

## PROGETTI ASSEGNAZIONE RISORSE 5X1000-2018

### 1) Sviluppo di una strategia sostenibile per lo Screening Neonatale Genomico per la diagnosi precoce di malattie rare: studio pilota

Il Programma di Screening Neonatale (SN) è un'attività di medicina preventiva che identifica precocemente patologie rare, migliorando la qualità di vita dei neonati e offre loro opportunità di trattamento. Il test viene effettuato nelle prime ore di vita tramite un prelievo di sangue dal tallone del neonato, depositato su carta assorbente (Dried Blood Spot, DBS).

Obiettivo principale: verificare fattibilità di un programma di SN attraverso la messa a punto di test biochimici (immunofluorimetria e spettrometria di massa tandem) e genomici che consentono l'identificazione di malattie rare potenzialmente trattabili quali SMA, SCID, DMD, 21-ODH, XALD, AADCd, malattie lisosomiali (MPS I, GSDII, malattia di Anderson-Fabry, malattia di Gaucher) e le malattie da errori congeniti del metabolismo (ECM).

A seguito del calcolo dei cut-off relativi ai nuovi programmi di screening biochimici, della validazione della flow-chart per lo SN genomico con campioni anonimizzati, della creazione dell'informativa e del consenso informato, nonché dello sviluppo di pipeline analitiche e tools bio-informatici, e dopo l'approvazione da parte del CER il 10/10/2023, con questo programma di screening sono stati arruolati 300 neonati, nati presso l'IRCCS G. Gaslini, con peso alla nascita  $\geq 1800$  g ed età gestazionale  $\geq 38$  settimane. Ogni partecipante è stato sottoposto a test biochimici e genomici previa firma del consenso informato da parte dei genitori/tutori.

Risultati test biochimici: in tutti i 300 casi sono stati eseguiti screening di routine per ECM ed i nuovi screening per la DMD, 21-OHD, AADCd, X-ALD e malattie lisosomiali.

Risultati test genomici:

a) estratti e analizzati 191 campioni di DNA da DBS

b) identificati 2 profili patologici:

- SMA Tipo 2: rilevazione simultanea di 0 copie di SMN1 e 3 copie di SMN2

- PKU: identificazione "eterozigosi composta" in PAH.

c) altri 48 campioni sono in fase di processamento

Il progetto pilota ha mostrato risultati promettenti, evidenziando l'efficacia dei nuovi test biochimici e genetici nel rilevare patologie rare e trattabili in fase neonatale utilizzando come unica matrice biologica di partenza "una goccia di sangue". Inoltre la collaborazione multidisciplinare ha permesso l'implementazione di tecniche avanzate, garantendo tempestiva diagnosi e presa in carico del paziente presso le varie unità operative competenti dell'IRCCS G.

Gaslini.

### 2) Identificazione di nuovi biomarcatori nel neuroblastoma ad alto rischio per migliorare la stratificazione e il follow-up, predire la risposta all'immunoterapia e guidare scelte terapeutiche innovative

Nonostante l'uso di terapie combinate molto aggressive, la sopravvivenza dei bambini affetti da neuroblastoma ad alto rischio (HR-NB) rimane purtroppo limitata. Per questo motivo, il nostro progetto si è concentrato su due obiettivi: l'analisi approfondita del microambiente tumorale, con particolare attenzione al midollo osseo, una delle principali sedi di infiltrazione tumorale, e l'identificazione di nuovi approcci immunoterapeutici capaci di rafforzare la risposta del sistema immunitario contro il tumore.

Abbiamo studiato sia le cellule tumorali che quelle del sistema immunitario, focalizzandoci su macrofagi e cellule Natural Killer (NK), fondamentali nella risposta contro i tumori. Abbiamo isolato e analizzato gli esosomi, piccole vescicole prodotte dalle cellule che giocano un ruolo chiave nella comunicazione intercellulare e nella regolazione della risposta immunitaria. Abbiamo inoltre esplorato l'efficacia di nuovi approcci terapeutici, come il trapianto di cellule staminali emopoietiche da donatori sani, in particolare dopo selezione negativa dei linfociti T alfa/beta e B, e l'impiego di molecole multifunzionali innovative, i cosiddetti "NK cell engagers", capaci di attivare le cellule NK contro il tumore.

Grazie ai risultati ottenuti, sarà possibile migliorare la diagnosi e il monitoraggio dei bambini con HR-NB. L'analisi più dettagliata delle caratteristiche del tumore e del sistema immunitario consentirà inoltre di predire con maggiore precisione la risposta ai trattamenti, personalizzando sempre più il trattamento terapeutico, eventualmente introducendo approcci immunoterapeutici innovativi. Ci auguriamo che questi progressi possano in futuro migliorare la sopravvivenza e la qualità della vita dei piccoli pazienti.

1. Vitale C, Petretto A, Cortese C, Carta S, Dondero A, Lavarello C, Cangelosi D, Morini M, Bellora F, Arnaldi P, Loiacono F, Bruzzone S, Piacente F, Bruno S, Pessino A, Mammoliti S, Garaventa A, Conte M, Locati M, Norata G.D, Colonna M, Vivier E, Bottino C, Castriconi R. *Membrane IL-18 Identifies a Unique Human Macrophage Subset with Distinct Phenotypic and Functional Properties, Highlighting Macrophage Heterogeneity* (submitted).
2. Giordano C., Carlomagno S., Falco M., Cantoni C., Vitale M., Caruana I., Dirks J., Serio A., Muccio L., Bartalucci G., Bo A., Locatelli F., Bottino C. 1, Sivori S., Della Chiesa M. *CD94-driven in vitro expansion of highly functional adaptive NKG2C+ NKG2A- CD57+ NK cells from CMV+ healthy donors*. (Frontiers in Immunology, in press)
3. Bottino C, Picant V, Vivier E, Castriconi R. *Natural killer cells and engagers: Powerful weapons against cancer*. Immunol Rev. 2024 Nov;328(1):412-421. doi: 10.1111/imr.13384.
4. Bottino C, Vitale C, Dondero A, Castriconi R. *B7-H3 in Pediatric Tumors: Far beyond Neuroblastoma*. Cancers (Basel). 2023 Jun 21;15(13):3279. doi: 10.3390/cancers15133279.
5. Bottino C, Della Chiesa M, Sorrentino. *Strategies for Potentiating NK-Mediated Neuroblastoma Surveillance in Autologous or HLA-Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplants* (Basel). 2022 Sep 20;14(19):4548. doi: 10.3390/cancers14194548.
6. Marzagalli M, Pelizzoni G, Fedi A, Vitale C, Fontana F, Bruno S, Poggi A, Dondero A, Aiello M, Castriconi R, Bottino C, Scaglione S. *A multi-organ-on-chip to recapitulate the infiltration and the cytotoxic activity of circulating NK cells in 3D matrix-based tumor model*. Front Bioeng Biotechnol. 2022 Jul 25;10:945149. doi: 10.3389/fbioe.2022.945149.
7. Regis S, Dondero A, Spaggiari GM, Serra M, Caliendo F, Bottino C, Castriconi R. *miR-24-3p down-regulates the expression of the apoptotic factors FasL and BIM in human natural killer cells*. Cell Signal. 2022 Oct;98:110415. doi: 10.1016/j.celsig.2022.110415.
8. Vitale C, Marzagalli M, Scaglione S, Dondero A, Bottino C, Castriconi R. *Tumor Microenvironment and Hydrogel-Based 3D Cancer Models for In Vitro Testing Immunotherapies*. Cancers (Basel). 2022 Feb 17;14(4):1013. doi: 10.3390/cancers14041013.

### 3) Biochimica del neuroblastoma: dal metaboloma ai metaboliti verso una diagnostica di precisione

Il neuroblastoma (NB), il tumore solido extracranico pediatrico più comune. I pazienti con NB nel 90% dei casi presentano un aumento dell'escrezione dei metaboliti delle catecolamine, che sono comunemente misurati nelle urine come parte del workup diagnostico (comunemente definita come biochimica del NB). È stato recentemente dimostrato che essi hanno il potenziale di aumentare la sensibilità diagnostica e di predire l'outcome indipendentemente da altri fattori di rischio noti come lo stadio e l'amplificazione dell'oncogene MYCN. Il nostro laboratorio rappresenta un'eccellenza nell'ambito della biochimica del NB centralizzando questo tipo di analisi da molti centri italiani e avendo un ruolo chiave in uno studio clinico in corso di avvio nell'ambito della SIOPEN nei pazienti con NB ad alto rischio. Grazie ai fondi del 5x1000 abbiamo potuto acquisire strumentazione automatizzata per l'estrazione delle catecolamine dai fluidi biologici standardizzando i processi di analisi necessari per garantire elevata qualità alle nostre analisi. Le

catecolamine estratte con questa metodologia vengono poi analizzate mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS). Tra i metaboliti, la 3-O-methyldopa (3-OMD) è stata confermata dal nostro gruppo come nuovo biomarcatore di prognosi sfavorevole nel NB ad alto rischio, associato a età alla diagnosi, lo stadio M e l'amplificazione di MYC. Inoltre, cosa molto interessante, il 3-OMD è stato in grado di stratificare il sottogruppo di pazienti con stadio M, di età superiore ai 18 mesi, difficilmente stratificabili con fattori di rischio effettivi.

La 3-OMD rappresenta quindi un potenziale valore aggiunto per la caratterizzazione biochimica del NB.

Questo ci ha spinto a sviluppare un metodo analitico che potesse facilitare ulteriori studi sulla 3-OMD plasmatica mediante un micrometodo basato su spot plasmatici essiccati (DBS) e sulla LC-MS/MS.

Il DBS è un microcampione di plasma che può essere ottenuto mediante spotting del plasma su cartoncini di carta da filtro, quelli comunemente utilizzati per lo screening neonatale. Il nuovo metodo è stato validato sia nel plasma che nei DPS per uso clinico secondo le linee guida internazionali EMA-ICH per la validazione dei metodi bioanalitici.

Plasma e DBS sono stati sottoposti a convalida incrociata, dimostrando che i risultati ottenuti sulle due matrici sono intercambiabili con il grande vantaggio che la 3-OMD è stabile nel DPS a temperatura ambiente per almeno 10 giorni e facilitando così la spedizione e lo scambio di campioni tra i vari siti, condizione che potrebbe renderla applicabile in ampi studi clinici prospettici che potrebbero far centralizzare presso il nostro istituto i campioni provenienti dagli altri centri europei.

Oltre alla validazione della 3-OMD il progetto si è focalizzato sull'ottimizzazione della piattaforma diagnostica del pannello delle catecolamine urinarie e plasmatiche mediante spettrometria di massa ad altissima risoluzione (HR-MS). Rispetto alla LCMS/MS, la HRMS offre il vantaggio di poter effettuare una profilazione dei metaboliti che potrebbero essere maggiormente utile nel monitoraggio della malattia rispetto all'analisi targeted di alcuni metaboliti come sino ad ora effettuato.

Riassumendo questa ricerca ha consentito di fare ulteriori passi avanti importanti nella biochimica del NB a supporto della qualificazione del nostro istituto come importante centro di riferimento per la diagnosi e la cura del NB.

1. Matser, Y.A.H., Verly, I.R.N., van der Ham, M., de Sain-van der Velden, M.G.M., Verhoeven-Duif, N.M., Ash, S., Cangemi, G., Barco, S., Popovic, M.B., van Kuilenburg, A.B.P., Tytgat, G.A.M., Cañete, A., Wiczorek, A., Vicha, A., Alba, A., Ryan, A.L., Brichard, B., Yalçın, B., Martínez, B., Márquez, C., Klapkova, E., Schleiermacher, G., Deubzer, H., Ryberg, H., Øra, I., Sastry, J., Bugajska, J., Gray, J.C., Baka, M., Martínez, M.L., Phillips, M.B., Renard, M., Vermeersch, P., Alvaro, R.H., Almaraz, R.L., Simon, T., Ek, T., Segura, V., Papadakis, V., SIOPEN Catecholamine Working Group. *Optimising urinary catecholamine metabolite diagnostics for neuroblastoma*(2023) *Pediatric Blood and Cancer*, 70 (6), art. no. e30289, DOI: 10.1002/pbc.30289
2. Barco, S., Lavarello, C., Cangelosi, D., Morini, M., Eva, A., Oneto, L., Uva, P., Tripodi, G., Garaventa, A., Conte, M., Petretto, A., Cangemi, G. *Untargeted LC-HRMS Based-Plasma Metabolomics Reveals 3-O-Methyldopa as a New Biomarker of Poor Prognosis in High-Risk Neuroblastoma*(2022) *Frontiers in Oncology*, 12, art. no. 845936. DOI: 10.3389/fonc.2022.845936
3. Verly, I.R.N., Matser, Y.A.H., Leen, R., Meinsma, R., Fiocco, M., Koster, J., Volckmann, R., Savci-Heijink, D., Cangemi, G., Barco, S., Valentijn, L.J., Tytgat, G.A.M., van Kuilenburg, A.B.P. *Urinary 3-Methoxytyramine Is a Biomarker for MYC Activity in Patients With Neuroblastoma*(2022) *JCO Precision Oncology*, 6, art. no. e2000447 DOI: 10.1200/PO.20.00447
4. Sebastiano Barco, Davide Cangelosi, Alessia Cafaro, Martina Morini, Margherita Biondi, Federica Pigliasco, Lucilla Rossi, Fabrizio Mancin, Massimo Conte, Alberto Garaventa and Giuliana Cangemi *Measurement of 3-O-methyldopa from dried plasma microsamples by high-resolution mass spectrometry: a tool for the diagnosis of patients with high-risk neuroblastoma*. *Pediatric Blood and Cancer*. Under review

#### 4) Sviluppo di Servizi Innovativi di Analisi dei Dati Pediatrici basati su Sistemi Intelligenti Artificiali

L'intelligenza artificiale (IA) è una disciplina che si occupa dello sviluppo di metodi in grado di apprendere e prendere decisioni in relazione a un dato obiettivo. I tumori neuroblastici periferici (TNP) rappresentano i tumori solidi extracranici pediatrici più comuni.

Il riconoscimento ottico di schemi e quadri morfologici, così come la quantificazione degli indici, richiede tempi di processamento lunghi e presenta scarsa riproducibilità. La nostra prima ipotesi era che l'automatizzazione di queste valutazioni potesse risolvere tali inefficienze.

Le malattie monogeniche e multifattoriali rare (MMR) si sviluppano prevalentemente a causa di alterazioni genomiche, la cui diagnosi e trattamento rappresentano tuttora una sfida. La nostra seconda ipotesi era che l'individuazione di nuove correlazioni genotipo fenotipo potesse migliorare la diagnosi di queste patologie.

La realizzazione del progetto ha richiesto:

- la predisposizione di un sistema ad alte prestazioni in grado di processare l'elevata quantità di dati necessaria per l'allenamento delle IA;
- L'acquisizione di uno scanner Aperio per la scansione automatica dei preparati istologici;
- la segmentazione di 5.000 cellule da 40 nuove immagini generate di TNP;
- il processamento di 1.600 esomi e 1.500 fenotipi clinici di MMR;
- il disegno e l'implementazione dell'architettura delle IA;
- l'allenamento dell'IA sui dati;
- la validazione del potenziale predittivo dell'IA in collaborazione con esperti del settore;
- predisposizione dell'accesso al servizio.

Il progetto ha consentito di mettere a disposizione dei ricercatori del Gaslini due nuovi servizi innovativi basati su IA, denominati Omero e HPOPrioritizer. Omero ha raddoppiato la velocità di quantificazione dell'indice MKI nei TNP e HPOPrioritizer ha individuato 50 nuove correlazioni genotipo-fenotipo da validare per le MMR.

Il contesto pediatrico può trarre grandi benefici dalle potenzialità offerte da servizi basati su IA, sia nel supporto alle decisioni cliniche, sia nell'estrazione di informazioni rilevanti, riducendo al contempo i tempi di valutazione dei preparati istologici di TNP e di diagnosi genetica delle MMR. Nel prossimo futuro estenderemo i servizi ad altri tipi di imaging e di malattie genetiche pediatriche.

#### 5) Una piattaforma di ricerca per la valutazione personalizzata dell'efficacia di modulatori CFTR di ultima generazione e l'identificazione dei meccanismi di mancata risposta al trattamento

Il farmaco modulatore Elexacaftor / Tezacaftor / Ivacaftor (ETI) recupera il deficit di funzione della proteina CFTR nei pazienti con Fibrosi Cistica (FC), ma esiste una quota di poor responders. Il progetto ha valutato la relazione tra risposta clinica e microbiota polmonare ed intestinale, rescue di funzione in colture nasali primarie e livelli plasmatici di ETI.

L'analisi del microbiota polmonare ed intestinale tramite PCR di 7 regioni polimorfe del gene codificante l'unità ribosomiale 16S dei procarioti ed analisi di sequenziamento NGS in 101 campioni ha mostrato popolazioni microbiche più omogenee dopo ETI nelle feci rispetto all'espettorato.

E' stato sviluppato e convalidato un metodo LC-MS/MS accurato e riproducibile per la misurazione simultanea di IVA, TEZ ed ELX, che si è dimostrato adatto per il Therapeutic Drug Monitoring (TDM).

Studi funzionali sugli epitelii nasali generati in vitro da questi pazienti hanno dimostrato che il doppio mutante L467F-F508del ha un'attività gravemente ridotta, con un rescue trascurabile da parte dei modulatori CFTR.

I poor responders costituiscono una categoria eterogenea di individui, che comprende eziologie come irreversibilità del danno d'organo, peculiarità farmacodinamiche, alleli CFTR complessi. Modelli di cellule epiteliali nasali ex vivo aiutano a classificare correttamente gli individui, in presenza di discordanza tra quadro clinico, test del sudore e profilo genetico.

1. Pigliasco F, Cafaro A, Stella M, Baiardi G, Barco S, Pedemonte N, D'Orsi C, Cresta F, Casciaro R, Castellani C, Calevo MG, Mattioli F, Cangemi G. *Simultaneous Quantification of Ivacaftor, Tezacaftor, and*

*Elexacaftor in Cystic Fibrosis Patients' Plasma by a Novel LC-MS/MS Method*. Biomedicines 2023;11:628. PMID:36831163; DOI:10.3390/biomedicines11020628.

2. Federica Pigliasco, Alessia Cafaro, Sebastiano Barco, Federico Cresta, Rosaria Casciaro, Nicoletta Pedemonte, Francesca Mattioli, Carlo Castellani, Giuliana Cangemi. *A novel LC-MS/MS method for the measurement of Elexacaftor, Tezacaftor and Ivacaftor in plasma, Dried Plasma Spot (DPS) and Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) Devices*. Under review in *Pharmaceutics*. PMID: 40006567; DOI:10.3390/pharmaceutics17020200.
3. Tomati V, Capurro V, Pesce E, Pastorino C, Sondo E, Lena M, Borrelli A, Cresta F, Pantano S, Collini F, Ripani P, Terlizzi V, Fevola C, Costa S, Lucanto MC, Zara F, Bandiera T, Bocciardi R, Castellani C, Galietta LJV, Pedemonte N. *Pharmacological rescue of the G85E CFTR variant by preclinical and approved modulators*. *Front Pharmacol*. 2024 Nov 18;15:1494327. PMID: 39624835; DOI:10.3389/fphar.2024.1494327.
4. Terlizzi V, Pesce E, Capurro V, Tomati V, Lena M, Pastorino C, Bocciardi R, Zara F, Centrone C, Taccetti G, Castellani C, Pedemonte N. *Clinical Consequences and Functional Impact of the Rare S737F CFTR Variant and Its Responsiveness to CFTR Modulators*. *Int J Mol Sci*. 2023 Mar 31;24(7):6576. PMID: 37047546; DOI:10.3390/ijms24076576
5. Tomati V, Costa S, Capurro V, Pesce E, Pastorino C, Lena M, Sondo E, Di Duca M, Cresta F, Cristadoro S, Zara F, Galietta LJV, Bocciardi R, Castellani C, Lucanto MC, Pedemonte N. *Rescue by elexacaftor-tezacaftor-ivacaftor of the G1244E cystic fibrosis mutation's stability and gating defects are dependent on cell background*. *J Cyst Fibros*. 2023 May;22(3):525-537. PMID: 36543707; DOI: 10.1016/j.jcf.2022.12.005
6. Sondo E, Cresta F, Pastorino C, Tomati V, Capurro V, Pesce E, Lena M, Iacomino M, Baffico AM, Coviello D, Bandiera T, Zara F, Galietta LJV, Bocciardi R, Castellani C, Pedemonte N. *The L467F-F508del Complex Allele Hampers Pharmacological Rescue of Mutant CFTR by Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor in Cystic Fibrosis Patients: The Value of the Ex Vivo Nasal Epithelial Model to Address Non-Responders to CFTR Modulating Drugs*. *Int J Mol Sci*. 2022 Mar 15;23(6):3175. PMID: 35328596; DOI: 10.3390/ijms23063175
7. *Lung and gut microbiome modifications after prolonged Kaftrio treatment* Abstract at the 2023 European Cystic Fibrosis Conference.

## 6) Centro di Genomica IGG: ricerca di fattori di suscettibilità genetica per una medicina predittiva delle malattie pediatriche complesse

Mentre le malattie monogeniche rare sono già oggetto di studi approfonditi nel nostro Istituto, le malattie poligeniche relativamente comuni sono state trascurate in ambito genetico e genomico.

Il presente progetto si è pertanto proposto di avviare uno studio sulla genetica delle malattie poligeniche/multifattoriali quali obesità, malattie infiammatorie croniche, diabete ed altre che presentano un profilo genetico complesso caratterizzato da una ereditabilità limitata, indice del contributo significativo di fattori non geneticamente determinati.

Lo studio della predisposizione genetica per molte forme suddette si è basata sugli studi di associazione, sia caso-controllo (genome-wide association studies, GWAS) che family based (Transmission Disequilibrium Test, TDT). Inizialmente si sono reclutate diverse casistiche di pazienti affetti da malattie non Mendeliane, quali ad esempio specifiche malattie autoinfiammatorie (SURF=58), l'artrite idiopatica giovanile (AIG=175), la fibromialgia (FMG=88), raccogliendo dati clinici in appositi database. È poi stato effettuato il sequenziamento dell'intero genoma (WGS) per 110 dei 321 pazienti totali, seguito dall'analisi bioinformatica, oltre che dalle indagini statistiche/genetiche per identificare possibili fattori genetici di predisposizione.

Il sequenziamento di parte degli altri DNA è in corso, come anche le analisi dei dati WGS per AIG e per SURF. In quest'ultimo caso, dato il limitato numero di casi, si è proceduto ad integrare l'analisi genomica a quella di altre omiche nel frattempo generate per parte degli stessi campioni nell'ambito di altro progetto. Un tale approccio "multi-omico" ha permesso al momento di identificare, in via preliminare, quantitative trait loci (QTL) che complessivamente puntano ad un interessamento di pathways già note coinvolte nelle malattie autoinfiammatorie. In conclusione, i mezzi computazionali

attualmente a disposizione, e i big data che si possono estrarre da diversi campioni biologici dei pazienti, aumentano le nostre capacità discriminative anche in coorti limitate di pazienti.

1. Grossi A, Rosamilia F, Carestiato S, Salsano E, Ceccherini I, Bachetti T. *A systematic review and meta-analysis of GFAP gene variants in Alexander disease*. Sci Rep. 14(1):24341;2024. PMID:39420046;DOI:10.1038/s41598-024-75383-4
2. Grossi A, Rusmini M, Cusano R, Massidda M, Santamaria G, Napoli F, Angelelli A, Fava D, Uva P, Ceccherini I, Maghnie M. *Whole genome sequencing in ROHHAD trios proved inconclusive: what's beyond?* Front Genet. 14:1031074;2023. PMID: 37609037; DOI:10.3389/fgene.2023.1031074
3. Zambito M, Viti F, Bosio AG, Ceccherini I, Florio T, Vassalli M. *The Impact of Experimental Conditions on Cell Mechanics as Measured with Nanoindentation*. Nanomaterials (Basel). 13(7):1190;2023. PMID: 37049284;DOI: 10.3390/nano13071190.
4. Viti F, Pramotton FM, Martufi M, Magrassi R, Pedemonte N, Nizzari M, Zancchi FC, De Michele B, Alampi M, Zambito M, Santamaria G, Bajetto A, Sardar S, Tomati V, Gandullia P, Giampietro C, Florio T, Beltrame F, Vassalli M, Ceccherini I. *Patient's dermal fibroblasts as disease markers for visceral myopathy*. Biomater Adv. 148:213355;2023. PMID: 36893487; DOI:10.1016/j.bioadv.2023.213355
5. Tabarini N, Biagi E, Uva P, Iovino E, Pippucci T, Seri M, Cavalli A, Ceccherini I, Rusmini M, Viti F. *Exploration of Tools for the Interpretation of Human Non-Coding Variants*. Int J Mol Sci. 23(21):12977;2022. PMID: 36361767; DOI:10.3390/ijms232112977

## **7) Crioanalgesia per la gestione del dolore dopo la riparazione del pectus excavatum. Studio COPPER (Cryoanalgesia For Pain management after Pectus Excavatum Repair): studio randomizzato e controllato**

I pazienti sottoposti a correzione chirurgica del pectus excavatum con approccio mini-invasivo riferiscono spesso un forte dolore postoperatorio. L'obiettivo dello studio è determinare se la crioanalgesia è superiore rispetto alle cure standard per il ritorno ad una normale qualità di vita.

COPPER è uno studio randomizzato, controllato attivo, a gruppi paralleli (dispositivo medico di categoria IIb) progettato per pazienti sottoposti a riparazione del pectus excavatum. I partecipanti sono stati selezionati dalle liste chirurgiche elettive presso l'Istituto Gaslini, Genova, Italia. Una volta arruolati, i pazienti sono stati assegnati uno dei due bracci dello studio: crioanalgesia vs cura standard (analgesia basata su epidurale). L'outcome primario era la qualità della vita (PedsQL) e le sottocomponenti (salute psico-sociale e fisica) 14 giorni dopo l'intervento chirurgico.

Ottantotto pazienti sono stati arruolati nello studio: quarantacinque con crioanalgesia e quarantatré con il braccio epidurale. La mediana PedsQL (IQR) al 14° giorno era 59,8 (48,4, 71,2) vs 67,93 (58,7, 73,9) (IC 95%: 0,46-13, p=0,07), rispettivamente nel gruppo crioanalgesia e nel gruppo di cura standard. Indipendentemente dal trattamento, è stata riscontrata una diminuzione significativa sia del punteggio totale PedsQL che dei suoi sottocomponenti. Questo effetto persisteva quando stratificato per trattamento: la salute fisica ha mostrato una diminuzione significativa in entrambi i bracci, mentre la salute psico-sociale ha mostrato una diminuzione significativa nel braccio di cura standard (valore q = 0,028), ma non nel braccio della crioanalgesia (q- valore = 0,056).

La crioanalgesia non migliora il ritorno alla qualità di vita basale due settimane dopo l'intervento. Tuttavia, la crioanalgesia ha dimostrato di essere benefica nella componente psico-sociale della scala PedsQL e nel ridurre la durata della ospedalizzazione e facilitare la dimissione precoce.

1. Bastianello M, Torre M, Bonfiglio R, Calevo MG, Palomba L, Uva P, Kanapari A, Lorenzoni G, Disma N, on behalf of the COPPER consortium. *Cryoanalgesia for Pain management after Pectus Excavatum Repair (COPPER) in adolescents: a randomized controlled trial*. Ped Anesth. 2025 in press.
2. Trò R, Orecchia A, Disma N, Uva P, Cavanna R, Zanardi N, Torre M, Fato MM. *Comparison of Analgesia Methods Through a Web Platform in Patients Undergoing Thoracic Surgery: Pilot Design, Implementation, and Validation Study*. JMIR Form Res.2024 Oct 8;8:e56674. PMID: 39378419; DOI: 10.2196/56674

## **8) Diagnostica integrata e dinamica dei tumori cerebrali infantili per una terapia di precisione e personalizzata**

I tumori del Sistema Nervoso Centrale sono le neoplasie solide più frequenti in pediatria; in Italia se ne registrano 400 nuovi casi/anno e rappresentano ancora la principale causa di morte nei bambini affetti da tumore; per l'estrema eterogeneità che li contraddistingue, la 5° classificazione WHO raccomanda una diagnostica integrata, che prevede cioè definizione istologica e caratterizzazione biomolecolare.

Finalità del progetto è la profilazione molecolare dei tumori cerebrali sia alla diagnosi che alla recidiva, con particolare riferimento alle neoplasie gliali.

Il progetto si è articolato in più fasi: identificare il panel NGS (Next Generation Sequencing) più idoneo, analizzare i campioni selezionati, verificare i dati ottenuti per validare il panel, consolidare il modello organizzativo, standardizzare le procedure operative.

Si è utilizzato il Panel multigenico OncoPrint Comprehensive Assay Plus, con profilazione genomica basata sull'analisi del DNA e RNA di oltre 500 oncogeni, studio di mutazioni, fusioni, caratterizzazione di Instabilità da microsatellite (MSI), variazioni del numero di copie geniche (CNV), carico mutazionale tumorale (TMB).

Sono stati studiati 68 campioni: 20 gliomi maligni, 38 gliomi/tumori glioneuroni a basso grado, 8 tumori rari, 2 campioni di sangue periferico. In 22 casi l'analisi è stata condotta alla diagnosi, in 33 alla recidiva; 13 campioni erano di pazienti deceduti.

In 17/68 casi sono state riscontrate mutazioni/fusioni geniche rilevanti per la prognosi e l'attribuzione del giusto protocollo di terapia; in 27/68 casi sono state individuate alterazioni per le quali vi sono terapie target specifiche.

La percentuale dei casi studiati con successo, la proporzione di pazienti candidati a terapie personalizzate, la concordanza dei risultati nei casi già studiati in precedenza in altra sede, hanno permesso di validare la procedura rendendo il Progetto propedeutico a Protocolli Operativi e collaborazioni future.

1. Crocco M, Verrico A, Milanaccio C, et al. *Dyslipidemia in Children Treated with BRAF Inhibitor for Low Grade Gliomas: A New Side Effect?* *Cancers* (Basel). 2022 May 29;14(11):2693. doi:10.3390/cancers14112693. PMID:35681673

## **9) Monitoraggio dell'autoregolazione cerebrovascolare e valutazione dell'outcome neurologico in pazienti ricoverati in terapia intensiva neonatale e pediatrica**

Il monitoraggio della fisiologica autoregolazione del flusso ematico cerebrale al letto del paziente si sta affermando come metodica avanzata nei pazienti ad alto rischio di sviluppare complicanze neurologiche. L'obiettivo della ricerca è quello di implementarne l'utilizzo in sala operatoria e terapia intensiva, a partire da categorie di pazienti nel cui trattamento il mantenimento di un'adeguata perfusione cerebrale rappresenta una delle maggiori criticità.

Il software ICM+ (Cambridge University, UK) è stato utilizzato per calcolare in continuo gli indici di autoregolazione cerebrale derivati dai dati del monitoraggio della pressione arteriosa invasiva integrati con quelli della pressione intracranica invasiva (PRx) o della NIRS cerebrale (COx) e le metriche da essi derivate. Tale tecnologia è stata utilizzata per acquisire dati osservazionali presso l'IRCCS Gaslini e il Children's National Hospital di Washington, DC, con cui è attivo un protocollo di collaborazione.

I dati raccolti presso l'IRCCS Gaslini hanno contribuito a studi multicentrici internazionali riguardanti la pressione di perfusione cerebrale nel trauma cranico pediatrico severo (1) e il neuro-monitoraggio di pazienti pediatrici sottoposti ad ECMO (2,3). L'analisi dei dati raccolti presso il Children's National Hospital ha riguardato l'associazione tra disturbi dell'autoregolazione cerebrale e complicanze neurologiche avvenute dopo (4) o durante (5) cardiocirurgia in neonati affetti da cardiopatie congenite complesse. Una scoping review (6), ha presentato gli sviluppi correnti, in attesa di ulteriori risultati provenienti dalla coorte prospettica raccolta (n=80).

Il tempo speso con autoregolazione cerebrale alterata nel neonato e nel bambino critico può costituire un marker di aumentato rischio per complicanze neurologiche, ed è potenzialmente utilizzabile per guidare una gestione emodinamica neuroprotettiva e individualizzata in sala operatoria e in terapia intensiva.

1. Joram N, Beqiri E, Pezzato S, Andrea M, Robba C, Liet JM, Chenouard A, Bourgoïn P, Czosnyka M, Léger PL, Smielewski P. *Continuous Monitoring of Cerebral Autoregulation in Children Supported by Extracorporeal Membrane Oxygenation: A Pilot Study*. Neurocrit Care. 2021 Jun;34(3):935-945. doi: 10.1007/s12028-020-01111-1. Epub 2020 Oct 8. Erratum in: Neurocrit Care. 2023 Jun;38(3):831. PMID: 33029743.
2. Joram N, Beqiri E, Pezzato S, Andrea M, Robba C, Liet JM, Chenouard A, Bourgoïn P, Czosnyka M, Léger PL, Smielewski P. *Impact of Arterial Carbon Dioxide and Oxygen Content on Cerebral Autoregulation Monitoring Among Children Supported by ECMO*. Neurocrit Care. 2021 Oct;35(2):480-490. doi: 10.1007/s12028-021-01201-8. Epub 2021 Mar 9. Erratum in: Neurocrit Care. 2023 Jun;38(3):830. PMID: 33686559.
3. Pezzato S, Govindan RB, Moscatelli A, Bagnasco F, Panagopoulos EM, Robba C, Beqiri E, Smielewski P, Munoz R, du Plessis A. *Continuous cerebral autoregulation monitoring using Cerebral Oximetry index after neonatal cardiac surgery: a single-center retrospective cohort study*. J Thorac Cardiovasc Surg. 2024 Aug;168(2):353- 363.e4. doi: 10.1016/j.jtcvs.2023.12.003. Epub 2023 Dec 6. PMID: 38065519.
4. Pezzato S, Moscatelli A, Fedriga M, Govindan RB, Waberski AT, Munoz R, d'Udekem Y, Yerebakan C. *Intraoperative Cerebral Autoregulation Monitoring Using Cerebral Oximetry Index for Early Detection of Neurologic Complications in an Infant Undergoing Repair of Interrupted Aortic Arch*. J Cardiothorac Vasc Anesth. 2024 Jul;38(7):1550-1553. Doi10.1053/j.jvca.2024.03.021. Epub 2024 Mar 20. PMID: 28627173

#### **10) Studio multiomico nei soggetti con osteolisi multicentrica carpotarsale per l'identificazione di biomarcatori che costituiscano il target di terapie specifiche**

L'osteolisi multicentrica carpo-tarsale (MTCO) è una rara malattia genetica caratterizzata dalla progressiva distruzione delle ossa del carpo e del tarso, spesso associata a insufficienza renale. Lo studio dell'insieme delle proteine presenti nelle urine può offrire preziose informazioni sui meccanismi molecolari della patologia. Questo studio ha analizzato i campioni urinari di pazienti affetti da MTCO raccolti durante l'Open Day e conservati presso la Biobanca dell'Istituto G. Gaslini, al fine di identificare biomarcatori utili ad ampliare le conoscenze nella progressione della malattia.

Campioni di urina di sei pazienti con MTCO e nove individui di controllo sono stati analizzati con tecniche di spettrometria di massa ad alta risoluzione basata su tecnologia Orbitrap.

Sono state, quindi, identificate e quantificate 1878 proteine, di cui 563 selezionate per analisi statistiche più approfondite. Tra queste, 62 proteine hanno mostrato differenze significative nei livelli di espressione tra pazienti e controlli, in modo piuttosto significativo nonostante i limiti di forte variabilità e del basso numero di campionamento.

L'analisi bioinformatica ha evidenziato il coinvolgimento di queste proteine in processi biologici chiave, quali risposta allo stress, infiammazione e apoptosi, con localizzazione predominante nella regione extracellulare e nella membrana cellulare.

Lo studio ha identificato potenziali biomarcatori urinari per la MTCO, evidenziando il loro ruolo in processi patogenetici rilevanti. Sebbene i risultati siano promettenti, ulteriori studi con un maggior numero di campioni sono necessari per validare questi biomarcatori e valutarne l'applicabilità clinica. Le prospettive future includono l'estensione dell'indagine a livello multi-omico per una comprensione più approfondita della malattia e per migliorare la gestione clinica dei pazienti affetti da MTCO.

Stiamo approfondendo questi risultati con ulteriori studi clinici e sperimentali, al fine di pubblicarli su una rivista scientifica.

#### **11) Progresso tecnologico: automazione dei processi biochimici e screening rapido del fenotipo proteico metabolico**

La medicina di precisione si basa su trattamenti personalizzati, adattati alle caratteristiche specifiche di ciascun paziente. Per realizzarla, è fondamentale un'analisi accurata e rapida del fenotipo molecolare. La proteomica e la metabolomica, che studiano rispettivamente proteine e metaboliti, sono strumenti chiave in questo contesto. Presso le Core Facilities di Proteomica e Metabolomica Clinica dell'IRCCS Istituto Giannina Gaslini, sono stati implementati processi tecnologici che automatizzano i flussi di lavoro biochimici

e consentono uno screening rapido del fenotipo proteico-metabolico, migliorando efficienza, riproducibilità e capacità analitica.

Tali innovazioni supportano la ricerca traslazionale e favoriscono lo sviluppo della medicina predittiva, preventiva e personalizzata.

L'automazione dei processi biochimici, tramite piattaforme robotiche di "liquid handling" (Assist Plus - Integra e KingFischer - Thermo Scientific), ha ridotto gli errori umani, aumentato la riproducibilità e consentito l'analisi delle piccole quantità di campioni pediatrici. Questi sistemi, integrati con lo spettrometro di massa ad alta risoluzione Orbitrap Exploris 480, hanno potenziato il throughput e l'affidabilità dei risultati. Per lo screening rapido del fenotipo proteico-metabolico, è stato usato un nuovo sistema cromatografico (EvosepOne - Evosep), capace di processare fino a 500 campioni al giorno con elevata sensibilità. La creazione di un database AMRT ha consentito l'identificazione di oltre 250 metaboliti in campioni pediatrici. Queste tecnologie hanno già prodotto risultati significativi, supportando studi traslazionali per la stratificazione dei pazienti, l'identificazione di biomarcatori e il monitoraggio terapeutico.

Le innovazioni tecnologiche implementate presso le Core Facilities dell'IRCCS Gaslini rappresentano un avanzamento cruciale per la ricerca traslazionale applicata alla medicina di precisione, migliorando l'efficienza e la qualità delle analisi proteicometaboliche.

Prospettive future includono l'espansione del database AMRT, lo sviluppo di protocolli per analisi su singole cellule e l'integrazione di dati multi-omici. Questi progressi ci consentono di essere competitivi nella ricerca pediatrica nazionale ed internazionale.

1. Bruschi M, Candiano G, Petretto A, Angeletti A, Meroni PL, Prunotto M, Ghiggeri GM; Zeus Consortium. *Antibodies Against Anti-Oxidant Enzymes in Autoimmune Glomerulonephritis and in Antibody-Mediated Graft Rejection*. *Antioxidants* (Basel). 2024 Dec 12;13(12):1519. doi: 10.3390/antiox13121519. PMID: 39765847; PMCID: PMC11726969.
2. Bruschi M, Candiano G, Petretto A, Angeletti A, Meroni PL, Prunotto M, Ghiggeri GM; Zeus Consortium. *Technology Innovation for Discovering Renal Autoantibodies in Autoimmune Conditions*. *Int J Mol Sci*. 2024 Nov 25;25(23):12659. doi: 10.3390/ijms252312659. PMID: 39684370; PMCID: PMC11640796.
3. Spinelli S, Kajana X, Garbarino A, Bartolucci M, Petretto A, Pavanello M, Verrina E, Candiano G, Panfoli I, Bruschi M. *Proteomic Profiling of Cerebrospinal Fluid and Its Extracellular Vesicles from Extraventricular Drainage in Pediatric Pilocytic Astrocytoma, towards*. *Precision Oncology*. *Cancers* (Basel). 2024 Mar 20;16(6):1223. doi: 10.3390/cancers16061223. PMID: 38539556; PMCID: PMC10969024.
4. Potenzieri A, Uccella S, Preiti D, Pisoni M, Rosati S, Lavarello C, Bartolucci M, Debellis D, Catalano F, Petretto A, Nobili L, Fellin T, Tucci V, Ramenghi LA, Savardi A, Cancedda L. *Early IGF-1 receptor inhibition in mice mimics preterm human brain disorders and reveals a therapeutic target*. *Sci Adv*. 2024 Mar;10(9):eadk8123. doi: 10.1126/sciadv.adk8123. Epub 2024 Mar 1. PMID: 38427732; PMCID: PMC10906931.
5. Zaza G, Neri F, Bruschi M, Granata S, Petretto A, Bartolucci M, di Bella C, Candiano G, Stallone G, Gesualdo L, Furian L. *Proteomics reveals specific biological changes induced by the normothermic machine perfusion of donor kidneys with a significant upregulation of Latexin*. *Sci Rep*. 2023 Apr 11;13(1):5920. doi: 10.1038/s41598-023-33194-z. PMID: 37041202; PMCID: PMC10090051.
6. Piaggio F, Croce M, Reggiani F, Monti P, Bernardi C, Ambrosio M, Banelli B, Dogrusöz M, Jockers R, Bordo D, Puzone R, Viaggi S, Coviello D, Lanza FB, Bartolucci M, Petretto A, Mosci C, Gangemi R, van der Velden PA, Jager MJ, Pfeffer U, Amaro A. *In uveal melanoma Gα-protein GNA11 mutations convey a shorter disease-specific survival and are more strongly associated with loss of BAP1 and chromosomal alterations than Gα-protein GNAQ mutations*. *Eur J Cancer*. 2022 Jul;170:27-41. doi: 10.1016/j.ejca.2022.04.013. Epub 2022 May 14. PMID: 35580369.
7. Bruschi M, Granata S, Candiano G, Petretto A, Bartolucci M, Ghiggeri GM, Stallone G, Zaza G. *Proteomic analysis of urinary extracellular vesicles of kidney transplant recipients with BKV viremia and viremia: A pilot study*. *Front Med (Lausanne)*. 2022 Nov 17;9:1028085. doi: 10.3389/fmed.2022.1028085. PMID: 36465937; PMCID: PMC9712214.

8. Bruschi M, Moroni G, Sinico RA, Franceschini F, Fredi M, Vaglio A, Cavagna L, Petretto A, Pratesi F, Migliorini P, Manfredi A, Ramirez GA, Esposito P, Negrini S, Trezzi B, Emmi G, Santoro D, Scolari F, Volpi S, Mosca M, Tincani A, Candiano G, Prunotto M, Verrina E, Angeletti A, Ravelli A, Ghiggeri GM. *Neutrophil Extracellular Traps in the Autoimmunity Context*. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Mar 22;8:614829. doi: 10.3389/fmed.2021.614829. PMID: 33829021; PMCID: PMC8019736.
9. Ravera S, Vigliarolo T, Bruno S, Morandi F, Marimpietri D, Sabatini F, Dagnino M, Petretto A, Bartolucci M, Muraca M, Biasin E, Haupt R, Zecca M, Fagioli F, Cilloni D, Podestà M, Frassoni F. *Identification of Biochemical and Molecular Markers of Early Aging in Childhood Cancer Survivors*. *Cancers (Basel)*. 2021 Oct 18;13(20):5214. doi:10.3390/cancers13205214. PMID: 34680366; PMCID: PMC8534026.
10. Lavarello C, Barco S, Bartolucci M, Panfoli I, Magi E, Tripodi G, Petretto A, Cangemi G. *Development of an Accurate Mass Retention Time Database for Untargeted Metabolomic Analysis and Its Application to Plasma and Urine Pediatric Samples*. *Molecules*. 2021 Jul 13;26(14):4256. doi: 10.3390/molecules26144256. PMID: 34299531; PMCID: PMC8303579.

## 12) Medicina personalizzata: sviluppo di terapie oncologiche di precisione per il Neuroblastoma (PeRsonalizEd Medicine, PREME)

Sebbene la sopravvivenza dei pazienti affetti da Neuroblastoma (NB) sia migliorata negli ultimi anni, oltre il 50% dei pazienti considerati ad alto rischio (HR) va incontro a recidiva di malattia, e in questo caso la sopravvivenza a 5 anni è ancora inferiore al 20%. La necessità di terapie specifiche per il paziente HR è urgente. Il programma di medicina di precisione/personalizzata PREME si focalizza sulla progettazione di strategie terapeutiche innovative per i pazienti affetti da NB HR, all'esordio e in recidiva.

I tumori di NB e le cellule di NB infiltranti il midollo osseo, derivati dai centri dell'Associazione Italiana di Ematologia Oncologica Pediatrica, sono stati valutati e caratterizzati mediante esami istologici e di citofluorimetria a flusso. Il materiale biologico è stato quindi utilizzato per studi del DNA e dell'RNA tumorale allo scopo di verificare l'eventuale presenza di alterazioni molecolari potenzialmente bersagliabili da farmaci specifici. Il materiale è stato anche utilizzato per lo sviluppo di modelli preclinici di NB, in vitro (sferoidi tumorali-3D) e in vivo (in topi-PDX) derivati direttamente dalle cellule dei pazienti, da utilizzare per la validazione terapeutica della medicina di precisione stessa.

Su 80 pazienti arruolati, il 70% ha mostrato avere almeno una alterazione molecolare terapeutamente bersagliabile e di questi, circa il 40% ha ricevuto la medicina di precisione. E' stata inoltre creata una collezione di materiale biologico di 3D e PDX.

I risultati ottenuti in PREME suggeriscono che la valutazione del DNA e dell'RNA tumorale rappresenta uno strumento utile per la realizzazione della terapia di medicina di precisione per pazienti affetti da NB. Modelli preclinici 3D e PDX di NB riassumono fedelmente le caratteristiche dei pazienti affetti da NB e possono essere utilizzati per la valutazione della medicina di precisione singola o associata ad altre strategie terapeutiche.

1. Pastorino F\*, Capasso M\*, Brignole C, Giglio S, Bensa V, Cantalupo S, Lasorsa VA, Tondo A, Mura R, Sementa AR, Garaventa A, Ponzoni M\*, Amoroso L\*. *Italian Precision Medicine in Pediatric Oncology: Moving beyond Actionable Alterations*. *Int J Mol Sci*. 2022 Sep 23;23(19):11236. doi: 10.3390/ijms231911236
2. Pastorino F\*, Capasso M\*, Brignole C, Lasorsa VA, Bensa V, Perri P, Cantalupo S, Giglio S, Provenzi M, Rabusin M, Pota E, Cellini M, Tondo A, De Ioris MA, Sementa AR, Garaventa A, Ponzoni M\*, Amoroso L\*. *Therapeutic Targeting of ALK in Neuroblastoma: Experience of Italian Precision Medicine in Pediatric Oncology*. *Cancers* 2023, 15(3), 560; <https://doi.org/10.3390/cancers15030560>
3. Capasso M\*, Brignole C\*, Lasorsa VA\*, Bensa V, Cantalupo S, Sebastiani E, Quattrone A, Ciampi E, Avitabile M, Sementa AR, Mazzocco K, Cafferata B, Gaggero G, Vellone VG, Cilli M, Calarco E, Giusto E, Perri P, Aveic S, Fruci D, Tondo A, Luksch R, Mura R, Rabusin M, De Leonardis F, Cellini M, Coccia P, Iolascon A, Corrias MV, Conte M, Garaventa A, Amoroso L, Ponzoni M\*, Pastorino F\*. *From the identification of actionable molecular targets to the generation of faithful neuroblastoma patient-derived preclinical models*. *J Transl Med*. 2024 Feb 13;22(1):151. doi: 10.1186/s12967-024-04954-w.PMID: 38351008

### 13) Primo Registro Italiano Perinatale per l'Encefalopatia postasfittica (RIPENSA) con indagini Genetiche, di scienze Omiche e di Risonanza Magnetica (GENORM) cerebrale per identificare le gravidanze a rischio di esitare in neonati con encefalopatia post-asfittica (EPA)

Il progetto RIPENSA-GENORM rappresenta uno studio multicentrico, prospettico e osservazionale, finalizzato alla creazione del primo registro nazionale dei neonati con encefalopatia ipossico-ischemica sottoposti a trattamento ipotermico. Oltre a raccogliere dati clinici e di neuroimaging, il registro integrerà informazioni genetiche derivate dal trio familiare, nonché dati provenienti dalle scienze omiche su sangue raccolti in diversi timepoint. L'obiettivo primario è approfondire i meccanismi fisiopatologici alla base di questa grave condizione, con un focus particolare sul 70-80% dei casi in cui non è identificabile un evento sentinella scatenante l'evento.

Il progetto prevede l'arruolamento di neonati con encefalopatia ipossico-ischemica sottoposti a trattamento ipotermico, con un approfondimento dei dati prenatali, perinatali, genetici e omici. I campioni biologici sono raccolti in quattro momenti temporali: da cordone ombelicale e da neonato prima dell'inizio del trattamento ipotermico, quindi esclusivamente da neonato durante il trattamento, al termine del trattamento e a sette giorni di vita. Tali dati sono integrati con neuroimaging.

Durante il periodo di svolgimento delle attività progettuali sono stati arruolati dieci neonati e le rispettive famiglie, raccogliendo i dati per la componente prospettica dello studio e i campioni biologici per le analisi genetiche e omiche.

Il registro nazionale è stato completato e i dati dei pazienti arruolati sono stati inseriti nel sistema. Attraverso la collaborazione con la Società Italiana di Neonatologia (SIN) e la Società Italiana di Medicina Perinatale (SIMP), stati stati contattati numerosi ospedali italiani per avviare la raccolta dei dati. Attualmente il progetto coinvolge 13 centri italiani, ancora in attesa di approvazione dai rispettivi Comitati Etici.

A causa di difficoltà iniziali nell'arruolamento e nel coinvolgimento degli ospedali, è stato necessario richiedere un emendamento per estendere il periodo di arruolamento fino al 2026 (previsto nella prima versione del protocollo dal 1 luglio 2022 al 30 giugno 2023). Inoltre, sono stati modificati i protocolli per includere prelievi aggiuntivi di piccole quantità di sangue, al fine di migliorare l'analisi delle scienze omiche, soprattutto considerando le difficoltà nel reperire campioni di sangue cordonale dai pazienti riferiti al nostro Istituto da centri periferici.

Oltre all'arruolamento, sono state realizzate numerose attività di divulgazione scientifica, tra cui la partecipazione a congressi nazionali e internazionali come relatori e la vincita di selezioni per presentazioni orali e poster orali.

In conclusione, sebbene il progetto RIPENSA-GENORM abbia incontrato alcuni ritardi iniziali a causa della sua complessità organizzativa e gestionale, è stato avviato con successo e sta progressivamente raggiungendo i suoi obiettivi. La raccolta di dati multidisciplinari relativamente a questa condizione, non ancora totalmente compresa e in molti casi altamente impattante sulla qualità di vita di questi pazienti, contribuirà a fornire una base solida per future linee guida sull'argomento.

1. Calandrino A, Minghetti D, Brigati G, Parodi A, Nozza P, Ramenghi LA. *Distruption of Cerebellar Granular Layer as a Consequence of Germinal Matrix Intraventricular Hemorrhage in Extreme Prematurity: An Acute Direct Mechanism Too?* *Pediatr Neurol.* 2024 Mar 152:20-22. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2023.12.004. PMID: 38176224.