

# AISS Informa

ASSOCIAZIONE ITALIANA SINDROME DI SHWACHMAN - ONLUS

Numero 23

Iscritta Registro Regionale Organizzazioni Volontariato – Regione Veneto  
C.F. 92112250284

Giugno 2010



Carissimi soci e amici AISS, in questo numero di *AISS Informa* dobbiamo purtroppo riportare due notizie drammatiche che ci hanno colpito profondamente.

Lo scorso dicembre 2009 è morto il piccolo Cristian Cipriani di appena undici mesi, ricoverato dalla nascita all'Ospedale Bambino Gesù di Roma. Cristian era affetto da sindrome di Shwachman e presentava seri problemi respiratori e di malassorbimento; ci ha lasciato dopo venti giorni di febbre alta dovuta ad una grave infezione polmonare.

Nel marzo 2010 è morto Gabriele Carosiello di 25 anni, ricoverato presso l'Ospedale Molinette di Torino; anche lui era affetto da sindrome di Shwachman e presentava seri problemi cardiaci che lo hanno costretto a sottoporsi a trapianto di cuore nel luglio 2009. Purtroppo, dopo aver lottato con tutte le sue forze, non ce l'ha fatta.

La "grande famiglia AISS" è in lutto per queste dolorose perdite e cerca di essere vicina ai genitori di Cristian e Gabriele con tutto l'affetto e la comprensione possibili.

Questi dolorosi eventi ci fanno riflettere sulla dura realtà di combattere quotidianamente contro una patologia molto rara che presenta vari sintomi e coinvolge diversi organi e parti del corpo: neutropenia, anemia, piastrinopenia, malassorbimento, infezioni ricorrenti ed altri disturbi associati.

In considerazione delle purtroppo ancora limitate conoscenze della sindrome, sia in Italia che nel resto del mondo, non è da escludere che in passato ci siano stati, e ci siano tuttora, altri casi di persone morte in seguito a complicazioni dovute alla sindrome di Shwachman per le quali non sia stata fatta una diagnosi corretta.

Pazienti e famiglie stiamo imparando a convivere con questa situazione e affrontiamo quotidianamente le difficoltà che ci si presentano, però nessuno di noi pensa (o vuole pensare) che purtroppo la sindrome possa, ancora oggi, provocare lutti togliendoci all'affetto dei nostri cari.

Se tutto questo da un lato ci fa paura, dall'altro deve darci maggiori stimoli a proseguire nella nostra attività di sensibilizzazione delle persone, degli enti pubblici e privati, e soprattutto dei medici affinché possa essere implementata la ricerca scientifica, epidemiologica e genetica, come base imprescindibile alla lotta contro la sindrome di Shwachman, incentivando altresì l'elaborazione di terapie non solo sintomatiche per la sua gestione e cura.

Che Dio abbia cura di noi.

Aurelio Lococo e Fabio Cofini

## SOMMARIO

- ▶ Disfunzioni neuro cognitive nei bambini in età scolare con SDS .....p. 2
- ▶ Neutropenia e difetti funzionali nei pazienti affetti SDS .....p. 4
- ▶ Arte e Solidarietà sotto le stelle .....p. 7
- ▶ Il nuovo Consiglio Direttivo Aiss triennio 2010 - 2012 .....p. 8
- ▶ 5 per mille all'Aiss .....p. 8

## “Le caratteristiche comportamentali di bambini in età scolare, affetti da Sindrome di Shwachman Diamond (con perdita della funzionalità del gene SBDS), indicano disfunzioni neurocognitive”.

*(Traduzione a cura di Claudia Coralli)*

**Obiettivo dello studio-** Questo studio è stato pubblicato di recente, nel marzo 2010, sul “The Journal of Pediatrics” da un gruppo di ricercatori canadesi (Elisabeth Kerr, Lynda Ellis, Annie Dupuis, Johanna Rommens e Peter Durie) dell’Hospital for Sick Children di Toronto con lo scopo di analizzare le funzioni cognitive, comportamentali e adattative in un gruppo di bambini affetti da Sindrome di Shwachman Diamond (SDS). La Sindrome di Shwachman Diamond è caratterizzata generalmente da disfunzione pancreatica e da malfunzionamento del midollo osseo. Altre caratteristiche frequentemente riscontrabili sono la statura ridotta, le anomalie scheletriche, la disfunzione epatica, i problemi dentali e le infezioni, quali polmoniti e otiti. La sindrome è causata da mutazioni nel gene SBDS, situato sul cromosoma 7. Il gene SBDS è espresso in tutti gli organi, incluso il cervello ed è pertanto importante valutare l’impatto che tale gene può avere sulle funzioni cognitive e comportamentali. Fino ad ora la maggior parte degli studi sulle funzioni comportamentali e cognitive nella sindrome di Shwachman sono stati effettuati solo su piccoli gruppi di pazienti, a volte di età molto diverse, con mancanza di controlli appropriati. Anche le valutazioni delle capacità cognitive

sono limitate. Da qui si comprende l’importanza di effettuare uno studio completo, su un ampio gruppo di pazienti.

**Sviluppo dello studio e caratteristiche dei pazienti SDS -** Questo studio è stato condotto su un gruppo di 32 bambini, statunitensi e canadesi, affetti da Sindrome di Shwachman Diamond per i quali la diagnosi di SDS era stata precedentemente confermata da analisi genetica e il quadro delle mutazioni nel gene SBDS (cioè il genotipo) per ciascun bambino era noto. Nello studio sono stati inclusi bambini di età compresa tra 6 e 17 anni, tra i quali 14 femmine e 18 maschi. Tutti i bambini studiati erano stabili dal punto di vista medico, nessuno dei soggetti aveva il diabete mellito e nessuno di loro aveva ricevuto un trapianto di midollo o cicli di chemioterapia o radioterapia. 31 soggetti presentavano la neutropenia, 4 la pancitopenia, 16 anomalie scheletriche e 19 avevano infezioni ricorrenti. Su questi 32 pazienti affetti da SDS sono stati condotti test neuropsicologici convenzionali. I risultati ottenuti per tali pazienti sono stati paragonati con i risultati ottenuti per corrispondenti soggetti sani, per fratelli o sorelle (13 soggetti) e per pazienti affetti da fibrosi cistica (20 soggetti) aventi sesso ed età corrispondenti ai pazienti affetti da SDS. Il confronto con i rispettivi fratelli o sorelle è servito

per confrontare le abilità di pazienti affetti da SDS all'interno dello stesso ambiente familiare, mentre il confronto con i pazienti affetti da fibrosi cistica, di ugual sesso ed età, è servito per verificare l'impatto di una altra sindrome cronica anch'essa caratterizzata da malnutrizione dovuta a insufficienza pancreatica.

**Risultati** - Sebbene sia stata osservata variabilità nelle risposte all'interno dei tre diversi gruppi (soggetti normali, pazienti affetti da fibrosi cistica e pazienti affetti da SDS), tuttavia i bambini affetti da SDS hanno mostrato, in generale, aree di debolezza nelle capacità logiche, nelle proprietà di linguaggio di alto ordine, nelle capacità logiche percettive, nel coordinamento occhio-manuale, nella concentrazione e in vari aspetti dell'apprendimento scolastico, così come una ridotta capacità di indipendenza rispetto alla popolazione generale. Sono

stati anche identificati problemi nel comportamento e nelle capacità di socializzazione. Pazienti affetti da SDS hanno mostrato abilità ridotte rispetto a quelle dei loro fratelli o sorelle sani, e a quelle dei pazienti affetti da fibrosi cistica, utilizzati come controlli. La ridotta abilità è risultata indipendente dalle complicazioni secondarie della Sindrome di Shwachman, dall'età o dal sesso dei pazienti studiati.

**Conclusioni** - E' possibile concludere che i difetti neurocognitivi trovati nei pazienti affetti da SDS studiati sono indipendenti dall'ambiente familiare o dall'aver una malattia cronica e sono invece presumibilmente la conseguenza della disfunzione del gene SBDS medesimo. Esiste la necessità di un approccio multidisciplinare in grado di testare la funzione cognitiva nei pazienti affetti da SDS per poter poi apportare un rimedio appropriato.

## COMITATO SCIENTIFICO DELL'AISS

### DIRETTORE

Dr. Marco Cipolli  
Centro Fibrosi Cistica -  
Ospedale "Borgo Trento" - Verona  
Tel. 045 8122293  
Fax 045 8122042  
e-mail: [marco.cipolli@azosp.vr.it](mailto:marco.cipolli@azosp.vr.it)

### COMPONENTI

prof. Cesare Danesino - Università degli Studi - Pavia  
dr.ssa Daniela Longoni - Clinica Pediatrica - Monza  
dr.ssa Elena Nicolis - Centro Fibrosi Cistica - Verona  
prof. Francesco Pasquali - Università degli Studi - Varese  
dott.ssa Sandra Perobelli - Centro Fibrosi Cistica - Verona  
dr. Furio Poli - Istituto "Burlo Garofolo" - Trieste  
dr.ssa Laura Sainati - Clinica Pediatrica - Padova

Diamo il benvenuto nel Comitato Scientifico al Prof. Pasquali e lo ringraziamo della sua disponibilità.

## **Caratterizzazione del network citochinico e dei difetti funzionali alla base della risposta immunitaria mediata dai neutrofilii nei pazienti affetti da sindrome di Shwachman-Diamond.**

**Progetto di ricerca finanziato dall'Aiss con 10.000,00 Euro**

**Dr.ssa Giovanna D'Amico**

La neutropenia e i difetti funzionali dei neutrofilii giocano, nei pazienti SDS, un ruolo cruciale nelle complicanze dovute alle gravi infezioni ricorrenti e rappresentano una delle principali cause di morte nei primi 12 mesi di vita.

*Solo una migliore comprensione dei meccanismi che regolano il numero dei neutrofilii e la loro funzionalità rappresenta la migliore speranza per il trattamento di questa malattia. Sulla base di queste esigenze cliniche, gli obiettivi principali del nostro studio saranno rappresentati:*

- i) dall'analisi delle proprietà funzionali dei neutrofilii dei pazienti SDS;*
- ii) dalla valutazione del network di citochine responsabile della neutropenia dei pazienti SDS;*
- iii) dall'analisi delle proprietà funzionali delle cellule staminali mesenchimali di origine midollare (MSC).*

### **Risultati preliminari:**

*Caratterizzazione delle proprietà di trafficking dei neutrofilii SDS* - Diversi studi dimostrano che la migrazione e la localizzazione spaziale dei neutrofilii sono controllate da numerosi fattori, incluse le chemochine, a cui essi rispondono attraverso il traffico fisiologico e al traffico indotto dallo stato infiammatorio (Locati et al., 2001). Ad oggi poche informazioni riguardanti il rapporto tra i neutrofilii SDS ed il network chemochinico sono disponibili. Abbiamo quindi analizzato, attraverso esperimenti condotti in citofluorimetria, l'espressione di CXCR4, un recettore chemochinico necessario al mantenimento del traffico fisiologico dei neutrofilii e del reclutamento di queste cellule nei tessuti interessati dall'infiammazione. Abbiamo dimostrato che l'espressione del recettore CXCR4,

valutata sui neutrofilii CD15+ di 6 pazienti SDS, non differisce da quella valutata sui neutrofilii di donatori sani (HD). In particolare, l'espressione del CXCR4 sui neutrofilii dei donatori sani è del 64% (range = 40-85%) mentre è del 53% (range = 22-96%) sui neutrofilii dei pazienti SDS.

Abbiamo inoltre valutato la funzionalità del CXCR4 in risposta al suo ligando CXCL12 attraverso esperimenti di migrazione in transwell (Fig. 1). Abbiamo dimostrato, in un esperimento preliminare, che il recettore CXCR4 è capace di indurre la migrazione dei neutrofilii SDS in risposta a CXCL12 (media dell'Indice di Migrazione, MI = 5,3), risultato simile a quello ottenuto nei donatori sani. Inoltre, abbiamo confermato che i neutrofilii ottenuti sia dai donatori sani che dai pazienti SDS possiedono capacità migratorie in risposta anche al C5a (MI = 6,5 e 10,5 rispettivamente).

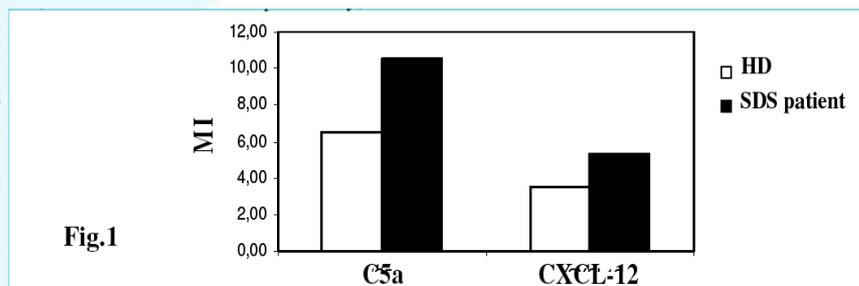


Fig.1

**Esperimenti futuri:** al fine di caratterizzare ulteriormente le proprietà migratorie dei neutrofilii SDS, estenderemo l'analisi dell'espressione del recettore CXCR4 e le capacità migratorie dei neutrofilii dei pazienti in risposta a diversi stimoli chemiotattici, mediante l'aumento del numero dei campioni testati.

- *Caratterizzazione delle proteine associate ai granuli presenti nei neutrofili SDS* - I granuli presenti nei neutrofili a livello citoplasmatico contengono sostanze con attività antimicrobica ed enzimi proteolitici; tali proteine sono coinvolte nell'uccisione e digestione dei micorganismi. I granuli dei neutrofili sono suddivisi, in base alla presenza o assenza di mieloperossidasi, in granuli perossidasi-positivi e granuli perossidasi-negativi. I granuli perossidasi-positivi sono anche chiamati primari o azzurrofilo e contengono defensine e mieloperossidasi (MPO). La MPO converte il perossido di idrogeno in un composto con una maggior efficacia antisettica ed aumenta fortemente l'azione degli intermedi reattivi dell'ossigeno (ROIs). La carenza di questo enzima o la sua inibizione riduce la capacità antimicrobica dei neutrofili. I granuli perossidasi-negativi detti anche specifici o secondari contengono numerose proteine immunoregatorie, come la lactoferrina e la pentraxina-3 (PTX3). Durante il processo infiammatorio la lactoferrina, viene rilasciata nei tessuti infetti e nel circolo sanguigno per poi essere rapidamente metabolizzata a livello epatico. In aggiunta alle proprietà antimicrobiche, la lactoferrina è capace di modulare il processo infiammatorio. PTX3 rappresenta un componente non ridondante dell'immunità umorale innata contro alcuni patogeni. Studi precedenti dimostrano che PTX3 si trova immagazzinata nei neutrofili sotto forma di molecola immediatamente disponibile (Jaillon S, 2007) e viene rilasciata a seguito del riconoscimento di componenti microbiche e segnali infiammatori. Da notare che neutrofili carenti in PTX3 mostrano un'azione fagocitaria difettiva (Garlanda et al., 2002). Visto che i pazienti SDS sono particolarmente suscettibili alle infezioni ricorrenti, abbiamo analizzato se la presenza delle proteine contenute nei granuli risulti alterata nei neutrofili. A tal fine, i granulociti sono stati purificati, seguendo protocolli precedentemente descritti, tramite stratificazione di sangue su gradiente di Ficoll e poi su gradiente di Percoll preceduta da sedimentazione dei globuli rossi mediante destrano. I granulociti sono poi stati fissati in una soluzione al 4% di paraformaldeide/0.02% di sodio azide ed analizzati al citofluorimetro per l'espressione intracellulare di MPO e lactoferrina. I neutrofili SDS mostrano una significativa riduzione dell'espressione della MPO (valore medio = 65.9%, range = 31.1-98.8%, n = 9) rispetto ai donatori sani (valore medio = 97.7%, range = 90.8- 94.4%, n = 8). Inoltre, mentre i neutrofili ottenuti dai donatori sani esprimono alti livelli di lactoferrina (valore medio = 98.6%, range = 95.5-99.9%, n = 9), i neutrofili SDS ne esprimono bassi livelli (valore medio = 38.1%, range = 5.7-47.5%, n = 9). Questi risultati preliminari dimostrano per la prima volta, una forte riduzione delle proteine associate ai granuli nei neutrofili dei pazienti SDS, suggerendo che il difetto nell'attività antimicrobica possa essere dovuta alla carenza di questi enzimi.

***Esperimenti futuri: estenderemo la caratterizzazione della MPO e della lactoferrina aumentando il numero di campioni testati. Inoltre, analizzeremo i livelli di PTX3 nei neutrofili SDS e la loro attività anti-microbica.***

#### **Analisi delle citochine omeostatiche dei neutrofili nei pazienti SDS**

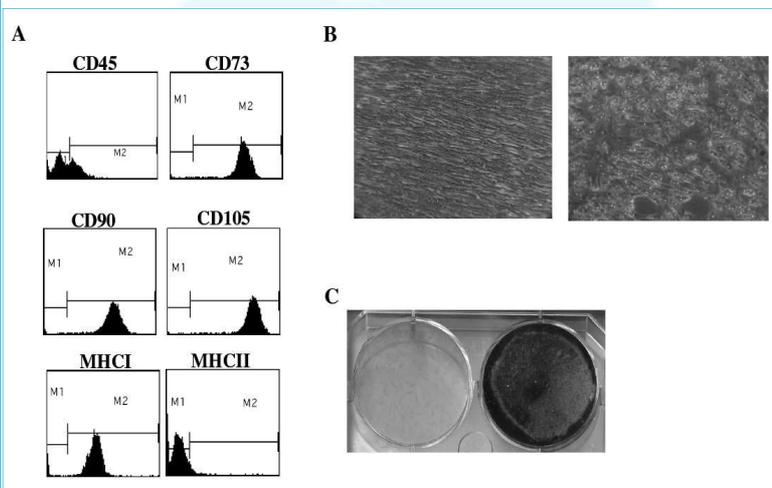
I neutrofili sono una componente importante della risposta immune innata contro un ampio spettro di agenti infettivi. La neutropenia di grado variabile vista nei pazienti SDS contribuisce probabilmente alla suscettibilità alle infezioni. Al fine di esplorare l'eventuale origine della neutropenia dovuta ad un incorretto microambiente citochinico, abbiamo analizzato i livelli di IL-23 nel plasma dei pazienti SDS tramite saggi ELISA. Similmente a quanto visto nei donatori sani, un ridotto livello di IL-23 (<0.5 pg/ml) è stato osservato in 9 pazienti SDS.

***Per il prossimo anno: amplieremo lo studio del profilo citochinico dei pazienti SDS. Analizzeremo i livelli di CXCL12, IL-17 e G-CSF nel sangue e nel midollo dei pazienti SDS.***

#### **Analisi delle MSC ottenute da midollo osseo di pazienti SDS.**

È stato dimostrato che il midollo osseo dei pazienti SDS non è in grado di supportare e mantenere il processo di ematopoiesi (Yigal Dror, Blood, 2009). Il midollo osseo non rappresenta solo l'organo in cui avviene la formazione delle cellule del sangue ma è anche il sito in cui risiede una consistente quantità di neutrofili non proliferanti. Tale riserva midollare, la cui quantità è circa 25-30 volte maggiore rispetto ai granulociti circolanti, rappresenta in caso di necessità una risorsa immediatamente disponibile di neutrofili, i quali possiedono le stesse proprietà funzionali della loro controparte periferica. Le cellule mesenchimali, che esercitano le loro funzioni omeostatiche attraverso il rilascio di fattori solubili e mediante il contatto cellulare, delimitano il confine con lo spazio extravascolare midollare costruendo una nicchia perivascolare dove risiedono i neutrofili midollari. Recentemente è stato dimostrato che nella nicchia midollare le cellule mesenchimali proteggono i neutrofili del pool di riserva dall'apoptosi preservando le loro funzioni effettrici e prevenendo l'eccessiva o inappropriata attivazione del metabolismo ossidativo. Al fine di studiare l'interazione tra le MSC e i neutrofili dei pazienti SDS, isoleremo le cellule mesenchimali dal midollo di tali pazienti ed analizzeremo le loro proprietà funzionali. In due esperimenti preliminari siamo riusciti ad ottenere MSC dal midollo di pazienti SDS.

Abbiamo piastrato il midollo in flask sterili per la coltura cellulare; il terreno di coltura è stato cambiato dopo due giorni, al fine di rimuovere le cellule non aderenti, e successivamente due volte a settimana fino al raggiungimento della confluenza della coltura cellulare aderente (P1). Successivamente le cellule sono state staccate e ripiastrate ed al passaggio 3 (P3) le cellule sono state testate per l'espressione dei marcatori CD73, CD90 e CD105 e per la loro capacità di differenziativa.



**Fig. 2 Fenotipo e capacità differenziativa delle MSC. (A):** Analisi citofluorimetrica delle MSC. Le cellule mesenchimali sono state analizzate mediante citofluorimetro dopo marcatura con isotipi controllo o con anticorpi contro antigeni di membrana. **(B):** Differenziamento adipogenico. Il differenziamento in adipociti viene valutato attraverso la colorazione con Oil Red O dei depositi intracellulari di grasso. **(C):** Differenziamento osteogenico. Il differenziamento in osteoblasti viene dimostrato

tramite la colorazione con Alizarin Red dei depositi di calcio.

La figura 2 mostra come le cellule MSC ottenute da pazienti SDS esprimano alti livelli di CD73,

CD90, CD105 e MHC di classe I ed al contrario esprimano bassi livelli di CD45 e MHC di classe II; inoltre sono in grado di differenziarsi in adipociti e osteoblasti.

***Per il prossimo anno: caratterizzeremo le MSC incrementando il numero di pazienti. In particolare studieremo la loro attività immunoregolatoria e la loro capacità di interagire con i neutrofili.***

*I promettenti dati ottenuti e l'approfondimento di questi mediante studi sull'attività migratoria dei neutrofili purificati, sulle loro proprietà anti-microbiche e sulle funzioni delle MSC, potrebbero fornire le basi scientifiche per nuovi e migliori protocolli per il trattamento dei pazienti SDS.*

# "ARTE E SOLIDARIETA' SOTTO LE STELLE"

Siamo tutti qui!

Il primo da sinistra è il presentatore Andrea Marinucci poi, disposti ad arco dietro ci sono: Claudio Giantomassi di Ascoli Piceno, Roberta Tomassoli da Gradara, Laura Panziera da San Donato Milanese, Alberto Santagostino e Miriam Baroni da Milano, Marina Stopponi e



Gianluca Cipriani con il piccolo Federico da Civita Castellana (VT), Paola Paoletti da Recanati (MC), Dino Baccichet e Teodora Andreetta da Cappella Maggiore (TV), davanti a loro Fabio Cofini (io) da Forme (AQ), Flavia Foscarini e Ezio Polese di Fontanafredda (PN), Ilario Fusco da San Donato Milanese e la presentatrice della serata, Eleonora Balestra. Con il microfono in mano, Aurelio Lococo da Padova e, a fianco, Alessandra Spinucci di Ascoli Piceno.

Ma partiamo dall'inizio.

Il 21 marzo scorso si è tenuta ad Ascoli Piceno l'assemblea dei soci dell'Aiss e la nomina del consiglio direttivo che resterà in carica per il triennio 2010-2012 (riportiamo l'elenco completo nelle pagine successive). La riunione era fissata per la domenica e noi soci "diligenti" per essere freschi e riposati all'incontro siamo arrivati ad Ascoli Piceno il sabato. Nel pomeriggio Alessandra Spinucci ci ha fatto visitare il bellissimo centro storico di Ascoli. La sera abbiamo assistito allo spettacolo "Arte e Solidarietà sotto le stelle" organizzato in favore dell'Aiss presso il Teatro Ventidio Basso, che, a mio avviso, non ha nulla da invidiare a teatri più famosi d'Italia. Lo spettacolo è stato davvero emozionante. Il direttore artistico, Gabriele Fioravanti, ha saputo brillantemente intervallare "pezzi" di danza classica, ginnastica artistica coreografica a cura dell'Associazione

Sportiva Dilettantistica San Giacomo della Marca e i cantanti della Scuola Le Arti.

La novità di quest'anno è stata la moda con le sfilate delle ragazze dell'IPSI; i vestiti indossati erano stati disegnati e realizzati interamente da loro e seguivano un filo storico dai primi del '900 ad oggi superbamente accompagnati da musiche in tema. Abbiamo avuto anche un "quadro" dello stilista ascolano Andrea Pizi che ha voluto partecipare presentando la sua "Moda Sposa 2010". E adesso spieghiamo la foto di gruppo iniziale! Nel corso dello spettacolo noi rappresentanti dell'Aiss siamo saliti sul palcoscenico (indegnamente in quanto non siamo artisti!). Ognuno di noi ha detto il suo nome e la città di provenienza, quindi il presidente Lococo ha illustrato brevemente la Sindrome e le finalità dell'Associazione. E' stato un momento intenso e toccante che ha colpito favorevolmente il pubblico che aveva deciso di sostenere l'Aiss partecipando a questa serata di beneficenza.

Per la riuscita della serata è doveroso fare dei ringraziamenti:

Il Comune di Ascoli Piceno nelle persone del Sindaco, Guido Castelli e il Vice Sindaco Gianni Silvestri; Fabio Ercoli e gli insegnanti della Scuola LeArti; l'IPSI Moda con la preside prof.ssa Giovanna Angelini e le insegnanti che hanno maggiormente collaborato; San Giacomo della Marca con gli insegnanti Valentina Formica, Lorenza Cappelli e Gabriele Fioravanti. Il CSV di Ascoli per la stampa del materiale e Chicca Petrucci per le stupende locandine e manifesti.

Un grazie, grazie, grazie, anche a chi è impazzito per la vendita dei biglietti Valeria Cespi della Tabaccheria del Corso e Marco Torzolini della Palestra.

Naturalmente grazie ai magnifici ragazzi che hanno partecipato mettendoci l'anima e ... all'anno prossimo!

