



# INQUADRAMENTO DIAGNOSTICO-CLINICO DELLE ANEMIE EMOLITICHE

Dott Francesco Sorrentino



UO Talassemici

CENTRO REGIONALE ANEMIE RARE  
E DISTURBI DEL METABOLISMO DEL FERRO



SISTEMA SANITARIO REGIONALE

ASL  
ROMA 2

Ospedale S Eugenio – Roma EUR

---

Immunoterapia e citopenie immuno-mediate di interesse trasfusionale

Roma, 29 gennaio 2020



Il sottoscritto, in qualità di Relatore  
dichiara che

nell'esercizio della Sua funzione e per l'evento in oggetto, NON È in alcun modo portatore di interessi commerciali propri o di terzi; e che gli eventuali rapporti avuti negli ultimi due anni con soggetti portatori di interessi commerciali non sono tali da permettere a tali soggetti di influenzare le mie funzioni al fine di trarne vantaggio.

E

che negli ultimi due anni ha avuto i seguenti rapporti anche di finanziamento con i soggetti portatori di interessi commerciali in campo sanitario:

- Novartis Pharma
- Chiesi Farmaceutici
- Vifor Pharma



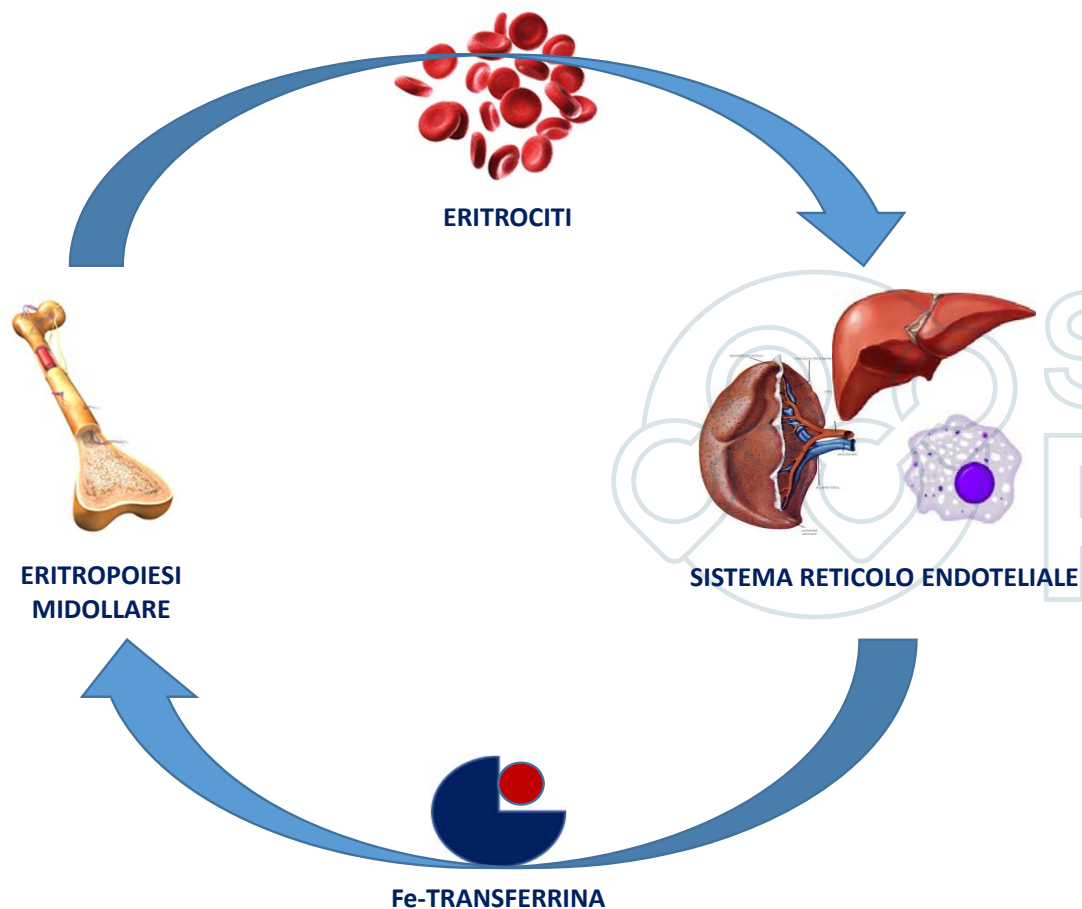
## LA FISIOLGICA CINETICA DEI GLOBULI ROSSI

- Un individuo adulto di 70 Kg di peso corporeo contiene una massa di globuli rossi (RBC) di circa 30 mL/Kg pari ad un volume totale di circa 2.100 mL ( $24 \times 10^{12}$  RBC)
- Per mantenere una costante massa di RBC circolanti l'organismo produce e distrugge circa 20 mL di RBC al giorno, contenenti 6-7 g di emoglobina e 23-30 mg di Ferro

**L'ERITROPOIESI E L'EMOCATARESIS SONO AL CENTRO DELLA FISIOLOGIA DEL FERRO**

Ogni giorno vengono prodotti 200 miliardi di globuli rossi  
La loro produzione richiede più di  $2 \times 10^{15}$  atomi di ferro ogni secondo per mantenere una adeguata eritropoiesi

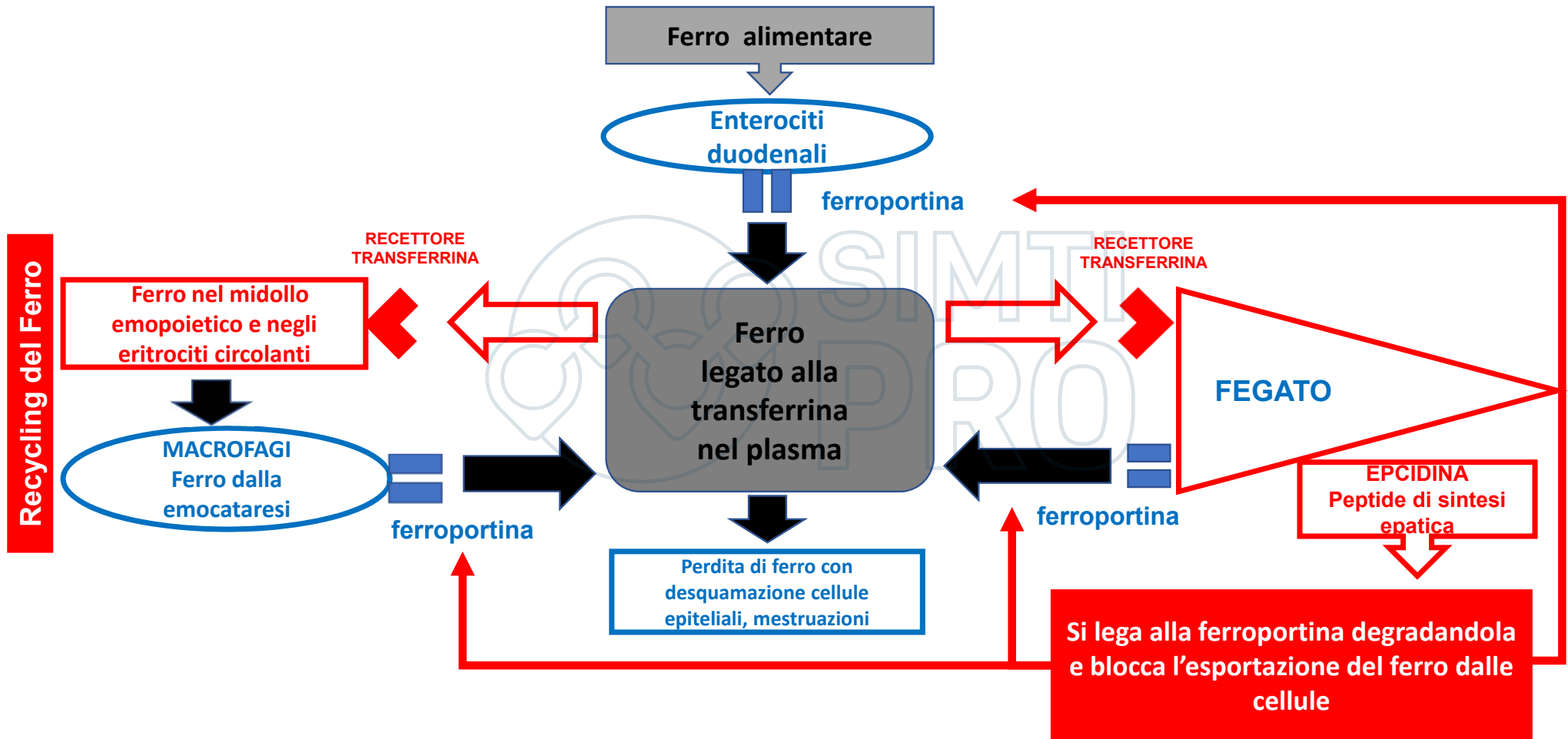
## L'ECONOMIA CIRCOLARE DELL'ORGANISMO UMANO



**COMPLESSI MECCANISMI SISTEMICI E CELLULARI REGOLATORI DEL Fe-UPTAKE E DEL RECYCLING del Fe ASSICURANO LA QUOTA GIORNALIERA NECESSARIA ALLA SINTESI DELL'EMOGLOBINA**

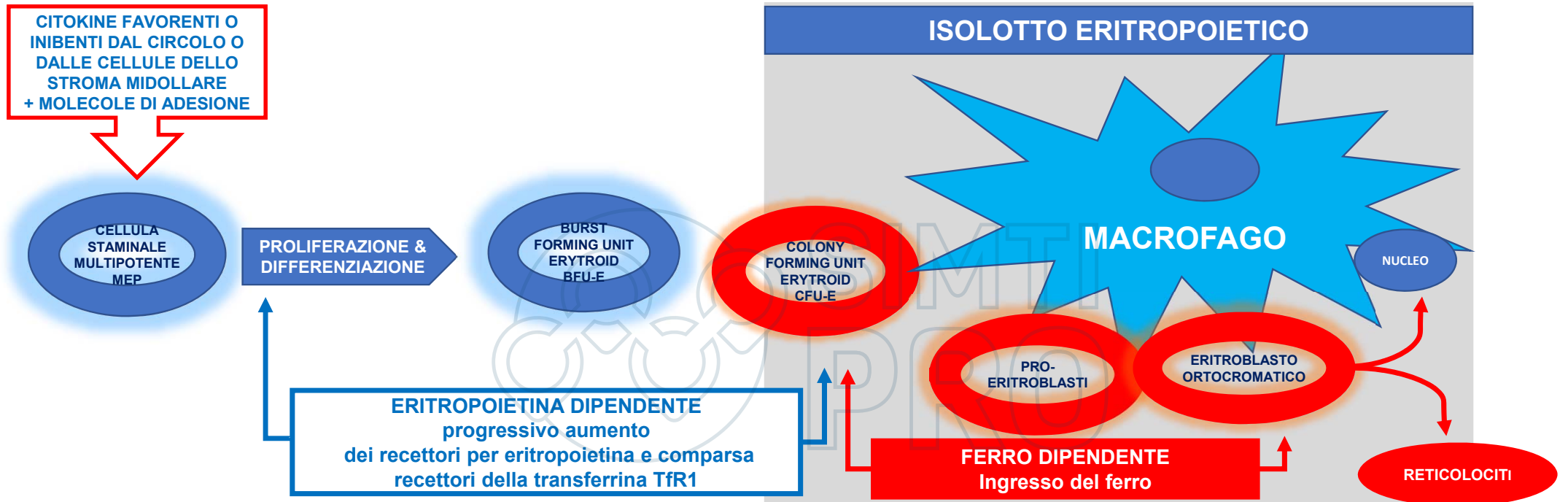
**LA DEGRADAZIONE DEI GLOBULI ROSSI SENESCENTI , SOPRATTUTTO DA PARTE DEI MACROFAGI SPLENICI, FORNISCE IL 90% DEL FERRO ( Re-CYCLING) .  
La restante quota del 10% è fornita dal Fe introdotto con la dieta**

# RUOLO CENTRALE DEL PEPTIDE ORMONALE EPATICO EPCIDINA NELLA REGOLAZIONE DELL'OMEOSTASI DEL FERRO



Ganz T *Physiol Rev* 2013 ; Park CH J *Biol Chem* 2001; Nemeth E *Science* 2004 ;  
Drakesmith H *Cell Metab* 2015; Sangkhae V *Adv Nutr* 2017

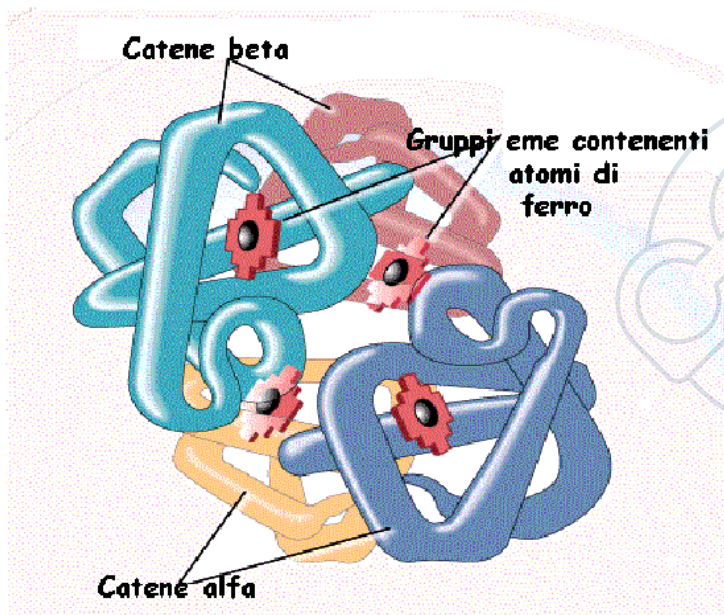
## INDISPENSABILE COLLEGAMENTO TRA ERITROPOIESI E FERRO



Gli eritroblasti esprimono una diversa schiera di molecole di adesione che subiscono variazioni dinamiche durante la differenziazione e che mediano le interazioni tra eritroblasto/eritroblasto, eritroblasto/macrofago e eritroblasto matrice extracellulare

Le isole eritropoietiche sono caratteristiche dell'eritropoiesi dei mammiferi  
I **MACROFAGI** sostengono la proliferazione, forniscono il ferro per l'emoglobina, promuovono l'enucleazione e rimuovono i detriti nucleari

## L'EMOGLOBINA



Il globulo rosso deve mantenere la sua emoglobina altamente concentrata (MCHC), ridotta e funzionale a 37°C per i 4 mesi di sopravvivenza dell'eritrocita: DIFFICILE RIPETERE IN LABORATORIO TALE PERFORMANCE!

La viscosità dello stroma di globuli rossi aumenta rapidamente tra 30 e 40 g per decilitro di MCHC, portando a una ridotta deformabilità

Il valore dell'MCHC pertanto è UN INDICATORE DI VISCOSITA' INTRA-CELLULARE ed è un importante parametro emocromocitometrico diagnostico ( vedi difetti di membrane eritrocitaria e Anemia falciforme)

La mutazione nell'emoglobina possono determinare alterate solubilità, stabilità e la capacità di resistere all'ossidazione in metemoglobina. Tali anomalie ovviamente influenzano negativamente anche la sopravvivenza della cellula che la trasporta e quindi causano emolisi ereditaria

## IL CORREDO ENZIMATICO DEGLI ERITROCITI.

ENZIMI RIMODELLANTI: Responsabili della degradazione degli organelli nei reticolociti ( mitocondri e ribosomi). Un esempio è la Pirimidin 5'-nucleotidasi che rimuove i ribonucleotidi residui della maturazione reticolocitaria



Da: [ASPAM .org](http://ASPAM.org)

La cellula normale è dotata di numerosi enzimi che proteggono dal danno ossidativo e mantengono l'integrità e la plasticità all'eritrocita assicurandone la sopravvivenza.

LA GLICOLISI anaerobica o Ciclo di EMBDEN-MEYEROF è l'unica fonte di ATP per l'eritrocita e consente il funzionamento delle Kinasie che controllano la fosforilizzazione delle membrane eritrocitarie, per il funzionamento delle pompe ioniche e dei canali e per mantenere livelli adeguati di fosfolipidi.

inoltre genera nicotinamide adeninedinucleotide ridotta ( NADH), una molecola necessaria per la riduzione della metaemoglobina a Hb

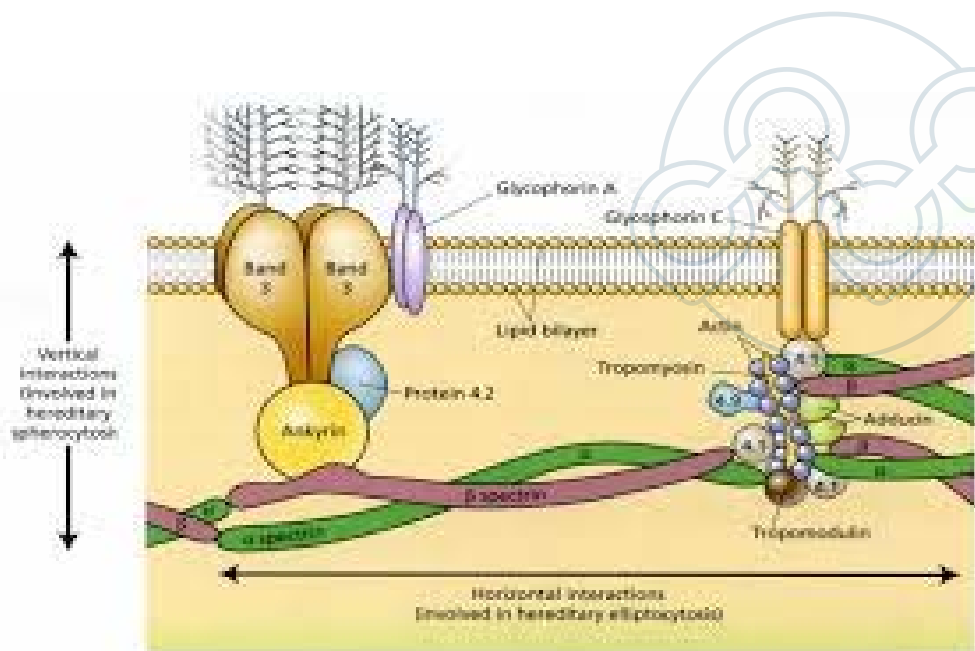
Uno shunt all'interno del ciclo della glicolisi anaerobica, lo shunt RAPOPORT-LUEBERING, genera il composto 2-3-BIFOSFOGLICERATO (2-3-BPG) un importante cofattore che, se legato alla Hb, ne riduce l'affinità per l'ossigeno

la via metabolica anaerobica genera inoltre il Glucosio-6 Fosfato che è il substrato per la G6PD. Il G6PD sembra essere l'enzima che modula la velocità per una lo shunt DEGLI ESOSOMONOFOSFATI. Lo shunt genera il GLUTADIONE Ridotto, ad attività anti ossidante, utilizzato per ridurre l'ossidazione di strutture critiche, quali Hb, proteine del citoscheletro e lipidi a membrana



## LA MEMBRANA ERITROCITARIA

- CARATTERISTICHE UNICHE : ELEVATA ELASTICITA' E RISPOSTA RAPIDA ALLE SOLLECITAZIONI.
- QUESTE PECULIARITA' SONO CONSEGUENZA DELLA STRUTTURA PARTICOLARE COMPOSTA DA UN INVOLUCRO A DOPPIO STRATO ( formato da quantità equivalenti di colesterolo e fosfolipidi) ANCORATO AD UNA RETE BIDIMENSIONALE ELASTICA DI PROTEINE SCHELETRICHE ATTRAVERSO DELLE PROTEINE TRANSMEMBRANA
- L'INTERAZIONE DIRETTA DELLE PROTEINE SCHELETRICHE CON I FOSFOLIPIDI ANIONICI E' UN ULTERIORE MEZZO DI COLLEGAMENTO



- I vari fosfolipidi sono distribuiti asimmetricamente: La FOSFADILCOLINA e SFINGOMIELINA sono prevalenti nello strato esterno. La maggior parte delle FOSFDILETANOLAMINE e tutte le FOSFATIDILSERINE ed I FOSFOINOSITIDI SONO LOCALIZZATI NEL MONOSTRATO INTERNO
- Una famiglia di proteine chiamate SCRAMBLASI e FILIPPASI è coinvolta della distribuzione asimetrica
- La stabilità meccanica della membrana è rafforzata dal legame diretto della FOSFATIDILSERINA con la SPETTRINA
- IL legame della proteina 4.1 con il fosfoinositide modula l'interazione tra la proteina transmembrana BANDA 3 e la GLIFORINA C

DELLE OLTRE **100** PROTEINE DI MEMBRANA IDENTIFICATE **CIRCA 25 DI ESSE SONO GLICOSILATE DETERMINANO LE STRUTTURE ANTIGENICHE DEI GRUPPI SANGUIGNI**

TRA LA VASTA GAMMA DI FUNZIONI DELLE PROTEINE si segnala: La funzione di trasporto di cationi, acqua e urea e ligandi di adesione tra gli eritrociti e neutrofili, piastrine e cellule endoteliali

I Principali componenti della rete proteica scheletrica sono la  $\alpha$  e  $\beta$  SPETTRINA , LA ACTINA, LA PROTEINA 4.1R, L'ADDUCINA, LA DEMATINA , LA TROPOMIOSINA E LA TROPOMODULINA  
Una caratteristica particolare del filamento di SPETTRINA è la ripetizione elicoidale tripla di 106 aminoacidi: 21 in  $\alpha$  SPETTRINA e 15 in  $\beta$  SPETTRINA. **Questa struttura conferisce l'elasticità alla membrana.**

INTERAZIONI ORIZZONTALI

Il componente strutturale principale della rete scheletrica eritrocitaria bidimensionale è **IL TETRAMERO DI SPETTRINA**: è formato dalla interazione laterale di due dimeri di spettina con la parte N-terminale di  $\alpha$  spettina e la C-terminale della  $\beta$  spettina del secondo dimero. All'altra estremità è assemblato il **COMPLESSO SPETTRINA-ACTINA E PROTEINA 4.1R** che è un **REGOLATORE CHIAVE DELLA STABILITÀ MECCANICA DELLA MEMBRANA**

La **BANDA 3** , l'**RhAg**, l'**ankirina**, la **proteina 4.2** e la **spettina** ancorano lo scheletro di membrana a base di spettina al doppio strato lipidico attraverso **COLLEGAMENTI VERTICALI**.  
La carenza di uno di questi elementi proteici determina **LA PERDITA DI COESIONE DELLA MEMBRANA e conseguentemente alla PERDITA DI SUPERFICIE**

INTERAZIONI VERTICALI

## SENESCENZA DEL GLOBULI ROSSI E DISTRUZIONE

Normalmente gli eritrociti, **CHE HANNO INCAPACITA' DI SINTESI**, vivono 120 giorni: QUESTO IMPLICA L'ESISTENZA DI MECCANISMI MOLECOLARI, STRETTAMENTE REGOLATI **MA ancora non del tutto chiariti** RESPONSABILI DELLA PROGRAMMAZIONE DELLA DURATA DELLA VITA E DELLA RIMOZIONE NON CASUALE DELLE CELLULE SENESCENTI

**I GLOBULI ROSSI SUBISCONO UNA SERIE CONTINUA DI DANNI METABOLICI E FISICI**

### ESPRESSIONE FENOTIPICA DELLA SENESCENZA ERITROCITARIA

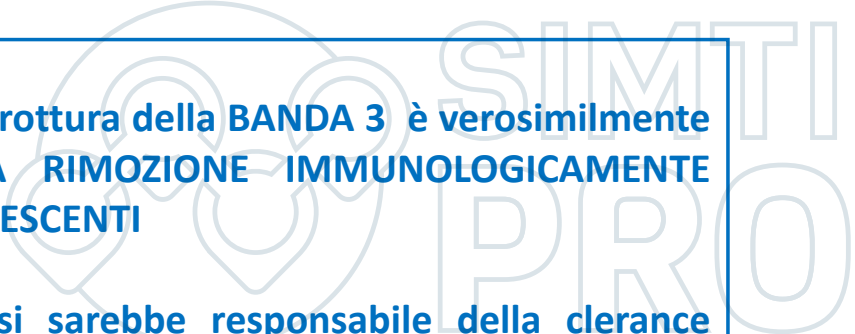
- DECLINO DELLA ATTIVITA' METABOLICA
- LESIONI OSSIDATIVE
- MICROVESCICOLAZIONE ed esposizione di markers di superficie di rimozione
- RIMODELLAMENTO DELLA MEMBRANA
- TRASFORMAZIONE PROGRESSIVA DELLA FORMA CELLULARE con riduzione volumetrica

**TUTTE QUESTE ALTERAZIONI  
INNESCANO, direttamente o  
indirettamente, l'ERITROPTOSI**



ESPOSIZIONE DELLA  
FOSFADILSERINA

- **ADERENZA ALLA PARETE VASCOLARE LEGANDOSI AL RECETTORE ENDOTELIALE CXC-Motiv-Chemokin-16 (CXCL-16) scavenger PER LA FOSFADILSERINA E LIPOPROTEINE OSSIDATE A BASSA DENSITÀ**
- **VENGONO ULTERIORMENTE FAGOCITATE DAI MACROGAGI E RAPIDAMENTE ELIMINATI DAL SANGUE CIRCOLANTE**

- 
- **Le modificazioni strutturali e la rottura della BANDA 3 è verosimilmente UNO STEP CENTRALE DELLA RIMOZIONE IMMUNOLOGICAMENTE MEDIATA DEGLI ERITROCITI SENESCENTI**
  - **Tale meccanismo di eritroptosi sarebbe responsabile della clearance prematura degli eritrociti in emoglobinopatie, nelle patologie da difetto di membrana, nella Sindrome di Down, nel Morbo di Alzheimer**
  - **IL DANNO OSSIDATIVO ATTIVA LE PROCASPASI E LA ROTTURA DELLA BANDA 3 FAVORENDONE IL LEGAME CON LE IgG AUTOLOGHE E CON LA FRAZIONE C3 DEL COMPLEMENTO INNESCANDO LA FAGOCITOSI DA PARTE DELLE CELLULE MACROFAGICHE**

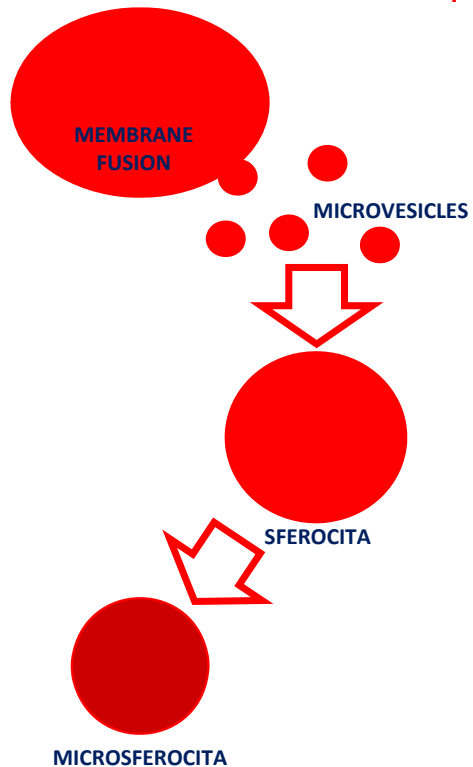


BANDA 3 DANNEGGIATA

MICROVESCICOLAZIONE

IL MECCANISMO DELLA MICROVESCICOLAZIONE FA PARTE INTEGRANTE DEL PROCESSO DI MATURAZIONE ERITROCITARIA

- E' MAGGIORMENTE EVIDENTE NELLE CELLULE PIU' VECCHIE
- HA EFFETTI POSITIVI: DETERMINA PERDITA DI PARTI DANNEGGIATE DELL'ERITROCITA IN CRESCITA
- HA EFFETTI NEGATIVI: **PERDITA IRREVERSIBILE DEL RAPPORTO MEMBRANA/EMOGLOBINA E RIDUZIONE DEL VOLUME ERITROCITARIO**



- La forma del disco biconcavo, **IMPORTANTE PER LA DEFORMABILITA'**, dipende da un elevato rapporto tra superficie e volume e richiede una prevalente superficie di membrana (~140 $\mu\text{m}^2$  vs volume 90 fl)
- La progressiva perdita di membrana determina che l'eritrocita assuma la **FORMA SFERICA PIU' RIGIDA**
- Una sfera è ovviamente **MOLTO MENO DISTENSIBILE** e molto meno capace di passare attraverso piccole aperture rispetto a un disco, specialmente nella lenta e tortuosa circolazione splenica.

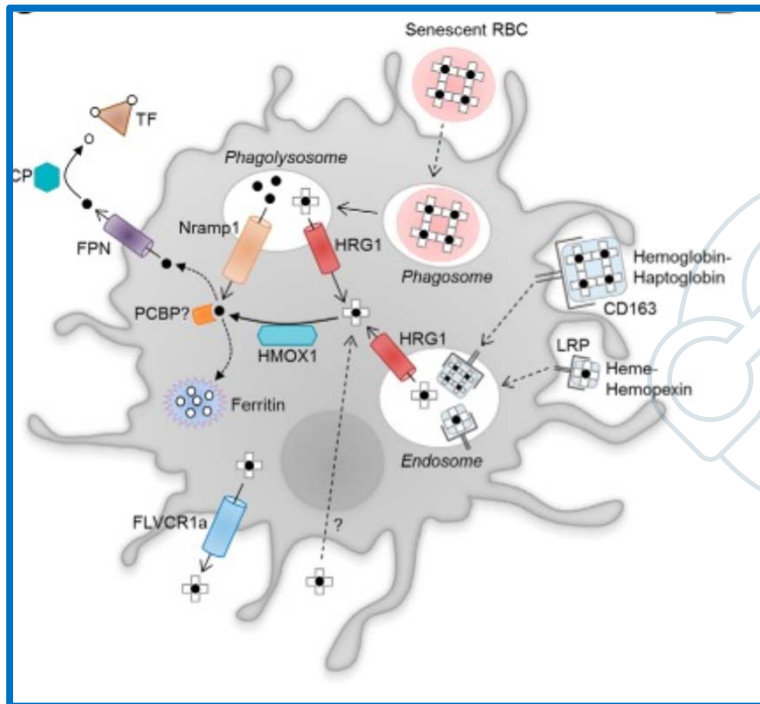
MODIFICAZIONE DELLA FORMA DEGLI ERITROCITI

**CONDIZIONI PATOLOGICHE CON AUMENTATA ERITROPTOSI ( da: *Lang E. Biomed Res Int 2015*)**

PATOLOGIA	RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI
DISIDRATAZIONE	Abed M. <i>Kidney Blod Press Res</i> 2013
IPOSSIA	Weiss E. <i>Cell Calcium</i> 2011
SIDEROPENIA	Kempe DS. <i>FASEB J</i> 2006
SINDROME METABOLICA	Zappulla D. <i>J Cardiomet Synd</i> 2008
DIABETE	Firat U. <i>Diabetes Res</i> 2012
ANEMIA EMOLITICA	BaneijeeD. <i>Eu J Haemat</i> 2008
INSUFFICIENZA CARDIACA	Mahmud H. <i>Cardiovasc Res</i> 2013
INSUFFICIENZA RENALE	Myssina S. <i>J Am Soc Neph</i> 2003; Polak-Jonksz D. <i>Blood</i> 2012; Abed M. <i>J Mol Med</i> 2014
SINDROME UREMICO-EMOLITICA	Lang PA. <i>J Molec Med</i> 2006
SEPSIrol 2003;	Kempe DS. <i>J Molec Med</i> 2007
INFEZIONE DA MYCOPLASMA	Feder K. <i>Cell Phys Biochem</i> 2011
MALARIA	Foller M. <i>Cell Physio Biochem</i> 2009; Bobbala D. <i>Bioch Bioph Res Comunic</i> 2008; Bottger E. <i>PloS One</i> 2012; Koda S. <i>Cell Physiol Bioch</i> 2008; Totino PRR. <i>PloS ONE</i> 2011
EMOGLOBINOPATIE( Talassemia e SCD)	Lang PA. <i>Nature Medicine</i> 2007; Ayi K. <i>Blood</i> 2003; Kean LS. <i>Experimental Hematol</i> 2002; Kuypers FA. <i>Blood</i> 1998; Basu S. <i>Glycoconjugate Journal</i> 2010; Weiss E- <i>Cell Calcium</i> 2012; Chedebech P. <i>Transfusion</i> 2009
Deficit di G6PD	Lank KS. <i>Biochemistry</i> 2002,; Cappadoro M . <i>Blood</i> 1998,; Ganesan S. <i>Toxicology</i> 2012
Malattia di Wilson	Lang PA. <i>Nature Medicine</i> 2007
Malattia neoplastica	Quadri SM. <i>J Cell Mol Med</i> 2012

## I MACROFAGI DEL SISTEMA RETICOLOENDOTELIALE

I globuli rossi senescenti o danneggiati sono eliminati dalla circolazione dai macrofagi di milza fegato e midollo osseo ( Sistema Reticoloendoteliale)



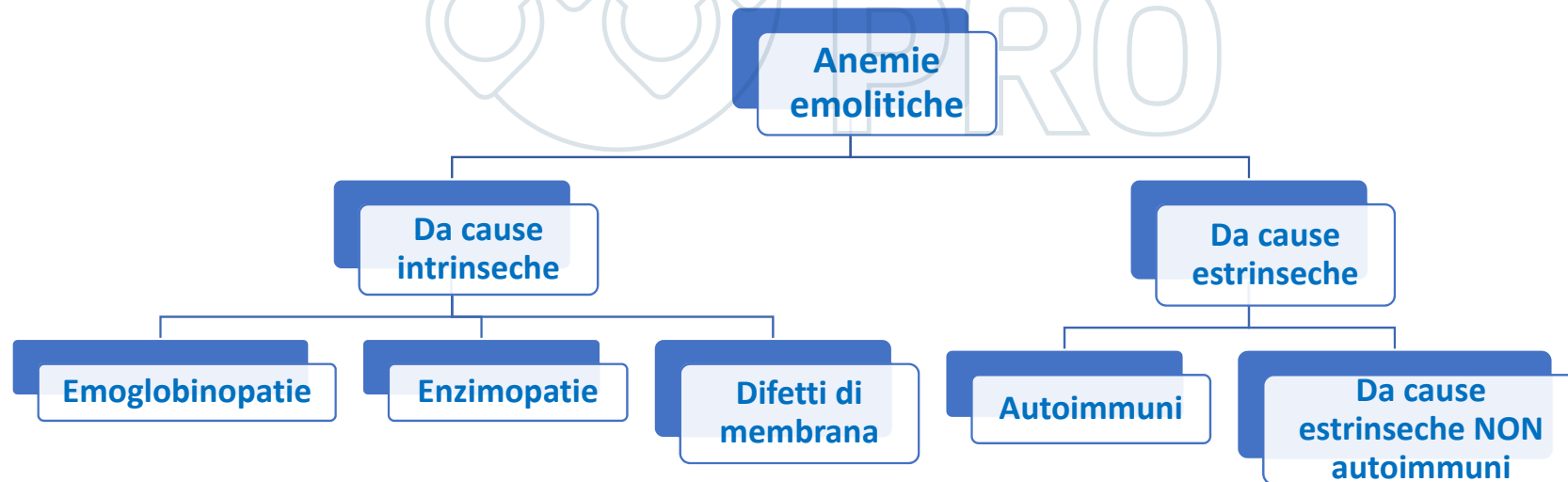
- I macrofagi interiorizzano i globuli rossi nel FAGOSOMA che si fonda con i lisosomi a formare il FAGOLISOSOMA
- L'eme liberato viene traslocato nel citosol tramite HRG1 ( trasportatore ad alta affinità per l'EME) e viene degradato dalla emossigenasi HMOX1 , enzima ancorato al reticolo endoplasmatico
- Espresso esclusivamente dai macrofagi il RECETTORE SCAVENGER CD 163 che permette la rimozione dal circolo dell'emoglobina legata alla aptoglobina ( fisiologicamente almeno il 10% dell'emolisi è intravascolare negli individui normali)
- Anche l'Hb non legata alla aptoglobina può essere assorbita dal CD 163
- In topi privi del recettore la clearance dell'emoglobina dal plasma non è modificata: possibile esistenza di circuiti alternativi
- L'emolisi estesa può esaurire l'aptoglobina plasmatica . L'emoglobina ferrosa si trasforma in ferrica con rilascio dell'eme.. L'eme rilasciato si lega a una glicoproteina plasmatica EMOPEXINA che lo trasporta al fegato dove viene assorbita dalle cellule di Kupffer tramite il CD91 ( proteina legata al recettore delle lipoproteine a bassa densità) .

## LE ANEMIE EMOLITICHE

L'emolisi (dal greco αἷμα, àima, "sangue" e λύσις, lysis, "scioglimento, separazione") è il processo che porta alla distruzione degli eritrociti

Il **processo è fisiologico** (Eritroptosi) ed avviene in sede EXTRAVASCOLARE, nell'organo emocataretico per eccellenza che è la MILZA e, in misura minore nel FEGATO e nel MIDOLLO OSSEO, ad opera delle cellule macrofagiche (sistema reticoloendoteliale) che eliminano i globuli rossi più vecchi ed operano indubbiamente con finalità di RICICLO

E' un **PROCESSO PATOLOGICO** quando sono presenti condizioni INTRINSECHE od ESTRINSECHE all'eritrocita, in ACUZIE o in CRONICITA', che determinano UNA ACCELERAZIONE del fisiologico processo CON RIDUZIONE della sopravvivenza eritrocitaria e dell'emoglobina e possono avvenire in sede INTRAVASCOLARE, EXTRAVASCOLARE o in entrambe







IL PENSATORE: Bronzo di August Rodin - Parigi

## IL PIANO DIAGNOSTICO TERAPEUTICO ASSISTENZIALE (PDTA) Per le ANEMIE RARE E' COMPLESSO E MOLTO ARTICOLATO

### Riferimenti normativi:

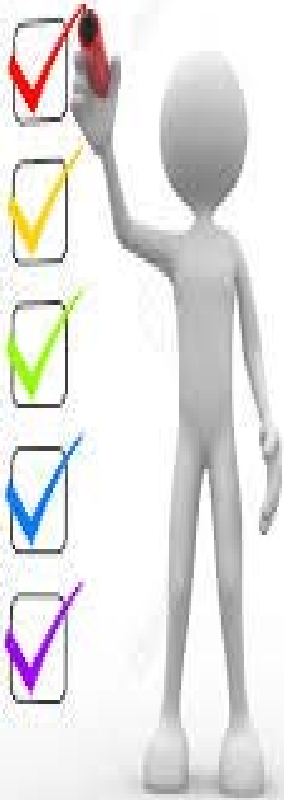
- *Decreto 18 maggio 2001, n. 279. Regolamento di istituzione della rete nazionale delle malattie rare e di esenzione dalla partecipazione al costo delle relative prestazioni sanitarie, ai sensi dell'articolo 5, comma 1, lettera b), del decreto legislativo 29 aprile 1998, n. 124. (G.U. Serie Generale, n. 160 del 12 luglio 2001*
- *DGR del 07/01/2005 n.20. Individuazione della rete regionale dei centri e presidi per la sorveglianza, diagnosi e la terapia delle malattie rare. Aggiornamento e sostituzione dell'Allegato 1 alla DGR 1324/2003*

## CON L'ULTIMO AGGIORNAMENTO DEI LIVELLI ESSENZIALI DI ASSISTENZA IL DEFICIT DI G6PD NON E' PIU' CONSIDERATO MALATTIA RARA

*Riferimento normativo: Decreto del Presidente del Consiglio dei Ministri (DPCM) 12/01/2017. Definizione e aggiornamento dei livelli essenziali di assistenza, di cui all'articolo 1, comma 7, del decreto legislativo 30 dicembre 1992, n. 502. (17A02015) (GU Serie Generale n.65 del 18-03-2017 - Suppl. Ordinario n. 15)*

**IL PDTA PER ANEMIE RARE della Regione Lazio  
DOVRA' ESSERE AGGIORNATO, con la partecipazione di tutti gli attori coinvolti,  
COMPRESO LE RAPPRESENTANZE DEI PAZIENTI come da norma e nell'ottica che il  
PDTA deve essere strumento di intervento che assicuri  
«NON PIU' DI-NON MENO DI»**

## L'APPROCCIO DIAGNOSTICO



**IN MEDICINA, specie nel campo delle malattie rare, IL PROCESSO DIAGNOSTICO è costituito da TAPPE OBBLIGATORIE la cui successione è dettata da UN PROCESSO LOGICO**

**LA RACCOLTA DELLA STORIA CLINICA E L'ESAME OBIETTIVO DEL PAZIENTE HANNO RILEVANZA MAGGIORE E SONO ATTI MEDICI IMPRESCINDIBILI:**

Forniscono elementi importanti per la diagnosi  
Assicurano l'appropriatezza prescrittiva degli accertamenti da eseguire  
Contribuiscono a stabilire un rapporto umano tra il medico e il paziente

**In particolare L'ANAMNESI FAMILIARE E PERSONALE SONO FONDAMENTALI PER:**

Per l'orientamento diagnostico  
Per prospettare e pianificare indagini familiari e di coppia  
Per un corretto counseling genetico



- Generalmente il paziente giunge all'osservazione lamentando sintomatologia, talora ingravescente, riconducibile ad uno stato anemico e alla riduzione dell'ossigenazione dei tessuti.
- Spesso lamenta DEBOLEZZA, AFFATICAMENTO, PALPITAZIONI o sintomi riconducibili a ipo-ossigenazione cerebrale, come CEFALEA, DIFFICOLTA' DI CONCENTRAZIONE, IPERSONNIA.
- Un quadro emolitico lieve potrebbe non provocare sintomi significativi e possono esordire in età avanzata con caratteristiche anche gravi di acuzie ( crisi emolitiche, crisi aplastiche , riscontro di emosiderosi, riscontro di epato-splenomegalia)

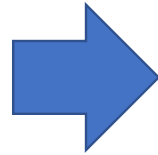
- Significativa è una STORIA FAMILIARE di anemia non meglio precisata, riscontro di splenomegalia o splenectomia inspiegabile, colelitiasi e colecistectomia.
- Il rilievo anamnestico di episodi di ittero intermittente , specie dopo episodi infettivi anche banali o assunzione di farmaci deve far sospettare la presenza di un patologia emolitica

**La maggioranza dei pazienti che giungono all'osservazione presso il Centro Anemie Rare dell'Ospedale S Eugenio è a causa del rilievo occasionale di SPLENOMEGALIA**

## LA SPLENOMEGALIA

### RUOLO FISIOLÓGICO DELL'ORGANO SPLENICO

- EMOCATARESIS degli eritrociti invecchiati o malfunzionanti; tale funzione è estesa anche ai linfociti e alle piastrine
- Rimozione dei corpi inclusi negli eritrociti e parassiti (pitting)
- MATURAZIONE dei reticolociti
- EMATOPOIESI , tipica della vita fetale, può riattivarsi nell'adulto( es. dopo emorragia) (ematopoiesi vicariante)
- Produzione del Fattore VIII e depurazione dei fattori della coagulazione
- LINFOPOIESI e ANTICORPOPOIESI specialmente anticorpi diretti contro antigeni solubili
- Sintesi di OPSONINE che facilitano l'attività macrofagica "etichettando" sostanze estranee come dannose
- Serbatoio di sangue e regolazione attiva del circolo portale ( anche se contiene il 2% degli eritrociti)
- Riserva piastrinica ( circa 2/3 della massa piastrinica)



### LA SPLENOMEGALIA

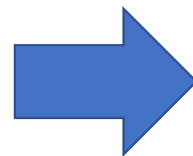
- È quasi sempre un SINTOMO e numerose sono le affezioni che si accompagnano a splenomegalia
- Casi in cui la splenomegalia fa parte di un quadro clinico più complesso
- Casi in cui è un segno apparentemente isolato, scoperto casualmente

### Eccesso di funzioni

**RISPOSTA IMMUNITARIA:** infezioni, infestazioni, collagenopatie  
**RISPOSTA del RE :** talassemie, malattie della membrana, PTI  
**EMOPOIESI:** Malattie mieloproliferative croniche, MDS, LMC

### DISORDINI STRUTTURALI

**CONGESTIONE :** ipertensione portale  
**INFILTRAZIONE :** mucopolisaccaridosi, amiloidosi, Sarcoidosi  
**NEOPLASIE:** linfomi, leucemia linfatica, tumori primitivi



### L'IPERSPLENISMO

È DEFINITO DALLA CONCOMITANZA DI SPLENOMEGALIA E CITOPENIA PERIFERICA : anemia, leucopenia , trombocitopenia, da sole o variamente associate, cui concomita iperplasia midollare dei precursori

# EMOGLOBINOPATIE

## DISORDINI QUANTITATIVI

ridotta o assente sintesi  
di  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  catene globiniche

**SINDROMI TALASSEMICHE**

QUADRO FISIOPATOLOGICO DOMINATO  
MAGGIORMENTE DAGLI EVENTI  
«CENTRALI»

## DISORDINI QUALITATIVI

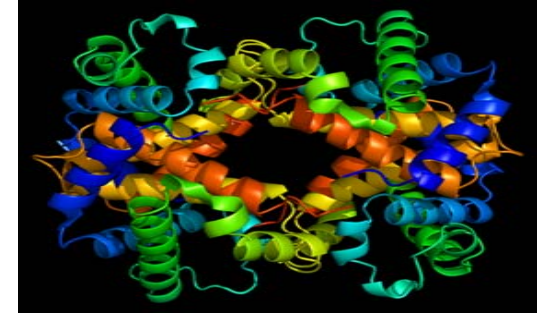
Solubilità, Stabilità, Affinità per  $O_2$

**EMOGLOBINOPATIE  
STRUTTURALI (es. SCD)**

QUADRO FISIOPATOLOGICO  
DOMINATO MAGGIORMENTE DAGLI  
EVENTI «PERIFERICI»»

SIMPTI  
PRO

**NEL VASTO MONDO DELLE MALATTIE RARE E ,  
IN PARTICOLARE DELLE ANEMIE RARE,  
LE EMOGLOBINOPATIE VANTANO INDUBBI PRIMATI**



Molte delle nostra conoscenze di fisiopatologia umana derivano proprio dagli studi sulla emoglobina che, più che in altre molecole, hanno seguito la nascita e lo sviluppo della medicina molecolare

**CONOSCENZA DELLE BASI  
MOLECOLARI DELLO  
SVILUPPO  
DELL'EMOGLOBINA**

**CONOSCENZA DEL  
CONTROLLO GENETICO E  
DEL CONCETTO  
GENOTIPO/FENOTIPO**

**CONOSCENZA DEI  
MECCANISMI  
FISIOPATOLOGICI**

**POSSIBILITA' TERAPEUTICHE  
E ACCESSO A TRATTAMENTI  
INNOVATIVI NEL FUTURO  
PROSSIMO**

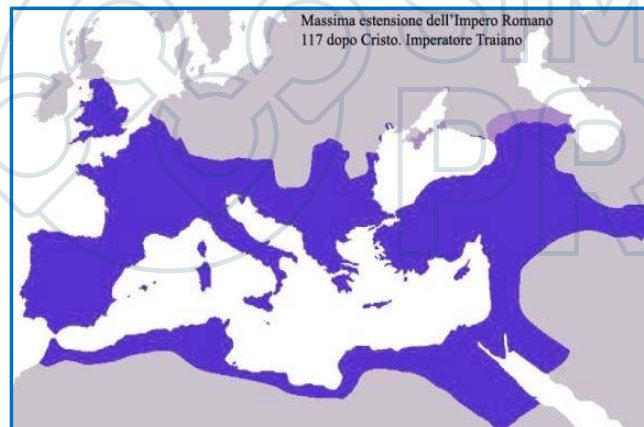
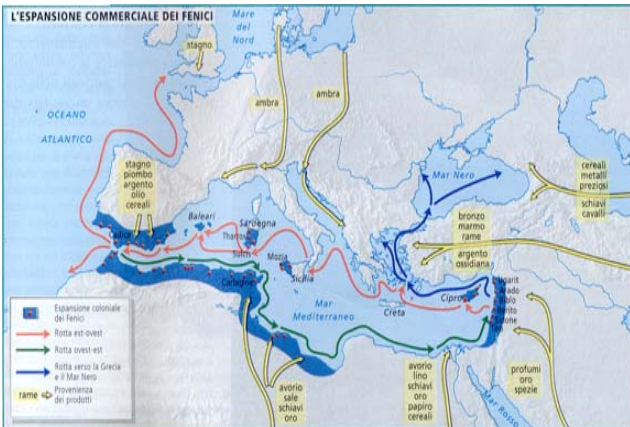
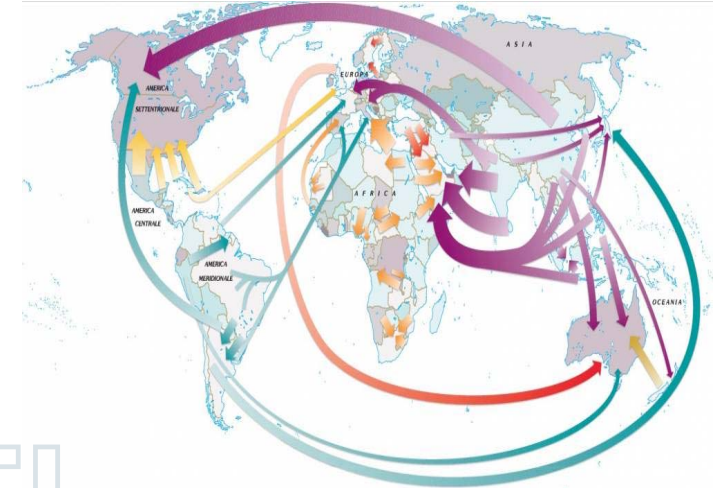
**NON SI TROVANO PRECEDENTI IN MEDICINA !**



Musei vaticani – Raffaello  
Enea Anchise e Ascanio

## UNA STORIA MILLENARIA ....

Alla diffusione delle emoglobinopatie hanno sicuramente contribuito le rotte dei Micenei e dei Fenici, l'espansione dell'Impero Romano, le tratte degli schiavi, i fenomeni migratori .....



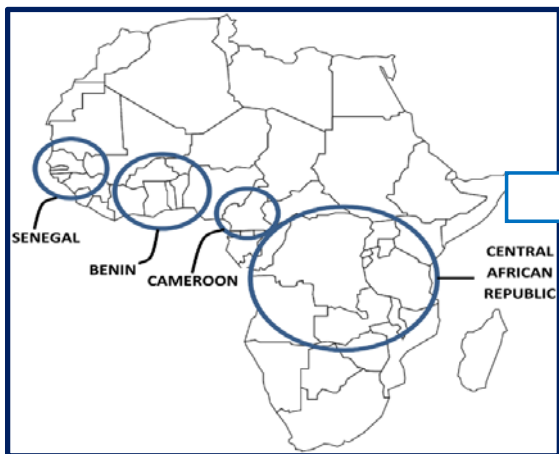
## LE EMOGLOBINOPATIE *IGNORANO* LE FRONTIERE !

Le emoglobinopatie, inizialmente endemiche in Sardegna, in Sicilia, nell'Italia del sud e nel Delta del Po, si sono diffuse in seguito ai fenomeni migratori specie nel periodo post bellico .

Studi molecolari del gene  $\beta$  mediante analisi con enzimi di restrizione e studi epidemiologici

**SI SUPPONE CHE LA MUTAZIONE HbS SI E' ORIGINATA IN MODO INDIPENDENTE IN ALMENO 5 DISTINTE AREE GEOGRAFICHE**

**APLOTIPI CON DIVERSA GRAVITA' DI ESPRESSIONE FENOTIPICA**  
%HbF, livello di espressione del gene Gy, associazione con variante AyT, % di cellule dense



- APLOTIPO BANTU O CAR  
Repubblica Centro Africana
- APLOTIPO BENIN
- APLOTIPO CAMERUN
- APLOTIPO SENEGAL  
Fenotipo MILD per HbF e  
cellule F più elevate

APLOTIPO INDIANO  
Fenotipo MILD per HbF e  
cellule F più elevate

AMERICA

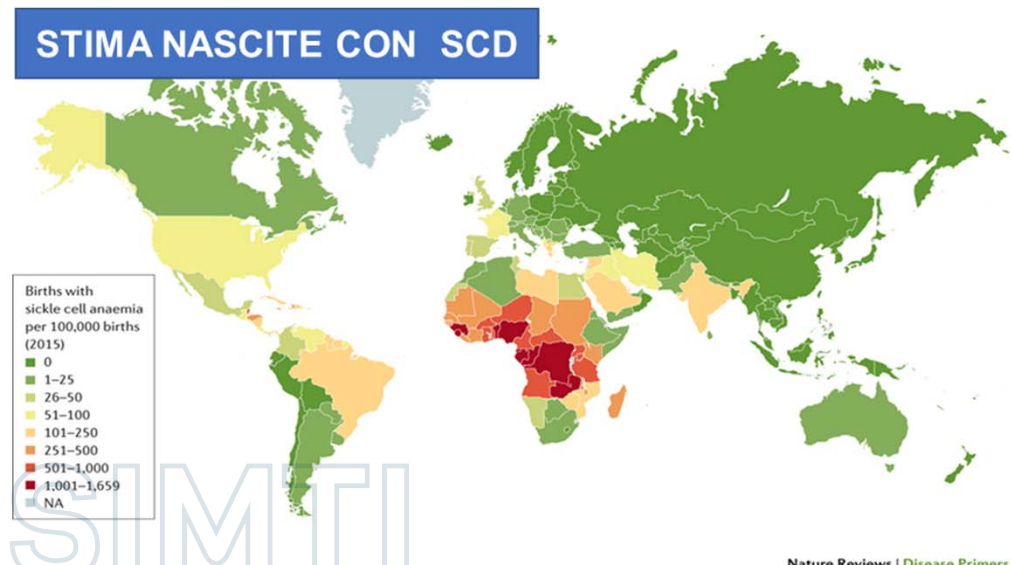
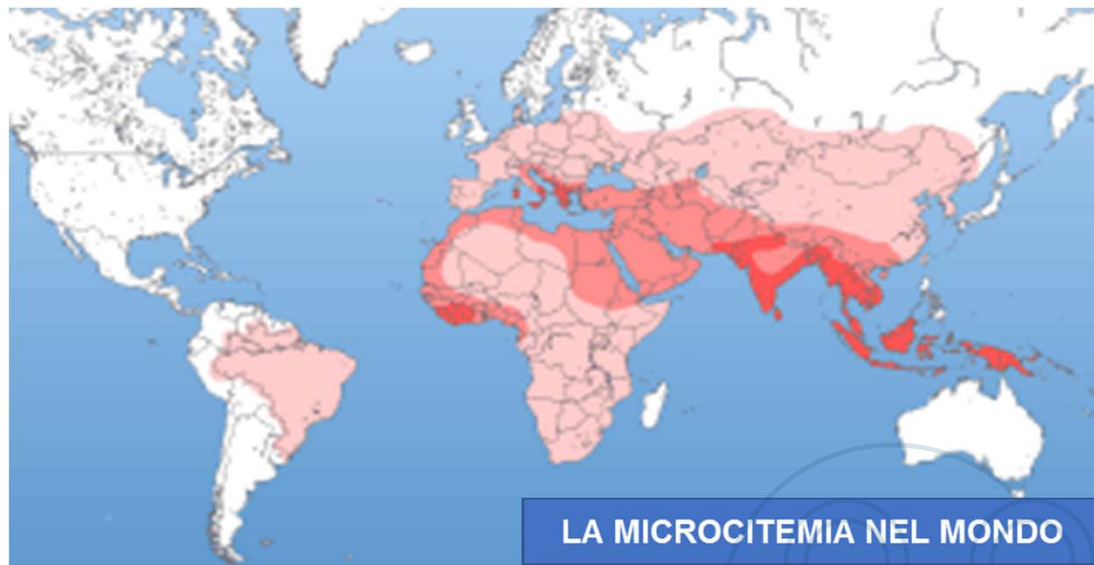
MEDITERRANEO

ARABIA OCCIDENTALE

ARABIA SUD ORIENTALE

(  Nagel RL Semin Hematol 1990 )





**Si stima che globalmente ci siano 270 milioni di portatori di emoglobine anomale , di cui 80 milioni siano portatori di  $\beta$  talassemia**

**Stima nascite /anno con talassemia trasfusione-dipendente : 25.511**  
**N. pz / anno che iniziano le trasfusioni : 2989 Regularmente trasfusi: 11.7%**  
**decessi /anno per mancanza di trasfusioni : 22522**  
**adeguata chelazione : 39% ( 37866) Inadeguata chelazione : 61% (59764)**  
**decessi/anno per emosiderosi : 2988**

- L'incidenza della Anemia Falciforme è circa del 10-18,9 per mille nati in alcuni paesi del sub-sahara, del 0,2-0,99 nei paesi mediterranei e del 5-9,9 in alcuni paesi del medio oriente e dell'Africa equatoriale.
  - In Usa l'incidenza è approssimativamente di 1 su 1000-1400 nati di origine ispanico-americana e di 1 su 500 nati di origine afro-americana (WHO 2015).
  - In Jamaica la variante omozigote della malattia si riscontra in 1 su 300 nati mentre la variante in eterozigosi mista HbSC in 1 su 500 nati.
- Si stima che ci siano in Europa circa 44.000 soggetti ammalati da Anemia a cellule falciformi**



Report Genomic and World Health WHO 2002: disordini globinici descritti come primo esempio di come le tecnologie del DNA ricombinante possono essere di beneficio alle popolazioni sottosviluppate

118 th session of WHO Executive Board 2006 indica la SCD e la Talassemia come problematiche maggiori che richiedono azioni immediate da parte dei governi e delle organizzazioni mondiali di sanità

**Diagnostica delle emoglobinopatie:**  
**HPLC o Cromatografia Liquida ad Alta Pressione**

- L' HPLC è il metodo d'elezione e di riferimento per la determinazione del quadro emoglobinico, in particolare per la determinazione quantitativa dell' HbA<sub>2</sub>
- Le tecniche elettroforetiche non sono ritenute idonee ma forniscono informazioni complementari (DPR 18/12/2003 e GURS parte I n.4 del 23/01/2004)

**DIAGRAMMA DI FLUSSO**

**I FASE**  
SCREENING DELLE  
EMOGLOBINOPATIE

**II FASE**  
STUDIO DEI FAMILIARI  
Per confermare il sospetto

**III FASE : STUDIO DEL DNA**  
Del soggetto e/o familiari per  
Identificare la mutazione



## LE SINDROMI TALASSEMICHE

Malattie genetiche a trasmissione autosomica recessiva caratterizzate da ridotta o assente sintesi delle catene emoglobiniche. L'alta incidenza nei paesi rivieraschi del Mediterraneo e la prima descrizione (Cooley e Lee nel 1925) in bambini originari di tale area giustificano il sinonimo di "Anemia Mediterranea".


Il difetto genetico può interessare le diverse catene globiniche

Le più significative a carico delle catene  $\beta$ ,  $\alpha$  e  $\delta$ :  $\beta$  talassemie,  $\alpha$  talassemie e  $\delta\beta$  talassemie.

Ne fanno parte anche un gruppo di disordini definiti Persistenza di Emoglobina Fetale ereditaria (HPFH)

### $\beta$ TALASSEMIA: PATOLOGIA PARADIGMATICA DEI DISORDINI DELLA AGGREGAZIONE PROTEICA

**ALLA BASE DELLA FISIOPATOLOGIA DELLA BETA TALASSEMIA VI E' UNA SINTESI SBILANCIATA DELLE CATENE GLOBINICHE CON ACCUMULO CITOTOSSICO DI  $\alpha$  CATENE LIBERE**

(  Fessas P Blood 1963; Weatheral DJ Nature 1965; Natlhan DG Am J Med 1966; Bank A J Clin Invest 1968 )

Disease	Abnormal Protein	Cell type	Intracellular Inclusion
Alzheimer's disease	Tau	Neurons	Neurofibrillar tangles
Amyotrophic lateral sclerosis (familial)	Superoxide dismutase 1	Neurons	Bunina bodies
Parkinson's disease	$\alpha$ -synuclein	Neurons	Lewy bodies
Huntington's disease	Huntingtin (polyglutamine expansion)	Neurons	-
X-linked spinobulbar muscular atrophy (Kennedy's disease)	Androgen receptor (polyglutamine expansion)	Neurons	-
Prion disease	Prion protein	Neurons	-
$\alpha_1$ -antitrypsin deficiency	$\alpha_1$ -antitrypsin	Hepatocytes	-
Alcoholic liver disease	Intermediate filaments	Hepatocytes	Mallory bodies
Wilson's disease	ATP7B	Hepatocytes	-
$\beta$ -thalassemia	$\alpha$ globin	Erythrocytes	-

# FISIOPATOLOGIA DELLE SINDROMI TALASSEMICHE

ridotta o assente sintesi delle catene emoglobiniche.

**$\beta$  TALASSEMIA: PATOLOGIA PARADIGMATICA**  
sintesi sbilanciata delle catene globiniche  
con accumulo citotossico di  $\alpha$  catene libere

**EMICROMI :**  
AGGREGATI di  $\alpha$  catene/ EME  
Precipitazione e danneggiamento  
membrane

**ECESSO DI EMI : FORMAZIONE**  
DI Reactive Oxygen Species ( ROS)



INADEGUATO  
TRATTAMENTO  
TRASFUSIONALE

INADEGUATA TERAPIA  
CHELANTE

RESIDUA SINTESI DI  $\beta$   
CATENE ( $\beta^+$ )  
COESISTENZA DI  $\alpha$  TAL  
PERSISTENZA DI  
HbF  
TRASFUSIONI REGOLARI  
CHELAZIONE ADEGUATA

**TOSSICITA' FERRO-MEDIATA**  
Apoptosi cellule eritroidi e riduzione RBC e loro sopravvivenza

**ANEMIA**

DOWN-REGULATION  
EPCIDINA  
RE-CYCLING FERRO

INCREMENTO  
ERITROPOIETINA  
ESPANSIONE MIDOLLARE

EMOLISI  
ERITROPOIESI  
EXTRAMIDOLLARE

**EMOSIDEROSI  
FIBROSI**

**DEFORMAZIONI OSSEE**

**SPLENOMEGALIA**

*Rivella S Haematologica 2015 ; Camaschella C Br J Haematol 2016*

L'ORGANISMO UMANO NON POSSIEDE UN MECCANISMO PER ESPELLERE IL FERRO IN ECCESSO

L'EMOSIDEROSI SI GENERA QUANDO LE CAPACITA' DI LEGARE IL FERRO DA PARTE DELLA TRANSFERRINA SONO SUPERATE (> 70%)

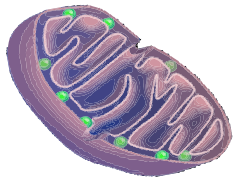


**LPI : Labile Plasma Iron**  
Forma del NTBI ad attività REDOX, chelatabile, che permea le cellule attraverso vie non regolabili



**LCI : Labile Cell Iron**

Determina uno stato ossidativo persistente attraverso la formazione di specie dell'O reattive ( ROS) che catalizzano la formazione di radicali OH\* CON DANNO AI LIPIDI , PROTEINE E DNA



MITOCONDRI



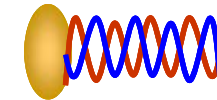
RETIKOLO ENDOPLASMATICO



LISOSOMI



PROTEINE



DNA

**DANNO CELLULARE - FIBROSI - MUTAGENESI**

L'ACCUMULO DI FERRO MACROFAGICO E' TIPICO DELLA DEPOSIZIONE DI FERRO SECONDARIO ALLE TRASFUSIONI E AL CONSEGUENTE RE-CYCLING DEL FERRO ( BATTI 2007 )

## IL SOVRACCARICO DI FERRO TRASFUSIONALE

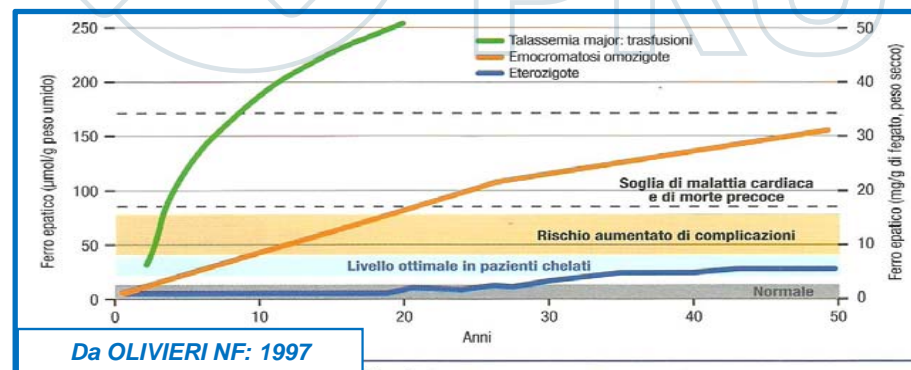


**Nelle Talassemie major E' NECESSARIO IL REGOLARE APPORTO TRASFUSIONALE PER LA SOPRAVVIVENZA**

Una unità di emazie = 200-250 mgFe (circa 1,08 mg/ml)  
In TM trasfusione dipendente : 0,3-0,6 mgFe/Kg/die = 4-10 g di Fe /anno

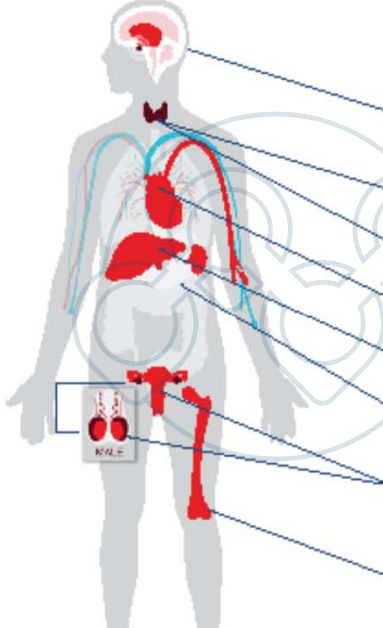
Riduzione degli eventi secondari allo stato anemico

Incremento del RE CYCLING DEL FERRO da parte dei macrofagi del sistema reticoloendoteliale



Porter JB Hematol Oncol Clin N Am 2018; Gozzolino R Int J mol Sci 2016 ; Saliba An J blood Med 2015

## Transfusional Iron Overload in Thalassemia

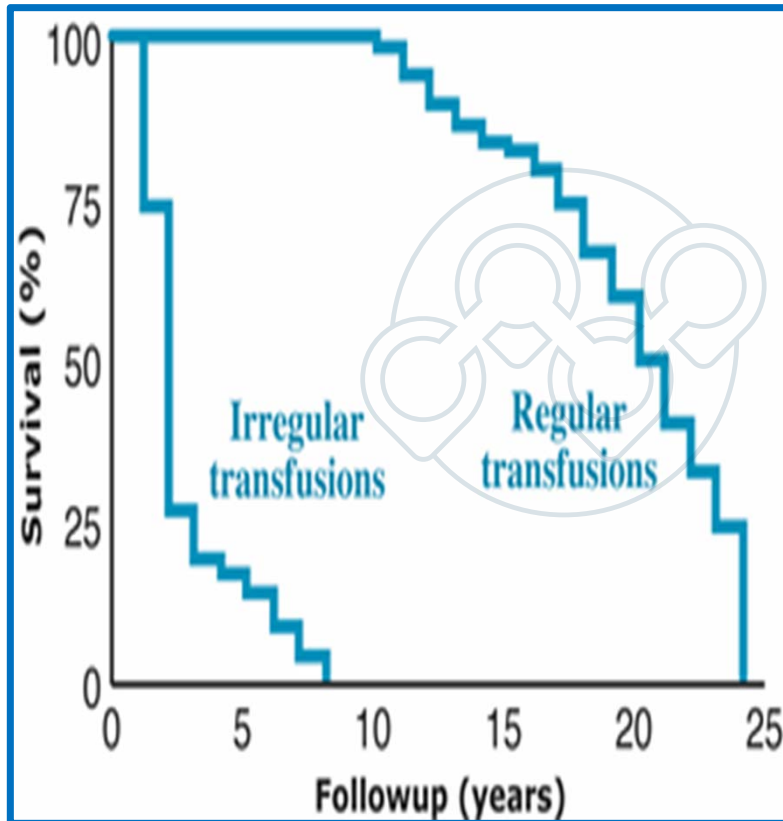


Organ <sup>1,2</sup>	Consequences
Pituitary	Hypogonadotropic Hypogonadism
Thyroid	Hypothyroidism
Parathyroid	Hypoparathyroidism
Heart	Cardiomyopathy
Liver	Cirrhosis, carcinoma
Pancreas	Diabetes
Gonads	Hypogonadotropic Hypogonadism
Bones	Osteomalacia Osteoporosis

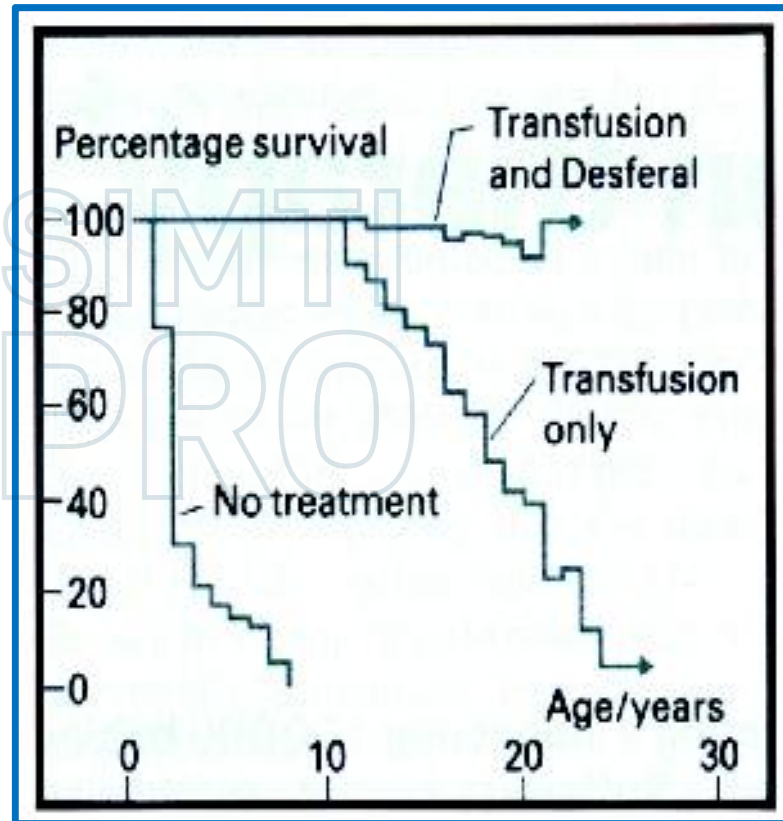
*Taher A Semin Hematol 2007; Ebrhimpour L Hematology 2012; Oudit GY Nat Med 2003*



## TRASFUSIONI, CHELAZIONE E SOPRAVVIVENZA



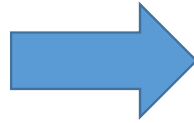
 Modell B. 1984



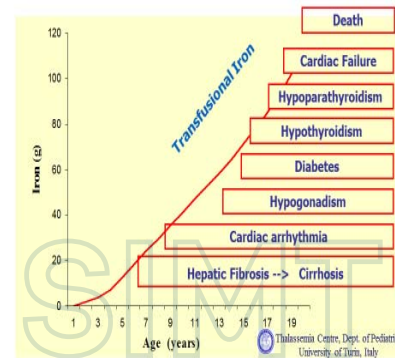
 Chemistry in Britan 1990

## L'IMPORTANZA DELL'ORGANO EPATICO IN TALASSEMIA

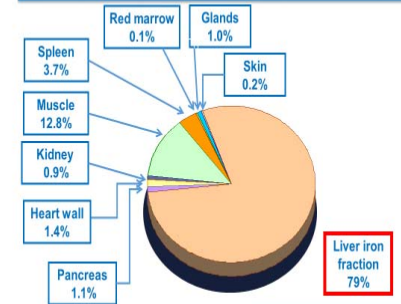
L'INTERASSAMENTO EPATICO DA SOVRACCARICO DI FERRO E' PRECOCE E PREPONDERANTE



Transfusional Iron Overload in Thalassemia

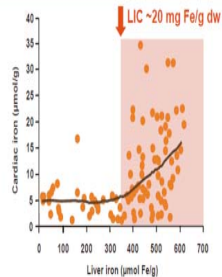


DISTRIBUZIONE DEI DEPOSITI DI FERRO IN PAZIENTI TALASSEMICI ( DATI AUTOPTICI )



MODELL B. 1976

Without iron chelation the liver loads iron first, followed by the heart



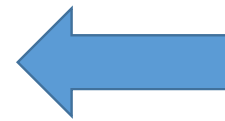
Excess iron is absorbed by the liver before storage capacity overflow, resulting in cardiac loading

Jensen PD et al. Blood 2003; 101:4632-4639

### LA LIC CORRELA :

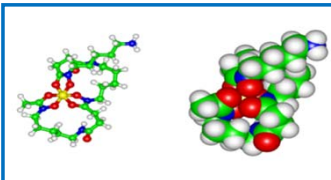
- ❖ CON IL BODY IRON STORE ( Angelucci E 2000 )
- ❖ CON IL DANNO CELLULARE E LA FIBROSI ( Jensen PD 2003 )
- ❖ CON L'ASSENZA DI MALATTIA CARDIACA ( Telfer PT 2000 )

LA LIC NON E' CORRELATA CON I DEPOSITI CARDIACI DI FERRO ( Brittenham GM 1994 ; Noetzel L 2008 )

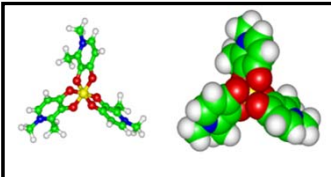


L'IMPORTANZA DELLA LIVER IRON CONCENTRATION (LIC)

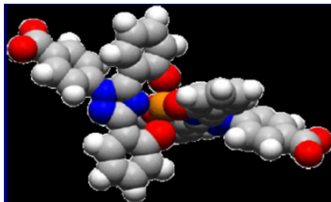
**... UN LENTO E FATICOLO SVILUPPO ... PER  
AVERE TRATTAMENTI ADEGUATI....**



**DEFERRIOXAMINA ( DFO )**  
Sideroforo naturale prodotto dallo *Streptomyces Pilosus*  
Primo report di utilizzo nel 1962



**DEFERIPRONE ( DFR )**  
Chelante di sintesi (brevetto 1983) (Hider-Kontoghiorghes)  
Prime somministrazioni a pazienti nel 1987



**DEFERASIROX ( DFX )**  
Unico chelante di sintesi utilizzato in studio prospettico  
Fase I :1998; Fase II :2001; Fase III: 2003

...E PER AVER MEZZI DIAGNOSTICI ATTENDIBILI



Lancet 1971 Barry M et al :  
Measurement of  
liver-iron concentration  
in needle-Biopsy specimens

N Engl J Med 2000 Angelucci E :  
Hepatic iron concentration  
and total body  
iron stores

Elsevier 1992 Fisher R et al:  
Liver iron Quantification  
in the diagnosis and  
therapeutic control...

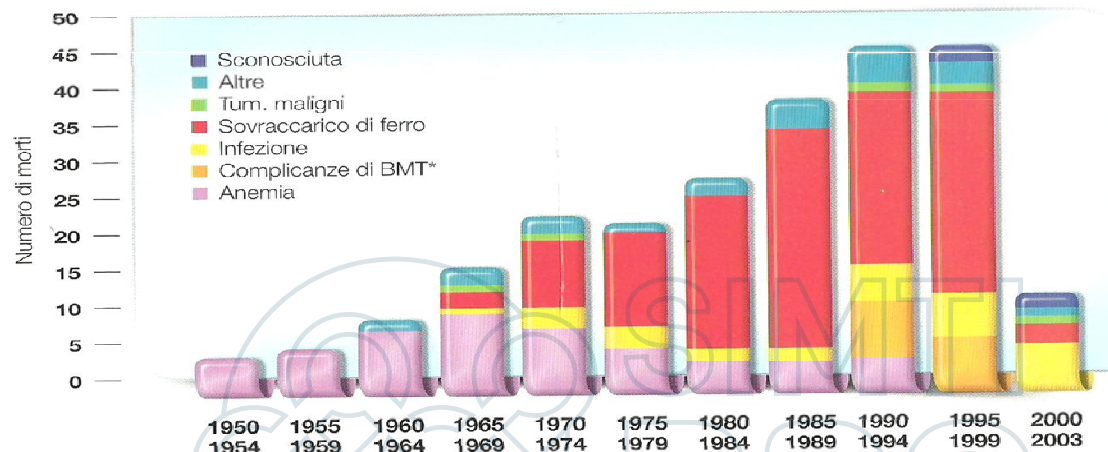
Magn Reson Imaging 2000  
Clark PR, St Pierre TG  
Quantitative mapping of trasverse  
relaxivityIn hepatic iron overload



METODO	VANTAGGI	SVANTAGGI
FERRITINA	BASSO COSTO RIPETIBILITA'	INSATTENDIBILIA' IN STATI INFIAMMATORI
BIOPSIA EPATICA	GOLD STANDARD MISURAZIONE ACCURATA DELLA EMOSIDEROSI CORPOREA	INVASIVA RISCHIO DI INFEZIONI RISCHIO DI SANGUINAMENTI INADEGUATEZZA DEL FRUSTOLO DIFFICOLTA' DI ESECUZIONE
RM T2*	VALUTAZIONE FEGATO & CUORE VALUTAZIONE DEL PANCREAS NON INVASIVA ACCURATEZZA DEI RISULTATI	COSTO DIFFICOLTA' DI REPERIRE CENTRI ATTREZZATI
SQUID ( Super Quantum conducing interference device)	NON INVASIVA ACCURATEZZA DEI RISULTATI	SOLO 3 CENTRI NEL MONDO

**Biopsia epatica**  
**Gold Standard per la determinazione del Fe epatico**  
**Liver Iron Concentration : LIC mgFE/g liver dw**

**SCARSE CONOSCENZE E INADEGUATEZZA NELL'APPLICAZIONE DEI TRATTAMENTI HANNO CONDIZIONATO PESANTEMENTE LA STORIA NATURALE DELLA MALATTIA**



MODELL B 2008 : MORTALITA' NEL REGNO UNITO

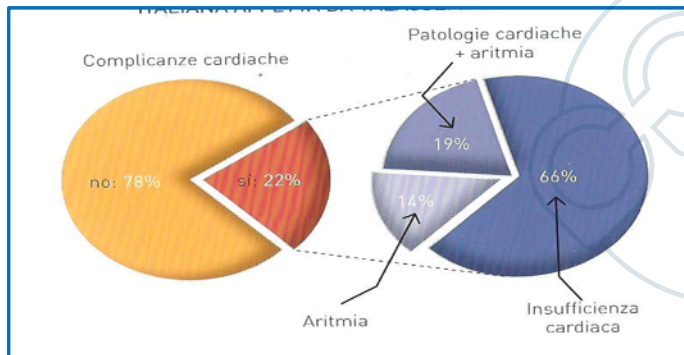
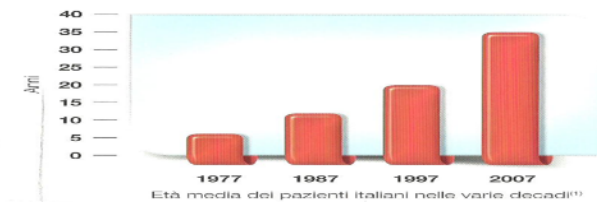
Inadeguata terapia trasfusionale

Inadeguata chelazione

Chelazione  
ottimale

## PROGRESSIVO AUMENTO DELL'ETA' MEDIA DEI PAZIENTI E SOSTANZIALE DECLINO DELLA MORTALITA' CARDIACA NEL XXI sec

- Tra il 1949 e il 1957 solo il 9% dei PZ in Italia settentrionale raggiungeva i 6 anni di età
- Negli anni settanta solo il 12% sopravviveva fino ai 12 anni
- Nel 2007 l'età media dei pazienti italiani raggiungeva i 35 anni



**n.776 Pazienti italiani ( anno 2011)**

**68,2% decessi per cardiopatia  
6,8% decessi per infezioni  
4,1% decessi per complicanze epatiche**

**LA CARDIOPATIA E' RIMASTA A LUNGO LA PRIMA CAUSA DI DECESSO NEI PAZIENTI TALASSEMICI  
( *Borgna Pignatti C 2005; Telfer P 2009; Borgna Pignatti C 2011; Voskaridou E 2012* )**

### Cause di decesso nella regione Lazio: periodo 1990-2019

periodo	Decessi TM	Decessi TI	periodo	Decessi TM	Decessi TI	periodo	Decessi TM	Decessi TI	periodo	Decessi TM	Decessi TI
I° decennio	8	3	II° decennio	11	3	2011-2015	8	4	2016-2019	4	2
Età media	32,5±8,8	39±9,8	Età media	37,5±13,6	55,3±23,4	Età media	42,6±10,6	61,2±13,4	Età media	48,2±6	57±14

Cause decesso	I° decennio	II° decennio	2011-2015	2016-2019
CUORE	6 ( 54,5%)	3 ( 21,5%)	3 (25%)	3(50%)
CIRROSI EPATICA	1 ( 9,01%)	2 ( 14,2%)	1 (8,3%)	-
HCC	-	3 (21,5%)	5 (41,6%)	2(33,3%)
TROMBOEMBOLISMO	1 ( 9,01%)	4 28,6%)	-	1(16,6%)
INFEZIONI	1 (9,01%)	-	-	-
NEOPLASIE	1 (9,01%)	1 (7,1%)	-	-
TMO	1 (9,01%)	-	-	-
INCIDENTE STRADALE	-	1 (7,1%)	1 (8,3%)	-
IRC	-	-	1 (8,3%)	-
SENESCENZA	-	-	1 (8,3%)	-

35,7%

49,9%

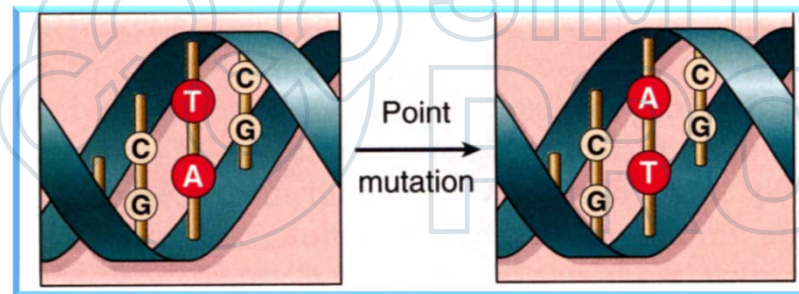


## ANEMIA FALCIFORME o DREPANOCITOSI o SICKLE CELL DISEASE ( SCD

gruppo di disordini del globulo rosso ad ereditarietà autosomica recessiva, associati alla predominante presenza di emoglobina S ( HbS ) , una variante patogena della catena beta globinica

- presente in omozigosi (HbS/S)
- in eterozigosi mista con altre varianti beta globiniche : Hb C,  $\beta^{\div}$  Tal e  $\beta^{\circ}$ Tal (Microdrepanocitosi o Talasso-drepanocitosi )
- più raramente con le varianti D-Punjab, O-Arab e E

La sostituzione di una base di adenina con una di timina determina la conversione della tripletta GAG in GTG



codifica per l'aminoacido Valina ( idrofobico) al posto dell'Acido Glutammico ( idrofilico) in posizione 6 della catena globinica

### PRIMA MALATTIA MOLECOLARE IDENTIFICATA

Prima descrizione nel 1910 ( *Herrick* )

Nel 1940 descrizione del fenomeno di sickling e iperviscosità ( *Ham e Castle* )

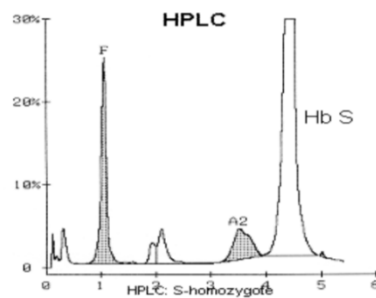
Nel 1949 venne dimostrata la presenza della emoglobinopatia ( *Pauling* ) e la trasmissione mendelliana ( *Neel* )



## DIAGNOSI

- Familiari di portatori o malati già individuati
- Coppie a rischio per familiarità per emoglobinopatie con
- Coppie in età fertile in cui un componente sia stato accertato come portatore
- Individui ( adulti o in età pediatrica ) che presentano anemia ad impronta emolitica , asplenia o splenomegalia, crisi dolorose ad eziologia non nota , specialmente se originari di zone ad alta endemia per emoglobinopatie

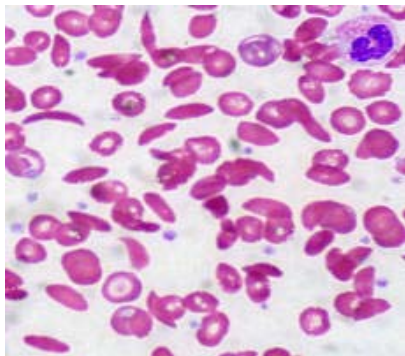
Appropriatezza prescrittiva per il test di I° livello per emoglobinopatie  
L' indicazione all'approfondimento diagnostico prevede che l'individuo non presenti carenza marziale o sia in terapia con ferro, che non abbiano ricevuto emotrasfusione nei tre mesi precedenti.



**DIMOSTRAZIONE DELLA HbS IN ALTA PERCENTUALE ( >50%)  
in Cromatografia liquida ad alta performance (HPLC)  
Tale tecnica permette inoltre di quantificare l'HbA2 e la HbF**

### TEST DI FALCIZZAZIONE o SICKLING TEST

**Sangue fresco + volume doppio di sodio diodonito con vetrino porta-oggetto chiuso ermeticamente + incubazione a 37 °C per 1 ora**



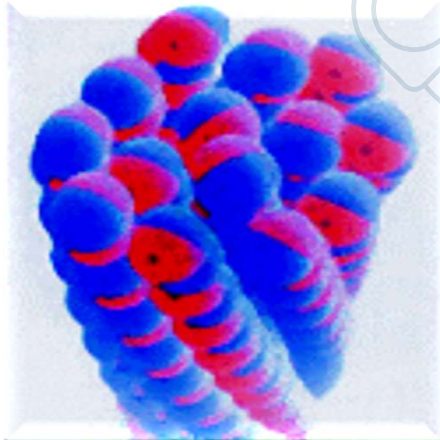
**L'analisi del DNA è di minor impiego e riservata alla tipizzazione delle varianti emoglobiniche associate in eterozigosi mista alla HbS o alla identificazione di concomitanti difetti delle alfa catene globiniche.**

**Hb SOLUBILE**



**STATO desossi-  
Riduzione Ph  
DISIDRATAZIONE  
FEBBRE**

## **Hb POLIMERIZZATA**



L' HbS SI AGGRAGA IN DENSI POLIMERI TRASFORMANDOSI IN UN GEL SEMISOLIDO E VISCOSO CHE DETERMINA LA CARATTERISTICA DEFORMAZIONE A FALCE DELL'ERITROCITA

**Incremento della concentrazione della emoglobina  
Modificazioni della membrana  
Modifica della adesività**

**CINETICA**  
**PROCEDE PER DUE STEP**

- Inizialmente si forma un piccolo nucleo formato da 30 a 50 tetrameri (sickling reversibile)
- Successivamente altri tetrameri possono aggiungersi longitudinalmente a formare un polimero più ampio
- A questo punto il processo diventa rapidamente esplosivo ( sickling irreversibile)

**QUANTITA' E VELOCITA' DI FORMAZIONE**

- La concentrazione intracellulare di HbS : è fattore determinante!
- La pO<sub>2</sub>
- La temperatura
- Il pH
- La concentrazione di 2-3 difosfoglicerato che stabilizza la deoxy - HbS
- La concentrazione di altre Hb ( HbF o HbA)



**POLIMERIZZAZIONE HbS**

Rigidità della membrana per alterazione dei trasporti ionici e danno ossidativo  
Attivazione della coagulazione  
Stato infiammatorio  
Riduzione dell'Ossido nitrico da Hb libera CON VASOCOSTRIZIONE in organi come rene, cuore, cervello

**EMOLISI CONICA**  
**INTRA- ED EXTRA-VASCOLARE**

Entrambi contribuiscono, pur in modo differente , ai danni acuti d'organo e ai danni cronici

**EVENTI VASO-OCCLUSIVI ACUTI (VOCs)**  
**con successivo DANNO ISCHEMICO**

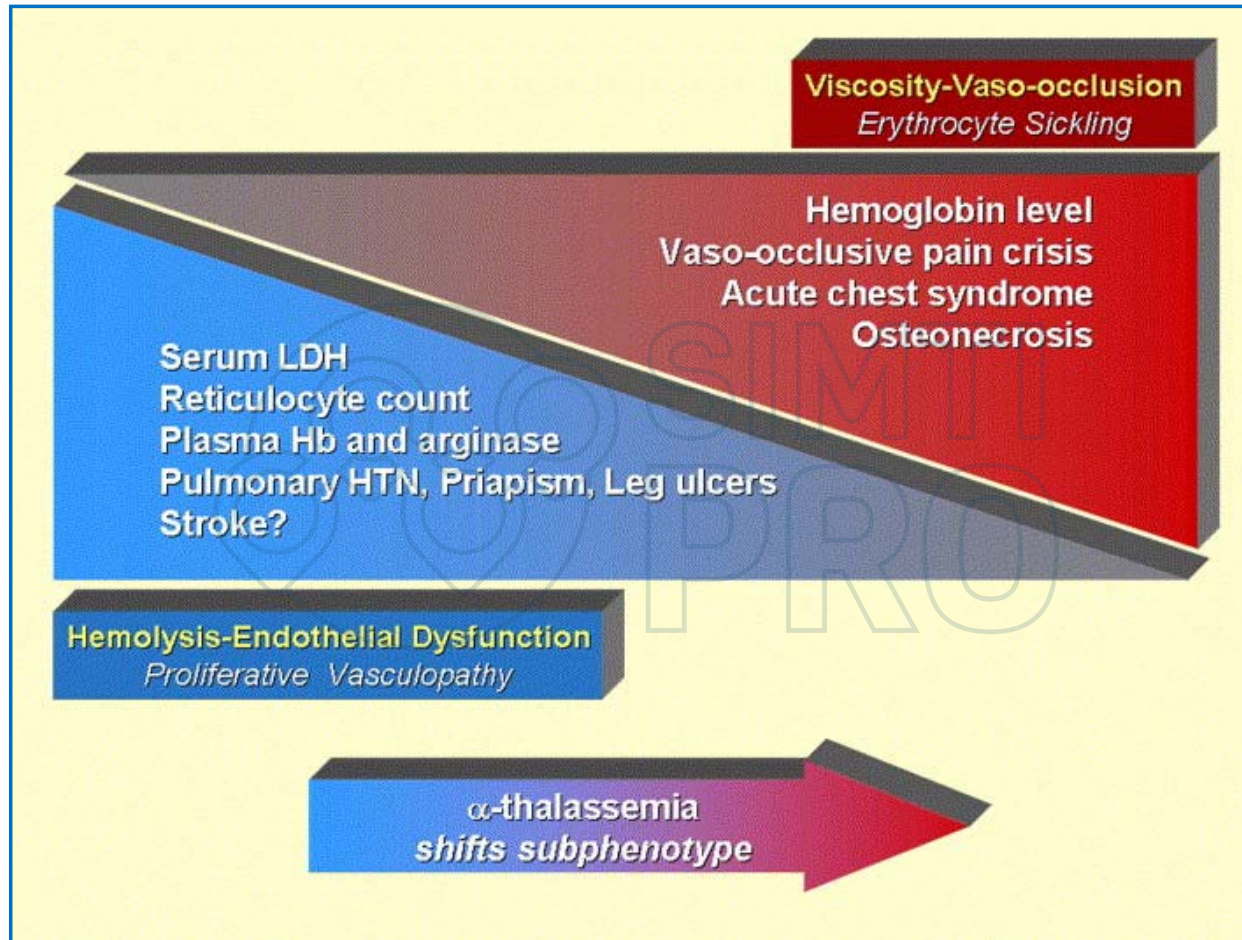
**ACUTI**

- Crisi dolorose
- Crisi toracica acuta
- Stroke
- Sequestro splenico
- Sequestro epatico
- priapismo

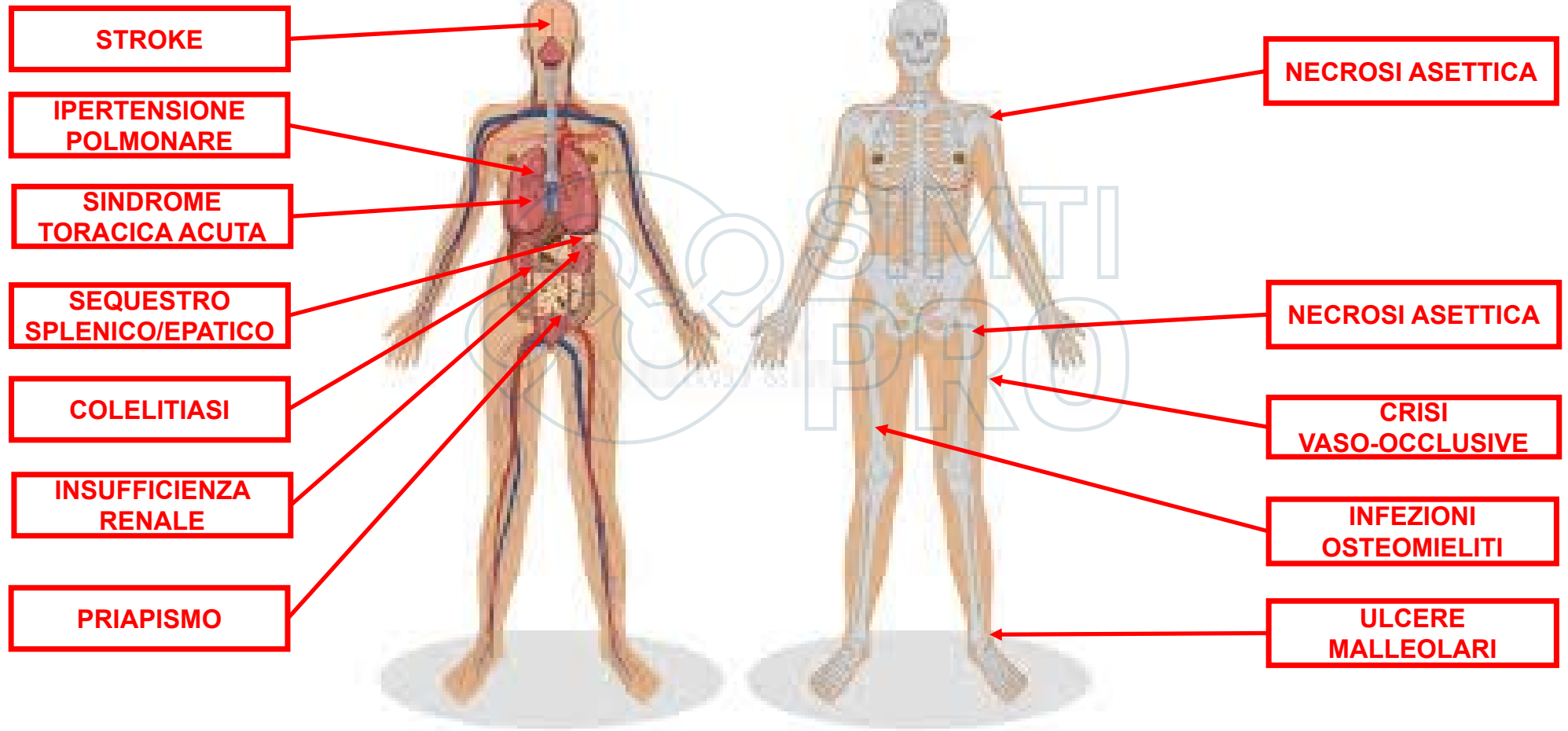
**CRONICI**

- Ipertensione polmonare
- Danni oculari
- Danni renali

## FENOTIPO DELLA SCD



Un drammatico quadro clinico **DOMINATO DALLA CRISI VASO-OCCLUSIVE** e **DAL DOLORE**



## TRATTAMENTO DELLA SCD

**OUTCOME PRIMARIO**

**MANAGEMENT  
DEL DOLORE  
ACUTO E  
CRONICO**

**TERAPIA TRSFUSIONALE**

**ESSENZIALE NEL  
MANAGEMENT  
DEGLI EVENTI  
ACUTI ( ACS,  
STROKE, SEPSI ...)**

**ASSESSMENT DEL RISCHIO  
DI SOVVRACARICO DI  
FERRO**

**NON PERCEPITO  
COME  
PROBLEMATICA  
CHE ABBA  
PRIORITA' CLINICA**

## RAZIONALE DELLA TERAPIA TRASFUSIONALE IN ANEMIA FALCIFORME

### TRASFUSIONI SEMPLICI

Se anemizzazione  
con Hb < 7 g/dl

### SCAMBIO ERITROCITARIO MANUALE (SALASSO-TRASFUSIONE)

con Hb 10 mg/dl  
anche con singolo  
accesso venoso

SALASSO ( 250-300 g)  
+ Infusione  
NaCl 0,9%

Se Hb > 10 g/dl  
e Ht > 30 %

### ERITRO-EXCHANGE

SOSTITUZIONE IN TEMPI RAPIDI DELLE EMAZIE  
SENZA RISCHI DI SOVRACCARICO E IPERVISCOSSITA'  
SCAMBIO :15-20 ml/kg ( 4-6 unità nell'adulto)  
RIDUZIONE DELLA QUOTA DI HbS < 30%

DILUIZIONE DELLA HbS

SOSTITUZIONE DELLA HbS

**RIDUZIONE DELLA HbS circolante**  
con valori post-trattamento di Hb non superiore a 10 mg/dl  
e di Ht non superiore a 30%  
per evitare aumenti di viscosità ematica

 **Raccomandazioni SITE- SIMTI**

## IL FUTURO PROSSIMO ..... (clinical trials.gov al Novembre 2019)

### MODULATORI DELL'ERITROPOIESI

1) Activin receptor ligand (ACE 536)	5) Jak2 inhibitors
2) HEPCIDIN <ul style="list-style-type: none"><li>• Hecpidin</li><li>• Anti TTPRSS 6</li><li>• Ferroportin Inhibitor</li><li>• ERFE Inhibitor</li></ul>	6) TFR inattivaction
3) SERA Inhibitors	7) Apo-transferrin infusion
4) HIF 2alpha Inhibitor	8) HO inhibition
9) PK activation	

**Gene therapy**  
**ex vivo addition**  
**ex vivo gene editing**

bluebirdbio

Ha fissato il prezzo della sua terapia genica  
in 1.575 milioni di Euro

  
**KEEP  
CALM  
AND  
ESTOTE  
PARATI**





## I DIFETTI DI MEMBRANA ERITROCITARIA

La definizione delle struttura e della funzione delle proteine della membrana eritrocitaria e dei geni che governano la loro sintesi ha determinato indubbi vantaggi sulla comprensione dei meccanismi molecolari che determinano i disordini delle membrane eritrocitarie

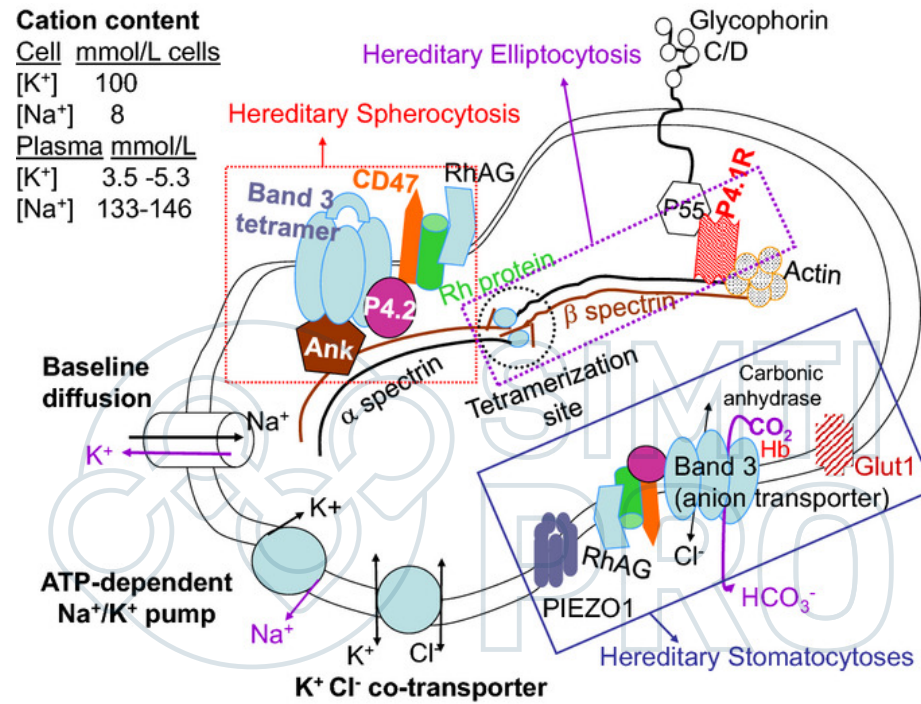
**Le mutazioni di questi geni e le conseguenti anomalie delle proteine di membrana sono la causa della malattia emolitica ereditaria.**

DISORDINE	TRASMISSIONE	DIFETTO MOLECOLARE	GENE	MORFOLOGIA ERITROCITARIA	FRAGILITA' OSMOTICA	FENOTIPO	SPLENECTOMIA
SFEROCITOSI	AD AR de novo	ANKIRINA SPETTRINA $\beta$ SPETTRINA $\alpha$ BANDA 3 PROTEINA 4.2	ANK1 SPTB SPTA1 SLC4A1 EPB42	GRADO VARIABILE DI SFEROCITI	DA LIEVE A MARCATAMENTE RIDOTTA	DA LIEVE A SEVERA	INDICATA
ELISSOCITOSI	AD	PROTEINA 4.1 SPETTRINA $\alpha$ SPETTRINA $\beta$	EPB41 SPYA1 SPTB	ELISSOCITI E CELLULE FRAMMENTATE	DA NORMALE A MARCATA RIDOTTA	DA NON EMOLITICA A SEVERA	INDICATA
STOMATOCITOSI IPERIDRATA	AD	RhAG	RhAG	STOMATOCITOSI	AUMENTATA	DA LIEVE A MODERATA	NON RACCOMANDATA
XEROCITOSI	AD	PIEZO-1 Canali di GARDOS	PIEZO1 KCNN4	ALCUNE TARGET CELL	RIDOTTA	DA NON EMOLITICA A MODERATA	NON RACCOMANDATA

Leggenda AD =AUTOSOMICA DOMINANTE; AR= AUTOSOMICA RECESSIVA

 Hoffman R. Hematology 7h Ed; Mohandas N. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2018; Narla J. Int J Lab Hem 2017; He BJ .Acta Haematol 2018; Andolfo I. Am J Hematol 2018; Jolascon A. Haematologica 2017

ICSH guidelines for the laboratory diagnosis of nonimmune hereditary red cell membrane disorders



## PROCESSO DIAGNOSTICO

### I° STEP

- ANAMNESI CON PARTICOLARE RIGUARDO ALLA STORIA FAMILIARE, OBIETTIVITA'
- ESAMI EMATOCHIMICI DI SCREENING con STUDIO DELLA MORFOLOGIA ERITROCITARIA

### II° STEP

- TEST SPECIALISTICI CHE FORNISCONO ULTERIORI EVIDENZE AL SOSPETTO DIAGNOSTICO ( studio della fragilità osmotica, ektacitometria, elettroforesi delle proteine di membrana)

### III° STEP

- ANALISI GENOMICA CON RILIEVO DELLA MUTAZIONE DEI VARI GENI RESPONSABILI DI QUESTI DISTURBI
- INDAGINE FAMILIARE

 King MJ et AL. ICSH guidelines for the laboratory diagnosis of nonimmune hereditary red cell membrane disorders. Int Jnl Lab Hem 2015



TEST	In presenza di emolisi	causa
Coombs DIR e IND	Test di fondamentale importanza. La positività del test indirizza immediatamente ad una noxa autoimmune	
Aptoglobina	ridotta	Lega l'emoglobina libera
LDH	elevato	Rilasciato dalla lisi eritrocitaria
Bilirubina non coniugata	aumentata	Rottura della emoglobina
Esame urine	Urobilinogeno, positività per sangue	Emoglobina libera e suoi metaboliti
Indici del metabolismo del ferro con calcolo dell'indice di saturazione della transferrina	Possibile iperferritinemia con basso indice di saturazione della transferrina. Possibile emosiderosi nei casi severi	Ferro rilasciato dalla lisi eritrocitaria
<b>INDICI ERITROCITARI</b>		
Hb	HS: da normale o spesso ridotta HE: da normale a severa riduzione OHS: moderata riduzione HX: normale o lieve riduzione	
MCV	OHS: ELEVATO HX: mediamente aumentato	
MCHC	HS: nei range ALTI o AUMENTATA OHS:RIDOTTO HX: AUMENTATA	riflette la disidratazione eritrocitaria
RETICOLOCITI	HS: AUMENTATI HE: possibile reticulocitosi OHS: AUMENTATI HX: AUMENTATI	Risposta midollare allo stato anemico
<b>MORFOLOGIA ERITROCITARIA</b>		<b>TIPICA DEL DIFETTO</b>

legenda HS: sferocitosi ereditaria; HE: ellisocitosi ereditaria; OHS: stomatocitosi iperidrata ereditaria; HX: xerocitosi ereditaria



<p><b>TEST DI FRAGILITA' OSMOTICA</b> <b>Test con incubazione degli eritrociti varie concentrazioni di NaCl</b></p> <p><b>TEMPO DI LISI DEL GLICEROLO ACIDIFICATO (AGLT)</b> <b>PINK TEST ( variante del test al Glicerolo)</b></p> <p><b>EKTACITOMETRIA A GRADIENTE OSMOTICO</b></p>	<p>Gli sferociti hanno meno resistenza alla lisi ad ogni concentrazione di NaCl rispetto ai normali globuli rossi. La pre-incubazione del campione di sangue intero per 24 ore a 37 ° C migliorerà il grado di lisi cellulare. Ha lo svantaggio di una <b>MANCANZA DI SPECIFICITA'</b>. Anche altri difetti possono dare un risultato positivo: anemia emolitica immunitaria, trasfusioni di sangue recenti ( lisi di globuli rossi trasfusi ex vivo a causa della deplezione di ATP in queste cellule), carenze di enzimi RBC (ad es. Carenze di G6PD e piruvato-chinasi) e varianti instabili dell'emoglobina.</p> <p>Misura il tempo impiegato per il 50% di emolisi di un campione di sangue in una soluzione tamponata di soluzione salina ipotonica / glicerolo/fosfato di sodio L'AGLT potrebbe anche dare risultati positivi nella sferocitosi acquisita, come AIHA, in circa un terzo delle donne in gravidanza e in alcuni pazienti con insufficienza renale cronica e con sindrome mielodisplastica</p> <p>La ektacitometria del gradiente osmotico monitora l'estensione del cambiamento di forma dei globuli rossi all'interno di un intervallo di gradiente osmotico Fornisce informazioni sul contenuto di acqua cellulare e sull'eterogeneità della deformabilità. <b>VANTAGGIO: produzione di profili di deformabilità distinti per diversi tipi di disturbi dei globuli rossi</b></p>
<p><b>L'elettroforesi su gel SDS-poliacrilammide (SDS-PAGE)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"><li>• è la tecnica standard utilizzata per la quantificazione delle proteine di membrana : ad es. diminuzione delle proteine in SFEROCITOSI ED IN ELISSOCITOSI</li><li>• può anche rivelare le proteine anomale presenti nei globuli rossi, come la banda 3 CDAlI e varianti di spettrina tipiche di una grave forma di elissocitosi , la piroipoichilocitosi</li><li>• non è in grado di rilevare GLUT1, RhAG e Piezo1 per la stomatocitosi ereditaria.</li></ul>



La sferocitosi ereditaria è stata segnalata in tutto il mondo, ma la più alta prevalenza si riscontra tra le popolazioni del nord Europa (stima 1: 2000 nascite).

La ANEMIA DISERITROPOIETICA tipo II ( CDA II) può avere una espressione fenotipica simile alla Sferocitosi (anemia ma non reticolocitosi franca, ittero, splenomegalia, spesso emosiderosi e colelitiasi).

La CDAII è legata alla mutazione di un gene che regola la proliferazione e differenziazione degli eritroblasti (SEC23B).

L'ellissocitosi ereditaria: gruppo eterogeneo di disordini per modalità di ereditarietà (da dominante a recessiva) e fenotipo clinico (da anemia compensata a trasfusione dipendente) La diagnosi di HE è casuale (ad es. Ellissociti segnalati dal contatore del sangue) **perché la maggior parte dei pazienti presenta un'anemia compensata o è asintomatica** (incidenza scarsamente valutabile).

Comune in Africa e nelle vecchie popolazioni del mediterraneo.

Le stomatocitosi ereditarie sono un gruppo di condizioni emolitiche in cui la lesione 'primaria' è una 'perdita' nei cationi monovalenti sodio (Na +) e potassio (K +) con conseguente alterazione dello stato di idratazione (variazione significativa del MCV).

Sono stati identificati quattro sottotipi: la forma iperidratata, la forma disidratata o Xerocitosisi ( più alta incidenza nel gruppo) , la crioidrocitosi (CHC) e pseudoiperkaliemia familiare. Solo quest'ultima è asintomatica, mentre le altre tre condizioni ad espressione fenotipica variabile. Tutti i sottotipi sono ereditati come dominanti

**NON BENEFICIANO DELLA SPLENECTOMIA perché non risolutiva dell'eventuale stato anemico**

#### **DIFETTI DI MEMBRANA E INFEZIONI**

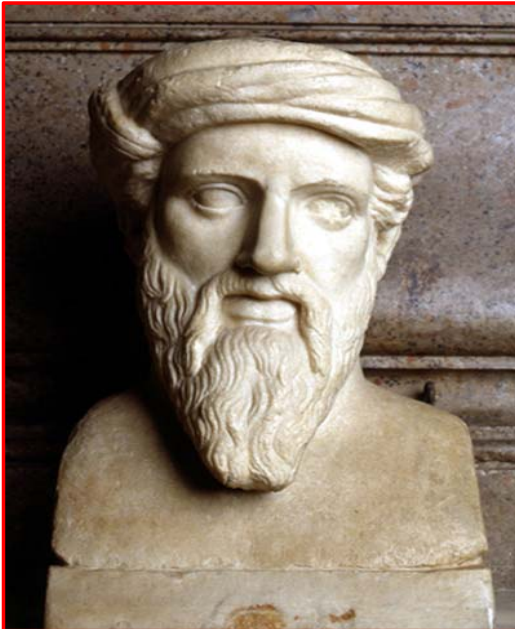
Anemizzazione in corso di patologia infettiva possibile, fino a quadri severi ( pancitopenia ) da **PARVOVIRUS B19** , che infetta selettivamente gli eritroblasti attraverso l'interazione con il globoside che codifica per il gruppo ematico P

Altre infezioni : Plasmodio Babesio, Bertonella attaccano direttamente la membrana eritrocitaria ; Il Clostridium perfringes elabora una tossina emolitica o una fosfolipasi che danneggia la membrana

**LA SPLENECTOMIA IMPONE UN RIGOROSO PROGRAMMA DI VACCINAZIONE PER GERMI CAPSULATI e profilassi antibiotica**

**ATTENZIONE ALLE COMPLICANZE TROMBOTICHE POST SPLENECTOMIA e alle COMPLICANZE CARDIO-CIRCOLATORIE (Ipertensione polmonare )**

## IL DEFICIT DI G6PD



PITAGORA – MUSEI CAPITOLINI

- Pitagora nel V sec aC affermò che le fave potevano essere pericolose
- **La carenza di G6PD venne scoperta nel 1956** (Alving AS, Carson PE, Flanagan CL, Ickes CE. *Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. Science 1956*)
- **Il deficit di G6PD è una delle più comuni cause di anemia emolitica acuta**, specie nei bambini, la cui esatta incidenza non è nota ma si stima che ne siano **affetti più di 500 milioni di individui nel mondo e presenta un'alta prevalenza in aree endemiche per la Malaria**
- **Per contro** il DAPSONE, usato in terapia combinata per il trattamento del *Plasmodium falciparum*, e la PRIMACHINA, utilizzata per la cura del *Plasmodium vivax* e del *Plasmodium ovale* possono determinare seri eventi emolitici

- **GENE** codificante per la G6PD localizzato in un cluster di geni sulla parte distale del braccio lungo del **CROMOSOMA X (Locus q28)** (disordine recessivo *X-linked*)
- Tipizzate **più di 200 MUTAZIONI** sulla base della cinetica enzimatica, caratteristiche fisico-chimiche ed altri parametri.

- I **maschi** sono **EMIZIGOTI** per il deficit
- Le **femmine** possono essere **ETEROZIGOTI** o **OMOZIGOTI** per il deficit
- Le **femmine ETEROZIGOTI** hanno un **misto di popolazione eritrocitaria** (con deficit e senza deficit) per l'inattivazione random di uno dei due crom X (Lyon)
- La **diagnosi nelle femmine ETEROZIGOTI può essere pertanto difficoltosa. Le femmine ETEROZIGOTI possono avere crisi emolitiche**

### CLASSIFICAZIONE del DEFICIT di G6PD ( WHO Recommendation)

Classe	CLASSE I	CLASSE II	CLASSE III	CLASSE IV
Residua attività enzimatica (% del vn)	DEFICIT SEVERO < 1%-10% o non dosabile	DEFICIT SEVERO < 10%	DEFICIT MODERATO 10%-60%	DEFICIT MINIMO > 60%-100%
FENOTIPO	Anemia emolitica cronica Non sferocitica (CNSHA) Forma RARA	Anemia emolitica acuta  variante MEDITERRANEA • Ittero neonatale + , anche severo • FAVISMO • Emolisi da farmaci ossidanti	Anemia emolitica acuta occasionale  Variante A - • Ittero neonatale • Favismo meno comune • Emolisi da farmaci ossidanti	asintomatica

L'EMOLISI E' DETERMINATA  
DA FATTORI SCATENTI  
che hanno azione ossidativa sugli eritrociti

- Alimenti: **FAVE** (e nessun altro alimento!) + se fresche e in base alla quantità ingerita. Le sostanze chimiche coinvolte sono la VICINA E CONVICINA che non sono presenti nel polline !
- FARMACI
- EPISODI INFETTIVI VIRALI E BATTERICI
- CHETOACIDOSI DIABETICA
- Varie: HENNE' usato a scopo cosmetico
- NB: NON vi sono segnalazioni per i MEZZI DI CONTRASTO radiologici e per GLI ANESTETICI

#### DIAGNOSI

- Dosaggio della attività G6PD in emolizzato (IU/g Hb) in *spettrometria* , anche determinando il rapporto G6PD/6PGD
- Utile specie nei maschi anche la metodica *florescent spot test*
- **NON RAZIONALE il dosaggio G6PD in fase acuta per la presenza di reticolocitosi**
- Studio del DNA



Istituto Superiore Sanità – Ospedale S Eugenio: **DIAGNOSI DI DEFICIT DI G6PD IN N.560 PAZIENTI**

M: n. 252; F n.308 - età 10 gg-82 a      periodo 1995-2007

n. 141 episodi di Anemia emolitica acuta con necessità di ricovero in 129 pazienti  
Nel 78% dei casi in pazienti con mutazione Mediterranea

DA ingestione di FAVE in n. 117 episodi

In M : n.70 ; in F : n.47

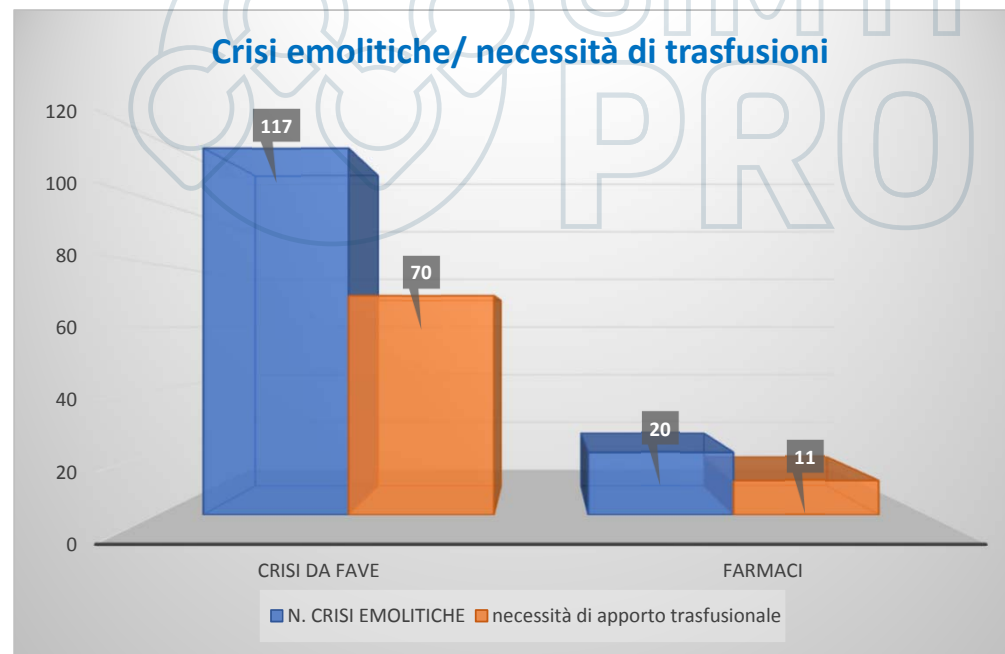
nel 56% dei casi entro i 10 a. di vita

DA assunzione di FARMACI in n. 20 episodi ( in M:11; in F:9)

IN CORSO DI INFEZIONI in n.4 episodi (in M:2; in F:2)

nel 37% dei casi entro i 10 a. di vita

n.7 pazienti con n.2 episodi di crisi emolitica dopo ingestione di fave  
n.5 pazienti con n.1 crisi dopo ingestione di fave e n.1 crisi da assunzione di farmaci  
n.1 paziente con 2 crisi emolitiche acute dopo assunzione di farmaci




## IL DEFICIT DI PIRUVATO KINASI (PK)

MOLTO MENO COMUNE DEL G6PD.  
MENTRE LA STRAGRANDE MAGGIORANZA DEI PAZIENTI CON DEFICIT DI G6PD NON  
SUBISCE MAI UN EPISODIO EMOLITICO,  
NEL DEFICIT DI PK IL FENOTIPO EMOLITICO È PREPONDERANTE

- La piruvato chinasi è l'ultimo enzima coinvolto nel processo glicolitico e catalizza il trasferimento di un gruppo fosfato dal fosfoenolpiruvato (PEP) all'ADP producendo **ATP**.
- Il deficit (insufficiente o completa carenza) negli eritrociti determina il blocco e il completamento della glicolisi e la produzione di ATP.
- I globuli rossi carenti sono **incapaci di mantenere il gradiente elettrochimico e l'integrità della membrana**

- è dovuto a una mutazione nel gene PKLR
- ha più comunemente ereditarietà autosomica recessiva
- Generalmente i pazienti affetti presentano un genotipo da eterozigosi composta.
- Gli omozigosi sono più frequenti in consanguinei (Amish)

- *Mitapivat is an oral, small-molecule allosteric activator of pyruvate kinase in red cells. (phase 2 study) N Engl J Med 2019*
- *Observational study AG348-C-008 : PK deficiency global longitudinal registry: dal 2018 in 60 centri in 20 paesi*

 Hoffman R. Hematology 7 th Ed; Grace RF et Al. Blood 2018; Grace RF et Al. Br J Haematol 2019; Bianchi P et Al. Am J Hematol 2019

### Ampio spettro di espressione fenotipica a gravità crescente

- Lieve anemia emolitica; episodi di acuzie, anche con necessita di apporto trasfusionale ( gravidanza, episodi infettivi), quadri di anemia emolitica severa con necessita di apporto trasfusionale in cronico
- La maggior parte dei neonati presenta ittero significati e frequenti sono le complicanze perinatali
- Colelitiasi e splenomegalia
- Possibile sviluppo di emosiderosi
- Possibile presenza nei quadri più severi di masse di EE
- Splenectomia talora non efficace: indici predicatori di risposta all'intervento Sono la presenza di mutazione *missense*, valori di emoglobina più alti e più bassi valori di bilirubina indiretta

*Al Professor Luciano Vettore,  
mio amato Maestro di Medicina e , soprattutto,  
Maestro di vita,  
ideatore del Pink Test,  
che mi ha introdotto ed accompagnato nel  
fantastico mondo dello studio del globulo rosso,  
da pochi giorni tornato alla casa del padre.....*



***Grazie per l'attenzione !***