



OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO, MANGIAGALLI E REGINA ELENA

FONDAZIONE IRCCS DI NATURA PUBBLICA

Milano, 17/01/2006

PIANO DI ATTIVITA'

Titolo della ricerca:

DIAGNOSI E TERAPIA DELLA SINDROME NEFROSICA CORTICORESISTENTE DA
GLOMERULOSCLEROSI FOCALE

Sede principale della ricerca:

- U.O. Nefrologia ed Emodialisi
Fondazione IRCCS, Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena
Direttore Dr. Alberto Edefonti
Responsabile U.O.S. Terapia Medica del Trapianto Renale
Dr.ssa Luciana Ghio

Unità Operative collaboranti:

STRUTTURA	ISTITUZIONE	RESPONSABILE
U.O. Nefrologia e Dialisi Pediatrica	Fondazione IRCCS, Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena Milano	A. Edefonti
U.O. Patologia Medica Laboratorio di Genetica Medica Laboratorio di Genetica Medica	Fondazione IRCCS, Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena Milano	E. Torresani D. Coviello M. Travi
U.O. Pediatria Clinica Pediatrica, Ematologia pediatrica	Nuovo Ospedale San Gerardo, Monza	A. Biondi
UCSF, Department of Surgery	513 Parnassus Avenue, S-320 San Francisco, CA 94143-0104.	F. Vincenti
U.O. Ematologia	IRCCS Policlinico SanMatteo, Pavia	
U.O. Nefrologia e Dialisi e Trapianto Pediatrico	Istituto Gaslini Genova	G.M. Ghiggeri
U.O. di Medicina Clinica	Ospedale Cattinara Trieste	M. Carraro

U.O. Nefrologia ed Emodialisi Pediatrica Direttore dott. Alberto Edefonti
via Commenda,9 20122 MILANO
Tel. 0257992883-2467 fax 0257992451 e-mail: nefrologia.pediatrica@icp.mi.it

Background del progetto

- La glomerulosclerosi focale (GSF) è una lesione di sclerosi di una parte del glomerulo renale, dapprima presente in alcuni glomeruli e che poi si estende progressivamente a tutti i glomeruli dei reni. Nel contesto clinico della sindrome nefrosica corticoresistente, il riscontro di una lesione di GSF rappresenta un fattore prognostico negativo e caratterizza i bambini con evoluzione spesso rapida ad insufficienza renale terminale. Per quanto riguarda le cause e i meccanismi che conducono alla GSF, sono state recentemente identificate forme di sindrome nefrosica corticoresistente legate a difetti ereditari nella sintesi di proteine della membrana basale glomerulare e si è quindi esteso, e forse non ancora completato, il campo delle possibili cause, precedentemente limitato a fattori immunologici cellulari.

Per quanto riguarda la componente genetica, sono riportate mutazioni di componenti strutturali del podocita renale. I geni coinvolti in tale malattia codificano quindi per elementi che costituiscono la membrana basale del podocita renale: proteine quali la podocina (NPHS2), la nefrina (NPHS1), la CD2AP (CD2 proteina collegata) e componenti del citoscheletro, quali l' α actinina (ACTN4). Studi recenti hanno riscontrato mutazioni a carico del gene codificante la podocina in alcuni casi di GSF sporadiche. Inoltre sono stati identificati anche polimorfismi funzionali a carico del promotore NPHS2: questo viene considerato non come causa di malattia, ma come suscettibilità genetica allo sviluppo della stessa. Quindi, ci sono casi di GSF che, in particolari condizioni di stress, come può essere il trapianto renale, sviluppano la recidiva della malattia sul rene trapiantato.

Per quanto riguarda la componente immunologica, negli ultimi 20 anni si sono accumulate numerose evidenze che la GSF è associata ad alterazioni del sistema immunitario. Infatti la GSF può essere associata ad atopia, a malattia linfoproliferativa, ad aumentata produzione di citochine da parte dei T helper e ad una produzione di fattori di permeabilizzazione della membrana basale dei glomeruli renali da parte dei T linfociti. Queste alterazioni immunologiche potrebbero a loro volta avere una base genetica ed essere comunque responsabili della recidiva di GSF sul rene trapiantato. È probabile quindi che, sotto al termine di GSF si nascondano differenti malattie, per alcune delle quali soltanto sono noti i fattori che le determinano.

Una diagnosi più precisa secondo le categorie sinora note rappresenta quindi il primo passo per poter impostare un trattamento individualizzato. È noto infatti che i pazienti con difetti genetici non rispondono alla terapia corticosteroidica, né a quella immunosoppressiva: una diagnosi di forma genetica permetterebbe quindi di evitare trattamenti farmacologici lunghi e gravati da severi effetti collaterali. In questi pazienti invece, il trapianto renale rappresenta la terapia più razionale. Per i pazienti con GSF da fattori immunologici, le possibili soluzioni terapeutiche sinora seguite implicano, da una parte, l'immunosoppressione delle linee cellulari responsabili della produzione di linfocine, dall'altra la rimozione, con plasmaferesi, dei fattori plasmatici responsabili del danno. I risultati dei vari trattamenti

proposti non sono stati tuttavia risolutivi, almeno per la parte di pazienti con manifestazioni severe della malattia.

- Il trapianto renale costituisce un'opzione terapeutica valida per i pazienti affetti da insufficienza renale terminale. Vi sono però pazienti difficilmente trapiantabili perché affetti da particolari malattie di base, quale la stessa Glomerulosclerosi Focale (GSF) associata alla Sindrome Nefrosica corticoresistente. Questa malattia recidiva nel 25-50% dei casi dopo il primo trapianto e nel 75-100% dopo il secondo trapianto. Le strategie terapeutiche attualmente a disposizione per trattare la recidiva di GSF sul rene trapiantato si avvalgono dell'utilizzo di farmaci immunosoppressori e di trattamenti di aferesi. La terapia immunosoppressiva si basa sull'utilizzo di corticosteroidi in associazione ad altri farmaci; i corticosteroidi vengono somministrati solitamente in boli endovena e quindi per os. I farmaci utilizzati in associazione sono gli inibitori delle calcineurine, quali Ciclosporina A ad alte dosi e in aggiunta gli agenti antilinfocitari, quali Micofenolato Mofetile, se prima non era somministrato. Le tecniche di aferesi [la plasmaferesi convenzionale (PF) e l'immunoadsorbimento con proteina A (IA)] si basano sul presupposto che esista un fattore circolante proteinurico; queste metodiche consentono di negativizzare l'attività di permeabilità presente nel plasma dei pazienti in oggetto, con successiva riduzione della proteinuria. L'efficacia di tali schemi terapeutici non sempre fornisce i risultati attesi: infatti, la recidiva di FSGS si può verificare anche a distanza di poche ore dal trapianto. Si può quindi affermare che vi è molto spazio ancora per nuovi interventi terapeutici.

Obiettivi principali

- Precisare la diagnosi di FSGS con studi genetici atti a individuare le forme ereditarie e le forme sporadiche di malattia attraverso l'analisi dei geni coinvolti: NPHS1, NPHS2, ACTN4, CD2AP.
- Attuare studi immunologici e di proteomica su sangue e urine dei pazienti affetti, come marker di malattia e di attività della malattia
- Valutare le opzioni terapeutiche nelle diverse fasi della malattia

Personale specificamente dedicato e competenze necessari (U.O. Nefrologia ed Emodialisi Pediatrica, Fondazione IRCCS, Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena)

- 1 borsista della Fondazione "La nuova speranza. Lotta alla Glomerulosclerosi Focale"
- 1 specializzando nefrologo con borsa di studio all'estero.

Fasi principali, workpackages, protocolli e metodologie

1. **Indagine epidemiologica** dei casi di sindrome nefrosica corticoresistente da GSF seguiti presso l'U.O. di Nefrologia e Dialisi Pediatrica secondo il questionario appositamente preparato. I pazienti saranno divisi in 5 gruppi corrispondenti ad altrettante fasi di malattia:

- fase A: pazienti con malattia pre-IRC
- fase B: pazienti con malattia, in dialisi pre primo trapianto
- fase C: pazienti con malattia post primo trapianto
- fase D: pazienti con malattia post-secondo trapianto
- fase E (gruppo controllo): pazienti con trapianto funzionante

2. **Indagine eziopatogenetica:** Dal momento che è proponibile uno schema che prevede una patogenesi della GSF multifattoriale, genetica ed immunologica, saranno effettuate le seguenti indagini in tutti i 5 gruppi di pazienti:

- Analisi genetica: ricerca delle mutazioni a carico dei geni codificanti per la podocina (NPHS2), nefrina (NPHS1), CD2 proteina collegata (CD2AP) e α -actinina (ACTN4).
- Studio immunologico :
 - o ricerca del fattore plasmatico in grado di alterare la permeabilità della membrana basale del podocita. L'esistenza di questo fattore è sostenuta da diverse osservazioni: a) la recidiva di sindrome nefrosica sul rene trapiantato; b) l'infusione di siero, proveniente da pazienti con recidiva di malattia sul rene trapiantato, in modelli animali, provoca alterazione della permeabilità della membrana basale e sindrome nefrosica; c) l'utilizzo di plasmateresi o di immunoassorbimento con proteina A determina una riduzione o una remissione della proteinuria in tali pazienti.
 - o alterazioni immunologiche: sono stati condotti una serie di studi riguardanti le sottopopolazioni linfocitarie e la funzione dei linfociti in questo tipo di pazienti, che hanno permesso di stabilire un'anormalità dei linfociti T e quindi un ruolo di causalità degli stessi nella patogenesi della GSF. Sono quindi coinvolti i linfociti T (in particolare i T-helper) e le citochine da essi prodotte (in particolare IL2, INF- γ , IL4, IL6, TNF- β): il quadro di anormalità della produzione di citochine potrebbe dipendere da una sintesi intracellulare alterata della maggior parte delle sottopopolazioni linfocitarie. Recentemente è stata individuata una nuova possibile causa di sindrome nefrosica, correlata soprattutto con la recidiva di GSF: la presenza di molecole costimolatorie CD80 (B7) espresse a livello podocitario. Le CD80 sono proteine di membrana espresse in maniera costitutiva sulle cellule dendritiche e, dopo induzione, sulla superficie dei linfociti B e delle APC. Tali

molecole hanno come ligando i CD28 e i CTLA4 presenti sulla superficie dei linfociti T: il loro legame permette di ottenere un'attivazione piena dei linfociti T in risposta all'antigene. Studi recenti hanno dimostrato che queste molecole sono up-regolate a livello podocitario e contribuiscono alla patogenesi della proteinuria modificando la permeabilità della membrana podocitaria.

In tutti i pazienti arruolati nel nostro piano di attività verrà quindi ricercata la presenza del fattore plasmatico e individuato l'assetto immunologico con lo studio delle diverse sottopopolazioni linfocitarie coinvolte nella malattia secondo gli studi già condotti.

Sulla base dei risultati ottenuti ogni gruppo di pazienti sarà diviso in due sottogruppi: 1) pazienti con alterazioni genetiche della membrana basale del podocita renale e 2) pazienti con alterazioni immunologiche responsabili del danno della membrana basale.

- **Proteomica:** il termine proteomica definisce un'analisi sistematica dell'identità, della qualità e della funzione delle proteine e indica quindi lo studio di tutte le proteine espresse da un organismo, tessuto o cellula in un preciso istante; in relazione ad uno stato fisiologico o patologico (età, malattia, influenze ambientali) lo stesso tipo di cellule esprime proteine differenti. Tale scienza si avvale di metodologie specifiche, alcune ancora in fase di perfezionamento: elettroforesi bidimensionale, spettrometria di massa, microarray. L'analisi di tali proteine può essere eseguita sia su sangue che su urine. Studi recenti hanno individuato l'esistenza una serie di biomarker urinari riscontrati in pazienti con Sindrome Nefrosica (albumina, transferrina, α 1-anti-tripsina, chininogeno e callicreina) e di biomarker caratteristici di GSF (riscontro nelle urine in pazienti affetti da tale malattia di ormone della crescita-GH). Altri studi recenti condotti su sangue, hanno permesso di individuare anticorpi circolanti contro podociti e cellule tubulari (anticorpi anti-actina/ATP sintetasi) in pazienti con Sindrome Nefrosica e GSF.

Sulla base degli studi sopra riportati, indagheremo la presenza di biomarker specifici, quali albumina, transferrina, α 1-anti-tripsina, chininogeno e callicreina su urine e anticorpi anti-actina/ATP sintetasi su sangue, in tutti i pazienti affetti da GSF per valutare l'attività di malattia e l'efficacie delle terapie impostate.

3. Nuove proposte terapeutiche: In ogni singolo paziente, esse saranno valutate, in relazione alla patogenesi della malattia. Dato il numero limitato di pazienti, non sarà effettuata randomizzazione a diversi trattamenti.

Le forme genetiche non saranno trattate con terapia immunosoppressiva nelle fasi pre-IRC e pre-primario trapianto (fasi A e B), ma solo con terapia conservativa e successivamente dialitica. Poiché le forme genetiche recidivano solo nell'1-2% dei casi di trapianto, nel caso di primo trapianto sarà attuata terapia immunosoppressiva convenzionale. In caso di eventuale recidiva post-trapianto (fasi C e D) si attuerà la terapia delle forme su base immunologica.

Le forme non genetiche, ovvero quelle su base immunologica, richiederanno una terapia immunosoppressiva aggressiva sia nella fase A che nelle successive, data la elevata frequenza di recidiva sul trapianto:

- utilizzo di nuovi anticorpi monoclonali, quali Campath 1H (Alemtuzumab, anti CD-52) o LEA29Y (Belatacept, inibitore delle molecole costimolatorie CD80-CD86)
- utilizzo di tecniche di aferesi, quali la chemofotoaferesi, associata o meno a plasmaferesi

In dettaglio, per le forme su base immunologica, dopo l'insuccesso degli schemi immunosoppressivi convenzionali comprendenti Ciclosporina e in seguito Tacrolimus + Micofenolato, saranno attivati i seguenti trattamenti:

- pazienti in fase A: chemofotoaferesi e plasmaferesi + terapia immunosoppressiva (Campath 1H)
- pazienti in fase B: chemofotoaferesi solo dopo dimostrazione di efficacia al trattamento della fase A
- pazienti in fase C: chemofotoaferesi e plasmaferesi + terapia immunosoppressiva (Campath 1H)
- pazienti in fase D: chemofotoaferesi e plasmaferesi solo dopo dimostrazione di efficacia al trattamento della fase A
-

Se sarà disponibile nel corso dei tre anni dello studio il LAE29Y, caratterizzato da minori effetti collaterali, questo potrà sostituire il Campath 1H.

4. Valutazione della risposta terapeutica a follow-up: Essa sarà basata sulla determinazione della proteinuria (Pru/Cru) e dei parametri ematologici ad essa correlati, monitorati regolarmente nel tempo.

Durata (in mesi 36):

- Durante i primi mesi del 2006 avverrà il reclutamento dei pazienti già esistenti (valutazione epidemiologica). Attualmente sono disponibili un numero complessivo di 35 pazienti così suddivisi:

- fase A: 15
- fase B: 3

- fase C: 5
- fase D: 0
- fase E: 12

E' possibile durante tutta la fase dello studio (36 mesi) il reclutamento di nuovi pazienti il passaggio dei pazienti tra i diversi gruppi.

- Nei mesi successivi, verrà effettuato il prelievo di materiale biologico per lo studio eziopatogenetico di base (parametri genetici e parametri immunologici) nonché per i parametri metabolici (Su campione urine 24h: proteine/creatinina; su campione ematico: urea, creatinina, elettroliti, protidemia totale + albumina, calcio, fosforo, colesterolo e trigliceridi). Per l'esecuzione di tali indagini sono richiesti tempi tecnici, variabili da 6 mesi ad 1 anno, determinati dal numero di pazienti arruolati, dall'ottenimento dei campioni biologici da analizzare e dai tempi di consegna del risultato, legati alle metodiche eseguite presso centri esterni (Ospedale Gaslini di Genova, Ospedale Cattinara di Trieste), piuttosto che nei laboratori della Fondazione (Genetica Medica).
- In relazione al gruppo di appartenenza verranno definiti dei protocolli differenti di trattamento e di follow-up come sopra descritto, che richiederanno tempi di osservazione comunque prolungati. Ad esempio nei pazienti in dialisi in attesa di trapianto, il momento del trapianto costituirà il tempo 0 per l'inizio del follow-up. I pazienti saranno monitorati nei successivi 24 mesi in modo da valutare l'influenza delle condizioni genetiche ed immunologiche sull'outcome del trapianto
- Durante il periodo di studio i pazienti arruolati in ciascun gruppo verranno monitorati con valutazioni intermedie, come descritto, per definire l'evoluzione clinica della malattia e la risposta ad un determinato trattamento.