FONDAZIONE G. e D. DE MARCHI
Lotta contro le emopatie e i tumori dell'infanzia
ONLUS

Atti del Convegno

Giornata sulla TALASSEMIA

10 OTTOBRE 2009
Palazzina Liberty
Largo Marinai d'Italia
MILANO

Con il Patrocinio

Milano
Comune di Milano
Assessorato alla Salute

ATTI DEL CONVEGNO

Giornata sulla TALASSEMIA

PRENDERSI CURA: dal paziente al dna

10 OTTOBRE 2009
Palazzina Liberty
Largo Marinai d'Italia
MILANO

Fondazione De Marchi
via Della Commenda 9 - 20122 Milano
Tel: 02 55192026 - Fax: 02 93881978
Cell: 339 2334037
e-mail: fondazionedemarchi@tiscali.it
www.demarchi.org

Con il Patrocinio

Milano
Comune di Milano
Assessorato alla Salute

Il progetto **TALASSEMIA**

Anni fa un gruppo di genitori e di medici ha sentito la necessità di offrire ai loro figli ed ai loro piccoli pazienti, oltre alle migliori cure, un supporto assistenziale e psicologico ”umano e a misura di bambino” con l’obiettivo finale della guarigione e di una buona qualità di vita.

Con tale finalità è stata costituita la Fondazione G. e D. De Marchi Onlus che opera nell’ambito della Clinica Pediatrica De Marchi dell’ Ospedale Maggiore, Policlinico Mangiagalli e Regina Elena con un programma di “Assistenza Globale” che ha trovato un gruppo sempre più generoso di persone sensibili che si sono impegnate accanto ai piccoli pazienti, ai medici e ai genitori per fare opera di informazione e di educazione per prevenire queste malattie, per incentivare la ricerca e per migliorare l’assistenza.

La Fondazione G.e D. De Marchi Onlus realizza tale obiettivo attraverso l’istituzione di borse di studio per meglio qualificare i giovani medici, il miglioramento delle strutture ospedaliere, l’acquisto di apparecchiature scientifiche per lo sviluppo della ricerca medica, l’impiego di equipe di psicologi, assistenti sociali, animatrici ludiche e personale infermieristico aggiornato sempre con il primario obiettivo di dare ai piccoli pazienti tutto ciò che è necessario per donare loro un sorriso.

Le attività sviluppate negli anni nell’ambito del “Progetto assistenza globale ai bambini affetti da patologie ematologiche croniche ed oncologiche”, che compendia la missione della Fondazione De Marchi Onlus, hanno portato ad effettuare esperienze specifiche nelle diverse aree in cui sono coinvolti i pazienti e le loro famiglie mettendone in evidenza quelle in cui è necessario intervenire con più incisività.

A seguito di quanto è emerso da questa esperienza, oltre a continuare le attività di assistenza globale intrapresa, la Fondazione G. e D. De Marchi Onlus è promotrice del

" Progetto Talassemia: prospettive di ricerca per la guarigione"

Il progetto è focalizzato su talassemie e altre emoglobinopatie con l'intento di sviluppare da un lato nuove aperture nel campo della ricerca applicata, finalizzata ad ottenere terapie mirate alla correzione di specifici difetti genetici con l'obiettivo della guarigione, e dall'altro a migliorare la prevenzione tramite una diagnostica di alta qualità e una politica di informazione e di screening presso la popolazione.

Per raggiungere gli obiettivi sopra descritti la Fondazione G. e D. De Marchi Onlus, ha stipulato dei protocolli d'intesa con la Fondazione Franco e Piera Cutino Onlus di Palermo ed le rispettive strutture ospedaliere: Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico Mangiagalli e Regina Elena di Milano e l'Azienda Ospedaliera "V. Cervello" di Palermo, per sostenere azioni di ricerca e sperimentazione congiunte tra le strutture:

- Laboratorio di Genetica Medica della Fondazione Ospedale Policlinico, Mangiagalli Regina Elena

- Unità di Ricerca P. Cutino- UOC Ematologia II – Ospedale Cervello – Palermo

Unendo la pluriennale esperienza maturata dalle due strutture nel campo della ricerca genetica,ci si prefigge così di ottenere più concreti e veloci risultati nell'individuazione e sperimentazione di soluzioni per raggiungere l'obiettivo primario della guarigione della malattia .

Vittorio Carnelli

Indice ATTI

La malattia: introduzione e cenni storici
Dott.ssa Nadia Mirra **9**

La prevenzione
Dott.ssa Emanuela D'Angelo **16**

La diagnostica genetica
Dott.ssa Cristina Curcio **21**

Approccio non convenzionale al trattamento delle emoglobinopatie
Prof. Aurelio Maggio **27**

La terapia genica per la cura della βtalassemia: dal modello animale all'uomo
Dott.ssa Santina Acuto **30**

LA MALATTIA: INTRODUZIONE E CENNI STORICI

Dott.ssa Nadia Mirra

DH - II Clinica Pediatrica De Marchi,
Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena

CENNI STORICI

- Nel 1925, per la prima volta, nel mondo scientifico, veniva posta attenzione ad una malattia ematologica peculiare. In America, Cooley e Lee descrivevano un particolare tipo di "anemia splenica infantile" caratterizzata da alterazioni scheletriche, familiarità ed origine mediterranea, in bambini italiani e greci.
- Nello stesso anno, in Italia, Rietti segnalava pazienti "microcitemici", ovvero con globuli rossi più piccoli (Volume globulare -MCV- diminuito). Solo dalla fine degli anni trenta-quaranta, il mondo scientifico promuoveva la ricerca in questo settore.
- Un grande contributo italiano, già dal 1943, è stato operato da Silvestroni e Bianco, i quali mediante ricerche estese su tutto il territorio nazionale hanno permesso una mappa epidemiologica. Si segnalavano, così, aree geografiche del territorio italiano nelle quali emergeva una maggiore frequenza di malattia, come in Sicilia, Sardegna e delta padano. Inoltre, veniva segnalata la presenza, in Sicilia, Puglia e Calabria, di un'altra particolare malattia ematologica: la Falcemia o Drepanocitosi.
- La peculiare distribuzione geografica, che coinvolge principalmente i Paesi affacciati sul Mediterraneo, ne determinarono la denominazione: talassemia (anemia mediterranea) o morbo di Cooley. A partire dagli anni Cinquanta si scopriva che l'estensione geografica coinvolgeva i Paesi asiatici nei quali si rilevava la presenza di microcitemia, che negli anni successivi sarà identificata nelle sue varianti genetiche.
- Le indagini cliniche, epidemiologiche, biochimiche e genetiche permisero di definire

laalassemia, e la falcemia, come malattia ematologica ereditaria causata da difetti genetici che coinvolgono le catene globiniche che costituiscono l'emoglobina.
- I quadri clinici delle sindromi talassemiche si presentano eterogenei a seconda del grado del difetto genetico sottostante. Si descrivono tre manifestazioni cliniche fondamentali: talassemia minor (o portatore sano), asintomatico; talassemia major (o morbo di Cooley), condizione clinica molto grave e fatale in assenza di cure adeguate; talassemia intermedia, con manifestazioni della malattia meno gravi rispetto alla forma completa.
La caratteristica ereditaria della malattia, inizialmente suggerita dagli studi osservazionali delle famiglie affette, venne di seguito confermata dagli studi molecolari.
Le sindromi talassemiche sono anemie emolitiche congenite caratterizzate da anomalie dei geni preposti alla sintesi delle catene globiniche .

EMOGLOBINA

L'emoglobina è una molecola che ha la funzione di trasportare l'ossigeno in tutti i tessuti. E' composta da una parte proteica (globina) che sostiene una parte non proteica (eme) che lega il ferro. La globina è formata da 4 catene uguali due a due: nell'individuo normale adulto (dopo il 6° mese) due di tipo a e due tipo b (HbA) che costituisce circa il 98% di tutta l'emoglobina. Esistono altre due forme minori di emoglobina: l'HbA2 (due di tipo a e due d) presente in meno dell'1%. Durante la vita fetale e nei primi mesi di vita è presente un'altra forma composta da due catene a e due catene g (HbF).

Periodo	Emoglobina	Struttura
Fetale	Fetale	a2g2
Adulta	A	a2b2
	A2	a2d2

LE TALASSEMIE

Le sindromi talassemiche sono un gruppo eterogeneo di malattie ereditarie trasmesse con carattere autosomico recessivo, caratterizzate da ridotta o assente sintesi di una o più catene peptidiche costituenti l'emoglobina. In relazione al gene globinico compromesso possiamo distinguere varie forme di talassemia: talassemia alfa, beta, delta e delta beta.
La forma più frequente in Italia è la b talassemia. Oltre alle sindromi talassemiche esistono difetti della forma delle catene globiniche (emoglobinopatie). Per esempio, la

Falcemia, o anemia falciforme, presente nelle nostre zone meridionali e molto diffusa in Africa, determinata da una catena globinica a forma di falce. L'associazione dei due difetti genetici, tratto talassemico e tratto falcemico, provoca la cosiddetta Microdrepanocitosi o talasso-drepanocitosi, presente nel nostro Paese.

ASPETTI CLINICI

ALFA TALASSEMIA

Le alfa talassemie sono emopatie caratterizzate dal difetto di sintesi delle catene alfa. Ogni soggetto possiede quattro geni per le catene alfa, due ereditati dalla madre e due dal padre, pertanto i quadri ematologici saranno più o meno gravi a seconda che il difetto coinvolga uno o più geni. Il portatore sano, silente, con due o tre geni funzionanti, presenta valori ematologici normali o lieve anemia microcitica. Mentre la malattia da HbH è la condizione caratterizzata da un unico gene a attivo con un quadro clinico molto più evidente, anemia microcitica, epatosplenomegalia e nei casi più severe anomalie scheletriche. Infine, l'assenza di geni a funzionanti, nella maggior parte dei casi, è incompatibile con la vita (idrope fetale).

BETA TALASSEMIA

Le beta talassemie sono emopatie caratterizzate da difetto di sintesi delle catene beta globiniche. Ogni individuo possiede due geni per la produzione di catene globiniche beta, uno ereditato dalla madre e l'altro dal padre. A seconda del difetto i quadri clinici variano.

Il tratto talassemico, o condizione di eterozigote, è asintomatico e determinato dal difetto di un solo gene beta. Quando sono alterati entrambi i geni beta si determina la condizione di Talassemia major, o Anemia Mediterranea. La malattia si manifesta in genere dopo il 6° mese di vita con pallore, irritabilità, scarso accrescimento, inappetenza. E' presente grave anemia, epatosplenomegalia e sviluppo di alterazioni scheletriche particolari che determinano la “facies talassemica” (fig. 2).

La talassemia major, se non trattata, porta a morte per anemia, nei primi anni di vita.

Questi pazienti sono incapaci di produrre adeguate quantità di emoglobina che deve essere somministrata mediante trasfusioni di sangue. Dagli esordi negli anni cinquanta della terapia trasfusionale, ad oggi, si sono perfezionate le modalità della cura. Non solo regimi trasfusionali sempre più efficaci, ma anche la terapia ferrochelante che contrasta l'eccesso di ferro negli organi nobili come cuore, fegato e le ghaindole endocrine dovuto

Figura 2

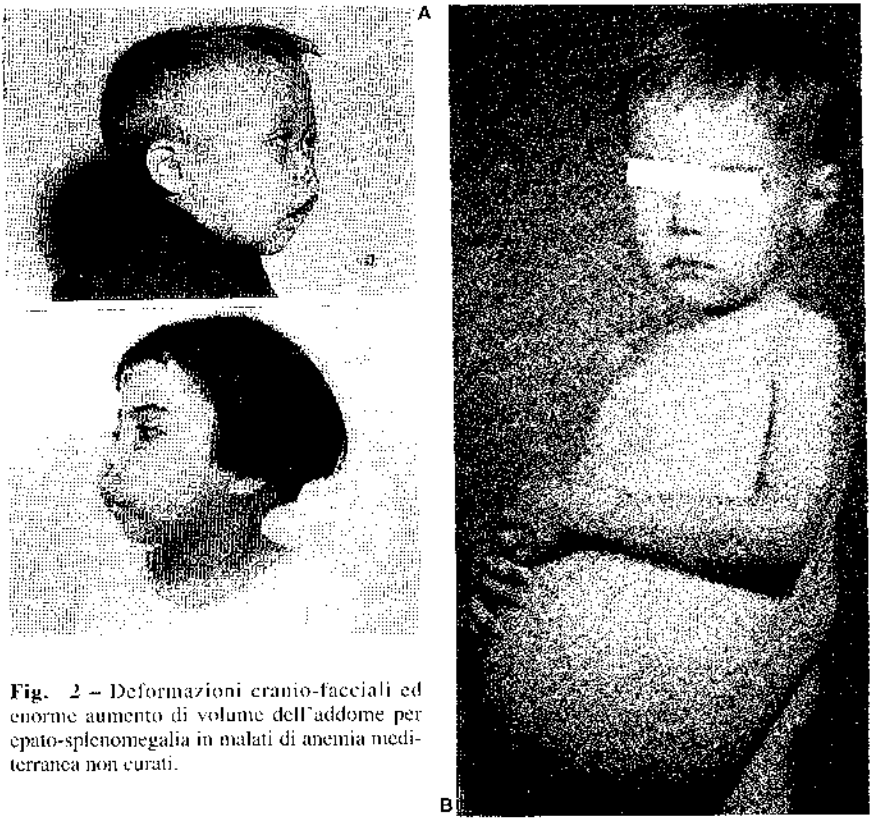


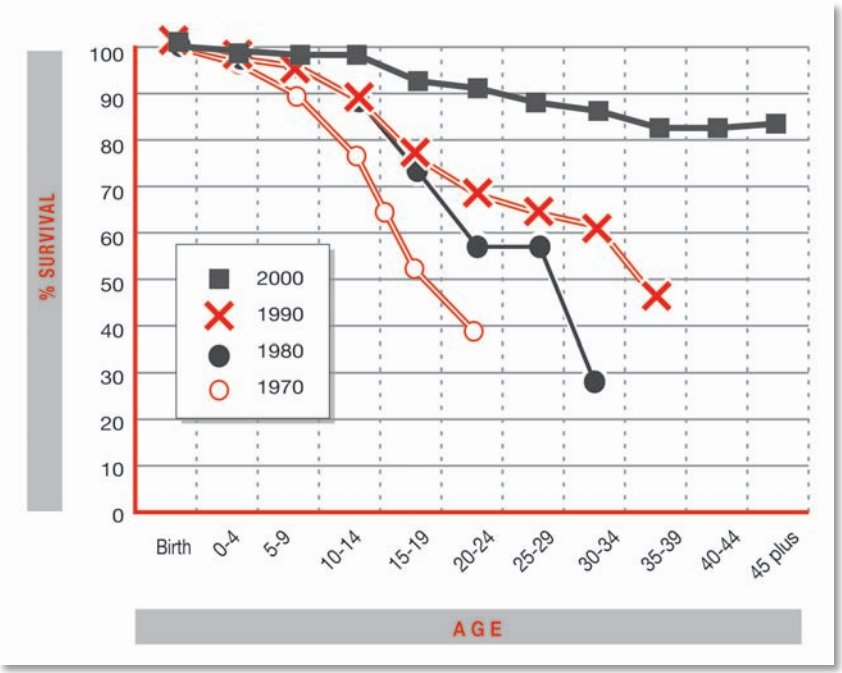
Fig. 2 – Deformazioni cranio-facciali ed enorme aumento di volume dell'addome per epato-splenomegalia in malati di anemia mediterranea non curati.

alle trasfusioni. L'introduzione, a partire dagli anni sessanta, di farmaci ferrochelanti, capaci di rimuovere l'eccesso di ferro trasfusionale e preservare la funzionalità degli organi ha rivoluzionato l'aspettativa di vita di questi malati.

Grazie all'applicazione regolare di questo complesso di terapie si osserva quindi in questi pazienti modificazione del quadro clinico con aumento della sopravvivenza e miglioramento della qualità di vita, (grafico1).

La Talassemia intermedia, infine, comprende un gruppo eterogeneo di quadri clinici con caratteristiche anemiche meno gravi rispetto alla forma major ma che non esclude la terapia trasfusionale, la ferrochelazione e la splenectomia.

Grafico 1



ANEMIA FALCIFORME (Drepanocitosi e Talasso-drepanocitosi)

L'anemia emolitica a cellule falciformi, o drepanocitosi, è un'anemia emolitica cronica ereditaria caratterizzata dalla presenza di emoglobina S (Hb S).

Quando il tratto falcemico (portatore sano) si associa al tratto talassemico (portatore sano) si determina la cosiddetta Microdrepanocitosi, o Talasso-drepanocitosi.

L'HbS tende a cristallizzare all'interno dei globuli rossi che assumono il caratteristico aspetto a falce (sickle cell); l'alterazione della forma e dell'elasticità comporta occlusione del flusso ematico con trombi ed infarto dell'organo colpito. La malattia è caratterizzata da anemia, crisi dolorose e maggior predisposizione ad infezioni anche fatali. Il sintomo principale è il dolore intenso che inizia nella sede colpita dall'occlusione per diffondersi a tutto il corpo. Lo scheletro è una delle sedi maggiormente interessate ma la crisi vaso-occlusiva può interessare i vasi polmonari, addominali e cerebrali (infarti cerebrali/emorragie). Anche per questa malattia può essere intrapreso un regime

trasfusionale regolare, come per la talassemia major, e la contemporanea terapia ferrochelante. Una scelta terapeutica alternativa, efficace in moltissimi malati, è l'utilizzo di Idrossiurea. Questo farmaco, somministrato per via orale, avrebbe la capacità di minimizzare il rischio di crisi vaso-occlusive, talvolta fatali.

TRAPIANTO DI MIDOLLO OSSEO

Il trapianto di midollo osseo (insieme al trapianto di cellule staminali dal cordone ombelicale) rimane l'unica terapia che può determinare la guarigione definitiva per un paziente affetto da talassemia major. Tale terapia consiste nel prelievo di cellule ematiche dal midollo osseo di un donatore (compatibile) e la trasfusione di queste cellule nel bambino affetto.

Il primo successo di trapianto di midollo osseo da sorella isto-compatibile si verificò a Seattle nel 1981 ad opera del Dr. E. D. Thomas su un bambino italiano di 16 mesi affetto da anemia mediterranea; successivamente in Italia, a Pesaro, nasce e si consolida il Centro Trapiantologico di midollo osseo del Prof. Lucarelli.

Attualmente, grazie al miglioramento dei trattamenti di condizionamento pre-trapianto, delle tecniche di asepsi, dell'evoluzione della terapia antibiotica e prevenzione della GVHD (graft versus host disease), oltre che alla vasta esperienza clinica, i risultati del trapianto di midollo osseo sono notevolmente migliorati.

Visti gli ottimi risultati ottenuti dal Centro di Pesaro, la richiesta di trapianto di midollo osseo da parte dei pazienti affetti da emopatie è aumentata esponenzialmente, e con questa la necessità di trovare un donatore di midollo osseo compatibile, stimando che un donatore familiare compatibile è disponibile solo per non più del 25% dei pazienti. Pertanto in Italia, ma anche in altri paesi, si è promossa la creazione di banche di donatori di midollo osseo a cui attingere in assenza di donatore compatibile in famiglia.

Con la completa ricostruzione del midollo osseo trapiantato il paziente acquisisce un quadro ematologico normale, ed una normale crescita staturo-ponderale e sviluppo puberale quando trapiantati in giovane età.

TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI

Nei primi anni '90 grazie al possibile utilizzo delle cellule staminali, uniche cellule in grado di produrre elementi maturi delle tre linee emopoietiche per un tempo indefinito, si osserva una importante modificazione nell'intervento di trapianto.

In particolare è stato osservato che la fonte più ricca e più facilmente reperibile di cellule staminali totipotenti risiede nel sangue del cordone ombelicale. Queste cellule, quando compatibili, possono essere raccolte e utilizzate al posto del midollo osseo, con ottime probabilità di guarigione (98%), una ridotta incidenza di GVHD e una assente mortalità.

LA PREVENZIONE

Dott.ssa Emanuela D'Angelo

DH - II Clinica Pediatrica De Marchi,
Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena

Negli anni '60 sono stati istituiti 16 Centri Regionali di riferimento per la cura e la prevenzione della talassemia, trasformati negli anni '70 in centri di diagnosi prenatale.

Tabella 1. Principali Centri di diagnosi prenatale per la talassemia in Italia

BARI:	Centro Regionale per la Talassemia, Policlinico
CAGLIARI:	Laboratorio di Genetica Prenatale, Ospedale Regionale delle Microcitemie
FERRARA:	Laboratorio di Biologia Molecolare, Arcispedale Sant'Anna,
MILANO:	Clinica Mangiagalli, Laboratorio IOG, Fondazione Policlinico
PALERMO:	Servizio per la Prevenzione e la Terapia per la Talassemia, Ospedale Cervello
ROMA:	II Clinica Ostetrica e Ginecologica, Policlinico Umberto I

Attualmente il programma di prevenzione della talassemia si basa su una strategia di prevenzione globale e prospettiva attraverso:

- educazione sanitaria: corretta e completa informazione rivolta agli operatori sanitari (medici di base, pediatri e ginecologi) e alla popolazione stessa in tutte le aree a forte incidenza di microcitemia, attraverso convegni, conferenze e pubblicazioni su periodici scientifici per i primi, nelle scuole medie per gli adolescenti e nei Consultori o nelle ASL per i giovani e gli adulti.

- screening: l'identificazione attraverso il semplice esame del sangue di soggetti microcitemici deve essere eseguito di prassi non solo durante l'età scolare, ma anche nei giovani, nelle coppie o nelle donne in gravidanza.
- consulenza genetica: dopo aver diagnosticato la presenza di microcitemia è indispensabile dare all'individuo o alla coppia informazioni chiare, complete ed esatte su tutti gli aspetti della microcitemia e in particolare sulla prevenzione della talassemia. Queste informazioni devono essere date da medici specializzati in consulenza genetica presenti in centri qualificati.
- diagnosi prenatale (amniocentesi o villocentesi): permette di effettuare la diagnosi di malattia sul feto e pertanto permette la decisione di interrompere volontariamente la gravidanza. I metodi diagnostici pre-concezionali e pre-impianto, (non intervengono sull'embrione e pertanto superano le difficoltà etiche) presentano ancora diversi svantaggi in fatto di sicurezza della diagnosi e proprio per questo motivo dovranno essere sensibilmente migliorati prima di entrare nell'applicazione corrente per la diagnosi prenatale delle talassemie.

UNO SGUARDO GENERALE SULLA PRESENZA STRANIERA IN ITALIA

I dati raccolti dal Ministero degli Interni dimostrano che, nonostante il costante aumento annuale del fenomeno immigrazione, il nostro paese si colloca agli ultimi posti in Europa sia per quanto riguarda la quantità di stranieri rispetto al totale dei residenti (superiore solo a Portogallo e Finlandia) che la quantità di stranieri nati all'estero rispetto al totale dei residenti (superiore solo a Finlandia).

Nonostante ciò è opportuno ricordare che, seppur nel contesto di un'immigrazione inferiore rispetto agli altri paesi europei, il nostro paese è caratterizzato da una rilevante discrepanza territoriale che rende il Centro-nord assai diverso dal Sud. Infatti se al gennaio 2007 gli stranieri erano il 5% della popolazione residente in Italia, al sud la quota scendeva all'1,6%, mentre nelle regioni del centro nord la quota saliva al 6,8%, una quota meno distante da quella degli altri paesi di immigrazione; in questo caso infatti il centro nord d'Italia sarebbe molto vicino o addirittura superiore a Francia, Svezia, Danimarca, Irlanda e Paesi Bassi , per presenza di stranieri.

LA POPOLAZIONE STRANIERA IN ITALIA

Al 1 gennaio 2007 gli stranieri con regolare permesso di soggiorno erano 2.414.972

(129.000 in più rispetto all'anno precedente); la popolazione straniera risulta quasi quadruplicata rispetto alla situazione registrata quindici anni prima, grazie ai provvedimenti di regolarizzazione avvenuti nella seconda metà degli anni '90 e nel 2004, che hanno interessato quasi esclusivamente stranieri di paesi a forte pressione migratoria (Europa centro-orientale, Africa, Asia - tranne Israele e Giappone- ed America centro-meridionale).

CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE STRANIERA IN ITALIA
E SUA DISTRIBUZIONE

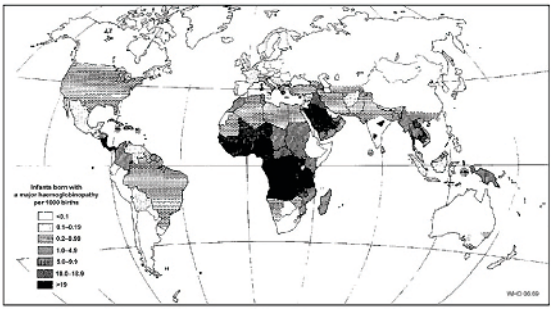
Tra i quasi 3 milioni di stranieri prevalgono i minori e le persone in età attiva e riproduttiva, soprattutto nelle zone settentrionali (Nord-ovest e Nord-est), con un'età media di 30,4 anni. I minorenni rappresentano un quarto della popolazione straniera ad indicare il carattere sempre più stabile e radicato dell'immigrazione sul territorio italiano. Negli ultimi anni, sebbene siano comunità numericamente cresciute, si osserva una diminuzione della percentuale di marocchini, tunisini e filippini rispetto ad altre comunità, quali albanese, cinese, e rumena che risultano sensibilmente aumentate.

Per quanto riguarda la distribuzione territoriale della popolazione straniera si riscontra che più dell'88% della popolazione immigrata risiede al Centro-nord, di cui ben un quarto in Lombardia. In particolare a circa l'80% degli stranieri provenienti da Egitto, Ecuador e Serbia-Montenegro è stato rilasciato un permesso di soggiorno dalle questure site nel nord -ovest del paese, mentre al centro Italia circa i due quinti dei permessi è stato rilasciato a polacchi e filippini. Nella nostra regione la popolazione straniera è principalmente rappresentata da egiziani (70,3%) seguiti da indiani (38,9%) e marocchini (24,2%), con una componente femminile sempre più importante a sottolineare il maggior coinvolgimento familiare, che indica l'estendersi di insediamenti definitivi in Italia.

La fig.1 rappresenta le aree principalmente interessate dalle emoglobinopatie: queste risultano endemiche nel 71% dei paesi del mondo. Almeno il 5,2% della popolazione mondiale e più del 7% delle donne in gravidanza sono portatori di una variazione emoglobinica. L'HbS conta il 40% di portatori e determina una incidenza intorno all'85% di nati affetti da drepanocitosi, di cui più del 70% in Africa; almeno il 20% della popolazione mondiale è portatore invece di α talassemia. Circa l'1,1% delle coppie a livello mondiale sono a rischio di concepire un figlio affetto da un'emoglobinopatia e il

2,7dei concepiti né è affetto. Infine le emoglobinopatie rappresentano il 3,4% della mortalità dei bambini di età inferiore ai 5 anni in tutto il mondo e raggiunge il 6,4% in Africa.

Figura 1



Global distribution of haemoglobinopathies (talassemia and sickle-cell diseasa): number of affected infants per 1000 births

La Tab.1 mostra i principali indicatori dell'OMS relativi alla presenza di emoglobinopatie nelle varie regioni geografiche e la rapida e recente diffusione delle stesse a seguito dell'immigrazione (i concepiti affetti sono oggi più comuni nel nord/ovest Europa rispetto al sud Europa).

Annualmente sono più di 336.000 i nati affetti da emoglobinopatie, dei quali 275.000 da drepanocitosi, circa 56.000 da β talassemia (di cui almeno 30.000 trasfusione-dipendente) e 5.500 affetti da α talassemia, con morte perinatale da idrope fetale. Il 75% dei nati affetti sono presenti in aree endemiche per tali patologie, mentre il 13% si osservano a seguito dei flussi migratori. Più di 9 milioni di portatrici rimangono annualmente incinte e il rischio che i loro partner siano anch'essi portatori è compreso tra lo 0.1 e il 40% (media 14%).

Alla luce di questi dati e visto il tipo di immigrazione presente nel nostro paese e in particolare nella nostra regione appare di primaria importanza il discorso prevenzione per quanto riguarda tutte le emoglobinopatie.

Tabella 1

PAESI	NATI AFFETTI / ANNO				TOTALE nati/anno %	PORTATRICI Incinte/anno %	GRAVIDANZE/ANNO	
	DREPANOCITOSI	β TALASSEMIA	αTALASSEMIA	TOTALE emoglobinopatie			GENITORI PORTATORI	A RISCHIO
AFRICA	**233.289**	**1.520**	**11**	**234.819**	**22.895**	**4.363**	**1.005.752**	**939.277**
Nord	181	337	0	518	627	35	2.882	2.073
Ovest	167.224	971	0	168.195	9.622	2.551	738.373	672.781
Centro	40.688	27	0	40.715	4.184	804	162.934	162.861
Est	25.184	183	11	25.377	6.974	966	101.510	101.509
Sud	11	2	0	13	1.487	7	53	53
AMERICA	**9.047**	**533**	**442**	**10.022**	**16.483**	**523**	**44.769**	**40.088**
Nord	2.637	268	429	3.334	4.435	122	15.780	13.337
Centro	175	2	0	176	3.627	20	724	705
Caraibi	3.333	16	0	3.349	778	4.505	14.369	13.394
Sud	2.902	248	13	3.163	7.643	278	13.895	12.651
MEDITERRANEO	**6.491**	**9.715**	**1**	**16.207**	**16.776**	**670**	**66.079**	**64.828**
Nord Africa	1.456	1.829	0	3.285	3.776	152	13.986	13.140
Est Africa	8	19	0	27	3.067	19	109	109
Ovest Asia	4.479	1.815	1	6.294	3.540	218	25.178	25.178
Sud/centro Asia	547	6.053	0	6.600	6.393	281	26.806	26.401
EUROPA	**1.292**	**1.347**	**162**	**2.800**	**10.459**	**152**	**12.064**	**11.201**
Nord	429	82	73	533	1.162	15	2.660	2.333
Ovest	387	78	56	521	1.949	23	2.556	2.085
Sud	204	313	33	550	1.458	39	2.263	2.202
Est	0	25	0	25	2.881	8	98	98
Sud/centro Asia	0	365	0	365	1.190	27	1.461	1.461
Ovest Asia	272	484	0	756	1.819	41	3.027	3.023
ASIA SUD-EST	**26.037**	**21.693**	**1.383**	**49.114**	**38.139**	**2.363**	**421.398**	**196.454**
Sud/centro	26.037	9.348	0	35.386	31.210	1.476	230.905	141.542
Sud/est	0	12.345	1.383	13.728	6.929	887	190.493	54.912
EST-PACIFICO	**13**	**7.601**	**10.524**	**18.138**	**23.914**	**1.038**	**191.045**	**72.554**
Est Asia	0	1.672	8.106	9.778	18.592	420	39.129	39.110
Sud/est Asia	0	5.846	2.373	8.219	4.774	607	151.173	32.878
Melanesia/ Micronesia/ Polinesia	0	54	0	54	242	6	214	214
Australia Nuova Zelanda	13	29	45	88	307	5	529	351
TOT NEL MONDO	**276.168**	**42.409**	**13.466**	**332.043**	**128.667**	**9.111**	**1.744.877**	**1.328.172**

LA DIAGNOSTICA GENETICA

Dott.ssa Cristina Curcio

UOS Laboratorio di Genetica,
Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena

TALASSEMIA E DIAGNOSI PRENATALE

La talassemia è un'anomalia ereditaria che interessa solo i globuli rossi e, più precisamente, una sostanza in essi contenuta, l'emoglobina, che trasporta l'ossigeno dai polmoni ai tessuti.

Nella talassemia è ridotta la produzione di emoglobina e, come conseguenza, si formano globuli rossi più piccoli e meno vitali di quelli normali. Questo difetto dei globuli rossi può essere assai lieve o molto grave e ciò dà luogo a due forme distinte di talassemia di cui la prima lascia inalterato lo stato di salute (portatore), mentre la seconda produce una importante malattia (talassemia major).

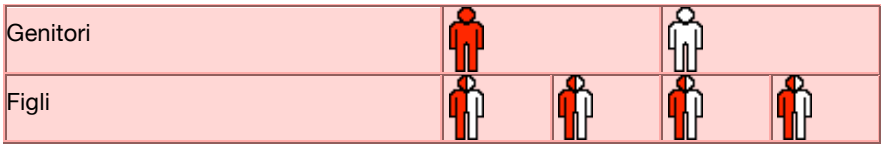
Essere portatore significa che uno dei due geni che controllano la produzione dell'emoglobina nei globuli rossi è difettoso; dal momento che l'altro gene funziona bene, il portatore è una persona sana. Quando un figlio viene concepito riceve un gene da ciascuno dei due genitori; se essi sono entrambi portatori esiste il rischio di ereditare la talassemia major e questo rischio è lo stesso per ogni gravidanza e non si può prevedere in quale gravidanza e con quale sequenza potranno nascere i figli malati.

COME SI TRASMETTE LA TALASSEMIA

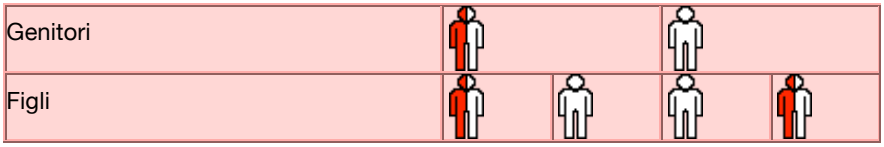
Un soggetto con globuli rossi normali è tale perché ha due geni normali (uno che proviene dalla madre e l'altro dal padre), mentre un soggetto con beta talassemia eterozigote (portatore) è tale perché possiede un gene normale e un gene alterato che può essere di origine materna o paterna; infine un soggetto con talassemia major (malato) è tale perché possiede due geni alterati.

Consideriamo ora quattro tipi di possibili coppie: Schema 1

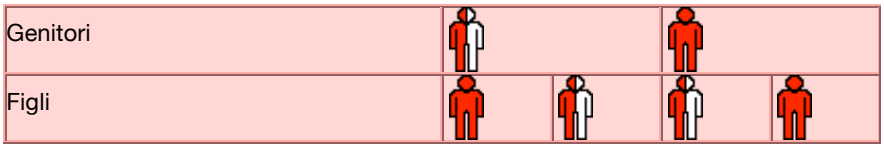
- 1 genitore sano ed 1 malato avranno una probabilità del 100% di avere figli portatori;



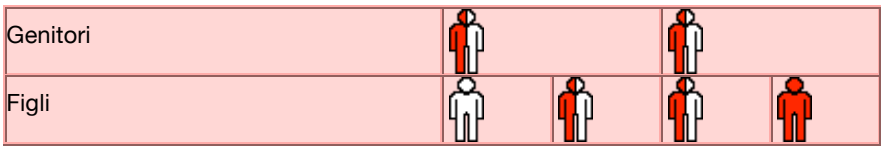
- 1 genitore portatore ed 1 genitore sano avranno una probabilità del 50% di avere figli sani e del 50% di avere portatori;



- 1 genitore malato ed 1 portatore avranno una probabilità del 50% di avere figli malati e del 50% di avere figli portatori;



- 2 genitori portatori avranno una probabilità:
    - del 50% di avere dei figli portatori;
    - del 25% di avere dei figli sani;
    - del 25% di avere dei figli malati;



LEGENDA

sano

portatore

malato

PREVENZIONE

Al giorno d'oggi il massimo dell'attenzione nei confronti della talassemia major è rivolta alla sua prevenzione. Oggi, una moderna strategia della prevenzione per realizzare dei risultati concreti con controllo del fenomeno talassemia deve essere basata, essenzialmente, sull'educazione sanitaria/terapeutica; l'informazione capillare, infatti, di tutta la popolazione rappresenta lo strumento più valido per attuare un'efficace prevenzione.

La migliorata prognosi, oggi, nella Talassemia major apre, inoltre, un altro settore d'informazione ed educazione sanitaria/terapeutica: quello di far comprendere alla popolazione che il talassemico major può procreare e, soprattutto, se sposa un soggetto non portatore può avere figli non malati, anche se portatori sani.

Le coppie di portatori sani, cioè a rischio genetico, devono ricevere tutte le informazioni relative alla malattia, alle migliorate aspettative di vita di un eventuale figlio affetto, alla diagnosi prenatale ed alle attuali (trapianto di midollo) e future possibilità di guarigione.

La diagnosi prenatale costituisce l'ultimo anello della catena di prevenzione e serve alla coppia di portatori sani per sapere se il proprio figlio è affetto da talassemia al fine di poter attuare una scelta libera e consapevole.

L'attività di prevenzione non va quindi vista solo nell'ottica della sua tappa, la diagnosi prenatale, ma in tutta la sua strategia globale che permette, attraverso l'informazione costante della popolazione, la tutela del bambino talassemico.

Se la coppia è costituita da due portatori, come si può affrontare questo problema?

Se una coppia di portatori vuole avere dei figli, può ricorrere alla scelta delle seguenti soluzioni:

- essere informati del rischio ed accettare la possibilità di avere un figlio malato
- rinunciare ad avere figli propri
- decidere di avere ugualmente figli propri e, per evitare che nascano malati, chiedere la diagnosi prenatale.

CHE COS'E' LA DIAGNOSI PRENATALE

Si può esaminare il DNA del bambino nel primo trimestre di gravidanza per sapere se è malato o no. Nel caso di diagnosi di malattia è possibile decidere di interrompere la gravidanza. La diagnosi prenatale si effettua tramite il prelievo dei villi coriali.

CHE COS'È IL PRELIEVO DEI VILLI CORIALI?

Il prelievo dei villi coriali (CVS) è una tecnica invasiva di diagnosi prenatale e consiste nell'aspirazione con una siringa di una piccola quantità di tessuto coriale (10-15 mg), un tessuto fetale localizzato nella placenta.

L'epoca più idonea e meno rischiosa per l'effettuazione di questo prelievo ostetrico è stato regolamentato a livello internazionale intorno alla 11-12. settimana di gravidanza. Attualmente il prelievo di villi coriali è eseguito nelle principali strutture ostetrico-ginecologiche sia per l'analisi del cariotipo fetale che per tutte le analisi prenatali di malattie genetiche.

Per poter far ricorso a questo tipo di indagine è però necessario sottoporsi ad un esame di sangue preliminare (screening ematologico di primo livello). Questa indagine ha lo scopo di inquadrare con precisione il sospetto portatore (beta, alfa-talassemia, emoglobinopatie, emoglobine varianti,…) e di selezionare le coppie a rischio riproduttivo per talassemia major (beta talassemia), per idrope fetale o malattia da Hb H (alfa talassemia) o per emoglobinopatia (anemia falciforme). Il filtro effettuato dall'analisi ematologica ha lo scopo di selezionare solo i casi in cui ci sia un reale sospetto clinico e per cui si renda necessaria un'indagine molecolare per individuare l'alterazione; per le coppie a rischio riproduttivo per esempio questo si rende indispensabile ai fini di una diagnosi prenatale in quanto una volta note le mutazioni parentali, è possibile ricercale nel feto. Se il feto le ha ereditate entrambe, esso è affetto.

Ancora oggi, nell'1% dei casi non è possibile determinare la mutazione talassemica presente in uno dei genitori. Non si potrà allora ricorrere al CVS e sarà necessario aspettare qualche settimana per poter eseguire l'altro tipo di indagine ematologica: la cordocentesi.

Va sottolineato che gli accertamenti sul sangue dei genitori possono essere eseguiti anche prima di una gravidanza. In tal modo una coppia potrà conoscere in anticipo se, in caso di gravidanza, sarà possibile ricorrere al prelievo fetale (CVS).

COME SI ESEGUE IL PRELIEVO DEI VILLI CORIALI?

Vi sono due metodi di prelievo. Il primo prevede l'introduzione in utero, attraverso la parete addominale e sotto controllo ecografico, di un ago sottile e il prelievo di un piccolo campione di tessuto fetale dal margine della placenta (villi coriali). Il secondo

metodo, usato raramente, consiste nell'introduzione di un catetere di plastica molto sottile per via vaginale e nel successivo prelievo dei villi.

COME SI ESAMINA IL TESSUTO?

I tessuti sono costituiti da molte piccole cellule. La parte più importante di ogni cellula si chiama nucleo. Ogni nucleo contiene una sostanza chiamata DNA, che determina tutte le caratteristiche che si ereditano dai genitori, come ad esempio il colore degli occhi e dei capelli, la forma del naso e il tipo di emoglobina.

Si può estrarre il DNA del feto dai villi coriali e studiarne la parte che ci interessa. Per sapere se il feto è affetto da talassemia major si andrà a vedere se esso ha ereditato entrambe le mutazioni che avevamo in precedenza riscontrato nei genitori. Il risultato dell'esame è pronto in circa 4-7 giorni.

IL RISULTATO DELL'ESAME DEL TESSUTO È SICURO?

L'esame è molto accurato e i metodi usati oggi in laboratorio sono da ritenersi di grande affidabilità e sicurezza (99%): il rischio di errore diagnostico per motivi tecnici o genetici è valutabile intorno all'1%. Tali errori possono includere scambi di campioni, errore di identificazione di paternità, contaminazione materna di campioni fetali.

L'ESAME COMPORTA DEI RISCHI?

Il rischio per la donna legato al prelievo è praticamente assente. Il rischio di abortire per donne che si sono sottoposte a CVS è circa dell'1%.

ALTRE FORME DI ANOMALIE EMOGLOBINICHE

Esistono, seppure meno frequenti della beta talassemia, altre anomalie emoglobiniche congenite:

- delta beta talassemia
- emoglobina Lepore
- emoglobina S

Per tutti questi casi il soggetto eterozigote conduce una vita del tutto normale e non deve considerarsi un malato, analogamente al soggetto con beta talassemia eterozigote, ma come quest'ultimo ha un rischio riproduttivo, nel caso che il partner sia un portatore di variante come lui o un portatore di beta talassemia.

- alfa talassemia

L'Italia è, come altri paesi, al centro di un flusso migratorio associato a differenti etnie all'interno delle quali sono riscontrabili difetti a carico dei geni globinici. Fino agli anni 80 in Italia e, più generalmente, nel bacino mediterraneo, il principale rischio riproduttivo era associato alla beta talassemia.

Per quanto riguarda invece le alterazioni a carico dei geni α globinici responsabili dell'α talassemia è possibile definire la gravità della patologia in base al numero di geni coinvolti: lieve microcitemia (un gene α), severa microcitemia (due geni α), malattia da Hb H (tre geni coinvolti), fino all'idrope fetale (quattro geni implicati).

La scarsa frequenza di alfa talassemia all'interno della nostrapopolazione e, in particolare, la presenza di difetti dei geni alfa globinici non particolarmente severi, era associabile alla quasi totale assenza di rischio per idrope fetale e ad un relativamente basso rischio di malattia da Hb H. Oggi il quadro si è notevolmente ribaltato in quanto, a causa della cospicua presenza d'immigrazione con popolazione proveniente dal bacino asiatico, ci si trova a dover effettuare una attività di prevenzione sia per la beta che per le alfa talassemie ed anche per svariate emoglobinopatie. Infatti se nel passato il principale rischio era la beta talassemia Major mentre i dati di letteratura riportavano isolatissimi casi di idrope fetale all'interno di soggetti di origine mediterranea e relativamente pochi casi da Hb H, attualmente tutti e tre i tipi di patologia sono presenti pressoché in egual misura. La definizione del rischio riproduttivo si rende quindi necessaria al fine di escludere in coppie dove entrambi sono portatori di alfa talassemia, il rischio di figli affetti da malattia da Hb H o idrope fetale.

APPROCCIO NON CONVENZIONALE AL TRATTAMENTO DELLE EMOGLOBINOPATIE

Prof. Aurelio Maggio

Direttore Ematologia II,
Ospedale Cervello, Palermo

TERAPIA FARMACOLOGICA PER IL TRATTAMENTO DELLE EMOGLOBINOPATIE

Le emoglobinopatie come la b-talassemia, l'anemia falciforme e la microdrepanocitosi sono gravi anemie ereditarie dovute ad una assente, ridotta o anomala sintesi di emoglobina. In particolare, la b-talassemia è causata da assente o ridotta sintesi di catene b-globiniche, mentre la drepanocitosi è causata dalla produzione di un'emoglobina anomala (HbS). In Italia ci sono più di due milioni di portatori sani di b-talassemia, 6000 pazienti talassemici e 1000 pazienti con drepanocitosi.

Il genotipo omozigote della drepanocitosi ($ß^S/ß^S$) è presente, in particolare, nella popolazione africana e nei negri americani, mentre la doppia eterozigosi ($ß^S$-$ß^0$) è più frequente nelle aree mediterranee (nel 2002 in Sicilia i pazienti con drepanocitosi erano 560 di cui 445 con genotipo $ß^S/ß^0$. La microdrepanocitosi o talassodrepanocitosi ($ß^S/ß^0$) presenta un quadro clinico assimilabile alla drepanocitosi.

Già da parecchio tempo si era osservato che pazienti falcemici con HbF > 20% avevano un quadro clinico più lieve. Studi successivi in vitro hanno dimostrato che l'HbF inibisce la polimerizzazione dell'HbS e che l'inibizione è correlata alla concentrazione di HbF. Anche nelle talassemie l'aumento dell'emoglobina fetale e quello dell'emoglobina totale sembrerebbero determinare una diminuzione o addirittura assenza di richiesta di terapia

trasfusionale. Per questa ragione è iniziato l'interesse per alcuni farmaci che sono in grado di aumentare la produzione di emoglobina fetale. Di questi, l'idrossiurea (HU) è il più utilizzato, con notevoli risultati, in pazienti con emoglobinopatie. E' un farmaco di facile somministrazione, tollerabilità e dal basso rischio di sviluppare carcinogenesi.

Diversi pazienti con β-talassemia, anemia falciforme e microdrepanocitosi sono in trattamento con idrossiurea, ma l'aumento di HbF derivato dal trattamento con HU non è costante in tutti i pazienti, sia con talassemia che con anemia falciforme. Alcuni, considerati non responder, non hanno nessun incremento altri, invece, hanno un modesto incremento non sufficiente a garantire un'efficacia clinica; inoltre, in diversi pazienti, è stata osservata una diminuzione della risposta dopo trattamento a lungo termine.

Per evitare gli effetti collaterali dovuti alla somministrazione del farmaco in quei pazienti che poi si rivelano "non responder", nel laboratorio che si occupa di terapia farmacologica delle emoglobinopatie dell' U.O. Ematologia II dell'A.O. "V.Cervello di Palermo, è in via di definizione uno studio per la realizzazione di un test "in vitro" predittivo della risposta del paziente al trattamento "in vivo". A tal fine viene utilizzato il modello delle colture eritroidi in fase liquida derivate dalle cellule staminali del sangue periferico dei pazienti, un sistema che riproduce il processo dell'eritropoiesi che "in vivo" ha sede nel midollo osseo. E' stato dimostrato che la risposta di questo sistema di cellule al trattamento farmacologico, corrisponde alla risposta del paziente stesso "in vivo".

Per quanto detto finora, è molto importante individuare altri agenti farmacologici che siano in grado di incrementare la produzione di emoglobina fetale, per quei pazienti che non rispondono al trattamento con l'idrossiurea o quelli che non rispondono più dopo trattamento a lungo termine. E' interessante mettere in evidenza che il trattamento farmacologico può essere cruciale anche per quei pazienti per cui è difficoltoso reperire unità di sangue compatibile.

L'interesse è ancora maggiore per quelle molecole, quali la rapamicina e l'everolimus, che sono già utilizzate in altre patologie per cui se ne conoscono già gli effetti collaterali e il loro uso potrebbe così essere facilmente trasferito nella pratica clinica delle emoglobinopatie.

La rapamicina è un macrolide lipofilico, chiamato anche sirolimus, che è stato isolato dallo Streptomyces hygroscopicus, trovato in un campione di suolo della Easter Island. E' un farmaco già presente in commercio utilizzato, in particolare, per prevenire il rigetto a seguito del trapianto del rene. L'everolimus è un derivato della rapamicina in seguito a modifiche per migliorarne le capacità farmacocinetiche come il raggiungimento più veloce dei livelli di stabilità.

Studi condotti hanno evidenziato che questi due agenti farmacologici sono in grado di indurre il differenziamento nella linea cellulare umana eritroide K562; ulteriori studi condotti su un ristretto numero di pazienti β-talassemici hanno evidenziato che sono in grado di aumentare la produzione di HbF nei precursori eritroidi umani.

Per questi motivi è molto importante analizzare l'efficacia di questi due agenti farmacologici per valutarne l'uso come induttori di emoglobina fetale nel trattamento di pazienti con emoglobinopatie. Le analisi potranno essere condotte "in vitro" utilizzando come modello di studio le colture primarie eritroidi liquide derivate dai pazienti.

Sarà molto importante valutare se questi farmaci possono essere utilizzati in via alternativa in quei pazienti in cui non è possibile l'uso dell'idrossiurea e, di notevole importanza, se hanno un effetto sinergico quando usati in associazione. L'uso combinato dei due farmaci, infatti, se agiscono in sinergia, determinerebbe un aumento degli effetti terapeutici ottenuti con i trattamenti singoli e potrebbe permettere la riduzione delle dosi dei singoli farmaci e, di conseguenza, dei danni dovuti agli effetti collaterali.

Questo argomento è l'oggetto di un progetto di ricerca che prevede la collaborazione fra il laboratorio dell'Unità di Ricerca "P.Cutino" dell'U.O. Ematologia II dell' A.O. "V.Cervello" di Palermo diretta dal Prof. Aurelio Maggio e il laboratorio di Genetica Medica dell'Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena di Milano diretto dal Prof. Domenico Coviello.

LA TERAPIA GENICA PER LA CURA DELLA βTALASSEMIA: DAL MODELLO ANIMALE ALL'UOMO

Dott.ssa Santina Acuto

Responsabile del Laboratorio di Terapia Genica,
Unità di Ricerca P. Cutino, Ematologia II,
Ospedale Cervello, Palermo

La terapia genetica consiste nell'introduzione, all'interno delle cellule bersaglio, di sequenze di DNA che contengono le informazioni necessarie a curare una malattia

Le b-talassemie e l'anemia falciforme sono state, per diverse ragioni, tra le prime malattie ad essere candidate per la cura genetica e questo per diverse ragioni: perché si conoscevano le mutazioni che determinavano la malattia, perché il gene b-globinico, anche se complesso nella sua regolazione, è di piccole dimensioni e si presta ad essere inglobato in vettori virali per il trasferimento genetico e perchè non esistono terapie che sono definitivamente curative da offrire ai pazienti affetti, se non il trapianto di midollo osseo da donatore. In quest'ultimo caso, anche se il trattamento può avere successo c'è, oltre alla difficoltà di trovare un donatore compatibile, il rischio di serie complicanze immunologiche post-trapianto. Da qualche anno, numerose sperimentazioni su topi talassemici hanno dimostrato che si può guarire completamente dalla talassemia anche con la terapia genica, cioè con l'introduzione nelle cellule di un gene b-globinico che funzioni normalmente in sostituzione di quello difettoso. Il gene sano è trasportato nelle cellule umane da un guscio vuoto del virus HIV (vettore lentivirale) che inserisce il gene b-globinico nei cromosomi.

Le cellule sottoposte a questa correzione genetica sono le cellule staminali pluripotenti del midollo osseo, quelle che dividendosi e differenziandosi producono tutte le cellule del

sangue (globuli rossi, bianchi e piastrine) durante l'intera vita. Questo significa che l'intervento di terapia genica puo' essere fatto una sola volta durante la vita del paziente. (Fig. 1)

In generale, il protocollo prevede:

1) la purificazione ex-vivo delle cellule staminali CD34+ dal midollo osseo del paziente o dal sangue periferico dopo mobilizzazione e aferesi,

2) la correzione genetica di queste cellule mediante l'introduzione del gene b-globinico umano veicolato da vettori virali che riconoscono le cellule staminali ed efficientemente vi trasportano dentro il loro materiale genetico,

3) il reimpianto delle cellule geneticamente modificate nel midollo osseo del paziente dopo che questo è stato sottoposto a una parziale ablazione midollare.

(Fig.2)

Sono stati costruiti diversi vettori lentivirali contenenti il gene della b-globina assieme ad ampie regioni di sequenze regolatrici che permettono l'espressione del gene solo nele cellule appropriate, cioè nelle cellule eritroidi e l'effetto terapeutico è stato valutato oltre che nei modelli murini (topo con b-talassemia intermedia e major) anche nelle cellule staminali di pazienti talassemici coltivate in provetta.

Con questi vettori la sperimentazione nell'uomo è cominciata ad essere una realtà con un primo trial clinico cominciato due anni fa a Parigi con un vettore lentivirale denominato beta(A-T87Q) e sviluppato dal dott.re Philippe Lebouch, ed un secondo trial che comincerà l'anno prossimo al Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre di New York con un vettore sviluppato dal dott.re Michel Sadelain, denominato TNS9. Il nostro gruppo collabora a questo secondo trial sia per il completamento degli studi preclinici (studio di espressione del vettore nelle cellule dei pazienti talassemici), sia per il miglioramento di questo vettore dal punto di vista dell'efficacia e della sicurezza.

Figura 1

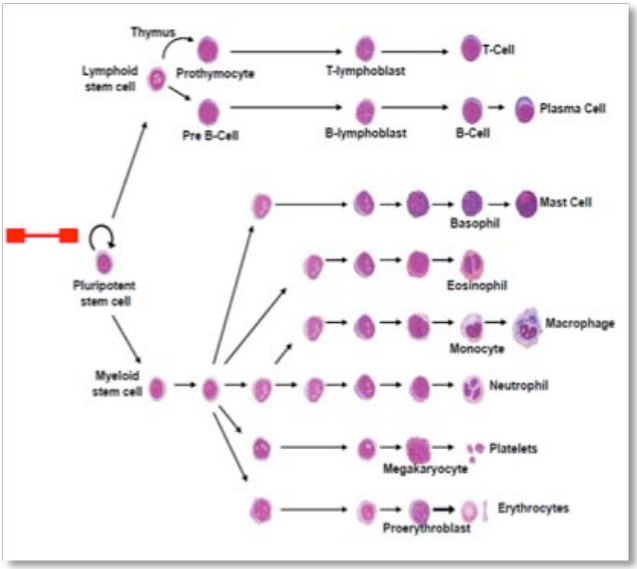
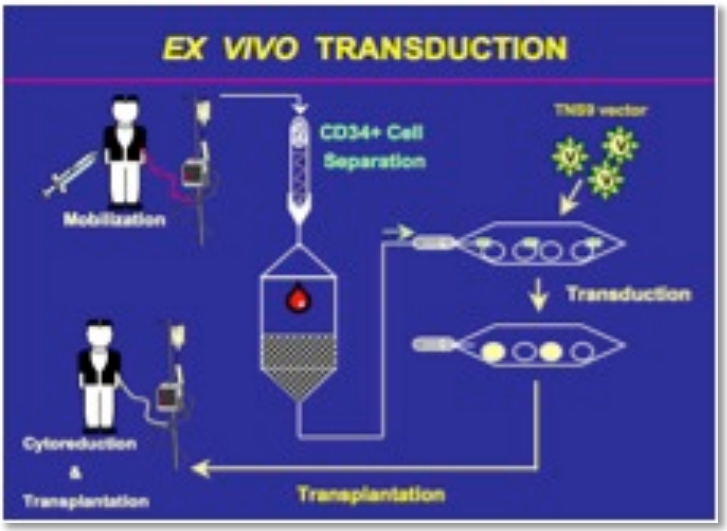



Figura 2