terapia ex adjuvantibus con cotrimossazolo e successivamente con metronidazolo aveva determinato un miglioramento transitorio della sintomatologia intestinale associata a risalita delle immunoglobuline sieriche. Il piccolo aveva successivamente presentato un progressivo deterioramento delle condizioni cliniche, con una perdita di peso di circa 12 kg (il 25% del suo peso), una profonda astenia ed un sempre maggior numero di infezioni; la diarrea accompagnata da febbricola non tendeva al miglioramento. Lo studio della risposta anticorpale alla vaccinazione con vaccino pneumococcico polisaccaridico 23-valente era risultato deficitario e pertanto era stata posta la diagnosi di Immunodeficienza comune variabile. Leonardo aveva iniziato pertanto terapia sostitutiva con immunoglobuline per via endovenosa. La protidodispersione e la sintomatologia non avevano mostrato alcun miglioramento dopo l'inizio di tale terapia. La terapia con metilprednisolone alla dose iniziale di 1 mg/Kg ha viceversa determinato un rapido ed eclatante miglioramento clinico con scomparsa della sintomatologia intestinale, recupero del peso e normalizzazione degli esami di laboratorio (albuminemia e livelli di IgG). Leonardo ha proseguito tale terapia, con una lenta riduzione della dose, senza presentare una riattivazione della patologia intestinale. In atto Leonardo prosegue la terapia con immunoglobuline sottocutanee settimanalmente senza alcun disturbo.

CONCLUSIONI: L'iperplasia linfatica intestinale nodulare può essere una complicanza dell'immunodeficienza comune variabile, in alcuni casi secondaria alla infestazione da giardia o a neoplasie intestinali. Nel nostro caso è stata la prima manifestazione dell'immunodeficienza, non è stata influenzata dalla terapia con immunoglobuline ed è regredita rapidamente con la terapia steroidea.

Bibliografia:

- Spickett GP, Farrant J, North ME, Zhang JG, Morgan L, Webster AD: Common variable immunodeficiency: how many diseases? *Immunol Today* 1997; 18: 325-328.
- Mohammadinejad P, Aghamohammadi A, et al. Pediatric Patients With Common Variable Immunodeficiency: Long-term Follow-up. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2012; Vol. 22(3): 208-214
- Gathmann B, Grimbacher B, Beaute J, Dudoit Y, Mahlaoui N, Fischer A, Knerr V, Kindle G, Party ERW (2009) The European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies: results 2006-2008. *Clin Exp Immunol* 157(Suppl 1):3-11
- Graham Davies E, Thhrasher AJ. Update on the hyper immunoglobulin M syndromes. *British Journal of Haematology* 2010, 149 167-180.
- Etzioni A., et al. The Hyper IgM Syndrome An Evolving Story *Pediatric Research* (2004) 56, 519-525;
- Schroeder HW Jr. Schroeder HW 3rd, Sheikh SM. The complex genetics of common variable immunodeficiency. *J. Investig. Med.* 2004; 52:90-103.
- Deane S, Selmi C, Naguwa S, Teuber SS, Gershwin ME. Common Variable Immunodeficiency: Etiological and Treatment Issues. *Arch Allergy Immunol* 2009;150:311-324
- Park JH, Resnick ES, Cunningham-Rundles C. Perspectives on common variable immune deficiency *Ann N Y Acad Sci* . 2011 December ; 1246: 41-49. doi:10.1111
- Pagon RA, Bird TD, Dolan CR et al. Common variable immunodeficiencies overview. *GeneReview-NCBI Bookshelf*.
- Estrada Pérez V, Pérez de la Serna J, García Paredes J, Cortés León M, Gutiérrez Marcos FM, Estrada Sáiz RV. Digestive manifestations of common variable immunodeficiency. *Rev Clin Esp.* 1991 Feb;188(3):142-6.

L079

“SMILE, BOCCA E DENTI SONO OK”: PERCORSO INFORMATIVO PER LA GESTIONE DELLA SALUTE ORALE

A. Majorana,¹ E. Bardellini,¹ P. Flocchini,¹ M. Dotti,² E. Cavagna,² F. Porta³

¹Clinica Odontoiatrica, Università di Brescia, Brescia; ²Associazione Bambino Emopatico, UO Oncoematologia Pediatrica, Spedali Civili, Brescia; ³UO Oncoematologia Pediatrica, Spedali Civili, Brescia, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Lo scopo di questo lavoro è stato quello di fornire ai caregivers e/o ai piccoli pazienti, raccomandazioni mirate e applicazioni pratiche, riguardanti la gestione della salute orale nel periodo prima, durante o dopo i trattamenti anti-neoplastici, con l'obiettivo di migliorare la situazione di igiene orale e prevenire eventuali sovrainfezioni, in grado di compromettere in modo serio le condizioni generali del bambino. Questi percorsi informativi sono stati tradotti in un opuscolo, realizzato dagli odontoiatri pediatrici, igienisti dentali e psicologi, di facile consultazione, in 4 diverse lingue, che ha permesso di rendere fruibile a tutti, le conoscenze in ambito di salute orale, ma soprattutto in grado di sottolineare le strategie per prevenire e riconoscere le complicanze farmacologiche.

METODI: L'opuscolo, intitolato "Smile, bocca e denti sono ok" è dedicato al paziente, scritto con un linguaggio accessibile da un piccolo lettore e corredato con illustrazioni che permettono di comprendere il testo anche ai bambini più piccoli. Si articola in due sezioni, una dedicata al periodo delle cure e un'altra dedicata al ritorno a casa e contiene tutte le indicazioni utili per la cura della bocca nelle due diverse situazioni. La prima sezione, intitolata "Durante le terapie" contiene sotto forma di semplici regole pratiche le prassi di igiene dentale che i bambini devono seguire e indicazioni sulle modalità per evitare le complicanze più frequenti. In questa sezione sono presenti anche dei riquadri con dei consigli per i genitori, che sono parte attiva nel processo di cura del cavo orale del proprio figlio. Poiché il percorso di terapia non si interrompe in ospedale ma prosegue presso il domicilio, la seconda sezione, intitolata "Dopo la terapia", contiene alcuni consigli utili per i bambini e per i genitori dopo la conclusione della terapia. L'opuscolo è disponibile in quattro lingue: italiano, spagnolo, russo e arabo. Le lingue sono state scelte in base alle statistiche degli accessi al Reparto, scegliendo i Paesi maggiormente rappresentati.

RISULTATI: Come evidenziato dalle Linee Guida del Ministero della Salute (giugno 2010) all'interno delle Linee Guida per la promozione della Salute orale e la prevenzione delle patologie orali negli individui in età evolutiva che devono essere sottoposti a terapia chemio e/o radio, l'intera comunità scientifica internazionale attribuisce ai programmi di prevenzione delle patologie orali un ruolo fondamentale nella buona riuscita dei protocolli chemio-radioterapici. L'adesione a tali protocolli ha come esiti attesi la significativa diminuzione di mucositi tossiche e/o infettive con una significativa riduzione delle ulcere della mucosa della bocca dei bambini e conseguentemente una significativa diminuzione del dolore che consente ai bambini in trattamento di potersi nutrire in maniera migliore con un conseguente miglioramento della sua qualità di vita.

CONCLUSIONI: Questo opuscolo rappresenta un completamento e non una sostituzione della comunicazione medico-paziente, l'intento è quello di dotare le famiglie di uno strumento di facile comprensione che permetta loro di recuperare le informazioni utili qualora ne sentano il bisogno. Si ipotizza che questo strumento possa essere particolarmente utile per i pazienti stranieri che possono riscontrare particolari difficoltà nella comunicazione orale. Questo opuscolo rappresenta anche un intervento psicologico perché una comunicazione semplice ed accessibile rappresenta un primo strumento di contenimento dell'ansia per il bambino e i genitori.

L080

MANIFESTAZIONI CUTANEE ATIPICHE NELL'AGAMMAGLOBULINEMIA X-RECESSIVA: PRESENTAZIONE DI UN CASO E REVIEW DELLA LETTERATURA

L. Palumbo,¹ M. Maffei,¹ C. Donati,¹ G. Zani,¹ M. Milanese,¹ A. Mantovani,¹ C. Mingotti,¹ G. Gualdi,² A. Soresina,¹ A. Plebani¹

¹Immunologia Pediatrica, Clinica Pediatrica, Spedali Civili di Brescia, Brescia; ²UO Dermatologia, Spedali Civili di Brescia, Brescia, Italy

CASE REPORT: l'Agammaglobulinemia X-recessiva (XLA) rappresenta il prototipo delle immunodeficienze umorali ed è caratterizzata dalla riduzione/assenza dei livelli di immunoglobuline sieriche e dall'assenza di linfociti B circolanti. Nello specifico la malattia è causata da una mutazione del gene Btk localizzato sul cromosoma X, colpendo quindi solo soggetti di sesso maschile. I pazienti con XLA presentano frequentemente infezioni batteriche ricorrenti, soprattutto a livello delle vie respiratorie e del tratto gastrointestinale, meno frequentemente artriti, meningiti e sepsi. Le manifestazioni cutanee della patologia comprendono principalmente le infezioni piogeniche, celluliti ed eczema¹. Presentiamo il caso di G. L., paziente di 27 anni, a cui è stata fatta diagnosi all'età di 8 mesi di XLA. Dall'anamnesi familiare emerge che due zii materni sono deceduti nel primo anno di vita per problemi infettivi, uno zio materno è morto all'età di 30 anni per pneumocistosi e due cugini materni affetti da XLA sono viventi e in buone condizioni di salute. Dall'età di 8 mesi G.L. è in terapia sostitutiva con Immunoglobuline. Nei primi anni di vita G.L. presenta frequenti episodi di bronchite, rinite e congiuntivite recidivanti. All'età di 16 anni compare una lesione sottocutanea a livello dell'articolazione tibiotarsica destra, che in seguito a biopsia viene identificata come una vasculite nodulare, trattata con terapia antinfiammatoria e antibiotica. Per la persistenza e il peggioramento dei noduli sottocutanei agli arti inferiori viene iniziata terapia immunosoppressiva con steroide e successivamente ciclosporina, con progressivo miglioramento del quadro clinico cutaneo. Purtroppo nel corso della terapia immunosoppressiva G.L. sviluppa una polmonite interstiziale da *Pneumocystis Carinii*. Nel 2009 un episodio di sepsi da *Campylobacter Jejuni*, a partenza gastroenterica, trattato con terapia antibiotica sistemica con aminoglicosidi e carbapenemici, con completa risoluzione del quadro clinico. A luglio 2010 G.L. presenta un processo flogistico acuto in corrispondenza dell'inserzione del tendine d'Achille di sinistra per cui esegue una visita ortopedica, in cui viene descritta una tendinosi dell'Achilleo sinistro verosimilmente secondaria all'assunzione di ciprofloxacina. Dall'esame ecografico emerge un ispessimento dello strato adiposo con aspetto pseudo-nodulare disomogeneamente ipoecogeno, che ingloba posteriormente e medialmente il tendine d'Achille; anche alla risonanza magnetica si conferma un'area di alterato segnale da edema dei tessuti molli peritendinei da riferirsi a processo flogistico acuto. Nel giugno 2012 a livello calcaneare sinistro, nella sede della progressiva tendinite, si evidenzia una lesione cutanea per cui viene richiesta valutazione dermatologica. G.L. viene sottoposto a biopsia cutanea della lesione nel sospetto di patologia linfoproliferativa o di tumore vascolare (Kaposi/pseudoKaposi). L'esame istologico descrive un'epidermide marcatamente assottigliata con focale dermatite dell'interfascia e ipercheratosi follicolare; nel derma superficiale e profondo, con coinvolgimento della porzione superficiale dell'ipoderma, si nota un denso infiltrato linfoistioide confluyente e destruento, presenza di linfociti di piccola taglia a nuclei ipercromici e irregolari con fenotipo positivo per CD2, CD3, CD5, CD7 e netta prevalenza di CD8+ sui CD4+. Non viene dimostrato né un quadro di vasculite, né di proliferazione vascolare riferibile a sarcoma di Kaposi e si conclude per una proliferazione linfoistioide con fenotipo CD8 dominante. Vista la diagnosi di proliferazione pseudo-linfomatosa reattiva il paziente viene trattato con clobetasolo unguento topico in occlusione due volte al giorno, per quattro settimane con remissione completa delle lesioni. Attualmente a distanza di dodici mesi dalla terapia non è stata segnalata alcuna recidiva locale.

CONCLUSIONI: Come noto, il nostro caso sottolinea la necessità di eseguire tempestivamente esame istologico di eventuale lesione cutanea in particolare in pazienti con patologie come l'XLA, per le quali è descritta un'aumentata incidenza di patologie tumorali. Ad oggi, rivedendo la letteratura disponibile, sono stati segnalati nei pazienti con XLA due casi di tumori cutanei. Un paziente XLA di 28 anni², a cui è stato diagnosticato un linfoma a cellule T primitivo a sede cutanea, localizzato al volto, al tronco e agli arti. La diagnosi è stata posta in seguito all'esame istologico di tessuto prelevato dalla zona periorale e dall'arto superiore sinistro; la neoplasia è stata trattata con chemioterapia (vincristina, adriamicina, ciclofosfamide e prednisone) con beneficio. Un altro caso³ di tumore cutaneo a prognosi più infausta è stato descritto in un paziente di 46 anni affetto da XLA che ha presentato una cisti sottocutanea, mobile e non dolente a livello dell'articolazione interfalangea prossimale del quinto dito della mano destra. Tale lesione è stata sottoposta ad escissione e l'esame istologico ha mostrato un dermatofibrosarcoma protuberans, CD34+ e fattore XIIa negativo. Per il ripresentarsi della lesione il paziente è stato successivamente sottoposto ad amputazione del dito interessato. Come è ovvio, trattandosi di patologie rare, è al momento difficile poter dire se le complicanze tumorali a carico della cute sono più frequenti nell'XLA rispetto alla popolazione generale.

Bibliografia:

1. Winkelstein JA et al. X linked agammaglobulinemia: report and United States Registry of 201 patients. *Medicine (Baltimore)* 2006; 85:193-202.
2. Park JY et al. Primary cutaneous peripheral T-cell lymphoma in a patient with X-linked agammaglobulinemia. *The British journal of dermatology*, 2011 Mar;164(3):677-9.
3. Flint NJ et al. Dermatofibrosarcoma protuberans in a patient with X-linked agammaglobulinemia. *Journal of clinical pathology*, 2007 Oct;60(10):1162-4.

L081

TUMEFAZIONI LATEROCERVICALI DEL COLLO NON SOLO ADENOMEGALIEA. Spirito,¹ M. Foglia,² G. Nardella,² L. De Santis,² L. Miglionico,¹ M. Maruzzi,¹ M. Delvecchio,¹ G. Giannatempo,¹ S. Ladogana¹¹IRCCS, Ospedale Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG); ²Università degli Studi di Foggia, Foggia, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il Neurofibroma plessiforme (NP) insorge comunemente nei pazienti affetti da neurofibromatosi di tipo 1 (NF1), con una frequenza stimata tra il 26 e il 44%.¹ E' un tumore mesenchimale che origina dalle cellule di supporto dei nervi periferici (cellule di Schwann e fibroblasti perineurali), che interessa multipli fasci nervosi. L'accrescimento dell'NP si può estrinsecare lungo il decorso del nervo o lungo il suo diametro trasverso: il fascio nervoso coinvolto si presenta ispessito con una ipertrofia dei tessuti circostanti.²

METODI: TS, femmina di 4 anni e mezzo. Anamnesi patologica muta fino all'età di 3 anni e mezzo quando viene riscontrata una tumefazione laterocervicale destra diagnosticata come linfoadenomegalia reattiva e per la quale esegue controlli ecografici con frequenza trimestrale con quadro morfologico invariato. All'età di 4 anni e 3 mesi comparsa di otalgia destra e diagnosi di otite esterna trattata con antibiotico-terapia senza alcun beneficio. Un mese dopo, recidiva di otite per cui esegue valutazione otorinolaringoiatrica con riscontro di esostosi del condotto uditivo destro. Esegue TC dell'orecchio medio che evidenzia un'alterazione morfo-strutturale dell'osso temporale, totale mancanza della parete inferiore e posteriore del condotto uditivo esterno, plurime erosioni della mastoide, nonché una breccia ossea della sincondrosi temporo-occipitale e della porzione contigua dell'osso occipitale (Figura 1 A,C). La TC evidenzia anche un marcato ispessimento ipodensso dei tessuti molli sottocutanei della regione nucale destra, in corrispondenza della quale si apprezza palpatariamente una tumefazione di consistenza molle (Figura 1B).

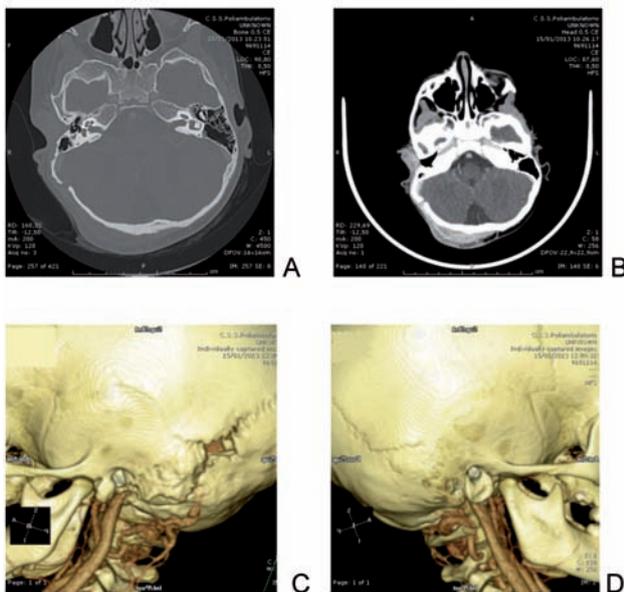


Figura 1. TC in assiale con finestra per osso (A) TC in assiale con mdc e finestra per parti molli (B) e con ricostruzioni 3D del lato lesso (C) e sano (D). Distruzione ossea della mastoide destra e interruzione della corticale ossea del versante destro dell'osso occipitale.

RISULTATI: La bambina giunge alla nostra osservazione in buone condizioni generali, all'esame obiettivo si apprezza un'asimmetria del volto con riscontro palpatorio di linfoadenomegalia latero-cervicale e sovraclaveare prevalentemente a destra e tessuto di consistenza molle in sede occipitale. Il faringe appare iperemico con ipertrofia tonsillare destra. Effettua una RM encefalo, massiccio facciale ed orecchio medio, che conferma le alterazioni ossee e l'ispessimento dei tessuti molli della regione retroauricolare e nucale destra, con intenso enhancement esteso da un piano orizzontale passante per C1-C2 ad un piano passante per il torcolare. Alterazioni di segnale simili si repertano anche a livello della loggia parafaringea di destra, nello spazio vascolare omolaterale e nella loggia parotideea destra. Si evidenziano inoltre plurime linfoadenopatie confluenti laterocervicali e sottomandibolari bilateralmente (Figura 2A, 2B). Si completa l'iter diagnostico con: audioimpedenzometria e potenziali evocati uditivi che evidenziano una ipoacusia trasmissiva moderata a destra; scintigrafia scheletrica, EEG, Fundus oculi, lampada a fessura, RX torace, ECG ed ETG addome sono risultati nella norma. Gli esami ematochimici di routine, compresi: markers virali, sottopopolazioni linfocitarie, indici flogistici, tampone faringeo sono negativi con cariotipo 46XX. Si eseguono biopsie del tessuto molle sottogaleale e nucale con diagnosi di Neurofibroma plessiforme. Viene ricercata la presenza di altri elementi diagnostici suggestivi di Neurofibromatosi tipo 1 (NIH 1997) senza alcun riscontro e nonostante l'assenza di dati clinici, si avvia il sequenziamento del DNA per NF1.

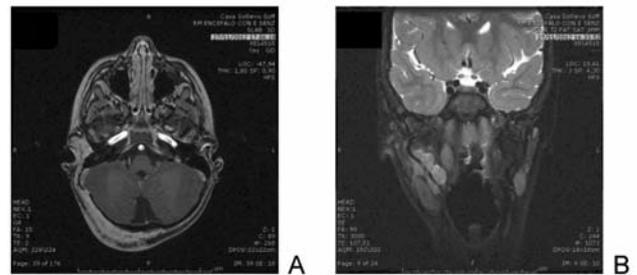


Figura 2. RM in assiale GRE T1 dopo mdc (A), e RM in coronale FSET2 fat sat (B). Processo espansivo che distrugge la mastoide destra e si espande lungo il profilo dell'osso occipitale (A). Altro processo espansivo nella regione laterale destra del collo, in sede parafaringea e nella loggia vascolare destra (B).

CONCLUSIONI: Il Neurofibroma plessiforme può originare sia dai nervi cutanei, rendendosi evidente massa palpabile cordoniforme del derma con irregolare pigmentazione e/o aumentata vascolarizzazione, che da nervi di strutture profonde. I NP possono interessare tutta la superficie corporea. Frequente è il coinvolgimento del cranio e della regione nucale, per la loro ricca innervazione, con origine dai nervi cranici o dai nervi cervicali superiori. In questi casi si assiste ad un coinvolgimento della regione auricolare posteriore o della nuca. Si tratta sempre di una lesione neoplastica benigna che nel 2-5% dei casi può andare incontro a trasformazione maligna.⁴ Il trattamento è prettamente chirurgico, nonostante il rischio di recidive. Un'età inferiore ai 10 anni, la presenza di neoplasia residua e la localizzazione a testa, collo e volto costituiscono fattori prognostici negativi. Il caso proposto è peculiare per due aspetti:

1. il riscontro di un NP isolato è infrequente: si stima che in oltre il 90% dei casi esso sia associato a NF1;⁴
2. la presenza di displasia dell'osso occipitale e la completa assenza della mastoide destra è stata fin qui segnalata solo in un altro paziente, affetto però da NF-1.⁵

Sebbene non possiamo escludere che la nostra paziente sia affetta da NF1 (genetica in corso), il nostro caso è peculiare sia per la manifestazione di esordio (la massa diagnosticata come linfoadenomegalia retroauricolare si è poi rivelata un NP) che per la rarità della sede con effetto destrutturante importante. Il trattamento in questi casi non è al momento standardizzato. Considerata la benignità della lesione che non causa attualmente sintomi rilevanti, l'impossibilità di trattare chirurgicamente la massa per via della sede, si è deciso, dopo consulto con altri centri, per la sola osservazione clinica. Tuttavia, stiamo valutando se altri approcci terapeutici, come chemioterapia o embolizzazione, possano avere un rapporto rischi - benefici a favore dei secondi.

Bibliografia.

1. *Am J Med Genet* 1999; 89:31-37.

2. Mod Pathol 1998; 11:612-17.
3. Am J Med Genet 1996; 66:7-10.
4. The laryngoscope 2004; 114:1410-14.
5. Eur J Dermatol. 2011 May-Jun;21(3):452-3.

L082

INDICATORI DI RISCHIO BIO-PSICO-SOCIALE E REFERTO PSICOLOGICO IN UN CENTRO AIEOP

A. Pinto,¹ R. Capasso,¹ M. Palumbo,¹ F. Borrometi,¹ J. Blom,² V. Poggi¹

¹AORN Santobono-Pausilipon, Ospedale, Napoli; ²Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Università, Modena, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: All'interno del Servizio di Psicologia ospedaliera dell'A.O.R.N. Santobono-Pausilipon è stato realizzato un Referto Psico-Diagnostico che si propone di documentare quanto viene predisposto per ogni singolo paziente sulla base del rischio bio-psico-sociale individuato, partendo dall'assessment del paziente e della sua famiglia dalla fase iniziale della presa in carico al primo mese. Il referto nasce dalla necessità di condividere con i medici, una modalità standardizzata di raccolta dati basati su parametri *ad hoc*, definiti a priori ed esportabili alla comunità scientifica e di integrare in un approccio olistico l'aspetto prettamente medico-biologico della malattia con quello psicologico ad essa correlato (Engels, 1977).

METODI: Il referto psicodiagnostico tiene conto della diagnosi, del protocollo di cura che il paziente dovrà sostenere, del rischio legato alla malattia, della criticità psico-sociale intendendo quale *criticità* aspetti rilevabili sia dal profilo psicologico paziente/famiglia, sia da parametri di rischio sociale specifici (PAT). Il referto così articolato sarà la fotografia della condizione critica di partenza che, a seconda del rischio bio-psico-sociale evidenziato, avrà come suo corrispondente uno dei tre livelli d'intervento psicologico che di seguito descriviamo e che sono stati tratti dall'analisi retrospettiva degli interventi effettuati nell'anno 2011 e 2012. Nel primo livello viene considerato un discreto livello di adattamento alla malattia e di conseguenza l'attività psicologica sarà focalizzata sull'ottimizzazione delle strategie di fronteggiamento. Il secondo livello considera il rischio medio di adattamento alla condizione di malattia e rispetto al funzionamento familiare. L'intervento psicologico sarà mirato ad affrontare la tematica del disagio, ad avviare un processo di elaborazione della condizione di malattia e ad attivare un sostegno di tipo psico-sociale. Il terzo livello definisce un alto rischio e prevede un intervento clinico e psicosociale intensivo e una decisa segnalazione all'equipe medica dell'elevata criticità psicosociale emersa e del suo potenziale impatto sulla terapia. A tale riguardo è previsto un intervento clinico finalizzato alla riduzione dello stress e del disagio psicologico nonché un intervento di sostegno psico-sociale rivolto alla famiglia per facilitare l'elaborazione della condizione di malattia e la *compliance* nel contesto di cura.

RISULTATI: Tale lavoro di strutturazione del referto ha consentito di trasferire all'equipe medica attraverso degli standard, quelle informazioni essenziali che permettono di inserire nella cartella clinica di reparto dati meno sensibili e più tutelanti la privacy familiare e di focalizzare l'attenzione dell'intera *équipe* sulla necessità di un intervento mirato attraverso un linguaggio condiviso.

CONCLUSIONI: Inoltre tale referto ci permette di riflettere su una rimodulazione del carico di lavoro che tenga conto di specifici strumenti psicodiagnostici per l'intervento rivolto al paziente e alla famiglia nelle diverse fasi del percorso terapeutico.

Bibliografia:

- Engel, George L. (1977). *The need for a new medical model: A challenge for biomedicine*. Science 196:129-136.
- Kazak, A. E. (2006). *Pediatric Psychosocial Preventative Health Model (PPPHM): Research, practice and collaboration in pediatric family systems medicine*. Families, Systems and Health, 24, 381-395.
- Kazak, A., Cant, M. C., Jensen, M., McSherry, M., Rourke, M., Hwang, W. T., et al. (2003). *Identifying psychosocial risk indicative of subsequent resource utilization in families of newly diagnosed pediatric oncology patients*. Journal of Clinical Oncology, 21, 3220-3225.
- Kazak, A. E., Prusak, A., McSherry, M., Simms, S., Beele, D., Rourke, M., Alderfer, M., & Lange, B., (2001). *The Psychosocial Assessment Tool (PAT): Pilot data on a brief screening instrument*

for identifying high risk families in pediatric oncology. Families, Systems, & Health, 19(3), 303-315.

Kazak, A., Rourke, M., Alderfer, M., Pai, A., Reilly, A. & Meadows, A. (2007). *Evidence-based assessment, intervention and psychosocial care in pediatric oncology: A blueprint for comprehensive services across treatment*. Journal of Pediatric Psychology, 32, 1099-1110.

L083

NEOPLASIA PAPILLARE UROTELIALE A BASSO POTENZIALE DI MALIGNITÀ DELL'ETA' PEDIATRICA: RECIDIVA MULTIFOCALE E STRATEGIE DI TRATTAMENTO

A. Calisti,¹ P. Maurizi,² I. Russo,² M. Scalzone,² F. Pierri,² R. Arena,² V.D. Catania,¹ D. Rizzo,² A. Ruggiero,² R. Riccardi²

¹Dipartimento di Chirurgia e Urologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera San Camillo Forlanini, Roma, ; ²Divisione Oncologia Pediatrica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Policlinico Universitario "A. Gemelli", Roma, Italy

RAZIONALE: Le neoplasie uroteliali della vescica sono estremamente rare nelle prime due decadi di vita con una incidenza pari a 0,1% - 0,4% e sono stati descritti meno di 35 casi al di sotto dei 10 anni di età. La forma più tipica dell'età giovanile è la Neoplasia Uroteliale a basso potenziale di malignità (PUNLMP), che è biologicamente indolente, di basso grading e stadio tumorale. Le forme multifocali sono estremamente rare e attualmente non sono descritti in letteratura casi in bambini di età inferiore a 10 anni. Non esistono raccomandazioni standardizzate per il trattamento di tale neoplasia in età giovanile.

METODI E RISULTATI: Bambino di 9 anni affetto da neoplasia vescicale, la cui storia clinica è esordita all'età di 8 anni con ematuria macroscopica, per la quale è stato sottoposto ad esami strumentali di approfondimento diagnostico. L'esame cistoscopico mostrava la presenza di una struttura papillomatosa del diametro di circa 2 cm in corrispondenza del meato ureterale destro. Il paziente è stato pertanto sottoposto ad asportazione completa dell'eteroformazione per via trans-uretrale. L'esame istologico poneva diagnosi di Neoplasia uroteliale a basso potenziale di malignità, non infiltrante il connettivo sub-epiteliale (Ta), secondo la classificazione World Health Organisation/International Society of Urological Pathology 1998 (WHO/ISUP 1998). Successivamente il paziente è stato sottoposto a regolari controlli clinici e strumentali di follow-up a cadenza semestrale. Alla cistoscopia eseguita a distanza di un anno dal primo intervento, riscontro di recidiva multifocale di malattia. Le lesioni apparivano superficiali e non infiltranti, localizzate a livello delle pareti laterali e del fondo vescicale, con un diametro massimo di circa 3,5 cm. L'esame istologico confermava la precedente diagnosi. A completamento della stadiazione è stata eseguita Uro-TAC che ha escluso la presenza di infiltrazione del muscolo detrusore della vescica e di lesioni ripetitive a distanza. Sulla base della storia clinica, del tipo istologico delle lesioni e dello stadio di malattia, è stato iniziato trattamento chemioterapico endovescicale. Il trattamento prevedeva una prima fase di induzione, costituita da instillazioni vescicali monosettimanali di Mitomicina C (MMC) al dosaggio di 20 mg per un totale di 8 settimane. Il controllo cistoscopico eseguito alla fine della terapia di Induzione mostrava una regressione completa delle lesioni precedentemente descritte. E' stata pertanto eseguita terapia di Mantenimento con instillazioni mensili di MMC endovescicale al dosaggio di 20 mg per un totale di 6 mesi. La terapia è stata ben tollerata e il paziente non ha presentato complicanze degne di nota. I controlli strumentali eseguiti al termine del trattamento hanno confermato la negatività di malattia. Attualmente il paziente esegue regolari controlli clinici e strumentali di follow up, che a distanza di circa 6 mesi dalla fine del trattamento chemioterapico endovescicale, confermano la negatività di malattia.

CONCLUSIONI: Le neoplasie papillari uroteliali a basso potenziale di malignità, rappresentano un'entità istopatologica introdotta nella nuova classificazione WHO/ISUP 1998. Tali lesioni hanno un'alta tendenza alla recidiva locale e il loro trattamento varia a seconda del gruppo di rischio di appartenenza. Il rischio di ricorrenza e di progressione secondo lo score dell'European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC), si basa su: numero e dimensioni delle lesioni, tasso di recidiva precedente, invasività della lamina propria, presenza concomitante di carcinoma in situ e grading istologico. Nel nostro caso il paziente, a distanza di un anno dall'esordio, ha presentato una recidiva multifocale di malattia con lesioni superficiali non infiltranti la lamina propria (Ta), di basso grado, il cui diametro massimo era superiore a 3 cm. In considerazione delle caratteristiche della reci-

diva, il paziente apparteneva al gruppo "Alto Rischio" e per la multifocalità delle lesioni sarebbe stato candidato all'intervento di cistectomia radicale. Allo scopo di preservare la funzione d'organo, è stata posta indicazione a terapia endovesicale. Non esistono raccomandazioni standardizzate per il trattamento endovesicale delle neoplasie uroteliali in età giovanile e in letteratura non sono descritti altri casi di recidiva multifocale in bambini al di sotto di 10 anni di età. Le indicazioni terapeutiche attualmente disponibili sono per pazienti in età adulta ed includono l'immunoterapia con il Bacillo di Calmette et Guérin (BCG) e la chemioterapia con MMC, Doxorubicina ed Epirubicina. In considerazione dell'età del paziente e della tossicità sistemica correlata alla terapia con BCG, è stato deciso di eseguire trattamento con instillazioni endovesicali di MMC. La terapia è stata ben tollerata e si è assistito ad una remissione completa di malattia già al termine della fase di Induzione. L'instillazione endovesicale di MMC rappresenta una opzione terapeutica sicura ed efficace nei pazienti affetti da PUNLMPs recidivati ad Alto Rischio e nel nostro caso ha permesso di ottenere remissione completa di malattia, preservando l'organo coinvolto.

L084

IL TRATTAMENTO NON FARMACOLOGICO DEL DOLORE NEL BAMBINO. ESPERIENZA DEL DIPARTIMENTO DI EMATOLOGIA E ONCOLOGIA IRCCS G. GASLINI

B. D'Ulivo, S. Di Profio, F. Riccardi, F.G. Naselli, L. Manfredini, D. Caprino

Dipartimento di Ematologia Oncologia Pediatrica, Istituto G. Gaslini, Genova, Italy

PSICO-ONCOLOGIA. RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il trattamento non farmacologico del dolore nel bambino si propone di incrementare le strategie di coping, attraverso la modificazione di quei fattori che aumentano o rendono più angosciante e drammatica la sensazione dolorosa. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, le tecniche non farmacologiche dovrebbero essere messe in atto come prassi abituale e associate alla somministrazione degli analgesici. Le TNF comprendono i metodi cognitivi e i metodi comportamentali, che possono essere scelti di volta in volta a seconda dell'età e delle caratteristiche del piccolo paziente, del tipo di dolore e delle risorse disponibili. Accanto ai metodi cognitivo-comportamentali, è fondamentale il supporto psicologico e logistico al bambino da parte degli operatori e della struttura, oltre alla massima cura nell'applicare costantemente tutti i provvedimenti atti a migliorarne il benessere del bambino.

METODI: L'efficacia delle TNF è basata soprattutto sulla naturale predisposizione del bambino a farsi coinvolgere mentalmente, grazie a facile distraibilità, grande capacità di immaginazione e maggiore plasticità del sistema nervoso. Da un punto di vista fisiologico, le TNF attivano le strutture nervose che inibiscono la nocicezione a livello periferico e/o centrale. A livello periferico l'azione si esplica sul *gate control*, meccanismo per il quale stimoli tattili apportati su un segmento corporeo inibiscono la trasmissione dello stimolo doloroso proveniente dalla stessa area, per mezzo di interneuroni inibitori presenti in sede midollare. A livello centrale esiste un complesso sistema di modulazione antinocicettivo discendente, che agisce tramite la liberazione di serotonina, noradrenalina e oppioidi endogeni. La tecnica da utilizzare si sceglie in base a: 1) *Desiderio/parere del bambino*. 2) *Caratteristiche di personalità del bambino*. 3) *Parere dei genitori*. 4) *Età*.

RISULTATI: Da alcuni anni nel nostro Dipartimento vengono utilizzate, in diversi casi, le TNF con successo. Segue un'analisi dettagliata delle tecniche più utilizzate, in quale ambito (reparto, day hospital e domiciliare) e con quale scopo. **Terapie di supporto:** Viene posta una particolare cura nell'accoglienza e nell'informazione adeguata sia ai genitori che al paziente e viene lasciata la possibilità, quando possibile, di scelta ad esempio quando essere visitato ecc. **Terapie Fisiche:** Tutti gli ambienti sono stati resi accoglienti e confortevoli utilizzando colori, disegni e spazi adatti al gioco e al riposo. **Metodi Cognitivi:** Domiciliare: si utilizzano la distrazione per effettuare i prelievi e/o la somministrazione di farmaci sottocute. Day hospital: si utilizza il gioco, la musica, l'immaginazione per effettuare prelievi e somministrazione di terapie. Reparto: oltre al gioco, la musica si utilizza l'immaginazione per il controllo del dolore da procedura o cronico. E' prevista inoltre la presenza dei "medici clown" una volta a settimana. **Metodi Comportamentali:** Sono utilizzati soprattutto in Assistenza Domiciliare e in Reparto per la gestione del dolore da procedura e cronico e per la gestione dell'ansia (Tabella 1).

CONCLUSIONI: In età prescolare sono naturalmente sviluppate *immaginazione e fantasia*. La capacità di pensiero magico e fantastico permette al bambino di allontanare la mente dal momento di dolore e paura che sta vivendo, attraverso un processo di dissociazione mente-corpo, per raggiungere un vero e proprio stato temporaneo di *trance* (stato di coscienza modificato in cui l'attenzione è ristretta, focalizzata ed assorbita da un pensiero), in cui è possibile controllare le sensazioni fisiche dolorose. Nelle età successive le TNF aiutano il bambino a diventare protagonista e responsabile delle proprie capacità di contenere ansia e dolore, assumendo un ruolo di partecipazione attiva a quanto gli sta succedendo, un pieno senso di fiducia in sé stesso e di capacità di controllo della situazione (*coping skills, empowerment*). Nello stesso tempo, genitori e operatori diventano parte integrante dell'intero processo, concorrendo attivamente ad alleviare il dolore.

Tabella 1.

TERAPIE DI SUPPORTO	Sostengono e danno forza al bambino ed alla famiglia	Cure centrate sulla famiglia Informazioni precise Empatia Possibilità di scelta Supporto religioso/morale
TERAPIE FISICHE	Interessano il sistema sensoriale	Stabilizzare le fratture Evitare la ritenzione urinaria Trattare l'iperpiressia Cercare una posizione adeguata per il paziente Modificare l'ambiente (rumori, luci) Essere delicati nelle manovre Contatto fisico Caldo e freddo Fisioterapia TENS (Elettro-neurostimolazione transcutanea) Agopuntura
METODI COGNITIVI (DISTRUZIONE)	Influenzano i pensieri del bambino attraverso la distrazione attiva della sua attenzione	Gioco Musica Clown Animali Immaginazione Ipnosi
METODI COMPORTAMENTALI	Modificano i comportamenti	Respirazione profonda Rilassamento

L085

BLUEBERRY MUFFIN BABY SYNDROME DA ISTIOCITOSI A CELLULE DI LANGERHANS: DESCRIZIONE DI UN CASO

C. Domenici, L. Luti, E. Dati, L. Coccoli, M. Nardi, C. Favre
 UO Oncoematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana, Pisa, Italy

INTRODUZIONE: "Blueberry muffin baby syndrome" (BMBS) è un termine che descrive la cute di un neonato che presenta multiple macule blu/porpora o noduli cutanei. Tali lesioni sono il risultato di una infiltrazione nello strato cutaneo di un cluster di cellule emopoietiche o di disseminazione cutanea metastatica.

CASO CLINICO: B. nasce a termine a 41 settimane e 2 giorni di gestazione con TC (mancata progressione fetale) da gravidanza normodecorsa. Primi atti fisiologici nei limiti della norma. Pochi minuti dopo la nascita viene notata la presenza di un decina di lesioni cutanee, di dimensioni e forma variabili, alcune maculari, altre infiltranti tipo noduli, di colore nero-viola localizzate a livello dei quadranti addominali inferiori, glutei, arti inferiori e regione paramammaria destra (Figura 1); tali lesioni cutanee permettono di porre diagnosi clinica di BMBS. Poiché la bambina non presenta altri sintomi e gli esami eseguiti risultano nella norma (in particolare normale l'emocromo, lo striscio di sangue periferico e negativa la sierologia gruppo TORCH), tra le varie cause di BMBS la più probabile appare l'espressione cutanea della istiocitosi a cellule di Langerhans. Per tale motivo viene eseguita la biopsia di una lesione

nodulare il cui esame istologico conferma la diagnosi evidenziando la presenza di reperti morfologici ed immunohistochimici (S100+, CD1a+, LCA -/+) compatibili con localizzazione cutanea di istiocitosi a cellule di Langerhans. Si eseguono inoltre Rx torace e scheletro ed una visita oculistica per escludere ulteriori localizzazioni di malattia. Data la benignità della condizione patologica che, nella maggior parte dei casi, presenta un decorso autolimitantesi, la bambina viene quindi dimessa e programmato follow-up ambulatoriale.



Figura 1.

DISCUSSIONE La diagnosi differenziale in presenza di un bambino che presenta una clinica compatibile con la diagnosi di BMBS deve comprendere: infezioni connatali (Rosolia, Toxoplasmosi, Citomegalovirus, Herpesvirus, Coxsackie, Epstein Barr virus, Parvovirus, Sifilide), malattie emolitiche (sferocitosi ereditaria), trasfusione gemello-gemello o neoplasie (leucemia congenita cutanea, istiocitosi a cellule di Langerhans, neuroblastoma, rabdomiosarcoma congenito). Gli accertamenti diagnostici di primo livello sono dunque costituiti da un esame emocromo con striscio periferico, indagini sierologiche (gruppo TORCH), ecografia addome e transfontanelle. Indagini di secondo livello sono poi eventuale aspirato midollare e/o biopsia cutanea con esame istologico ed immunohistochimico. L'Istiocitosi a cellule di Langerhans è una patologia rara che riguarda circa 3-5 bambini per milione/anno ed include uno spettro di disordini di varia gravità, dalle più gravi come la malattia di Letter-Siewe, Hand-Shüller-Christian, granuloma eosinofilo, a forme benigne che hanno una spontanea involuzione come la forma cutanea, descritta per la prima volta da Hashimoto e Pritzker nel 1973; quest'ultima è una istiocitosi che si manifesta in epoca neonatale attraverso la comparsa di lesioni cutanee eterogenee (papule rosa, rosse, violacee, noduli e vescicole) che raramente possono configurare un quadro di BMBS. Le lesioni compaiono generalmente alla nascita o nelle prime settimane e tendono, con rare eccezioni, a regredire spontaneamente entro i primi mesi tre mesi di vita, lasciando, talora, esiti ipo o iperpigmentati o cicatriziali. La diagnosi di questa condizione patologica rimane essenzialmente istologica e clinica. La biopsia delle lesioni cutanee mostra un quadro sovrapponibile alle altre forme di istiocitosi: infiltrato dermico costituito da istiociti, con abbondante citoplasma eosinofilo e nucleo reniforme con contorno irregolare, pochi neutrofilo e linfociti. Gli istiociti sono caratteristici: all'esame immunohistochimico risultano S-100 e CD1 positivi e in microscopia elettronica mostrano granuli di Birbeck nel 10-30% dei casi. Tali caratteristiche istologiche non consentono di distinguere tuttavia la "self healing histiocytosis" da altre forme di istiocitosi con prognosi più seria la cui diagnosi differenziale sarà dunque affidata al decorso: autolimitantesi nel primo caso, una forma evolutiva con comparsa di lesioni sistemiche nell'altro. Fondamentale è quindi un attento follow up a medio-lungo termine del bambino, volto ad escludere eventuali recidive o progressioni di malattia (soprattutto a livello osseo, mucoso e cerebrale). Non esiste un trattamento specifico per questa condizione patologica. Solo nei casi caratterizzati dalla persistenza delle lesioni cutanee è indicato un trattamento topico steroideo. Nel caso di recidiva esclusivamente cutanea la prognosi rimane sostanzialmente buona con elevate percentuali di regressione spontanea delle lesioni senza coinvolgimento viscerale. Non è facile stabilire una percentuale di recidiva e mortalità perchè nella maggior parte dei casi i

bambini vengono seguiti per un breve follow-up: nei vari studi la recidiva cutanea varia da un 40 al 10% con un 6% dei casi che mostra recidiva sistemica dopo la risoluzione delle lesioni esclusivamente cutanee. Nel caso di recidiva sistemica è indicato un approccio più aggressivo della malattia attraverso trattamenti chemioterapici (vinblastina o etoposide con o senza terapia steroidea associata).

CONCLUSIONI Il nostro caso si è mostrato interessante per la insolita presentazione della malattia con il raro quadro di BMBS e pone l'attenzione sul fatto che ogni lesione cutanea congenita del neonato, anche isolata, debba essere valutata attentamente e debba altresì essere presa in considerazione, se pur rara, anche l'istiocitosi cutanea, malattia che può sottendere talvolta una patologia potenzialmente mortale. Da segnalare inoltre che gli attuali protocolli diagnostico-terapeutici non comprendono nella classificazione la forma di Hashimoto e Pritzker che, se pur a prognosi favorevole nella maggioranza dei casi è importante conoscere e diagnosticare per evitare eccessive indagini o addirittura trattamenti, previsti invece nelle forme a maggiore aggressività e non autolimitantesi.

L086

INFLUENZA E PREVENZIONE DELLA XEROSTOMIA NELLE MANIFESTAZIONI ORALI DEL PAZIENTE PEDIATRICO ONCOEMATOLOGICO

T. Perillo,¹ A. Degirolamo,² M. Scivetti,³ P. Muggeo,⁴ R. Koronica,⁴ N. Santoro⁶

¹Biomedicina dell'Età Evolutiva, Università degli Studi di Bari, Bari; ²Dipartimento Igiene Dentale, Università degli Studi di Bari, Azienda Ospedaliera Consorziale Policlinico di Bari, Bari; ³Dipartimento di Odontoiatria, Università degli Studi di Bari, Bari; ⁴Biomedicina dell'Età Evolutiva, Università degli Studi di Bari, Bari; ⁵Biomedicina dell'Età Evolutiva, Azienda Ospedaliera Consorziale Policlinico di Bari, Università degli Studi di Bari, Bari, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Nei pazienti oncoematologici in trattamento chemio-radioterapico la xerostomia svolge un ruolo cardine nella genesi e nell'aggravamento clinico delle principali manifestazioni orali quali mucositi, infezioni opportunistiche, disgeusia, malnutrizione, sanguinamento orale, carie radio-indotta, osteoradionecrosi, malformazioni dentali e facciali, trisma e discromie dentali. Obiettivo dello studio è stata la valutazione dell'influenza della xerostomia nelle manifestazioni del cavo orale nei pazienti affetti da LLA ed LAM, e lo sviluppo successivo di un programma educativo di prevenzione orale rivolto ai piccoli pazienti, ai genitori, ed al personale infermieristico.

METODI: Sono stati arruolati 60 bambini di età compresa tra 1 e 13 anni, suddivisi in tre gruppi: GRUPPO A (20 pazienti in trattamento chemioterapico), GRUPPO B (20 pazienti in fase di mantenimento), GRUPPO C di controllo (20 bambini sani). Per ogni gruppo sono stati rilevati parametri significativi quali flusso salivare, pH salivare basale e dopo stimolo con paraffina, indici di patologia dentaria quali DMFT (decay, missing and filled teeth), indice di BEWE (Basic Erosive Wear Examination) e di PCR (Plaque Control Record)/O'Leary; è stato inoltre somministrato un questionario inerente le patologie orali ai genitori dei gruppi A e B, ed è stata fornita ampia informazione (scritta mediante opuscoli figurati e pratica mediante lezioni collettive ed individuali) Figura 1 circa il mantenimento di una corretta igiene orale.

RISULTATI: I risultati hanno messo in evidenza:

- 1) Aumentata presenza di xerostomia nel Gruppo A (85%) rispetto al gruppo B (65%), e nei Gruppi A e B (75%) rispetto al gruppo C (10%).
- 2) Aumento patologico dell'Indice di PCR nei Gruppi A e B (48,5% e 40% rispettivamente) e valori nella norma nel Gruppo C (30%). I pazienti dei Gruppi A e B sono quindi da considerare soggetti a rischio di sviluppo della patologia gengivale e parodontale.
- 3) Aumento dell'indice di Bewe nei Gruppi A e B (45% in entrambi i gruppi), rispetto a valori non patologici riscontrati nel Gruppo C (15%).
- 4) Aumento dell'indice di DMFT nel Gruppo A rispetto al Gruppo B, e nei Gruppi A e B rispetto al Gruppo C (maggiore percentuale di denti cariati, persi ed otturati nei primi due gruppi).
- 5) Incremento del PH e della flussometria salivare (Figura 2 e 3) dopo stimolo con paraffina.

CONCLUSIONI: Il nostro studio ha confermato come la xerostomia ed i relativi cambiamenti qualitativi e quantitativi salivari che ne

derivano, rappresentano un fattore di rischio statisticamente significativo (p -value < 0,05) per le patologie del cavo orale. E' stato inoltre osservato un netto incremento del flusso salivare dopo masticazione di composti a base di paraffina, suggerendo che quest'ultima potrebbe rappresentare un ausilio di facile utilizzo e soddisfacenti risultati per la prevenzione della xerostomia. L'analisi dei risultati, infine, suggerisce che i pazienti con patologia oncoematologica in età pediatrica necessitano di: 1) maggiori attenzioni rivolte al disturbo salivare (xerostomia) indotta da chemio-radioterapia; 2) accurata informazione circa le complicanze a livello del cavo orale e delle relative misure di prevenzione e trattamento 3) stretta sorveglianza sanitaria da parte di specialisti del cavo orale, in particolare igienisti dentali 4) personale sanitario accuratamente informato ed istruito circa le terapie specifiche da somministrare in caso di manifestazioni di effetti collaterali nel cavo orale. Linee guida nazionali per la promozione della salute orale e la prevenzione delle patologie orali negli individui in età evolutiva che devono essere sottoposti a terapia chemio e/o radio; 2010.



Figura 1.

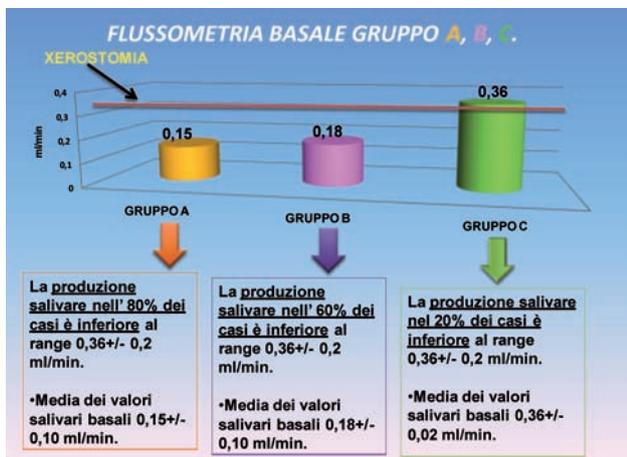


Figura 2.

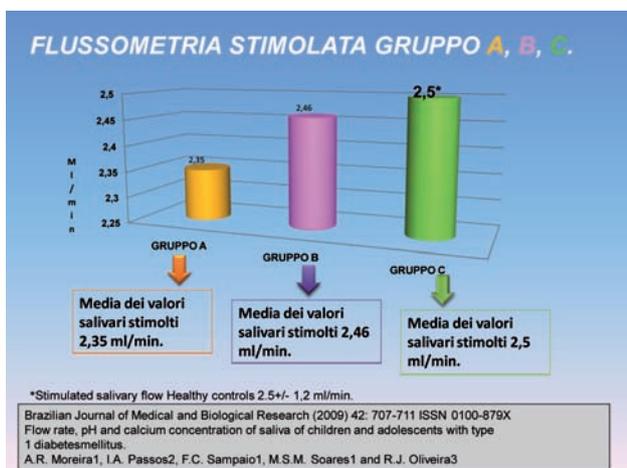


Figura 3.

L087

MEDULLOBLASTOMA PEDIATRICO: CASISTICA E ANALISI RETROSPETTIVA DAL 1997 AL 2013 DELLA UOC DI ONCOEMATOLOGIA PEDIATRICA - IRCCS "CASA SOLLIEVO DELLA SOFFERENZA" DI SAN GIOVANNI ROTONDO

A. Maggio,¹ A. Ciliberti,¹ L. De Santis,² R. De Santis,² M. Foglia,² M. Delvecchio,¹ M. Maruzzi,¹ L. Miglionico,¹ G. Nardella,² E. Poli,² A. Spirito,¹ G.M. Giannatempo,¹ S. Ladogana¹

¹IRCCS, Ospedale Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG); ²Università degli Studi di Foggia, Foggia, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: I Tumori cerebrali sono i più comuni tumori solidi dell'età pediatrica. Il Medulloblastoma rappresenta il 40% di tutti i tumori della fossa cranica posteriore, l'incidenza attesa in Europa è di 6,5 casi per milione di bambini di età compresa tra 0-14 anni. Origina dal cervelletto più frequentemente a livello del verme da dove tende a crescere all'interno del quarto ventricolo. Il picco di incidenza è tra i 3 e i 4 anni di età con una prevalenza nel sesso maschile.

METODI: Riportiamo l'analisi retrospettiva della casistica degli ultimi 16 anni di un singolo Centro, dei casi di medulloblastoma insorto in pazienti in età evolutiva. Dal 1997 al 2013 nel nostro Centro sono stati seguiti 23 pazienti (18 maschi e 5 femmine) di età media alla diagnosi 6 anni, 21 pazienti con medulloblastoma classico e 2 pazienti con medulloblastoma desmoplastico nodulare. Tutti e 23 i pazienti sono stati sottoposti ad intervento chirurgico di exeresi di neoplasia insorta in sede cerebellare (in 21 pazienti a partenza dal verme ed in 2 pazienti da uno dei due emisferi). L'intervento chirurgico è stato macroscopicamente radicale o con residuo < 1,5 cm² (Rischio Standard) in 18 pazienti (78%), in 1 paziente il residuo è stato > 1,5 cm² (4%) mentre in 4 pazienti (18%) la malattia era metastatica alla diagnosi, (con metastasi al midollo spinale in 3 pz e in sede extracerebrale linfonodi ed osso in 1 pz).

RISULTATI: Dei 18 pazienti operati radicalmente o con un residuo < 1.5 cm², 5 pazienti erano in epoca pre-PNET IV, pertanto sono stati trattati in accordo con il Protocollo AIEOP SNC 91 (2 pazienti) e con Protocollo AIEOP SNC 99 (3 pazienti). 4 di questi 5 pazienti sono recidivati e deceduti, resistenti ai trattamenti successivi; 1 paziente a 14 anni dalla diagnosi ha presentato recidiva sovratentoriale, suscettibile pertanto di ulteriore trattamento chirurgico, radio e chemioterapico, è comunque deceduto quest'anno per progressione di malattia. I 13 bambini con medulloblastoma rischio standard sono stati trattati secondo il Protocollo SIOP PNET IV (radioterapia cranio-spinale 23,6 Gy con boost su FCP, DTF 50-54 Gy + chemioterapia). Dei 13 pazienti inseriti nel Protocollo PNET IV, 12 (92%) sono vivi, in remissione completa. Solo 1 di questa coorte di pazienti, è recidivato ed è deceduto per progressione di malattia. Dall'analisi dei nostri dati si evince un'ottima risposta al trattamento, nei casi di medulloblastoma standard risk, in linea con i risultati della letteratura che riportano una OS>80% a 5 anni. Peggiora la prognosi nella casistica di nostri pazienti con medulloblastoma alto rischio (con residuo > 1,5 cm² o metastatici all'esordio) con un OS<40% a 5 anni. Pur essendo la prognosi del medulloblastoma nettamente migliorata in termini di sopravvivenza, permane l'importante aspetto delle sequele relative agli effetti tossici delle terapie e agli esiti post-chirurgici. Pertanto è fondamentale avviare un precoce programma di terapia riabilitativa ad ampio raggio e uno stretto monitoraggio auxologico ed endocrinologico. La riduzione della dose di irradiazione cranio-spinale a 23.4 Gy, anche nella nostra casistica di bambini lungosopravvissuti, ha riportato una minore tossicità neuroscopologica rispetto a quelli trattati con una dose di 36 Gy. Dei 13 pazienti con medulloblastoma vivi, in trattamento o fuori terapia dopo il trattamento chemio-radioterapico, 7 (80%) pazienti presentano ipoacusia iatrogena e 2 tra questi 7 pazienti presentano inoltre ipotiroidismo in terapia sostitutiva.

CONCLUSIONI: Nella nostra casistica l'attuazione di un intenso programma di fisioterapia volto al recupero delle sequele post operatorie ha permesso di ottenere ottimi risultati in termini di qualità di vita. I risultati del trattamento del medulloblastoma in età pediatrica, anche nella nostra esperienza, sono strettamente legati alla radicalità o meno dell'intervento chirurgico e all'assenza di metastasi. Importante il ruolo della radioterapia precoce e della chemioterapia oltre che dell'assistenza ai bisogni del bambino legata alla neoplasia e al trattamento. E' pertanto fondamentale una multidisciplinarietà degli interventi, al fine di perseguire non solo la guarigione ma la miglior qualità di vita possibile.

L088

EFFICACIA DELLA LOCK THERAPY NELLE INFEZIONI DEL CVC: ESPERIENZA PRELIMINAREE. De Marco,¹ S. Bernasconi,¹ G. Casazza,¹ C. Domenici,¹ C. Tascini,² C. Favre³¹UO Oncoematologia Pediatrica; ²UO Malattie Infettive; ³UO Oncoematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Pisa, Italy

INTRODUZIONE: L'impiego del CVC ha migliorato la modalità e possibilità di somministrare chemioterapici e terapie di supporto ai bambini con patologie oncologiche, pur rappresentando un fattore di rischio per complicanze infettive oltre che trombotiche. Tra le complicanze infettive si annoverano le infezioni locali del sito, sepsi catetere-correlate (CRBSI), trombo-flebite, endocardite, ed altre infezioni metastatiche (ascesso polmonare, ascesso cerebrale, osteomielite, endoftalmite, infezioni metastatiche) a cui possono conseguire prolungamento della degenza, ritardo e maggiore difficoltà della terapia della malattia di base e, non da ultimo, rischio di vita. Da un recente studio effettuato dall'università di Bari è emerso che il 14-51% dei CVC impiantati in bambini con tumori possono essere la causa di batteriemie e che l'incidenza di infezioni è di 1.4-1.9 episodi su 1000 CVC. In passato in molti casi l'unica soluzione era la terapia antibiotica associata alla rimozione del CVC. Oggi, grazie alla *lock therapy*, è possibile la sterilizzazione del catetere anche in caso di sepsi da *Staphylococcus Aureus*. Tale tecnica consiste nell'instillare nel lume di un catetere vascolare un antibiotico attivo sul germe isolato, ad elevata concentrazione (+/-eparina) e può consentire il salvataggio di cateteri a lunga permanenza in pazienti con infezioni CVC correlate, in assenza di segni di infezione del sito di inserzione o del tunnel. Soluzioni antibiotiche contenenti l'antimicrobico desiderato alla concentrazione di 1-5 mg/mL sono miscelate con 50-100 U di eparina (o sol salina) in un volume sufficiente per riempire il lume del catetere (usualmente 2-5 mL) e sono mantenute (*lock* - chiudere a chiave) all'interno del lume del catetere durante i periodi di inutilizzo.

METODI: La *lock therapy* è stata effettuata in due pazienti seguiti presso il nostro centro: un bimbo di 6 mesi affetto da Leucemia Mielomonocitica Giovanile splenectomizzata e sottoposto a terapia citoriduttrice con 6-mercaptopurina in attesa di trapianto e una ragazza di 17 anni con Leucemia Mieloide Acuta in tredicesima giornata post-trapianto da donatore allogenico non familiare. In entrambi il riscontro di emocultura da CVC (parzialmente impiantabile tipo Groshong) positiva per *Staphylococcus Epidermidis* è avvenuto in apiressia e in assenza di segni di infezione del tunnel sottocutaneo o dell'emergenza (l'emocultura da vena periferica era negativa). E' stata quindi effettuata terapia antibiotica con Daptomicina per via parenterale (8 mg/kg/die) e sono stati instillati 5 mg del medesimo antibiotico diluiti in 5 ml di soluzione fisiologica 0,9% con la metodica del *catheter lock*.

RISULTATI: In entrambi i casi si è ottenuta una negativizzazione dell'emocultura rispettivamente in quarta giornata di terapia e in seconda giornata dall'inizio della terapia antibiotica, consentendo di evitare la rimozione del CVC.

CONCLUSIONI: Il razionale del "lock" terapeutico si basa sul fatto che il germe responsabile dell'infezione è spesso indovato nella matrice del biofilm e difficilmente viene raggiunto dall'antibiotico per via sistemica. In questi casi ovviamente oltre al riempimento del CVC con antibiotico è necessario utilizzare lo stesso antibiotico per via sistemica. Il problema principale del "lock" con antibiotico è costituito dal rischio che buona parte degli antibiotici precipiti, se associata ad eparina. Nella nostra esperienza abbiamo utilizzato l'antibiotico in alte concentrazioni da solo, senza eparina o citrato. In 21 trials sulla *lock therapy* nel trattamento di infezioni CVC correlate in pazienti con cateteri a lunga permanenza, in associazione o meno a terapia antibiotica parenterale, il salvataggio del catetere in assenza di relapse si è verificato nel 77% dei casi. Tale tecnica era stata descritta fino ad ora quasi esclusivamente nei pazienti in dialisi. Solo *trials* clinici che coinvolgono i pazienti pediatrici oncologici potranno chiarire quali sono le migliori strategie di trattamento e prevenzione delle infezioni CVC correlate in questa popolazione.

Bibliografia:

1. Activity of Daptomycin with or without 25 Percent Ethanol Compared to Combinations of Minocycline, EDTA, and 25 Percent Ethanol against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Isolates Embedded in Biofilm. Estes R, Theusch J, Beck A, Pitrak D, Mullane KM. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Apr;57(4):1998-2000.

2. Treatment of hemodialysis catheter-associated bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by daptomycin lock method. Yılmaz H, Mutlu Yılmaz E, Esen S, Sünbül M, Leblebicioğlu H. *Mikrobiyol Bul.* 2012 Jul;46(3):470-4. Turkish.
3. Daptomycin lock therapy for grampositive long-term catheter-related bloodstream infections. Del Pozo JL, Rodil R, Aguinaga A, Yuste JR, Bustos C, Montero A, Espinosa G, García-Fernández N. *Int J Clin Pract.* 2012 Mar;66(3):305-8.
4. Locking out the bugs: the first retrospective study on daptomycin lock therapy for catheter-related bloodstream infections. Stein RA. *Int J Clin Pract.* 2012 Mar;66(3):231-3.
5. Daptomycin antibiotic lock therapy in a rat model of staphylococcal central venous catheter biofilm infections. Van Praagh AD, Li T, Zhang S, Arya A, Chen L, Zhang XX, Bertolami S, Mortin LI. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Sep;55(9):4081-9.
6. Catheter-related infections in pediatric patients with cancer. Cincinati V, Brescia L, Tagliaferri L, Giordano P, Esposito S. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012 Nov;31(11):2869-77.

L089

PERSONALIZZAZIONE DELLA GESTIONE ANTIDOLORIFICA ED EMOTIVA DURANTE LE PROCEDURE DOLOROSEK. Maslak,¹ C. Favara Scacco,¹ M. Astuto,² L. Scordo,² R. Scalisi,² M. La Spina,¹ P. Samperi,¹ L. Lo Nigro,¹ S. D'Amico,¹ V. Miraglia,¹ G. Russo,¹ A. Di Cataldo,¹¹Unità Operativa Ematologia Oncologia Pediatrica; ²Anestesia Rianimazione, Azienda Ospedaliero Universitaria Policlinico Vittorio Emanuele, Catania, Italy

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO: Il bambino in oncologia pediatrica va incontro a ripetute procedure invasive, come puntura lombare (PL), aspirato midollare (BM), biopsia ossea, necessarie per il processo diagnostico e terapeutico. Sono diversi gli aspetti delle procedure che possono essere vissuti con grande difficoltà: la paura del dolore, dell'anestesia, della perdita di controllo o la paura di separarsi dai genitori. Anche la modalità di supporto offerta dagli operatori e dai genitori può influenzare i livelli d'ansia e paura vissuti dai bambini. Abbiamo sviluppato diverse modalità di supporto intese a minimizzare l'effetto traumatico delle molteplici variabili emotive che intervengono al ripetersi delle procedure dolorose.

METODI: Sono stati arruolati 85 bambini sottoposti alle procedure dolorose. La modalità di supporto offerta prevede la presenza dello psicologo prima, durante e dopo. Prima, lo psicologo ha offerto uno spazio di ascolto, dove il bambino ha espresso i suoi bisogni e scegliere il tipo di supporto per lui più rassicurante tra 1) anestesia generale, 2) sedazione cosciente, 3) 'da sveglia' (senza supporto farmacologico). Durante la procedura, lo psicologo ha accompagnato il bambino nel rispetto della scelta fatta, della sua personalità, età ed esigenze mostrate, inducendo o la distrazione, o il rilassamento, o l'immaginazione visiva guidata. Dopo la procedura, lo psicologo ha offerto uno spazio di elaborazione dell'esperienza vissuta. Per ogni paziente e per ogni procedura è stata compilata una scheda di osservazione atta a valutare il vissuto del bambino.

RISULTATI: Da gennaio a Novembre 2012 sono state effettuate 247 procedure. Nel rispetto della scelta del bambino, il 39.3% delle procedure è stato eseguito in anestesia generale, il 26.7% in sedazione cosciente, mentre il 2% ha scelto di affrontare le procedure senza supporto farmacologico. Il rimanente 32% non ha potuto esprimere una preferenza perché o troppo piccolo, o per esigenze di tempo o per forte condizionamento genitoriale, ed è stato avviato ad anestesia generale. Il gruppo che ha potuto operare una scelta ha mostrato, nell'87% dei casi, senso di rassicurazione, alta compliance e scarsi livelli di ansia. Inoltre, in questo gruppo, abbiamo osservato la maggiore disponibilità dei genitori a separarsi dai figli che vanno in "sala procedure". Nel gruppo che non ha potuto operare una scelta, invece, i bambini con buona compliance sono stati solo il 35%, mentre il 65% evidenzia pianto prima della procedura, all'ingresso in sala procedure e/o al risveglio.

CONCLUSIONI: E' necessario 'personalizzare' la gestione delle tecniche di supporto farmacologico e non-farmacologico offerte ai bambini ascoltandoli e rispettando i loro bisogni. Questo permette di migliorare la relazione di fiducia tra i piccoli pazienti, genitori e l'equipe multidisciplinare. In questo modo seguiamo i processi di auto-regolazione dei bambini salvaguardando il naturale percorso di crescita della propria identità e di autostima, rendendo il percorso di cura un'esperienza possibile da integrare e non un trauma che ostacola. Inoltre la

presentazione della modalità di supporto rappresenta una potenziale prevenzione alla sindrome del burnout, aiutando la distribuzione di responsabilità tra i membri dell'equipe, la continuità relazionale tra operatori e bambini aumentando il senso di efficacia e benessere.

L090

UN CASO INSOLITO DI REAZIONE AVVERSA ALL'INFUSIONE DI IMMUNOGLOBULINE SOTTOCUTE

A. Trizzino,¹ S. Leone,² A. Trizzino,¹ S. Cannella,¹ C. Mosa,¹ P. D'Angelo,¹

¹UO di Oncoematologia Pediatrica; ²Scuola di Specializzazione in Pediatria, Azienda Ospedaliera Civico, Di Cristina e Benfratelli, Palermo, Italy

INTRODUZIONE. La terapia dell'Immunodeficienza Comune Variabile si avvale dell'uso di immunoglobuline per via endovenosa o sottocutanea.^{1,2} Le infusioni sottocutanee non si associano generalmente a reazioni sistemiche. Possono determinare manifestazioni locali con prurito ed edema locale nel sito dell'inoculazione, che si risolve dopo poche ore o nei casi più persistenti entro 48 ore. In letteratura vengono riportate alte percentuali di eventi avversi di lieve entità nel sito di inoculo sino al 91% delle infusioni.³ Tali eventi avversi tendono però a ridursi durante le infusioni successive. Non sono segnalati eventi avversi gravi.⁴

CASO CLINICO: Rita è una donna di 50 anni affetta da immunodeficienza comune variabile e da ipotiroidismo di Hashimoto. Ha eseguito terapia sostitutiva con immunoglobuline per via endovenosa sin dall'epoca della diagnosi, all'età di 25 anni, presentando come unico effetto collaterale la cefalea quando la velocità di infusione superava i 100 ml/ora. Nel 2010 Rita decide di passare alla terapia sostitutiva per via sottocutanea principalmente per ridurre la frequenza dei fastidiosi spostamenti dal suo luogo di residenza, distante più di 200 Km, al nostro centro. Ha iniziato a praticare uno schema con due infusioni settimanali di Subcuvia® presentando lieve fastidio nel sito di inoculo, accompagnato ad arrossamento e gonfiore della durata di qualche ora. Tale fastidio si era tuttavia progressivamente attenuato sino ad essere considerato di trascurabile importanza. A fine 2011 riferisce la comparsa di varie manifestazioni eritematopomfoidi pruriginose, localizzate all'addome, ma lontane dalla sede dell'ultima infusione (Figura 1).



Figura 1. Reazione eritemato-pomfoide.

Tali manifestazioni comparivano per lo più a 48-72 ore dall'infusione si è protravano per alcuni giorni. Alle infusioni successive il problema si verificava sempre più precocemente e con le stesse caratteristiche. La "classica" reazione locale all'infusione sottocutanea è circoscritta il sito di inoculo, e si manifesta in stretta relazione all'infusione stessa per poi risolversi dopo qualche ora. Nel nostro caso invece la reazione aveva un andamento bizzarro interessando per lo più sedi a distanza dall'infusione e comparando a distanza di giorni. Per le infusioni sottocutanee vengono utilizzati dispositivi costituiti da aghi speciali che presentano nel loro contesto, già inserito, un cerotto, al fine di facilitare l'ancoraggio dell'ago nel sottocutaneo. Rita utilizzava un

dispositivo molto diffuso di tipo "Medis". Abbiamo ipotizzato che potesse avere sviluppato una reazione al cerotto. Sono stati quindi fatti alcuni tentativi: abbiamo suggerito di rimuovere il cerotto dell'ago Medis e fissare il dispositivo con un cerotto di carta. Con tale strategia non ha presentato alcuna reazione. Ciò ha confermato l'ipotesi diagnostica di una reazione ritardata alla colla del cerotto e pertanto al successivo accesso in ospedale sono stati sostituiti i dispositivi di infusione. Con il cambio di ago (o meglio di cerotto a esso annesso) non si sono più verificati eventi avversi. Gli eventi avversi possono quindi essere collegati non soltanto alle immunoglobuline ma anche ai presidi che utilizziamo per effettuarle.

Bibliografia:

1. Mohamadinejad P, Aghamohammadi A, et al. Pediatric Patients With Common Variable Immunodeficiency: Long-term Follow-up. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2012; Vol. 22(3): 208-214.
2. Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS, et al. Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin. Immunol.* 2009.
3. Ochs HD, Gupta S, Kiessling P, Nicolay U, Berger M. Safety and Efficacy of Self-Administered Subcutaneous Immunoglobulin in Patients with Primary Immunodeficiency Diseases. *Journal of Clinical Immunology* May 2006, Volume 26, Issue 3, pp 265-273.
4. Dellepiane RM, Pavesi P, Beilis L, Raimondi M, Pietrogrande MC. Tollerabilità delle immunoglobuline per uso endovenoso. Focus sulle reazioni avverse. *RIAP* 06 2010: 23-34.
5. Spickett GP, Farrant J, North ME, Zhang JG, Morgan L, Webster AD: Common variable immunodeficiency: how many diseases? *Immunol Today* 1997; 18: 325-328.
6. Schroeder HW Jr. Schroeder HW 3rd, Sheikh SM. The complex genetics of common variable immunodeficiency. *J. Investig. Med.* 2004; 52:90-103.
7. Deane S, Selmi C, Naguwa S, Teuber SS, Gershwin ME. Common Variable Immunodeficiency: Etiological and Treatment Issues. *Arch Allergy Immunol* 2009;150:311-324.
8. Park JH, Resnick ES, Cunningham-Rundles C. Perspectives on common variable immune deficiency *Ann N Y Acad Sci* . 2011 December ; 1246: 41-49. doi:10.1111.
9. Pagon RA, Bird TD, Dolan CR et al. Common variabile immunodeficiencies overview. *GeneReview- NCBI Bookshelf.*

L091

COSA NASCONDE UNA PUPILLA BIANCA: TIPS PER IL PEDIATRA

T. Hadjistilianou,¹ S. De Francesco,² M. De Luca,¹ M. Caini,³ D. Galimberti,³

¹Oftalmologia, Università degli Studi di Siena, Siena; ²Pediatria, Policlinico Le Scotte, Siena, Italy

INTRODUZIONE ED OBIETTIVI: La leucocoria, non è sempre sinonimo di retinoblastoma avanzato. Esso può essere segno di retinoblastoma maculare, anche precoce, o di altre patologie retiniche dell'età pediatrica. Lo scopo di questo lavoro è svelare i segni che portano alla diagnosi.

METODI: Sono stati revisionati tutti i casi inviati per leucocoria al centro di Riferimento per il Retinoblastoma dell'Università degli Studi di Siena, dal 1980 al 2012.

RISULTATI: Su 685 casi di leucocoria inviati a siena nel periodo suddetto, 35 erano casi di Coats, 30 di colobomi, 2 di toxocara, 7 di persistenza del vitreo primario iperplastico (PHPV), 3 di displasia retinica, 12 di retinoma, 1 di malattia di Norrie, 6 di plica falciforme, 2 di astrocitomi, 2 mystery cases.

CONCLUSIONE: Gli autori riportano la loro esperienza sulle cause di leucocoria in età pediatrica, delineando le caratteristiche di ciascuna e sottolineando l'importanza di una precoce e corretta diagnosi differenziale ai fini di impostare l'iter terapeutico e/o di follow-up più corretto.