

Anno 1 - Numero 3 - 2014

Ematologia **Oncologica.it**

**Diagnosi
difficili e rare**

Organo Ufficiale della **Fondazione Matarelli** - Milano

dynamicom
edizioni

Con il supporto non condizionato di



Diagnosi difficili e rare

Mastocitosi

Roberta Zanotti

7

Malattie dei telomeri

Cristina Mecucci, Tamara Iannotti

23

Emofilia e sindromi di von Willebrand acquisite

Augusto B. Federici, Francesco Maura, Valentina Rossi

29

Linfoistiocitosi emofagocitica

Maria Ciccone, Antonio Cuneo

39

Leucemia a grandi linfociti granulati

*Gregorio Barilà, Antonella Teramo, Cristina Gattazzo,
Renato Zambello, Gianpietro Semenzato*

49

Ematologia Oncologica.it

Vol 1 - n.3 - 2014

Direttore Responsabile

Giorgio Maggiani

Direttore Scientifico

Giorgio Lambertenghi Delilieri

Fondazione Matarrelli, Milano

Comitato Editoriale

Sergio Amadori

Università degli Studi Tor Vergata, Roma

Mario Boccadoro

Università degli Studi, Torino

Alberto Bosi

Università degli Studi, Firenze

Michele Cavo

Università degli Studi, Bologna

Antonio Cuneo

Università degli Studi, Ferrara

Marco Gobbi

Università degli Studi, Genova

Cristina Mecucci

Università degli Studi, Perugia

Fabrizio Pane

Università degli Studi, Napoli

Francesco Passamonti

Università degli Studi, Varese

Gianni Pizzolo

Università degli Studi, Verona

Giorgina Specchia

Università degli Studi, Bari

Ematologia Oncologica.it

è una rivista quadrimestrale monotematica, di aggiornamento in lingua italiana, che ha essenzialmente lo scopo educativo di rendere disponibili le informazioni più aggiornate su argomenti pertinenti le malattie del sangue, in particolare quelle neoplastiche. Per raggiungere questo obiettivo la rivista desidera coinvolgere gli specialisti italiani più qualificati e informare il lettore sui più recenti progressi nel campo della ricerca di base, della clinica e della terapia.

La rivista si attiene alle raccomandazioni indicate dal World Association of Medical Editors (WAME) riguardante l'etica delle pubblicazioni in ambito sanitario.

Registrazione Tribunale di Milano

n. 348 del 19/11/2013

Progetto grafico

Dynamicom srl

Sito Internet

www.ematologiaoncologica.it

Coordinamento editoriale

Dynamicom - Milano

Tel. (+39)0289693750 - Fax (+39)02201176

Editore

Dynamicom Edizioni

Periodicità

Quadrimestrale

Avvertenze ai lettori

L'Editore declina ogni responsabilità derivante da errori od omissioni eventualmente citati negli articoli, ed invita il lettore a controllare personalmente l'esattezza, facendo riferimento alla bibliografia relativa.

Norme per gli Autori

- L'accettazione dei testi inviati è comunque subordinata al parere del Comitato Editoriale che deve verificare la loro compatibilità con le norme redazionali.

- Gli Autori dei testi sono gli unici responsabili del loro contenuto, e della riproduzione delle immagini allegate.

- Il primo Autore è tenuto ad ottenere l'autorizzazione di "Copyright" qualora utilizzi figure e/o tabelle già pubblicate altrove.

- La proprietà dell'articolo, una volta pubblicato, appartiene alla Fondazione Matarrelli, (Largo Crocetta, 2 - 20122 MI) che ha depositato il nome della rivista presso il Tribunale di Milano in data 19/11/2013

- Il manoscritto deve essere inviato a Dynamicom Edizioni (segreteria@ematologiaoncologica.it) che, dopo averlo controllato ed impaginato, lo invierà al Direttore Scientifico (giorgio.lambertenghi@unimi.it) per la revisione e il controllo della stesura secondo le norme redazionali. Le bozze di stampa verranno quindi rinviare all'Autore per le opportune correzioni, che dovrà provvedere entro cinque giorni lavorativi a rinviarle a: segreteria@ematologiaoncologica.it

Norme redazionali

Il contenuto dell'articolo, redatto utilizzando il programma Microsoft Word per Windows o Macintosh, non deve superare le 30-35 cartelle dattiloscritte (2000 battute cad.) compresa la bibliografia, e corredato delle illustrazioni (tabelle, grafici, figure) nel numero che l'Autore ritiene necessario, in file ad alta risoluzione (salvate in formato pdf, jpg o eps).

Lo stile del manoscritto, le citazioni bibliografiche e il loro riferimento nel testo del manoscritto devono seguire le raccomandazioni dell'International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). Per le relative informazioni, gli Autori sono pregati di consultare il sito <http://www.icmje.org>.

L'articolo deve essere così strutturato:

- **Titolo** conciso e pertinente con il tema della rivista;

- **Prima pagina** con nome e cognome degli Autori, istituzione di appartenenza, foto tessera a colori del primo Autore;

- **Introduzione iniziale** che esponga in maniera chiara lo scopo dell'articolo;

- **Corpo del testo** suddiviso in sottocapitoli a contenuto omogeneo;

Pagina finale:

1) nome e cognome del primo autore, con telefono, fax, e-mail al quale andrà indirizzata la corrispondenza;

2) eventuali **ringraziamenti** a persone e/o associazioni;

3) 3-5 parole chiave.

Bibliografia

Per lo stile nella stesura seguire le seguenti indicazioni o consultare il sito "International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals Sample References". Le **voci bibliografiche** non devono superare il numero massimo di 150, numerate secondo l'ordine di comparsa nel testo, citate tra parentesi con il testo in apice e con i numeri arabi, tenendo presente gli esempi sottostanti.

Articoli con 1-6 autori

Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. N Engl J Med. 2000;30(1):100-1.

Bianchi AG, Rossi M, Patruno S, Miliani E. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. N Engl J Med. 2000;30(1):100-1.

Articoli con più di 6 autori

Bianchi AG, Rossi M, Patruno S, Miliani E, De Giglio I, Baldoni A, et al. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. N Engl J Med. 2000;30(1):100-1.

Abstract e Congressi

Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. ASH Annual Meeting Abstracts. 2000;100(10):1000.

Capitoli di libri

Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. In: Spagnoletti M. ed. The Hemoglobin, Vol 10. London: Raven Livingstone. 1980:10-15.

Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. Hematology Am Soc Program 1980:10-15.

Editoriale

Giorgio Lambertenghi Delilieri

Fondazione Matarrelli - Milano



Ematologia Oncologica.it dedica questo ultimo numero dell'annata 2014 ad alcune malattie per lungo tempo ritenute rare e di difficile identificazione, ma divenute più frequenti del previsto con l'avvento delle nuove tecniche diagnostiche. Si tratta spesso di patologie silenti sul piano clinico, dotate di varianti a prognosi differente. Ad esempio la mastocitosi, un disordine clonale eterogeneo che oscilla tra forme paucisintomatiche o asintomatiche a regressione spontanea, fino a neoplasie particolarmente aggressive, incurabili e resistenti al trattamento citoriduttivo. L'identificazione di queste varianti è oggi possibile sulla base di criteri clinici e di laboratorio, come il livello delle triptasi, la morfologia e il profilo immunofenotipico degli infiltrati nel midollo e nella cute, e la quantificazione della mutazione D816V, recentemente proposta come esame di screening nell'algoritmo diagnostico.

Di notevole interesse la recente identificazione delle telomeropatie, cioè malattie dovute ad erosioni delle porzioni telomeriche dei cromosomi dovute all'età, stress e mutazioni, che arrestano o limitano le potenzialità rigenerative delle cellule. A queste si associa la perdita delle funzioni riparative dei geni che codificano per le telomerasi: la conseguenza è una instabilità genomica che si esprime con tipiche aberrazioni cromosomiche, duplicazione telomerica e fenomeni di fusione fra cromatidi. La familiarità è un elemento da tenere sempre presente, anche se fenotipi diversi e di variabile complessità si possono riscontrare nel succedersi delle generazioni.

Il capostipite delle telomeropatie è la discheratosi congenita, ma numerose altre emopatie, come l'anemia aplastica e le sindromi mielodisplastiche, caratterizzate da una insufficienza midollare con potenzialità evolutive verso la leucemia mieloide acuta, sono sostenute da mutazioni dei geni preposti al controllo dei telomeri.

Un altro disordine raro, ancora poco conosciuto, è la linfoistiocitosi emofagocitica, caratterizzata da una spiccata pro-

liferazione di istiociti e macrofagi nel midollo e nei tessuti, secondaria ad una risposta immunologica esuberante ed inefficace. Alla base c'è un difetto genetico o acquisito che scatena una tempesta di citochine da parte dei linfociti T-citotossici e delle cellule NK, che attivano l'endocitosi macrofagica e di conseguenza l'emofagocitosi. Il quadro clinico è complesso, con espressioni a livello cutaneo, polmonare e cerebrale, mentre la prognosi è solitamente severa per l'elevata mortalità.

Un disordine proliferativo analogo caratterizzato da un'espansione delle popolazioni cellulari T o NK è la leucemia a grandi linfociti granulati. L'eziologia è sconosciuta, ma è probabile il ruolo di auto-antigeni o virus esogeni che determinano un'attivazione, inizialmente policlonale e successivamente di tipo monoclonale, di elementi linfocitari che, a causa di un deficit del processo di morte programmata, si accumulano progressivamente nell'organismo. Il decorso clinico inizialmente indolente, diventa progressivamente più sintomatico per l'insorgenza di infezioni batteriche ricorrenti dovute alla severa neutropenia, e per la frequente associazione con malattie autoimmuni o emopatie caratterizzate da insufficienza midollare, come l'aplasia midollare, le mielodisplasie e l'emoglobinuria parossistica notturna.

Infine la sindrome di von Willebrand acquisita spesso associata a disordini linfo-mieloproliferativi, e l'emofilia acquisita dovuta ad autoanticorpi contro il fattore VIII in pazienti con anamnesi familiare negativa per emorragie. Si tratta di disordini a volte sottovalutati, anche perché l'approccio diagnostico è difficoltoso per i molti fattori confondenti e la spiccata eterogeneità clinica e biologica. Ne consegue che, in questi casi, la gestione delle emergenze emorragiche o dei pazienti che devono essere sottoposti a interventi con alto rischio di sanguinamento dovrebbe essere coordinata da ematologi esperti, coadiuvati da altri specialisti per il trattamento della patologia causale sottostante.

ESSERCI.

Momenti. Persone. Passioni. Celgene lavora ogni giorno per dare a ogni paziente il tempo di viverli. Nonostante la malattia.

celgene.com

Improving the lives of patients worldwide.



Mastocitosi

Roberta Zanutti

Unità Operativa di Ematologia
Gruppo Interdisciplinare per lo Studio della Mastocitosi (GISM)
Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata (AOUI) - Verona (Italia)



Introduzione

La mastocitosi è una malattia clonale caratterizzata da un accumulo di mastociti in vari organi (prevalentemente cute, ossa, tratto gastrointestinale, linfonodi e milza). È correlata nella maggioranza dei casi ad una mutazione puntiforme del gene che codifica per il recettore KIT, costitutivamente espresso dai mastociti ^(1,2). L'interazione tra KIT e il suo ligando, lo *stem cell factor* (SCF), svolge un ruolo chiave nella regolazione della proliferazione, maturazione, adesione, chemiotassi e sopravvivenza delle mastocellule ⁽³⁾.

Si distingue fondamentalmente una mastocitosi cutanea (MC), la più frequente e tipica dell'età infantile, e una mastocitosi sistemica (MS), coinvolgente almeno un organo diverso dalla cute, caratteristica della maggioranza dei soggetti adulti ⁽⁴⁾. Dal punto di vista clinico la mastocitosi è un disordine eterogeneo, che varia da forme infantili a spontanea regressione, a forme sistemiche paucisintomatiche o asintomatiche ad ottima prognosi, fino a neoplasie particolarmente aggressive associate a prognosi particolarmente infausta ⁽⁴⁾. I sintomi sono correlati principalmente alla liberazione di mediatori mastocitari e, solo nelle forme avanzate, all'infiltrazione tissutale mastocellulare ⁽⁴⁾. Il trattamento delle forme indolenti si limita al controllo e alla cura dei sintomi da mediatori, mentre nelle forme avanzate l'obiettivo è ridurre la proliferazione dei mastociti con terapie citoriduttrici convenzionali o mirate verso il recettore KIT mutato.

Epidemiologia

La mastocitosi è ritenuta una malattia rara, o perlomeno è stata considerata tale per lungo tempo, fino a che sono stati stabiliti nuovi criteri diagnostici e sono diventate disponibili tecniche più sensibili per il riconoscimento dei mastociti patologici e la ricerca delle mutazioni D816V di KIT. La definizione di alcune raccomandazioni diagnostiche da parte di un gruppo di consenso d'esperti convenuti a Vienna nel 2000 ⁽⁴⁾, ha introdotto il concetto di criteri minori, che permettono di porre diagnosi di MS anche in assenza nel midollo osseo di larghi e densi aggregati di mastociti, requisito necessario per la diagnosi fino a quel momento. Tali raccomandazioni sono state

accolte in seguito dalla classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ⁽⁵⁾. Sulla base dei criteri minori è ora possibile porre diagnosi di MS anche in pazienti che non presentano lesioni cutanee o che hanno una scarsa infiltrazione midollare, come ad esempio nei pazienti che presentano anafilassi idiopatiche o secondarie a puntura d'imenotteri. L'applicazione di tali criteri, in particolare nell'ambito di centri di riferimento per tale patologia, ha comportato un incremento progressivo nel tempo delle diagnosi di mastocitosi. I dati epidemiologici sull'incidenza e prevalenza della MC nella popolazione generale sono molto scarsi (0,66 nuovi casi di MC/100.000 abitanti/anno) ⁽⁶⁾ mentre maggiori informazioni sono disponibili sulla prevalenza della MS in Europa (0,9-1,3/10.000 adulti) ⁽⁷⁻⁹⁾. Si ritiene tuttavia che la MS senza manifestazioni cutanee rappresenti ancora oggi una patologia sottostimata ⁽¹⁰⁾. La prevalenza della malattia sistemica in pazienti adulti con lesioni cutanee è assai variabile nei diversi studi: in passato l'interessamento midollare era riportato in meno della metà dei casi di MC dell'adulto ⁽¹¹⁾, ma con l'applicazione di metodi più sensibili per la rilevazione dei mastociti e della loro clonalità, la prevalenza di MS nei pazienti adulti negli studi più recenti è maggiore del 95% ^(10,12,13). Nei bambini le biopsie midollari sono eseguite solo alla presenza di malattia severa; sono segnalati tuttavia rari casi di forme sistemiche. La mastocitosi può interessare qualunque età e il rapporto maschi/femmine è all'incirca pari a 1 ^(10,12,14-17). In maggioranza i casi di mastocitosi sono sporadici, ma sono descritti rari *clusters* familiari. ⁽¹⁸⁻²⁴⁾

In più del 50% dei casi l'insorgenza è in età pediatrica, di cui l'85% tra la nascita e i 2 anni d'età, il restante 15% tra i 2 e i 15 anni ^(25,26). Negli adulti la malattia compare generalmente in un'età compresa fra i 20 e i 50 anni ⁽¹⁴⁾.

Patogenesi

I mastociti sono cellule che si ritrovano prevalentemente negli spazi perivasculari di quasi tutti i tessuti e sono riconoscibili per il contenuto citoplasmatico in granuli metacromatici quando colorati con il Giemsa o con il Blu di Toluidina. I granuli contengono numerosi

mediatori pro-infiammatori e vasoattivi, che sono rilasciati dopo attivazione del mastocita, prevalentemente dopo legame del recettore delle IgE con allergeni o per altri fattori. I mediatori preformati vasoattivi e immunoregolatori, contenuti nei granuli dei mastociti includono istamina, eparina, serotonina, proteasi neutre (triptasi, chimasi, carbossipeptidasi A, catepsina G), proteine basiche maggiori e fosfolipasi. La triptasi e la chimasi sono i principali costituenti dei granuli mastocitari ⁽²⁷⁾.

I mastociti derivano da precursori emopoietici midollari che, attraverso il sangue periferico, migrano nei tessuti dove si differenziano in mastociti maturi. Il processo di maturazione avviene sotto l'influenza di varie interleuchine e in particolare dello *Stem Cell Factor* (SCF), il ligando di KIT (CD117) ⁽²⁾. Il recettore KIT è un recettore tirosin-chinasico espresso, oltre che dai mastociti, dalle cellule progenitrici ematopoietiche e germinali, dai melanociti e dalle cellule interstiziali di Cajal nel tratto gastrointestinale ⁽²⁸⁾. L'espressione di KIT si riduce progressivamente durante la differenziazione dei progenitori ematopoietici in cellule mature di tutte le linee, ad eccezione dei mastociti, che mantengono alti livelli di espressione di superficie. La mutazione somatica più frequentemente riscontrata nei pazienti adulti affetti da mastocitosi è la D816V che comporta la sostituzione nella regione intracellulare tirosin-chinasica del recettore KIT di un

aminoacido in posizione 816 (Asp-816-Val) con conseguente auto-attivazione del recettore indipendentemente dal ligando ^(1,29). Altre mutazioni somatiche di c-KIT meno comuni (<5%) identificate negli adulti con MS sono: V560G ^(30,31), R815K ⁽³²⁾, D816Y ⁽³²⁻³⁵⁾, insVI815-816 ⁽³³⁾, D816F ^(32,35), D816H ⁽³⁶⁾, e D820G ⁽³⁷⁾ (Figura 1). Studi recenti hanno confermato che anche la MC ad esordio infantile è una patologia di natura clonale, associata a mutazioni di tipo acquisito o germinali attivanti KIT ⁽³⁸⁻⁴⁰⁾. In un ampio studio di MC pediatriche il 42% dei casi presenta mutazioni coinvolgenti il codone 816 di c-KIT; nel 44% dei casi sono presenti alterazioni genetiche coinvolgenti altri esoni ⁽³⁸⁾.

Come la mutazione D816V di c-KIT, la maggioranza delle mutazioni documentate a livello dell'esone 17, corrispondenti alla porzione intracellulare del recettore, comportano un'attivazione costitutiva del recettore KIT. Allo stesso modo sono attivanti le mutazioni a livello dell'esone 11, corrispondente alla regione iuxtamembrana ⁽²⁰⁾. Rare mutazioni attivanti germinali associate a forme familiari coinvolgono il dominio transmembrana e includono la mutazione F522C e la A533D ^(23,24) (Figura 1).

Poiché la mutazione attivante di KIT è presente nella maggioranza ma non in tutti i casi di mastocitosi non è ancora definito se tale mutazione sia necessaria e sufficiente per la trasformazione dei mastociti.

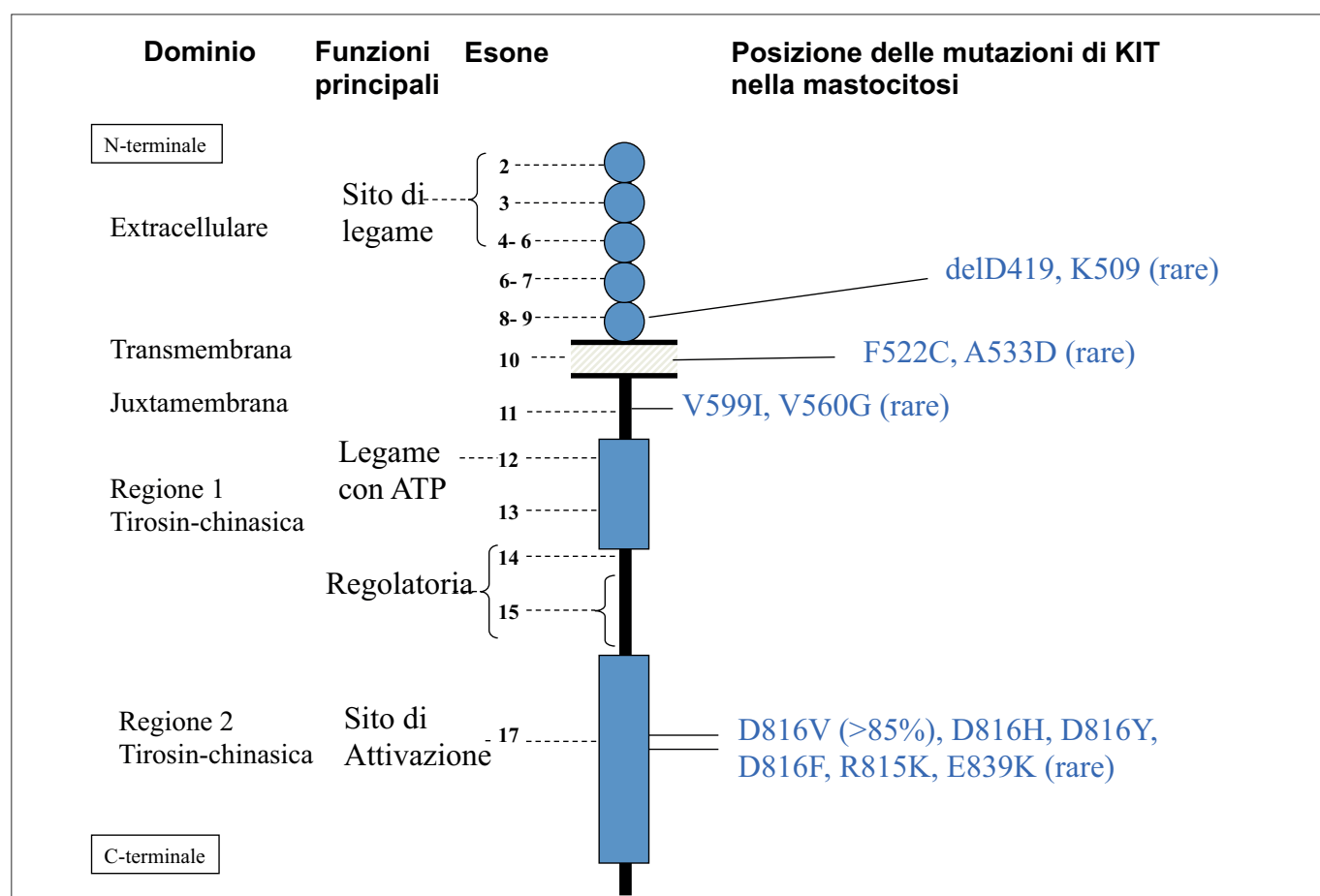


Figura 1 – Rappresentazione schematica del recettore KIT: illustra i vari domini del recettore, e la localizzazione delle mutazioni più frequenti della sequenza di KIT osservate nella mastocitosi.

Inoltre, la sola presenza della mutazione D816V non spiega l'estrema eterogeneità della patologia. Studi nei topi hanno evidenziato come la mutazione D816V nella sola linea mastocitaria comporti una bassa percentuale di sviluppo della malattia, quasi sempre con caratteristiche indolenti, mentre nei topi dove la mutazione è presente in tutti i precursori ematopoietici si sviluppa una malattia severa nel 100% dei casi ^(41,42). Questi dati suggeriscono un effetto della mutazione dipendente dallo stato maturativo della cellula in cui avviene. Tale ipotesi ben si accorda con i risultati ottenuti dal gruppo della *Red Espanola de Mastocitosis* (REMA): la presenza nei pazienti affetti da MS della mutazione nei progenitori emopoietici (multilineare) è, infatti, correlata a una malattia più severa e/o a una maggiore probabilità di progressione, mentre quando la mutazione interessa solo la linea mastocellulare la malattia è più frequentemente indolente con ottima prognosi ^(12,33). La documentazione in alcuni casi di mastocitosi familiare della mutazione D816V somatica suggerisce la presenza di altri fattori genetici predisponenti lo sviluppo della malattia ^(19,21). Altre mutazioni oncogeniche recentemente identificate nella mastocitosi sono quelle a livello di TET2 (*TET oncogene family member 2*) e N-RAS ^(43,44). Queste mutazioni non sono specifiche della mastocitosi e il loro ruolo patogenetico è ancora incerto.

Classificazione

In base alla classificazione dell'OMS, si definisce, come riportato nell'introduzione, una mastocitosi confinata solo alla cute o MC e la MS, caratterizzata da coinvolgimento di almeno un organo extra-cutaneo, che nella maggior parte dei casi è rappresentato dal midollo osseo ⁽⁵⁾. La classificazione della mastocitosi e delle sue varianti di MC e MS è riportata nella Tabella 1.

Mastocitosi cutanea Mastocitosi cutanea maculo-papulare Mastocitosi cutanea diffusa Mastocitoma cutaneo
Mastocitosi sistemica indolente e sottovarianti Mastocitosi sistemica <i>smouldering</i> Mastocitosi isolata del midollo osseo
Mastocitosi sistemica con associata malattia clonale ematopoietica non mastocellulare
Mastocitosi sistemica aggressiva MS linfadenopatica con eosinofilia
Leucemia mastocitaria Tipica Aleucemica
Sarcoma mastocitario
Mastocitoma extracutaneo

Tabella 1 – Classificazione della mastocitosi (classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità 2008) ⁽⁵⁾.

Mastocitosi cutanea

La cute rappresenta l'organo più frequentemente coinvolto nella mastocitosi. La mastocitosi cutanea maculo-papulare (MCMP), o orticaria pigmentosa, è il quadro più frequente (Figura 2) ⁽⁵⁾. Si presenta con lesioni maculari, papulari o a placche rosso-brunastre, simmetricamente distribuite e che possono interessare qualsiasi distretto cutaneo o mucoso, ma con minore frequenza il volto e le regioni palmo-plantari ⁽⁴⁵⁾. Dopo sfregamento presentano eritema e reazione pomfoide associati a prurito (segno di Darier) e talora a *flushing*. Si differenzia una forma *large type*, con lesioni di diametro >0,5 cm e una forma *small type*. Il 50-80% delle forme ad esordio infantile va incontro a completa remissione spontanea durante l'adolescenza ⁽²⁵⁾. Nell'adulto le lesioni sono generalmente monomorfe *small type*. Una variante di MCMP di rara osservazione e pressoché limitata all'età adulta è rappresentata dalla *Teleangectasia Macularis Eruptiva Perstans* (TMEP), con manifestazioni cutanee molto sfumate, caratterizzate da macule eritematose o lievemente ipercromiche, con teleangectasie e con segno di Darier incostantemente positivo ⁽⁴⁶⁾. Il mastocitoma cutaneo interessa quasi esclusivamente l'età pediatrica comparando solitamente nei primi 3 mesi di vita, può essere singolo, nella maggior parte dei casi, o multiplo ⁽⁵⁾. Si presenta come placca o nodulo di 1-5 cm con superficie liscia o a buccia d'arancia e un colore che varia dal giallastro al bruno. Le lesioni tendono con il tempo ad attenuarsi sino a regredire completamente prima dell'adolescenza. La MC diffusa è la variante più rara (1-2% dei casi) e più grave, si presenta esclusivamente nei bambini, con insorgenza al di sotto dei 3 anni ⁽⁵⁾. Sintomi sistemici sono frequenti e sono rappresentati da ipotensione, diarrea grave, disturbi gastrointestinali; vi è inoltre un rischio potenziale di *shock* o morte improvvisa da ipotensione dovuta alla degranulazione mastocitaria massiva ⁽⁴⁷⁾.



Figura 2 – Mastocitosi cutanea maculo-papulare dell'adulto (o Orticaria Pigmentosa). (g.c. dr. Donatella Schena)

Mastocitosi sistemica

In base alla classificazione OMS del 2008 ⁽⁵⁾ la MS è inclusa tra le neoplasie mieloproliferative croniche e comprende varie forme a presentazione clinica e prognosi eterogenee (Tabella 1). Per la diagnosi di MS è richiesta la soddisfazione di un criterio maggiore (Figura 3) e di almeno un criterio minore, oppure di tre criteri minori ⁽⁵⁾.

Tali criteri sono descritti nella Tabella 2.

La MS viene sottoclassificata in indolente (MSI), *smouldering*

(MSS) o aggressiva (MSA) sulla base della presenza o meno dei cosiddetti reperti B e C (vedi Tabella 2) ⁽⁵⁾. Nella MSA l'infiltrazione midollare da parte dei mastociti è in genere diffusa (Figura 4).

Nella MS associata a malattie ematologiche clonali non mastocitarie sono presenti i criteri per la diagnosi di MS associati alla dimostrazione di un'altra malattia clonale ematologica di tipo mieloide (80-90%) o linfoide (10-20%) ⁽⁵⁾. Le forme più frequentemente associate sono le leucemie acute mieloidi, la leucemia mie-

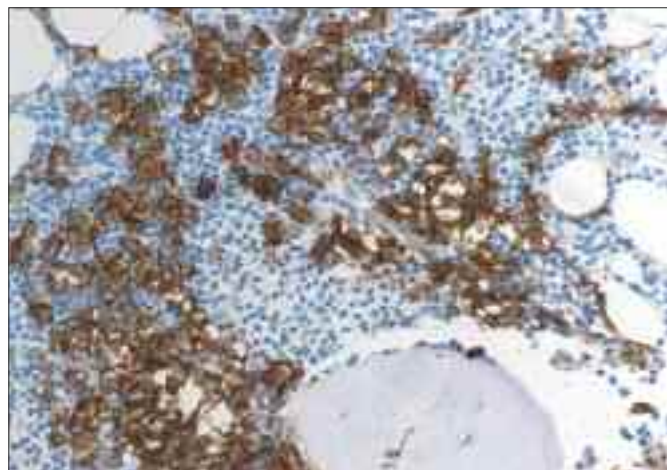


Figura 3 – Aggregato denso di mastociti fusati CD117 positivi in sezione di biopsia ossea (criterio maggiore per la diagnosi di mastocitosi sistemica). (g.c. prof Marco Chilosi)

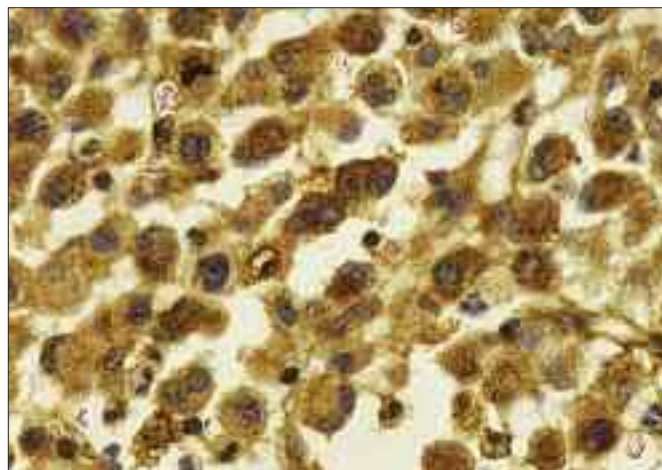


Figura 4 – Mastocitosi sistemica aggressiva: infiltrato mastcellulare diffuso (g.c. dr. Luis Escribano).

La diagnosi di mastocitosi sistemica (MS) è stabilita quando sono soddisfatti almeno il criterio maggiore e uno minore o almeno tre criteri minori	
Criterio maggiore	Presenza d'infiltrati multifocali, densi di mastociti nelle sezioni di midollo osseo o di organo extracutaneo (aggregati di >15 mastociti)
Criteri minori	a. Morfologia anomala di >25% dei mastociti nel midollo osseo o altro organo extracutaneo b. Mutazione di KIT al codone 816 in organo(i) extracutaneo(i). Nella maggioranza dei casi la mutazione è la D816V c. Espressione di CD2 e/o CD25 nei mastociti midollari d. Livelli di triptasi sierica >20 ng/ml (tale criterio non conta se il paziente presenta un'altra neoplasia ematologica non mastcellulare)
Reperti "B"	a. Presenza d'infiltrazione di mastociti > 30% (aggregati focali, densi) alla biopsia ossea e/o triptasi sierica >200 ng/ml b. Midollo ipercellulare con dismielopoiesi o aspetti mieloproliferativi, in assenza di criteri sufficienti per una diagnosi di mielodisplasia o neoplasia mieloproliferativa, con conte ematiche normali o lievemente alterate c. Epatomegalia con funzione epatica normale e/o splenomegalia palpabile senza ipersplenismo e/o linfadenomegalie > 2 cm palpabili o dimostrate radiologicamente
Reperti "C"	1. Alterata funzione midollare con presenza di una o più citopenia(e): Neutrofili <1000/μl; Hb<10 g/dl; piastrine <100000/μl in assenza di altre patologie midollari non mastocitarie 2. Epatomegalia palpabile con alterata funzione epatica, ascite, e/o ipertensione portale 3. Splenomegalia palpabile con ipersplenismo 4. Malassorbimento con calo ponderale da infiltrazione gastrointestinale mastocitaria 5. Coinvolgimento scheletrico con larghe osteolisi e/o fratture patologiche
Diagnosi di: a) MS indolente (MSI): soddisfa i criteri per la MS. Non soddisfa nessun reperto "C". Assenti evidenze di altre malattie clonali ematologiche non mastcellulari b) MS "Smouldering" (MSS): come la MSI, ma con 2 o più reperti "B", assenti i reperti "C" c) Mastocitosi isolata del midollo osseo: come la MSI, con coinvolgimento del midollo osseo ma senza coinvolgimento della cute o di altri tessuti d) MS aggressiva (MSA): soddisfa i criteri per MS. È presente uno o più reperti "C". Non evidenza di leucemia mastcellulare e) Leucemia mastcellulare (LM): soddisfa i criteri per MS. La biopsia ossea mostra una diffusa infiltrazione da parte di mastociti immaturi atipici. Lo striscio midollare mostra ≥20% di mastociti. Nella forma tipica di LM i mastociti rappresentano ≥10% dei leucociti del sangue periferico	

Tabella 2 – Criteri per la diagnosi e la classificazione della mastocitosi sistemica ⁽⁵⁾.

lomonocitica cronica, la mielofibrosi primaria e le mielodisplasie, ma sono descritte associazioni con tutti i maggiori sottotipi di malattie clonali linfoidi ⁽⁴⁸⁾. La leucemia mastcellulare è una forma estremamente rara, a pessima prognosi. Può presentarsi sia come forma *de novo* che come forma secondaria, evoluzione di un'altra patologia mastcellulare. La biopsia ossea mostra un infiltrato diffuso di mastociti immaturi atipici (Figura 5) e all'aspirato sono evidenti almeno più del 20% di mastociti.

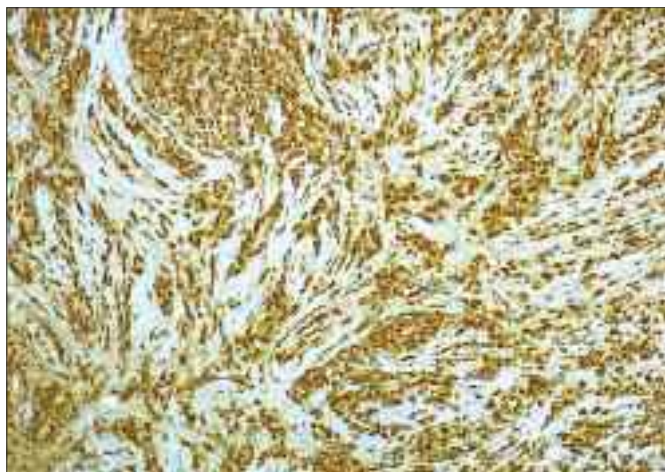


Figura 5 – Leucemia mastcellulare (ampia infiltrazione midollare da parte di mastociti immaturi triptasi positivi) (g.c. dr. Luis Escribano).

La frequenza delle forme varianti di MS è assai diversa nelle non numerose casistiche pubblicate, dipendendo dalla tipologia del centro e dalla sensibilità delle tecniche diagnostiche utilizzate (Tabella 3) ^(9,13,15,49,50). L'assenza di manifestazioni cutanee era ritenuta frequente nelle forme aggressive ⁽⁴⁾, mentre la variante di MSI limitata al midollo osseo era considerata una forma rara. In realtà le forme di MSI limitate al midollo osseo rappresentano una patologia sottostimata, che può essere prevalentemente diagnosticata in pazienti con episodi d'ana-

filassi, soprattutto da imenotteri, o osteoporosi non spiegata ^(10,13,51,52). Una forma molto rara di mastocitosi con coinvolgimento cutaneo e sistemico, non ancora inclusa nella classificazione dell'OMS, è la MS ben differenziata ^(23,52,53). Le manifestazioni cutanee sono in genere di due tipi: a placche o nodulari ⁽⁵³⁾. A livello midollare sono presenti aggregati densi di mastociti a morfologia rotondeggiante e citoplasma fittamente granulato, triptasi positivo e con caratteristica espressione assente di CD25 e/o CD2 (Figura 6) ⁽⁵³⁾.

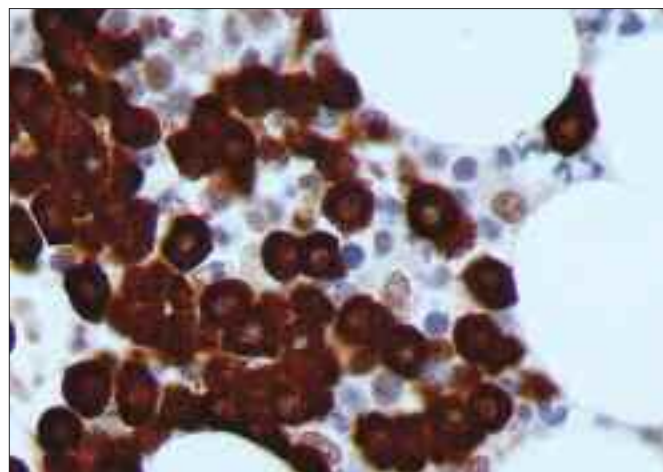


Figura 6 – Mastocitosi sistemica ben differenziata (infiltrazione midollare da parte di mastociti rotondi, con citoplasma fittamente granulato, intensamente triptasi positivi) (g.c. dr. Luis Escribano).

Nella maggior parte dei casi non è documentabile una mutazione di c-KIT o è presente una mutazione non coinvolgente il codone 816, inoltre la triptasi è in genere inferiore a 20 ng/ml, con impossibilità a soddisfare sufficienti criteri per la diagnosi di MS ⁽⁵³⁾. Il riconoscimento di tali forme, per quanto rare, è di fondamentale importanza per la loro ottima responsività all'inibitore delle tirosin-chinasi, imatinib, cui sono invece resistenti le forme D816V mutate ^(23,53). Nei pazienti con sintomi severi da rilascio di mediatori

Varianti di MS	Horny (2004) n (%)	Lim (2009) n (%)	Sanchez (2011) n (%)	Wimazal (2012) n (%)	Cohen (2014) n (%)	GISM* n (%)
MSI						
- MS isolata del midollo osseo	35 (55)	159 (46)	93 (82)	81 (83)	450 (82)	265 (95)
- MSS	nr	36 (10)	16 (14)	nr	nr	126 (45)
	nr	22 (6)	nr	7 (7)	nr	3 (1)
MSA	7 (11)	41 (12)	11 (10)	5 (5)	8 (2)	3 (1)
MS associata a malattie ematologiche clonali non mastocitarie	20 (31)	138 (40)	6 (5)	11 (11)	24 (4)	9 (3)
Leucemia mastcellulare	2 (3)	4 (1)	2 (2)	1 (1)	5 (1)	1 (0,4)
Totale	64	342	113	98	548	278
*casistica 2006-2013: dati non pubblicati - Abbreviazioni: MSI: mastocitosi sistemica indolente, MSS: mastocitosi sistemica <i>smouldering</i> ; MSA: mastocitosi sistemica aggressiva; GISM: Gruppo interdisciplinare per lo studio della mastocitosi (Verona); nr: non riportato						

Tabella 3 – Frequenza delle differenti varianti di mastocitosi sistemica (MS). ^(9,13,15,49,50)

in cui sia presente a livello midollare almeno un criterio di clonalità (coespressione di CD25/CD2 e/o la presenza di mutazione del gene c-KIT), ma non siano soddisfatti criteri sufficienti per una diagnosi di MS, è stato proposto il termine di sindrome da attivazione mastocitaria monoclonale ^(51,52,54). Recentemente altri autori hanno suggerito di includere sotto il termine MS sub-diagnostica tutti i casi in cui siano documentati mastociti clonali a livello midollare, ma insufficienti criteri per la diagnosi, anche in assenza di sintomi da rilascio di mediatori ⁽⁵⁵⁾.

Sarcoma mastocitario e mastocitoma extracutaneo

Sono entrambe forme rare e localizzate. Il sarcoma mastocellulare è una forma rarissima, si presenta come lesione unifocale, costituita da mastociti atipici e immaturi, che infiltra e distrugge i tessuti circostanti, in assenza di un coinvolgimento di tipo sistemico ⁽⁴⁾.

Altrettanto raro è il mastocitoma extracutaneo, una forma benigna di neoplasia unifocale, diagnosticata prevalentemente a livello polmonare, caratterizzata da proliferazione di mastociti maturi ⁽⁴⁾.

Prognosi

La MSI è la forma più frequente ed ha una aspettanza di vita sovrapponibile a quella dei soggetti normali nella gran maggioranza dei pazienti ^(12,15). È tuttavia riportata una probabilità di progressione della MSI in una forma più aggressiva dell'8,4% a 20 anni ⁽¹²⁾ e i fattori predittivi indipendenti di progressione risultano la concentrazione plasmatica di beta2-microglobulina e la presenza della mutazione D816V oltre che nei mastociti, anche nella rimanente serie mieloide e linfoide (mutazione multilineare) ⁽¹²⁾. La valutazione della multilinearità della mutazione richiede una considerevole esperienza tecnica e non è facilmente applicabile in tutti i laboratori; per questo motivo sono stati ricercati vari parametri correlati con la sua presenza, come l'aumento della beta2-microglobulina associata a livelli ridotti di lattato deidrogenasi ⁽¹³⁾, un fenotipo immaturo dei mastociti midollari ⁽⁵⁶⁾ e l'incremento significativo nel tempo dei livelli di triptasi ⁽⁵⁷⁾. Nei pazienti con MSI l'età alla diagnosi, l'aumento della fosfatasi alcalina, elevati livelli plasmatici di CD25 e CD117 solubile e lo sviluppo di un'altra malattia ematologica sono riportati associati ad una ridotta sopravvivenza ^(12,58). Analogamente la mutazione di c-KIT misurata con metodiche di *Polymerase Chain Reaction* (PCR) quantitativa correla negativamente con la sopravvivenza ⁽⁵⁹⁾. La MSA, la MS associata ad altra malattia clonale ematologica non mastocellulare e la leucemia mastocitaria, sono associate ad una prognosi severa, con una sopravvivenza mediana riportata rispettivamente di 48, 24 e 2 mesi ⁽¹⁵⁾.

Il ruolo prognostico di mutazioni addizionali documentabili nei pazienti con MS, incluse le mutazioni di RAS, TET2 e dei geni codificanti per il recettore delle IgE, e l'espressione del CD30 sui mastociti neoplastici è ancora incerto ^(43, 44, 60-62).

Diagnosi

Livelli di triptasi

La triptasi è la principale serinproteasi contenuta nei granuli di secrezione dei mastociti umani ed ha un'attività simil-tripsinica ⁽⁶³⁾. È prodotta in maniera pressoché esclusiva dai mastociti, con l'eccezione di una piccola quantità prodotta dai basofili, ed è quindi considerata il marcatore delle malattie mediate dai mastociti; la sua concentrazione plasmatica è correlabile con la quantità e l'attività dei mastociti dell'organismo ⁽⁶³⁾. La triptasi viene dosata utilizzando un metodo immunometrico (Phadia AB, Uppsala, Sweden). I livelli sierici di triptasi sono mediamente intorno a 5 ng/ml con un intervallo da <1 a 15 ng/ml ⁽⁶³⁾. Nella maggioranza dei laboratori si considerano normali livelli di triptasi sierica inferiori a 11,4 ng/ml. I pazienti con MC presentano valori normali o solo lievemente aumentati di triptasi, ma livelli nel range di normalità si riscontrano anche in rare forme di MSI. Nella MS in genere i livelli di triptasi aumentano nel tempo nell'arco di mesi o anni fino a un quadro di malattia stabilizzata: da quel momento in poi i valori tendono a stabilizzare con modeste oscillazioni o addirittura a diminuire leggermente ^(57,63). Si elevano in maniera consistente in caso di progressione o evoluzione in una forma di MS associata a malattia ematologica clonale non mastocitaria. Valori sierici elevati di triptasi non sono però esclusivi della mastocitosi. Si ritrovano, infatti, oltre che nelle prime 24-48 ore dopo un episodio di anafilassi, in corso di numerose malattie ematologiche, soprattutto della linea mieloide, ma anche linfoide, nell'insufficienza renale cronica in fase terminale, nell'oncocercosi in trattamento ^(64, 65). Valori lievemente elevati sono stati documentati anche nell'orticaria cronica ⁽⁶⁶⁾. I livelli di triptasi aumentano inoltre con l'età, in particolare sono stati documentati valori superiori a 11,4 ng/ml nel 7% dei soggetti di età superiore a 65 anni ⁽⁶⁷⁾.

Morfologia

Nella mastocitosi sono distinti principalmente 4 tipi morfologici di mastociti che corrispondono a un diverso grado maturativo:

- (i) mastocita maturo tipico (rotondo, ben granulato, con nucleo rotondo centrale);
 - (ii) mastocita atipico allungato con le caratteristiche estroflessioni citoplasmatiche, nucleo ovale ed eccentrico, citoplasma ipogranulato o con focale accumulo dei granuli (definito come mastocita atipico di tipo I) (Figura 7 a-b);
 - (iii) mastocita atipico con nucleo bi- o multilobato ("mastocita atipico di tipo II"); e (iv) cellula simil-blastica con granuli metacromatici ⁽⁶⁸⁾.
- Negli strisci midollari di MS colorati con May Grunwald-Giemsa o Blu di Toluidina si osservano generalmente mastociti atipici di tipo I, più raramente si possono trovare mastociti atipici di tipo II (in particolare nelle forme aggressive o in progressione); i mastociti maturi rotondi sono tipici della MS ben differenziata ⁽⁶⁸⁾.

Istologia

La diagnosi di MC è classicamente definita dalla presenza all'obiettivo delle tipiche lesioni cutanee (criterio maggiore) e da uno o due dei seguenti criteri: i) infiltrato mastcellulare monomorfo in larghi aggregati triptasi positivi (>15 mastociti/aggregato) o presenza di >20 mastociti isolati, per campo a elevato ingrandimento; (ii) documentazione della mutazione di c-KIT al codone 816 nella lesione cutanea ⁽⁶⁹⁾. Nelle forme dell'adulto i mastociti sono spesso in numero inferiore rispetto a quello delle forme infantili e le alterazioni possono essere così sfumate da evidenziare solo un lieve incremento di mastociti perivascolari, a morfologia fusata, come si osserva frequentemente nella TMEP. In tale caso utile per la diagnosi si è rivelato il confronto con la cute sana prelevata dalla stessa sede, ove è localizzata la lesione ^(70,71). Il CD117 si è rivelato il marcatore più sensibile sebbene non sia specifico. L'espressione di CD25 nei mastociti cutanei di pazienti adulti con MCMP sembrerebbe predittivo di malattia sistemica ⁽⁷²⁾.

La diagnosi di MS si basa fondamentalmente sul riconoscimento d'infiltrati compatti e multifocali di mastociti (almeno 15) nel midollo osseo o in altri organi extracutanei (criterio maggiore) (Figura 3). All'interno di tali aggregati frequentemente i mastociti presentano un aspetto fusato e/o una ridotta granularità (criterio minore): in queste condizioni il riconoscimento di mastociti atipici permette di soddisfare sufficienti criteri per la diagnosi di MS ⁽⁶⁹⁾. Gli aggregati spesso contengono anche eosinofili e linfociti sparsi, o sono adiacenti a noduli linfoidi reattivi. Le indagini diagnostiche istologiche prevedono anche la conferma mediante tecniche d'immunistoichimica, in particolare l'espressione da parte dei mastociti della triptasi, di CD117 (KIT) e di CD25 ⁽⁶⁹⁾. Recentemente è stata riportata l'espressione

del CD30 (Ki-1 *antigen*) sui mastociti di pazienti con MS, valutata sia in immunistoichimica che in citofluorimetria ^(60,62). Con metodiche d'immunistoichimica il CD30 appare preferenzialmente espresso nei mastociti di pazienti affetti da MSA o leucemia mastcellulare, rispetto alle forme di MSI ⁽⁶⁰⁾: tale associazione non è tuttavia confermata dalla valutazione dell'espressione del CD30 in citofluorimetria ⁽⁶²⁾.

Non infrequentemente il criterio maggiore istologico non è soddisfatto, in quanto a livello midollare sono presenti solo piccoli aggregati sub-diagnostici o isolati sparsi di mastociti. In tali casi sono necessari altri accertamenti per soddisfare i criteri per diagnosi di MS, quali lo studio immunofenotipico e la ricerca di mutazione a livello del codone 816 di c-KIT ⁽¹⁰⁾.

Immunofenotipo

È possibile identificare i mastociti nell'aspirato di midollo osseo mediante uno studio multiparametrico in citofluorimetria, utilizzando un pannello minimo di marcatori: i mastociti si caratterizzano per la forte espressione di CD117, l'assenza d'espressione di CD34 e la positività per CD45 ⁽⁷³⁾. È possibile inoltre distinguere i mastociti patologici dai mastociti normali semplicemente dimostrando la caratteristica espressione aberrante di CD25 ⁽⁷³⁾, oltre che di CD2, pur se presente in maniera meno intensa e costante (Figura 8).

Il numero di mastociti patologici presenti nel midollo delle MSI è generalmente inferiore al 2% delle cellule CD45 positive, con un range che va dallo 0,002% all'1,7% ⁽⁷³⁾. Lo studio immunofenotipico dei mastociti midollari, e in particolare la ricerca dell'espressione anomala di CD25, è da considerare la metodica più sensibile e affidabile per la diagnosi di MS nelle forme indolenti con una scarsa infiltrazione midollare ^(74,75).

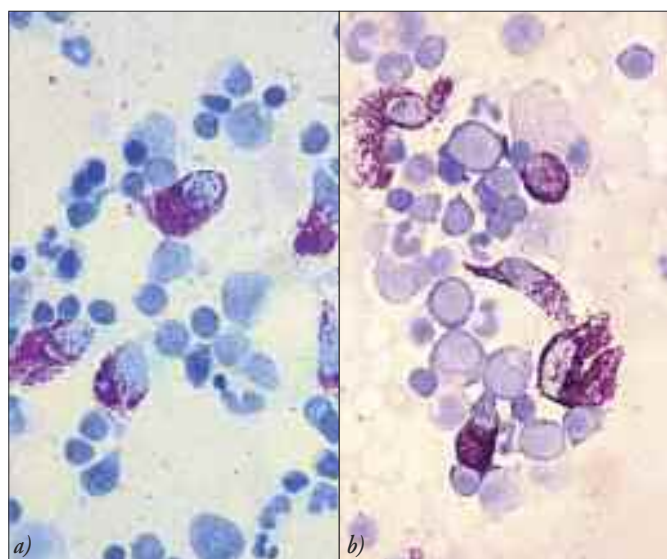


Figura 7 – Mastociti atipici di tipo I (striscio midollare): colorazione Blu di Toluidina (sinistra) e May Grunwald-Giemsa (destra). (g.c. dr. Luis Escribano)

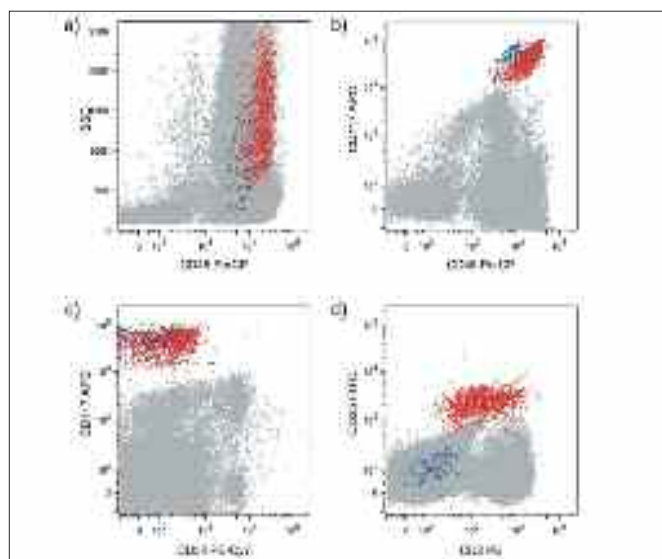


Figura 8 – Analisi immunofenotipica dei mastociti midollari mediante citometria a flusso. CD45, CD117 e CD34 sono utilizzati per individuare i mastociti come cellule CD117+/CD45+/CD34- (gate mastociti: a-c). In seguito viene valutata l'espressione di CD2 e CD25 (d). CD2 e CD25 sono espressi in modo aberrante sui mastociti anomali (in rosso) ma non dai mastociti normali (in blu) (g.c. dr. Omar Perbellini).

Biologia molecolare

In letteratura sono riportate molte metodiche per l'identificazione della mutazione D816V ma solo alcune sono indicate come sufficientemente sensibili ⁽⁶⁹⁾ come la *Reverse-Transcriptase* PCR (RT-PCR) con analisi del polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione (*Restriction Fragment Length Polymorphism* -RFLP) ⁽⁷⁶⁾, la PCR allele-specifica ⁽⁷⁷⁾ e la PCR mediata da analogo peptidico dell'acido nucleico (*peptide nucleic acid*, PNA-PCR) ⁽³²⁾. Quest'ultima consente di identificare anche altre mutazioni del codone 816. Recentemente è stata standardizzata una metodica PCR allele-specifica in *Real Time* a elevata sensibilità, che permette la quantificazione della mutazione D816V anche sulle cellule mononucleari di sangue periferico ⁽⁷⁸⁾. La ricerca della mutazione su sangue periferico è stata recentemente proposta come esame di *screening* nell'algoritmo diagnostico in caso di sospetta mastocitosi dall'*European Competence Network on Mastocytosis* (ECNM) ⁽⁷⁹⁾.

La mancata identificazione della mutazione D816V nel midollo dei pazienti che richiedono un trattamento citoriduttivo ha un importante rilievo qualora s'intenda utilizzare degli inibitori delle tirosin-chinasi, essendo noto come la mutazione D816V conferisce una resistenza all'imatinib ⁽⁸⁰⁾, mentre forme di MS che non presentano mutazioni di KIT o con mutazioni a livello dei domini extracellulari, trans-membrana e juxta-membrana risultano sensibili ^(23,53,81). L'assenza della mutazione D816V nel midollo deve essere comunque

valutata sempre con cautela, soprattutto nei casi con scarsa infiltrazione di mastociti per i quali può essere necessario anche l'arricchimento di mastociti mediante *sorting* o micromanipolazione, e confermata in un centro di riferimento per la mastocitosi ⁽⁶⁹⁾.

Nei casi con persistente eosinofilia è consigliata la ricerca della mutazione FIP1L1-PDGFR: tale riscontro ha una valenza terapeutica in considerazione dell'elevata responsività di tali forme a imatinib ⁽⁶⁹⁾. Nei casi che presentano aspetti mieloproliferativi è indicato ricercare la mutazione di JAK2 V617F, anche se non comunemente osservata nella mastocitosi ⁽⁶⁹⁾.

Citogenetica

Lo studio citogenetico da midollo è in genere indicato nei casi in cui siano presenti all'esordio alterazioni dell'emocromo o epato-splenomegalia e il sospetto di una patologia mieloidale non mastocellulare associata ⁽⁶⁹⁾.

Altri accertamenti

Una volta accertata la diagnosi di MS sono consigliati esami di laboratorio, radiologici e valutazioni specialistiche al fine di un completo inquadramento classificativo oltre che di tipo allergologico, reumatologico e dermatologico. Le varie indagini andranno poi ripetute a diverse scadenze (in genere ogni 6-12-18 mesi) in base alla clinica e alla variante. Nella Tabella 4 sono elencate le indagini eseguite alla diagnosi e nel *follow-up* presso il Gruppo Interdisciplinare

Esami di laboratorio	- Emocromo completo con formula; - Triptasi; - PT, aPTT, LDH, ALT, AST, GGT, ALP, albumina, bilirubina, colesterolo, trigliceridi, vitamina B12, folati, ferritina, beta2microglobulina; - Calcio e fosforo plasmatico e urinario, PTH, vitamina D, CTX, osteocalcina, fosfatasi alcalina ossea; - IgE totali
Esami radiologici	- Densitometria ossea della colonna lombare e femore (alla diagnosi e ogni 12-18-24 mesi); - Ecografia addome (ogni 12-24 mesi); - Rx colonna in toto e bacino (alla diagnosi) - Rx, TAC o RMN mirati in base ai sintomi, scintigrafia ossea o PET/TAC in casi selezionati
Visite specialistiche	- Visita ematologica - Visita allergologica - Visita dermatologica - Visita reumatologica
Altre indagini	in base ai sintomi o all'anamnesi: - IgE specif. e test per allergia a imenotteri, farmaci o alimenti - Visita gastroenterologica, gastroscopia e/o colonscopia - Visita psichiatrica/psicologica - Visita anestesiológica

Tabella 4 – Indagini di stadiazione e follow-up nei pazienti adulti affetti da mastocitosi sistemica (percorso diagnostico utilizzato presso il gruppo Multidisciplinare per lo studio della mastocitosi di Verona - GISM).

Sintomi da rilascio di mediatori acuto e cronico	- <i>Fatigue</i>, depressione, difficoltà d'attenzione e di concentrazione, cefalea - Prurito, orticaria, vescicolazione, dermatografismo, <i>flushing</i> - Ipertensione, palpitazioni - Diarrea, epigastralgia, crampi, dolori addominali, ulcera peptica - Broncocostrizione, ipersecrezione bronchiale - Mialgie, dolore osseo (da fratture su base osteoporotica) - Episodi pre-sincopali, sincope, shock anafilattico
Sintomi costituzionali	- Calo ponderale - Febbre - Sudorazioni profuse
Segni e sintomi da infiltrazione tissutale	- Epato e/o splenomegalia - Ascite - Malassorbimento - Dolore da lisi ossee e/o fratture patologiche - Linfadenomegalia - Anemia, piastrinopenia, leucopenia

Tabella 5 – Principali sintomi e segni della mastocitosi.

per lo Studio della Mastocitosi di Verona (GISM). Al fine di ridurre il numero di esami di controllo in pazienti a basso/nullo rischio di progressione il gruppo della REMA propone una valutazione dei pazienti con MSI ogni 6 mesi per i primi 4 anni, con esame clinico/fisico, dosaggio della triptasi sierica, emocromo con formula e esami di laboratorio. In caso di stabilità del quadro e con valori di triptasi stabili o in riduzione il consiglio è di proseguire con valutazione annuale clinico-laboratoristiche ed ecografia addome ogni 2 anni⁽⁵⁷⁾. Negli altri casi è consigliato proseguire con controlli semestrali, analogamente in tutti i casi che sviluppano un'epato/splenomegalia⁽⁵⁷⁾.

Quadri clinici

I quadri clinici nella mastocitosi sono molto eterogenei passando da forme asintomatiche o pauci-sintomatiche a quadri severi da rilascio di mediatori o da deficit d'organo. I principali sintomi sono classificabili in tre gruppi: da rilascio di mediatori, costituzionali e da infiltrazione tissutale (Tabella 5). I sintomi da rilascio di mediatori sono presenti sia in pazienti con MC che nelle forme sistemiche; in alcuni casi sono molto modesti e talora assenti, mentre in altri sono severi o addirittura *life-threatening*.

Nelle MSI in genere non vi è stretta correlazione tra l'entità dei sintomi e i livelli di triptasi sierica o il *burden* mastocitario (Figura 9). I fattori scatenanti i sintomi da rilascio di mediatori sono elencati nella Tabella 6. I sintomi costituzionali e le manifestazioni cliniche da infiltrazione tissutale sono caratteristici solo delle forme sistemiche aggressive (Figura 9).

Nelle MS associate a malattie ematologiche clonali non mastcellulari prevalgono generalmente i sintomi e i segni clinici della neoplasia ematologica associata.

L'anafilassi è la manifestazione clinica più severa della MSI. La sua frequenza nei pazienti affetti da mastocitosi è riportata tra il 22% e

il 49% negli adulti e tra il 6% e il 9% nei bambini^(82,83). Oltre a forme di anafilassi idiopatiche, gli episodi possono seguire l'assunzione di farmaci (antinfiammatori non steroidei, aspirina, induttori dell'anestesia, miorellassanti – vedi anche Tabella 6), mezzo di contrasto, alimenti, puntura d'insetti imenotteri o più raramente ditteri.

La puntura d'imenottero è la causa più frequente d'anafilassi nei pazienti adulti affetti da mastocitosi, riportata nel 5-19% dei casi^(82,83) ed è inoltre documentata una significativa correlazione tra il livello di triptasi sierica, a partire da un valore soglia di 5 mg/ml e la frequenza di reazioni sistemiche severe al veleno di imenotteri⁽⁸⁴⁾.

Gli episodi più severi possono causare in rari casi il decesso⁽⁸⁵⁾, una sindrome di Kounis⁽⁸⁶⁾ o avere come conseguenza disabilità neurologiche transitorie o permanenti^(10,49).



Figura 9 – Spettro clinico delle patologie clonali mastcellulari, in accordo con la classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (tabella 1); la Mastocitosi Sistemica (MS) pre-diagnostica non è inclusa nella classificazione (include i casi che pur presentando segni di clonalità – mastociti CD25 positivi e/o mutazione del codone 816 di KIT – non soddisfano criteri sufficienti per la diagnosi di MS).

Stimoli fisici

Calore
Freddo
Pressione
Sfregamento
Eccessiva esposizione alla luce solare

Fattori emozionali

Stress
Ansia

Farmaci

Acido acetilsalicilico*
Antiinfiammatori non steroidei*
Morfina e derivati come la codeina
Induttori e rilassanti muscolari utilizzati nell'anestesia generale
Anestetici locali
Beta-bloccanti, alfa-adrenergici e antagonisti dei recettori colinergici
Polimixina-B, anfotericina-B
Alfa-interferone
Cladribina
Mezzi di contrasto iodati

Molecole ad alto peso molecolare come il destrano

Alcool

Veleno d'imenotteri o di serpenti

Esami endoscopici

Interventi chirurgici

Miscellanea**

* L'aspirina e i FANS oltre a causare anafilassi, in alcuni casi se tollerati possono essere utilizzati nella terapia dei sintomi da mediatori

** In singoli pazienti alcuni alimenti, allergeni ambientali o altri fattori possono esacerbare i sintomi da mediatori o causare anafilassi.

Tabella 6 – Principali fattori che possono scatenare i sintomi da liberazione di mediatori^(4,98).

L'associazione tra mastocitosi e anafilassi da imenotteri è stata inizialmente descritta in pazienti con MCMP, ma successive evidenze hanno potuto documentare come tali manifestazioni siano particolarmente associate alle forme di mastocitosi senza lesioni cutanee, inquadrabili come MSI limitata al midollo osseo^(5,52,87,88). In una serie di 34 soggetti con anamnesi positiva di reazione sistemica al veleno d'imenotteri e valori di triptasi basale >11,4 ng/ml è stata documentata la presenza di una patologia clonale mastocitaria (MSI o una sindrome da attivazione mastocitaria clonale) nell'88% dei soggetti sottoposti a prelievo midollare⁽⁵²⁾ e solo il 13% di questi pazienti presentava lesioni cutanee da orticaria pigmentosa⁽⁵²⁾. In uno studio simile in pazienti con anafilassi da farmaci o da alimenti e triptasi basale elevata solo in un paziente su cinque valutati con prelievo midollare è stata diagnosticata una mastocitosi sistemica, confermando quindi la peculiare associazione tra anafilassi da imenotteri e patologie clonali mastocellulari⁽⁸⁹⁾. Un recente studio ha proposto di inquadrare la MSI senza lesioni cutanee associata all'anafilassi da imenotteri come entità a sé stante, ad ottima prognosi, caratterizzata da predominanza del sesso maschile, valori più bassi di triptasi sierica e inferiore percentuale di mastociti midollari rispetto alle altre forme indolenti, pressoché assenti altri sintomi da mediatori e coinvolgimento clonale dei soli mastociti e non di altre linee mieloidi⁽⁹⁰⁾. Alvarez Twose et al.⁽⁵¹⁾ della REMA hanno proposto, e poi validato, uno score prognostico (REMA score) in grado di individuare tra i pazienti con manifestazioni severe da mediatori mastocitari, tra cui l'anafilassi da imenotteri, quelli a maggior rischio di essere affetti da patologia clonale mastocitaria, in assenza di lesioni cutanee tipiche. Recentemente tale score è stato incluso nella valutazione di screening anche dall'ECNM⁽⁷⁹⁾. Il REMA score si basa sui seguenti parametri, cui è stato associato un punteggio: sesso maschile, clinica dell'episodio caratterizzato dalla presenza d'ipotensione/sincope in assenza d'orticaria/angioedema e livelli basali di triptasi > 25 ng/ml (vedi Tabella 7). Uno score ≥ 2 risulta avere un potere predittivo positivo dell'89 %⁽⁵¹⁾. Dal punto di vista pratico in un soggetto con anafilassi

al veleno d'imenotteri e concentrazione plasmatica persistentemente elevata di triptasi basale e/o un REMA score ≥2 va sempre sospettata la presenza di mastocitosi^(51,52,79).

La MS è da tempo identificata come possibile causa d'osteoporosi; tale complicanza nella MS è stata attribuita direttamente all'infiltrazione del midollo osseo da parte dei mastociti e al rilascio locale da parte di questi dei molteplici mediatori noti (ad esempio istamina, eparina, triptasi) o citochine (*tumor necrosis factor alfa*, interleuchina 1, interleuchina 6)⁽⁹¹⁻⁹³⁾. La prevalenza dell'osteoporosi in corso di MS è stata variamente riportata in un intervallo che va dal 14 al 66%⁽⁹³⁻⁹⁵⁾ e si manifesta prevalentemente a livello della colonna vertebrale. Le principali manifestazioni sono le fratture osteoporotiche, spesso multiple, a livello dei corpi vertebrali, con collasso mediale simile alle fratture nell'osteoporosi indotta da steroidi^(93,94) (Figura 10). La presenza di tali fratture non è da considerare un criterio C (Tabella 2). In pazienti affetti da MS sono state descritte anche lesioni focali, sia osteolitiche (talora multiple di piccole dimensioni, visibili anche in forme non aggressive, oppure di grandi dimensioni) che osteoaddensanti. Osteopatie addensanti diffuse simil-osteoporotiche sono state descritte nel 3-8% dei pazienti^(94,96): la concentrazione plasmatica di triptasi in tali casi è spiccatamente elevata^(12,94,97). In assenza di episodi di anafilassi o lesioni cutanee che suggeriscano la diagnosi di MS, l'osteoporosi può essere la sola manifestazione di una MS latente. Qualsiasi forma d'osteoporosi a eziologia sconosciuta, specie nel maschio, dovrebbe essere valutata per il sospetto di mastocitosi, utilizzando come metodo di screening la triptasi. I livelli di triptasi non sembrano correlare con la compromissione della densità minerale ossea o la prevalenza di fratture vertebrali^(93,94).

È stata invece riportata una correlazione tra i livelli più elevati di metaboliti urinari dell'istamina (metilistamina) e il rischio di manifestazioni osteoporotiche⁽⁹³⁾. Nei pazienti con MS i *markers* laboratoristici di *turnover* osseo possono essere normali, aumentati o diminuiti e non correlano con la densità minerale ossea⁽⁹⁴⁾.

Terapia

Un approccio razionale al paziente con mastocitosi deve includere principalmente:

- un adeguato *counseling* rivolto oltre che ai pazienti, ai parenti e ai medici coinvolti nella cura. Le informazioni devono riguardare la malattia e le sue problematiche, i farmaci che vanno evitati, i comportamenti da adottare in caso di anestesia o intervento chirurgico. Ai pazienti deve essere spiegato come evitare i fattori scatenanti la liberazione acuta dei mediatori (Tabella 6) e devono essere istruiti sull'utilizzo in caso di emergenza di antistaminici ad azione rapida associati a steroidi e dell'adrenalina autoiniettabile, in particolare se ad alto rischio di episodi di anafilassi (ad es. i pazienti allergici a veleno di imenotteri);
- trattamento dei sintomi da rilascio acuto e cronico di mediatori⁽⁹⁸⁾,
- immunoterapia specifica (ITS) in caso di reazioni sistemiche

Variabile		Score
Sesso	Maschile	+1
	Femminile	-1
Sintomi clinici	Assenza di orticaria e angioedema	+1
	Orticaria e/o angioedema	-2
	Presincope/sincope	+3
Triptasi basale	<15 ng/ml	-1
	>25 ng/ml	+2
* Uno score ≥2 individua tra i pazienti con manifestazioni severe da mediatori mastocitari e assenti lesioni cutanee tipiche, quelli a maggior rischio di patologia clonale mastocellulare		

Tabella 7 – REMA score*⁽⁵¹⁾

al veleno d'imenotteri ^(87,99);

- fototerapia in casi molto selezionati ⁽¹⁰⁰⁾;
- terapia dell'osteoporosi e delle complicanze ossee ⁽¹⁰¹⁾;
- terapia citoriduttrice nei casi in cui è indicata ^(61,102,103).

Sintomi da rilascio di mediatori

La terapia medica con antistaminici anti-H1 è efficace nel ridurre il prurito e gli episodi di *flushing* nella maggior parte dei pazienti.

In genere si utilizzano anti H1 di seconda generazione, non sedanti e se necessario quelli sedanti, preferenzialmente la sera. L'impiego degli anti-H2 o degli inibitori di pompa protonica è indicato nei pazienti con interessamento gastrointestinale ^(4,98,104). L'impiego combinato di anti-H1, anti-H2 e/o del sodio cromoglicato è raccomandato per la profilassi degli episodi d'ipotensione o delle reazioni anafilattoidi ⁽⁴⁾. Il sodio cromoglicato è efficace inoltre nel ridurre la sintomatologia gastrointestinale (dolori addominali, nausea, vomito e diarrea) ⁽⁹⁸⁾. L'uso dei corticosteroidi è invece controverso: in taluni casi può migliorare il controllo d'alcuni sintomi sistemici, ma anche contribuire alla già frequente osteoporosi. Altri farmaci utilizzati per trattare gli episodi di prurito/*flushing* resistenti agli anti H1 sono gli anti-leucotrienici e il ketotifene ^(98,103).

I sintomi da mediatori sovente richiedono una terapia farmacologica continua, spesso di combinazione, e in alcuni casi, una terapia d'emergenza. Nei pazienti non responsivi, con sintomi severi, è segnalata in alcuni casi l'efficacia dell'omalizumab (anticorpo monoclonale anti-IgE) ⁽¹⁰⁵⁾ o di un trattamento citoriduttrice.

Reazioni sistemiche da veleno d'imenotteri

L'uso dell'ITS nei pazienti affetti da mastocitosi è rimasto oggetto di discussione per molti anni, per segnalazioni sia di un rischio maggiore di reazioni allergiche sistemiche sia d'inefficacia in questa tipologia di pazienti ⁽⁸⁷⁾. Studi più recenti, effettuati su ampie casistiche, hanno invece dimostrato come l'ITS è ben tollerata dai pazienti affetti da mastocitosi e costituisce un'efficace protezione alle reazioni allergiche gravi in seguito alle successive punture ^(89,99). Si raccomanda inoltre di proseguire l'ITS per tutta la vita, data la segnalazione di reazioni fatali a puntura d'imenotteri dopo la sospensione ⁽⁸⁷⁾.

Fototerapia

La fototerapia, tra cui UVA1, a banda stretta UVB e UVA più psoraleni rappresenta una terapia di secondo livello in pazienti con mastocitosi con manifestazioni cutanee, sintomatici, che non hanno avuto beneficio dalla terapia con anti-mediatori. È ben segnalata la sua efficacia nelle MC e nelle MS con coinvolgimento cutaneo per quanto riguarda i sintomi cutanei mediatori-correlati ⁽¹⁰⁰⁾. Tuttavia, la completa e/o permanente scomparsa delle lesioni non viene riportata, e il periodo complessivo di riduzione dei sintomi è breve. Pertanto, dati i potenziali effetti collaterali della fototerapia ultravioletta ricorrente, la sua indicazione va valutata con grande attenzione ⁽¹⁰⁰⁾.

Complicanze ossee

La diagnosi precoce delle complicanze ossee è di estrema importanza per prevenire fratture invalidanti soprattutto vertebrali. Una valutazione annuale della densitometria è indicata in tutti i soggetti che presentino segni di coinvolgimento osseo, anche modesto all'esordio, o in caso contrario almeno ogni 18-24 mesi.

All'esordio è indicata anche una valutazione radiologica almeno della colonna in toto e del bacino, per valutare sia la presenza di fratture vertebrali che di aree di osteosclerosi.

Analogamente vanno monitorati annualmente almeno i dosaggi di vitamina D e paratormone e instaurato supplemento vitaminico se necessario e non controindicato. In caso di osteoporosi andranno in ogni caso escluse anche altre cause ed eventualmente corrette.

Alcune segnalazioni suggeriscono come una precoce terapia anti-mediatori possa migliorare i segni e sintomi di coinvolgimento osseo, ma non vi sono studi definitivi a riguardo ⁽¹⁰⁶⁾.



Figura 10 – Risonanza magnetica nucleare della colonna di una paziente affetta da fratture vertebrali osteoporotiche secondarie a mastocitosi sistemica. (g.c. dr. Maurizio Rossini).

In assenza di specifici studi nell'osteoporosi in corso di MS, le linee guida raccomandano i bisfosfonati orali, e nei casi con osteoporosi severa o con fratture i bisfosfonati per via endovenosa, applicando le misure di sicurezza idonee, come per il mieloma⁽⁶⁹⁾.

Tuttavia, un recente studio su 25 pazienti ha documentato come la sola infusione endovenosa di zoledronato 5 mg ogni 12-18 mesi sia in grado di migliorare il quadro densitometrico⁽¹⁰¹⁾ e sopprimere i *markers* laboratoristici surrogati di turn-over osseo per almeno 1 anno. I risultati in termine di densità ossea riportati sono superiori a quelli ottenuti in precedenti serie, con trattamento orale giornaliero con alendronato o con infusioni di pamidronato mensili⁽¹⁰¹⁾.

L'associazione dei bisfosfonati per via e.v. con l'alfa-interferone (α -IFN) è consigliata nei casi resistenti ai soli bisfosfonati o nei casi di osteoporosi particolarmente severa^(103,107).

Farmaci citoriduttivi

Una terapia citoriduttiva è indicata solo nei pazienti affetti da leucemia mastocitaria, MSA, MSS in progressione, mentre nella MSI è consigliata solo nei rari casi in cui ripetuti e frequenti sintomi severi da mediatori non siano controllabili con la terapia con anti-mediatori^(69,103). Nel caso di MS associate a malattie ematologiche clonali non mastcellulari il trattamento consigliato è quello diretto alla forma più severa delle due malattie associate^(69,102). I farmaci citoriduttivi considerati di prima linea nel trattamento della MSA e nelle forme di MSS in progressione sono l' α -IFN e la cladribina (2-CdA). L' α -IFN è utilizzato associato inizialmente a steroidi (es. prednisone 30-60 mg/die) che ne aumentano la tollerabilità, gradualmente poi scalati fino a sospensione nelle prime settimane o nei primi mesi di terapia. Dati i problemi di tollerabilità dell' α -IFN è consigliabile iniziare con basse dosi e poi gradualmente aumentare nel tempo. Le risposte maggiori sono intorno al 40%⁽¹⁰⁸⁻¹¹⁰⁾. Il dosaggio ottimale non è definito (in genere da 1 a 5 MU sc 3 volte la settimana)⁽¹⁰³⁾. È prevedibile una migliore tollerabilità utilizzando la forma pegilata⁽¹⁰³⁾.

La 2-CdA è somministrata al dosaggio di 0,13-0,15 mg/kg per 5 gg (infusione di 2 ore), per un totale di 3-6 cicli; permette di ottenere una risposta nel 55-66% dei casi^(102,103,111,112). Attualmente è possibile utilizzare la 2-CdA allo stesso dosaggio in formulazione sottocutanea. La tossicità principale è la mielo-soppressione e la linfopenia. La 2-CdA è sicuramente da preferire all' α -IFN nei casi in cui sia necessaria una risposta più rapida o vi siano controindicazioni al suo uso.

Tra gli inibitori delle tirosin-chinasi, l'imatinib si è dimostrato efficace solo nelle rare forme con c-KIT non mutato o mutazioni di c-KIT non coinvolgenti il codone 816^(23,53,61). L'imatinib è pure attivo nelle rare forme di MS associate a leucemia eosinofila cronica e mutazione FIP1L1-PDGFra: in tali forme KIT è *wild-type* (WT) pressochè in tutti i casi⁽¹⁰²⁾.

Sono in corso studi per valutare l'efficacia nella MS d'altri inibitori

delle tirosin-chinasi: complessivamente il trattamento con dasatinib, che in vitro si era dimostrato efficace sia su cellule WT sia D816V mutate, ha ottenuto risultati assai poco soddisfacenti nelle forme aggressive^(113,114). Il masitinib, un inibitore selettivo delle tirosin-chinasi (KIT WT, PDGF-receptor e *Lyn*) ha ottenuto nel 56% dei casi un miglioramento dei sintomi >50% in una serie di 25 pazienti affetti da MC o MSI (di cui solo 6 con documentata mutazione di D816V nella cute o nel midollo), con sintomi non controllati dagli anti-mediatori. Tale trattamento è stato complicato nel 35% dei casi da severi effetti collaterali⁽¹¹⁵⁾.

La midostaurina, un inibitore orale di multiple tirosin-chinasi, incluso il recettore KIT WT e D816-mutato^(116,117), ha dimostrato tassi di risposta globale del 60% in 40 pazienti affetti da MS avanzata, tra cui 7 pazienti con leucemia mastocitaria⁽¹¹⁸⁾. Complessivamente il farmaco ha mostrato una buona tollerabilità⁽¹¹⁹⁾ e la durata mediana della risposta e della sopravvivenza non è stata raggiunta dopo un follow-up mediano di 27 mesi; particolarmente interessante è l'ottenimento d'una sopravvivenza mediana di 22 mesi nei pazienti con leucemia mastcellulare⁽¹¹⁸⁾.

Ad oggi non è chiaro quali pazienti con MS possono effettivamente beneficiare del trattamento con inibitori di KIT. Sono necessari ulteriori studi per chiarire il vantaggio degli inibitori della tirosin-chinasi su α -IFN o 2-CdA, che sono ancora considerati il trattamento di prima linea nella MSA. Un'opzione di trattamento possibile in futuro è la combinazione di più farmaci citoriduttivi con potenziali effetti sinergici.

Nei soggetti giovani con forme avanzate a rapida cinetica e disponibilità di un donatore di midollo, è indicato il trapianto allogenico preceduto da schemi polichemioterapici comprendenti citosin-arabinoside ad alte dosi e analoghi purinici come la fludarabina (o in alternativa cicli di 2-CdA)⁽¹⁰²⁾.

Conclusioni

La mastocitosi è una malattia rara ed eterogenea definita dall'espansione e accumulo di mastociti clonali nella cute e in altri organi; nella maggior parte dei pazienti adulti si presenta come forma sistemica della malattia. In presenza di un sospetto clinico di malattia il livello sierico di triptasi è un utile parametro per lo *screening* così come la ricerca della mutazione D816V sul sangue periferico, purchè siano disponibili tecniche sufficientemente sensibili. Un esame del midollo osseo e i successivi esami di stadiazione sono tuttavia necessari per stabilire la diagnosi, definire la variante e la relativa prognosi. La diagnosi e il trattamento devono basarsi su un approccio multidisciplinare che si avvalga della collaborazione di diversi specialisti (in particolare ematologi, allergologi, dermatologi, internisti, reumatologi): i pazienti con MSI, che rappresentano la stragrande maggioranza, pur avendo una pressochè normale aspettanza di vita, richiedono spesso una terapia cronica con anti-mediatori, un adeguato trattamento per l'osteoporosi e/o un'im-

munoterapia specifica per allergia al veleno di imenotteri continuativa. Un non corretto approccio a queste problematiche può comportare il rischio di reazioni allergiche severe *life-threatening* o a complicanze ossee di rilievo. Negli ultimi anni, sono stati sviluppati una serie di nuovi approcci terapeutici per quei pazienti con

MS che richiedono un trattamento citoriduttivo: è ipotizzabile che tali farmaci possano essere disponibili per il futuro nella comune pratica clinica.

Al momento tuttavia la mastocitosi rimane una malattia incurabile e spesso resistente al trattamento nelle sue forme avanzate.

Bibliografia

- Longley BJ, Tyrrell L, Lu SZ, Ma YS, Langley K, Ding TG, et al. Somatic c-KIT activating mutation in urticaria pigmentosa and aggressive mastocytosis: establishment of clonality in a human mast cell neoplasm. *Nat Genet.* 1996;12(3):312-4.
- Kirshenbaum AS, Goff JB, Kessler SW, Mican JM, Zsebo KM, Metcalfe DD. Effects of IL-3 and stem cell factor on the appearance of human basophils and mast cells from CD34+ pluripotent progenitor cells. *J Immunol.* 1992;148(3):772-7.
- Valent P, Spanblochl E, Sperr WR, Sillaber C, Zsebo KM, Agis H, et al. Induction of differentiation of human mast cells from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/kit-ligand in long-term culture. *Blood* 1992;80(9):2237-45.
- Valent P, Horny HP, Escribano L, Longley BJ, Li CY, Schwartz LB, et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res.* 2001;25(7):603-25.
- Horny HP, Metcalfe DD, Bennett JM, Bain BJ, Akin C, Escribano L, et al. Mastocytosis. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. eds. *WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues.* 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research and Cancer (IARC) 2008:54-63.
- Rosbotham JL, Malik NM, Syrris P, Jeffery S, Bedlow A, Gharraie S, Murday VA, et al. Lack of c-kit mutation in familial urticaria pigmentosa. *Br J Dermatol.* 1999;140(5):849-52.
- van Doormaal JJ, Arends S, Brunekreef KL, van der Wal VB, Sietsma J, van Voorst, et al. Prevalence of indolent systemic mastocytosis in a Dutch region. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(5):1429-31.
- Bonifacio M, Artuso A, Bonadonna P, Schena D, Rossini M, Perbellini O, et al. Epidemiology of mastocytosis in adults based on a multidisciplinary diagnostic approach. *Haematologica (EHA Annual Meeting Abstracts)* 2013;98(s1):348.
- Cohen SS, Skovbo S, Vestergaard H, Kristensen T, Møller M, Bindslev-Jensen C, et al. Epidemiology of systemic mastocytosis in Denmark. *Br J Haematol.* 2014;166(4):521-8.
- Zanotti R, Bonadonna P, Bonifacio M, Artuso A, Schena D, Rossini M, et al. Isolated bone marrow mastocytosis: an underestimated subvariant of indolent systemic mastocytosis. *Haematologica.* 2011;96(3):482-4.
- Czarnetzki BM, Kolde G, Schoemann A, Urbanitz S, Urbanitz D. Bone marrow findings in adult patients with urticaria pigmentosa. *J Am Acad Dermatol* 1988;18(1 Pt 1):45-51.
- Escribano L, Alvarez-Twose I, Sánchez-Muñoz L, García-Montero A, Núñez R, Almeida J, et al. Prognosis in adult indolent systemic mastocytosis: a long-term study of the Spanish Network on Mastocytosis in a series of 145 patients. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124(3):514-21.
- Sanchez-Muñoz L, Alvarez-Twose I, García-Montero AC, Teodosio C, Jara-Acevedo M, Pedreira CE, et al. Evaluation of the WHO criteria for the classification of patients with mastocytosis. *Mod Pathol.* 2011;24(9):1157-68.
- Brockow K Epidemiology, Prognosis, and Risk Factors in Mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2014;34(2):283-29.
- Lim KH, Tefferi A, Lasho TL, Finke C, Patnaik M, Butterfield JH, et al. Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood* 2009;113(23):5727-36.
- Hannaford R, Rogers M. Presentation of cutaneous mastocytosis in 173 children. *Australas J Dermatol.* 2001;42(1):15-21.
- Lange M, Niedozytko M, Renke J, Gle J, Niedozytko B. Clinical aspects of paediatric mastocytosis: a review of 101 cases. *J Eur Acad Dermatol Venerol.* 2012;26(12):1565-71.
- Hartmann K, Wardelmann E, Ma Y, Merkelbach-Bruse S, Preussner LM, Woolery C, et al. Novel germline mutation of KIT associated with familial gastrointestinal stromal tumors and mastocytosis. *Gastroenterology.* 2005;129(3):1042-6.
- Zanotti R, Simioni L, Garcia-Montero AC, Perbellini O, Bonadonna P, Caruso B, et al. Somatic D816V KIT mutation in a case of adult onset familial mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(2):605-7.
- Orfao A, Garcia Montero AC, Sanchez L, Escribano L; REMA. Recent advances in the understanding of mastocytosis: the role of KIT mutations. *Br J Haematol.* 2007;138(1):12-30.
- Broesby-Olsen S, Kristensen TK, Møller MB, Bindslev-Jensen C, Vestergaard H; Mastocytosis Centre, Odense University Hospital (MastOUH). Adult-onset systemic mastocytosis in monozygotic twins with KIT D816V and JAK2 V617F mutations. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130(3):806-8.
- Chang A, Tung RC, Schlesinger T, Bergfeld WF, Dijkstra J, Kahn TA. Familial cutaneous mastocytosis. *Pediatr Dermatol.* 200;18(4):271-6.
- Akin C, Fumo G, Yavuz AS, Lipsky PE, Neckers L, Metcalfe DD. A novel form of mastocytosis associated with a transmembrane c-Kit mutation and response to imatinib. *Blood* 2004;103(8):3222-5.
- Tang X, Boxer M, Drummond A, Ogston P, Hodgins M, Burden AD. A germline mutation in KIT in familial diffuse cutaneous mastocytosis. *J Med Genet.* 2004;41(6):e88.
- Ben-Amitai D, Metzker A, Cohen HA. Pediatric Cutaneous Mastocytosis: A Review of 180 Patients. *IMAJ.* 2005;7(5):320-2.
- Kettelhut BV, Metcalfe DD. Pediatric mastocytosis. *Ann Allergy.* 1994;73(3):197-202.
- Metcalfe DD. Mast cells and mastocytosis. *Blood* 2008;112(4):946-55.
- Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2005;13(3):205-20.
- Nagata H, Worobec AS, Oh CK, Chowdhury BA, Tannenbaum S, Suzuki Y, et al. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92(23):10560-4.
- Buttner C, Henz BM, Welker P, Sepp NT, Grabbe J. Identification of activating c-kit mutations in adult, but not in childhood-onset indolent mastocytosis: A possible explanation for divergent clinical behavior. *J Invest Dermatol.* 1998;111(6):1227-31.
- Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, Ikeda H, Kitayama H, Koshimizu U, et al. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest.* 1993;92(4):1736-44.
- Sotlar K, Escribano L, Landt O, Möhrle S, Herrero S, Torrelo A, et al. One-step detection of c-kit point mutations using PNA-mediated PCR-clamping and hybridization probes. *Am J Pathol.* 2003;162(3):737-46.
- Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez ML, Nunez R, Prados A, et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood* 2006;108(7):2366-72.
- Beghini A, Cairoli R, Morra E, Larizza L. In vivo differentiation of mast cells from acute myeloid leukemia blasts carrying a novel activating ligand-independent c-kit mutation. *Blood Cells Mol Dis.* 1998;24(2):262-70.
- Longley BJ Jr, Metcalfe DD, Tharp M, Wang X, Tyrrell L, Lu SZ, et al. Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(4):1609-14.

36. Pullarkat VA, Pullarkat ST, Calverley DC, Brynes RK. Mast cell disease associated with acute myeloid leukemia: Detection of a new c-kit mutation Asp816His. *Am J Hematol* 2000;65(4):307-9.
37. Pignon JM, Giraudier S, Duquesnoy P, ouault H, Imbert M, Vainchenker W, et al. A new c-kit mutation in a case of aggressive mast cell disease. *Br J Haematol*. 1997;96(2):374-6.
38. Bodemer C, Hermine O, Palmérini F, Yang Y, Grandpeix-Guyodo C, Leventhal PS, et al. Pediatric mastocytosis is a clonal disease associated with D816V and other activating c-KIT mutation. *J Invest Dermatol*. 2010;130(3):804-15.
39. Yanagihori H, Oyama N, Nakamura K, Kaneko F. c-kit Mutations in patients with childhood-onset mastocytosis and genotype-phenotype correlation. *J Mol Diagn*. 2005;7(2):252-7.
40. Verzijl A, Heide R, Oranje AP, van Schaik RH. C-kit Asp-816-Val mutation analysis in patients with mastocytosis. *Dermatology* 2007;214(1):15-20.
41. Zappulla JB, Dubreuil P, Desbois S, Létard S, Hamouda NB, Daéron M, et al. Mastocytosis in mice expressing human Kit receptor with the activating Asp816Val mutation. *J Exp Med*. 2005;20(12):1635-41.
42. Gerbaulet A, Wickenhauser C, Scholten J, Peschke K, Drube S, Horny HP, et al. Mast cell hyperplasia, B cell malignancy, and intestinal inflammation in mice with conditional expression of a constitutively active kit. *Blood* 2011;117(6):2012-21.
43. Wilson TM, Maric I, Simakova O, Bai Y, Chan EC, Olivares N, et al. Clonal analysis of NRAS activating mutations in KIT-D816V systemic mastocytosis. *Hematologica* 2011;96(3):459-63.
44. Soucie E, Hanssens K, Mercher T, Georgin-Lavialle S, Damaj G, Livideanu C, et al. In aggressive forms of mastocytosis, TET2 loss cooperates with c-KITD816V to transform mast cells. *Blood*. 2012;120(24):4846-49.
45. Hartmann K, Henz BM. Cutaneous mastocytosis – clinical heterogeneity. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;127(2):43-6.
46. Parks A, Camisa C. Reddish-brown macules with telangiectasia and pruritus. Urticaria pigmentosa-telangiectasia macularis eruptiva perstans (TMEP) variant, with systemic mastocytosis. *Arch Dermatol*. 1988;124(3):429-30, 432-3.
47. Sethuraman G, Handa S, Radotra B, Kumar B. Diffuse cutaneous mastocytosis with bullae or bullous mastocytosis: a question of semantics. *Ped Dermatol*. 1999;16(5):409-11.
48. Sotlar K, Colak S, Bache A, Berezowska S, Krokowski M, Burkhard B, et al. Variable presence of KITD816V in clonal haematological non-mast cell lineage diseases associated with systemic mastocytosis (SM-AHNMD). *J Pathol*. 2010;220(5):586-95.
49. Wimazal F, Geissler P, Shnawa P, Sperr WR, Valent P. Severe Life-Threatening or Disabling Anaphylaxis in Patients with Systemic Mastocytosis: A Single-Center Experience. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;157(4):399-405.
50. Horny HP, Sotlar K, Sperr WR, Valent P. Systemic mastocytosis with associated clonal haematological non-mast cell lineage diseases: a histopathological challenge. *J Clin Pathol*. 2004;57(6):604-8.
51. Alvarez-Twose I, González de Olano D, Sánchez-Muñoz L, Matito A, Esteban-López MI, Vega A, et al. Clinical, biological, and molecular characteristics of clonal mast cell disorders presenting with systemic mast cell activation symptoms. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(6):1269-1278.
52. Bonadonna P, Perbellini O, Passalacqua G, Caruso B, Colarossi S, Dal Fior D, et al. Clonal mast cell disorders in patients with systemic reactions to Hymenoptera stings and increased serum tryptase levels. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(3):680-6.
53. Alvarez-Twose I, González P, Morgado JM, Jara-Acevedo M, Sánchez-Muñoz L, Matito A, et al. Complete response after imatinib mesylate therapy in a patient with well-differentiated systemic mastocytosis. *J Clin Oncol*. 2012;30(12):e126-9.
54. Sonneck K, Florian S, Müllauer L, Wimazal F, Födinger M, Sperr WR, et al. Diagnostic and subdiagnostic accumulation of mast cells in the bone marrow of patients with anaphylaxis: Monoclonal mast cell activation syndrome. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;142(2):158-64.
55. Pardanani A, Chen D, Abdelrahman RA, Reichard KK, Zblewski D, Wood AJ, et al. Clonal mast cell disease not meeting WHO criteria for diagnosis of mastocytosis: clinicopathologic features and comparison with indolent mastocytosis Leukemia. 2013;27(10):2091-4.
56. Teodosio C, García-Montero AC, Jara-Acevedo M, Alvarez-Twose I, Sánchez-Muñoz L, Almeida J, et al. An immature immunophenotype of bone marrow mast cells predicts for multilineage D816V KIT mutation in systemic mastocytosis. *Leukemia*. 2012;26(5):951-8.
57. Matito A, Morgado JM, Álvarez-Twose I, Sánchez-Muñoz L, Pedreira CE, Jara-Acevedo M, et al. Serum tryptase monitoring in indolent systemic mastocytosis: association with disease features and patient outcome. *PLoS One*. 2013;8(10):e76116.
58. Akin C, Schwartz LB, Kitoh T, Obayashi H, Worobec AS, Scott LM et al. Soluble stem cell factor receptor (CD117) and IL-2 receptor alpha chain (CD25) levels in the plasma of patients with mastocytosis: relationships to disease severity and bone marrow pathology. *Blood*. 2000;96(4):1267-73.
59. Hoermann G, Gleixner KV, Dinu GE, Kundi M, Greiner G, Wimazal F, et al. The KIT D816V allele burden predicts survival in patients with mastocytosis and correlates with the WHO type of the disease. *Allergy*. 2014;69(6):810-3.
60. Sotlar K, Cerny-Reiterer S, Petat-Dutter K, Hessel H, Berezowska S, Müllauer L, et al. Aberrant expression of CD30 in neoplastic mast cells in high grade mastocytosis. *Mod Pathol*. 2011;24(4):585-95.
61. Pardanani A. Systemic mastocytosis: disease overview, pathogenesis and treatment. *Am J Hematol*. 2012;26(5):1117-28.
62. Morgado J M, Perbellini O, Johnson R C, Teodosio C, Matito A, Alvarez-Twose I, et al. CD30 expression by bone marrow mast cells from different diagnostic variants of systemic mastocytosis. *Histopathology*. 2013;63(6):780-7.
63. Schwartz LB. Diagnostic value of tryptase in Anaphylaxis and Mastocytosis. *Immunol Allergy Clin N Am*. 2006;26(3):451-63.
64. Simons FE, Arduoso LR, Bilò MB, El-Gamal YM, Ledford DK, Ring J, et al. World Allergy Organization anaphylaxis guidelines: summary. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3):587-93.
65. Sperr WR, El-Samahi A, Kundi M, Girschikofsky M, Winkler S, Lutz D, et al. Elevated tryptase levels selectively cluster in myeloid neoplasms: a novel diagnostic approach and screen marker in clinical haematology. *Eur J Clin Invest*. 2009;39(10):914-23.
66. Ferrer M, Nuñez-Córdoba JM, Luquin E, Grattan CE, De la Borbolla JM, Sanz ML, et al. Serum total tryptase levels are increased in patients with active chronic urticaria. *Clin Exp Allergy*. 2010;40(12):1760-6.
67. Schliemann S, Seyfarth F, Hipler UC, Elsner P. Impact of age and heterophilic interference on the basal serum tryptase, a risk indication for anaphylaxis, in 1,092 dermatology patients. *Acta Derm Venereol*. 2012;92(5):484-9.
68. Sperr WR, Escribano L, Jordan JH, Scherthaner GH, Kundi M, Horny HP, et al. Morphologic properties of neoplastic mast cells: delineation of stages of maturation and implication for cytological grading of mastocytosis. *Leuk Res*. 2001;25(7):529-36.
69. Valent P, Akin C, Escribano L, Födinger M, Hartmann K, Brockow K, et al. Standards and standardization in mastocytosis: consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria. *Eur J Clin Invest*. 2007;37(6):435-53.
70. Mihm MC, Clark WH, Reed RJ, Caruso MG. Mast cell infiltrates of the skin and the mastocytosis syndrome. *Hum Pathol*. 1973;4(2):231-9.
71. Janssens AS, Heide R, den Hollander JC, Mulder PG, Tank B, Oranje AP, et al. Mast cell distribution in normal adult skin. *J Clin Pathol*. 2005;58(3):285-9.
72. Hollmann TJ, Brenn T, Hornick JL. CD25 expression on cutaneous mast cells from adult patients presenting with urticaria pigmentosa is predictive of systemic mastocytosis. *Am J Surg Pathol*. 2008;32(1):139-45.
73. Escribano L, Diaz-Agustin B, López A, Núñez López R, García-Montero A, Almeida J, et al. Immunophenotypic analysis of mast cells in mastocytosis: When and how to do it. Proposals of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA). *Cytometry B Clin Cytom*. 2004;58(1):1-8.
74. Perbellini O, Zamò A, Colarossi S, Zampieri F, Zoppi F, Bonadonna P, et al. Primary role of multiparametric flow cytometry in the diagnostic work-up of indolent clonal mast cell disorders. *Cytometry B Clin Cytom*. 2011;80(6):362-8.
75. Morgado JM, Sánchez-Muñoz L, Teodósio CG, Jara-Acevedo M, Alvarez-Twose I, Matito A, et al. Immunophenotyping in systemic mastocytosis diagnosis: 'CD25 positive alone is more informative than the 'CD25 and/or CD2' WHO criterion.

- Mod Pathol. 2012;25(4):516-21.
76. Akin C, Kirshenbaum AS, Semere T, Worobec AS, Scott LM, Metcalfe DD. Analysis of the surface expression of c-kit and occurrence of the c-kit Asp816Val activating mutation in T cells, B cells, and myelomonocytic cells in patients with mastocytosis. *Exp Hematol*. 2000;28(2):140-7.
 77. Corless CL, Harrell P, Lacouture M, Bainbridge T, Le C, Gatter K, et al. Allele-specific polymerase chain reaction for the imatinib-resistant KIT D816V and D816F mutations in mastocytosis and acute myelogenous leukaemia. *J Mol Diagn*. 2006;8(5):604-12.
 78. Kristensen T, Vestergaard H, Møller MB. Improved detection of the KIT D816V mutation in patients with systemic mastocytosis using a quantitative and highly sensitive real-time qPCR assay. *J Mol Diagn*. 2011;13(2):180-8.
 79. Valent P, Escribano L, Broesby-Olsen S, Hartmann K, Grattan C, Brockow K, et al. Proposed diagnostic algorithm for patients with suspected mastocytosis: a proposal of the European Competence Network on Mastocytosis. *Allergy*. 2014;69(10):1267-74.
 80. Ma Y, Zeng S, Metcalfe DD, Akin C, Dimitrijevic S, Butterfield JH, et al. The c-KIT mutation causing human mastocytosis is resistant to STI571 and other KIT kinase inhibitors; kinases with enzymatic site mutations show different inhibitor sensitivity profiles than wild-type kinases and those with regulatory-type mutations. *Blood*. 2002;99(5):1741-4.
 81. Zermati Y, De Sepulveda P, Feger F, Létard S, Kersual J, Castéran N, et al. Effect of tyrosine kinase inhibitor STI571 on the kinase activity of wild-type and various mutated c-kit receptors found in mast cell neoplasms. *Oncogene*. 2003;22(5):660-4.
 82. González de Olano D, de la Hoz Caballer B, Núñez López R, et al. Prevalence of allergy and anaphylactic symptoms in 210 adult and pediatric patients with mastocytosis in Spain: a study of the Spanish network on mastocytosis (REMA). *Clin Exp Allergy*. 2007;37(10):1547-55.
 83. Brockow K, Jofer C, Behrendt H, Ring J. Anaphylaxis in patients with mastocytosis: a study on history, clinical features and risk factors in 120 patients. *Allergy*. 2008;63(2):226-32.
 84. Rueff F, Przybilla B, Biló MB, Müller U, Scheipl F, Aberer W, et al. Predictors of severe systemic anaphylactic reactions in patients with Hymenoptera venom allergy: importance of baseline serum tryptase—a study of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(5):1047-54.
 85. Oude Elberink JNK, de Monchy JGR, Kors JW, et al. Fatal anaphylaxis after a yellow jacket sting, despite venom immunotherapy, in two patients with mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;99:153-161.
 86. González-de-Olano D, Matito A, Sánchez-López P, Sánchez-Muñoz L, Morgado JM, Teodósio C, et al. Mast cell-related disorders presenting with Kounis syndrome. *Int J Cardiol*. 2012;161(1):56-8.
 87. Bonadonna P, Zanotti R, Müller U. Mastocytosis and insect venom allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2010;10(4):347-53.
 88. González de Olano D, Alvarez-Twose I, Esteban-López MI, et al. Safety and effectiveness of immunotherapy in patients with indolent systemic mastocytosis presenting with Hymenoptera venom anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(2):519-26.
 89. Bonadonna P, Zanotti R, Pagani M, Caruso B, Perbellini O, Colarossi S, et al. How much specific is the association between hymenoptera venom allergy and mastocytosis? *Allergy*. 2009;64:1379-82.
 90. Alvarez-Twose I, Zanotti R, González-de-Olano D, Bonadonna P, Vega A, Matito A, et al. Spanish Network on Mastocytosis (REMA); Italian Network on Mastocytosis (RIMA). Nonaggressive systemic mastocytosis (SM) without skin lesions associated with insect-induced anaphylaxis shows unique features versus other indolent SM. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(2):520-8.
 91. Dobigny C, Saffar JL. H1 and H2 histamine receptors modulate osteoclastic resorption by different pathways: evidence obtained by using receptor antagonists in a rat synchronized resorption model. *J Cell Physiol*. 1997;173(1):10-8.
 92. Bioso-Duplan M, Baroukh B, Dy M, de Vernejoul MC, Saffar JL. Histamine promotes osteoclastogenesis through the differential expression of histamine receptors on osteoclasts and osteoblasts. *Am J Pathol*. 2009;174(4):1426-34.
 93. van der Veer E, van der Goot W, de Monchy JG, Kluin-Nelemans HC, van Doormaal JJ. High prevalence of fractures and osteoporosis in patients with indolent systemic mastocytosis. *Allergy*. 2012;67(3):431-8.
 94. Rossini M, Zanotti R, Bonadonna P, Artuso A, Caruso B, Schena D, et al. Bone Density, Fractures and Bone Turnover markers in patients with Indolent Systemic Mastocytosis. *Bone*. 2011;49(4):880-5.
 95. Barete S, Assous N, de Gennes C, Grandpeix C, Feger F, Palmerini F, et al. Systemic mastocytosis and bone involvement in a cohort of 75 patients. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(10):1838-41.
 96. Reinacher-Schick A, Petrasch S, Longley BJ, Teschendorf C, Graeven U, Schmiegell W. c-Kit mutation and osteopetrosis-like osteopathy in a patient with systemic mast cell disease. *Ann Hematol*. 1998;77(3):131-4.
 97. Kushnir-Sukhov NM, Brittain E, Reynolds JC, Akin C, Metcalfe DD. Elevated tryptase levels are associated with greater bone density in a cohort of patients with mastocytosis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006;139(3):265-70.
 98. Escribano L, Akin C, Castells M, Schwartz LB. Current Options in the Treatment of Mast Cell Mediator-Related Symptoms in Mastocytosis. *Inflammation & Allergy-Drug Targets*. 2006;5(1):61-77.
 99. Bonadonna P, Zanotti R, Caruso B, Castellani L, Perbellini O, Colarossi S, et al. Allergen specific immunotherapy is safe and effective in patients with systemic mastocytosis and Hymenoptera allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(1):256-7.
 100. Siebenhaar F, Akin C, Bindslev-Jensen C, Maurer M, Broesby-Olsen S. Treatment strategies in mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2014;34(2):433-47.
 101. Rossini M, Zanotti R, Viapiana O, Tripi G, Orsolini G, Idolazzi L, et al. Bone involvement and osteoporosis in mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2014;34(2):383-96.
 102. Valent P, Sperr WR, Akin C. How I treat patients with advanced systemic mastocytosis. *Blood*. 2010;116(26):5812-7.
 103. Pardanani A. How I treat patients with indolent and smoldering mastocytosis (rare conditions but difficult to manage). *Blood*. 2013;121(16):3085-94.
 104. Worobec AS. Treatment of systemic mast cell disorders. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2000;14(3):659-87.
 105. Sokol KC, Ghazi A, Kelly BC, Grant JA. Omalizumab as a desensitizing agent and treatment in mastocytosis: a review of the literature and case report. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2014;2(3):266-70.
 106. Graves L 3rd, Stechschulte DJ, Morris DC, Lukert BP. Inhibition of mediator release in systemic mastocytosis is associated with reversal of bone changes. *J Bone Miner Res*. 1990;5(11):1113-9.
 107. Laroche M, Livideanu C, Paul C, Cantagrel A. Interferon alpha and pamidronate in osteoporosis with fracture secondary to mastocytosis. *Am J Med*. 2011;124(8):776-8.
 108. Delaporte E, Pierard E, Wolthers BG, Desreumaux P, Janin A, Cortot A, et al. Interferon-alpha in combination with corticosteroids improves systemic mast cell disease. *Br J Dermatol*. 1995;132(3):479-82.
 109. Hauswirth AW, Simonitsch-Klupp I, Uffmann M, Sperr WR, Lechner K, Valent P. Response to therapy with interferon alpha-2b and prednisolone in aggressive systemic mastocytosis: report of five cases and review of the literature. *Leuk Res*. 2004;28(3):249-257.
 110. Lim KH, Pardanani A, Butterfield JH, Li CY, Tefferi A. Cytorreductive therapy in 108 adults with systemic mastocytosis: Outcome analysis and response prediction during treatment with interferon-alpha, hydroxyurea, imatinib mesylate or 2-chlorodeoxyadenosine. *Am J Hematol*. 2009;84(12):790-794.
 111. Kluin-Nelemans HC, Oldhoff JM, Van Doormaal JJ, Van't Wout JW, Verhoef G, Gerrits WB, et al. Cladribine therapy for systemic mastocytosis. *Blood*. 2003;102(13):4270-6.
 112. Hermine O, Hirsh I, Damaj G, Granpeix C, Barète S, Suarez F, et al. Long Term Efficacy and Safety of Cladribine In Adult Systemic mastocytosis: a French Multi-center Study of 44 Patients. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2010;116:1982.
 113. Purtill D, Cooney J, Sinniah R, Carnley B, Cull G, Augustson B, et al. Dasatinib therapy for systemic mastocytosis: four cases. *Eur J Haematol*. 2008;80(5):456-8.
 114. Verstovsek S, Tefferi A, Cortes J, O'Brien S, Garcia-Manero G, Pardanani A, et al. Phase II study of dasatinib in Philadelphia chromosome-negative acute and chronic myeloid diseases, including systemic mastocytosis. *Clin Cancer Res*. 2008;14(12):3906-15.
 115. Paul C, Sans B, Suarez F, Casassus P, Barete S, Lantermier F, Grandpeix-Guyodo C,

-
- et al. Masitinib for the treatment of systemic and cutaneous mastocytosis with handicap: a phase 2a study. *Am J Hematol.* 2010;85(12):921-5.
116. Gowney JD, Clark JJ, Adelsperger J, Stone R, Fabbro D, Griffin JD, et al. Activation mutations of human c-KIT resistant to imatinib are sensitive to the tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Blood.* 2005;106(2):721-4.
117. Gleixner KV, Mayerhofer M, Aichberger KJ, Derdak S, Sonneck K, Bohm A, et al. PKC412 inhibits in vitro growth of neoplastic human mast cells expressing the D816V-mutated variant of KIT: comparison with AMN107, imatinib, and cladribine (2CdA) and evaluation of cooperative drug effects. *Blood.* 2006;107(2):752-9.
118. Gotlib J, Kluin-Nelemans HC, George TI, Akin, C, Sotlar K, Hermine O, et al. KIT Inhibitor Midostaurin in Patients with Advanced Systemic Mastocytosis: Results of a Planned Interim Analysis of the Global CPKC412D2201 Trial. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2012;120:799.
119. Gotlib J, Kluin-Nelemans HC, George TI, Akin, C, Sotlar K, Hermine O, et al. Durable Responses and Improved Quality Of Life With Midostaurin (PKC412) In Advanced Systemic Mastocytosis (SM): Updated Stage 1 Results of the Global D2201 Trial. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2013;122:106.

Parole Chiave

Mastocitosi, mastociti, mutazioni di KIT

Indirizzi per la corrispondenza

Roberta Zanotti
UO di Ematologia
Dipartimento di Medicina
Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona
P.le L.A. Scuro, 12
37134 Verona VR - Italia
Tel (+39) 045 8124443/4812
Fax. (+39) 045 8027488
E-mail: roberta.zanotti@univr.it

Malattie dei telomeri

Cristina Mecucci, Tamara Iannotti

Ematologia, Università degli Studi di Perugia



Introduzione

Il termine telomeropatie, o sindromi del telomero, deriva dall'osservazione che un'usura delle porzioni telomeriche dei cromosomi costituisce il comune denominatore sottostante manifestazioni cliniche eterogenee di cui risulta capostipite la discheratosi congenita (Tabella 1). La familiarità è un elemento fondamentale da investigare nel sospetto di patologie con coinvolgimento dei telomeri, anche se fenotipi diversi e di variabile complessità si possono rilevare nelle diverse generazioni. Geneticamente è inoltre comune il fenomeno della cosiddetta anticipazione, vale a dire la presentazione clinica in età sempre più precoce, nel succedersi delle generazioni.

Telomeri e telomerasi

I telomeri sono strutture costituite da ripetizioni multiple di una piccola sequenza di DNA, un esamero TTAGGG, che proteggono le estremità cromosomiche dall'erosione dovuta agli enzimi endonucleasi e conferiscono stabilità alle terminazioni medesime e quindi al cromosoma. Il 3' della sequenza telomerica termina con un filamento a singola catena ricco in G (guanina) che viene costretto ad assumere una conformazione specifica, stabilizzata da un complesso proteico costituito da sei proteine, detto complesso delle shelterine (TERF1 e TERF2, TINF2, TPP1, POT1 e RAP1).

Durante la replicazione del DNA si verifica una graduale e continua perdita di 8-12 nucleotidi telomerici per ciclo replicativo (*end replication problem*). Accanto a questa condizione fisiologica, fattori quali età, stress e mutazioni nel complesso telomerasi possono accelerare la progressiva erosione telomerica. Quando i telomeri raggiungono il limite critico d'accorciamento (<5Kb, limite di Hayflick) le cellule subiscono un arresto della proliferazione e vengono inviate verso la senescenza e l'apoptosi, con limitazione nelle potenzialità rigenerative del tessuto interessato, a vantaggio dell'integrità morfo-funzionale. La perdita delle funzioni protettive dei telomeri può portare le cellule a manifestare fenomeni di instabilità genomica con tipiche aberrazioni cromosomiche: duplicazione telomerica su uno o entrambi i cromatidi, fusione fra cromatidi fratelli, fusione termino-terminale,

SINDROME	GENI CANDIDATI	MECCANISMO PATOGENETICO
Discheratosi congenita (DKC)	<i>DCK1</i> <i>TERT</i> <i>TERC</i> <i>NOP10</i> <i>NHP2</i> <i>TINF2</i>	A seconda dei geni coinvolti ci può essere un deficit della corretta localizzazione nucleare, nel funzionamento o nella regolazione del complesso della telomerasi
Anemia aplastica (AA)/ SMD-Hypo	<i>TERT</i> <i>TERC</i>	Telomerasi difettiva a seguito di deficit a carico della trascrittasi inversa o del template ad RNA
Fibrosi polmonare idiopatica (FPI)	<i>TERT</i> <i>TERC</i>	Telomerasi difettiva a seguito di deficit a carico della trascrittasi inversa o del template ad RNA
Cirrosi epatica criptogenetica	<i>TERT</i> <i>TERC</i>	Telomerasi difettiva a seguito di deficit a carico della trascrittasi inversa o del template ad RNA
Hoyeraal-Hreidersson (HHS)	<i>DCK1</i> <i>TERT</i> <i>RTEL1</i> <i>TINF2</i>	Stabilità della struttura telomerica a <i>T-loop</i> e sua corretta destrutturazione durante la replicazione del DNA.
Revesz (RS)	<i>TINF2</i>	Stabilità della struttura telomerica a <i>T-loop</i>
Rothmund-Thomson (RTS)	<i>RECQL4</i>	L'elicasi RECQL4 interagisce con le shelterine TERF1 e 2, in concomitanza con le mutazioni nella RECQL4 aumentano TIFs ai telomeri, rotture e fusioni anomale telomeriche
Coats plus	<i>CTC1</i>	Protezione del telomero mediante il complesso CST (CTC1, STN1 and TEN1). CTC1 interviene nel riavvio della forcella replicativa dalla fase di stallo durante la replicazione del DNA
Anemia di Fanconi (FA)	<i>FANCD2</i>	Risposta al danno del DNA Localizzazione della proteina a livello del nucleo ove prende contatto col DNA telomerico e fattori di regolazione della telomerasi

Tabella 1 – Fenotipi clinici inclusi nella sindrome del telomero.

aneuploidie^(1,2,3). La controffensiva all'erosione è principalmente affidata alla telomerasi, un complesso ribonucleoproteico deputato ad aggiungere gli esanucleotidi TTAGGG ripetuti in tandem (circa un migliaio) a ciascun cromosoma. Il sistema, in questo modo, è in grado di prevenire l'accorciamento eccessivo e la conseguente attivazione delle *pathways* mediate dagli oncosoppressori p53 e Rb.

Il complesso telomerasi è costituito da differenti subunità, ognuna delle quali è codificata da uno specifico gene che dà il suo indispensabile contributo alla perfetta funzionalità del complesso^(4,5) (Figura 1, Tabella 2). L'attivazione e la repressione del complesso telomerasi è un fenomeno tessuto specifico. L'attività telomerasica è assente nelle cellule somatiche, differenziate e post-mitotiche, ed è quindi ristretta a pochi citotipi cellulari normali: cellule germinali, staminali e progenitori cellulari. Il complesso telomerasi (Figura 1) è costituito da 4 proteine di assemblaggio: le discherine (NOP10, GAR1, DKC1, NHP2), la trascrittasi inversa che sintetizza gli esameri (TERT), il templatato che funge da stampo (TERC) a localizzazione nucleolare (corpi del Cajal). In aggiunta è presente una proteina (TCAB1) il cui ruolo è di favorire il passaggio del complesso delle discherine attraverso il nucleolo per il legame con TERC. L'attività del complesso telomerasi caratterizza tutti quei tessuti che necessitano di un rapido rinnovamento cellulare, come midollo osseo e cute. L'enzima è altresì riattivato nell'80% delle neoplasie e ricopre un ruolo fondamentale nell'immortalizzazione cellulare, eludendo i sistemi di controllo del ciclo cellulare e sfuggendo alla morte programmata^(6,7,8). Le shelterine fungono da stabilizzatori dei telomeri con una vera e propria inibizione fisica della telomerasi che si esplica mediante un ripiegamento indietro della parte a singolo filamento 3' del telomero venendo ad insinuarsi nella doppia elica di DNA in una struttura detta a T-loop, inaccessibile a qualsiasi enzima. Le shelterine possono ulteriormente stabilizzare le estremità cromosomiche mediante la costituzione di strutture ad RNA intramolecolari (TERRA)^(9,10). Queste strutture, scoperte più recentemente, sono ben più complesse del loop a T: sono strutture planari che si generano per interazione (legami idrogeno) fra 4 guanine, formando le cosiddette eliche G quadruple.

Queste sono termodinamicamente più stabili e molto più difficili da rompere rispetto al *duplex*, per cui hanno un effetto di stabilità sul telomero^(11,12,13,14,15).

Le alterazioni dei telomeri e dei geni che codificano per le unità della telomerasi e per le shelterine, sono tipiche delle telomeropatie (Tabelle 2 e 3), il cui capostipite è la discheratosi congenita (DKC, OMIM #613989) ad insorgenza precoce. Altre condizioni, a esordio più tardivo e correlate alla discheratosi, includono l'anemia aplastica (AA, OMIM #609135), la fibrosi polmonare idiopatica (FPI, OMIM #178500), la cirrosi epatica criptogenetica, varie patologie del midollo osseo, quali sindromi mielodisplastiche (SMD, OMIM #614286), leucemia mieloide acuta (LAM, OMIM #601626), leucemia linfatica cronica (LLC, OMIM #151400)^(2,4,8,16,17). Tra i fenotipi eterogenei di particolare rilievo clinico vanno anche ricordate l'osteoporosi precoce, ricorrenze di tumori e/o di cardiopatie ischemiche, manifestazioni disimmuni, *lupus-like*. Non di rado i diversi fenotipi possono sovrapporsi, essere concomitanti, oppure presentarsi in sequenza ed è questa la caratteristica clinica che può creare difficoltà diagnostiche.

Discheratosi congenita (DKC)

È una malattia genetica caratterizzata dalle seguenti manifestazioni fenotipiche: distrofia ungueale, iperpigmentazione del collo e del tronco superiore, leucoplachia orale. In molti casi ci possono essere manifestazioni concomitanti come anomalie dentarie e oculari, stenosi esofagea e uretrale, osteopenie. L'anemia aplastica e la fibrosi polmonare idiopatica sono spesso considerate un aggravamento della discheratosi congenita, costituendo la prima causa di morte nei pazienti affetti, ma possono anche costituire l'unica manifestazione clinica⁽⁷⁾. Tale patologia può essere ereditata in modi differenti. Sono conosciute infatti tre forme: DKCX (OMIM #305000) legata al cromosoma X, causata da mutazioni nel gene *DKC1* codificante per una discherina; una forma autosomica dominante DKCA2 (OMIM #127550), dovuta a mutazioni nei geni *TERT* e *TERC* codificanti per la telomerasi e il suo templatato;^(18,19) DKCB1 (OMIM #224230), autosomica recessiva, conseguente a mutazioni nei geni *TINF2*,

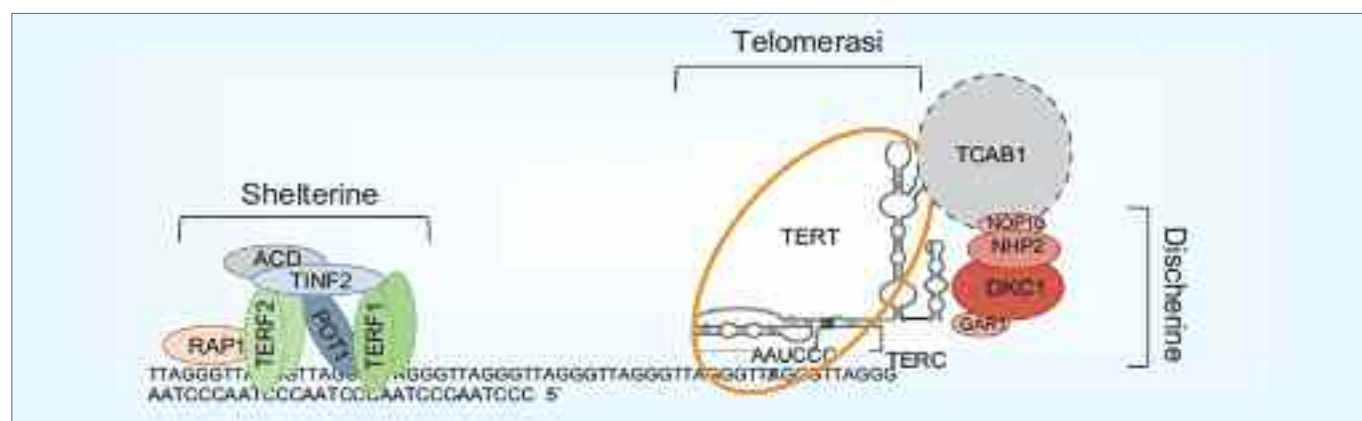


Figura 1 – Rappresentazione schematica del telomero con la struttura a singolo filamento costituita da esameri TTAGGG in tandem. A sinistra il complesso proteico di protezione (shelterine) a destra il complesso della telomerasi composta da 4 subunità proteiche (discherine), dal templatato (TERC) e dalla trascrittasi inversa (TERT). TCAB1 rappresenta la proteina di delocalizzazione dal nucleo al nucleolo.

NOP10, *NHP2* codificanti per le shelterine. A causa del complesso *pattern* di eredità, la penetranza e l'espressività di questa patologia sono altamente variabili. I telomeri sono fortemente ridotti in lunghezza. Tuttavia è noto che le due condizioni genotipiche (mutazioni geniche e telomeri corti) sono necessarie, ma non sempre sufficienti

COMPONENTI	LOCAL. CROMOS.	FUNZIONE
<i>TERT</i>	5p15.33	Trascrittasi inversa
<i>TERC</i>	3q26.2	Templato RNA
<i>NHP2</i> (<i>DKCB2</i>) <i>NOLA2</i>)	5q35.3	Presente nella regione fibrillare del nucleolo e nei corpi del Cajal, è la prima proteina a contattare il templato, di seguito insieme alle altre discherine completano il complesso della telomerasi
<i>GAR1</i> (<i>NOLA1</i>)	4q25	snoRNAs appartenente alle HVACA snoRNPs e alla telomerasi, specifico per la conversione delle uridine in pseudouridine (maturazione rRNA).
<i>NOP10</i> (<i>DKCB1WOLA3</i>)	15q14	Proteina nucleolare che costituisce il complesso della telomerasi
<i>DKC1</i> (<i>NOLA4</i>)	Xq28	Costituisce il complesso della telomerasi e nello specifico è responsabile dei primi step di processamento dell'rRNA
<i>TCAB1</i>	17p13.1	È il fattore di adattamento fra <i>TERT</i> , <i>TERC</i> e le discherine, trasporta l'intero complesso dal nucleo ai corpi del Cajal
<i>TERF1</i>	8q21.11	Coinvolto in un meccanismo a <i>feedback</i> negativo che stabilisce la lunghezza dei telomeri, a tal fine interagisce con DNA telomerico a doppio filamento, con <i>PINX1</i> , <i>TINF2</i> e recluta <i>POT1</i>
<i>TERF2</i>	16q22.1	Inibitore della telomerasi, si lega al DNA telomerico a doppio filamento per limitare l'allungamento dei telomeri. Protegge le estremità cromosomiche facendo sì che queste mantengano la struttura corretta
<i>TINF2</i>	14q12	Mediatore essenziale dell'attività di <i>TERF1</i> , interconnette fra loro i fattori che legano il doppio filamento <i>TERF1-2</i> con quelli che legano il singolo filamento telomerico <i>POT1-ACD</i>
<i>TPP1</i> (<i>ACD</i>)	16q22.1	Si lega al DNA telomerico a singolo filamento interagisce e recluta <i>POT1</i> e <i>TINF2</i> sui telomeri per ultimare l'intero complesso
<i>RAP1</i> (<i>TERF2IP</i>)	16q23.1	Viene reclutata sui telomeri da <i>TERF2</i> , è essenziale per la repressione del sistema di riparazione omologa che andrebbe ad agire sul filamento singolo del DNA telomerico
<i>POT1</i>	7q31.33	Interagisce con <i>TERF1</i> e <i>ACD</i> , si lega al DNA telomerico a singolo filamento per trasmettere informazioni, circa la lunghezza dei telomeri, alle estremità telomeriche ove la telomerasi è regolata

Tabella 2 – Geni, localizzazione cromosomica e funzione delle proteine telomeriche e telomerasiche.

a spiegare le manifestazioni fenotipiche, suggerendo l'intervento di fattori addizionali, verosimilmente epigenetici ^(20,21,22).

Fenotipi ematologici

Sono sintetizzabili in un'insufficienza midollare di grado variabile che si manifesta sotto forma di anemia aplastica o di sindrome mielodisplastica a midollo ipocellulare, entrambe con potenzialità di evoluzione verso leucemia acuta mieloide. È importante notare che, nelle forme familiari, le stigmate ematologiche possono presentarsi come l'unica manifestazione clinica, oppure anche in concomitanza con altri fenotipi clinici come la fibrosi polmonare o una cirrosi criptogenetica. Sebbene sostenuta da mutazioni congenite, l'insufficienza midollare può presentarsi in età adulta, così che le mutazioni nei geni preposti al controllo dei telomeri debbono essere parte integrante di un percorso di diagnosi differenziale nelle insufficienze midollari, non solo nei pazienti pediatrici, ma anche in quelli adulti ^(6,23). Inoltre nelle insufficienze midollari le mutazioni dei geni che codificano per le proteine che legano la telomerasi, per le subunità dell'enzima stesso, o per le proteine telomeriche, in rari casi sono state riportate anche come acquisite ^(4,7,24).

Anemia aplastica (AA) e sindromi mielodisplastiche (SMD)

La diagnosi differenziale tra AA e SMD ipoplastiche (*hypo*-SMD) a tutt'oggi si basa sul numero ed entità delle citopenie del sangue periferico e su criteri convenzionali di valutazione quantitativa della cellularità del midollo osseo ⁽²⁵⁾. Le caratteristiche morfologiche non sempre aiutano a discriminare tra queste due entità, a tal punto che fare diagnosi di AA o di SMD ipoplastica, in assenza di anomalie citogenetiche, può essere quasi impossibile. La diagnosi differenziale è altresì di grande importanza in termini di corretta prognosi e soprattutto trattamento appropriato. L'AA può insorgere a qualsiasi età e di solito è classificata, sulla base dell'eziologia, in forme idiopatiche (75%), congenite (10%) e acquisite (15%) ⁽²⁶⁾. L'esposizione a fattori di rischio, quali farmaci, agenti chimici, virus, possono contribuire alle forme acquisite. Tra le forme congenite, il paradigma è rappresentato dall'anemia di Fanconi. I geni *TERT*, *TERC* e *TINF2* danno ragione di un sottogruppo di AA congenite con significativo accorciamento dei telomeri e con familiarità per telomeropatie. Tutti e tre i geni sono caratteristicamente coinvolti anche nella discheratosi congenita in cui peraltro il fenotipo ematologico può anticipare le manifestazioni cutanee soprattutto nei casi con mutazione eterozigote di *TINF2* ⁽²⁷⁾. Va sottolineato che il riconoscimento dell'origine germinale o somatica di un'eventuale mutazione è molto importante nella diagnosi differenziale delle diverse forme di AA, dal momento che l'accorciamento dei telomeri può essere osservato anche in casi di AA acquisita. D'altra parte la diagnosi differenziale tra AA da interessamento dei geni preposti alla struttura e funzione del telomero e anemie aplastiche da cause im-

munomediate è rilevante per predire la risposta alla terapia immunosoppressiva, dal momento che la prima non risponde all'immunosoppressione ⁽²⁸⁾. I geni *TERT* e *TERC* sono anche associati al fenotipo di SMD ipocellulare acquisita, suggerendo che le mutazioni telomeriche sono il denominatore comune di un'insufficienza midollare con due fenotipi: AA o SMD. L'accorciamento dei telomeri è stato peraltro investigato e dimostrato nelle SMD acquisite ^(29,30,31,32). Inoltre l'accorciamento critico dei telomeri costituisce un fattore di rischio di impatto prognostico per l'evoluzione clonale delle sindromi mielodisplastiche (SMD) e la progressione verso leucemia acuta ^(2,8). Un interessante meccanismo patogenetico dell'accorciamento dei telomeri nelle SMD è derivato dalle dimostrazioni di variazioni del repertoire T-cellulare con conseguente alterazione dell'omeostasi nel compartimento ematopoietico, fornendo alcune chiavi interpretative sui meccanismi cellulari sottostanti l'insufficienza midollare dell'AA e delle *hypo*-SMD ⁽³³⁾.

Altri fenotipi

Fibrosi polmonare idiopatica (FPI)

È un disordine caratterizzato dal progressivo e irreversibile deterioramento del tessuto polmonare che in ultimo provoca grave insufficienza funzionale. Molti casi sono definiti sporadici. Al contrario circa il 20% sembrano essere familiari con una eredità autosomica dominante e una penetranza variabile. Molti fattori ambientali, fra cui l'abitudine al fumo e mutazioni nel gene *TERT*, possono essere implicati come fattori determinanti questo fenotipo. Attraverso numerosi studi di FPI su pedigree di intere famiglie è stato osservato che alcuni membri mostrano caratteristiche cliniche associabili alla DKC o alla AA, cancro, osteopenia o osteoporosi. Tutto ciò è riconducibile ad una telomerasi difettiva.

Pazienti con diagnosi di FPI dovrebbero essere infatti analizzati per le mutazioni germinali dei geni preposti alla stabilità telomerica, in particolare *TERT* e *TERC* ^(34,35,36). Ugualmente pazienti con AA/SMD e un'anamnesi familiare positiva per FPI sono candidati per l'analisi mutazionale dei geni delle proteine telomeriche e telomerasiche.

Cirrosi epatica criptogenetica

Fra le telomeropatie viene annoverata la cirrosi criptogenetica così definita quando la causa di origine non è determinabile ⁽³⁷⁾. Tra le cause genetiche di questo fenotipo epatico, sono presenti mutazioni nei geni *TERT* e *TERC*, bassa attività telomerasica residua e telomeri corti, caratteristiche tutte che si sovrappongono perfettamente al quadro delle sindromi telomeriche. Non di rado si osserva anche che nei pazienti affetti dalle telomeropatie più comuni, come la DKC o l'AA, ci sia un aumento nella frequenza di sviluppo di compromissioni epatiche quali fibrosi e cirrosi. La lunghezza ridotta dei telomeri è stata correlata anche al grado di fibrosi. Gli epatociti di un fegato cirrotico presentano telomeri più corti rispetto agli epatociti di un paziente con epatite e in entrambi i casi i telomeri sono ridotti rispetto a quelli

degli epatociti sani ⁽³⁸⁾. È plausibile che il logoramento dei telomeri giochi un ruolo importante nel *turnover* cellulare conseguente alla rigenerazione degli epatociti ^(39,40,41). In altri termini il meccanismo di instabilità e senescenza indotto dall'accorciamento dei telomeri è comprensibile che determini un fenotipo in un tessuto con costante e attiva rigenerazione cellulare come quello epatico.

Sindrome di Hoyeraal-Hreidersson (HHS)

È una malattia recessiva legata al cromosoma X, considerata una variante grave della DKC. È caratterizzata da ritardo della crescita prenatale, microcefalia, ipoplasia cerebellare, immunodeficienza e AA. La HHS è causata principalmente da mutazioni del gene *DCK1* ma recentemente sono stati caratterizzati altri geni che sembrerebbero intervenire nel fenotipo quali *TERT*, *RTEL1* o *TINF2*. *RTEL1*(20q13.3) codifica per una elicasi indispensabile per la corretta destrutturazione del T-loop telomerico durante la replicazione del DNA ^(42,43,44,45). Pazienti HHS presentano telomeri sorprendentemente corti ^(46,47).

Sindrome di Revesz (RS)

È una sindrome estremamente rara in cui sono associate AA e retinopatia, congiuntamente a distrofia ungueale, ritardo mentale e ipoplasia cerebellare. I malati di Revesz presentano telomeri estremamente corti e genotipicamente le responsabili di tale fenotipo sono mutazioni in eterozigosi del gene *TINF2* ^(43, 44, 48).

Sindrome di Rothmund-Thomson (RTS)

È caratterizzata da anomalie cutanee quali genodermatosi, poichiloderma, distrofia ungueale e ipercheratosi. Possono associarsi anomalie scheletriche, anomalie dentarie, ritardo della crescita, invecchiamento precoce e predisposizione al cancro. La RTS è trasmessa come carattere autosomico recessivo ed è eterogenea dal punto di vista genetico: è dovuta alle mutazioni omozigoti o eterozigoti del gene *RECQL4* (8q24.3) che codifica per una elicasi.

PATOLOGIA	GENI	ESONI/DOMINI	MUTAZIONI
AA/SMD-Hypo	<i>TERT</i>	2-5-7	MISSENSO
	<i>TINF2</i>	6	
	<i>DCK1</i>	/	
	<i>GAR1</i>	2	
	<i>NOP10</i>	/	
	<i>TERC</i>	PSEUDOKNOT / CR4-CR5	DELEZIONI
DKC	<i>TERT</i>	2-5-7	MISSENSO
	<i>TINF2</i>	6	
	<i>DCK1</i>	4-11-12	
	<i>GAR1</i>	2	
	<i>NOP10</i>	2	
	<i>TERC</i>	PSEUDOKNOT	DELEZIONI
HHS/RS	<i>TINF2</i>	6	MISSENSO

Tabella 3 – Mutazioni frequenti nella sindrome del telomero.

In concomitanza con queste mutazioni aumenta l'instabilità genetica, in particolare aumentano la quantità di foci indotti dal danno del DNA telomerico, cosiddetti TIFS (*telomere induced foci*)⁽⁴⁹⁾, rotture e fusioni anormale telomeriche. L'elicasa RECQL4 interagisce con due delle principali shelterine TERF1 e 2⁽⁵⁰⁾.

Sindrome di coats plus

È un fenotipo molto raro caratterizzato da microangiopatia cerebroretinica con calcificazioni e cisti, difetti midollari e gastrointestinali, dovuto principalmente a mutazioni nel gene *CTC1* (17p13.1). Questo gene fa parte del complesso di protezione del telomero CST (*CTC1*, *STN1* e *TEN1*) che ha il compito di interagire con le shelterine e proteggere i telomeri.

CTC1 interviene nel riavvio della forcella replicativa dalla fase di stallo durante la replicazione del DNA. *CTC1* in particolare interviene sul filamento in ritardo, quindi quello complementare al DNA a singolo filamento dei telomeri cui si lega^(51,52). Forse proprio per il fatto che questo gene non interviene direttamente nella sintesi del DNA telomerico ma del filamento opposto, i telomeri nei pazienti affetti non risultano erosi in modo eccessivo pur mostrando le differenze fra i mutati eterozigoti e omozigoti^(53,54).

Anemia di Fanconi (AF)

È senz'altro la forma più nota di AA/SMD su base congenita. Per un corretto inquadramento clinico/genetico si rimanda alla recente revisione di Garaycochea JJ. e Patel KJ⁽⁵⁵⁾. Qui viene citata perché tra

i numerosi geni coinvolti nella patogenesi, il gene *FANCD2* (3p25.3), codifica per una proteina di risposta al danno del DNA che viene reclutata a livello del nucleo e prende contatto con il DNA telomerico, quindi con i regolatori del complesso della telomerasi. In particolare, la shelterina TERF2 recluta ai telomeri una famiglia di nucleasi coinvolte nella riparazione, nominata APOLLO, che a sua volta utilizza come mediatore di risposta *FANCD2*^(56,57). Come atteso nei linfociti di pazienti con AF, *FANCD2* positivi, sono presenti telomeri molto corti⁽⁵⁸⁾.

Conclusioni

In conclusione il ruolo critico dei telomeri e del meccanismo di controllo della loro lunghezza nel mantenimento dell'integrità genomica a livello cellulare dà ragione dell'interessamento di molti organi e tessuti con manifestazioni cliniche eterogenee, che a volte possono essere molto complesse, sì da spiegare il loro raggruppamento nella diagnosi di sindrome del telomero, o telomeropatie. Due i percorsi diagnostici rilevanti: un'anamnesi familiare accurata e l'analisi mutazionale dei geni candidati. In ematologia la diagnosi precisa, oltre a consentire un corretto inquadramento diagnostico in pazienti con AA o SMD ipoplastica, fornisce importanti informazioni sul percorso terapeutico, sia perché l'AA da sindrome del telomero non risponde alla terapia immunosoppressiva⁽²⁸⁾, sia perché l'origine familiare delle mutazioni rende necessaria la sequenza genica dei donatori correlati, nei pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo.

Bibliografia

- Calado RT. Telomeres and marrow failure. ASH Annual Meeting Abstract. 2009;338-43.
- Brugat T, Nguyen-Khac F, Grelier A, Merle-Béral H, Delic J. Telomere dysfunction-induced foci arise with the onset of telomeric deletions and complex chromosomal aberrations in resistant chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2010;116(2):239-49.
- O'Sullivan RJ, Karlseder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(3):171-81.
- Calado RT, Young NS. Telomere diseases. *N Engl J Med*. 2009;361(24):2353-65.
- Young NS. Telomere biology and telomere diseases: implications for practice and research. ASH Annual Meeting Abstracts. 2010:30-5.
- Savage SA and Bertuch AA. The genetics and clinical manifestations of telomere biology disorders. *Genet Med*. 2010;12(7):753-64.
- Armanios M, Blackburn EH. The telomere syndromes. *Nat Rev Genet*. 2012;13(10):693-704.
- Young NS. Bone marrow failure and the new telomere diseases: practice and research. *Hematology*. 2012;17(Suppl 1):S18-21.
- Biffi G, Tannahill D, Balasubramanian S. An intramolecular G-quadruplex structure is required for binding of telomeric repeat-containing RNA to the telomeric protein TRF2. *J Am Chem Soc*. 2012;134(29):11974-6.
- Biffi G, Tannahill D, McCafferty J, Balasubramanian S. Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells. *Nat Chem*. 2013;5(3):182-6.
- Smogorzewska A, de Lange T. Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu. Rev. Biochem*. 2004;73:177-208.
- Cosme-Blanco W, Chang S. Dual roles of telomere dysfunction in initiation and suppression of tumorigenesis. *Exp. Cell Res*. 2008;314(9):1973-79.
- Palm W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu. Rev. Genet*. 2008;42(9):301-334.
- de Lange T. How telomeres solve the end-protection problem. *Science*. 2009;326(5955):948-952.
- Nandakumar J, Cech TR. Finding the end: recruitment of telomerase to telomeres. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(2):69-82.
- Calado RT, Young NS. Telomere maintenance and human bone marrow failure. *Blood*. 2008;111(9):4446-55.
- Kirwan M, Vulliamy T, Marrone A, Walne AJ, Beswick R, Hillmen P, et al. Defining the pathogenic role of telomerase mutations in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Hum Mutat*. 2009; 30(11):1567-73.
- Vulliamy T, Marrone A, Goldman F, Dearlove A, Bessler M, Mason PJ, et al. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature*. 2001;413(6854):432-5.
- Marrone A, Sokhal P, Walne A, Beswick R, Kirwan M, Killick S, et al. Functional characterization of novel telomerase RNA (TERC) mutations in patients with diverse clinical and pathological presentations. *Haematologica*. 2007;92(8):1013-20.
- Armanios M, Chen JL, Chang YP, Brodsky RA, Hawkins A, Griffin CA, et al. Haploinsufficiency of telomerase reverse transcriptase leads to anticipation in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(44):15960-4.
- Du HY, Pumbo E, Manley P, Field JJ, Bayliss SJ, Wilson DB, et al. Complex inheritance pattern of dyskeratosis congenita in two families with 2 different mutations in the telomerase reverse transcriptase gene. *Blood*. 2008;111(3):1128-30.
- Mason PJ, Bessler M. The genetics of dyskeratosis congenita. *Cancer Genet*. 2011;204(12):635-45.
- Yamaguchi H, Calado RT, Ly H, Kajigaya S, Baerlocher GM, Chanock SJ, Lansdorp PM, et al. Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. *N Engl J Med*. 2005;352(14):1413-24.

24. Khincha PP, Savage SA. Genomic characterization of the inherited bone marrow failure syndromes. *Semin Hematol.* 2013;50(4):333-47.
25. Yamazaki H, Nakao S. Border between aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol.* 2013;97(5):558-63.
26. Young NS. The etiology of acquired aplastic anemia. *Rev. Clin. Exp. Hematol.* 2000;4:236-239.
27. Gramatges MM, Bertuch AA. Short telomeres: from dyskeratosis congenita to sporadic aplastic anemia and malignancy. *Transl Res.* 2013;162(6):353-63.
28. Khincha PP, Wentzensen IM, Giri N, Alter BP, Savage SA. Response to androgen therapy in patients with dyskeratosis congenita. *Br J Haematol.* 2014;165(3):349-57.
29. Lange K, Holm L, Vang Nielsen K, Hahn A, Hofmann W, Kreipe H, et al. Telomere shortening and chromosomal instability in myelodysplastic syndromes. *Genes Chromosomes Cancer.* 2010;49(3):260-9.
30. Rollison DE, Epling-Burnette PK, Park JY, Lee JH, Park H, Jonathan K, et al. Telomere length in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma.* 2011;52(8):1528-36.
31. Vajen B, Thomay K, Schlegelberger B. Induction of Chromosomal Instability via Telomere Dysfunction and Epigenetic Alterations in Myeloid Neoplasia. *Cancers (Basel).* 2013;5(3):857-74.
32. Poloni A, Serrani F, Berardinelli E, Maurizi G, Mariani M, Costantini B, et al. Telomere length, c-myc and mad-1 expression could represent prognosis markers of myelodysplastic syndrome. *Leuk Res.* 2013;37(11):1538-44.
33. Yang L, Mailloux A, Rollison DE, Painter JS, Maciejewski J, Paquette RL, et al. Naïve T-cells in myelodysplastic syndrome display intrinsic human telomerase reverse transcriptase (hTERT) deficiency. *Leukemia.* 2013;27(4):897-906.
34. Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, Alder JK, Ingersoll RG, Markin C, et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2007;356(13):1317-26.
35. Parry EM, Alder JK, Qi X, Chen JJ, Armanios M. Syndrome complex of bone marrow failure and pulmonary fibrosis predicts germline defects in telomerase. *Blood.* 2011;117(21):5607-11.
36. Carulli L, Dei Cas A, Nascimbeni F. Synchronous cryptogenic liver cirrhosis and idiopathic pulmonary fibrosis: a clue to telomere involvement. *Hepatology.* 2012;56(5):2001-3.
37. Carulli L, Anzivino C. Telomere and telomerase in chronic liver disease and hepatocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2014;20(20):6287-92.
38. Kitada T, Seki S, Kawakita N, Kuroki T, Monna T. Telomere shortening in chronic liver diseases. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;211(1):33-9.
39. Calado RT, Brudno J, Mehta P, Kovacs JJ, Wu C, Zago MA, et al. Constitutional telomerase mutations are genetic risk factors for cirrhosis. *Hepatology.* 2011;53(5):1600-7.
40. Hartmann D, Srivastava U, Thaler M, Kleinhans KN, N'kontchou G, Scheffold A, et al. Telomerase gene mutations are associated with cirrhosis formation. *Hepatology.* 2011;53(5):1608-17.
41. Chaiteerakij R, Roberts LR. Telomerase mutation: a genetic risk factor for cirrhosis. *Hepatology.* 2011;53(5):1430-2.
42. Savage SA, Giri N, Baerlocher GM, Orr N, Lansdorp PM, Alter BP. TIN2, a component of the shelterin telomere protection complex, is mutated in dyskeratosis congenita. *Am J Hum Genet.* 2008;82(2):501-9.
43. Vulliamy T, Beswick R, Kirwan MJ, Hossain U, Walne AJ, Dokal I. Telomere length measurement can distinguish pathogenic from non-pathogenic variants in the shelterin component, TIN2. *Clin Genet.* 2012;81(1):76-81.
44. Sasa GS, Ribes-Zamora A, Nelson ND, Bertuch AA. Three novel truncating TIN2 mutations causing severe dyskeratosis congenita in early childhood. *Clin Genet.* 2012;81(5):470-8.
45. Ballev BJ, Joseph V, De S, Sarek G, Vannier JB, Stracker T, et al. A recessive founder mutation in regulator of telomere elongation helicase 1, RTEL1, underlies severe immunodeficiency and features of Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. *PLoS Genet.* 2013;9(8):1-10.
46. Walne AJ, Vulliamy T, Kirwan M, Plagnol V, Dokal I. Constitutional mutations in RTEL1 cause severe dyskeratosis congenita. *Am J Hum Genet.* 2013;92(3):448-53.
47. Le Guen T, Jullien L, Touzot F, Schertzer M, Gaillard L, Perderiset M, et al. Human RTEL1 deficiency causes Hoyeraal-Hreidarsson syndrome with short telomeres and genome instability. *Hum Mol Genet.* 2013;22(16):3239-49.
48. Scheinfeld MH, Lui YW, Kolb EA, Engel HM, Gomes WA, Weidenheim KM, et al. The neuroradiological findings in a case of Revesz syndrome. *Pediatr Radiol.* 2007;37(11):1166-70.
49. Sikora E, Arendt T, Bennett M, Narita M. Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing Res Rev.* 2011;10(1):146-52.
50. Ghosh AK, Rossi ML, Singh DK, Dunn C, Ramamoorthy M, Croteau DL, et al. RECQL4, the protein mutated in Rothmund-Thomson syndrome, functions in telomere maintenance. *J Biol Chem.* 2012;287(1):196-209.
51. Anderson BH, Kasher PR, Mayer J, Szykiewicz M, Jenkinson EM, Bhaskar SS, et al. Mutations in CTC1, encoding conserved telomere maintenance component 1, cause Coats plus. *Nat Genet.* 2012;44(3):338-42.
52. Keller RB, Gagne KE, Usmani GN, Asdourian GK, Williams DA, Hofmann I, et al. CTC1 Mutations in a patient with dyskeratosis congenita. *Pediatr Blood Cancer.* 2012;59(2):311-4.
53. Polvi A, Linnankivi T, Kivelä T, Herva R, Keating JP, Mäkitie O, et al. Mutations in CTC1, encoding the CTS telomere maintenance complex component 1, cause cerebrotendinous microangiopathy with calcifications and cysts. *Am J Hum Genet.* 2012;90(3):540-9.
54. Walne AJ, Bhagat T, Kirwan M, Gitiaux C, Desguerre I, Leonard N, et al. Mutations in the telomere capping complex in bone marrow failure and related syndromes. *Haematologica.* 2013;98(3):334-8.
55. Garaycoechea JI, Patel KJ. Why does the bone marrow fail in Fanconi anemia? *Blood.* 2014;123(1):26-34.
56. Chen Y, Yang Y, van Overbeek M, Donigian JR, Baciú P, de Lange T, et al. A shared docking motif in TRF1 and TRF2 used for differential recruitment of telomeric proteins. *Science.* 2008; 319(5866):1092-6.
57. Lyakhovich A, Ramirez MJ, Castellanos A, Castella M, Simons AM, Parvin JD, et al. Fanconi anemia protein FANCD2 inhibits TRF1 polyADP-ribosylation through tankyrase1-dependent manner. *Genome Integr.* 2011;2(1):4.
58. Joksic I, Vujic D, Guc-Scekic M, Leskovic A, Petrovic S, Ojani M, et al. Dysfunctional telomeres in primary cells from Fanconi anemia FANCD2 patients. *Genome Integr.* 2012;3(1):6.

Parole Chiave

Anemia aplastica, sindrome mielodisplastica, telomerasi, telomeri, diagnosi molecolare

Indirizzi per la corrispondenza

Cristina Mecucci

Ematologia, Università di Perugia
Ospedale Universitario S. Maria della Misericordia
06132 Perugia
Tel. 075/ 578 3808
Fax 075/ 578 3691
e-mail: cristina.mecucci@unipg.it

Emofilia e sindromi di von Willebrand acquisite



Augusto B. Federici^{1,2}, Francesco Maura¹, Valentina Rossi²

¹ Scuola di Specializzazione in Ematologia, Dipartimento di Scienze Cliniche e Comunità, Università degli Studi di Milano

² Struttura complessa di Ematologia e Medicina Trasfusionale, Azienda Ospedaliera L. SACCO e Polo Universitario di Milano

Introduzione

La sindrome di von Willebrand acquisita (AVWS) e l'emofilia acquisita (AHA) sono due rare malattie emorragiche dovute a meccanismi acquisiti. L'AVWS si presenta con caratteristiche cliniche e di laboratorio simili alla malattia di von Willebrand ereditaria (VWD) e si manifesta prevalentemente in pazienti affetti da disordini linfoproliferativi, patologie cardiovascolari, neoplasie mieloproliferative e disordini immunologici. Nella maggior parte dei casi (più dell'80%) l'AVWS viene diagnosticata in seguito a complicanze emorragiche. In circa 20-33% dei pazienti affetti da AVWS si verificano episodi emorragici ricorrenti, soprattutto in seguito ad eventi traumatici maggiori o ad interventi chirurgici. AVWS è causata da meccanismi eterogenei, ed è quindi spesso necessario più di un approccio terapeutico per prevenire o trattare un evento emorragico acuto.

L'emofilia acquisita (AHA) è un disordine autoimmune causato dalla presenza di autoanticorpi contro il fattore VIII della coagulazione la cui incidenza aumenta con l'aumentare dell'età. Una diagnosi rapida e accurata è necessaria per poter impostare una terapia corretta che permetta di controllare l'evento emorragico spesso grave.

I concentrati del complesso protrombinico ed il fattore VII attivato sono fondamentali nel trattamento di questi eventi emorragici. È inoltre possibile controllare l'anticorpo inibitore utilizzando farmaci immunosoppressori quali i farmaci steroidei e citotossici; come approccio di seconda linea il rituximab è stato utilizzato con successo in alcuni casi.

Gli inibitori acquisiti dei fattori della coagulazione (AHI) rappresentano una forma relativamente rara tra i difetti acquisiti dell'emostasi, ma dovrebbero essere immediatamente diagnosticati a causa della loro grave tendenza emorragica⁽¹⁾. Questi AHI sono anticorpi circolanti (prevalentemente immunoglobuline) che neutralizzano selettivamente l'attività di diverse proteine emostatiche determinando un quadro di carenza; questi possono svilupparsi nel plasma di soggetti nei quali i processi emostatici sono risultati in precedenza normali. Questi inibitori acquisiti sono definiti come

autoanticorpi a differenza degli inibitori tipo alloanticorpi che si manifestano nei soggetti affetti da carenze congenite di fattori della coagulazione come conseguenza della terapia sostitutiva⁽¹⁾.

L'inibitore più noto è diretto contro il fattore VIII (FVIII) e si manifesta nel 15-30% dei pazienti affetti da emofilia ereditaria (alloanticorpi). La condizione clinica causata da autoanticorpi si chiama emofilia acquisita (AHA)⁽²⁾. Un altro difetto acquisito dell'emostasi che coinvolge il complesso FVIII/fattore von Willebrand (VWF) è noto come sindrome AVWS che va distinta dai difetti ereditari del VWF definiti come malattia di VWD⁽²⁾.

Oltre all'AVWS e all'AHA sono state descritte altre forme di AHI contro Fattore V, VII, IX, X, XI, XII e XIII che tuttavia sono molto rare⁽¹⁾. Il trattamento dei pazienti affetti da AVWS, AHA e altre forme di AHI è difficile e costoso; la consulenza di un ematologo esperto si rende spesso necessaria.

La sindrome AVWS

Definizione ed epidemiologia

L'AVWS è un disordine emorragico acquisito, descritto per la prima volta nel 1968, le cui caratteristiche cliniche e di laboratorio sono simili a quelle che si riscontrano nella malattia di von Willebrand ereditaria⁽³⁾. Questo raro disordine emorragico si manifesta soprattutto in pazienti affetti da disordini linfoproliferativi (DLP), da patologie cardiovascolari (PCV), da neoplasie mieloproliferative (NMP) e da disordini immunologici. Tuttavia anomalie che riguardano il dosaggio, la struttura o la funzione del VWF circolante possono verificarsi anche in altre condizioni cliniche^(4,5). Tra le malattie ematologiche le gammopatie monoclonali di incerto significato (MGUS) e la trombocitemia essenziale (TE) sono considerate tra le più frequenti condizioni associate all'AVWS, ma difetti acquisiti del VWF possono essere riscontrati in molte altre malattie linfoproliferative croniche e acute⁽⁶⁻⁸⁾. Nella maggior parte dei casi l'AVWS viene diagnosticata in seguito a complicanze emorragiche: infatti l'80% dei casi si presenta con un sanguinamento attivo. In circa 20-33% dei pazienti affetti dall'AVWS si verificano episodi emorragici ricorrenti, soprattutto in

seguito ad eventi traumatici maggiori o ad interventi chirurgici ⁽⁴⁾. In considerazione dell'eterogeneità dei meccanismi patogenetici dell'AVWS, l'utilizzo di molteplici approcci terapeutici è spesso necessario per prevenire o trattare gli eventi emorragici acuti. La remissione clinica in alcuni casi di AVWS può essere ottenuta trattando i disordini sottostanti. È stato difficile raccogliere dati sull'AVWS perché anche i grandi centri non hanno a disposizione un numero sufficiente di pazienti per poter valutare in modo completo questo raro disordine emorragico e non esistono studi prospettici. Per questo motivo la prevalenza reale dell'AVWS nella popolazione generale è quindi incerta. Tra il 1998 e il 1999, è stato condotto uno studio retrospettivo che è stato anche pubblicato come comunicazione ufficiale della *Scientific and Standardization Committee* (SSC) della *International Society on Thrombosis and Hemostasis* (ISTH), che fornisce informazioni dei casi inseriti nel registro ISTH-SSC ⁽⁴⁾. Pochi altri casi di AVWS sono stati descritti da singole istituzioni ^(9,10). La prevalenza dell'AVWS è probabilmente sottostimata perché pochi medici ricercano anomalie del VWF in pazienti affetti da malattie ematologiche, cardiovascolari o disordini immunologici. La distribuzione dei disordini associati all'AVWS sta cambiando come descritto da recenti revisioni della letteratura (Figura 1) con un significativo incremento dei casi associati a disordini cardiovascolari ⁽¹¹⁾.

Patogenesi

Rispetto alla malattia di von Willebrand ereditaria, nella maggior parte dei pazienti affetti da AVWS il VWF è sintetizzato in quantità normale o talvolta aumentata. Ridotti livelli plasmatici di VWF pos-

sono derivare da un'accelerata rimozione del VWF dal plasma attraverso tre meccanismi patogenetici principali: a) auto-anticorpi specifici o non-specifici che formano complessi immuni circolanti con VWF (questi complessi vengono eliminati dalle cellule attraverso recettori Fc che legano immunoglobuline IgG); b) assorbimento del VWF da parte di cloni di cellule maligne; c) perdita di multimeri ad alto peso molecolare del VWF (VWF HMW) in condizioni di alto *shear-stress*. Una sintesi di questi meccanismi è mostrata nella Figura 2. Rispetto all'AHA (che è sempre causata da auto-anticorpi contro il FVIII), l'AVWS è caratterizzata da meccanismi patogenetici più eterogenei. Nessuno dei meccanismi patogenetici descritti sembra essere patologia-specifico, lo stesso meccanismo può essere responsabile dell'insorgenza di AVWS in differenti quadri patologici associati alla sindrome. Inoltre in alcuni casi il meccanismo di base resta sconosciuto ⁽⁴⁻¹⁰⁾.

Un altro importante meccanismo, talvolta dimenticato, responsabile di difetti acquisiti del VWF è l'aumentata proteolisi del VWF attraverso proteasi specifiche che degradano il VWF HMW ⁽¹¹⁾.

Test diagnostici

I test utilizzati per diagnosticare l'AVWS sono gli stessi utilizzati per la VWD ereditaria e la diagnosi differenziale può essere talvolta difficile (Tabella 1). Tempo di emorragia e tempo di tromboplastina parziale attivato (APTT) non sono molto utili. FVIII:C, VWF:Ag, VWF:RCo e *collagen-binding activity* (VWF:CB) sono talora ridotti, soprattutto nei disordini linfoproliferativi. Una riduzione del

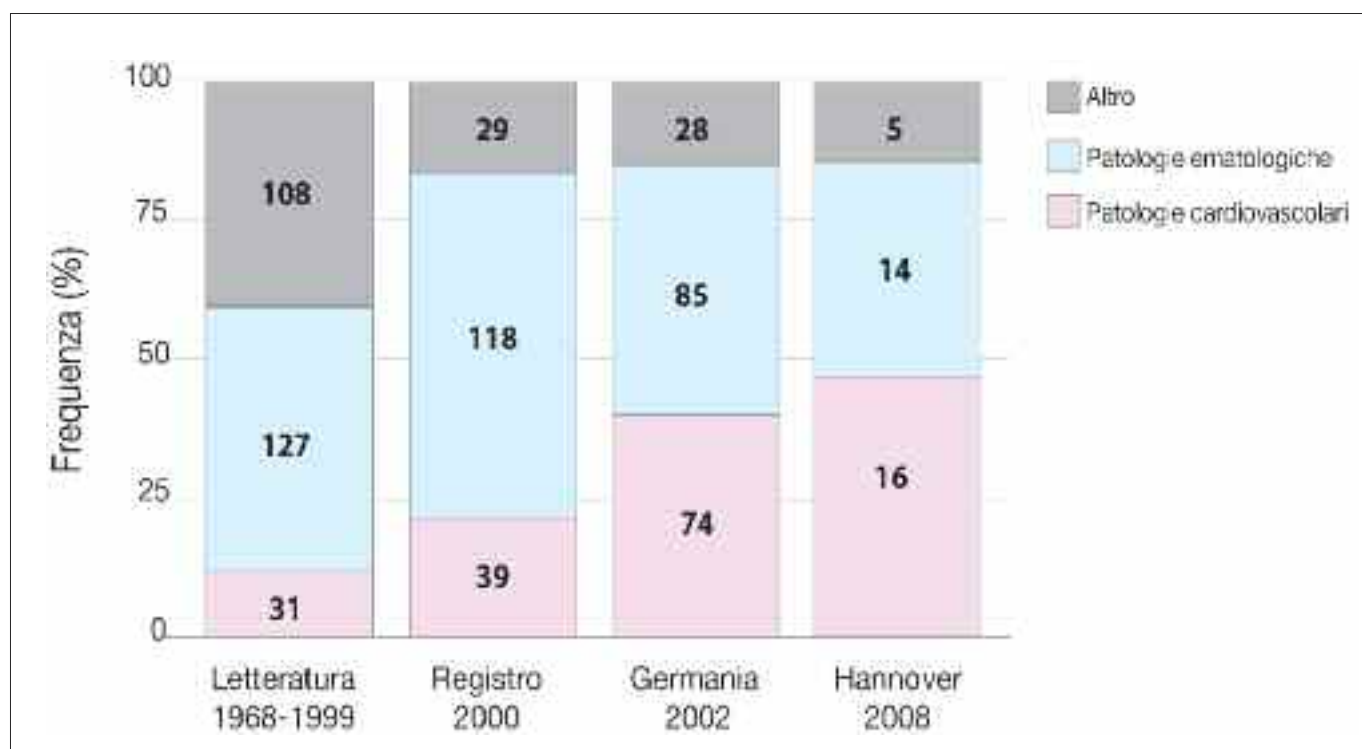


Figura 1 – La distribuzione dei quadri clinici (cardiovascolari, ematologici e altri) associati all'AVWS: da sinistra a destra quelli riportati in letteratura ⁽⁴⁾, del registro ⁽⁴⁾, della Germania ⁽⁹⁾ e del Centro di Hannover ⁽¹⁰⁾. Dal basso verso l'alto di ciascun istogramma sono descritti il numero di casi di AVWS associati a queste 3 condizioni.

rapporto funzione/antigene (VWF:RCo/Ag o VWF:CB/Ag) può indicare un difetto strutturale o funzionale anche se i livelli di attività assoluta rimangono nei limiti di norma.

Una perdita o riduzione dei multimeri di VWF ad alto peso molecolare (VWF-HMW) può essere quantificata utilizzando la densitometria. Tuttavia queste metodiche non sono disponibili in tutti i

laboratori e non sono ancora state standardizzate. Inoltre, variabili legate alle modalità di prelievo possono contribuire alla perdita di multimeri HMW. Una diminuzione di multimeri HMW può talvolta essere osservata in pazienti con VWF:RCo and VWF:CB normali e anche con rapporti VWF:RCo/Ag e VWF:CB/Ag normali ⁽¹¹⁾. La misurazione del VWF pro-peptide (noto in precedenza come

Fattori	Favorevole all'AVWS	Favorevole al VWD	Limitazioni
Anamnesi del paziente	Insorgenza di emorragie tardive	Emorragie prima dei 15 anni	Penetranza variabile della VWD
	Eventi chirurgici non complicati prima dell'insorgenza delle emorragie	Nessun intervento chirurgico senza complicanze o nessuna situazione precedente di alto rischio	
Anamnesi familiare	Negativa	Positiva	Penetranza variabile della VWD
Disordini associati all'AVWS	Presenti	Assenti	Presenza concomitante di malattie ad alta prevalenza, e.g. MGUS negli anziani
Test di laboratorio	Presenza di un inibitore o un anticorpo legante il VWF	Mutazioni sul gene del VWF	Bassa frequenza di casi in cui riscontrare gli inibitori nella AVWS
			Allo-anticorpi in casi rari di VWD di tipo 3
Risposta al trattamento	Remissione dopo il trattamento della malattia sottostante	Normale recupero e emivita dei concentrati di VWF	Non possibile valutarlo prima del trattamento
	Risposta alle IVG (nelle AVWS associate a MGUS-IgG)	Risposta alla desmopressina	
	Breve risposta a concentrati con VWF o alla desmopressina		

Tabella 1 – Diagnosi differenziale tra AVWS e VWD ereditaria ⁽¹¹⁾.

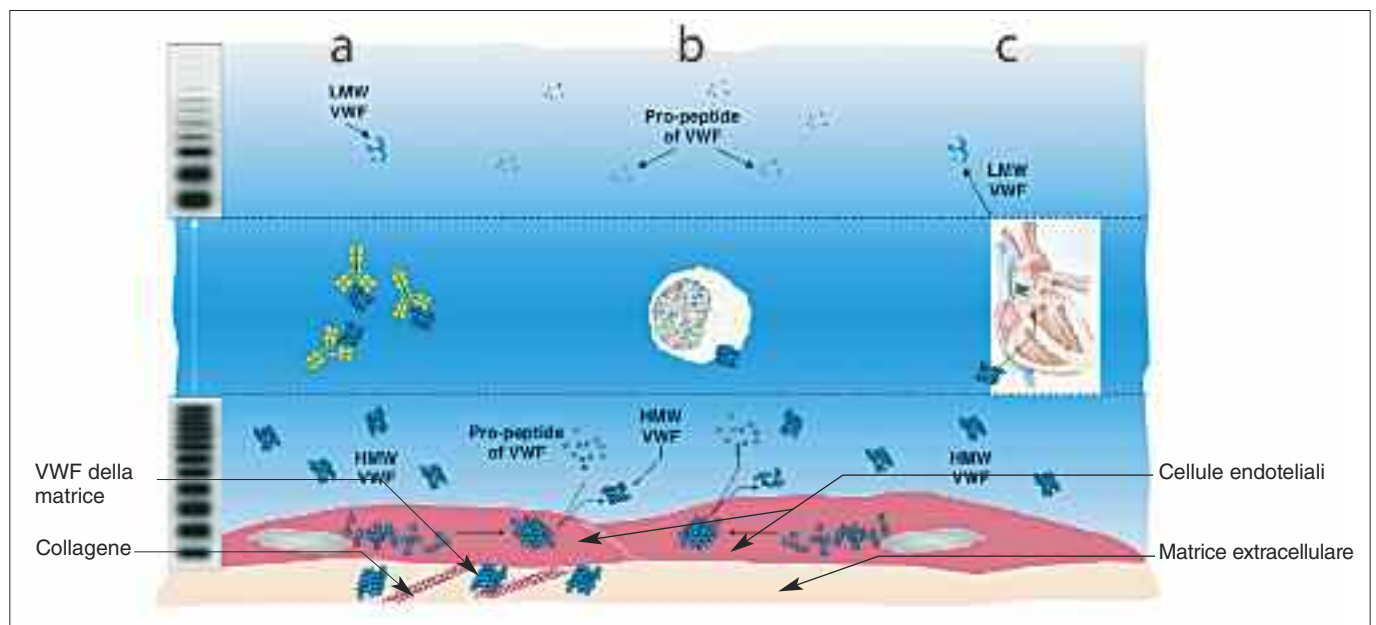


Figura 2 – Rappresentazione grafica dal basso verso l'alto dei principali meccanismi che causano AVWS parzialmente modificati dal precedente report ⁽⁷⁾. Pannello inferiore: la proteina VWF è normalmente sintetizzata e rilasciata dalle cellule endoteliali: multimeri ad alto peso molecolare (HMW) di VWF sono presenti in seguito alla scissione del pro-peptide. Pannello centrale: la normale struttura e funzione del VWF può essere modificata da 3 meccanismi che possono determinare AVWS. Auto-anticorpi specifici e non specifici (a); consumo del VWF da parte di cloni di cellule anomale o maligne (b); perdita dei multimeri HMW VWF in condizioni di elevato stress per anomalie delle valvole cardiache (c). Pannello superiore: gli effetti dei 3 diversi meccanismi dell'AVWS nell'indurre una riduzione delle attività VWF con livelli molto bassi di VWF: la presenza di autoanticorpi (a) e la rimozione preferenziale dei multimeri HMW VWF (b e c).

VWF:Ag II) è stata suggerita per migliorare la diagnosi dell' AVWS in quanto rappresenta un marcatore di biosintesi del VWF. Un aumento del rapporto pro-peptide/VWF:Ag riflette una eliminazione del VWF dal plasma accelerata. Tuttavia lo stesso quadro si verifica in un sottogruppo di pazienti con VWD tipo 1⁽¹³⁾. Quindi il rapporto pro-peptide/VWF:Ag non sempre permette di discriminare tra AVWS e VWD e non può essere raccomandato, al momento, come test di routine⁽¹⁰⁾. Gli autoanticorpi giocano un ruolo nella patogenesi di alcuni casi di AVWS, in particolare di quelli secondari a malattie linfoproliferative. La presenza di auto-anticorpi sembra essere associata ad una tendenza emorragica più grave⁽⁸⁾. In una minoranza di casi gli anticorpi inibitori possono essere identificati in studi *mixing* del VWF:RCo o VWF:CB. A differenza di ciò che si osserva nell'AHA, dove gli anticorpi inibitori del FVIII sono sostanzialmente sempre identificabili con test di laboratorio codificati, la probabilità di identificare l'inibitore nell'AVWS è bassa⁽⁴⁾. Nei pazienti affetti da AVWS, gli autoanticorpi formano complessi circolanti con il VWF, impedendone così l'identificazione a meno che il complesso non venga dissociato col calore o con altri metodi. Anticorpi non neutralizzanti che legano il VWF possono essere identificati attraverso ELISA e sono stati riportati in pazienti affetti da DLP ma anche in altri disordini^[14]; tuttavia non sono ad oggi disponibili test standardizzati per la determinazione di questi anticorpi. Il VWF plasma derivato contiene antigeni del sistema AB0 e non dovrebbe essere utilizzato come antigene in ELISA, poiché la presenza di isoagglutinine potrebbe fornire risultati falsi positivi. Il VWF umano ricombinante espresso da colture cellulari animali è attualmente og-

getto di studio come reagente che potrebbe potenzialmente risolvere questo problema⁽¹¹⁾.

Approcci terapeutici

Esistono due principali situazioni cliniche in cui si dovrebbe sospettare la diagnosi di AVWS: (i) episodi emorragici in pazienti che presentano esami di laboratorio suggestivi di anomalie del VWF; (ii) pazienti che devono essere sottoposti a procedure che li espongono ad un alto rischio di sanguinamento^(4,11). Gli obiettivi principali nel trattamento dell'AVWS sono: il controllo delle emorragie acute, la prevenzione delle emorragie nelle situazioni ad alto rischio e la remissione a lungo termine della AVWS. La strategia da utilizzare per raggiungere questi scopi dipende dal meccanismo patologico alla base della AVWS (Tabella 2).

Quando possibile, il trattamento dovrebbe essere mirato alla rimozione della malattia di base, la cui remissione può risolvere anche l'AVWS. Tuttavia, non è sempre possibile trattare la malattia di base. Le evidenze sull'efficacia e la sicurezza dei vari trattamenti emostatici comunemente usati sono riassunte qui di seguito. La desmopressina (DDAVP), un analogo sintetico della vasopressina, può essere usato per prevenire e controllare l'emorragia in alcuni pazienti con AVWS. DDAVP è generalmente somministrata in dosi di 0,3 microgrammi/kg peso corporeo, per via endovenosa in 30 minuti, una o due volte al giorno. Nell'unico studio clinico prospettico sul trattamento con DDAVP, eseguito in 10 pazienti con MGUS, tutti i soggetti mostravano un miglioramento del livello di VWF 30 minuti dopo il trattamento, anche se dopo 4 ore i livelli di VWF erano vicini ai valori di base⁽⁴⁾. Pertanto VWF:Ag e VWF:RCo, insieme con

Malattia sottostante	Trattamento della malattia sottostante	Opzioni terapeutiche aggiuntive
Malattia autoimmune		
Lupus eritematoso sistemico	Steroidi, ciclofosfamide	IVIG (solo nelle IgG-MGUS o quell anti-VWF IgG), plasmaferesi o immunoadsorbimento, anti-fibrinolitici, concentrati contenenti VWF, rFVIIa
Disordini linfoproliferativi		
MGUS	Generalmente non trattabili	
Linfoma, mieloma multiplo	Chemioterapia secondo la malattia	
Cardiovascolari		
Stenosi della valvola aortica e anomalie che aumentano lo shear-stress	Chirurgia correttiva	Concentrati contenenti VWF, anti-fibrinolitici
Valvola cardiaca disfunzionante, LVAD	Chirurgia correttiva se applicabile	Ridurre o sospendere la terapia anticoagulante, concentrati contenenti VWF
Sindromi mieloproliferative		
Trombocitemia essenziale	Terapia citoreducente, chemioterapia o trapianto di midollo in caso di malattia in progressione	Sospendere aspirina (se possibile), desmopressina, anti-fibrinolitici, concentrati contenenti VWF
Policitemia vera	Flebotomia, terapia citoreducente, chemioterapia o trapianto di midollo in caso di malattia in progressione	
Leucemia mieloide cronica	TK inibitori, trapianto cellule staminali	

Tabella 2 – Approcci terapeutici nell'AVWS tenendo conto della malattia sottostante⁽¹¹⁾.

FVIIIc, devono sempre essere strettamente monitorati quando DDAVP è usata per la profilassi e il trattamento dell'emorragie. Cautele deve essere esercitata durante l'utilizzo di questa terapia in pazienti che hanno disturbi cardiovascolari e/o che sono anziani, ed è necessario attuare stretti monitoraggi per prevenire il sovraccarico di liquidi e iponatriemia, che sono i più comuni effetti avversi del DDAVP. Concentrati di VWF/FVIII possono essere utilizzati per la terapia sostitutiva. Nella pratica clinica, dosi comprese tra 30 e 100 VWF:RCo unità/kg sono consigliate, a seconda dell'attività residua del VWF, della gravità dell'emorragia e della presenza di inibitori. Come per il DDAVP, l'emivita del VWF infuso può essere molto breve nei quadri di AVWS, in particolare in pazienti in cui l'AVWS è associata a MGUS o inibitori ⁽⁴⁾. È necessario un attento monitoraggio della risposta clinica al trattamento, con le misure di attività del VWF, in modo da poter adattare le dosi e gli intervalli di dose. Gammaglobuline per via endovenosa (IVIG) per il trattamento dell'AVWS sono state valutate in uno studio prospettico in pazienti con AVWS associati a MGUS della classe IgG (IgG-MGUS): dosi di 1 grammo/kg di peso corporeo al giorno venivano utilizzati per 2 giorni. Un aumento del VWF e FVIII, e un accorciamento del tempo di emorragia, sono stati osservati il giorno dopo la seconda infusione, raggiungendo livelli massimi dopo 4 giorni e ritornando ai valori basali entro i 21 giorni ⁽⁶⁾. Il trattamento con IVIG non è risultato efficace nei pazienti con AVWS associate a MGUS della classe di immunoglobuline M (IgM MGUS). Dosi ripetute di IVIG ogni 3 settimane sono efficaci per indurre una lunga remissione dall'AVWS, ma dosi più basse (0,5-0,75 mg/kg) non sono sufficienti a correggere questi difetti del VWF ⁽⁶⁾.

Fattore VII ricombinante attivato (rFVIIa) come agente emostatico è stato utilizzato anche in pazienti con AVWS e VWD tipo 3 ereditaria, in particolare in caso di alloanticorpi contro il VWF. rFVIIa è generalmente somministrato alla dose di 90 mg/kg di peso corporeo (range 40-150 mg/kg), per una mediana di 3 dosi (range 1-54). Il trattamento è solitamente efficace, con un tasso di risposte riportate del 96 % dei pazienti. Nei pazienti con emofilia trattati con rFVIIa le complicanze trombo-emboliche sono rare, ma non è chiaro se questo dato è valido anche per i pazienti con AVWS o VWD trattati con questa terapia. Particolare attenzione deve essere esercitata, in particolare nel trattamento di pazienti anziani e/o altri pazienti ad alto rischio trombo-embolico ⁽¹¹⁾.

La plasmateresi può essere utilizzata per ridurre i livelli di autoanticorpi e paraproteine di qualsiasi classe di immunoglobuline, anche se il trattamento è più efficace nel ridurre i livelli di anticorpi IgM. La plasmateresi è stata proposta come terapia standard per i pazienti con AVWS secondaria a MGUS IgM. In caso di impiego di questo trattamento, bisognerebbe utilizzare plasma fresco congelato invece dell'albumina, in modo da prevenire la deplezione di fibrinogeno e di altri fattori della coagulazione. Quando questo trattamento viene

utilizzato per la gestione di emorragie gravi, il ripristino dei livelli di VWF può essere accelerato da un trattamento concomitante con concentrato-VWF o DDAVP ⁽¹¹⁾.

Malattie associate

Le DLP sono presenti in una notevole percentuale di casi con AVWS, sia in letteratura (30%) sia nel Registro di sistema ISTH (48%), come riportato nel Registro internazionale ⁽⁴⁾. Altri disturbi del sistema immunitario come il lupus eritematoso sistemico, malattia caratterizzata da una componente *graft versus host disease* e da aspetti di malattia del tessuto connettivo, sono stati riportati meno frequentemente. Il rischio di emorragie in questi pazienti sembra essere maggiore che nei disturbi cardiovascolari ⁽⁴⁾. Va notato, tuttavia, che l'emorragia può dipendere non soltanto da AVWS. Nei pazienti con malattia di Waldenström o IgM MGUS, per esempio, l'emorragia può anche essere determinata dal danno vascolare dovuto all'iperviscosità.

Gestione delle emergenze emorragiche

DDAVP o i concentrati di VWF provocano un aumento dei livelli di VWF circolante solamente di breve durata. Pertanto, questi trattamenti richiedono un attento monitoraggio e possono a volte essere inefficaci. I pazienti con auto-anticorpi della classe IgG e/o paraproteine di solito rispondono bene alle IVIG. Un miglioramento dei valori di VWF si osserva tipicamente dopo 12-72 ore e dura per diversi giorni o settimane ⁽⁶⁾. Il trattamento con le IVIG è raccomandato per il trattamento di seconda linea nei pazienti che non rispondono alla DDAVP o ai concentrati contenenti VWF. Poiché le IVIG non hanno un'efficacia immediata, l'uso simultaneo di DDAVP o concentrati contenenti VWF può essere necessario nei primi giorni. Pazienti con paraproteine della classe IgM non rispondono alle IVIG ⁽⁴⁾. La plasmateresi combinata alla somministrazione di concentrati contenenti VWF è stata segnalata essere efficace in alcuni casi ⁽¹¹⁾.

Remissione a lungo termine

Il trattamento della malattia sottostante dovrebbe essere sempre valutato quando possibile. Le MGUS di solito non sono trattate nei pazienti asintomatici. Se diventa sintomatica a causa di AVWS, una terapia efficace a lungo termine sarebbe altamente giustificata, ma purtroppo non è stata ancora stabilita. Pertanto, IVIG (per IgG-MGUS) e plasmateresi (per IgM MGUS) rimangono le uniche opzioni terapeutiche in questo momento. Per i pazienti con linfomi a cellule B o mieloma multiplo, la chemioterapia di successo (eventualmente in combinazione con rituximab) può indurre remissioni di AVWS con un tasso di successo globale tra il 35 e il 70%. Steroidi, altri farmaci immunosoppressori, e IVIG (per gli anticorpi leganti VWF-IgG) dovrebbero essere considerati nei disordini autoimmuni, ma sono disponibili solo pochi dati a riguardo ⁽¹¹⁾. Non esistono studi in cui siano stati proposti schemi di trattamento per la rimozione degli anticorpi.

AVWS e neoplasie mieloproliferative

AVWS associati a neoplasie mieloproliferative (NMP) sono primariamente causate dal consumo di VWF da parte delle cellule patologiche circolanti, in particolare piastrine⁽¹⁴⁻¹⁶⁾.

Nella trombocitemia essenziale (TE) e nella policitemia vera (PV) questa problematica è stata riportata, ma queste alterazioni possono verificarsi anche nella leucemia mieloide cronica (LMC), nella mielofibrosi primaria (MF) e talvolta nella leucemia acuta. In uno studio prospettico condotto da Mohri et al.⁽¹¹⁾, l'AVWS è stata diagnosticata in 14 pazienti su 125 consecutivi (11%) con NMP.

Anche se i fattori di rischio di emorragia nei pazienti con NMP non sono stati ancora ben descritti, la maggior parte degli studi hanno concluso che una conta piastrinica molto elevata ($>1.500.000/\mu\text{l}$) è un fattore di rischio significativo di emorragia⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. Infatti, è stata precedentemente riportata una relazione inversa tra la conta piastrinica e il VWF:RCo/Ag o VWF:CB/Ag nei pazienti con NMP⁽¹⁷⁾. Tuttavia, nella serie prospettica da Mohri et al.⁽⁸⁾ la conta piastrinica mediana dei pazienti con NMP e AVWS è risultata essere solo $638.000/\mu\text{l}$ (range 120-1,305.000).

Sembra quindi probabile che ulteriori fattori di rischio, quali i difetti della funzione piastrinica, possano verosimilmente contribuire al sanguinamento. Il rapporto tra conta piastrinica, AVWS, difetti della funzione piastrinica e il rischio di emorragia andrebbe valutato in nuovi studi futuri. Per il momento, secondo le raccomandazioni degli esperti, le emorragie in pazienti con NMP dovrebbero essere sottoposte a screening sia per AVWS che per difetti della funzione piastrinica⁽¹¹⁾.

Trattamento delle emorragie

La terapia citoriduttrice è stata descritta essere capace di indurre la remissione dell'AVWS nei pazienti con NMP e dovrebbe essere presa in considerazione in pazienti con emorragia⁽¹¹⁾. Tuttavia, il trattamento di solito non ha un'efficacia immediata e potrebbero essere richiesti trattamenti aggiuntivi nei pazienti con emorragie attive. In teoria, DDAVP dovrebbe essere il trattamento preferenziale, in quanto il VWF appena rilasciato dalle cellule endoteliali contiene grandi quantità di multimeri ad alto peso molecolare, che risultano essere maggiori di quelli contenuti nei concentrati a base di plasma. Tuttavia, la percentuale di successo riportata nei pazienti con NMP è stato solo del 21%⁽⁴⁾. I concentrati di VWF sono più costosi e non è stato descritto un significativo aumento delle risposte⁽⁴⁾: il trattamento con dosi più elevate (ad esempio 50-80 UI/kg due o tre volte al giorno) talvolta produce migliori risultati. In alternativa, ripetute dosi di rFVIIa possono essere considerate per una grave emorragia refrattaria ad altre modalità di trattamento⁽¹¹⁾.

Prevenzione del rischio trombotico

Vi è consenso sul fatto che i fattori di rischio cardiovascolare dovrebbero essere affrontati. La profilassi primaria con aspirina è general-

mente raccomandata nella PV e nella TE salvo controindicazioni. Le principali controindicazioni sono l'intolleranza e l'emorragia: forse anche la presenza dell'AVWS dovrebbe essere considerata⁽¹¹⁾. Nei pazienti asintomatici con conta piastrinica molto elevata ($>1500.000/\mu\text{l}$), dove l'AVWS sembra essere particolarmente comune, l'introduzione dell'aspirina deve essere rimandata fino a quando la terapia citoriduttrice non ha ridotto la conta piastrinica sotto $1.000/\mu\text{l}$. Se si verificano eventi trombo-embolici in pazienti con AVWS asintomatici, farmaci antitrombotici devono essere somministrati nello stesso modo come nella popolazione generale. Di solito, questo include farmaci anti-piastrinici per eventi arteriosi e anticoagulanti per eventi venosi⁽¹¹⁾.

AVWS associata a malattie cardiovascolari

Il numero di casi con AVWS associati a disturbi cardiovascolari è aumentato nel corso degli ultimi 10 anni in seguito alle osservazioni di vari autori⁽¹⁸⁻²⁴⁾. Valori normali o aumentati di VWF:Ag, VWF:RCo, e VWF:CB sono molto comuni nelle AVWS associate a malattia cardiovascolari⁽¹¹⁾. Pertanto, questi test non possono essere utilizzati per escludere AVWS. I rapporti VWF:RCo/Ag e VWF:CB/Ag possono migliorare la sensibilità, ma è ancora insufficiente per porre la diagnosi in modo corretto in tutti i pazienti. Questo quadro ha una duplice implicazione: in primo luogo, l'analisi dei multimeri è di solito richiesta prima di escludere la diagnosi di AVWS in questo gruppo di pazienti; in secondo luogo, VWF:Ag e VWF:RCo non possono essere utilizzati nella maggior parte dei casi per il monitoraggio durante il trattamento⁽¹¹⁾.

Approcci terapeutici

Il trattamento deve mirare a correggere la disfunzione cardiaca quando possibile. In caso di stenosi della valvola aortica, la sostituzione valvolare determina una remissione di AVWS⁽¹⁹⁾, nonostante alcuni pazienti recidivino, in particolare quelli con disfunzione protesica; per questo motivo bisognerebbe valutare mediante ecocardiografia il possibile malfunzionamento della protesi. DDAVP non ha ottenuto molto successo con tassi di risposta del 10%⁽⁴⁾; inoltre DDAVP può essere controindicato nei pazienti con insufficienza cardiaca congestizia, malattia coronarica o di età avanzata (≥ 65 anni). Le percentuali di risposta ai concentrati contenenti VWF variava tra il 10% e il 70%⁽⁴⁾, riflettendo probabilmente una eterogeneità nei regimi di dosaggio e nelle caratteristiche dei concentrati.

Nei pazienti affetti da AVWS con emorragia grave di solito il trattamento con farmaci antitrombotici dovrebbe essere interrotto: la correzione con farmaci anticoagulanti anti-vitamina K o la terapia anti-piastrinica dovrebbero essere utilizzate in situazioni di emergenza in base alle linee guida pubblicate⁽¹¹⁾. Il rischio trombo-embolico nei pazienti portatori di protesi valvolare aortica meccanica sembra essere abbastanza basso per ridurre o interrompere il trattamento anti-piastrinico o anticoagulante in caso di eventi emorragici.

Tuttavia, questa decisione può essere molto più difficile in situazioni ad alto rischio, e.g. in protesi della valvola mitralica. Fino a che non saranno disponibili linee guida basate sull'evidenza, i rischi concorrenti di emorragia e trombosi devono essere bilanciati con attenzione per ogni singolo paziente, e le differenti esperienze dovrebbero essere raccolte in registri prospettici⁽¹¹⁾.

Emofilia acquisita (AHA)

Definizione ed epidemiologia

L'AHA è un disturbo della coagulazione potenzialmente pericoloso per la vita, determinato dallo sviluppo di auto-anticorpi contro FVIII, che insorge in pazienti con un'anamnesi personale o familiare negativa per emorragie⁽²⁾. La demografia, la presentazione clinica, la gestione degli episodi emorragici, nonché l'eliminazione degli auto-anticorpi con terapie immunitarie sono stati ampiamente studiati nel registro dell'AHA della Comunità Europea (EACH2)⁽²⁵⁻²⁷⁾. L'incidenza di AHA è stata riportata essere tra 1,3 e 1,5/milione/anno con una distribuzione bifasica per età: un piccolo picco tra i 20-40 anni, con maggior prevalenza tra le donne durante il periodo post parto e un picco maggiore nei pazienti di età superiore ai 65 anni con un'incidenza di 14,7/milione/anno nella popolazione con età superiore agli 85 anni. La presentazione clinica dei pazienti con AHA è molto diversa da quella delle forme di emofilia A ereditaria. I pazienti di solito si presentano con emorragie sottocutanee, spesso di grandi dimensioni. Le emorragie a livello dei tessuti molli, come ematomi muscolari, emorragie retroperitoneali ed emorragie intracraniche sono comuni, mentre gli ematomi si vedono meno frequentemente rispetto all'emofilia A congenita. Gli ematomi muscolari possono essere molto importanti e possono essere associati a una rapida e significativa riduzione dei livelli di emoglobina (Figura 3). L'emorragia gastrointestinale è un evento potenzialmente mortale e può verificarsi anche ematuria. In alcuni la diagnosi viene fatta durante un episodio emorragico complicante una procedura invasiva, mentre l'emorragia dopo il parto e quella dopo taglio cesareo sono le tipiche manifestazioni di AHA associata alla gravidanza. Gli epi-



Figura 3 – Tipico esempio di un grande ematoma in un paziente con AHA.

sodi di emorragie sono imprevedibili e possono essere molto gravi: circa l'8% dei pazienti con AHA ha emorragie fatali. Al contrario, circa il 25% di questi pazienti ha emorragie generalmente lievi che non richiedono sempre interventi terapeutici emostatici. Recentemente è stato pubblicato un approccio generale alla gestione dell'AHA⁽²⁸⁾.

Approccio diagnostico

La diagnosi di AHA è spesso ritardata, ma dovrebbe essere sospettata in caso di recente insorgenza di sintomi emorragici e in caso di riscontro di un allungamento del tempo di tromboplastina parziale attivata (PTT). La diagnosi di AHA viene confermata rilevando un livello ridotto di attività del FVIII e la presenza di un inibitore tempo e temperatura dipendente. La cinetica di questo inibitore anti-FVIII (auto-anticorpi) è generalmente diversa (curva cinetica tipo 2) da quella dell'alloanticorpo trovato in un paziente con HA ereditaria (curva cinetica tipo 1). Dopo aver confermato la presenza di un inibitore anti-FVIII, il test Bethesda con modificazione Nijmegen è usato per valutare la titolazione degli inibitori: è molto importante conoscere i livelli di inibitori anti-FVIII perché i pazienti con basso (<5) o alto (>5) titolo di inibitore devono essere gestiti con differenti approcci terapeutici. La presenza di *lupus anticoagulant* (LAC) può imitare un AHA, sebbene in genere il LAC dovrebbe essere differenziato in laboratorio dall'AHA dalla mancata inibizione dell'attività dei fattori della coagulazione dopo un'incubazione prolungata negli studi con miscela: infatti, inibitori *lupus* simili diminuiscono i livelli di tutti i fattori del sistema PTT (cioè FVIII, FIX, FXI nonché FXII), mentre un inibitore specifico diminuisce prevalentemente un unico fattore (FVIII in caso di AHA) per i quali è specifico. Questo è molto importante perché la presenza di inibitori specifici spesso genera false positività al LAC in molti saggi commerciali. Ultimo ma non meno importante, il LAC non è associato allo stesso tipo di sintomi emorragici severi che caratterizza AHA.

Gestione delle emergenze emorragiche

La gestione dei pazienti con AHA è complessa e idealmente dovrebbe essere sempre coordinata da un ematologo esperto con l'aiuto di altri specialisti a seconda della clinica e della sede di emorragia. Il trattamento dell'AHA ha come obiettivi il controllo dell'emorragia in atto, l'eradicazione dell'inibitore per evitare successivi eventi emorragici e il trattamento di qualsiasi patologia causale sottostante. Nessun dato clinico randomizzato è disponibile per guidare un intervento appropriato e quindi la selezione di appropriati approcci terapeutici è stata basata principalmente sul parere degli esperti. Dati recenti del Registro Europeo Emofilia Acquisita (EACH2) sono stati utilizzati per elaborare raccomandazioni per guidare nella scelta del corretto intervento terapeutico nelle fasi iniziali⁽²⁵⁻²⁷⁾. Il trattamento ottimale prevede la protezione

dei pazienti contro eventi traumatici; le procedure invasive non dovrebbero essere intraprese a meno che non sia inevitabile. Le emorragie sono di solito trattate nella fase acuta bypassando il fattore VIII mediante l'utilizzo di agenti come il complesso protrombinico attivato (APCC) o fattore VII attivato ricombinante (rFVIIa): il più diffuso APCC è il *Factor Eight Inhibitor Bypassing Agent* (FEIBA) mentre il più diffuso rFVIIa è il NovoSeven.

La sicurezza e i dati di efficacia del FEIBA e del NovoSeven sono stati derivati dall'HA congenita con allo-anticorpi, ma numerosi *case report* e analisi retrospettive indicano che sia FEIBA e rFVIIa sono sicuri ed efficaci nel controllare gli episodi emorragici nei pazienti AHA. Tuttavia, questi farmaci sono associati ad effetti collaterali potenzialmente fatali, quali infarto del miocardio, coagulazione intravascolare disseminata, trombosi arteriosa e venosa, embolia polmonare e ictus. Concentrati di FVIII ricombinante o derivati dal plasma sono raramente efficaci. Il FVIII derivato dal plasma suino concentrato è stato utilizzato in passato con un certo successo, ma i dati su efficacia e sicurezza sono scarsi. Alcuni pazienti con un titolo basso di inibitore e livelli di FVIII misurabili al basale possono rispondere all'infusione di DDAVP: pertanto tale approccio dovrebbe essere testato. I diversi approcci terapeutici sono riassunti nella Tabella 3.

Eradicazione dell'inibitore

La terapia per l'eradicazione dell'inibitore è necessaria nei pazienti con AHA per ridurre la morbidità e la mortalità in quanto il rischio di eventi emorragici ricorrenti persiste fino a che sono presenti gli inibitori anti-FVIII. Eradicazione dell'auto-anticorpo inibitore con immunosoppressione è indicato quando la diagnosi è confermata e l'emorragia è stata controllata. Steroidi, da soli o in combinazione con agenti citotossici come ciclofosfamide o azatioprina, sono in grado di indurre una remissione in circa il 70% dei pazienti. L'evidenza attuale non giustifica l'uso di immunoglobuline per via endovenosa (IVIG) per sopprimere gli inibitori AHA tranne forse in caso di basse titolazioni autoanticorpali (Tabella 3).

Trattamento	Controllo dell'emorragia	Eradicazione dell'inibitore
1° linea	aPCC o rFVIIa	Steroidi (ciclofosfamide)
2° linea	Bypassare l'agente inibitore alternato sequenziale parallelo protocollo immunoadsorbimento	Rituximab Steroidi Ciclofosfamide Ciclosporina Azatioprina CVP
rFVIIa, fattore VIIa ricombinante; aPCC, complesso protrombinico attivato		

Tabella 3 – Strategie terapeutiche nell'emofilia acquisita A

Conclusioni

AVWS è un disturbo emorragico attualmente sotto-diagnosticato che si verifica in diverse situazioni cliniche. L'approccio diagnostico per AVWS rimane una sfida per il medico a causa della presentazione clinica variabile e dei diversi test che devono essere ottenuti per dimostrare o escludere la diagnosi. La gestione richiede attenzione alla patologia di base e ai meccanismi patogenetici. La ricerca in questo settore è stata limitata da una serie di difficoltà quali la necessità di un *follow-up* prolungato, i molti fattori confondenti e la sempre più documentata eterogeneità clinica e biologica. Considerando la difficoltà ad organizzare studi clinici prospettici in questo piccolo ed eterogeneo gruppo di pazienti, incoraggiamo i medici a segnalare la loro esperienza nella versione aggiornata del registro AVWS promosso dalla ISTH (www.intreavws.com), disponibile entro il 2015.

Per quanto riguarda l'AHA, molte informazioni sono state raccolte dal registro europeo. Tuttavia, i pazienti con AHA sono ancora soggetti a diagnosi errate in ospedali dove i medici non sono spesso in grado di fornire una terapia appropriata durante emorragie mortali. La consultazione immediata con ematologi esperti di emostasi è fortemente raccomandata. È necessario anche ampliare ulteriormente le informazioni sui protocolli corretti di eradicazione, soprattutto per le giovani donne e gli anziani con compromissione delle difese immunologiche.

Bibliografia

- Kessler CM, Acs P, Mariani G. Acquired disorders of coagulation: the immune coagulopathies. In: Hemostasis and Thrombosis: basic principles and clinical practice: Tobert W Colman et al. Editors, 5th Edition, chapter 71:1061-84.
- Collins P, Budde U, Rand JH, Federici AB, Kessler CM. Epidemiology and general guidelines of the management of acquired haemophilia and von Willebrand syndrome. *Haemophilia* 2008;14(3):49-55.
- Simone JV, Cornet JA, Abilgaard CF. Acquired von Willebrand Syndrome in Systemic Lupus Erythematosus. *Blood* 1968;31(6):806-12.
- Federici AB, Rand JH, Bucciarelli P, Budde U, van Genderen PJ, Mohri H, et al. Acquired von Willebrand syndrome: Data from an international registry. *Thromb Haemost* 2000;84(2):345-349.
- Veyradier A, Jenkins CS, Fressinaud E, Meyer D. Acquired von Willebrand syndrome: from pathophysiology to management. *Thromb Haemost*. 2000;84(2):175-182.
- Federici AB, Stabile F, Castaman G, Canciani MT, Mannucci PM. Treatment of acquired von Willebrand syndrome in patients with monoclonal gammopathy of uncertain significance: comparison of three different therapeutic approaches. *Blood* 1998;92(8):2707-2711.
- Federici AB. Acquired von Willebrand syndrome: an underdiagnosed and misdiagnosed bleeding complication in patients with lymphoproliferative and myeloproliferative disorders. *Semin Hematol*. 2006;43(S1):S48-58.
- Mohri H, Motomura S, Kanamori H, Matsuzaki M, Watanabe S, Maruta A, et al. Clinical significance of inhibitors in acquired von Willebrand syndrome. *Blood*. 1998;91(10):3623-3629.
- Budde U, Bergmann F, Michiesl JJ. Acquired von Willebrand Syndrome: experience from 2 years in a single laboratory compared with data from the literature and an international registry. *Semin Thromb Haemost* 2002;28(2):227-38.

10. Tiede A, Priesack J, Werwitzke S, Bohlmann K, Oortwijn B, Lenting P et al. Diagnostic workup of patients with acquired von Willebrand syndrome: a retrospective single-centre cohort study. *J Thromb Haemost*. 2008;6(4):569-576.
11. Tiede A, Rand JH, Budde U, Ganer A, Federici AB. How I treat the acquired von Willebrand syndrome. *Blood*. 2011;117(25):6777-85.
12. Federici AB, Berkowitz SD, Lattuada A, Mannucci PM. Degradation of von Willebrand factor in patients with acquired clinical conditions in which there is heightened proteolysis. *Blood*. 1993;81(3):720-725.
13. Haberichter SL, Castaman G, Budde U, Peake I, Goodeve A, Rodeghiero F, et al. Identification of type 1 von Willebrand disease patients with reduced von Willebrand factor survival by assay of the VWF propeptide in the European study: molecular and clinical markers for the diagnosis and management of type 1 VWD (MCMDM-1VWD). *Blood*. 2008;111(10):4979-498.
14. Siaka C, Rugeri L, Caron C, Goudemand J. A new ELISA assay for diagnosis of acquired von Willebrand syndrome. *Haemophilia*. 2003;9(3):303-308.
15. Budde U, Schaefer G, Mueller N, et al. Acquired von Willebrand's disease in the myeloproliferative syndrome. *Blood*. 1984;64(5):981-985.
16. Budde U, Scharf RE, Franke P, Hartmann-Budde K, Dent J, Ruggeri ZM, et al. Elevated platelet count as a cause of abnormal von Willebrand factor multimer distribution in plasma. *Blood*. 1993;82(6):1749-1757.
17. Budde U, van Genderen PJ. Acquired von Willebrand disease in patients with high platelet counts. *Semin Thromb Hemost*. 1997;23(5):425-431.
18. Warkentin TE, Moore JC, Anand SS, Lonn EM, Morgan DG. Gastrointestinal bleeding, angiodysplasia, cardiovascular disease, and acquired von Willebrand syndrome. *Transfus Med Rev*. 2003;17(4):272-286.
19. Vincentelli A, Susen S, Le Tourneau T, Six I, Fabre O, Juthier F, et al. Acquired von Willebrand syndrome in aortic stenosis. *N Engl J Med*. 2003;349(4):343-349.
20. Uriel N, Pak SW, Jorde UP, Jude B, Susen S, Vincentelli A et al. Acquired von Willebrand syndrome after continuous-flow mechanical device support contributes to a high prevalence of bleeding during long-term support and at the time of transplantation. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56(15):1207-13.
21. Tsai HM, Sussman II, Nagel RL. Shear stress enhances the proteolysis of von Willebrand factor in normal plasma. *Blood*. 1994;83(8):2171-2179.
22. Wu T, Lin J, Cruz MA, Dong JF, Zhu C. Force-induced cleavage of single VWF A1A2A3 tridomains by ADAMTS-13. *Blood*. 2010;115(2):370-378.
23. Yoshida K, Tobe S, Kawata M, Yamaguchi M. Acquired and reversible von Willebrand disease with high shear stress aortic valve stenosis. *Ann Thorac Surg*. 2006;81(2):490-494.
24. Geisen U, Heilmann C, Beyersdorf F, et al. Non-surgical bleeding in patients with ventricular assist devices could be explained by acquired von Willebrand disease. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008;33(4):679-684.
25. Geisen U1, Heilmann C, Beyersdorf F, Benk C, Berchtold-Herz M, Schlensak C et al. Demographic and clinical data in acquired hemophilia A: results from the European Acquired Haemophilia Registry (EACH2). *J. Thromb Haemost* 2011;10(4):622-31.
26. Baudo F, Collins P, Huth-Kühne A, Lévesque H, Marco P, Nemes L, et al. Management of bleeding in acquired hemophilia A: results from the European Acquired Haemophilia Registry (EACH2). *Blood* 2012;120(1):39-46.
27. Collins P, Baudo F, Knoebl P, Lévesque H, Nemes L, Pellegrini F, et al. Immunosuppression for acquired hemophilia A: results from the European Acquired Haemophilia Registry (EACH2). *Blood* 2012;120(1):47-55.
28. Sborov DW, Rodgers GM. How I manage patients with acquired haemophilia A. *Br. J. Haematol* 2013;161(2):157-165.

Parole Chiave

Sindrome di von Willebrand acquisita, inibitori acquisiti dell'emostasi, emofilia acquisita, fattore di von Willebrand, fattore VIII, malattie linfo-mieloproliferative, cardiovascolari ed immunologiche.

Indirizzi per la corrispondenza

Augusto B. Federici

Struttura Complessa di Ematologia e Medicina Trasfusionale,
Ospedale L. SACCO e Polo Universitario
Dipartimento di Scienze Cliniche e Comunità
Università degli Studi di Milano
Via GB Grassi 74, 20154 Milano.
Tel (+39) 02 50319895
Fax (+39) 02 50319897
E-mail: augusto.federici@unimi.it

ESSERCI.

I momenti di ogni giorno fanno una vita. Celgene sviluppa terapie contro il mieloma multiplo da somministrare a casa. Per avere anche il tempo di vivere.

celgene.com

Improving the lives of patients worldwide.



Linfoistiocitosi emofagocitica



Maria Ciccone, Antonio Cuneo

Azienda Ospedaliero-Universitaria Arcispedale Sant'Anna, Sezione di Ematologia, Ferrara

Introduzione

La linfoistiocitosi emofagocitica (HLH) rappresenta un disordine raro ma frequentemente fatale caratterizzato da una risposta immunologica esuberante ed inefficace. Nel 1952 Farquhar e Claireaux descrissero, in un neonato di 9 settimane, una rara sindrome che definirono reticolosi familiare emofagocitica per l'osservazione su materiale autoptico di una spiccata proliferazione di istiociti e di macrofagi nei tessuti solidi e nel midollo osseo ⁽¹⁾. Da allora studi sperimentali e clinici hanno contribuito a chiarire gran parte dei meccanismi patogenetici dell'HLH e ad individuare strategie terapeutiche efficaci. Tuttavia, essa costituisce ancora un disordine misconosciuto associato, specie se non trattato tempestivamente, a mortalità elevata.

Epidemiologia e classificazione

In Svezia l'incidenza della HLH è stimata attorno a 1,2 casi per anno per milione di abitanti con età inferiore ai 15 anni oppure 1 ogni 50.000 nati vivi, ma probabilmente essa eccede questa stima a causa della natura rapidamente evolutiva che in alcuni casi porta all'*exitus* in assenza di una diagnosi definitiva ⁽²⁾. Uno studio retrospettivo recente ha stimato una prevalenza di HLH in Texas di 1 ogni 100.000 persone con età inferiore ai 18 anni ⁽³⁾. Inoltre, l'incidenza della HLH è influenzata dalla zona geografica ^(4,5) ed è stato descritto anche un andamento stagionale. L'HLH è solitamente classificata su criterio eziologico in genetica e acquisita ⁽⁶⁾. Invece, la distinzione fra forme primarie e secondarie è difficilmente applicabile dal momento che: i) le forme genetiche possono manifestarsi in occasione di stimoli esogeni, solitamente virali; ii) nella HLH secondaria sono inclusi quei casi in cui pur essendoci il sospetto di una base genetica, non vi è prova della presenza del difetto genico o di una storia familiare; iii) nuove evidenze scientifiche confermano che un numero crescente di pazienti diagnosticati come HLH secondaria potrebbero rappresentare casi di eterozigosi a carico dei geni associati all'HLH familiare oppure portatori di polimorfismi "svantaggiosi"; infine, iv) i difetti genetici tipici della HLH possono manifestarsi, seppure raramente,

in età adulta ^(7,8). Ad ulteriore conferma della difficoltà a distinguere chiaramente le forme secondarie da quelle primarie, vi sono studi sperimentali in modelli murini che hanno provato che anche nelle forme genetiche è necessaria la presenza di un insulto esogeno, solitamente virale, perché la malattia si manifesti. L'HLH genetica si distingue a sua volta in familiare (FHLH), in cui l'HLH costituisce l'unica manifestazione clinica, e in una forma associata ad altri difetti genetici, solitamente rappresentati da sindrome da immunodeficienza primaria (sindrome linfoproliferativa X-linked di tipo 1 e 2 o XLP1 e 2, la sindrome di Griscelli di tipo 2, la malattia di Chediak-Higashi e la sindrome di Hermansky-Pudlak2) (Tabella 1). Nel 70-80% dei casi l'HLH familiare esordisce entro il primo anno di vita, più raramente in epoca neonatale (o addirittura intrauterina) o adulta ^(2,8,9). La forma genetica è solitamente autosomica recessiva fatta eccezione per l'HLH associata alla XLP che è invece X-linked. In una indagine condotta in Nord America, la distribuzione di ciascuna delle anomalie genetiche responsabili della HLH genetica differisce a seconda della fascia di età e della etnia: le mutazioni a carico di PRF1 sono le più frequenti nel primo anno di vita e negli afro-americani mentre nella popolazione caucasica prevale la mutazione di UNC13D ⁽¹⁰⁾. Le forme acquisite sono più comuni in età adulta e la loro incidenza è strettamente correlata a quella del disordine primitivo a cui si associano. Le infezioni (specie da EBV), le malattie autoimmuni, le neoplasie solide, i linfomi, il trapianto d'organo o di midollo osseo, gli stati di immunodeficienza acquisita, le malattie metaboliche costituiscono le cause più comuni di HLH secondaria. Tra i linfomi e le leucemie, prevalgono le forme T-cellulari e gli Hodgkin, probabilmente per la loro associazione frequente con l'infezione da EBV ⁽¹¹⁻¹³⁾. Infine, la HLH può scaturire dalla somministrazione di farmaci immunomodulanti. Recentemente è stato osservato che in pazienti con leucemia o linfoma, l'infusione di blinatumumab, un anticorpo monoclonale bi-specifico (BiTE, *bispecific T-cell receptor engaging*) che induce la morte delle cellule B leucemiche "aggangiandole" ai linfociti T attivati, determina il rilascio di abbondanti quantità di citochine che producono un quadro clinico sovrapponibile alla HLH ⁽¹⁴⁾.

Patogenesi

L'HLH è determinata da una inefficace ed inappropriata funzione citotossica dei linfociti T e delle cellule *natural killer* (NK) in conseguenza di un difetto genetico o acquisito a carico di una delle proteine coinvolte nel processo di citolisi perforina-mediato. In presenza di stimoli adeguati, i linfociti T citotossici (*Cytotoxic T-cell Lymphocyte*, CTL) o le cellule NK rilasciano vescicole secretorie contenenti granuli di perforina e granzyme B attraverso un processo di esocitosi. La perforina contribuisce alla formazione di pori nella membrana plasmatica delle cellule-bersaglio attraverso i quali il granzyme B raggiunge il citoplasma attivando la pro-caspasi in caspasi ed inducendo la morte della cellula per apoptosi (Figura 1) ⁽¹⁵⁾.

Nelle forme primarie di HLH il difetto genetico può determinare alterazioni del *trafficking*, dell'ancoraggio o del rilascio delle vescicole contenenti perforina e granzyme B o in alternativa un difetto della funzione stessa della perforina (Tabella 1).

Le mutazioni a carico dei geni associati ad HLH possono essere del tipo *stop-codon* oppure missense o mutazioni associate ai siti di *splicing*: le prime prevalgono in età precoce mentre le altre sono più comuni in età adulta ⁽¹⁶⁾. Il tipo di difetto genetico e della funzione citotossica che il corrispondente gene ricopre, influisce sul tempo di insorgenza del quadro clinico e sulla sua severità ⁽¹⁷⁾.

La scoperta del ruolo cruciale della perforina ha permesso la creazione di modelli murini di HLH in cui si è potuto studiare l'effetto che il deficit della sua funzione provoca nei topi sottoposti ad insulti virali. Utilizzando i modelli murini è stato confermato che la cosiddetta tempesta di citochine tipica della HLH scaturisce essenzialmente dall'attivazione tossica di linfociti T e dal conseguente rilascio di interferon gamma (IFN- γ) ⁽¹⁸⁾. Tuttavia, alla tempesta citochinica contribuisce anche l'attivazione del sistema immunitario innato non

antigene specifico attraverso, ad esempio, i *toll-like receptors* (TLR) espressi a livello macrofagico. Il contributo dei macrofagi alla inappropriata risposta immune della HLH si basa non solo sul dato morfologico della eritrofagocitosi, ma anche su dati sperimentali. Infatti, è stato dimostrato recentemente che nel modello murino UNC13D^{j^{inx}/j^{inx}} il silenziamento della funzione del gene *MyD88*, che codifica per una proteina coinvolta nella trasduzione dei TLR, blocca l'esuberante attivazione macrofagica e l'espansione di linfociti T CD8+ ⁽¹⁹⁾. Infine, attraverso il rilascio di IFN- γ , i CTL contribuiscono ad indurre l'endocitosi macrofagica e di conseguenza l'emo-fagocitosi ⁽²⁰⁾.

L'attivazione macrofagica e la risposta citochinica da parte di CTL e cellule NK rappresentano, dunque, i due eventi cruciali nella patogenesi della HLH.

Aspetti clinici e diagnostici

Quadro clinico

Il quadro clinico della HLH è determinato da tre eventi patogenetici:

- 1) attivazione dei linfociti T CD8+ e dei macrofagi
- 2) proliferazione e infiltrazione tissutale delle stesse cellule
- 3) ipercitochinemia

Le manifestazioni cliniche pressoché sempre presenti sono la febbre, l'epatosplenomegalia, la pancitopenia con il conseguente sanguinamento e l'anemia, la coagulopatia emorragica ed, infine, l'insufficienza multiorgano. Il quadro clinico è reso a volte ancor più complicato dalla presenza della causa primitiva (malattie autoimmuni, linfomi o leucemie, tumori solidi, infezioni etc).

In alcuni casi e specie all'esordio di malattia, la febbre, tipicamente persistente e maggiore di 38,5 °C, è inquadrata come febbre di origine sconosciuta (FUO) ⁽²¹⁾. L'insufficienza epatica è in genere con-

Sottotipo HLH	Gene/proteina	Funzione	Locus
FHL1	Sconosciuto		
FHL2	PRF1/perforina	Formazione dei pori	10q21-22
FHL3	UNC13D/Munc 13-4	Esocitosi dei granuli citolitici	17q25
FHL4	STX11/sintassina 11	Trafficking vescicolare intracellulare	6q24
FHL5	STXB2/syntaxin binding protein 2	Trafficking vescicolare intracellulare	19p13
Sindrome di Griscelli tipo 2	RAB27A/Rab27a	Ancoraggio delle vescicole ai microtubuli	15q21
Sindrome di Chédiak-Higashi	LYST	Formazione e <i>sorting</i> delle vescicole	1q42.1-q42.2
Sindrome di Hermansky-Pudlak di tipo 2	AP3B1	Formazione e trasporto delle vescicole	5q14.1
XLP di tipo 1	SH2D2/SAIP	Polarizzazione dei granuli citolitici verso la sinapsi immunologica	Xp25
XLP di tipo 2	BIRC4/XIAP	Sconosciuto	Xp25

Tabella 1 – Alterazioni genetiche in corso di HLH ereditaria.

seguenza di epatite infiltrativa ed è spesso presente già dalle prime settimane di malattia ⁽²¹⁾. Non è raro il riscontro di idrope fetale e di ittero (nel neonato) e di malattia veno-occlusiva specie nelle forme secondarie a trapianto di midollo osseo. L'insufficienza epatica, la coagulazione intravascolare disseminata (CID) e la piastrinopenia contribuiscono alla diatesi emorragica che è tipica dei pazienti con HLH e che può essere rapidamente evolutiva ed esitare in eventi fatali. La citopenia rappresenta anche essa una manifestazione clinica tipica della HLH, specie in fase tardiva quando la quasi totalità dei pazienti ne risulta affetto. L'anemia è causata essenzialmente dall'aumentata eritrocateresi macrofagica che può produrre una risposta midollare compensatoria, cioè una maggiore differenziazione in senso eritroide delle cellule staminali midollari, come confermato da studi di profili di espressione genica nel midollo di pazienti affetti da HLH e da sindrome da attivazione macrofagica (MAS) ^(22,23). Questa ultima condizione è solitamente considerata una variante di HLH di cui condivide alcuni aspetti immunologici e genetici ma si associa tipicamente a malattie autoimmuni come l'artrite idiopatica giovanile o il lupus sistemico eritematoso ^(24,25). I pazienti con HLH possono manifestare nel corso della malattia anche alterazioni cutanee, polmonari e cerebrali. Le lesioni cutanee possono essere estremamente diverse a seconda dei casi, potendo variare da un *rash* diffuso sino a quadri di pannicolite o eritrodermia diffusa ^(2,9). In alcuni pazienti, la presenza di *rash* orticarioide associato a congiuntivite, eritema labiale e linfadenomalgie laterocervicali può ricordare la malattia di Kawasaki ⁽²⁶⁾. Tuttavia, a differenza dei casi tipici di malattia di Kawasaki, questi pazienti non rispondono al trattamento con immunoglobuline (Ig) in vena o ricadono rapidamente dopo un iniziale beneficio.

L'interessamento polmonare si associa al riscontro radiologico di im-

pegno interstiziale ed alveolare e può portare a quadri di insufficienza respiratoria severa che risultano fatali nella quasi totalità dei casi.

La comparsa di sindrome respiratoria acuta è generalmente un segno di inadeguato controllo della malattia ⁽²⁷⁾. Il sistema nervoso centrale (SNC) e periferico (SNP) risultano coinvolti in più di un terzo dei pazienti. I sintomi neurologici comprendono episodi critici, menin-gismo, stato confusionale, atassia, facile irritabilità, ritardo psicomotorio, ipotonia, paralisi di uno o più nervi cranici ⁽²⁸⁾. Casi di encefalopatia posteriore reversibile sono stati segnalati durante la terapia di induzione ed il rischio sembra associato all'uso di ciclosporina (CSA) e ad ipertensione arteriosa ^(29,30).

Specie in età pediatrica, sono stati descritti casi di emorragia retinica, edema del nervo ottico ed infiltrazione della coroide ⁽³¹⁾. La possibile demielinizzazione dei nervi periferici ad opera dei macrofagi è responsabile dell'eventuale insorgenza di neuropatia periferica multi-distrettuale, debolezza muscolare e dolore ^(32,33). Il quadro clinico dei pazienti con HLH è, dunque, complesso e solitamente severo ed in assenza di anamnesi familiare positiva, può essere confuso, specie all'esordio, con altri disordini a genesi infiammatoria e/o infettiva.

Criteri diagnostici

Dal momento che i test molecolari, che consentirebbero di fare diagnosi di certezza, sono indagini con tempi di esecuzione lunghi e non diffusamente disponibili e dal momento che non sono ancora note tutte le mutazioni genetiche associate ad HLH, nel corso degli ultimi decenni si è cercato di definire i criteri diagnostici di HLH in modo che fosse possibile stabilirne la diagnosi sulla sola scorta dei dati anamnestici, clinici, laboratoristici ed immunopatologici.

Nel 1994, dunque, con l'avvio del primo studio prospettico multicentrico, denominato HLH-94, sono stati applicati per la prima volta sei criteri per stabilire la diagnosi di HLH e dunque l'eleggibi-

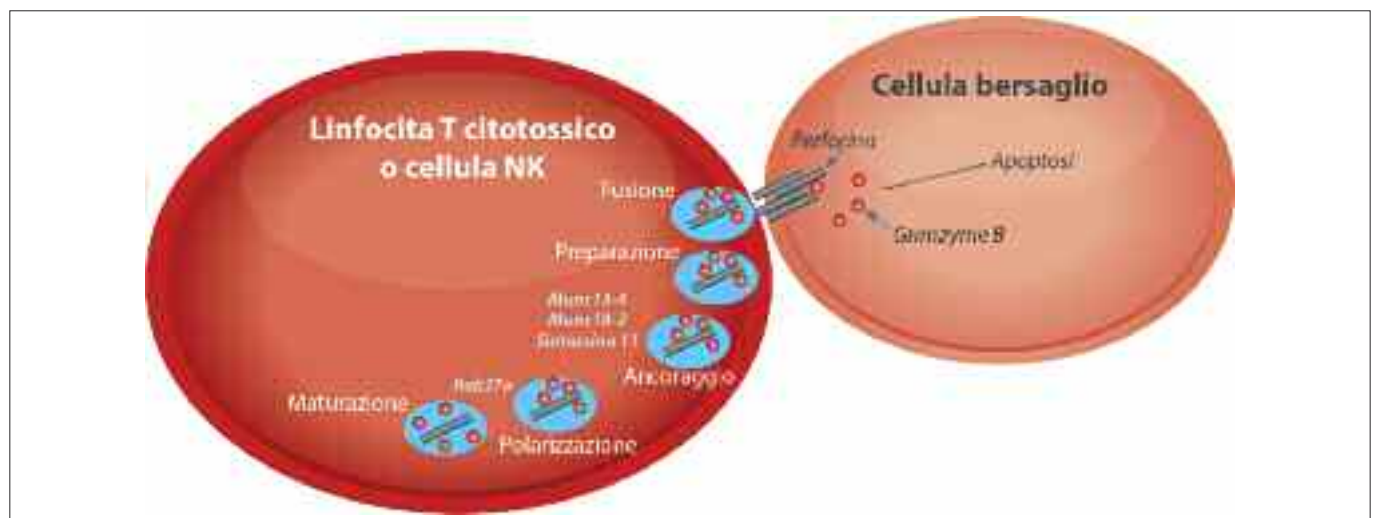


Figura 1 – Meccanismo di risposta immunitaria perforina-mediato. La cellula effettrice (CTL o cellula NK) rilascia vescicole contenenti perforina e granzima B. Le vescicole secretorie, rilasciando per esocitosi il loro contenuto, determinano la formazione di pori nella membrana della cellula bersaglio ed il passaggio di granzima B responsabile dell'attivazione della procaspasi in caspasi e quindi dell'apoptosi. Le più comuni mutazioni genetiche nella HLH determinano la compromissione della formazione, del trafficking, dell'ancoraggio delle vescicole o in alternativa della funzione della perforina.

lità allo studio clinico ⁽³⁴⁾. A distanza di circa 10 anni, in occasione dello studio clinico HLH-2004, i criteri diagnostici sono stati revisionati e sono stati inclusi i test molecolari, l'iperferritinemia, l'aumento della frazione solubile del CD25 (sCD25) e, infine, l'assenza o una diminuita attività delle cellule NK ⁽³⁵⁾. Il riscontro di una delle note anomalie genetiche è sufficiente per sé a confermare la diagnosi di HLH; in alternativa, occorre che siano soddisfatti almeno 5 su 8 criteri (Tabella 2). Jordan et al. hanno recentemente suggerito una nuova revisione dei criteri diagnostici di HLH ⁽¹⁰⁾. La loro proposta si basa sul principio che la combinazione dell'attivazione acuta del sistema immune e di specifiche alterazioni immunopatologiche è tipica della HLH e che le alterazioni laboratoristiche e cliniche che scaturiscono da questi due eventi patogenetici sono in grado, nella quasi totalità dei casi, di distinguere l'HLH da altri disordini infiammatori (Tabella 3). Per esempio, le infezioni organo specifiche e/o le malattie autoimmuni non si associano a stato infiammatorio sistemico e/o a danno multi-organo come nella HLH. Dall'altro lato, i disordini sistemici infiammatori (come la sepsi) non si associano ad attivazione T citotossica o alle specifiche alterazioni immunopatologiche tipiche della HLH. Secondo gli autori, la nuova formula diagnostica (cioè la presenza di un certo numero, ancora da stabilire, di caratteristiche delle categorie 2 e 3, in presenza o meno delle caratteristiche comprese nella categoria 1, vedi Tabella 3) permetterebbe di giungere con più accuratezza e più rapidamente alla diagnosi di HLH.

In questo nuovo modello la documentazione delle alterazioni immunopatologiche sembrerebbe cruciale per la definizione della diagnosi. In effetti, al momento attuale, il coinvolgimento del SNC e del fegato non costituiscono criteri diagnostici di HLH; tuttavia, nello studio HLH-94 il 62% dei pazienti presentava segni di inte-

ressamento del SNC ⁽³⁴⁾. Anche l'aumento della bilirubina indiretta (in conseguenza dello specifico tropismo degli istiociti per l'albero biliare), delle transaminasi, del D-dimero oltre che l'ipoalbuminemia e l'iponatremia, pur non essendo inclusi nei criteri diagnostici, sono di frequente riscontro in pazienti affetti da HLH.

L'inclusione di nuovi criteri probabilmente aumenterà l'accuratezza diagnostica; tuttavia è necessario che la loro applicazione passi attraverso il consenso internazionale e sia validata da studi prospettici multicentrici.

Dati di laboratorio

In corso di HLH, le alterazioni di alcuni parametri laboratoristici sono uno strumento indispensabile non solo per definire la diagnosi ma anche per il monitoraggio clinico e della efficacia terapeutica. L'iperferritinemia è definita da un valore superiore a 500 ng/ml anche se valori superiori a 3000 ng/ml o a 10.000 ng/ml risultano più specifici per HLH ⁽³⁶⁾. La citopenia è definita dall'interessamento di almeno 2 delle 3 linee midollari (Hb < 9 g/dl, Plt < 100x10⁹/l, Neu < 1,0x10⁹/l). La frazione solubile di CD25 (sCD25) può essere misurata con metodo ELISA. Il CD25 rappresenta la catena alfa del recettore dell'IL-2. L'aumento al di sopra del limite superiore (variabile a seconda dell'età) e maggiore di 2DS (deviazioni standard) dalla media sembra essere un criterio più affidabile rispetto all'aumento oltre le 2400 U/ml. Tanto l'incremento dell'sCD25 quanto della ferritina sono presenti all'esordio della malattia in più del 50% dei casi e dunque rappresentano criteri precoci di diagnosi. Il CD163, un recettore per il complesso emoglobina-apto-globina, è un marcatore di attivazione macrofagica della via alternativa del complemento. La frazione solubile del CD163 (sCD163) nel plasma di pazienti affetti da HLH è solitamente più elevata rispetto ai pazienti con infezioni, malattie autoinfiammatorie o tumori ⁽³⁷⁾.

Criteri	HLH-94	HLH-2004
Molecolari		Diagnosi molecolare compatibile con HLH: mutazioni di PRF1, UNC13D, Munc18-2, rab27a, STX11, SH2D1A o BIRC4
Clinici	1. Febbre 2. Splenomegalia	1. Febbre ≥ 38,5 C 2. Splenomegalia
Laboratoristici	3. Citopenia (di almeno 2 delle 3 linee ematologiche) Hb < 9 g/dl Plt < 100x10 ⁹ /l Neu < 1.0x10 ⁹ /l 4. Ipertrigliceridemia e/o ipofibrinogenemia Trigliceridi (a digiuno) ≥ 2 mM o ≥ 3DS Fibrinogeno ≤ 1.5 g/l o ≤ 3 DS	3. Citopenia (di almeno 2 delle 3 linee ematologiche) Hb < 9 g/dl Plt < 100x10 ⁹ /l Neu < 1.0x10 ⁹ /l 4. Ipertrigliceridemia (a digiuno > 265 mg/dl) e/o ipofibrinogenemia (< 150 mg/dl)
Isto-citologici	5. Emofagocitosi midollare o splenica o linfonodale	5. Emofagocitosi midollare o splenica o linfonodale
	6. Nessuna evidenza di disordine clonale	6. Attività di cellule NK diminuita o assente
		7. Ferritina > 500 ng/ml
		8. sCD25 aumentato

Tabella 2 – Criteri diagnostici utilizzati durante gli studi clinici HLH-94 e HLH 2004 - DS: deviazione standard dal normale valore a seconda dell'età.

La combinazione del dosaggio di sCD25 (prodotto dalle cellule T-attivate e dalle cellule dendritiche) e di sCD163 (prodotto dai macrofagi attivati) può essere utile nella diagnosi e nel *follow-up* dei pazienti con HLH. La funzione NK può essere valutata con test funzionali o fenotipici. Sono disponibili per esempio colorazioni specifiche per la perforina, oppure per le proteine SAP o XIAP. L'espressione di Munc13-4 sulla superficie delle piastrine sembra essere un affidabile test diagnostico per la FHL3⁽³⁸⁾. Recentemente è stato validato un test citofluorimetrico che consente di valutare l'attività di degranulazione delle cellule NK mediante la misurazione del CD107a, una glicoproteina di membrana lisosoma-associata. Questo test, valutato prospetticamente in una serie di 494 pazienti, sembra in grado di distinguere con accuratezza i pazienti con HLH familiare con difettosa esocitosi vescicolare (FHL3-5, sindrome di Griscelli e di Chediak-Higashi) da tutte le altre forme ereditarie e dalle forme acquisite⁽³⁹⁾. L'ipertrigliceridemia (> 265 mg/dl, a digiuno) e/o l'ipofibrinogenemia (< 150 mg/dl) completano il quadro delle possibili e più tipiche alterazioni laboratoristiche in corso di HLH.

Anatomia patologica

L'HLH si caratterizza, come precedentemente detto, dalla presenza di tipiche alterazioni immunopatologiche. Queste solitamente sono rappresentate da una diffusa infiltrazione di CTL prevalente a livello epatico e splenico, ma che può interessare numerosi distretti corporei. L'epatite è solitamente caratterizzata da un infiltrato linfocitico periportale⁽⁴⁰⁾. Il midollo osseo può presentare una cellularità variabile a seconda dei casi. L'emofagocitosi è presente nel 25-100% dei casi (Figura 2), con circa 1-10 figure di emofagocita ogni 500 cellule⁽⁴¹⁾. Nel sospetto diagnostico di HLH, dunque, oltre all'emocromo, ai test coagulatori, ai test ematochimici per la valutazione della funzione renale ed epatica e ai principali indici di flogosi, è necessario

eseguire il dosaggio dell'sCD25, dei trigliceridi, i test di funzione-NK e, in caso di disponibilità, è suggerita l'esecuzione dei test molecolari per l'identificazione delle specifiche mutazioni genetiche. Inoltre, per un adeguato inquadramento diagnostico e per la diagnosi differenziale, sono altrettanto indispensabili gli studi di *imaging* che includono l'ecografia addominale e, qualora indicati, la RMN cerebrale e l'esame del fondo oculare.

La RMN può rilevare segni di edema cerebrale, rinforzo delle leptomeningi oppure lesioni focali⁽⁴²⁾. L'agoaspirato midollare e/o la biopsia ossea e la puntura lombare possono svelare la presenza di figure di emofagocitosi che, tuttavia, non sono tipiche di HLH e pertanto la loro assenza non è sufficiente ad escludere la diagnosi di HLH. Il liquor, in più del 50% dei casi, presenta incremento della protidorrachia, pleiocitosi e/o emofagocitosi⁽²⁸⁾. Altre indagini invasive, come la biopsia epatica o quella renale, raramente sono eseguite nel sospetto di HLH a causa della diatesi emorragica che rende tali manovre altamente rischiose.

Le indagini diagnostiche, inoltre, devono mirare a riconoscere l'eventuale causa scatenante (tumore solido, infezione virale, leucemia etc) dal momento che, in questi casi, un trattamento efficace non può prescindere dal tentativo di eliminazione della causa primitiva.

Infine, per pazienti di età inferiore ai 60-65 anni e prima dell'inizio del trattamento specifico, è raccomandata la tipizzazione HLA per la ricerca di un donatore HLA-identico.

Terapia

Il trattamento dell'HLH si basa su alcuni principi fondamentali. Dal momento infatti che il quadro clinico e laboratoristico scaturisce essenzialmente dall'ipercitochinemia, dall'attivazione macrofagica e dall'infiltrazione tissutale di linfociti CTL e di macrofagi, è essenziale bloccare questi eventi patogenetici. Di conseguenza, per una buona probabilità di successo, è necessario:

- riconoscere e trattare la causa scatenante che, come detto in precedenza, rappresenta un evento cruciale anche nelle forme genetico-familiari;
- bloccare lo stato pro-infiammatorio;
- ridurre la componente infiltrativa;
- garantire un adeguato supporto per le funzioni d'organo compromesse;
- eventualmente provvedere a sostituire il sistema immune difettoso.

Senza alcun trattamento, la sopravvivenza dei pazienti con malattia attiva è stimata pari a due mesi⁽³⁴⁾. L'intervento adeguato e tempestivo consente di ridurre significativamente il rischio di morte anche se l'HLH resta un disordine raro con una mortalità elevata.

Terapia eziologica

La rimozione della eventuale causa scatenante l'HLH rappresenta una sfida nel trattamento dei pazienti affetti da questo raro disordine ematologico. Infatti, numerosi studi hanno dimostrato che anche nelle forme genetiche è necessario un insulto esterno, solitamente

CATEGORIA 1: immunodeficienza	CATEGORIA 2: significativa attivazione immune	CATEGORIA 3: anomalie immunopatologiche
Attività NK diminuita o assente	Febbre	Citopenia
Difetto genetico di citotossicità	Splenomegalia/epatomegalia	Ipfibrinogenemia o ipertrigliceridemia
Storia familiare di HLH	Iperferritinemia (> 3000 ng/ml)	Emofagocitosi
Episodio(i) precedenti di HLH o di citopenia di incerta determinazione	Aumento dei livelli serici di sCD25	Epatite
Marcatori di citotossicità: diminuita espressione di perforina, SAP, XIAP o diminuita mobilitazione di CD107a	Aumento dei livelli serici di sCD163	Coinvolgimento del SNC

Tabella 3 – Correlazione tra meccanismi patogenetici e alterazioni cliniche, laboratoristiche, immunopatologiche e molecolari di HLH⁽¹⁰⁾.

infettivo, perchè la malattia si manifesti. Il rischio infettivo in questi pazienti è ulteriormente aumentato per la presenza di neutropenia e di ipogammaglobulinemia. Una adeguata terapia antivirale e antimicrobica, dunque, risulta cruciale nel trattamento dei pazienti HLH. Il rituximab (anti CD20) può essere utile a controllare l'infezione da EBV. L'aggiunta di Ig per via endovenosa può contribuire a rinforzare il trattamento anti-infettivo.

Nel caso di condizioni cliniche stabili, si può decidere di posticipare l'inizio del trattamento steroideo per evitare di ritardare la risoluzione della infezione. Particolarmente difficile, inoltre, è il trattamento delle forme secondarie a disordini clonali dal momento che i regimi citotossici convenzionali possono contribuire ad una tossicità midollare ed extra-midollare a causa della insufficienza multi-organo che spesso caratterizza il quadro clinico della HLH.

La decisione, dunque, di prediligere il trattamento della HLH rispetto a quello della eventuale causa scatenante, può essere particolarmente difficile. Tuttavia, posticipare il trattamento della HLH può compromettere la possibilità di successo terapeutico ed in alcuni casi l'evoluzione rapida del quadro clinico induce ad iniziare il trattamento prima ancora di ottenere i risultati genetico-molecolari nel caso in cui ci sia un forte sospetto diagnostico (Figura 3).

Terapia anti-infiammatoria e anti-proliferativa

I corticosteroidi, l'etoposide, gli anticorpi monoclonali, il siero antilinfocitario (ATG), la ciclosporina (CSA) rappresentano al momento ottime opzioni terapeutiche in monoterapia o, più frequentemente, in combinazione. Questi farmaci sono in grado di bloccare e contenere la "tempesta citochinica" e di bloccare la proliferazione delle cellule infiammatorie inducendone la morte per apoptosi.

Il primo studio clinico internazionale e multicentrico è stato condotto dalla *Histiocyte Society* nel 1994⁽³⁴⁾. Lo scopo dello studio HLH-94 era quello di indurre e di mantenere risposte cliniche soddisfacenti consentendo ai pazienti con malattia primaria o ricaduta o refrattaria di procedere con il trapianto allogenico di midollo osseo (allo-TMO). Lo studio ha arruolato 249 pazienti, di età superiore a 16 aa con esclusione dei casi secondari a tumore o a disordine clonale ematologico o a malattia cronica. I pazienti, per essere inclusi, dovevano soddisfare tutti i criteri (Tabella 2) e non avere ricevuto in precedenza alcuna terapia citotossica o con CSA. Il trattamento prevedeva una fase iniziale con etoposide (due volte a settimane per le prime settimane e poi una volta a settimana) in associazione con dosi decrescenti di desametasone. Dopo otto settimane ed in caso di ri-

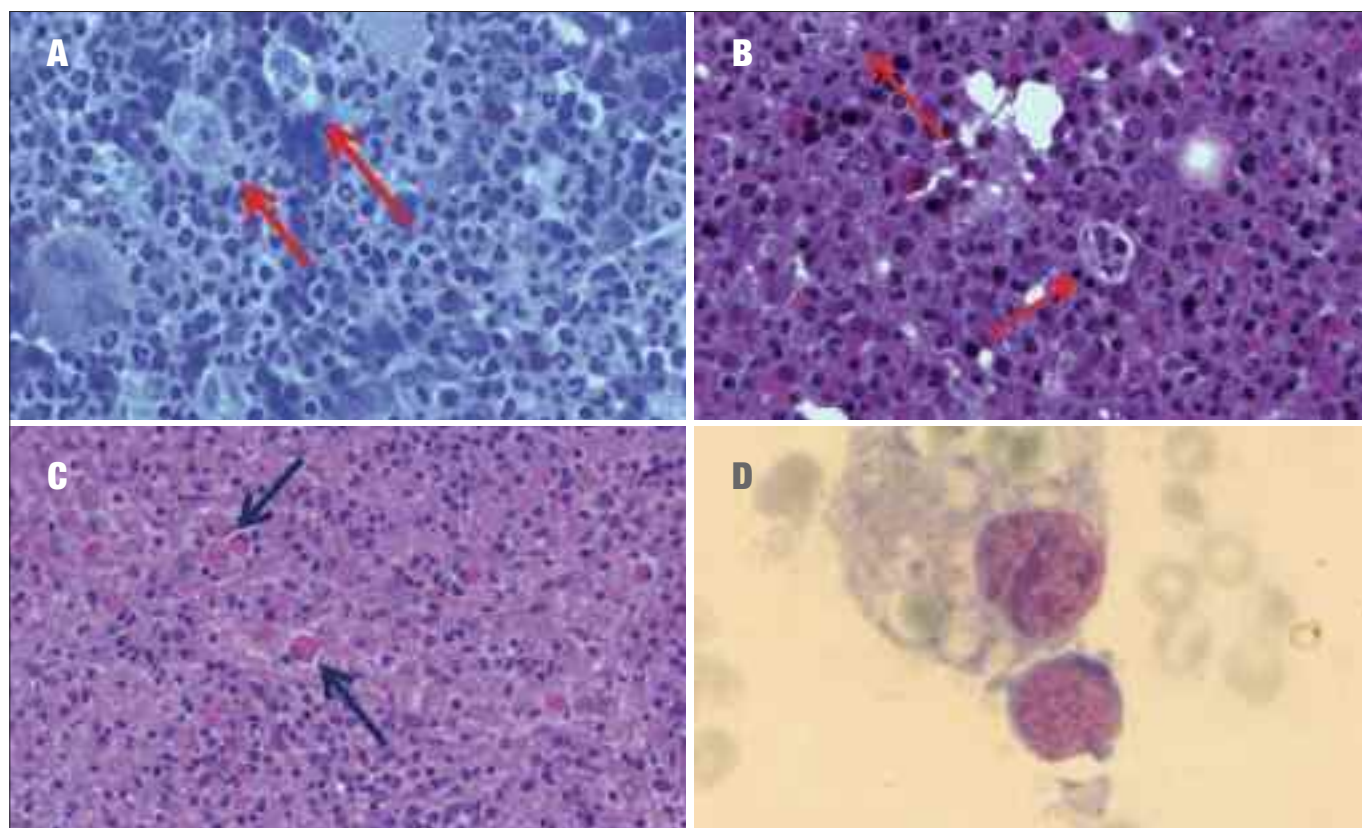


Figura 2 – Alterazioni istopatologiche e citologiche di HLH. (A) In questo caso di HLH il midollo osseo è caratterizzato da una ricca cellularità con iperplasia istiocitaria e immagini di fagocitosi di cellule emopoietiche (freccie rosse) (Giemsa, 40x). (B) Macrofagi contenenti elementi mieloidi ed eritrociti in sezione di biopsia osteomidollare (freccie rosse) (Ematossilina-Eosina, 40x). (C) Numerose immagini di eritrofagocitosi sono rilevabili anche nella milza di pazienti con HLH (freccie blu) (Ematossilina-eosina, 20x). (D) Particolare di emofagocitosi in agoaspirato midollare (Giemsa, 100x) (Le immagini istopatologiche della biopsia osteo-midollare e della milza sono state cortesemente fornite dalla dott.ssa Roberta Gaffà, Unità Operativa di Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Arcispedale Sant'Anna, Ferrara).

sposta clinica, i pazienti con HLH non-familiare potevano interrompere il trattamento e riprenderlo in caso di ricaduta. Al contrario, nei pazienti con FHLH era prevista una fase di mantenimento con dosi pulsanti di desametasone, etoposide e CSA sino al trapianto di midollo osseo, nel caso di disponibilità di un donatore familiare o da registro. In ogni caso era prevista la somministrazione intratecale di metotrexate. Al più recente aggiornamento, ed a un *follow-up* mediano di 6,2 anni, la probabilità di sopravvivenza a 5 anni è del 54%, del 66% e del 50% per l'intero gruppo, per il gruppo trattato con allo-TMO e per i casi di FHLH, rispettivamente ⁽⁴³⁾. Circa il 20% dei pazienti, tutti con forme acquisite, ha potuto sospendere il trattamento per l'assenza di segni di malattia attiva e senza la necessità di ricorrere ad allo-TMO. L'HLH-94 ha prodotto per la prima volta risposte significative e durevoli in pazienti con HLH genetica ed acquisita associando l'allo-TMO alla terapia immunosoppressiva. Inoltre i risultati di questo studio suggeriscono la raccomandazione, qualora vi sia un donatore disponibile, a procedere con il TMO allogenico in caso di forme familiari. L'HLH-94, tuttavia, non ha chiarito se regimi di condizionamento a ridotta intensità (RIC) possono ulteriormente migliorare i dati di mortalità nei pazienti trapiantati né se il tipo di mutazione genetica influisce sul rischio di morte o sulla probabilità di risposta.

Nel 2004 è stato aperto il nuovo studio, HLH-2004, che prevede l'anticipazione del trattamento con CSA sin dall'inizio e l'aggiunta di idrocortisone intratecale. I risultati di questo secondo studio clinico non sono ancora disponibili.

Un approccio alternativo al trattamento basato su etoposide, è rappresentato dalla associazione di corticosteroidi, ATG seguiti rapidamente da allo-TMO ⁽⁴⁴⁾. Questa combinazione, che si riferisce ad uno studio monocentrico in ambito pediatrico, ha prodotto risultati simili all'HLH-94, in termini di sopravvivenza.

Tuttavia, in attesa di ottenere i risultati definitivi dello studio HLH-2004 e in assenza di studi di fase 3, la raccomandazione condivisa è di procedere con lo schema previsto da HLH-94, riducendo eventualmente la dose di etoposide in caso di insufficienza renale associata a iperbilirubinemia diretta ⁽⁴⁵⁾.

Nei pazienti con evidenza di localizzazione di malattia a livello del SNC, il trattamento con metotrexate e idrocortisone intratecale dovrebbe essere proseguito sino a normalizzazione del liquor. In questi pazienti è fortemente suggerito l'allo-TMO dal momento che nei pazienti affetti da HLH sembra esserci una correlazione tra forme genetiche ed interessamento del SNC ⁽⁴⁶⁾.

Nonostante le attuali opzioni terapeutiche di prima linea consentano di ottenere una completa risoluzione del quadro in quasi la metà dei

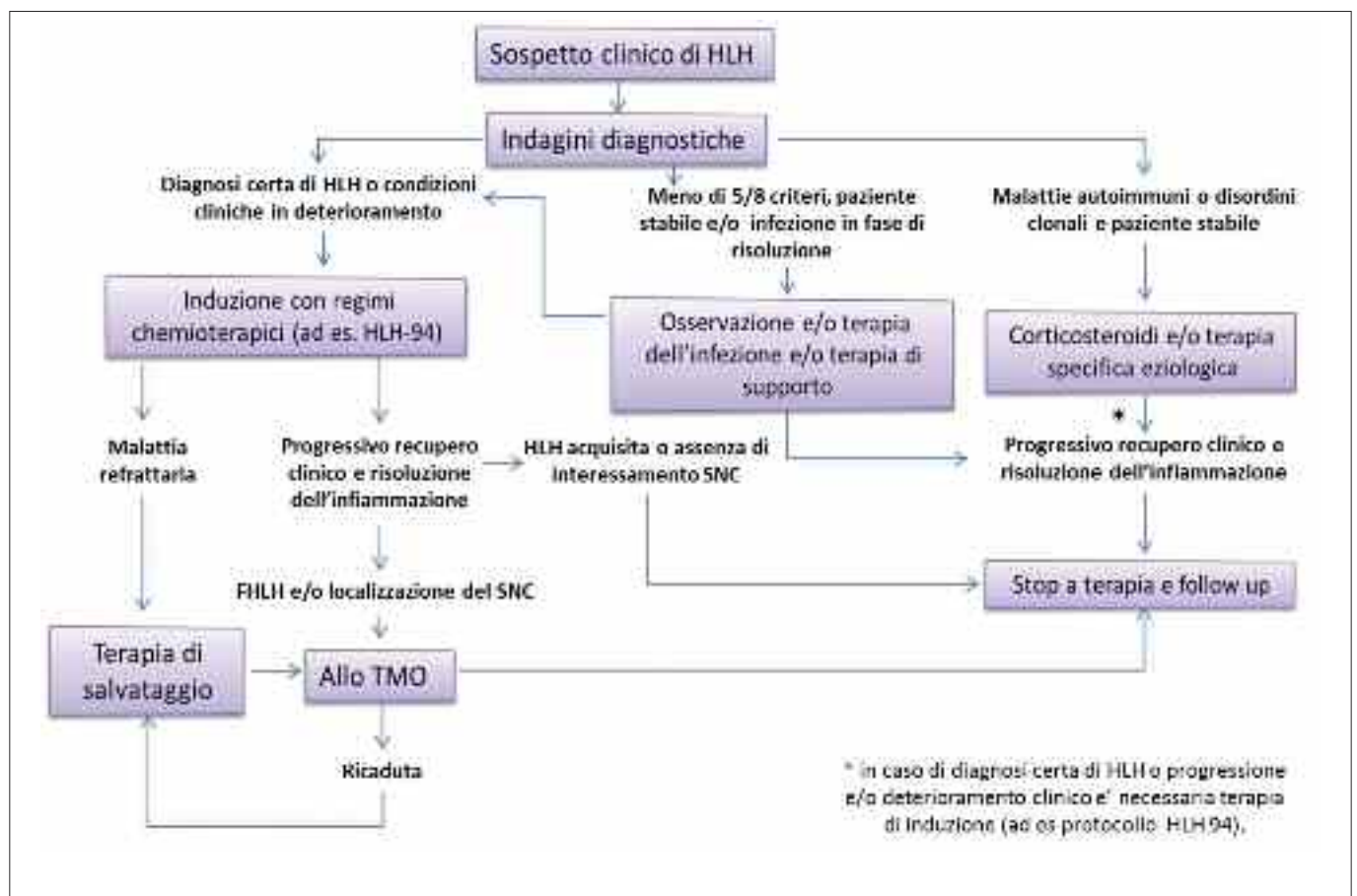


Figura 3 – Algoritmo di trattamento dei pazienti con HLH. Numerosi fattori influiscono sulla scelta del trattamento e nella successione delle varie opzioni terapeutiche nei pazienti con HLH ⁽¹⁰⁾.

pazienti, un numero consistente di pazienti ricade dopo allo-TMO oppure è refrattario al trattamento. Tuttavia, al momento, sono disponibili pochi dati sul trattamento di seconda linea. Recentemente sono stati pubblicati i risultati di uno studio retrospettivo di 22 pazienti (adulti e bambini) refrattari e trattati con alemtuzumab (anticorpo monoclonale anti-CD52) ad una dose mediana di 1 mg/kg ogni 4 giorni circa ⁽⁴⁷⁾. Il 76% dei pazienti ha ottenuto una risposta parziale (definita dal miglioramento del 25% di almeno due marcatori laboratoristici) ed è stato in grado di procedere al trapianto di midollo osseo. L'aggiunta di alemtuzumab nei pazienti con HLH sembra essere ben tollerata e l'unica complicanza significativa registrata è la riattivazione del CMV.

Terapia di supporto

I pazienti con HLH sono a rischio elevato di sanguinamento che può esitare in eventi fatali. Il rischio di sanguinamento è correlato al grado ed alla durata della piastrinopenia e della coagulopatia associata. Le trasfusioni di pool piastrinici e di plasma fresco congelato e in alcuni casi il crioprecipitato o il fattore VII attivato possono limitare il sanguinamento. Nelle giovani donne può essere necessario l'uso di agonisti del GnRH (*gonadotropin releasing hormone*) per prevenire il sanguinamento ciclico mestruale.

La terapia di supporto include naturalmente il trattamento delle eventuali complicanze infettive, il mantenimento di una adeguata funzione cardiaca e circolatoria. In alcuni casi, la grave compromissione multi-organo o la comparsa di grave insufficienza cardio-respiratoria può richiedere il supporto intensivo e meccanico.

Trapianto di midollo osseo (TMO)

Il trapianto di midollo osseo allogenico è raccomandato in tutti i pazienti con FHLH o con interessamento del SNC e nei casi refrattari o ricaduti. La tipizzazione HLA del paziente dovrebbe essere eseguita prima dell'inizio del trattamento specifico per evitare che il conseguente peggioramento della citopenia impedisca di ottenere adeguato materiale cellulare per la tipizzazione molecolare. In caso di assenza di un donatore compatibile nell'ambito familiare andrebbe attivata la ricerca da registro internazionale da donatore non consanguineo (MUD).

La sopravvivenza a lungo termine dopo allo-TMO con regimi di condizionamento convenzionali è stimata attorno al 50-66% indipendentemente dal tipo di donatore. Tuttavia, in uno studio giapponese che ha incluso solo pazienti con HLH secondaria ad infezione da EBV, la sopravvivenza a lungo termine dopo allo-TMO è risultata significativamente migliore (86%) ⁽⁴⁸⁾. La mortalità post-allo-TMO è attribuibile nella maggior parte dei casi a complicanze correlate al trapianto ^(34,44,49). Recentemente, risultati incoraggianti in termini di sopravvivenza (75% a 2,5 anni di follow up) sembrano provenire dall'applicazione di regimi di condizionamento con alemtuzumab ad intensità ridotta (RIC) ⁽⁵⁰⁾. In un'analisi in singolo cen-

tro, l'allo-TMO con RIC ha prodotto risultati migliori rispetto al condizionamento mieloablativo ⁽⁵¹⁾. In questo studio, il rischio di GvHD e di ricaduta erano correlati al tempo di somministrazione dell'alemtuzumab prima del trapianto.

Il tipo di mutazione genetica non sembra influire sulla sopravvivenza dopo trapianto ⁽⁴⁹⁾. Infine, al momento ci sono pochi dati riguardo l'uso del cordone ombelicale come sorgente di cellule staminali. Sono comunque necessari ulteriori studi e più lunghi *follow-up* per analizzare l'impatto del tipo di donatore, del regime di condizionamento, della sorgente di cellule staminali e del tipo di mutazione genetica sulla sopravvivenza dopo allo-TMO.

Indipendentemente dal trattamento prescelto e dalla forma di HLH (genetica o acquisita), è importante monitorare l'evoluzione della malattia mediante appropriati test laboratoristici, funzionali e/o radiologici. Oltre al monitoraggio delle funzioni vitali e dell'emocromo, è suggerito il controllo periodico dei test coagulativi, della funzionalità epatica (ALT, AST, GGT e bilirubina), di quella renale, dei livelli ematici di IgA/IgM/IgG e dell'albumina ⁽¹⁰⁾. Nei casi di HLH associata ad infezione da EBV, è suggerito il monitoraggio molecolare con PCR del genoma virale. I livelli di sCD25, della ferritina, delle transaminasi, della bilirubina, dei test coagulativi e della funzionalità respiratoria predicono l'evoluzione più o meno favorevole della malattia ⁽⁵²⁾. L'eventuale localizzazione della malattia a livello del SNC deve essere monitorata mediante punture lombari sequenziali, analisi morfologica e chimico-fisica del liquor e con RMN cerebrale. In caso di sospensione del trattamento, i pazienti con HLH dovrebbero sottoporsi ad un *follow up* periodico specie per il rischio consistente di ricaduta, maggiore entro il primo anno dal completamento della terapia.

Prognosi

Non è noto quali siano i fattori in grado di predire l'evoluzione più o meno severa dell'HLH. Nello studio HLH-94 l'età avanzata, il genere femminile, l'assenza di coinvolgimento del SNC e di epatosplenomegalia si associavano a maggiore probabilità di ottenere risposte persistenti senza necessità di allo-TMO ⁽⁴³⁾.

In uno studio retrospettivo di una coorte cinese che si riferisce a casi di HLH acquisita (con esclusione delle forme secondarie a linfomi), i livelli di fibrinogeno alla diagnosi, e in minor misura, il tempo all'inizio del trattamento e la percentuale di istiociti nel midollo osseo correlavano con il rischio di morte ⁽⁵³⁾.

Horne et al. hanno documentato che livelli più elevati di pleiocitosi e di proteine nel liquor si associano ad una più significativa mortalità ⁽²⁸⁾. L'abilità della ferritina di predire la risposta al trattamento oltre che il rischio di mortalità è stata confermata in più di una serie di pazienti ^(54,55,56). In uno studio pediatrico retrospettivo condotto in 232 pazienti in Scandinavia, Italia e Germania, i livelli alla diagnosi di bilirubina (>50 µmol/l), di ferritina (>2000 µg/l) e di pleiocitosi liquorale

(>100x10⁶/l) erano fattori prognostici indipendenti di morte precoce. Il rischio di morte prima del trapianto era, inoltre, anticipato da una conta piastrinica inferiore a 40x10⁹/l e dalla persistenza di febbre e di livelli di ferritina superiori a 2000 µg/l misurati a due settimane dall'inizio del trattamento ⁽⁵⁶⁾.

In futuro, l'ulteriore definizione e validazione di fattori prognostici consentirà una migliore ottimizzazione delle strategie terapeutiche che sono disponibili per il trattamento dei pazienti affetti da HLH.

Conclusioni

L'HLH costituisce un disordine immunogenico raro determinato da una esuberante ed inappropriata attività citotossica. La diagnosi e la distinzione della HLH tra forme primitive e acquisite si basa

essenzialmente su criteri clinici dal momento che i test molecolari, in grado di identificare le specifiche mutazioni genetiche, sono disponibili in pochi centri e richiedono tempi di esecuzioni lunghi. Gli indici di infiammazione, in particolare la ferritina ed il sCD25, rappresentano affidabili marcatori prognostici e utili strumenti per il monitoraggio della malattia. Il trattamento dell'HLH si basa essenzialmente sulla rimozione dell'insulto esogeno (infezione virale, malattia autoimmune, tumore solido o disordine clonale ematologico, etc) e sul contenimento della tempesta citochinica e della proliferazione/infiltrazione macrofagica e linfocitaria.

In assenza di studi clinici randomizzati, al momento attuale, la terapia basata su etoposide e corticosteroidi ed il consolidamento con trapianto allogenico di midollo osseo rappresentano la migliore strategia terapeutica di prima linea.

Bibliografia

- Farquhar JW, Claireaux AE. Familial haemophagocytic reticulosis. *Arch Dis Child*. 1952;27(136):519-525.
- Henter JL, Elinder G, Soder O, Ost A. Incidence in Sweden and clinical features of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Acta Paediatr Scand*. 1991;80(4):428-435.
- Niece JA, Rogers ZR, Ahmad N, Langevin AM, McClain KL. Hemophagocytic lymphohistiocytosis in Texas: observations on ethnicity and race. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;54(3):424-428.
- Nagai K, Yamamoto K, Fujiwara H, An J, Ochi T, Suemori K, et al. Subtypes of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan based on genetic and functional analyses of cytotoxic T lymphocytes. *PLoS One*. 2010;5(11):e14173.
- Zur Stadt U, Beutel K, Kolberg S, Kabisch H, Janka G, Hennies HC. Mutation spectrum in children with primary hemophagocytic lymphohistiocytosis: molecular and functional analyses of PRF1, UNC13D, STX11, and RAB27A. *Hum Mutat*. 2006;27(1):62-68.
- Janka GE. Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Annu Rev Med*. 2012;63:233-246.
- Allen M, De Fusco C, Legrand F, Clementi R, Conter V, Danesino C, et al. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis: how late can the onset be? *Haematologica*. 2001;86(5):499-503.
- Clementi R, Emmi L, Maccario R, Liotta F, Moretta L, Danesino C, et al. Adult onset and atypical presentation of hemophagocytic lymphohistiocytosis in siblings carrying PRF1 mutations. *Blood*. 2002;100(6):2266-2267.
- Arico M, Janka G, Fischer A, Henter JL, Blanche S, Elinder G, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis. Report of 122 children from the International Registry. FHL Study Group of the Histiocyte Society. *Leukemia*. 1996;10(2):197-203.
- Jordan MB, Allen CE, Weitzman S, Filipovich AH, McClain KL. How I treat hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*. 2011;118(15):4041-4052.
- Takahashi N, Chubachi A, Kume M, Hatano Y, Komatsuda A, Kawabata Y, et al. A clinical analysis of 52 adult patients with hemophagocytic syndrome: the prognostic significance of the underlying diseases. *Int J Hematol*. 2001;74(2):209-213.
- Gonzalez CL, Medeiros LJ, Brazil RM, Jaffe ES. T-cell lymphoma involving subcutaneous tissue. A clinicopathologic entity commonly associated with hemophagocytic syndrome. *Am J Surg Pathol*. 1991;15(1):17-27.
- O'Brien MM, Lee-Kim Y, George TI, McClain KL, Twist CJ, Jeng M. Precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia presenting with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2008;50(2):381-383.
- Teachey DT, Rheingold SR, Maude SL, Zugmaier G, Barrett DM, Seif AE, et al. Cytokine release syndrome after blinatumomab treatment related to abnormal macrophage activation and ameliorated with cytokine-directed therapy. *Blood*. 2013;121(26):5154-5157.
- Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(10):735-747.
- Trizzino A, zur Stadt U, Ueda I, Risma K, Janka G, Ishii E, et al. Genotype-phenotype study of familial haemophagocytic lymphohistiocytosis due to perforin mutations. *J Med Genet*. 2008;45(1):15-21.
- Schneider EM, Lorenz I, Muller-Rosenberger M, Steinbach G, Kron M, Janka-Schaub GE. Hemophagocytic lymphohistiocytosis is associated with deficiencies of cellular cytotoxicity but normal expression of transcripts relevant to killer-cell-induced apoptosis. *Blood*. 2002;100(8):2891-2898.
- Lykens JE, Terrell CE, Zoller EE, Risma K, Jordan MB. Perforin is a critical physiologic regulator of T-cell activation. *Blood*. 2011;118(3):618-626.
- Krebs P, Crozat K, Popkin D, Oldstone MB, Beutler B. Disruption of MyD88 signaling suppresses hemophagocytic lymphohistiocytosis in mice. *Blood*. 2011;117(24):6582-6588.
- Zoller EE, Lykens JE, Terrell CE, Aliberti J, Filipovich AH, Henson PM, et al. Hemophagocytosis causes a consumptive anemia of inflammation. *J Exp Med*. 2011;208(6):1203-1214.
- Palazzi DL, McClain KL, Kaplan SL. Hemophagocytic syndrome in children: an important diagnostic consideration in fever of unknown origin. *Clin Infect Dis*. 2003;36(3):306-312.
- Sumegi J, Barnes MG, Nestheide SV, Molleran-Lee S, Villanueva J, Zhang K, et al. Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells from children with active hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*. 2011;117(15):e151-160.
- Hinze CH, Fall N, Thornton S, Mo JQ, Aronow BJ, Layh-Schmitt G, et al. Immature cell populations and an erythropoiesis gene-expression signature in systemic juvenile idiopathic arthritis: implications for pathogenesis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(3):R123.
- Fall N, Barnes M, Thornton S, Luyrink L, Olson J, Ilowite NT, et al. Gene expression profiling of peripheral blood from patients with untreated new-onset systemic juvenile idiopathic arthritis reveals molecular heterogeneity that may predict macrophage activation syndrome. *Arthritis Rheum*. 2007;56(11):3793-3804.
- Ravelli A, Grom AA, Behrens EM, Cron RQ. Macrophage activation syndrome as part of systemic juvenile idiopathic arthritis: diagnosis, genetics, pathophysiology and treatment. *Genes Immun*. 2012;13(4):289-298.
- Palazzi DL, McClain KL, Kaplan SL. Hemophagocytic syndrome after Kawasaki disease. *Pediatr Infect Dis J*. 2003;22(7):663-666.
- Fitzgerald NE, McClain KL. Imaging characteristics of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Radiol*. 2003;33(6):392-401.
- Horne A, Trottestam H, Arico M, Egeler RM, Filipovich AH, Gadner H, et al. Frequency and spectrum of central nervous system involvement in 193 children with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br J Haematol*. 2008;140(3):327-335.

29. Thompson PA, Allen CE, Horton T, Jones JY, Vinks AA, McClain KL. Severe neurologic side effects in patients being treated for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2009;52(5):621-625.
30. Bechstein WO. Neurotoxicity of calcineurin inhibitors: impact and clinical management. *Transpl Int*. 2000;13(5):313-326.
31. Liao PM, Thompson JT. Ophthalmic manifestations of virus-associated hemophagocytic syndrome. *Arch Ophthalmol*. 1991;109(6):777.
32. Boutin B, Routon MC, Rocchiccioli F, Mayer M, Leverger G, Robain O, et al. Peripheral neuropathy associated with erythrophagocytic lymphohistiocytosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1988;51(2):291-294.
33. De Armas R, Sindou P, Gelot A, Routon MC, Ponsot G, Vallat JM. Demyelinating peripheral neuropathy associated with hemophagocytic lymphohistiocytosis. An immuno-electron microscopic study. *Acta Neuropathol*. 2004;108(4):341-344.
34. Henter JL, Arico M, Egeler RM, Elinder G, Favara BE, Filipovich AH, et al. HLH-94: a treatment protocol for hemophagocytic lymphohistiocytosis. HLH study Group of the Histiocyte Society. *Med Pediatr Oncol*. 1997;28(5):342-347.
35. Henter JL, Horne A, Arico M, Egeler RM, Filipovich AH, Imashuku S, et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2007;48(2):124-131.
36. Allen CE, Yu X, Kozinetz CA, McClain KL. Highly elevated ferritin levels and the diagnosis of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2008;50(6):1227-1235.
37. Schaer DJ, Schleiffenbaum B, Kurrer M, Imhof A, Bächli E, Fehr J, et al. Soluble hemoglobin-haptoglobin scavenger receptor CD163 as a lineage-specific marker in the reactive hemophagocytic syndrome. *Eur J Haematol*. 2005;74(1):6-10.
38. Murata Y, Yasumi T, Shirakawa R, Izawa K, Sakai H, Abe J, et al. Rapid diagnosis of FHL3 by flow cytometric detection of intraplatelet Munc13-4 protein. *Blood*. 2011;118(5):1225-1230.
39. Bryceson YT, Pende D, Maul-Pavicic A, Gilmour KC, Ufheil H, Vraetz T, et al. A prospective evaluation of degranulation assays in the rapid diagnosis of familial hemophagocytic syndromes. *Blood*. 2012;119(12):2754-2763.
40. Ost A, Nilsson-Ardnor S, Henter JL. Autopsy findings in 27 children with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Histopathology*. 1998;32(4):310-316.
41. Gupta A, Tyrrell P, Valani R, Benseler S, Weitzman S, Abdelhaleem M. The role of the initial bone marrow aspirate in the diagnosis of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2008;51(3):402-404.
42. Goo HW, Weon YC. A spectrum of neuroradiological findings in children with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Radiol*. 2007;37(11):1110-1117.
43. Trottestam H, Horne A, Arico M, Egeler RM, Filipovich AH, Gadner H, et al. Chemoimmunotherapy for hemophagocytic lymphohistiocytosis: long-term results of the HLH-94 treatment protocol. *Blood*. 2011;118(17):4577-4584.
44. Ouachee-Chardin M, Elie C, de Saint Basile G, Le Deist F, Mahlaoui N, Picard C, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in hemophagocytic lymphohistiocytosis: a single-center report of 48 patients. *Pediatrics*. 2006;117(4):e743-750.
45. Joel SP, Shah R, Clark PI, Slevin ML. Predicting etoposide toxicity: relationship to organ function and protein binding. *J Clin Oncol*. 1996;14(1):257-267.
46. Haddad E, Sulis ML, Jabado N, Blanche S, Fischer A, Tardieu M. Frequency and severity of central nervous system lesions in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*. 1997;89(3):794-800.
47. Marsh RA, Allen CE, McClain KL, Weinstein JL, Kanter J, Skiles J, et al. Salvage therapy of refractory hemophagocytic lymphohistiocytosis with alemtuzumab. *Pediatr Blood Cancer*. 2013;60(1):101-109.
48. Ohga S, Kudo K, Ishii E, Honjo S, Morimoto A, Osugi Y, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;54(2):299-306.
49. Cesaro S, Locatelli F, Lanino E, Porta F, Di Maio L, Messina C, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for hemophagocytic lymphohistiocytosis: a retrospective analysis of data from the Italian Association of Pediatric Hematology Oncology (AIEOP). *Haematologica*. 2008;93(11):1694-1701.
50. Cooper N, Rao K, Gilmour K, Hadad L, Adams S, Cale C, et al. Stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*. 2006;107(3):1233-1236.
51. Marsh RA, Vaughn G, Kim MO, Li D, Jodele S, Joshi S, et al. Reduced-intensity conditioning significantly improves survival of patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2010;116(26):5824-5831.
52. Buyse S, Teixeira L, Galicier L, Mariotte E, Lemiale V, Seguin A, et al. Critical care management of patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Intensive Care Med*. 2010;36(10):1695-1702.
53. Park HS, Kim DY, Lee JH, Lee JH, Kim SD, Park YH, et al. Clinical features of adult patients with secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis from causes other than lymphoma: an analysis of treatment outcome and prognostic factors. *Ann Hematol*. 2012;91(6):897-904.
54. Lin TF, Ferlic-Stark LL, Allen CE, Kozinetz CA, McClain KL. Rate of decline of ferritin in patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis as a prognostic variable for mortality. *Pediatr Blood Cancer*. 2011;56(1):154-155.
55. Imashuku S, Hibi S, Todo S. Hemophagocytic lymphohistiocytosis in infancy and childhood. *J Pediatr*. 1997;130(3):352-357.
56. Trottestam H, Berglof E, Horne A, Onelöv E, Beutel K, Lehmborg K, et al. Risk factors for early death in children with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Acta Paediatr*. 2012;101(3):313-318.

Parole Chiave

Linfoistocitosi emofagocitica, FHL, perforina, linfociti T citotossici, *natural killer*.

Indirizzi per la corrispondenza

Ciccone Maria

Sezione di Ematologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria
Arcispedale S. Anna, Ferrara
Tel. (+39) 0532 236212142
m.ciccone@ospfe.it

Ringraziamenti:

AIL – Sezione di Ferrara;
dott.ssa Roberta Gafa
per le immagini istopatologiche

Leucemia a grandi linfociti granulati

Gregorio Barilà^{1,2}, Antonella Teramo^{1,2}, Cristina Gattazzo^{1,2},
Renato Zambello^{1,2}, Gianpietro Semenzato^{1,2}

¹ Dipartimento di Medicina, Divisione di Ematologia ed Immunologia clinica, Università degli Studi di Padova

² Venetian Institute of Molecular Medicine (VIMM), Padova



Introduzione

La leucemia a grandi linfociti granulati (*leukemia*, LGL) è un disordine linfoproliferativo cronico eterogeneo caratterizzato da un'espansione dei linfociti granulati (LGL) di tipo T o NK.

Nel soggetto normale, gli LGL rappresentano circa il 15% dei PBMC, con un range compreso tra $0,2$ e $0,4 \times 10^9$ LGL/l, (200 – 400 LGL/mm³) e sono costituiti prevalentemente da cellule *Natural Killer* (NK) ⁽¹⁾. Da un punto di vista morfologico si tratta di cellule dalle dimensioni di 15 – 18 μ m, con nucleo rotondo o reniforme ed un citoplasma con all'interno granuli azzurrofilici contenenti enzimi litici ⁽²⁾ (Figura 1).

La descrizione di pazienti che presentavano una condizione caratterizzata da un definito e persistente aumento degli LGL venne fatta per la prima volta da McKenna et al. ⁽³⁾. Questi pazienti vennero all'epoca classificati come affetti da leucemia linfatica cronica a cellule T (T-LLC) ovvero T-prolinfocitica; un'accurata analisi morfologica tuttavia associata all'evidenza di un decorso clinico per lo più indolente della malattia, permise successivamente di distinguerli da pazienti affetti dalla ben più aggressiva T-CLL/T-PLL. Nel 1993 venne proposta una

prima distinzione tra forma T CD3+ e forma NK CD3- di LGL. Nel 2008, infine, la classificazione delle neoplasie linfoidi proposta dal *World Health Organization* (WHO) ha incluso questa patologia all'interno delle neoplasie mature di tipo T e NK, riconoscendo al suo interno tre diverse categorie: leucemia a grandi linfociti granulati di tipo T (T-LGL), leucemia aggressiva a cellule NK (ANKL) e disordine linfoproliferativo cronico NK (CLPD-NK), un'entità provvisoria ^(4,5). In quest'articolo si discuterà la LGL, comprendendo entrambe le forme T ed NK, esaminando la patogenesi, le caratteristiche cliniche, la diagnosi ed, infine, il trattamento.

Epidemiologia

La LGL è un disordine linfoproliferativo raro che comprende circa il 2-5% delle leucemie nei paesi occidentali, con una frequenza maggiore nei paesi asiatici. La T-LGL CD3+ rappresenta la forma più frequente nei paesi occidentali, comprendendo circa l'85% delle casistiche e colpisce soggetti con età media di 60 anni senza predilezione di genere. All'interno di queste forme, è stata descritta una rara variante aggressiva che colpisce soggetti in età più giovane (età media 41 anni), con caratteristiche simili alla ANKL e che presenta un immunofenotipo caratteristico (CD3+, CD8+, CD56+) ed una prognosi infausta ^(6,7). È possibile che questa forma rappresenti un'evoluzione clonale della più frequente forma indolente ma generalmente costituisce un disordine che si sviluppa *de novo* ^(8,9).

La LGL di tipo NK CD3- rappresenta, invece, circa il 15% dei casi; al suo interno distinguiamo a sua volta la ANKL, una forma acuta aggressiva, comprendente il 30% dei casi, che colpisce soprattutto soggetti in età giovanile con età media di 39 anni, diffusa nei paesi asiatici e con una forte associazione con il virus di Epstein Barr, e la NK-CLPD, una forma cronica con decorso indolente (70% dei casi) con età media alla diagnosi di 58 anni ⁽¹⁰⁾.

Eziopatogenesi

L'eziologia della T-LGL è tuttora ancora poco conosciuta, poiché non esiste uno specifico agente in grado di stimolare la proliferazione degli LGL; si ipotizza, invece, che una serie di eventi inducano la



Figura 1 – Grande linfocita granulato nel sangue periferico ad ingrandimento 100x: si possono osservare il nucleo reniforme e i granuli azzurrofilici citoplasmatici che caratterizzano questo sottotipo cellulare.

patologia attraverso un comune meccanismo eziopatogenetico. Una volta esercitata la loro funzione, gli LGL vanno incontro ad un processo di morte cellulare programmata, definito AICD (*Activation-Induced Cell Death*), al fine di mantenere l'omeostasi immunitaria ed evitare un'eccessiva attività di queste cellule. Il processo di AICD è mediato dalle medesime tecniche citolitiche degli LGL: questi ultimi, infatti, in seguito alla loro attivazione, esprimono sulla superficie alti livelli di recettori di morte e sono suscettibili alla citotossicità mediata da granuli secreti per via extracellulare o intracellulare ⁽¹¹⁾. Si ritiene che la LGLL sia il risultato di un processo immunologico caratterizzato da un'espansione clonale di LGL che presentano un deficit nell'AICD e che, di conseguenza, si accumulano nel sangue periferico ⁽¹²⁾.

Diverse evidenze supportano l'ipotesi che la stimolazione cronica antigenica da parte di auto-antigeni o virus esogeni possa rappresentare l'evento iniziale, determinando un'attivazione dei linfociti T o delle cellule NK con iniziale proliferazione policlonale sostenuta da interleuchina-2 (IL-2); successivamente, in seguito alla secrezione autocrina di *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) e la produzione di interleuchina 15 (IL-15) da parte delle cellule dendritiche, si determinerebbe il passaggio da una proliferazione di tipo policlonale ad una di tipo monoclonale che si mantiene nel tempo per l'instaurarsi di un terzo evento responsabile di una resistenza all'AICD (Figura 2) ⁽¹³⁾.

Come già accennato, una volta esplicata la loro funzione immunologica, gli LGL vanno incontro ad un processo di morte cellulare

programmata indotto da attivazione (AICD) al fine di mantenere l'omeostasi immunitaria. Infatti, l'attivazione degli LGL è associata ad una aumentata espressione non solo di FasL ma anche del rispettivo recettore Fas; l'interazione Fas-FasL induce anche nei linfociti granulati la formazione del DISC (*Death Inducing Signalling Complex*) cui segue l'attivazione della caspasi 8 e apoptosi. Nella LGLL, invece, le cellule patologiche mostrano una resistenza all'AICD che non è legata a un'alterazione dell'apparato apoptotico ma ad una costitutiva espressione di c-FLIP (*cellular-FLICE inhibitory protein*) che blocca l'attività del DISC. Questo deficit dell'apoptosi mediata da Fas è dunque responsabile dell'accumulo degli LGL nel sangue periferico ⁽¹¹⁾.

Di notevole importanza è il ruolo rivestito da citochine quali IL-15 e PDGF, che diversi studi hanno dimostrato in grado di riprodurre le alterazioni identificabili nella LGLL. In particolare, IL-15 agisce modificando i livelli di proteine della famiglia Bcl-2, aumentando l'espressione di proteine anti-apoptotiche e riducendo i livelli di proteine pro-apoptotiche quali Bim e Bid, stimolandone la degradazione per via proteasomiale; il trattamento con bortezomib è in grado di annullare gli effetti di IL-15 inducendo apoptosi negli LGL tramite aumento dei livelli di Bid ⁽¹⁴⁾.

Cruciale è il ruolo di vie segnale coinvolte nella patogenesi di varie forme leucemiche quali le via delle MAP chinasi, la via di PI3K-AKT e quella di NF-κB. In particolare, un'attivazione costitutiva di ERK è stata evidenziata inizialmente nella forma NK ed in seguito in quella T; sia la via delle MAPK che quella di NF-κB risulterebbero

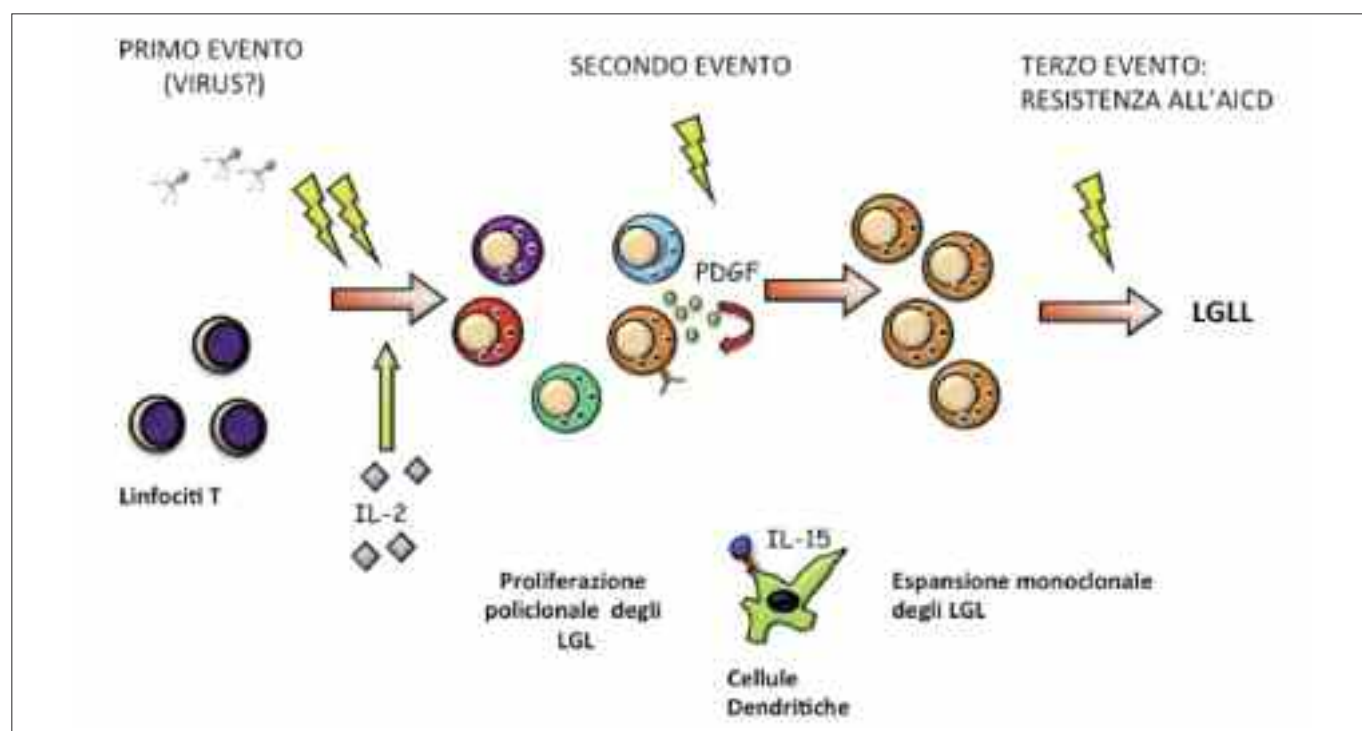


Figura 2 – Ipotesi eziopatogenetica della LGLL.

dipendenti dall'attività della chinasi AKT. Importante è anche il ruolo svolto dagli sfingolipidi, in particolare il bilancio tra i livelli di sfingosina 1-fosfato (S1P) con funzione anti-apoptotica ed i livelli di ceramide con attività pro-apoptotica (il cosiddetto *rheostat* degli sfingolipidi). Negli LGL, infatti, è presente un' aumentata attività della ceramidasi acida che converte il ceramide in sfingosina ed un'iperattività della sfingosina chinasi che metabolizza la sfingosina in sfingosina-1 fosfato⁽¹⁵⁾. Il trattamento con inibitori della ceramidasi ed il rilascio di ceramide via liposomiale in un modello murino di NK-LGLL si sono dimostrati in grado di indurre apoptosi negli LGL leucemici⁽¹⁶⁾.

Negli ultimi anni, infine, è stata studiata e caratterizzata approfonditamente la via JAK-STAT. Negli LGL, infatti, è presente una costitutiva attivazione di STAT3 con alti livelli della proteina antiapoptotica Mcl-1 responsabile della sopravvivenza delle cellule leucemiche; l'inibizione della chinasi JAK-2 determina apoptosi nelle cellule leucemiche mediante la riduzione dei livelli di fosforilazione di STAT3 e dei livelli di Mcl-1⁽¹⁷⁾. Un lavoro del nostro gruppo ha dimostrato come l'attivazione costitutiva di STAT3 dipenda non solo da meccanismi estrinseci quali gli alti livelli di interleuchina-6 (IL-6) prodotti dal microambiente che agisce mediante una via definita *trans-signalling*, ma anche da meccanismi intrinseci quali la riduzione dei livelli di SOCS-3 che rappresenta un naturale inibitore della via⁽¹⁸⁾. Infine, recentemente, in un 30% circa dei pazienti con T e NK-LGLL sono state riscontrate mutazioni somatiche nel dominio SH2 di STAT3 responsabili dell'attivazione costitutiva di que-

sto fattore di trascrizione (Figura 3)^(19,20). Per quanto riguarda la NK-CLPD, è noto da anni che esiste una suscettibilità genetica legata alla prevalenza a livello genomico di un aplotipo di tipo B dei geni dei recettori di tipo KIR (*Killer Immunoglobuline-Like Receptor*) caratterizzato dalla prevalenza di KIR attivatori. Infatti, gli NK-LGL presentano una restrizione di espressione dei recettori KIR con ridotta espressione di KIR inibitori a discapito di un'alta presenza di KIR attivatori^(21,22); quest'alterazione, in parte, è spiegata da processi di metilazione a livello dei geni di KIR inibitori quali il KIR3DL1⁽²³⁾. Un lavoro del nostro gruppo ha evidenziato, inoltre, un possibile ruolo delle cellule dendritiche (*Dendritic Cell*, DC) nella patogenesi di questo tipo di leucemia. Le cellule dendritiche, infatti, appartengono alla classe delle cellule *Antigen Presenting Cell* (APC), in grado di captare gli antigeni e presentarli, insieme ad alti livelli di molecole di co-stimolo e di adesione, ai linfociti T favorendone l'attivazione. Le DC potrebbero essere coinvolte nella proliferazione degli LGL in seguito al riconoscimento di uno specifico antigene e nel mantenimento della proliferazione tramite la secrezione di citochine quali IL-2, IL-15 e IL-18. Analisi immuno-istochimiche eseguite su biopsie osteomidollari di pazienti affetti da LGLL dimostrano la presenza di un contatto diretto tra LGL e DC, diversamente dalle biopsie dei controlli sani dove le cellule presentano una distribuzione casuale. Si è ipotizzato quindi che l'ambiente midollare rappresenti il luogo in cui inizia la proliferazione patologica e che le DC rappresentino le cellule *target* dell'infezione virale⁽²⁴⁾. A supporto dell'ipotesi di un'eziologia virale, in alcuni casi di T-LGLL è stato dimostrato un

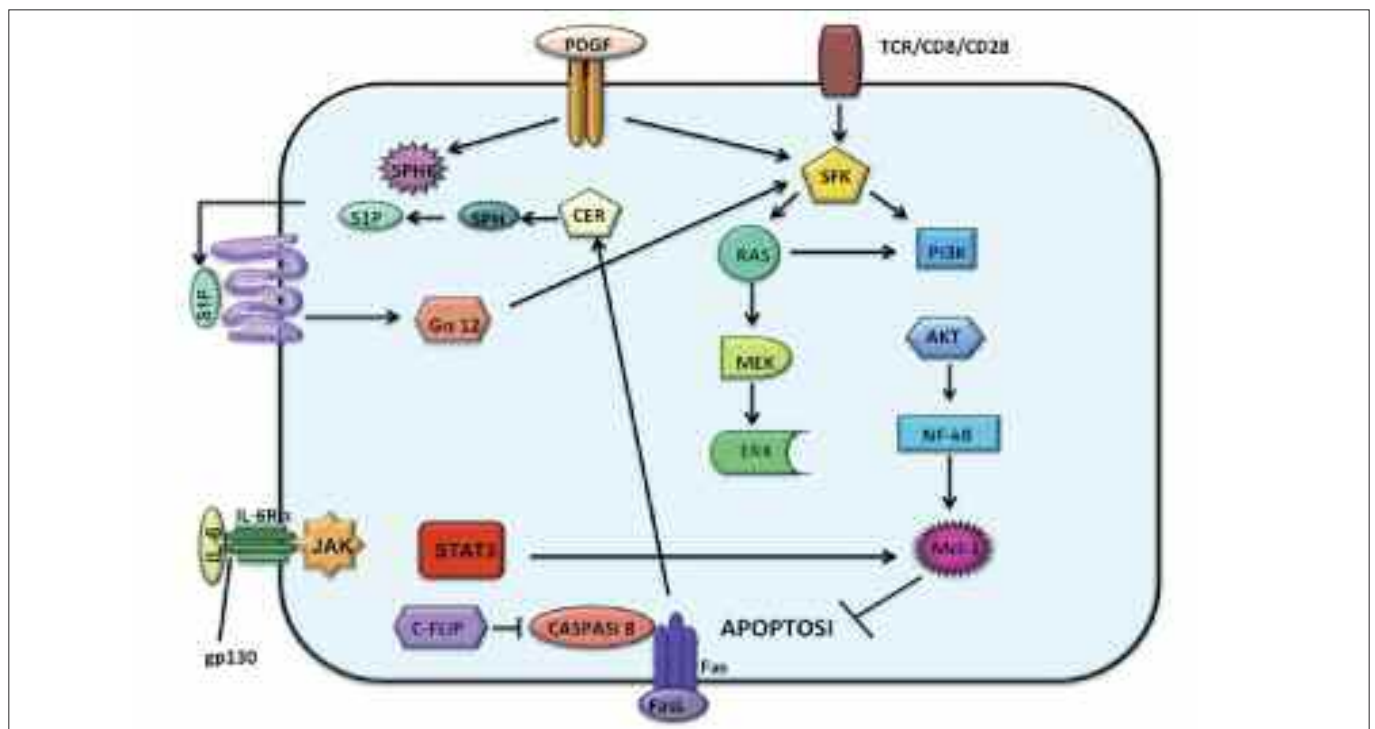


Figura 3 – Rappresentazione delle diverse vie di segnale coinvolte nella sopravvivenza degli LGL nella T-LGLL tra cui si possono osservare la via RAS/MEK/ERK, la via PI3K/Akt, la via NF-κB, la via JAK/STAT, il rheostat dei fosfolipidi e la via Fas-FasL.

ruolo eziopatogenetico di virus quali EBV e HTLV (*Human T-Lymphotropic Virus*); in particolare, il siero di pazienti europei ed americani mostra una reattività nei confronti della proteina p21E dell'*envelope* di HTLV, supportando l'idea che l'esposizione ad una proteina con omologia con l'epitopo BA21 potrebbe essere l'evento iniziale scatenante la proliferazione dei linfociti^(12,25); tale positività risulta presente anche in altre sindromi da insufficienza midollare: anemia aplastica (AA), sindrome mielodisplastica (SMD), emoglobinuria parossistica notturna (EPN) che spesso si associano al LGLL⁽²⁶⁾. Maggiori sono le evidenze per un ruolo di EBV nella patogenesi della ANKL, dove, nella maggior parte dei pazienti affetti da questa forma aggressiva, è possibile riscontrare il genoma del virus in forma epistomiale all'interno delle cellule patologiche⁽⁵⁾.

Alcuni autori hanno evidenziato una possibile associazione tra T-LGLL e disordini caratterizzati da insufficienza midollare quali SMD, EPN ed AA che spesso sono associati alla LGLL. Alcuni studi hanno suggerito che l'espansione T clonale o NK potrebbe derivare da una cellula staminale ematopoietica pluripotente in pazienti con SMD oppure da una stimolazione antigenica cronica da parte di un clone anomalo di cellule mieloidi nel midollo^(27,28); questi LGL auto-reattivi, quindi, potrebbero contribuire allo sviluppo delle citopenie sia nella LGLL che nei disordini da insufficienza midollare.

Aspetti clinici

La T-LGLL presenta un decorso clinico indolente; tuttavia, il 60% dei pazienti diventa sintomatico durante il corso della malattia. La caratteristica più comune della malattia è la presenza di citopenia, in particolare neutropenia. Nel 85% dei casi la patologia si presenta con neutropenia, che nel 45% dei casi presenta le caratteristiche di neutropenia severa ($ANC < 0,5 \times 10^9/l$). Da un punto di vista clinico, la neutropenia si manifesta con infezioni batteriche ricorrenti che rappresentano spesso la prima manifestazione della leucemia. Le infezioni nella maggior parte dei pazienti sono di tipo muco-cutaneo (celluliti, ulcere orali) ma coinvolgono anche le vie respiratorie e l'area perineale, potendo diventare invasive fino a sfociare in sepsi e polmoniti; rare e non caratteristiche, invece, sono le infezioni opportunistiche⁽¹⁾.

Anemia normo-macrocitica è presente in circa il 50% dei pazienti; una piastrinopenia moderata è diagnosticata nel 20% mentre rara è la piastrinopenia grave.

Astenia e sintomi B (febbre, sudorazione notturna, perdita di peso) sono osservabili in un 20-30% di casi. All'obiettività si può evidenziare splenomegalia in un 20-50% dei pazienti, epatomegalia in un 20%, mentre è rara la linfadenopatia. Il coinvolgimento polmonare è raro e si può manifestare con ipertensione polmonare.

Caratteristica peculiare della T-LGLL è la frequente associazione con disordini di tipo autoimmune, di cui il più frequente è l'artrite reumatoide (AR), che si riscontra nel 25-30% dei casi; in particolare, la sindrome di Felty, identificata dalla triade artrite reumatoide,

splenomegalia, neutropenia, entra in diagnosi differenziale con la T-LGLL associata all'artrite reumatoide. Diversi studi hanno evidenziato un'alta prevalenza del HLA-DR4 (*Human Leukocyte Antigen*) sia nella sindrome di Felty che nella T-LGLL, supportando l'ipotesi di una comune origine immunologica dei due disordini⁽²⁹⁾. Un ampio spettro di manifestazioni ematologiche e autoimmuni sono presenti in associazione con la T-LGLL (Tabella 1)^(30,31).

In particolare, è frequente l'associazione con disordini caratterizzati da insufficienza midollare, quali AA, aplasia pura della serie rossa (PRCA), SMD e EMP. Diversi sono i meccanismi ipotizzati all'origine delle citopenie e della neutropenia; tra questi, quelli ritenuti più importanti sono l'infiltrazione diretta del midollo osseo da parte degli LGL, una tossicità diretta tramite recettori T o NK, la produzione di citochine quali TNF α (Tumor Necrosis Factor α e INF γ (interferone γ), che inibiscono l'emopoiesi ed infine la secrezione di alti livelli di FasL che inducono apoptosi dei precursori midollari o delle cellule della linea mieloide⁽¹²⁾ (Figura 4).

A supporto dell'ultima ipotesi, la correzione delle citopenie si accompagna ad una riduzione o scomparsa dei livelli di FasL sierici. Peculiari, inoltre, sono le anomalie sierologiche di tipo immunologico quali alti livelli di fattore reumatoide (60%), anticorpi anti-nucleo (40%), anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA), anticorpi anti piastrine, immunocomplessi circolanti, iper/ipogammaglobulinemia e gammopatia monoclonale di incerto significato (MGUS)⁽³¹⁾. Le caratteristiche cliniche di NK-CLPD sono in gran parte sovrapponibili alla più frequente forma di tipo T; meno frequenti risultano la presenza di citopenia, sintomi sistemici, epato-splenomegalia e linfadenopatia mentre non comuni sono le lesioni cutanee. In molti casi, questo disordine si associa ad altre condizioni cliniche quali aplasia pura della serie rossa, vasculiti sistemiche, neoplasie ematologiche e non e malattie autoimmuni. Rara è la trasformazione in una forma più aggressiva quale ANKL⁽³²⁻³⁴⁾. Quest'ultima, invece, rappresenta una condizione clinica severa, a prognosi infausta, caratterizzata da un decorso clinico rapido, sintomi sistemici e coinvolgimento da parte delle cellule NK patologiche del sangue periferico, midollo osseo, fegato e milza che si traduce sul piano clinico in citopenia severa, disfunzione epatica ed epato-splenomegalia. Nonostante il trattamento, la prognosi risulta infausta, con una sopravvivenza media che va da qualche giorno a qualche settimana⁽⁵⁾. Non inusuale è descritto lo sviluppo concomitante di coagulazione intravascolare disseminata o di sindrome emofagocitica nel corso della malattia⁽³⁵⁾.

Diagnosi

Da un punto di vista storico, la presenza di almeno 2.000 LGL/mm^3 ha costituito un criterio diagnostico fondamentale per la diagnosi di LGLL⁽³³⁾; tuttavia, gli esperti considerano sufficiente per la diagnosi la presenza di almeno 500 LGL/mm^3 clonali che persistono nel sangue periferico per almeno 6 mesi⁽³⁶⁾. Nei casi in cui la conta di LGL

sia $<500/\text{mm}^3$ ma la clinica sia caratteristica, diviene necessario eseguire una biopsia midollare^(1,33). La valutazione del midollo, infatti, permette, in questo sottogruppo di pazienti, di quantificare mediante immunoistochimica l'entità del coinvolgimento midollare e facilita la dimostrazione della clonalità. Generalmente il coinvolgimento midollare è presente nella maggior parte dei casi, sebbene in entità variabile e non correlato con la severità dei sintomi o con il grado delle citopenie⁽¹⁾.

Nella T-LGLL, le cellule leucemiche esprimono, nella maggior parte dei casi, un fenotipo tipico delle cellule T mature post-timiche effetttrici, caratterizzate dalla positività per CD3, TCR $\alpha\beta$, CD8, CD16, e CD57 e negatività per CD4; inoltre, vi è espressione costitutiva di granzimi B, perforine, TIA-1, CD2, CD45RA, CD69, CD122 (IL2R β , p75), ma non di CD25 (IL2R α , p55). Negativi sono anche il CD27, CD28, CD45RO e CD62L⁽³⁷⁾. Il pattern CD45RA+/CD62L- permette di identificare gli LGL nella classe dei linfociti T memoria effettori (TEMRA)⁽⁴⁾. L'espressione aberrante di marker pan-T quali, CD5 e CD7, può essere d'aiuto per la diagnosi differenziale con altre proliferazioni di LGL di tipo reattivo⁽¹⁾. Rare sono le forme che esprimono il CD4, da solo o in associazione

con CD8, e tipicamente co-esprimono CD56 e CD57⁽³⁸⁾ mentre le forme CD8+/CD56+ identificano un sottotipo a decorso più aggressivo⁽⁷⁾. Le alterazioni citogenetiche sono inusuali e riscontrate in meno del 10% dei casi; le più frequenti sono la delezione del 6q, inversione del cromosoma 14 e del cromosoma 7⁽¹⁾, ma di regola non sono presenti alterazioni citogenetiche clonali.

Cruciale è nella diagnosi di T-LGLL la dimostrazione della clonalità che, attualmente, può essere eseguita mediante studio del riarrangiamento dei geni del TCR β e γ mediante PCR o, come surrogato, utilizzando la citometria a flusso con anticorpi monoclonali diretti contro la regione variabile del TCR (V β)⁽¹⁰⁾; questa metodica, tuttavia, non sostituisce completamente la biologia molecolare, in quanto gli anticorpi attualmente disponibili coprono all'incirca il 70% del patrimonio V β esistente⁽³⁹⁾.

Per quanto riguarda le forme NK, le cellule patologiche generalmente esprimono CD2, CD16, CD56, CD45RA, CD57 variabile, CD94 e talora CD3 ϵ citoplasmatico ma non CD3 di membrana, mantenendo, come atteso, una configurazione *germline* per i geni β e γ del TCR⁽¹⁰⁾, risultando, quindi, impossibile la dimostrazione della clonalità mediante lo studio del riarrangiamento dei geni del

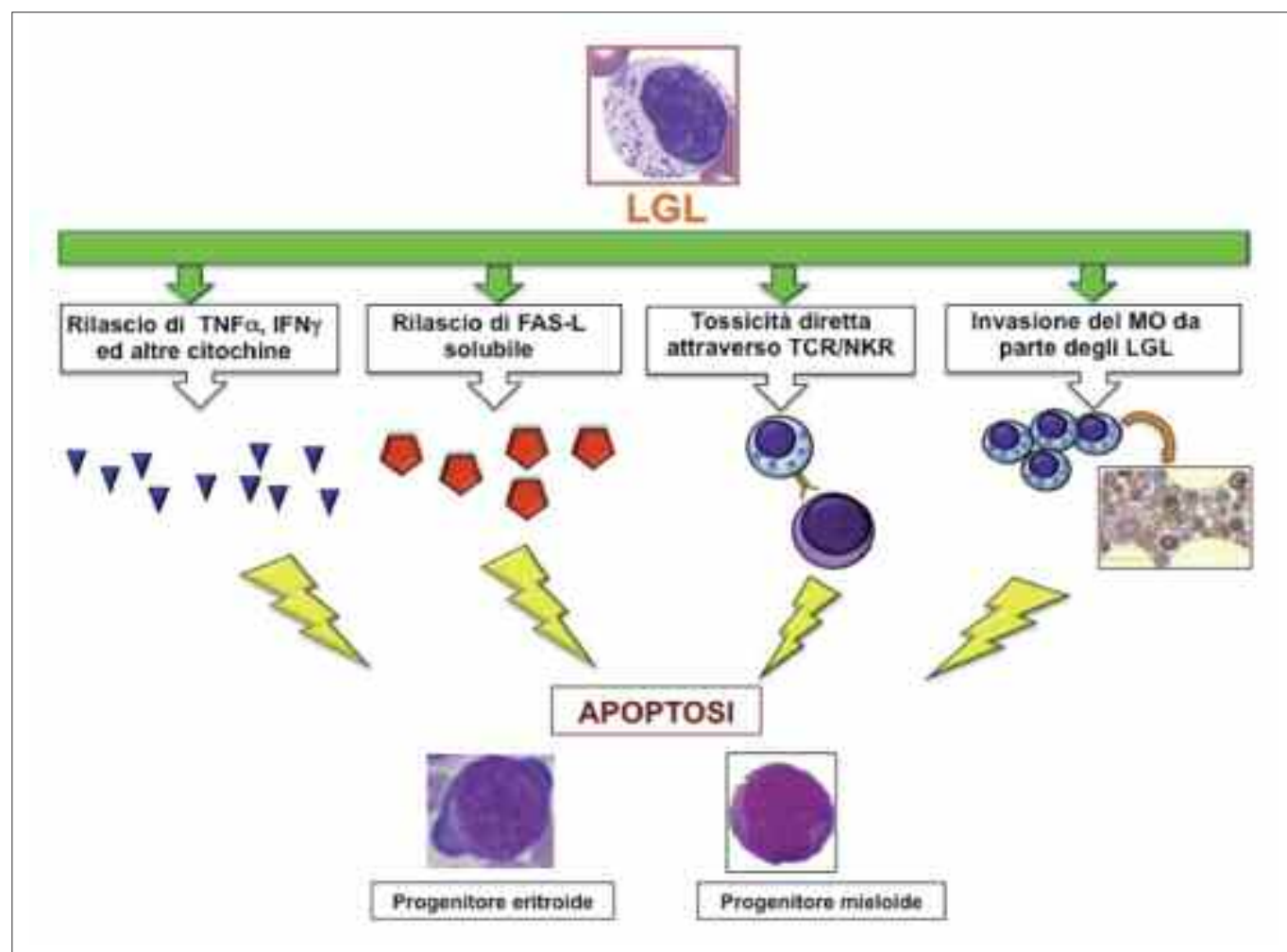


Figura 4 – Possibili meccanismi patogenetici delle citopenie nella LGLL (MO: midollo osseo).

TCR. In alcuni casi è stato possibile dimostrare la natura monoclonale dell'espansione mediante studio dei RFLPs (*Restriction fragment length polymorphism*) e del *pattern* di metilazione dei geni del cromosoma X, sebbene la maggior parte dei casi è dimostrata essere di tipo policlonale. Per questa ragione, risulta utile ai fini diagnostici l'identificazione mediante citofluorimetria di restrizione di espressione dei KIR come surrogato di clonalità ^(21,22,40).

Terapia

La T-LGLL, per il suo andamento indolente, non necessita sempre di trattamento. Nel paziente asintomatico è consigliata solo un'attenta osservazione. Il trattamento trova indicazione in presenza di neutropenia grave ($\leq 0,5 \times 10^9/l$) o moderata ma con infezioni ricorrenti, anemia e trombocitopenia sintomatiche o trasfusione-dipendenti, condizioni autoimmuni associate, malattia in progressione con organomegalia, sintomi B e rapido aumento degli LGL ⁽³⁶⁾.

Sebbene non esista un trattamento standard sulla base di studi clinici randomizzati, la terapia di prima linea utilizzata è generalmente una terapia a base di metotrexate (MTX) o ciclofosfamide a dosaggi immunosoppressivi o ciclosporina A (CyA).

La terapia a base di MTX a basse dosi per os (10 mg/m²/settimana) si è dimostrata efficace nel trattamento dell'artrite reumatoide e determina miglioramento dei sintomi reumatologici e della neutropenia secondaria associata; uno studio includente 62 pazienti trattati con MTX ha evidenziato un tasso di risposta globale del 55% ⁽⁴¹⁾. La durata del trattamento non è ben definita; in genere, se la terapia è ben tollerata, può essere continuata a tempo indeterminato ⁽³⁶⁾.

Tra gli agenti alchilanti, la ciclofosfamide (dose orale giornaliera di 50-100 mg per os) è stata usata con buoni risultati nel trattamento sia delle forme T che NK, con tassi di risposta paragonabili a quelli del MTX; in particolare, si è dimostrata efficace nei pazienti con LGLL e coesistente PRCA ^(42,43). Inoltre, una buona percentuale di

pazienti che falliscono la terapia di prima linea con MTX rispondono ad un trattamento di seconda linea con ciclofosfamide. Un recente *report* del gruppo franco-italo-americano ha analizzato retrospettivamente 45 pazienti trattati con ciclofosfamide, evidenziando un tasso di risposte globali pari al 71%, con 47% di risposte complete, senza distinzione significative tra forme T e NK. La terapia non deve essere intrapresa per più di 9-12 mesi per evitare complicanze secondarie quali SMD o leucemia acuta mieloide ⁽⁴⁴⁾.

In alternativa a MTX e ciclofosfamide, può essere utilizzata la ciclosporina A al dosaggio di 3-5 mg/kg/die; questo trattamento è in grado di dare una risposta globale nel 60% circa dei pazienti, in particolare in quelli che esprimono HLA-DR4, con necessità di monitoraggio dei livelli di pressione arteriosa e della funzionalità renale ^(41,45,46).

Attualmente si consiglia di utilizzare come farmaci di scelta in prima linea MTX o ciclofosfamide, con una risposta che deve essere valutata mediante controlli seriati dell'emocromo per almeno 4 mesi; l'utilizzo della ciclosporina è indicato nei pazienti che non rispondono alla terapia di prima linea. Si parla di risposta ematologica completa quando i valori dell'emocromo ed i livelli di LGL circolanti tornano nella norma (Hb > 12g/dl, ANC > 500x10⁹/l, Plt = 150.000x10⁹/l); in aggiunta, si parla di risposta molecolare completa quando, mediante PCR, non si evidenzia il clone T. Si definisce risposta parziale, invece, un miglioramento dei valori dell'emocromo in assenza di risposta completa ⁽⁴⁷⁾. In entrambi i casi, la terapia va mantenuta per almeno quattro mesi prima di considerare un'assenza di risposta e passare ad un regime terapeutico alternativo ^(10,36,47).

I corticosteroidi in monoterapia sono poco efficaci soprattutto per la durata minima delle remissioni ma, in associazione con MTX o ciclofosfamide, danno una rapida risoluzione dei sintomi B e delle alterazioni ematologiche ^(1,10,36). Il trattamento con corticosteroidi ad alte dosi, poiché va continuato per periodi lunghi non è esente da effetti collaterali.

Nei pazienti affetti da T-LGLL può essere d'aiuto una terapia antibiotica profilattica, soprattutto se i pazienti presentano una severa neutropenia sintomatica ed assumono terapia corticosteroidica. L'utilizzo di fattori di crescita, quali ESA (*Erythropoietin Stimulating Agents*) e GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*), può essere utile per il trattamento delle citopenie, ma di solito per periodi limitati ⁽³⁶⁾.

Il trattamento con agenti chemioterapici deve essere preso in considerazione nei pazienti refrattari o ricaduti con la sola terapia immunosoppressiva e nei pazienti giovani con importante infiltrazione midollare, nei quali la malattia presenta un andamento aggressivo. L'uso di farmaci analoghi delle purine quali pentostatina, fludarabina e 2-clorodeossadenosina ha dato risultati molto promettenti anche se solo in un piccolo gruppo di pazienti.

Anticorpi monoclonali quali alemtuzumab (anti-CD52), *humanized* MiK-β-1 (anti-CD122) e sipilizumab (anti-CD2) stanno entrando

Disordini ematologici associati alla T-LGLL:	Disordini autoimmuni non ematologici associati alla T-LGLL:
Anemia emolitica autoimmune	Artrite reumatoide
Aplasia pura della serie rossa	Sindrome di Felty
Anemia aplastica	Tiroidite di Hashimoto
Emoglobinuria parossistica notturna	Sindrome poliendocrina autoimmune
Sindrome mielodisplastica	Lupus eritematoso sistemico
Trombocitopenia immune	Sindrome di Sjogren
Hairy cell leukemia e disordini linfoproliferativi delle cellule B	
MGUS e Mieloma multiplo	
Linfoma di Hodgkin	

Tabella 1 – Disordini ematologici e autoimmuni associati alla T-LGLL.

a far parte dei nuovi scenari terapeutici. Alemtuzumab è utilizzato nei pazienti in cui il trattamento con fludarabina è fallito ma, dato il potente effetto immunosoppressivo, richiede una terapia antibiotica profilattica e il monitoraggio di CMV ⁽³⁶⁾.

Gli inibitori delle farnesil-trasferasi quali il tipifarnib, che inibiscono la via di Ras costitutivamente attivata nella T-LGLL, hanno dimostrato diminuire l'infiltrazione midollare e ridurre la quota degli LGL nel sangue periferico ⁽⁴⁸⁾. Nei pazienti in cui vi sia l'associazione di citopenia e splenomegalia può essere utile la splenectomia, ma generalmente i vantaggi sono limitati ⁽³⁶⁾. Per i pochi casi descritti di T-LGLL ad andamento fulminante con immunofenotipo CD3+ CD8+

CD56+ CD57+, è stato proposto uno schema terapeutico più aggressivo che prevede un regime di induzione simile a quello della leucemia linfatica acuta seguito da consolidamento e chemioterapia ad alte dosi se la risposta è completa ⁽⁷⁾.

La terapia del NK-CLPD è sovrapponibile a quella delle più comuni forme T, anche se la patologia necessita di trattamento in una percentuale di casi minore.

I pazienti con ANKL, invece, presentano scarsa risposta ai regimi chemioterapici tradizionali e necessitano di terapie simili a quelle utilizzate nelle leucemie linfoblastiche acute, con eventuale consolidamento con trapianto allogenico nei pazienti che rispondono ⁽⁴⁹⁾.

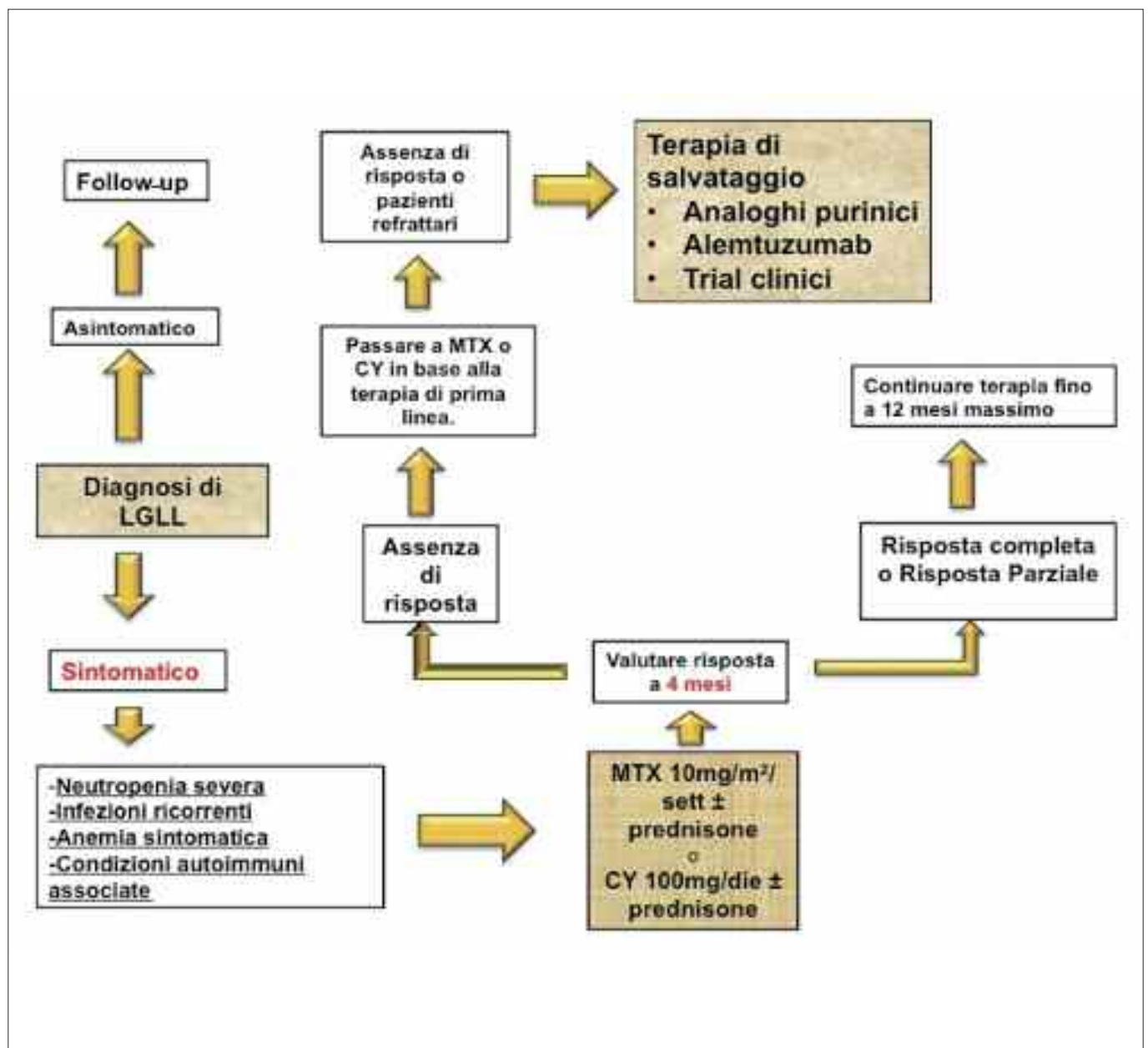


Figura 5 – Approccio terapeutico alla LGLL (MTX: metotrexate; CY: ciclofosfamide).

Bibliografia

- Alekshun TJ, Sokol L. Diseases of large granular lymphocytes. *Cancer Control*. 2007;14(2):141-150.
- Sokol L, Loughran TP, Jr. Large granular lymphocyte leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2007;2(4):278-282.
- McKenna RW, Parkin J, Kersey JH, Gajl-Peczalska KJ, Peterson L, Brunning RD. Chronic lymphoproliferative disorder with unusual clinical, morphologic, ultrastructural and membrane surface marker characteristics. *Am J Med*. 1977;62(4):588-596.
- Dearden C. Large granular lymphocytic leukaemia pathogenesis and management. *Br J Haematol*. 2011;152(3):273-283.
- Semenzato G, Marino F, Zambello R. State of the art in natural killer cell malignancies. *Int J Lab Hematol*. 2012;34(2):117-128.
- Gentile TC, Uner AH, Hutchison RE, Wright J, Ben-Ezra J, Russell EC, et al. CD3+, CD56+ aggressive variant of large granular lymphocyte leukemia. *Blood*. 1994;84(7):2315-2321.
- Alekshun TJ, Tao J, Sokol L. Aggressive T-cell large granular lymphocyte leukemia: a case report and review of the literature. *Am J Hematol*. 2007;82(6):481-485.
- Tordjman R, Macintyre E, Emile JF, Valensi F, Ribrag V, Burtin ML, et al. Aggressive acute CD3+, CD56- T cell large granular lymphocyte leukemia with two stages of maturation arrest. *Leukemia*. 1996;10(9):1514-1519.
- Macon WR, Williams ME, Greer JP, Hammer RD, Glick AD, Collins RD, et al. Natural killer-like T-cell lymphomas: aggressive lymphomas of T-large granular lymphocytes. *Blood*. 1996;87(4):1474-1483.
- Steinway SN, LeBlanc F, Loughran TP, Jr. The pathogenesis and treatment of large granular lymphocyte leukemia. *Blood Rev*. 2014;28(3):87-94.
- Shah MV, Zhang R, Loughran TP, Jr. Never say die: survival signaling in large granular lymphocyte leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2009;9 (Suppl 3):S244-253.
- Zambello R, Semenzato G. Large granular lymphocyte disorders: new etiopathogenetic clues as a rationale for innovative therapeutic approaches. *Haematologica*. 2009;94(10):1341-1345.
- Lamy T, Loughran TP, Jr. Current concepts: large granular lymphocyte leukemia. *Blood Rev*. 1999;13(4):230-240.
- Hodge DL, Yang J, Buschman MD, Schaughency PM, Dang H, Bere W, et al. Interleukin-15 enhances proteasomal degradation of bid in normal lymphocytes: implications for large granular lymphocyte leukemias. *Cancer Res*. 2009;69(9):3986-3994.
- Shah MV, Zhang R, Irby R, Kothapalli R, Liu X, Arrington T, et al. Molecular profiling of LGL leukemia reveals role of sphingolipid signaling in survival of cytotoxic lymphocytes. *Blood*. 2008;112(3):770-781.
- Liao A, Broeg K, Fox T, Tan SE, Watters R, Shah MV, et al. Therapeutic efficacy of FTY720 in a rat model of NK-cell leukemia. *Blood*. 2011;118(10):2793-2800.
- Epling-Burnette PK, Liu JH, Catlett-Falcone R, Turkson J, Oshiro M, Kothapalli R, et al. Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J Clin Invest*. 2001;107(3):351-362.
- Teramo A, Gattazzo C, Passeri F, Lico A, Tasca G, Cabrelle A, et al. Intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to maintain the JAK/STAT pathway aberrantly activated in T-type large granular lymphocyte leukemia. *Blood*. 2013;121(19):3843-3854.
- Koskela HL, Eldfors S, Ellonen P, van Adrichem AJ, Kuusanmaki H, Andersson EI, et al. Somatic STAT3 mutations in large granular lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366(20):1905-1913.
- Jerez A, Clemente MJ, Makishima H, Koskela H, Leblanc F, Peng Ng K, et al. STAT3 mutations unify the pathogenesis of chronic lymphoproliferative disorders of NK cells and T-cell large granular lymphocyte leukemia. *Blood*. 2012;120(15):3048-3057.
- Zambello R, Falco M, Della Chiesa M, Trentin L, Carollo D, Castriconi R, et al. Expression and function of KIR and natural cytotoxicity receptors in NK-type lymphoproliferative diseases of granular lymphocytes. *Blood*. 2003;102(5):1797-1805.
- Scquizzato E, Teramo A, Miorin M, Facco M, Piazza F, Noventa F, et al. Genotypic evaluation of killer immunoglobulin-like receptors in NK-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Leukemia*. 2007;21(5):1060-1069.
- Gattazzo C, Teramo A, Miorin M, Scquizzato E, Cabrelle A, Balsamo M, et al. Lack of expression of inhibitory KIR3DL1 receptor in patients with natural killer cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Haematologica*. 2010;95(10):1722-1729.
- Zambello R, Berno T, Cannas G, Baesso I, Binotto G, Bonoldi E, et al. Phenotypic and functional analyses of dendritic cells in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes (LDGL). *Blood*. 2005;106(12):3926-3931.
- Loughran TP, Jr., Hadlock KG, Yang Q, Perzova R, Zambello R, Semenzato G, et al. Seroreactivity to an envelope protein of human T-cell leukemia/lymphoma virus in patients with CD3- (natural killer) lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Blood*. 1997;90(5):1977-1981.
- Nyland SB, Krissinger DJ, Clemente MJ, Irby RB, Baab KT, Jarbada NR, et al. Seroreactivity to LGL leukemia-specific epitopes in aplastic anemia, myelodysplastic syndrome and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: results of a bone marrow failure consortium study. *Leuk Res*. 2012;36(5):581-587.
- Saunthararajah Y, Molldrem JL, Rivera M, Williams A, Stetler-Stevenson M, Sorbara L, et al. Coincident myelodysplastic syndrome and T-cell large granular lymphocytic disease: clinical and pathophysiological features. *Br J Haematol*. 2001;112(1):195-200.
- Karadimitris A, Li K, Notaro R, Araten DJ, Nafa K, Thertulien R, et al. Association of clonal T-cell large granular lymphocyte disease and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): further evidence for a pathogenetic link between T cells, aplastic anaemia and PNH. *Br J Haematol*. 2001;115(4):1010-1014.
- Liu X, Loughran TP, Jr. The spectrum of large granular lymphocyte leukemia and Felt's syndrome. *Curr Opin Hematol*. 2011;18(4):254-259.
- Zhang R, Shah MV, Loughran TP, Jr. The root of many evils: indolent large granular lymphocyte leukaemia and associated disorders. *Hematol Oncol*. 2010;28(3):105-117.
- Rose MG, Berliner N. T-cell large granular lymphocyte leukemia and related disorders. *Oncologist*. 2004;9(3):247-258.
- Semenzato G, Pandolfi F, Chisesi T, De Rossi G, Pizzolo G, Zambello R, et al. The lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. A heterogeneous disorder ranging from indolent to aggressive conditions. *Cancer*. 1987;60(12):2971-2978.
- Semenzato G, Zambello R, Starkebaum G, Oshimi K, Loughran TP, Jr. The lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: updated criteria for diagnosis. *Blood*. 1997;89(1):256-260.
- Oshimi K. Lymphoproliferative disorders of natural killer cells. *Int J Hematol*. 1996;63(4):279-290.
- Oshimi K. Progress in understanding and managing natural killer-cell malignancies. *Br J Haematol*. 2007;139(4):532-544.
- Lamy T, Loughran TP, Jr. How I treat LGL leukemia. *Blood*. 2011;117(10):2764-2774.
- Wlodarski MW, Nearman Z, Jankowska A, Babel N, Powers J, Leahy P, et al. Phenotypic differences between healthy effector CTL and leukemic LGL cells support the notion of antigen-triggered clonal transformation in T-LGL leukemia. *J Leukoc Biol*. 2008;83(3):589-601.
- Garrido P, Ruiz-Cabello F, Barcena P, Sandberg Y, Canton J, Lima M, et al. Monoclonal TCR-Vbeta13.1+/CD4+/NKa+/CD8-/dim T-LGL lymphocytosis: evidence for an antigen-driven chronic T-cell stimulation origin. *Blood*. 2007;109(11):4890-4898.
- Feng B, Jorgensen JL, Hu Y, Medeiros LJ, Wang SA. TCR-Vbeta flow cytometric analysis of peripheral blood for assessing clonality and disease burden in patients with T cell large granular lymphocyte leukaemia. *J Clin Pathol*. 2010;63(2):141-146.
- Epling-Burnette PK, Painter JS, Chaurasia P, Bai F, Wei S, Djeu JY, et al. Dysregulated NK receptor expression in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Blood*. 2004;103(9):3431-3439.
- Bareau B, Rey J, Hamidou M, Donadieu J, Morcet J, Reman O, et al. Analysis of a French cohort of patients with large granular lymphocyte leukemia: a report on 229 cases. *Haematologica*. 2010;95(9):1534-1541.
- Go RS, Li CY, Tefferi A, Phylly RL. Acquired pure red cell aplasia associated with lymphoproliferative disease of granular T lymphocytes. *Blood*. 2001;98(2):483-485.
- Fujishima N, Sawada K, Hirokawa M, Oshimi K, Sugimoto K, Matsuda A, et al. Long-term responses and outcomes following immunosuppressive therapy in

- large granular lymphocyte leukemia-associated pure red cell aplasia: a Nationwide Cohort Study in Japan for the PRCA Collaborative Study Group. *Haematologica*. 2008;93(10):1555-1559.
44. Moignet A, Hasanali Z, Zambello R, Pavan L, Bareau B, Tournilhac O, et al. Cyclophosphamide as a first-line therapy in LGL leukemia. *Leukemia*. 2014;28(5):1134-1136.
45. Battiwalla M, Melenhorst J, Sauntharajah Y, Nakamura R, Molldrem J, Young NS, et al. HLA-DR4 predicts haematological response to cyclosporine in T-large granular lymphocyte lymphoproliferative disorders. *Br J Haematol*. 2003;123(3): 449-453.
46. Mohan SR, Maciejewski JP. Diagnosis and therapy of neutropenia in large granular lymphocyte leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2009;16(1):27-34.
47. Zhang D, Loughran TP, Jr. Large granular lymphocytic leukemia: molecular pathogenesis, clinical manifestations, and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:652-659.
48. Epling-Burnette PK, Sokol L, Chen X, Bai F, Zhou J, Blaskovich MA, et al. Clinical improvement by farnesyltransferase inhibition in NK large granular lymphocyte leukemia associated with imbalanced NK receptor signaling. *Blood*. 2008;112(12):4694-4698.
49. Greer JP, Mosse CA. Natural killer-cell neoplasms. *Curr Hematol Malig Rep*. 2009;4(4):245-252.

Parole Chiave

LGL, citopenia, clonalità, terapia immunosoppressiva.

Indirizzi per la corrispondenza

Gianpietro Semenzato

Tel. (+39) 049 8212298

Fax (+39) 049 8211970

E-mail: g.semenzato@unipd.it

ESSERCI.

Con un tumore del sangue è difficile pensare ad altro. Celgene sviluppa terapie contro le sindromi mielodisplastiche che danno più tempo per vivere i momenti. La persona. La tua vita.

celgene.com

Improving the lives of patients worldwide.



La rivista è consultabile anche sui siti web:

Società Italiana di Ematologia (SIE)

www.siematologia.it

Società Italiana di Ematologia Sperimentale (SIES)

www.siesonline.it

Fondazione Beat Leukemia Dr Alessandro Cevenini

www.beat-leukemia.com

Nel prossimo numero: Anno2 - Numero 1 - 2015

Il mieloma multiplo nell'era dei nuovi farmaci

Patogenesi

Fattori prognostici

Terapia continuativa

Trapianto di cellule staminali

Gestione delle complicanze

Con il supporto non condizionato di

