2020

Progetto
Ematologia
Romagna

Le anemie emolitiche ereditarie

Sarah Parisi
Istituto di Ematologia ‘L. e A. Seràgnoli’

- Nessun conflitto di interessi da dichiarare

Anemie emolitiche ereditarie

- Classificate tra le anemie del **IV gruppo** (normocromiche, normo/macrocitiche)
- Patogenesi: riduzione significativa della vita media degli eritrociti (<120 giorni)
- Emolisi scompensata (anemia): riduzione della vita media degli eritrociti superiore alla riserva funzionale dell'eritrone (<20 giorni) e/o coesistenza di ridotta funzionalità dell'eritrone
- Segni di emolisi: iperbilirubinemia indiretta, incremento LDH, riduzione aptoglobina, incremento urobilinogeno
- Segni di risposta compensatoria eritrocitaria: reticolocitosi, iperplasia eritroide

Anemie emolitiche ereditarie: classificazione

Meccanismo patogenetico	Cause intrinseche	Cause miste
Difetto metabolico	**Deficit piruvato-chinasi (PK)**	**Deficit glucosio-6 fosfato deidrogenasi (G6PDH)**
Difetto di membrana	**Sferocitosi ereditaria** Ellissocitosi Stomatocitosi	
Difetto Hb		**HbS**

Anemia da deficit di Piruvato chinasi (PKD)

- Prevalenza stimata: 3-8:1.000.000
- Ereditarietà AUTOSOMICA RECESSIVA (gene PKLR, cromosoma 1q21), oltre 300 mutazioni descritte
- Fenotipo eterogeneo: <25% attività residua omozigoti, 40-60% eterozigoti
- Patogenesi: ridotta attività enzima PK → ridotta produzione ATP da fosfoenolpiruvato + accumulo 2,3-difosfoglicerato → perdita della plasticità di membrana → emolisi extravascolare
- Diagnosi: - ridotta attività enzimatica PK (spettrofotometria)

  - genotipizzazione PKLR (mutazioni *missense*, eterozigoti composti)

PKD: terapia di supporto

- Supporto trasfusionale: frequenza di TD diminuisce con l'età (11% adulti *vs* 36% bambini); Hb mediana 11,3 g/dL (bambino: 9 g/dL)
- Possibile incremento dei sintomi relati all'anemia in età adulta
- Splenectomia: timing ottimale 5-18 anni, ma possibile nell'adulto sintomatico o TD
- Sovraccarico di ferro (TD, maggior assorbimento intestinale): chelazione
- Gestione delle complicanze: litiasi biliare (70%), osteopenia/fratture (33%), endocrinopatia (18%), ulcere AAII (5%), emopoiesi extramidollare (8%), ipertensione polmonare (5%), crisi aplastica

PKD: disease-modifying therapy

- Trapianto di CSE: indicazione non chiara; pazienti età <10 anni, TD nonostante splenectomia

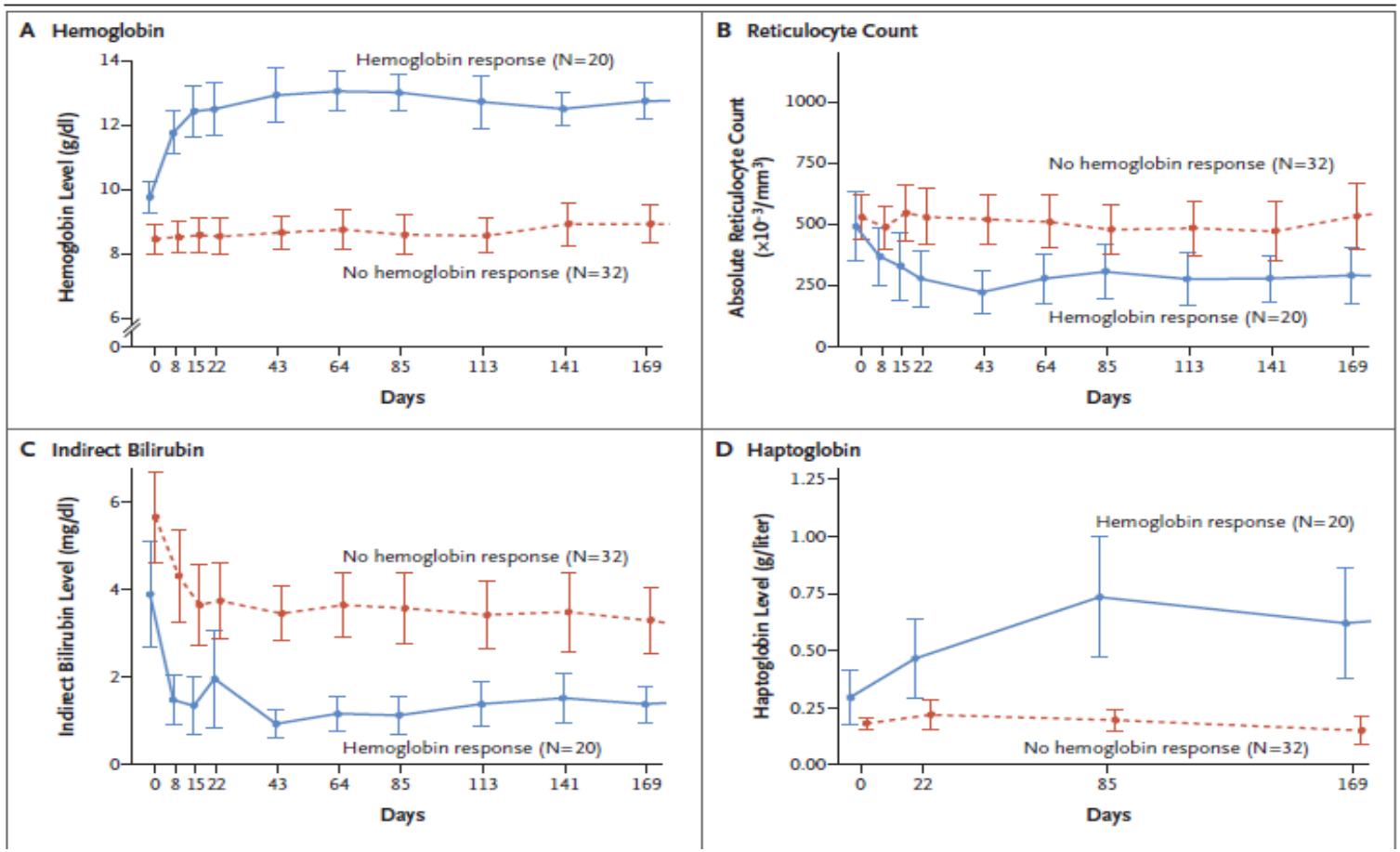
- 1996-2015: 16 pazienti con PKD sottoposti a trapianto CSE (età mediana 6,5 anni), sopravvivenza a 2 anni 74%; *outcome* migliore se età < 10 anni (*van Straaten S et al, 2018*)

- Terapia genica: studio fase I (*ongoing*) con vettore lentivirale, adulti e bambini con PKD, TD post splenectomia

PKD: disease-modifying therapy-I

- Mitapivat (AG-348): attivatore allosterico PK (WT e mutato), orale
- Studio fase I: induzione dell'attività di PK *in vivo*, incremento ATP e riduzione 2,3-DPG nelle emazie di individui sani (*Yang H et al, 2018*)
- Studio fase II: 52 pazienti adulti, Hb mediana 8,9 g/dL, non TD
- Aumento Hb ≥1 g/dL nel 50% pts, incremento mediano massimo 3,4 g/dL (range 1,1-5,8) + riduzione markers di emolisi (follow-up mediano 29 mesi)
- Risposta mantenuta fino a 35 mesi; AEs cefalea, insonnia, nausea
- Relazione genotipo/fenotipo e risposta: almeno una mutazione *missense* (*Grace RF et al, 2019*)
- 2 studi fase III + estensione fase II *ongoing*

PKD: Mitapivat

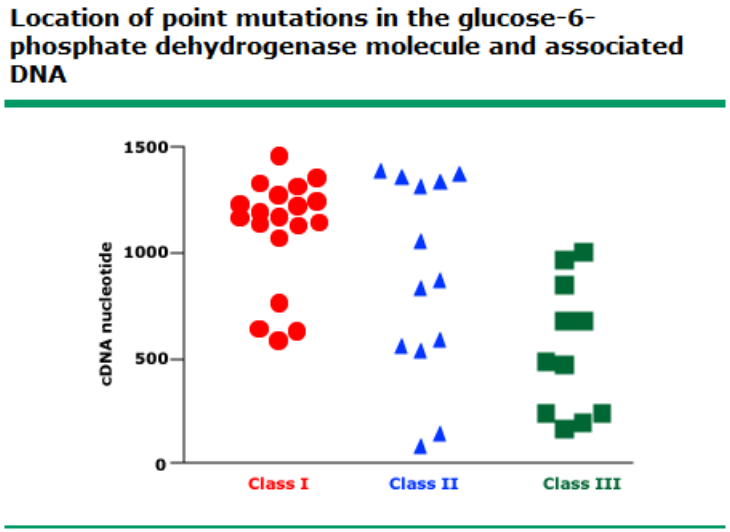


Grace RF et al, N Engl J Med. 2019

Deficit di Glucosio 6-fosfato deidrogenasi (G6PDH)

- Una delle enzimopatie più frequenti, asintomatica in assenza di trigger, X-linked
- 500 mln di persone portatici di una delle mutazioni riconosciute, prevalentemente asintomatici; associazione con infezione malarica
- 230 mutazioni del gene G6PD (*missense*) → ridotta stabilità della proteina e/o deficit di funzionalità catalitica dell'enzima (perdita completa di attività enzimatica è letale)
- Emolisi acuta dopo esposizione a stress ossidativo (ingestione di fave, farmaci, infezioni)
- Rari pazienti con mutazioni sporadiche e severa instabilità della proteina: anemia emolitica cronica non-sferocitica, in assenza di stress ossidativo

G6PDH: classificazione

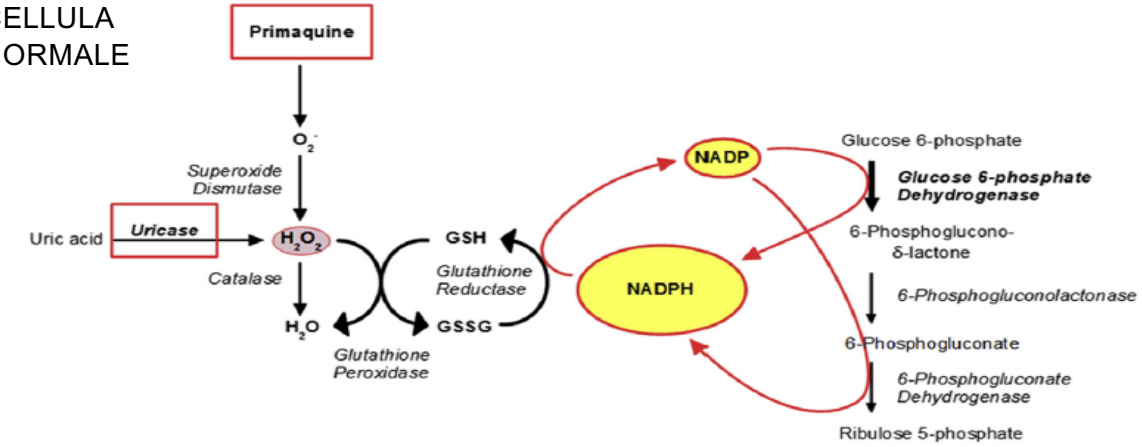


- **Classe I**: severa carenza G6PDH (anemia emolitica cronica non sferocitica)
- **Classe II**: carenza severa con emolisi intermittente
- **Classe III**: deficit lieve-moderato

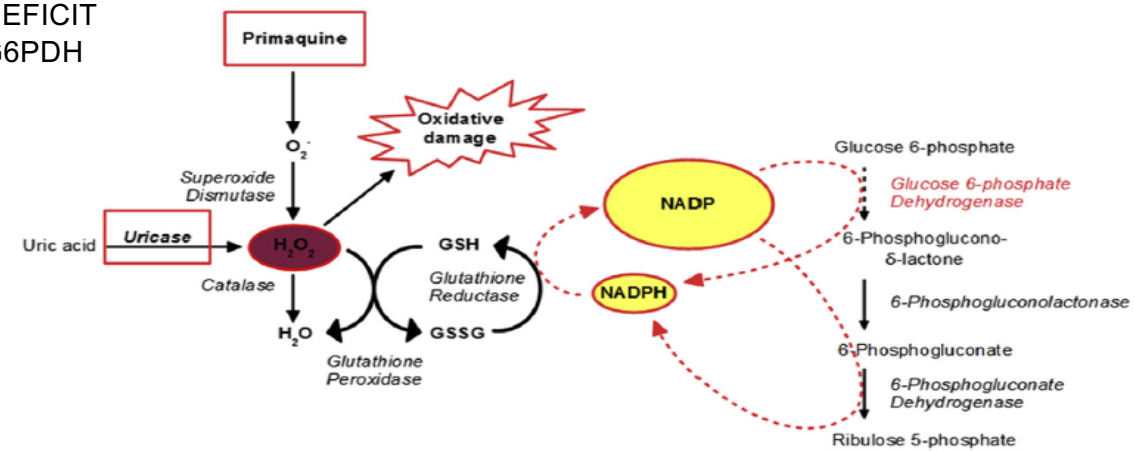
Beutler E et al, Blood 1994

G6PDH: funzione

CELLULA NORMALE



DEFICIT G6PDH



Luzzatto L. et al, Hematol Oncol Clin N Am, 2016

Trigger (fave, farmaci, infezioni batteriche/virali)

↓

Produzione ROS e H_2O_2

↓

Insufficiente produzione di NADPH

↓

Denaturazione Hb e precipitazione sulla membrana (Corpi di Heinz)

↙ ↘

Emolisi intravascolare (emoglobinuria, dolore addominale)

Opsonizzazione ed emolisi extravascolare (ittero, splenomegalia)

Deficit di Glucosio 6-fosfato deidrogenasi

- 3 quadri clinici: - ittero neonatale (meccanismo non totalmente compreso, picco iperbilirubinemia +3 dalla nascita)
  - favismo (emolisi acuta, severa, prevalentemente intravascolare)
  - anemia emolitica primachina-sensibile (dose-dipendente)

- Diagnosi: dosaggio G6PDH (v.n.>7-11 UI/g Hb); in corso di crisi possibile risultato falsato da reticolocitosi

- Conferma diagnostica: identificazione mutazione specifica

- Terapia: - eliminazione fave e farmaci
  - emolisi severa: supporto trasfusionale
  - emolisi non severa: supporto liquidi (shock ipovolemico, IRA)

Deficit di Glucosio 6-fosfato deidrogenasi: farmaci

Type of drug	Definite risk of AHA	'Possible' risk of AHA	Possible association (less likely)
Antimalarials	*Dapsone-containing combinations *Pamaquine *Primaquine Tafenoquine	Chloroquine Quinidine Quinine	
Other drugs	Ciprofloxacin Glibenclamide[a] *Methylthioninium chloride[b] Moxifloxacin Nalidixic acid Niridazole *Nitrofurantoin[c] Norfloxacin Ofloxacin Phenazopyridine[d] *Rasburicase and Pegloticase [35] Sulfamethoxazole/co-trimoxazole Henna (*cosmetic use*) [36,37 38]	Aspirin[e] Menadiol sodium phosphate Sulfadiazine Sulfasalazine Sulfonylureas Tolonium chloride[f]	Chloramphenicol Dimercaptosuccinic acid Glibenclamide Mepacrine Vitamin K analogues

Luzzatto L. et al, Hematol Oncol Clin N Am, 2016

Sferocitosi ereditaria

- Prevalenza stimata: 1:2000-1:5000 (la più comune anemia emolitica congenita)

- Ereditarietà AUT DOM (75%), AUT REC o nuove mutazioni (25%)

- Patogenesi: mutazioni in geni codificanti per proteine di membrana (anchirina, banda 3, proteina 4.4, spectrina alfa/beta) → alterato rapporto citoscheletro-membrana → sferociti sequestrati nei sinusoidi splenici

- Diagnosi: - aumentata fragilità emazie (test di lisi in glicerolo acidificato, Pink-test, EMA-binding, test di Simmel)
  - identificazione difetto molecolare (SDS-PAGE: elettroforesi, II livello)

Sferocitosi ereditaria: difetti molecolari

Molecular defects in HS.

Molecular defect	Prevalence in HS population	Inheritance	Prevalent mutation	Protein low expressed	Disease severity	Cytologic feature (MGG coloration of the blood smears)
Ankyrin-1 (*ANK1*)	40–65% in Europe and USA	AD, AR, *de novo*	AD or *de novo*: null mutation AR: missense or promoter mutation	Spectrin and ankyrin: 11% à 50%	Minor to moderate form	Spherocytes
Band 3 (*SLC4A1*)	20–35%	AD	Functionally null mutation	Band 3: 31%–35%	Minor to moderate form	Spherocytes, rare mushroom red cells
α spectrin (*SPTA1*)	<5%	AR	α-LEPRA and null mutation	α spectrin: 50–75%	Severe	Spherocytes, poikilocytosis, contracted red cells
β spectrin (*SPTB*)	15–30%	AD, *de novo*	Null mutation	β spectrin: 15–40%	Minor to moderate form	Spherocytes, 5–10% acanthocytes
4.2 Protein (*EPB42*)	<5% in Europe and USA (45–50% in Japan)	AR	Missense mutation	4.2 Protein: 95–100%	Minor to moderate form	Spherocytes, ovalostomatocytes

AD: autosomal dominant, AR: autosomal recessive, LEPRA: Low expression allele Prague.

Da Costa L. et al, Blood Rev 2013

Sferocitosi ereditaria: quadri clinici

HS classification.

	Minor HS	Moderate HS	Moderate to severe HS	Severe HS
Hb (g/l)	Normal	>80	60–80	<60
Reticulocytes (%)	<6%	6–10%	>10%	>10%
Bilirubin (μmol/l)	17.1–34.2	>34.2	>34.2–51.3	>51.3
Red blood smear	Few spherocytes	Spherocytes	Spherocytes	Microspherocytes and poikilocytosis
Osmotic fragility (fresh blood)	Normal or slight increased	Increased	Increased	Increased
Osmotic fragility (incubation at 37 °C)	Increased	Increased	Increased	Increased
Splenectomy	Rarely	If the capacity level is decreased and depending on certain cases	Necessary > 5 y-old	Necessary > 2–3 y-old
Transfusions	0–1	0–2	>2	Regularly
SDS-PAGE (protein defect)	Normal	Sp, Ank + Sp, band 3, protein 4.2	Sp, Ank + Sp, band 3	Sp, Ank + Sp, band 3
Inheritance	AD	AD, *de novo*,	AD, *de novo*	AR

Da Costa L. et al, Blood Rev 2013

Sferocitosi ereditaria: terapia

- Forme lievi-moderate: non necessaria terapia, vitamine emoattive
- **WARNING**: crisi aplastica in corso di infezione da Parvovirus B19!
- Forme severe (severa anemia, calcolosi biliare): splenectomia dopo i sei anni di età
- Fondamentale diagnosi differenziale pre-splenectomia tra Sferocitosi ereditaria e Stomatocitosi (trombosi)

Anemia falciforme

- La più comune emoglobinopatia (300.000 nuovi nati diagnosticati/anno)
- Mutazione puntiforme al codone 6 gene della beta-globina: sostituzione valina → acido glutammico
- Riduzione pO_2→ polimerizzazione intracellulare HbS → GR meno deformabile → adesione all'endotelio e occlusione vasale + emolisi extravascolare
- Clinica: emolisi cronica + crisi vaso-occlusive (VOC) + danno d'organo
- Terapia di supporto: idratazione + analgesici durante VOC, trasfusioni o eritro-exchange
- Terapia curativa: SCT, terapia genica (*gene-editing*, *gene-insertion*)

Anemia falciforme: terapia trasfusionale

- Mantenere HbS <30%, Hct 30%

- Scambio eritrocitario raccomandato in assenza di anemizzazione severa, necessità di ridurre rapidamente HbS; efficace anche nel trattamento delle complicanze croniche

- Indicazioni per trasfusione in eventi acuti:
  - anemia acuta (Hb <7 g/dL)
  - VOC
  - Sd polmonare acuta
  - Stroke
  - MOF
  - gestione pre-operatoria

- Indicazioni per trasfusione regolare:
  - VOC non responsiva a HU
  - Sd polmonare acuta ricorrente in corso HU
  - Stroke (prevenzione primaria e secondaria)
  - Ipertensione polmonare
  - Cardiopatia
  - Complicanze renali
  - Priapismo, necrosi asettica testa femore

Anemia falciforme – disease-modifying therapies

Diverse possibili strategie:

- **Inibizione della polimerizzazione di HbS:** **- induzione di HbF**
  - agenti inibenti la falcizzazione
- **Riduzione dell'anomala adesione endoteliale**

- Riduzione disidratazione del GR (clotrimazolo, senicapoc)
- Riduzione di attivazione piastrinica e ipercolagulabilità (EBPM, ASA, Ticagrelor)
- Riduzione dello stress ossidativo (L-glutammina, N-acetilcisteina)
- Riduzione dell'infiammazione (steroidi, statine, anti-iNKT)

Anemia falciforme – incremento HbF

- Idrossiurea: inibisce ribonucleotide-reduttasi e incrementa produzione HbF, riducendo il rischio di polimerizzazione
- Raccomandata per adulti con SCD severa e in profilassi in pazienti pediatrici
- Riduce complicanze e incrementa OS

Anemia falciforme – incremento HbF

- Farmaci ipometilanti: razionale → sintesi HbF soppressa per via epigenetica da DNMT1

- Decitabina + tetraidrouridina (studio fase I, pazienti adulti HbSS/HbS/β^0): incremento HbF 4-9%, incremento Hb totale 1,2-1,9 g/dL (*Molokie et al, 2017*)

- Inibizione istone deacetilasi (studi fase I): Panobinostat, Pomalidomide → incrementano HbF eliminando silenziamento catene γ

Anemia falciforme – agenti anti-falcizzazione

- Voxelotor : modificazione allosterica HbS
- Stabilizza Hb in stato ossigenato, legando la catena α-globinica e aumentando affinità per O_2
- Studio fase III HOPE: 274 pazienti trattati con Voxelotor 1500 mg/die *vs* 900 mg/die *vs* placebo
- Incremento mediano Hb 0,6-1,1 g/dL, non ridotta incidenza VOC, non incremento QoL (*Vichinsky et al, 2019*)
- Approvato FDA per pazienti ≥ 12 anni

Anemia falciforme – riduzione dell'adesione

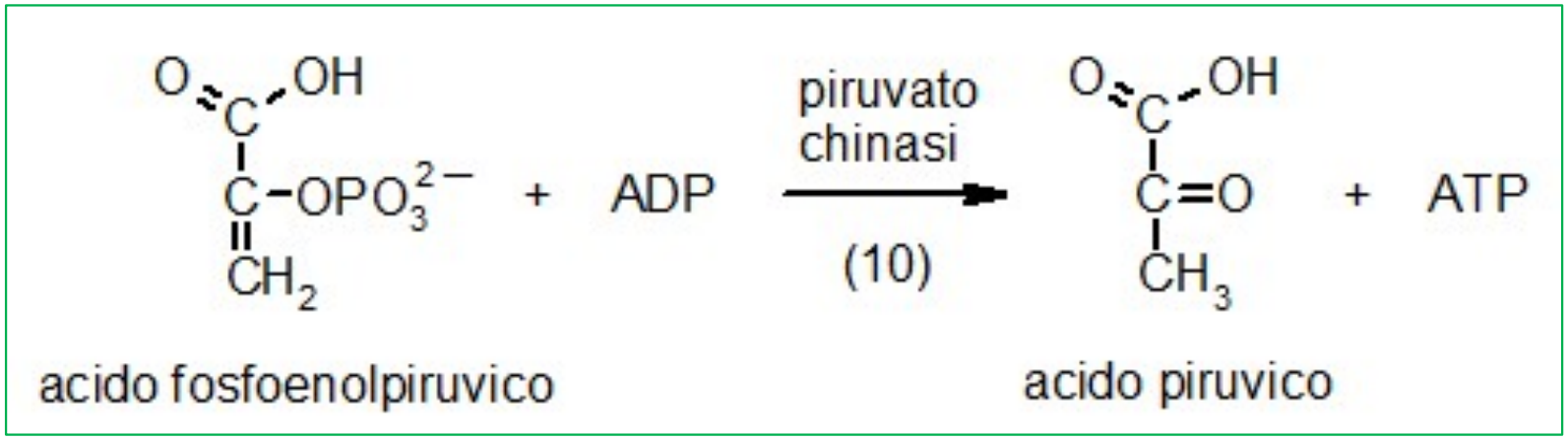
- Adesione all'endotelio di leucociti ed emazie mediata da P-selectina
- Crizanlizumab: MoAb umanizzato anti-P selectina
- Studio SUSTAIN, fase II*:* 198 pts 16-65 aa, almeno 2-10 VOCs nei 12 mesi precedenti
- Episodi annuali VOC: 2,98 Crizanlizumab *vs* 1,63 placebo (riduzione 45%)
- Tempo mediano al primo episodio VOC: 4,07 *vs* 1,38 mesi (*Ataga et al, 2017*)
- Tossicità: artralgie, diarrea, prurito, febbre, polmonite, reazioni infusionali
- Approvato FDA/EMA in monoterapia o in associazione a HU in pazienti di età ≥ 16 aa alla dose di 5 mg/Kg/mese per ridurre la frequenza di VOCs

Conclusioni

- Nuove frontiere terapeutiche nelle anemie emolitiche ereditarie (PKD, SCD)
- Patologie croniche → terapie continuative
- Impatto economico significativo

…Grazie per l’attenzione!

PK


O
OH
C
C-OPO3 2−
CH2
+
ADP
piruvato
chinasi
(10)
O
OH
C
C=O
CH3
+
ATP
acido fosfoenolpiruvico
acido piruvico