

Anno 6 - Numero 1 - 2019

Ematologia **Oncologica.it**

**Anemie:
recenti acquisizioni**

Organo Ufficiale
della **Fondazione Matarelli** - Milano

Con il supporto non condizionante di



Anemie: recenti acquisizioni

Fisiopatologia dell'eritropoiesi

Lucia De Franceschi, Antonella Gambale, Achille Iolascon

7

Sindromi mielodisplastiche a basso rischio

*Matteo G. Della Porta, Marta Ubezio, Lucio Morabito,
Marianna Rossi, Erica Travaglino*

21

Emoglobinuria parossistica notturna

Francesco Lanza

27

Anemia aplastica acquisita

Antonio M. Risitano, Serena Marotta

41

Agenti stimolanti l'eritropoiesi

*Roberto Latagliata, Serena Rosati, Michela Ansuinelli,
Ida Carmosino, Massimo Breccia*

55

Ematologia Oncologica.it

Vol 6 - n.1 - 2019

Direttore Responsabile

Giorgio Maggiani

Direttore Scientifico

Giorgio Lambertenghi Deliliers

Fondazione Matarrelli, Milano

Comitato Editoriale

Sergio Amadori

Università degli Studi Tor Vergata, Roma

Mario Boccardo

Università degli Studi, Torino

Alberto Bosi

Università degli Studi, Firenze

Michele Cavo

Università degli Studi, Bologna

Paolo Corradini

Università degli Studi, Milano

Antonio Cuneo

Università degli Studi, Ferrara

Marco Gobbi

Università degli Studi, Genova

Cristina Mecucci

Università degli Studi, Perugia

Fabrizio Pane

Università degli Studi, Napoli

Francesco Passamonti

Università degli Studi, Varese

Gianni Pizzolo

Università degli Studi, Verona

Giorgina Specchia

Università degli Studi, Bari

Ematologia Oncologica.it

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

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

Registrazione Tribunale di Milano

n. 348 del 19/11/2013

Progetto grafico

Dynamicom srl

Sito Internet

www.ematologiaoncologica.it

Coordinamento editoriale

Dynamicom - Milano

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

Editore

Fondazione Matarrelli

Periodicità

Quadrimestrale

Avvertenze ai lettori

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

Norme per gli Autori

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

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

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

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

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

Norme redazionali

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

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

L'articolo deve essere così strutturato:

- **Titolo conciso** e pertinente con il tema della rivista;
- **Prima pagina** con nome e cognome degli Autori, istituzione di appartenenza, foto tessera a colori del primo Autore;
- **Introduzione iniziale** che esponga in maniera chiara lo scopo dell'articolo;
- **Corpo del testo** suddiviso in sottocapitoli a contenuto omogeneo;

Pagina finale:

- 1) nome e cognome del primo autore, con telefono, fax, e-mail al quale andrà indirizzata la corrispondenza;
- 2) eventuali **ringraziamenti** a persone e/o associazioni;
- 3) 3-5 parole chiave.

Bibliografia

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

Articoli con 1-3 autori

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

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

Articoli con più di 3 autori

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

Abstract e Congressi

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

Capitoli di libri

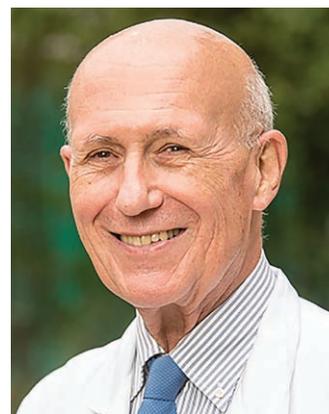
Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. In: Spagnoletti M. ed. The Hemoglobin, Vol 10. London: Raven Livingstone. 1980:10-15.

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

Editoriale

Giorgio Lambertenghi Delilieri

Fondazione Matarrelli - Milano



Ematologia Oncologica.it dedica questo numero all'anemia, una condizione a carattere prevalentemente cronico, che nel paziente oncoematologico ha un impatto negativo sull'outcome clinico, a causa di una maggiore morbidità e mortalità, soprattutto negli anziani con patologie concomitanti. La patogenesi è multifattoriale, in quanto l'eritropoiesi è un processo complesso, finemente regolato da meccanismi diversi, solo in parte conosciuti. La regolazione avviene attraverso fattori di trascrizione che intervengono nelle diverse fasi della differenziazione cellulare, in particolare sulla sintesi delle globine e sulla espressione delle proteine di membrana. Mutazioni geniche, ereditarie o acquisite, possono alterare questo complesso sistema e determinare un quadro morfologico e funzionale definito diseritropoiesi e/o eritropoiesi inefficace, come nelle talassemie, nelle anemie congenite diseritropoietiche e nelle sindromi mielodisplastiche. In questi pazienti lo screening mutazionale si sta rivelando un mezzo prezioso per la scelta del farmaco "intelligente", dotato di una maggiore probabilità di risposta. Ad esempio nei soggetti con del5q la lenalidomide può colpire selettivamente i cloni patologici, anche se l'effetto non è curativo, mentre il composto luspatercept ha mostrato un tropismo selettivo per i pazienti con anemia sideroblastica in presenza della mutazione SF3B1.

Altro esempio di malattia clonale è l'emoglobinuria parossistica notturna dove una mutazione genica causa la scomparsa di alcune glicoproteine di membrana, che dalle cellule progenitrici si trasmette su tutte le linee emopoietiche. Il risultato è una particolare suscettibilità all'azione litica del complemento, e quindi uno stato emolitico cronico intravascolare, con possibili acuzie. Da un punto di vista clinico-laboratoristico la malattia è molto eterogenea, ma l'anemia è dominante, dovuta alla componente emolitica, alla carenza marziale per la perdita di emoglobina ed emosiderina attraverso le urine, alla pancitopenia secondaria ad

una ipo-aplasia midollare o ad un quadro mielodisplastico. La citometria a flusso, metodica di elezione per la diagnosi di malattia, ha evidenziato che i pazienti possono presentare tre distinte popolazioni di emazie con un diverso grado di sensibilità alla lisi complemento-mediata. L'introduzione dell'anticorpo monoclonale umanizzato elculizumab ha permesso di ridurre la necessità trasfusionale, con un drastico miglioramento dell'aspettativa di vita. Altri anticorpi monoclonali con emivita più lunga sono in corso di sperimentazione clinica.

L'anemia aplastica acquisita è un altro brillante esempio del contributo della ricerca scientifica di base al miglioramento dell'outcome clinico. Si tratta di una malattia dove le cellule staminali emopoietiche, ridotte sul piano quantitativo, sono funzionalmente inibite a causa di citochine prodotte da linfociti T a fenotipo citotossico. Sulla base di questi dati negli ultimi decenni sono stati proposti vari protocolli terapeutici basati sull'associazione globuline anti-linfocitarie e ciclosporina, soprattutto nei soggetti adulti. L'agente trombopoietino-mimetico eltrombopag, in associazione agli immunosoppressori tradizionali, sembra essere un'interessante alternativa alla terapia trapiantologica.

Nelle malattie oncoematologiche i fattori di stimolazione dell'eritropoiesi a dosi standard, contribuiscono in maniera significativa ad innalzare i livelli dell'emoglobina, riducendo la dipendenza trasfusionale e migliorando la qualità di vita dei pazienti. Con l'obiettivo di migliorare i risultati clinici è stato proposto un aumento del dosaggio delle diverse eritropoietine o la loro associazione con il fattore di crescita granulocitario, al fine di potenziare il segnale anti-apoptotico sui precursori eritroidi. Tuttavia anche utilizzando le alte dosi, i principali fattori predittivi di risposta sono sempre il dosaggio dell'eritropoietina endogena e la presenza/assenza di fabbisogno trasfusionale pre-trattamento.

Fisiopatologia dell'eritropoiesi



Lucia De Franceschi¹, Antonella Gambale², Achille Iolascon²

¹ Dipartimento di Medicina, Università di Verona, Policlinico GB Rossi e AOUI Verona, Verona; Italia; ² Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università Federico II di Napoli, Napoli, Italia; CEINGE, Biotecnologie Avanzate, Napoli, Italia

Introduzione

L'eritropoiesi è un processo complesso, e finemente regolato, attraverso il quale cellule ematopoietiche si differenziano in progenitori eritroidi, successivamente in precursori eritroidi, fino alla produzione finale di reticolociti, che divengono globuli rossi nel circolo ematico periferico (Figura 1). 2×10^{11} eritrociti sono rilasciati giornalmente e vanno a sostituire i 2×10^{11} eritrociti rimossi quotidianamente dalla circolazione periferica prevalentemente attraverso il sistema reticolo-endoteliale splenico. Si deve agli studi pionieristici del gruppo di Erslev, l'identificazione del fattore di crescita preposto ad armonizzare gli eventi maturativi della serie eritroide, noto come eritropoietina (EPO)^(1,2). EPO viene prodotta a livello renale da cellule ultra-specializzate altamente sensibili allo stimolo ipossico relato alla riduzione dei livelli di emoglobina e alla comparsa di anemia. EPO interagisce con il suo recettore specifico presente sulla superficie dei progenitori e dei precursori eritroidi, portando all'attivazione di un articolato processo di *signaling* intracellulare che orchestra la maturazione eritroide e l'espansione cellulare necessaria ad assicurare costanti livelli di emoglobina (Hb) a fronte del fisiologico turn-over eritrocitario.

Eventi cellulari coinvolti nell'eritropoiesi

Lo studio dell'eritropoiesi normale ha permesso di identificare due momenti principali nella maturazione eritroide:

- la fase iniziale dell'eritropoiesi, che è EPO-dipendente;
- la fase terminale dell'eritropoiesi, che è solo in parte EPO-dipendente, ma diviene progressivamente ferro-dipendente in relazione alla progressiva emoglobinizzazione dei precursori eritroidi ed alla produzione finale di reticolociti (Figura 1)⁽³⁻⁵⁾.

La caratterizzazione degli eventi cellulari coinvolti nella fase iniziale dell'eritropoiesi è principalmente basata su saggi funzionali *in vitro*. Tali studi hanno permesso di seguire la differenziazione delle cellule staminali-*committed* in senso eritroide verso la differenziazione in *burst forming unit* eritroidi (BFU-E), così definite sulla base della loro residua capacità di migrazione, seguite poi dalla maturazione in *colony forming unit* eritrocitarie (CFU-E). I fattori di trascrizione

GATA1 e GATA2 sono stati identificati come importanti in questi processi differenziativi. GATA1 si esprime nelle diverse fasi della differenziazione eritroide, in particolar modo nelle CFU-E e nei pro-normoblasti, inducendo l'espressione di geni eritroidi specifici come i geni per le globine, componenti strutturali dell'emoglobina⁽⁶⁾. Le evidenze ottenute in topi *knockout* per GATA1 (*Gata1^{-/-}*), confermano ulteriormente l'importanza di GATA1 nella differenziazione eritroide, in modo particolare nelle fasi iniziali dell'eritropoiesi. I topi *Gata1^{-/-}* sviluppano una grave anemia relata all'arresto della maturazione eritroide allo stadio di pro-normoblasti⁽⁷⁾. Inoltre, GATA1 sinergizza con il *signaling* EPO mediato, diretto a favorire l'espressione di proteine con azione anti-apoptotica, come per esempio Bcl-x⁽⁷⁾. FOG1 è uno degli interattori principali di GATA1, modulandone l'attività sia in senso attivatorio che inibitorio. Gli studi condotti in modello murino *knockout* per FOG1 dimostrano l'importanza di questa connessione funzionale, vista la comparsa di grave anemia che porta alla morte embrionale dei topi *Fog1^{-/-}*⁽⁸⁾. Il rapporto di reciprocità tra GATA1 e GATA2 durante la vita è favorito anche da FOG1 ed è molto importante negli eventi di maturazione eritroide come dimostrato anche dalla gravità del fenotipo del ceppo murino doppio *knockout* per GATA1 e GATA2⁽⁹⁾. Infine, studi recenti hanno evidenziato come la traslocazione nucleare della proteina GATA1 richieda l'assistenza di HSP70, uno chaperone molecolare classico. HSP70 stabilizza GATA1 e lo protegge dal danno ossidativo, assicurandone la funzione una volta traslocato a livello nucleare^(10,11). L'importanza dell'interazione di HSP70 e GATA1 è ulteriormente supportata da evidenze ottenute nello studio dell'eritropoiesi nei soggetti β talassemici, dove HSP70 è sequestrata a livello citoplasmatico dalla presenza di catene α globiniche libere. Questo espone GATA1 a danno ossidativo e ne riduce l'efficienza trascrizionale^(10,11).

Il recente sviluppo di tecnologie *high-throughput* tipo *genome wide association* ha permesso di identificare Kupper-like (KLF1) come fattore trascrizionale importante nella regolazione della sintesi delle globine in particolare per l'espressione dell'emoglobina fetale. KLF1 partecipa allo switch delle globine attraverso due differenti meccanismi: la diretta attivazione dell'espressione delle beta-globine, e la modulazione di Bcl11 che, a sua volta, regola negativamente l'espressione delle γ -globine⁽¹²⁻¹⁵⁾. Inoltre, KLF1 partecipa anche

alla fase finale dell'eritropoiesi regolando l'espressione di proteine coinvolte nel ciclo cellulare così come deacetilasi, caspasi e proteine della membrana nucleare^(16,17).

Per quanto concerne la fase terminale dell'eritropoiesi, questa è caratterizzata da almeno quattro eventi distinti:

- la progressiva riduzione del volume cellulare;
- la condensazione della cromatina;
- la sintesi dell'emoglobina;
- l'organizzazione della membrana eritrocitaria (Figura 1).

Questi eventi sono propedeutici all'enucleazione ed al rilascio di reticolociti che rapidamente divengono eritrociti maturi in circolo, continuando a perdere circa il 20-30% del loro volume cellulare e completando l'eliminazione degli organelli residui o doppie membrane^(18,19).

I processi maturativi dei precursori eritroidi avvengono a livello midollare nella cosiddetta isola eritroblastica che è costituita da un macrofago centrale circondato da precursori eritroidi. Il macrofago supporta questo processo fornendo il ferro necessario alla sintesi dell'emoglobina⁽²⁰⁻²³⁾. Studi di microscopia elettronica ed immunofluorescenza hanno permesso di differenziare le isole eritroblastiche

in relazione alla loro distribuzione rispetto ai sinusoidi midollari e le caratteristiche degli eritroblasti maturanti:

- lontano dai sinusoidi vascolari midollari nelle isole eritroblastiche sono presenti prevalentemente pro-eritroblasti;
- vicino ai sinusoidi vascolari midollari sono presenti eritroblasti a differenti stadi maturativi e i reticolociti^(23,24).

Il ruolo di *nursing* svolto dai macrofagi nel processo di maturazione eritroide è stato anche dimostrato da esperimenti *in vitro* di co-coltura (cellule eritroidi e macrofagi) che hanno permesso di osservare il completamento del ciclo maturativo eritroide fino all'enucleazione e alla formazione di reticolociti⁽²⁵⁻²⁸⁾. Gli eritroblasti utilizzano ICAM4 e $\alpha 4\beta 1$ integrina per stabilire un legame con VCAM1, creando una rete di contatti pro-adesivi tra macrofagi ed eritroblasti maturanti, necessari fino alla generazione dei reticolociti⁽²⁹⁻³¹⁾.

Il processo maturativo eritroide richiede cambiamenti del volume cellulare che sono il risultato dell'azione armonizzata di organizzazione e rimodellamento della membrana cellulare accompagnati dalla modulazione dell'attività di sistemi di trasporto ionico di membrana e canali ionici che contribuiscono alla generazione dell'eritrocita, cellula ad elevato contenuto di K^+ e basso conte-

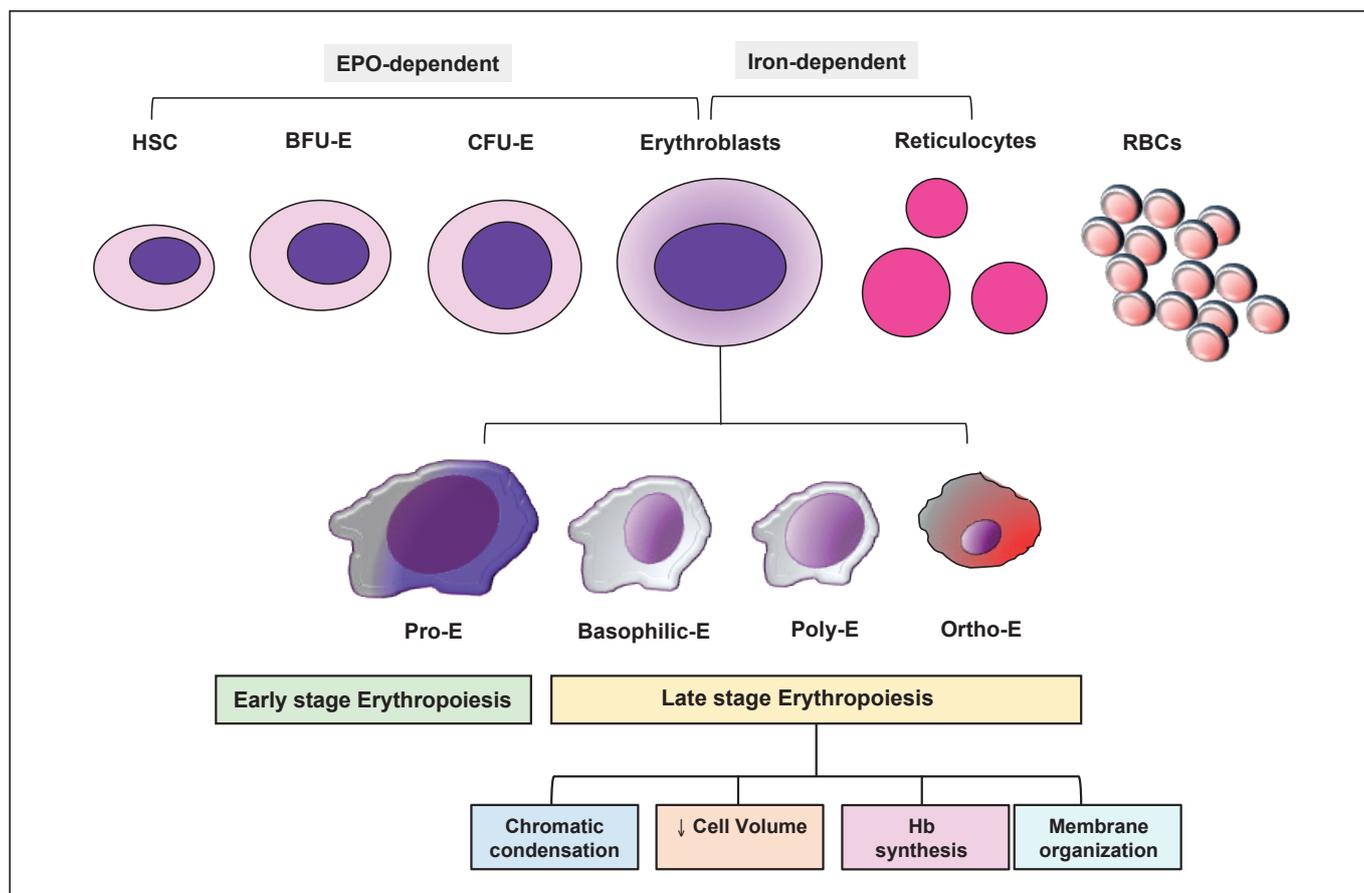


Figura 1 - Diagramma schematico dell'eritropoiesi normale. L'eritropoiesi si divide in due momenti principali: la fase iniziale dell'eritropoiesi, che è EPO-dipendente; e la fase terminale dell'eritropoiesi, che è solo in parte EPO-dipendente, ma diviene progressivamente ferro-dipendente in relazione alla progressiva emoglobinnizzazione dei precursori eritroidi e alla produzione finale di reticolociti. Le cellule staminali-committed in senso eritroide (HSC: hematopoietic stem cells), divengono burst forming unit eritroidi (BFU-E) e poi colony forming unit eritrocitarie (CFU-E). La fase terminale dell'eritropoiesi è dominata dalla maturazione degli eritroblasti (E): da pro-eritroblasti divengono eritroblasti basofili, eritroblasti policromatici ed ortocromatici fino alla generazione di reticolociti che maturano in circolo divenendo globuli rossi (RBCs: red blood cells).

nuto di Na⁺. Analisi funzionali condotte prevalentemente in linee cellulari di eritroleucemia K562 e in eritropoiesi umana derivata da cellule CD34⁺ hanno identificato un ruolo importante del sistema di cotrasporto K-CL nelle sue isoforme KCC1, 2, 3, 4, accanto al co-trasporto Na-K-2Cl e alla pompa Na-K ATP-dipendente nell'eritropoiesi normale⁽³²⁻³⁶⁾. Inoltre, studi recenti hanno evidenziato il contributo del meccanolettore PIEZO1 attraverso la sua cooperazione funzionale con il canale Gardos, noto anche come canale Ca²⁺ K⁺ attivato, contribuendo ai processi di controllo qualità del volume delle cellule eritroidi fino alla generazione di reticolociti e di globuli rossi maturi⁽³²⁻³⁶⁾.

Sebbene questi studi siano molto informativi sui dinamici cambiamenti cellulari che accompagnano la maturazione eritroide, il loro limite principale è rappresentato dal fatto che siano stati condotti su pool di cellule eritroidi maturanti e non su cellule omogenee dal punto di vista dello stadio maturativo.

Il recente sviluppo di metodologie di *sorting* cellulare attraverso la dettagliata caratterizzazione in citofluorimetria dei cambiamenti di espressione di proteine di membrana come CD44, CD71, TER119 nei topi e glicoforina A (GPA) nei soggetti umani così come banda 3

e β1-integrina, ha consentito di iniziare l'analisi di pool cellulari omogenei (Figura 2)^(4,37-42). È molto interessante l'osservazione che la maturazione degli eritroblasti si caratterizza per l'aumento dell'espressione di proteine di membrana, come banda 3, e la riduzione dell'espressione di molecole di adesione come ICAM-4 e β1-integrina, conferendo agli eritroblasti maturanti la progressiva capacità di allontanarsi dalle isole eritroblastiche una volta divenuti reticolociti⁽³⁷⁾. Le analisi di espressione genica condotte in cellule murine o umane sortate in modo omogeneo sulla base del profilo maturativo hanno consentito di identificare fattori trascrizionali importanti nella fase terminale dell'eritropoiesi come GATA1, KLF1, Nrf2 GFI1B o YBX1, e geni la cui espressione è costantemente modulata durante la maturazione eritroide come ad esempio:

- peroxiredossina-2 (Prx2), che appartiene al gruppo di sistemi anti-ossidanti o citoprotettivi;
- SLC4A1, gene relato a proteine di membrana;
- ALAS2 o AHSP, geni relati alla sintesi di eme o all'omeostasi del ferro;
- geni ribosomiali come RPL11 o RPS8⁽³⁷⁾.

Questi dinamici cambiamenti cellulari richiedono efficienti sistemi di controllo di qualità delle proteine, del contenuto di organelli quali mitocondri e ribosomi e delle membrane cellulari. Le cellule eritroidi utilizzano, in modo del tutto analogo ad altre cellule, il sistema UPR (*unfolded protein*) per limitare lo stress del reticolo endoplasmatico (ER). Il sistema UPR facilita il *folding* e *re-folding* delle proteine, la loro esportazione e/o degradazione attraverso un'azione coordinata con le chaperonine (HSP70, 90 e HSP27) e l'attivazione dell'autofagia^(43,44). L'importanza del sistema UPR nell'eritropoiesi è sostenuta dai dati ottenuti in un modello murino *knockout* per la proteina UFBPI, che si ancora al ER e partecipa all'attivazione di UPR in risposta ad un intenso stress cellulare. Questi topi *knockout* presentano una grave anemia con mortalità in stadio embrionale, mentre si osserva un'anemia associata a pancitopenia e morte degli animali quando il silenziamento di UFBPI viene attuato in topi adulti^(43,44).

Sebbene il ruolo del sistema UPR sia di intervenire per ripristinare l'omeostasi di ER, in presenza di uno stress cellulare intenso e prolungato si ha l'attivazione dell'autofagia.

L'autofagia è coinvolta nei processi di controllo qualità durante l'eritropoiesi consentendo la clearance di proteine *unfolded* (non ripiegate) e danneggiate così come degli organelli non funzionanti⁽⁴⁵⁻⁵³⁾. Qualora lo stress cellulare si dovesse prolungare superando la capacità di clearance dell'autofagia, la cellula andrà incontro a blocco del processo maturativo e/o apoptosi. I dati disponibili sono principalmente basati su modelli murini *knockout* per proteine della via autofagica come Ulk1, Atg5, Atg7 o Nix. I topi *knockout* per queste proteine presentano anemia e disturbi maturativi delle fasi terminali dell'eritropoiesi con mitofagia rallentata, ritenzione di organelli o disturbo dei processi di maturazione lisosomiale⁽⁴⁵⁻⁵³⁾. L'importanza dell'autofagia nel percorso di maturazione e crescita dei precursori eritroidi è dimostrata anche da studi in modelli murini di eritropoiesi patologica in cui l'autofagia è bloccata dall'attivazione della

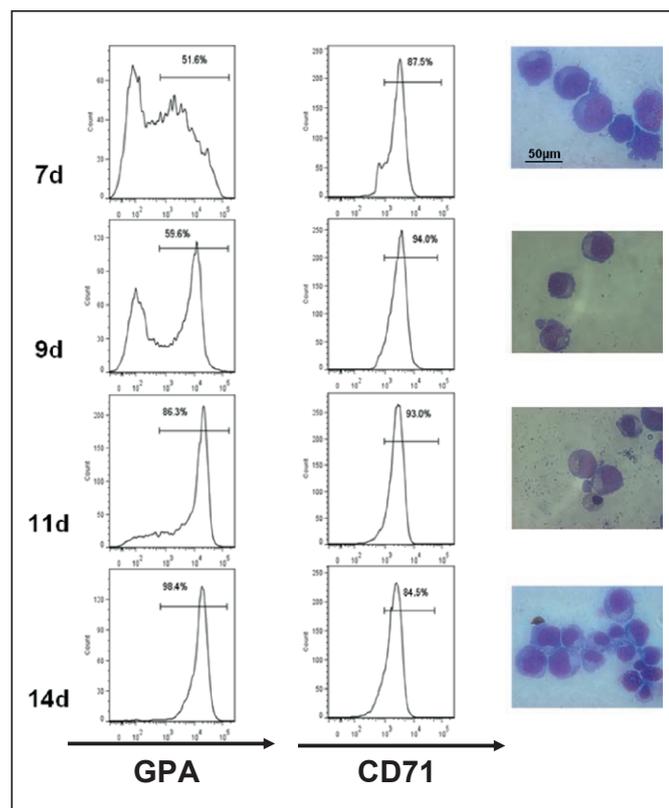


Figura 2 - Analisi citofluorimetrica dell'espressione della glicoforina A (GPA) e del CD71 durante l'eritropoiesi umana in vitro. I cambiamenti dinamici di questi antigeni di superficie sono caratterizzati a 7, 9, 11 e 14 giorni (d: days) di coltura corrispondenti rispettivamente alla fase iniziale dell'eritropoiesi (7d-9d) e alla fase tardiva (11d e 14d). Il pannello sulla destra riporta l'analisi morfologica delle popolazioni di eritroblasti studiati dagli eritroblasti policromatici (prima immagine) agli eritroblasti ortocromatici (ultima immagine). Figura modificata da Franco SS et al. *Haematologica* 2014;99:267.

via Akt-mTOR dipendente ⁽⁴⁵⁻⁵³⁾. Molecole farmacologiche che inibiscono mTOR si sono dimostrate efficaci nel migliorare l'eritropoiesi patologica, supportando l'importanza dell'autofagia come meccanismo adattativo in presenza di condizioni di intenso stress cellulare per assicurare il completamento del processo differenziativo e maturativo degli eritroblasti.

Profilo molecolare dell'eritropoiesi

L'eritropoiesi è strettamente dipendente dalla presenza di EPO che tramite il suo legame al recettore specifico (EPO-R), presente sulla superficie cellulare, induce l'attivazione di una cascata di *signaling* intracellulare che coinvolge Jak2 come tirosin-kinasi principale insieme a Lyn e Fyn, come tirosin-chinasi secondarie (Figura 3) ⁽⁵⁴⁻⁵⁷⁾. Queste chinasi a loro volta interagiscono direttamente con STAT5, fattore trascrizionale importante per l'attivazione di geni coinvolti nell'eritropoiesi, come evidenziato dai dati ottenuti in topi *knockout* per STAT5 (Stat5^{-/-}) che sviluppano anemia in fase embrionale ^(58,59).

L'identificazione di Lyn e Fyn come tirosin-chinasi cosiddette se-

condarie nella cascata EPO dipendente, è basata prevalentemente su studi condotti in topi *knockout* per Lyn (Lyn^{-/-}) o per Fyn (Fyn^{-/-}). Entrambi i ceppi murini presentano una ridotta risposta midollare all'eritropoiesi da stress indotta da fenilidrazina o doxorubicina, con comparsa tardiva di eritropoiesi extramidollare in sede splenica ^(58,59). Peraltro Lyn e Fyn fungono anche da *downstream* di altre vie di *signaling* coinvolte nella maturazione eritroide, esempio di ciò è il coinvolgimento di Fyn come inibitore del fattore di trascrizione Nrf2 durante l'eritropoiesi. Nrf2 interviene in supporto della maturazione eritroide regolando l'espressione di geni che contengono elementi ARE (*anti-oxidant redox element*), coinvolti nella risposta al fisiologico stress ossidativo che accompagna la cascata dell'EPO e nell'importazione del ferro necessaria alla sintesi dell'emoglobina (Figura 3) ⁽⁵⁵⁾. Nrf2 inoltre è in grado di agire anche sugli elementi ARE presenti sul promotore delle γ -globine favorendo l'espressione di emoglobina fetale ^(60,61). Nel topo *knockout* per Fyn, la persistente attivazione di Nrf2 comporta l'accumulo endocellulare di proteine non funzionanti accompagnata a blocco del processo autofagico e alla comparsa di

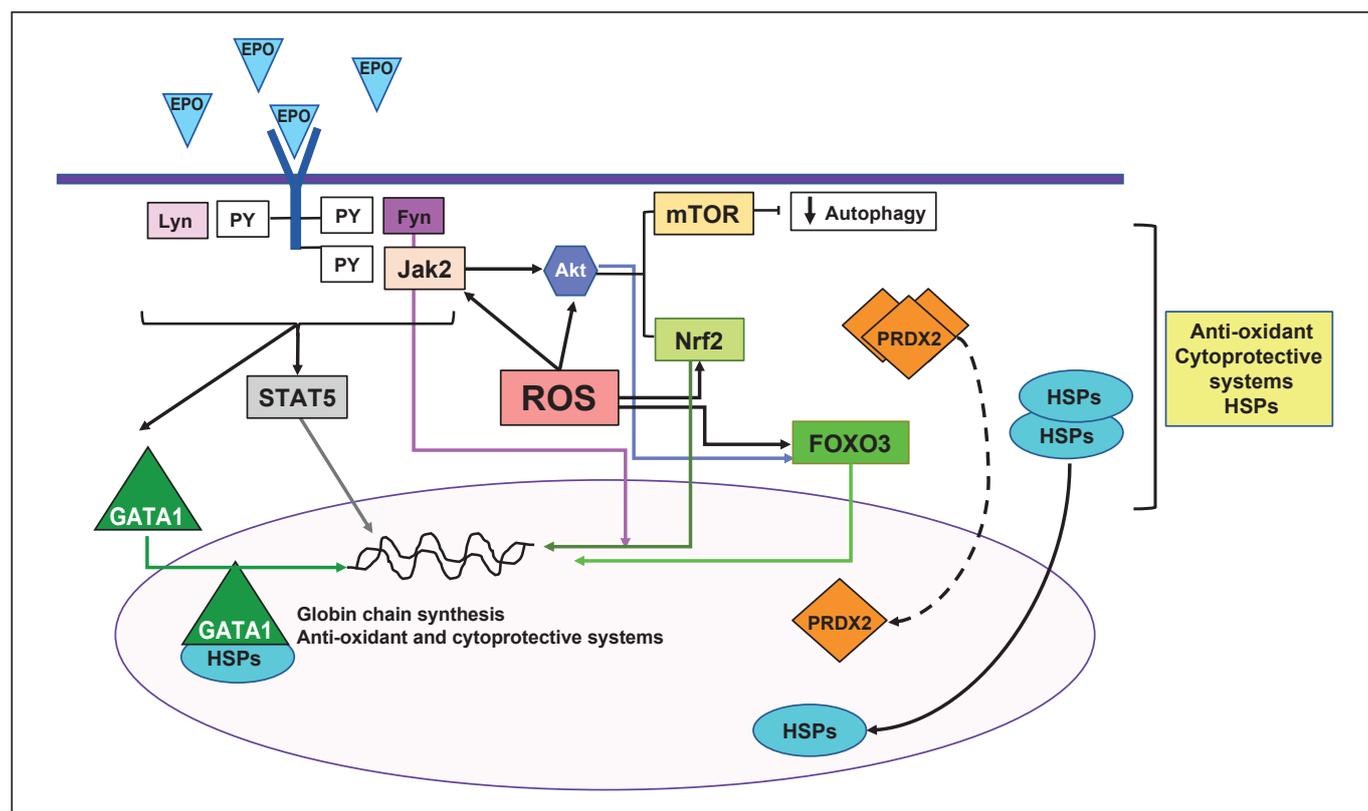


Figura 3 - Diagramma schematico della cascata di signaling eritropoietina (EPO) mediato durante l'eritropoiesi. La differenziazione eritroide legata all'interazione tra EPO ed il suo recettore (EPO-R) determina il reclutamento e l'attivazione di Jak2, kinasi primaria, e di due kinasi della famiglia del Src: Lyn e Fyn. Queste kinasi inoltre attivano STAT5 che traslocando al nucleo modulano l'attivazione di geni cruciali nella differenziazione eritroide. La cascata di signaling EPO dipendente attiva anche GATA1 che protetto dalle heat shock protein come HSP70 trasloca nel nucleo modulando la sintesi di geni sistema eritroide specifici. Lo stress ossidativo (ROS: radical oxygenspecies) relato allo stimolo EPO e all'importazione di ferro utilizzato nell'emoglobinnizzazione cellulare è strettamente sorvegliato da sistemi citoprotettivi e/o anti-ossidanti come Peroxiredoxin-2 (Prx2) che trasloca anche a livello nucleare dove svolge un'importante funzione citoprotettiva. ROS a sua volta contribuisce all'attivazione di Jak2 che partecipa alla via di signaling Jak2-Akt verso mTOR, che blocca la via autofagica e verso Nrf2 che una volta attivata trasloca a livello nucleare aumentando l'espressione di geni caratterizzati dagli elementi ARE che codificano per sistemi anti-ossidanti come catalasi o Prx2. Un altro fattore di trascrizione redox-sensibile che interviene nella risposta al fisiologico stress ossidativo è FOXO3. L'azione coordinata dei sistemi anti-ossidanti e citoprotettivi è diretta a sostenere il differenziamento e la maturazione eritroide.

eritropoiesi inefficace⁽⁵⁵⁾. Il trattamento con rapamicina, inibitore di mTOR, attiva l'autofagia che assiste la maturazione degli eritroblasti *knockout* per Fyn con significativo miglioramento del danno ossidativo e riduzione dell'eritropoiesi inefficace⁽⁵⁵⁾.

Studi condotti nell'eritropoiesi normale e patologica hanno evidenziato come la serin-treonin chinasi AKT intercetti oltre al sistema mTOR anche altre vie di segnale intracellulare dirette a contrastare l'azione citotossica dello stress ossidativo, o coinvolte nella crescita cellulare, nella differenziazione o nel metabolismo cellulare⁽⁶²⁻⁶⁶⁾. Tra le serin-treonin chinasi relate alla cascata EPO e sensibili all'ambiente pro-ossidante endocellulare, vi sono anche le chinasi Erk (*extracellular signal-regulated kinase*)-1 e 2. Queste ultime sono coinvolte nella proliferazione cellulare ed è stata dimostrata una loro azione negativa sul differenziamento cellulare nella fase iniziale dell'eritropoiesi⁽⁶²⁻⁶⁶⁾. In situazioni patologiche in cui l'ossidazione è intensa, Erk1-2 contribuiscono al blocco maturativo e all'orientamento cellulare in senso apoptotico⁽⁶²⁻⁶⁶⁾.

Pertanto, il controllo dello stress ossidativo endocellulare è estremamente importante durante l'eritropoiesi ed è strettamente dipendente dall'efficienza/espressione di sistemi anti-ossidanti e citoprotettori, come dimostrato dai gravi quadri di anemia con eritropoiesi inefficace in ceppi murini *knockout* per differenti sistemi anti-ossidanti come ad esempio la peroxidrossina-2 (Prx2; Prx2^{-/-}) (Figura 3)^(40,42,67-72). Topi *knockout* per Prx2^{-/-} presentano un'anemia emolitica cronica associata ad eritropoiesi inefficace ed intenso stress ossidativo durante la maturazione eritroide. Nei topi Prx2^{-/-} meccanismi di *back-up* entrano in funzione per contrastare il grave danno ossidativo, come ad esempio l'attivazione del fattore di trascrizione redox-sensibile, Nrf2, e la modulazione di FOXO3 (*Forkhead-box-calls-O3*), un altro fattore di trascrizione che modula l'espressione di sistemi anti-ossidanti come catalasi o superossido dismutasi (SOD1) (Figura 3)^(40,62,63,73). Il ruolo di Prx2 come *redox-switch protein* durante la maturazione eritroide è ulteriormente sostenuto dalla comparsa di grave anemia con peggioramento dell'eritropoiesi inefficace nei topi Prx2^{-/-} esposti ad una dieta per indurre sovraccarico marziale d'organo⁽⁴¹⁾. In questi topi, vi è una perdita della connessione funzionale tra eritropoiesi e metabolismo del ferro attraverso la perturbazione dell'asse eritroferone (Erfe) prodotto dagli eritroblasti a livello midollare, e epcidina (Hamp) prodotta a livello epatico.⁽⁴¹⁾ Erfe si esprime in conseguenza dell'attivazione della cascata EPO mediata tramite la via di *signaling* che vede coinvolti Jak2 e STAT5. Erfe sopprime la produzione di Hamp attraverso un meccanismo ancora oggetto di investigazione clinica; questo risulta in un aumento dell'assorbimento duodenale di ferro necessario a sostenere la maturazione eritroide ed i processi di emoglobinizzazione⁽⁷⁴⁻⁷⁸⁾. Altri fattori come GDF15 e TWSG1 sono stati proposti nella regolazione della connessione funzionale tra omeostasi del ferro ed eritropoiesi, ma questi studi sono rimasti confinati principalmente ai modelli animali con evidenze ancora limitate in soggetti umani^(79,80).

Accanto a modifiche post-traslazionali quali fosforilazione od ossidazione, recenti studi hanno evidenziato il ruolo dei microRNA (miRNAs) nella modulazione dell'eritropoiesi. I miRNA sono pic-

coli RNA non codificanti, lunghi da 18 a 22 nucleotidi che regolano l'espressione genica attraverso l'inibizione della traslazione delle proteine o destabilizzando target mRNA. Durante la maturazione eritroide alcuni sono espressi prevalentemente nella fase iniziale dell'eritropoiesi, altri solamente nelle fasi tardive, altri ancora hanno un andamento bifasico⁽⁸¹⁻⁸⁴⁾. Ad esempio il miRNA 199b-5p interagendo con GATA1 e Nrf2, regola e controlla direttamente i processi differenziativi eritroidi⁽⁸²⁾. miRNA 199b-5p, interagisce anche con c-Kit, un recettore importante nella fase iniziale della maturazione eritroide⁽⁸¹⁻⁸⁴⁾. miR-9 è stato recentemente descritto modulare l'eritropoiesi attraverso la soppressione dell'espressione di FOXO3, che risulta nella down-regolazione dei sistemi anti-ossidanti FOXO3 dipendenti con amplificato danno ossidativo e blocco maturativo dei precursori eritroidi⁽⁸³⁾. L'importanza del ruolo di alcuni miRNA durante l'eritropoiesi è sostenuta dai risultati in modelli murini geneticamente modificati con deficit di miR-144 e 451. Questi ceppi murini sviluppano eritropoiesi inefficace accompagnata a eritropoiesi extra-midollare e moderata anemia⁽⁸⁴⁾. Zhang et al.⁽⁸⁵⁾ hanno recentemente evidenziato come l'over-espressione di miR-155 sia associata ad una riduzione dei precursori eritroidi con lo sviluppo di anemia. I dati fino ad oggi disponibili su miRNA ed eritropoiesi indicano che specifici miRNA possano regolare l'eritropoiesi attraverso:

- inibizione della proliferazione o del differenziamento;
- modulazione del metabolismo del ferro;
- contributo agli eventi coinvolti nella sintesi di proteine necessarie alla stabilità della membrana cellulare⁽⁸⁶⁻⁸⁹⁾.

In prospettiva, ulteriori studi sono necessari per chiarire l'impatto dei miRNA nella biocomplexità degli eventi coinvolti nella maturazione eritroide.

Patologie dell'eritropoiesi

Data la complessità dell'eritropoiesi fisiologica, si comprende bene come alterazioni di uno degli elementi che costituiscono tale sistema possano alterare la produzione dei globuli rossi. Tali alterazioni possono essere sia di natura ereditaria sia di natura acquisita.

Una delle patologie ereditarie in cui l'eritropoiesi inefficace rappresenta un meccanismo cardine è la talassemia. In tal senso, la condizione meglio studiata è la β -talassemia. La β -talassemia è una delle più comuni emoglobinopatie nel mondo ed è dovuta a mutazioni nel gene HBB, che codifica per la β -globina, con conseguente produzione insufficiente di questa proteina nelle cellule eritroidi. La conseguenza di queste mutazioni è uno squilibrio di sintesi delle catene α - e β -globiniche. Tale squilibrio, a favore della produzione dell' α -globina, porta all'accumulo della proteina libera che forma aggregati altamente tossici⁽⁹⁰⁾. La conseguenza di tale condizione è un'anemia microcitica con emolisi e diseritropoiesi. Nei pazienti affetti da forme gravi di talassemia, trasfusione dipendenti, fino al 60-80% dei progenitori eritroidi subisce un arresto con conseguente apoptosi⁽⁹¹⁾. L'osservazione al microscopio ottico del midollo osseo dei pazienti affetti da β -talassemia conferma la presenza della diseritropoiesi, con l'osservazione di un aumento degli eritroblasti basofili

e policromatofili, diminuzione degli eritroblasti ortocromatici con riduzione delle forme più mature^(92,93). L'espansione dei precursori più immaturi è stata associata all'aumento estremamente rilevante dei livelli di EPO, come risultato del feedback dato dall'ipossia⁽⁹⁴⁾; tuttavia si ipotizza la partecipazione anche di altri meccanismi. Difatti, la risposta dell'EPO all'anemia nei pazienti talassemici appare ridotta rispetto a pazienti affetti da anemia aplastica o sideropenica; nei pazienti talassemici, a parità di Hb, i valori di EPO risultano inferiori⁽⁹⁵⁾. Tale risposta ridotta è stata ipotizzata essere legata all'aumentata clearance dell'EPO dovuta all'iperplasia eritroide, all'inibizione della sintesi di EPO dovuta alla presenza di citochine proinfiammatorie e all'alterazione della curva di dissociazione dell'Hb che causa un alterato sensing dell'ossigeno⁽⁹⁶⁾.

Componente cruciale della diseritropoiesi nei pazienti affetti da beta talassemia è l'apoptosi. Studi in vitro hanno infatti dimostrato un netto aumento dell'apoptosi nella fase policromatofila della differenziazione eritroide⁽⁹⁷⁾. Tuttavia, tali cellule apoptotiche non sono molto rappresentate allo striscio di sangue midollare dei pazienti affetti. Tali osservazioni non sono in contrasto in quanto gli eritroblasti anomali, esprimendo fosfatidilserina, vengono riconosciuti e fagocitati dai macrofagi, presenti nel midollo osseo dei pazienti affetti in numero aumentato^(98,99).

Altra componente chiave nel meccanismo di diseritropoiesi dei pazienti affetti da β -talassemia sembrerebbe essere l'ossidazione dei componenti delle membrane biologiche. La catena α -globinica, altamente instabile, lega l'eme e il ferro e genera specie reattive dell'ossigeno (ROS) che danneggiano proteine cellulari, lipidi e acidi nucleici⁽¹⁰⁰⁾. È stato quindi ipotizzato che l'eccesso di ROS, danneggiando componenti delle membrane, possa comprometterne la sopravvivenza. L'aumento di tali radicali liberi sembra essere in parte determinato dall'accumulo di ferro: la frazione di ferro plasmatico non legato alla transferrina potrebbe infatti promuovere la generazione di malonildialdeide e radicali idrossilici liberi, contribuendo all'apoptosi dell'eritroblasto^(101,102).

Tra le patologie ereditarie dell'eritropoiesi, una delle più conosciute è l'**anemia di Blackfan-Diamond (DBA)**. È causata da mutazioni nei geni delle proteine ribosomiali, più comunemente RPS19 e RPL5⁽¹⁰³⁾, ma anche nei geni RPS24, RPS26, RPS10, RPS35A, RPL5 e RPL11, codificanti sempre per proteine ribosomiali⁽¹⁰⁴⁾. Sono stati inoltre segnalati casi di pazienti DBA in cui è stata osservata la presenza di mutazioni nel fattore di trascrizione GATA1⁽¹⁰⁵⁾. Mutazioni in tali geni influenzano la stechiometria normale delle subunità ribosomiali, comportando stress ribosomale e apoptosi dei progenitori eritroidi⁽¹⁰⁶⁾. Clinicamente la DBA è una rara anemia macrocitica ereditaria, la cui insorgenza solitamente avviene nel primo anno di vita.⁽¹⁰⁴⁾ Alla condizione ematologica possono associarsi malformazioni e un aumento del rischio oncologico⁽¹⁰⁷⁾. Un modello ampiamente accettato per spiegare tale rischio coinvolge un'alterazione dell'attività della proteina oncosoppressore p53, a causa dello stress ribosomale⁽¹⁰⁸⁾.

Il meccanismo alla base dell'anemia, invece, è rappresentato dalla diseritropoiesi che avviene nel midollo di tali pazienti. Difatti è stato

dimostrato un importante blocco dell'eritropoiesi tra lo stadio di BFU-E e CFU-E dei precursori eritroidi^(109,110), tuttavia sono ancora in buona parte ignoti i meccanismi alla base degli effetti specifici eritroidi legati alle mutazioni nei geni delle subunità ribosomiali. Gli effetti di tali mutazioni sulle cellule eritroidi, si ipotizza, potrebbero essere legati ad una disfunzione del complesso ribosomale. Nello specifico nei pazienti DBA con mutazioni nei geni ribosomiali, la traduzione di mRNA potrebbe essere compromessa a causa dell'alterato assemblaggio del ribosoma, dovuto all'aploinsufficienza di una delle proteine ribosomiali. Nei pazienti che presentano mutazioni in GATA1, invece, la traduzione globale dell'mRNA sarebbe compromessa a causa dell'incapacità dei progenitori eritroidi di upregolare la sintesi di tutto il sistema di traduzione proteica, inclusa la sintesi delle proteine ribosomiali stesse⁽¹¹¹⁾.

Anche nelle **anemie diseritropoietiche congenite (Congenital Dyserythropoietic Anemia - CDA)** la diseritropoiesi rappresenta il *primum movens* eziologico. Esse sono una classe di malattie rare del sangue caratterizzata da una vasta gamma di alterazioni morfologiche e funzionali a carico dei precursori eritroidi, le cui caratteristiche sono principalmente l'eritropoiesi inefficace e l'accumulo di ferro. All'interno di questa classe di patologie si riconoscono diverse entità nosologiche⁽¹¹²⁾. La CDA di tipo I può essere caratterizzata da mutazioni in due geni, CDAN1⁽¹¹³⁾ (per la forma CDA1a) e C15ORF41⁽¹¹⁴⁾ (causativo di CDA1b); clinicamente è presente anemia, tendenzialmente macrocitica, occasionalmente possono essere presenti malformazioni minori a carico degli arti (come la sindattilia)^(112,113). All'osservazione al microscopio ottico, il midollo di pazienti CDA1 è caratterizzato da eritroblasti binucleati (spesso non simmetrici, ma di dimensioni differenti), ponti intercromatinici tra gli eritroblasti, cambi megaloblastoidi e alterazioni nucleari. L'osservazione al microscopio elettronico, invece, permette di verificare la presenza di piccoli vacuoli nell'eterocromatina nucleare che conferiscono al nucleo il classico aspetto spugnoso o a formaggio svizzero⁽¹¹⁵⁾. Il meccanismo alla base della diseritropoiesi presente nei pazienti affetti da CDA1 non è ancora del tutto noto. Si ipotizza possa essere legato al ruolo svolto dalle proteine codificate dai geni causativi CDAN1 e C15ORF41. La codanina-1, tradotta a partire dal gene CDAN1, si localizza nel nucleo, preferenzialmente nell'eterocromatina nucleare, è regolata trascrizionalmente da E2F1, e il livello proteico risulta aumentato durante la fase S del ciclo cellulare. Sebbene la funzione della codanina-1 durante la fase S sia ancora sconosciuta, la presenza di eterocromatina spugnosa nel midollo CDA I potrebbe suggerire un ruolo di questa proteina nell'organizzazione dell'eterocromatina durante la replicazione del DNA^(112,113,114). Un'altra ipotesi eziologica riguarda invece il ruolo della proteina nel complesso citosolico Asf1-H3-H4-importina4, la quale è implicata nell'assemblaggio e disassemblaggio del nucleosoma. La funzione della proteina Asf1, nello specifico, sembrerebbe essere regolata dall'attività di CDAN1⁽¹¹⁶⁾. Ancora meno informazioni vi sono sull'eziologia dell'eritropoiesi nei pazienti affetti da CDA1b, causata da mutazioni nel gene C15ORF41: tale gene è predetto codificare per una endonucleasi, ma la sua funzione rimane

ancora sconosciuta. Nelle colture di eritroblasti, C15ORF41 produce un trascritto che codifica una proteina che presenta omologia di sequenza con le resolvasi della giunzione di Holliday. Tuttavia, è stato dimostrato che C15ORF41 interagisce con Asf1b, supportando l'ipotesi che il difetto principale di CDA1b sia nella replicazione del DNA e nell'assemblaggio della cromatina⁽¹¹⁴⁾.

Meglio conosciuta, anche perché meno rara, è l'anemia congenita diseritropoietica di tipo 2, dovuta a mutazioni nel gene SEC23B. Il gene SEC23B codifica l'omonimo membro del complesso COPII, che è coinvolto nella via secretoria delle cellule eucariotiche. Questo complesso di multisubunità media il trasporto anterogrado delle proteine neosintetizzate verso l'apparato di Golgi⁽¹¹⁷⁾. In tale patologia il blocco maturativo sembra essere localizzato tra lo stadio di eritroblasto policromatico ed ortocromatico. Durante tale passaggio, infatti, si inizia ad osservare una delle caratteristiche più frequenti della CDA2, quale la presenza di doppi nuclei. Mentre allo stadio di eritroblasti basofili è possibile osservare una delle caratteristiche patognomoniche della CDA2, ossia l'ipoglicosilazione della proteina Banda3 (trasportatore degli anioni)⁽¹¹⁸⁾. Altra caratteristica della CDA2 è la presenza di una doppia membrana plasmatica⁽¹¹⁹⁾. Essa è valutabile mediante microscopia elettronica ed appare appartenere al reticolo endoplasmatico. Viene per la quasi totalità persa durante l'enucleazione, tuttavia alcuni reticolociti possono presentarne residui che vengono eliminati durante la maturazione eritroide terminale⁽¹²⁰⁾.

Molto rara è invece la CDA di tipo 4. Tale patologia è legata a mutazioni nel gene KLF1, il quale codifica per il fattore Krüppel-like tipo 1⁽¹²¹⁾. Tale proteina è un fattore di trascrizione specifico della linea eritroide che svolge un ruolo importante nello switching dell'emoglobina, nel differenziamento eritroide e nella maturazione degli eritrociti⁽¹²²⁾. Tale proteina può agire sia come attivatore trascrizionale che come repressore dell'espressione genica nella linea eritroide, con attivazione preferenziale di geni per la sintesi dell'eme e delle globine, di antigeni di gruppi sanguigni e altre proteine specifiche^(121,123). Il difetto nel processo maturativo sembrerebbe essere localizzato nella fase terminale dell'eritropoiesi. Difatti colture ex vivo di precursori eritroidi deficitari per KLF1 presentano anomalie della fase terminale dell'eritropoiesi, in particolare si osserva un blocco a livello dell'eritroblasto ortocromatico, che permane in fase S, e difetti dell'enucleazione⁽¹²²⁾.

Mutazioni in tale gene sono associate a fenotipi diversi come la talassemia, la persistenza dell'emoglobina fetale (HPFH) e la presenza del gruppo sanguigno LU. La mutazione c.973G>A, p.Glu325Lys è attualmente associata al fenotipo della CDA di tipo 4⁽¹²¹⁾. Il midollo osseo di tali pazienti, come per il resto delle CDA, mostra una netta componente diseritropoietica con uno sbilanciamento del rapporto mieloideritroide ridotto; tipica di tale forma è la multinuclearità, frequentemente presente negli eritroblasti ortocromatici di tali pazienti, associata alla presenza di eritroblasti binucleati. Al microscopio elettronico gli eritroblasti si presentano con alterazioni nucleari e cromatiniche: picnosi, carioressi, nuclei spongiosi, ponti internucleari, pori nella membrana nucleare attraverso cui il cito-

plasma sembra penetrare nei nuclei e nei ponti intercellulari⁽¹²⁴⁾. Difetti dell'eritropoiesi sono anche presenti in patologie acquisite. Tra queste un gruppo in cui la diseritropoiesi è particolarmente rilevante è rappresentato dalle sindromi mielodisplastiche (SMD). Le SMD sono malattie eterogenee caratterizzate da diseritropoiesi, displasia delle cellule staminali ematopoietiche e accumulo di ferro⁽¹²⁵⁾. Sono particolarmente comuni negli anziani e si manifestano primariamente con anemia. Secondo la classificazione dell'OMS, la diagnosi di SMD si basa sulla presenza di citopenie, la presenza di displasia di vario grado e la percentuale di blasti. In particolare, l'anemia si presenta quando almeno il 10% dei precursori eritroidi sono displastici^(125,126). Le caratteristiche dello striscio di sangue midollare includono alterazioni come megaloblastosi, frammentazione del citoplasma, accumulo di ferro all'interno del mitocondrio, bi/multinuclearità, e ponti nucleari e citoplasmatici⁽¹²⁷⁾. Uno dei meccanismi che induce la diseritropoiesi nelle SMD è legato al gene GATA1, uno dei geni maggiormente mutato nelle cellule con SMD (mutato, anche se in germline, anche in alcuni pazienti affetti da DBA e CDA)^(105, 128,129). Tale meccanismo è legato all'attivazione delle caspasi: nelle cellule normali, infatti, la *heat shock protein 70* (Hsp70), protegge la proteina GATA1 dal clivaggio delle caspasi⁽¹³⁰⁾. Le cellule di pazienti affetti da SMD, invece, overesprimono la proteina Fas (le CD34+) e FasL (precursori maturi). L'interazione di tali proteine comporta l'inizio dell'apoptosi tramite il reclutamento e attivazione della caspasi-8, depolarizzazione della membrana mitocondriale e attivazione della caspasi-3. La riduzione dei livelli proteici di GATA1 ne impedisce l'accumulo a livello nucleare, riducendone l'attività di fattore trascrizionale⁽¹³¹⁾. Una forma molto comune di SMD è la sindrome mielodisplastica con delezione 5q. Tale forma è caratterizzata da anemia costante e un numero di piastrine da normale ad alto, associato a megacariociti ipolobati e delezione della regione cromosomica 5q32-q33, all'interno della quale mappa il gene RPS14, che codifica per una proteina ribosomale⁽¹³²⁾. L'alterazione della proteina ribosomale comporta, come nelle DBA, un'alterazione del *pathway* di p53 con arresto del ciclo cellulare e apoptosi allo stadio di eritroblasto tardivo⁽¹³³⁾. L'anemia in tali pazienti, è stato recentemente osservato, è inoltre supportata da meccanismi estrinseci all'alterazione ribosomale e del suo *pathway*. Difatti è stato osservato che, in topi con aploinsufficienza di RPS14 vi è un'espansione intramidollare di *myeloid-derived suppressor cells* (MDSCs), legata alla produzione della proteina infiammatoria S100A9, ligando di CD33⁽¹³⁴⁾. Particolarmente frequenti sono inoltre le forme con sideroblasti ad anello (SMD-RS). Tali forme sono caratterizzate da mutazioni somatiche a carico dei geni che codificano per le proteine facenti parte del meccanismo di *splicing*⁽¹³⁵⁾. I geni più frequentemente mutati sono SF3B1, SRSF2, U2AF1 e ZRSR2, componenti del complesso U2 dello spliceosoma, il quale riconosce il sito di *splicing* al 3' e coordina l'escissione degli introni⁽¹³⁶⁾. Mentre le mutazioni di SRSF2, ZRSR2 e U2AF1 sono presenti in condizioni di neutropenia e trombocitopenia, mutazioni nel gene SF3B1 sono presenti in più dell'80% delle forme di SMD

con sideroblasti ad anello (SMD-RS)⁽¹³⁷⁾. Studi su modelli murini di SMD-RS hanno dimostrato che topi *knock-in* per la mutazione K700E del gene SF3B1 sviluppano anemia macrocitica a causa di un difetto nella fase terminale dell'eritropoiesi, con conseguente displasia eritroide ed espansione dei precursori eritroidi⁽¹³⁸⁾. Il meccanismo di formazione dei sideroblasti ad anello, tipici di tale forma, sembra essere legato ai prodotti dello *splicing* anomalo. In tali cellule, infatti, sono stati osservati mRNA anomali tradotti a partire da geni coinvolti in molti meccanismi cruciali per la cellula quali lo *splicing* stesso e i processi metabolici⁽¹³⁹⁾. Nelle cellule con mutazioni in SF3B1, infatti, sono stati frequentemente osservati mRNA anomali di vari geni tra cui geni TMEM14C. La proteina codificata da TMEM14C rappresenta una proteina transmembrana che svolge un ruolo nelle fasi terminali della sintesi dell'eme⁽¹⁴⁰⁾. Anche l'mRNA del gene ABCB7 è stato frequentemente osservato alterato in cellule SMD-RS⁽¹³⁹⁾. Mutazioni *germline* di tale gene sono causative di una forma di anemia sideroblastica *x-linked* con atassieltangectasia⁽¹⁴¹⁾. Nelle cellule con SMD-RS, a causa di uno *splicing* alternativo, infatti vi è la formazione di un mRNA con un codone di stop precoce con conseguente riduzione della sua espressione e accumulo di ferro mitocondriale legato a ferritina⁽¹³⁹⁾.

Trattamenti che modulano l'attività eritropoietica

Tra i primissimi composti farmacologici utilizzati per modulare l'eritropoiesi vi sono i corticosteroidi, in particolare il desametasone. Difatti, rappresenta uno dei farmaci attualmente utilizzati per il trattamento di DBA e SMD^(104, 127). In tali pazienti, infatti i corticosteroidi promuovono l'eritropoiesi, aumentando il numero assoluto di cellule eritroidi prodotte. Nello specifico il desametasone è stato dimostrato aumentare selettivamente le BFU-E⁽¹⁴²⁾. La somministrazione di corticosteroidi non sembra agire andando a modulare i livelli delle proteine ribosomali, ma, al contrario, sembra avere effetto su altri meccanismi. Studi in vitro hanno dimostrato una modifica dell'espressione di FLT3 (tirosinasi che promuove la proliferazione delle cellule staminali ematopoietiche), PLZF (repressore trascrizionale che blocca la differenziazione ematopoietica), Mip-1 α (citochina che blocca la proliferazione delle cellule staminali ematopoietiche)⁽¹⁴³⁾.

Più recentemente è stato osservato, invece, che nei pazienti affetti da DBA i glucocorticoidi potrebbero agire in maniera più mirata sull'espressione di p53, andando a ridurre i livelli della proteina e comportando una riduzione dell'apoptosi. Conseguenza di ciò è un aumento della differenziazione eritroide e della capacità di formare colonie CFU-E⁽¹⁴⁴⁾.

Al fine di migliorare l'outcome dei pazienti affetti da DBA sono state recentemente testate, in vitro e su modelli animali, molecole in grado di migliorare l'eritropoiesi nella DBA⁽¹⁴⁵⁾. Nello specifico è stata testata con promettenti risultati la molecola SMER28, un derivato della chinazolinamina caratterizzato come induttore di autofagia⁽¹⁴⁶⁾. Tale composto stimola l'eritropoiesi promuovendo l'au-

tofagia nei progenitori eritroidi, sia in modelli animali (zebrafish e topo), sia in cellule umane. L'applicazione su cellule CD34+ umane ha dimostrato l'efficacia di tale farmaco a livello sia dei precursori eritroidi immaturi sia degli eritroblasti maturi⁽¹⁴⁵⁾.

Per quanto riguarda l'anemia diseritropoietica di tipo 1, alcuni pazienti affetti hanno potuto invece beneficiare degli effetti dell'interferone Alpha-2a. Tale trattamento, per la prima volta somministrato in una paziente di 28 anni affetta da CDA1 ed epatite C, sembra infatti migliorare l'anemia in tali soggetti⁽¹⁴⁷⁾. Il meccanismo d'azione per cui l'interferone aumenta i valori di Hb non è noto ed attualmente i pazienti trattati sono in numero ancora esiguo⁽¹⁴⁷⁻¹⁵⁰⁾, tuttavia sembra possibile che esso riduca l'eritropoiesi inefficace e la formazione di anomalie nucleari⁽¹⁴⁷⁾.

Un farmaco particolarmente promettente nel trattamento delle patologie caratterizzate da diseritropoiesi è sicuramente il sotatercept (ACE-011) e gli analoghi successivi, un composto generato dalla fusione del recettore dell'attivina tipo IIA (ActRIIA) extracellulare al dominio Fc umano delle IgG1, antagonizzando il segnale a valle di ActRIIA attraverso il sequestro di proteine della famiglia del TGF- β .

Tale farmaco era stato inizialmente sviluppato per trattare l'osteopenia in donne in epoca postmenopausale, ma durante lo studio sono emersi effetti collaterali inaspettati, come l'aumento dell'ematocrito e dell'emoglobina⁽¹⁵¹⁾.

I meccanismi alla base dell'effetto benefico dell'ACE-011 sulla produzione di globuli rossi in vitro non sono ancora completamente chiari. Sebbene non si sia rilevato un effetto diretto sulla differenziazione eritroide delle cellule CD34+ umane, hanno dimostrato che ACE-011 attenua l'effetto inibitorio del microambiente midollare sulla differenziazione cellulare. Pertanto, l'effetto del farmaco potrebbe essere attribuito a una modulazione indiretta del microambiente in cui le cellule CD34+ si differenziano, piuttosto che a un'azione diretta sui precursori eritroidi⁽¹⁵²⁾.

Somministrazioni di RAP-011 (il muriniforma di ACE-011) in modelli murini ha dimostrato che il farmaco comporta un aumento di RBC, Hct ed Hb inducendo un aumento significativo nel pool di precursori eritroidi più maturi (eritroblasti poli/ortocromatici). Oltre a stimolare l'eritropoiesi tardiva, il farmaco si è dimostrato in grado di aumentare significativamente il numero e le dimensioni delle colonie di BFU-E⁽¹⁵³⁾.

Trattamenti su un modello zebrafish di DBA hanno dimostrato non solo che la somministrazione di RAP011 è in grado di migliorare il fenotipo dei precursori eritroidi, ma è stato osservato anche un effetto additivo se somministrato insieme al desametasone⁽¹⁵⁴⁾. Tuttavia la patologia in cui attualmente ha trovato una delle sue più importanti applicazioni è sicuramente la β -talassemia. Difatti è stato dimostrato come l'utilizzo del RAP011 in modelli murini di β -talassemia migliori l'anemia sopprimendo gli effetti deleteri di GDF11, una citochina che blocca la maturazione degli eritroidi terminali attraverso un ciclo di amplificazione autocrino che coinvolge sia lo stress ossidativo che la precipitazione dell' α -globina⁽¹⁵⁵⁾.

Gli effetti della somministrazione del sotatercept (ACE-011) a soggetti affetti da β -talassemia sono stati recentemente testati in un trial clinico di fase II (*ClinicalTrials.gov* NCT01571635)⁽¹⁵⁷⁾. Il farmaco, a varie dosi, è stato testato su 16 pazienti con β -talassemia trasfusione-dipendente e 30 pazienti con β -talassemia non trasfusione-dipendente. Non sono stati osservati eventi avversi gravi potenzialmente letali; il 13% dei pazienti ha riportato eventi avversi gravi ma gestibili. Di 30 pazienti con β -talassemia non trasfusione-dipendenti trattati con $\geq 0,1$ mg/kg di sotatercept, 18 (60%) hanno raggiunto un aumento medio dell'emoglobina $\geq 1,0$ g / dL e 11 (37%) un aumento $\geq 1,5$ g / dL, sostenuto per ≥ 12 settimane. Quattro (100%) pazienti con β -talassemia trasfusione-dipendenti trattati con sotatercept 1,0 mg/kg hanno raggiunto una riduzione del carico trasfusionale $\geq 20\%$ ⁽¹⁵⁶⁾.

Dati gli effetti sulla via di segnale indotta dall'attivina A, è stata recentemente prodotta un'altra proteina di fusione del recettore Activtype IIB modificata (Act-RIIB): l'ACE-536 (e il suo ortologo murino RAP-536). Tale molecola non inibisce il segnale mediato dall'Activina A, ma inibisce la segnalazione indotta da altri membri della superfamiglia TGF- β ⁽¹⁵⁷⁾.

Lo studio su modelli murini ha mostrato che RAP-536 promuove la maturazione dei precursori eritroidi tardivi in vivo, con una risposta sinergica rispetto all'EPO. Il trattamento ha comportato una riduzione dell'anemia, dell'iperplasia eritroide e dell'eritropoiesi inefficace in un modello murino di sindromi mielodisplastiche (SMD)⁽¹⁵⁷⁾.

Trials clinici di fase 2 (*ClinicalTrials.gov* NCT01749514 e NCT02268383) su pazienti affetti da SMD a basso rischio hanno mostrato come il farmaco sia in grado di aumentare i parametri ematologici, soprattutto in pazienti con valori di EPO basali inferiori a 200 UI/L. I pazienti hanno presentato riduzioni significative della richiesta trasfusionale, mentre i pazienti non trasfusione-dipendenti hanno mostrato aumenti precoci e sostenuti di circa 2g/dL di emoglobina. Pazienti affetti da SMD-RS hanno mostrato un miglior risultato rispetto alle altre forme di SMD⁽¹⁵⁸⁾.

Dati gli ottimi risultati ottenuti è stato avviato un altro trial, di fase 3, per lo studio degli effetti del farmaco in pazienti affetti da SMD a basso rischio, SMD-RS, attualmente in corso (NCT02631070).

Bibliografia

1. Erslev A. Humoral regulation of red cell production. *Blood*. 1953;8(4):349-357.
2. Erslev A, Laviets PH, Van Wägenen G. Erythropoietic stimulation induced by anemic serum. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1953;83(3):548-550.
3. Pronk CJ, Rossi DJ, Mansson R, et al. Elucidation of the phenotypic, functional, and molecular topography of a myeloerythroid progenitor cell hierarchy. *Cell Stem Cell*. 2007;1(4):428-442.
4. An X, Schulz VP, Mohandas N, et al. Human and murine erythropoiesis. *Curr Opin Hematol*. 2015;22(3):206-211.
5. Brugnara C, de Franceschi L. Effect of cell age and phenylhydrazine on the cation transport properties of rabbit erythrocytes. *J Cell Physiol*. 1993;154(2):271-280.
6. Tsai SF, Martin DI, Zon LI, et al. Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature*. 1989;339(6224):446-451.
7. Gregory T, Yu C, Ma A, et al. GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood*. 1999;94(1):87-96.
8. Tsang AP, Fujiwara Y, Hom DB, et al. Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev*. 1998;12(8):1176-1188.

Conclusioni

Come descritto precedentemente, l'eritropoiesi è un meccanismo estremamente complesso, i cui meccanismi sono solo in parte conosciuti. Tramite le nuove tecnologie è stato possibile sequenziare tutto il DNA e l'mRNA della cellula eritroide. Ciò ha aperto le porte alle recenti scoperte in tale ambito. È stato infatti possibile, da un lato, individuare nuovi geni associati a forme di diseritropoiesi, ereditarie e acquisite, ma anche analizzare tutte le modifiche a valle di tali alterazioni, aiutando quindi a comprendere il meccanismo patogenetico della patologia.

Comprendere il sofisticato sistema è fondamentale per cercare di instaurare terapie mirate per le varie patologie. Difatti, tale complesso quadro dell'eritropoiesi appare essere estremamente sensibile ad alterazioni di natura ereditaria o acquisita. Attualmente, infatti, il principale trattamento per i pazienti affetti da eritropoiesi inefficace rimane purtroppo l'apporto trasfusionale o il trapianto di cellule staminali.

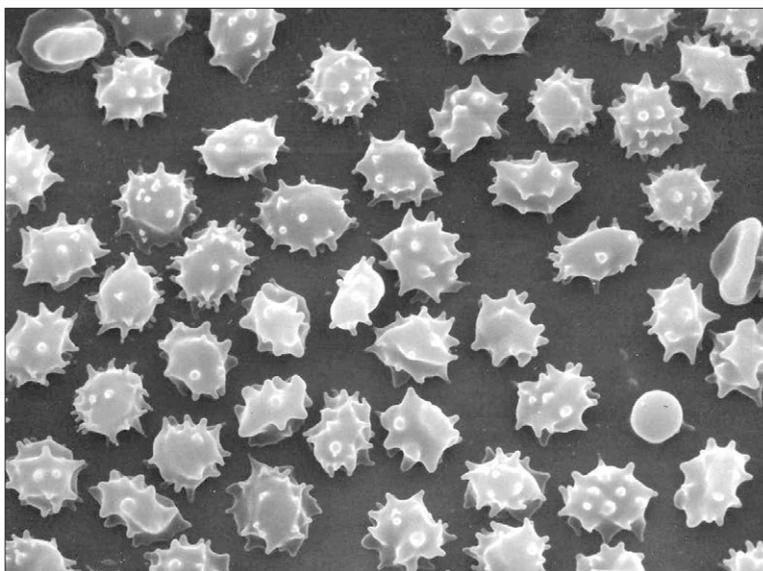
Le nuove molecole, sotatercept e luspatercept, generate dalla fusione del recettore dell'attivina tipo IIA (ActRIIA) extracellulare al dominio Fc umano delle IgG1, sembrano aver aperto, in maniera inaspettata, le porte ad una nuova epoca terapeutica per tali pazienti. Create per altri scopi, hanno mostrato tra gli effetti collaterali indesiderati, aumento dei valori di Hb. I primi studi, su modelli murini di varie anemie, hanno dimostrato l'applicabilità clinica di tali molecole. I primi trial clinici di fase II, eseguiti su pazienti affetti da β -talassemia e SMD hanno abbondantemente confermato la possibilità concreta di utilizzare tali molecole, soprattutto il luspatercept. Tali farmaci si sono dimostrati molto utili nell'aumentare i livelli di Hb, nel ridurre, fino all'eliminazione, la trasfusione dipendenza, tuttavia in tali pazienti permane un certo grado di anemizzazioni. Ulteriori studi, infatti, si rendono necessari per cercare di comprendere meglio il complicato meccanismo dell'eritropoiesi, al fine di identificare molecole che in maniera mirata possano intervenire sul singolo difetto. Vanno poi effettuati ulteriori studi più a lungo termine per studiare possibili effetti collaterali delle nuove molecole testate. Negli ultimi anni, quindi, lo scenario scientifico dell'eritropoiesi ha fatto passi da gigante, ma siamo ancora lontano dalla comprensione dello scenario generale.

9. Fujiwara Y, Chang AN, Williams AM, et al. Functional overlap of GATA-1 and GATA-2 in primitive hematopoietic development. *Blood*. 2004;103(2):583-585.
10. Arlet JB, Ribeil JA, Guillem F, et al. HSP70 sequestration by free alpha-globin promotes ineffective erythropoiesis in beta-thalassaemia. *Nature*. 2014;514(7521):242-246.
11. Valent P, Busche G, Theurl I, et al. Normal and pathological erythropoiesis in adults: from gene regulation to targeted treatment concepts. *Haematologica*. 2018;103(10):1593-1603.
12. Lettre G, Bauer DE. Fetal haemoglobin in sickle-cell disease: from genetic epidemiology to new therapeutic strategies. *Lancet*. 2016;387(10037):2554-2564.
13. Auer PL, Lettre G. Rare variant association studies: considerations, challenges and opportunities. *Genome Med*. 2015;7(1):16.
14. Luc S, Huang J, McEldoon JL, et al. Bcl11a Deficiency Leads to Hematopoietic Stem Cell Defects with an Aging-like Phenotype. *Cell Rep*. 2016;16(12):3181-3194.
15. Tsang JC, Yu Y, Burke S, et al. Single-cell transcriptomic reconstruction reveals cell cycle and multi-lineage differentiation defects in Bcl11a-deficient hematopoietic stem cells. *Genome Biol*. 2015;16:178.
16. Magor GW, Tallack MR, Gillinder KR, et al. KLF1-null neonates display hydrops fetalis and a deranged erythroid transcriptome. *Blood*. 2015;125(15):2405-2417.
17. Gnanaprasadam MN, Bieker JJ. Orchestration of late events in erythropoiesis by KLF1/EKLF. *Curr Opin Hematol*. 2017;24(3):183-190.
18. Da Costa L, Mohandas N, Sorette M, et al. Temporal differences in membrane loss lead to distinct reticulocyte features in hereditary spherocytosis and in immune hemolytic anemia. *Blood*. 2001;98(10):2894-2899.
19. Blanc L, De Gassart A, Geminard C, et al. Exosome release by reticulocytes--an integral part of the red blood cell differentiation system. *Blood Cells Mol Dis*. 2005;35(1):21-26.
20. De Back DZ, Kostova EB, van Kraaij M, et al. Of macrophages and red blood cells; a complex love story. *Front Physiol*. 2014;5:9.
21. Moras M, Lefevre SD, Ostuni MA. From Erythroblasts to Mature Red Blood Cells: Organelle Clearance in Mammals. *Front Physiol*. 2017;8:1076.
22. Salomao M, Zhang X, Yang Y, et al. Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: new insights into the structural organization of the red blood cell membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(23):8026-8031.
23. Mohandas N, Prenant M. Three-dimensional model of bone marrow. *Blood*. 1978;51(4):633-643.
24. Coulombel L, Tchernia G, Mohandas N. Human reticulocytes maturation and its relevance to erythropoietic stress. *J Lab Clin Med*. 1979;94(3):467-474.
25. Giarratana MC, Kobari L, Lapillonne H, et al. Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2005;23(1):69-74.
26. Fujimi A, Matsunaga T, Kobune M, et al. Ex vivo large-scale generation of human red blood cells from cord blood CD34+ cells by co-culturing with macrophages. *Int J Hematol*. 2008;87(4):339-350.
27. Lu SJ, Feng Q, Park JS, et al. Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. *Blood*. 2008;112(12):4475-4484.
28. Ovchinnikova E, Agliarolo F, von Lindern M, et al. The Shape Shifting Story of Reticulocyte Maturation. *Front Physiol*. 2018;9:829.
29. Chow A, Lucas D, Hidalgo A, et al. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp Med*. 2011;208(2):261-271.
30. Palis J. Interaction of the Macrophage and Primitive Erythroid Lineages in the Mammalian Embryo. *Front Immunol*. 2016;7:669.
31. Seu KG, Papoin J, Fessler R, et al. Unraveling Macrophage Heterogeneity in Erythroblastic Islands. *Front Immunol*. 2017;8:1140.
32. Bortner CD, Hughes FM, Jr., Cidlowski JA. A primary role for K+ and Na+ efflux in the activation of apoptosis. *J Biol Chem*. 1997;272(51):32436-32442.
33. De Franceschi L, Ronzoni L, Cappellini MD, et al. K-CL co-transport plays an important role in normal and beta thalassaemic erythropoiesis. *Haematologica*. 2007;92(10):1319-1326.
34. Bagriantsev SN, Gracheva EO, Gallagher PG. Piezo proteins: regulators of mechanosensation and other cellular processes. *J Biol Chem*. 2014;289(46):31673-31681.
35. Andolfo I, Alper SL, Delaunay J, et al. Missense mutations in the ABCB6 transporter cause dominant familial pseudohyperkalemia. *Am J Hematol*. 2013;88(1):66-72.
36. Fermo E, Bogdanova A, Petkova-Kirova P, et al. 'Gardos Channelopathy': a variant of hereditary Stomatocytosis with complex molecular regulation. *Sci Rep*. 2017;7(1):1744.
37. An X, Schulz VP, Li J, et al. Global transcriptome analyses of human and murine terminal erythroid differentiation. *Blood*. 2014;123(22):3466-3477.
38. Liu J, Zhang J, Ginzburg Y, et al. Quantitative analysis of murine terminal erythroid differentiation in vivo: novel method to study normal and disordered erythropoiesis. *Blood*. 2013;121(8):e43-49.
39. Liu J, Mohandas N, An X. Membrane assembly during erythropoiesis. *Curr Opin Hematol*. 2011;18(3):133-138.
40. Franco SS, De Falco L, Ghaffari S, et al. Resveratrol accelerates erythroid maturation by activation of FoxO3 and ameliorates anemia in beta-thalassaemic mice. *Haematologica*. 2014;99(2):267-275.
41. Matte A, De Falco L, Federti E, et al. Peroxiredoxin-2: A Novel Regulator of Iron Homeostasis in Ineffective Erythropoiesis. *Antioxid Redox Signal*. 2018;28(1):1-14.
42. Matte A, De Falco L, Iolascon A, et al. The Interplay Between Peroxiredoxin-2 and Nuclear Factor-Erythroid 2 Is Important in Limiting Oxidative Mediated Dysfunction in beta-Thalassaemic Erythropoiesis. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23(16):1284-1297.
43. Wu J, Lei G, Mei M, et al. A novel C53/LZAP-interacting protein regulates stability of C53/LZAP and DDRGK domain-containing Protein 1 (DDRGK1) and modulates NF-kappaB signaling. *J Biol Chem*. 2010;285(20):15126-15136.
44. Van Galen P, Kreso A, Mbong N, et al. The unfolded protein response governs integrity of the haematopoietic stem-cell pool during stress. *Nature*. 2014;510(7504):268-272.
45. Kalfa TA, Pushkaran S, Zhang X, et al. Rac1 and Rac2 GTPases are necessary for early erythropoietic expansion in the bone marrow but not in the spleen. *Haematologica*. 2010;95(1):27-35.
46. Zhang S, Macias-Garcia A, Velazquez J, et al. HRI coordinates translation by eIF2alphaP and mTORC1 to mitigate ineffective erythropoiesis in mice during iron deficiency. *Blood*. 2018;131(4):450-461.
47. Zhang X, Camprecios G, Rimmele P, et al. FOXO3-mTOR metabolic cooperation in the regulation of erythroid cell maturation and homeostasis. *Am J Hematol*. 2014;89(10):954-963.
48. Lupo F, Tibaldi E, Matte A, et al. A new molecular link between defective autophagy and erythroid abnormalities in chorea-acanthocytosis. *Blood*. 2016;128(25):2976-2987.
49. Knight ZA, Schmidt SF, Birsoy K, et al. A critical role for mTORC1 in erythropoiesis and anemia. *Elife*. 2014;3:e01913.
50. Kang YA, Sanalkumar R, O'Geen H, et al. Autophagy driven by a master regulator of hematopoiesis. *Mol Cell Biol*. 2012;32(1):226-239.
51. Liu X, Zhang Y, Ni M, et al. Regulation of mitochondrial biogenesis in erythropoiesis by mTORC1-mediated protein translation. *Nat Cell Biol*. 2017;19(6):626-638.

52. Zhang J, Wu K, Xiao X, et al. Autophagy as a regulatory component of erythropoiesis. *Int J Mol Sci*. 2015;16(2):4083-4094.
53. Marino G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, et al. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(2):81-94.
54. Oikonomidou PR, Rivella S. What can we learn from ineffective erythropoiesis in thalassemia? *Blood Rev*. 2018;32(2):130-143.
55. Beneduce E, Matte A, De Falco L, et al. Fyn kinase is a novel modulator of erythropoietin signaling and stress erythropoiesis. *Am J Hematol*. 2018;94:10-20.
56. Ingley E. Integrating novel signaling pathways involved in erythropoiesis. *IUBMB Life*. 2012;64(5):402-410.
57. Karur VG, Lowell CA, Besmer P, et al. Lyn kinase promotes erythroblast expansion and late-stage development. *Blood*. 2006;108(5):1524-1532.
58. Socolovsky M, Nam H, Fleming MD, et al. Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood*. 2001;98(12):3261-3273.
59. Socolovsky M, Fallon AE, Wang S, et al. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a-/-5b-/- mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell*. 1999;98(2):181-191.
60. Khandros E, Thom CS, D'Souza J, et al. Integrated protein quality-control pathways regulate free alpha-globin in murine beta-thalassemia. *Blood*. 2012;119(22):5265-5275.
61. Macari ER, Lowrey CH. Induction of human fetal hemoglobin via the NRF2 antioxidant response signaling pathway. *Blood*. 2011;117(22):5987-5997.
62. Liang R, Ghaffari S. Advances in understanding the mechanisms of erythropoiesis in homeostasis and disease. *Br J Haematol*. 2016;174(5):661-673.
63. Ghaffari S, Kitidis C, Zhao W, et al. AKT induces erythroid-cell maturation of JAK2-deficient fetal liver progenitor cells and is required for Epo regulation of erythroid-cell differentiation. *Blood*. 2006;107(5):1888-1891.
64. Zhao W, Kitidis C, Fleming MD, et al. Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway. *Blood*. 2006;107(3):907-915.
65. Wannatung T, Litanatudom P, Leecharoenkiat A, et al. Increased erythropoiesis of beta-thalassaemia/Hb E proerythroblasts is mediated by high basal levels of ERK1/2 activation. *Br J Haematol*. 2009;146(5):557-568.
66. Rhodes MM, Kopsombut P, Bondurant MC, et al. Bcl-x(L) prevents apoptosis of late-stage erythroblasts but does not mediate the antiapoptotic effect of erythropoietin. *Blood*. 2005;106(5):1857-1863.
67. Matte A, Recchiuti A, Federti E, et al. Resolution of sickle cell disease associated inflammation and tissue damage with 17R-Resolvin D1. *Blood*. 2019;133(3):252-265.
68. Bellelli R, Federico G, Matte A, et al. NCOA4 Deficiency Impairs Systemic Iron Homeostasis. *Cell Rep*. 2016;14(3):411-421.
69. Matte A, Bertoldi M, Mohandas N, et al. Membrane association of peroxiredoxin-2 in red cells is mediated by the N-terminal cytoplasmic domain of band 3. *Free Radic Biol Med*. 2013;55:27-35.
70. Matte A, Low PS, Turrini F, et al. Peroxiredoxin-2 expression is increased in beta-thalassemic mouse red cells but is displaced from the membrane as a marker of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2010;49(3):457-466.
71. Friedman JS, Lopez MF, Fleming MD, et al. SOD2-deficiency anemia: protein oxidation and altered protein expression reveal targets of damage, stress response, and antioxidant responsiveness. *Blood*. 2004;104(8):2565-2573.
72. Case AJ, Madsen JM, Motto DG, et al. Manganese superoxide dismutase depletion in murine hematopoietic stem cells perturbs iron homeostasis, globin switching, and epigenetic control in erythrocyte precursor cells. *Free Radic Biol Med*. 2013;56:17-27.
73. Marinkovic D, Zhang X, Yalcin S, et al. Foxo3 is required for the regulation of oxidative stress in erythropoiesis. *J Clin Invest*. 2007;117(8):2133-2144.
74. Kautz L, Jung G, Du X, et al. Erythroferrone contributes to hepcidin suppression and iron overload in a mouse model of beta-thalassemia. *Blood*. 2015;126(17):2031-2037.
75. Kautz L, Jung G, Nemeth E, et al. Erythroferrone contributes to recovery from anemia of inflammation. *Blood*. 2014;124(16):2569-2574.
76. Kautz L, Nemeth E. Molecular liaisons between erythropoiesis and iron metabolism. *Blood*. 2014;124(4):479-482.
77. Kautz L, Jung G, Valore EV, et al. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet*. 2014;46(7):678-684.
78. Rivella S. Iron metabolism under conditions of ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia. *Blood*. 2019;133(1):51-58.
79. Casanovas G, Vujic Spasic M, Casu C, et al. The murine growth differentiation factor 15 is not essential for systemic iron homeostasis in phlebotomized mice. *Haematologica*. 2013;98(3):444-447.
80. Mirciov CS, Wilkins SJ, Dunn LA, et al. Characterization of Putative Erythroid Regulators of Hepcidin in Mouse Models of Anemia. *PLoS One*. 2017;12(1):e0171054.
81. Bruchova H, Yoon D, Agarwal AM, et al. Regulated expression of microRNAs in normal and polycythemia vera erythropoiesis. *Exp Hematol*. 2007;35(11):1657-1667.
82. Li Y, Bai H, Zhang Z, et al. The up-regulation of miR-199b-5p in erythroid differentiation is associated with GATA-1 and NF-E2. *Mol Cells*. 2014;37(3):213-219.
83. Zhang Y, Li L, Yu C, et al. miR-9 upregulation leads to inhibition of erythropoiesis by repressing FoxO3. *Sci Rep*. 2018;8(1):6519.
84. Jafari M, Ghadami E, Dadkhah T, et al. PI3k/AKT signaling pathway: Erythropoiesis and beyond. *J Cell Physiol*. 2019;234(3):2373-2385.
85. Zhang D, Cui Y, Li B, et al. A comparative study of the characterization of miR-155 in knockout mice. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173487.
86. Felli N, Pedini F, Romania P, et al. MicroRNA 223-dependent expression of LMO2 regulates normal erythropoiesis. *Haematologica*. 2009;94(4):479-486.
87. Wang Q, Huang Z, Xue H, et al. MicroRNA miR-24 inhibits erythropoiesis by targeting activin type I receptor ALK4. *Blood*. 2008;111(2):588-595.
88. Andolfo I, De Falco L, Ascì R, et al. Regulation of divalent metal transporter 1 (DMT1) non-IRE isoform by the microRNA Let-7d in erythroid cells. *Haematologica*. 2010;95(8):1244-1252.
89. Kim M, Tan YS, Cheng WC, et al. MIR144 and MIR451 regulate human erythropoiesis via RAB14. *Br J Haematol*. 2015;168(4):583-597.
90. Khandros E, Thom CS, D'Souza J, et al. Integrated protein quality-control pathways regulate free α -globin in murine β -thalassemia. *Blood*. 2012;119(22):5265-75.
91. Finch CA, Deubelbeiss K, Cook JD, et al. Ferrokinetics in man. *Medicine*. 1970;49(1):17-53.
92. Centis F, Tabellini L, Lucarelli G, et al. The importance of erythroid expansion in determining the extent of apoptosis in erythroid precursors in patients with beta-thalassemia major. *Blood*. 2000;96(10):3624-9.
93. Yuan J, Angelucci E, Lucarelli G, et al. Accelerated programmed cell death (apoptosis) in erythroid precursors of patients with severe beta-thalassemia (Cooley's anemia). *Blood*. 1993; 82(2):374-7.
94. Lacombe C, Da Silva JL, Bruneval P, et al. Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J Clin Invest*. 1988;81(2):620-3.
95. Chen JS, Lin KH, Wang ST, et al. Blunted serum erythropoietin response to anemia in patients polytransfused for beta-thalassemia major. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1998;20(2):140-4.
96. Ribeil JA, Arlet JB, Dussiot M, et al. Ineffective erythropoiesis in β -thalassemia. *Scientific World Journal*. 2013;2013:394295.

97. Mathias LA, Fisher TC, Zeng L, et al. Ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia major is due to apoptosis at the polychromatophilic normoblast stage. *Exp Hematol*. 2000;28(12):1343-53.
98. Angelucci E, Bai H, Centis F, et al. Enhanced macrophagic attack on beta-thalassemia major erythroid precursors. *Haematologica*. 2002;87(6):578-83.
99. Kuypers FA, de Jong K. The role of phosphatidylserine in recognition and removal of erythrocytes. *Cell Mol Biol*. 2004;50(2):147-58.
100. Shinar E, Rachmilewitz EA. Oxidative denaturation of red blood cells in thalassemia. *Semin Hematol*. 1990;27(1):70-82.
101. Hershko C, Konijn AM, Link G. Iron chelators for thalassaemia. *Br J Haematol*. 1998;101(3):399-406.
102. Lu W, Zhao M, Rajbhandary S. Free iron catalyzes oxidative damage to hematopoietic cells/mesenchymal stem cells in vitro and suppresses hematopoiesis in iron overload patients. *Eur J Haematol*. 2013;91(3):249-61.
103. Draptchinskaia N, Gustavsson P, Andersson B, et al. The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet*. 1999;21(2):169-75.
104. Narla A, Ebert BL. Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood*. 2010;115(16):3196-205.
105. Sankaran VG, Ghazvinian R, Do R, et al. Exome sequencing identifies GATA1 mutations resulting in Diamond-Blackfan anemia. *J Clin Invest*. 2012;122(7):2439-43.
106. Choessel V, Bacquerville D, Rouquette J, et al. Impaired ribosome biogenesis in Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. 2007;109(3):1275-83.
107. Vlachos A, Rosenberg PS, Aitsadftos E, et al. Incidence of neoplasia in Diamond Blackfan anemia: a report from the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Blood*. 2012;119(16):3815-9.
108. Golomb L, Volarevic S, Oren M. p53 and ribosome biogenesis stress: the essentials. *FEBS Lett*. 2014;588(16):2571-9.
109. Ohene-Abuakwa Y, Orfali KA, Marius C, et al. Two-phase culture in Diamond Blackfan anemia: localization of erythroid defect. *Blood*. 2005;105(2):838-46.
110. Moniz H, Gastou M, Leblanc T, et al. Primary hematopoietic cells from DBA patients with mutations in RPL11 and RPS19 genes exhibit distinct erythroid phenotype in vitro. *Cell Death Dis*. 2012;3:e356.
111. O'Brien KA, Farrar JE, Vlachos A, et al. Molecular convergence in ex vivo models of Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. 2017;129(23):3111-3120.
112. Gambale A, Iolascon A, Andolfo I, et al. Diagnosis and management of congenital dyserythropoietic anemias. *Expert Rev Hematol*. 2016;9(3):283-96.
113. Noy-Lotan S, Dgany O, Lahmi R, et al. Codanin-1, the protein encoded by the gene mutated in congenital dyserythropoietic anemia type I (CDAN1), is cell cycle-regulated. *Haematologica*. 2009;94(5):629-37.
114. Babbs C, Roberts NA, Sanchez-Pulido L, et al. Homozygous mutations in a predicted endonuclease are a novel cause of congenital dyserythropoietic anemia type I. *Haematologica*. 2013;98(9):1383-7.
115. Resnitzky P, Shaft D, Shalev H, et al. Morphological features of congenital dyserythropoietic anemia type I: The role of electron microscopy in diagnosis. *Eur J Haematol*. 2017;99(4):366-371.
116. Ask K, Jasencakova Z, Menard P, et al. Codanin-1, mutated in the anaemic disease CDAI, regulates Asf1 function in S-phase histone supply. *Embo J*. 2012;31(8):2013-202.
117. Schwarz K, Iolascon A, Verissimo F, et al. Mutations affecting the secretory COPII coat component SEC23B cause congenital dyserythropoietic anemia type II. *Nat Genet*. 2009;41(8):936-940.
118. Satchwell TJ1, Pellegrin S, Bianchi P, et al. Characteristic phenotypes associated with congenital dyserythropoietic anemia (type II) manifest at different stages of erythropoiesis. *Haematologica*. 2013;98(11):1788-96.
119. Iolascon A, Heimpel H, Wahlin A, et al. Congenital dyserythropoietic anemias: molecular insights and diagnostic approach. *Blood*. 2013;122(13):2162-6.
120. Bell AJ, Satchwell TJ, Heesom KJ, et al. Protein distribution during human erythroblast enucleation in vitro. *PLoS One*. 2013;8(4):e63000.
121. Waye JS, Eng B. Krüppel-like factor 1: hematologic phenotypes associated with KLF1 gene mutations. *Int J Lab Hematol*. 2015;37(S1):78-84.
122. Siatecka M, Bieker J. The multifunctional role of EKLF/KLF1 during erythropoiesis. *Blood*. 2011;118(8):2044-54.
123. Singleton BK, Burton NM, Green C, et al. Mutations in EKLF/KLF1 form the molecular basis of the rare blood group In(Lu) phenotype. *Blood*. 2008;112(5):2081-8.
124. de-la-Iglesia-Iñigo S, Moreno-Carralero MI, Lemes-Castellano A, et al. A case of congenital dyserythropoietic anemia type IV. *Clin Case Rep*. 2017;5(3):248-252.
125. Strupp C, Nachtkamp K, Hildebrandt B, et al. New proposals of the WHO working group (2016) for the diagnosis of myelodysplastic syndromes (MDS): Characteristics of refined MDS types. *Leuk Res*. 2017;57:78-84.
126. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-951.
127. Lefèvre C, Bondu S, Le Goff S, et al. Dyserythropoiesis of myelodysplastic syndromes. *Curr Opin Hematol*. 2017;24(3):191-197.
128. Kratz CP, Niemeier CM, Karow A, et al. Congenital transfusion-dependent anemia and thrombocytopenia with myelodysplasia due to a recurrent GATA1(G208R) germline mutation. *Leukemia*. 2008;22(2):432-4.
129. Xu Y, Li Y, Xu Q. Implications of mutational spectrum in myelodysplastic syndromes based on targeted next-generation sequencing. *Oncotarget*. 2017;8(47):82475-82490.
130. Ribeil J-A, Zermati Y, Vandekerckhove J, et al. Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*. 2007;445(7123):102-105.
131. Frisan E, Vandekerckhove J, de Thonel A, et al. Defective nuclear localization of Hsp70 is associated with dyserythropoiesis and GATA-1 cleavage in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;119(6):1532-154.
132. Ebert BL, Pretz J, Bosco J, et al. Identification of RPS14 as a 5q syndrome gene by RNA interference screen. *Nature*. 2008;451(7176):335-339.
133. Schneider RK, Schenone M, Ferreira MV, et al. Rps14 haploinsufficiency causes a block in erythroid differentiation mediated by S100A8 and S100A9. *Nat Med*. 2016;22(3):288-297.
134. Chen X, Eksioglu EA, Zhou J, et al. Induction of myelodysplasia by myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest*. 2013;123(11):4595-4611.
135. Meyer SE. Splicing together the origins of MDS-RS. *Blood*. 2017;130(7):841-842.
136. Chesnais V, Kosmider O, Damm F, et al. Spliceosome mutations in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. *Oncotarget*. 2012;3(11):1284-1293.
137. Damm F, Kosmider O, Gelsi-Boyer V, et al. Mutations affecting mRNA splicing define distinct clinical phenotypes and correlate with patient outcome in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;119(14):3211-3218.
138. Obeng EA, Chappell RJ, Seiler M, et al. Physiologic expression of Sf3b1(K700E) causes impaired erythropoiesis, aberrant splicing, and sensitivity to therapeutic spliceosome modulation. *Cancer Cell*. 2016;30(3):404-417.
139. Dolatshad H, Pellagatti A, Liberante FG, et al. Cryptic splicing events in the iron transporter ABCB7 and other key target genes in SF3B1-mutant myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2016;30(12):2322-2331.
140. Gentien D, Kosmider O, Nguyen-Khac F, et al. A common alternative splicing signature is associated with SF3B1 mutations in malignancies from different cell lineages. *Leukemia*. 2014;28(6):1355-1357.

141. Protasova MS, Grigorenko AP, Tyazhelova TV, et al. Whole-genome sequencing identifies a novel ABCB7 gene mutation for X-linked congenital cerebellar ataxia in a large family of Mongolian ancestry. *Eur J Hum Genet.* 2016;24(4):550-5.
142. Narla A, Dutt S, McAuley JR, et al. Dexamethasone and lenalidomide have distinct functional effects on erythropoiesis. *Blood.* 2011;118(8):2296-2304.
143. Ebert BL, Lee MM, Pretz JL, et al. An RNA interference model of RPS19 deficiency in Diamond-Blackfan anemia recapitulates defective hematopoiesis and rescue by dexamethasone: identification of dexamethasone-responsive genes by microarray. *Blood.* 2005;105(12):4620-6.
144. Sjögren SE, Siva K, Soneji S, et al. Glucocorticoids improve erythroid progenitor maintenance and dampen Tip53 response in a mouse model of Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol.* 2015;171(4):517-29.
145. Doulatov S, Vo LT, Macari ER, et al. Drug discovery for Diamond-Blackfan anemia using reprogrammed hematopoietic progenitors. *Sci Transl Med.* 2017;9(376).
146. Tian Y, Bustos V, Flajolet M, et al. A small-molecule enhancer of autophagy decreases levels of Abeta and APP-CTF via Atg5-dependent autophagy pathway. *FASEB J.* 2011;25(6):1934-42.
147. Lavabre-Bertrand T, Blanc P, Navarro R, et al. alpha-Interferon therapy for congenital dyserythropoiesis type I. *Br J Haematol.* 1995;89(4):929-32.
148. Lavabre-Bertrand T, Ramos J, Delfour C, et al. Long-term alpha interferon treatment is effective on anaemia and significantly reduces iron overload in congenital dyserythropoiesis type I. *Eur J Haematol.* 2004;73(5):380-3.
149. Salihoglu A, Elverdi T, Eskazan AE, et al. Congenital Dyserythropoietic Anemia Type I: Report of One Patient and Analysis of Previously Reported Patients Treated with Interferon Alpha. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2016;32(S1):272-7.
150. Agrigento V, Barone R, Schafani S, et al. Response to Alpha-Interferon Treatment of the Congenital Dyserythropoietic Anemia type I in Two Sicilian Beta Thalassemia Carriers. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2017;33(4):621-623.
151. Ruckle J, Jacobs M, Kramer W, et al. Single-dose, randomized, double-blind, placebo-controlled study of ACE-011 (ActRIIA-IgG1) in postmenopausal women. *J. Bone Miner. Res.* 2009; 24(4):744-752.
152. Iancu-Rubin C, Mosoyan G, Wang J, et al. Stromal cell-mediated inhibition of erythropoiesis can be attenuated by Sotatercept (ACE-011), an activin receptor type II ligand trap. *Exp Hematol.* 2013;41(2):155-166.
153. Carrancio S, Markovics J, Wong P, et al. An activin receptor IIA ligand trap promotes erythropoiesis resulting in a rapid induction of red blood cells and haemoglobin. *Br J Haematol.* 2014;165(6):870-82.
154. Ear J, Huang H, Wilson T, et al. RAP-011 improves erythropoiesis in zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia through antagonizing lefty1. *Blood.* 2015;126(7):880-90.
155. Dussiot M, Maciel TT, Fricot A, et al. An activin receptor IIA ligand trap corrects ineffective erythropoiesis in β -thalassemia. *Nat Med.* 2014;20(4):398-407.
156. Cappellini MD, Porter J, Origa R, et al. Sotatercept, a novel transforming growth factor beta ligand trap, improves anemia in beta-thalassemia: a phase 2, open-label, dose-finding study. *Haematologica.* 2019;104(3):477-484.
157. Suragani RN, Cadena SM, Cawley SM, et al. Transforming growth factor- β superfamily ligand trap ACE-536 corrects anemia by promoting late-stage erythropoiesis. *Nat Med.* 2014;20(4):408-14.
158. Platzbecker U, Germing U, Götze KS, et al. Luspatercept for the treatment of anaemia in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes (PACE-MDS): a multicentre, open-label phase 2 dose-finding study with long-term extension study. *Lancet Oncol.* 2017;18(10):1338-1347.



Echinociti al ME a scansione (Archivio di G. Lambertenghi Delilieri).

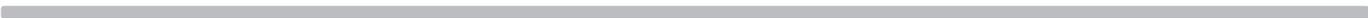
Parole Chiave

Eritropoiesi, globuli rossi, anemie, talassemie, diseritropoiesi.

Indirizzi per la corrispondenza

Achille Iolascon

Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche,
Università Federico II di Napoli, Napoli; Italia
E-mail: achille.iolascon@unina.it; tel:



Sindromi mielodisplastiche a basso rischio



Matteo G. Della Porta, Marta Ubezio, Lucio Morabito, Marianna Rossi, Erica Travaglio

Humanitas Cancer Center & Humanitas University, 20089 Rozzano, Milano

Introduzione

Le sindromi mielodisplastiche (SMD) sono un gruppo di disordini della cellula staminale emopoietica, classificati fra le neoplasie mieloidi, caratterizzati dalla presenza di ematopoiesi displastica, citopenia di una o più filiere nel sangue periferico e aumentato rischio di evoluzione leucemica⁽¹⁾. L'incidenza di questa condizione è all'incirca di 5 casi su 100.000 persone per anno nella popolazione generale, ma aumenta fino a 50 casi su 100.000 persone per anno dopo i 60 anni di età. L'età mediana alla diagnosi è attorno ai 70 anni con una predominanza del sesso maschile. Questo significa che nella popolazione italiana sono attese circa 3.000 diagnosi di SMD per anno; a causa del progressivo invecchiamento della popolazione l'incidenza di queste patologie è in aumento. L'incidenza potrebbe essere addirittura più elevata di quella riportata dai registri internazionali se si considera che molti casi sfuggono alla diagnosi a causa della sintomatologia sfumata o della non candidabilità del paziente all'esecuzione di un aspirato midollare⁽¹⁾. Le SMD sono caratterizzate da un andamento clinico estremamente eterogeneo da paziente a paziente. A questa variabilità clinica corrisponde una eterogeneità biologica in termini di mutazioni genetiche che interessano diverse vie metaboliche essenziali per la regolazione della vita cellulare⁽²⁾. Alla diagnosi, circa il 60-70% dei pazienti presenta una malattia a basso rischio secondo gli score prognostici attualmente in uso⁽³⁻⁵⁾. La caratteristica clinica principale di questi pazienti è rappresentata dall'anemia, spesso severa (ovvero che necessita di regolare fabbisogno trasfusionale): secondo i dati del registro europeo (EUMDS) oltre il 50% delle SMD a basso rischio riceve trasfusioni di globuli rossi entro 2 anni dalla diagnosi. Data la stabilità della malattia nei pazienti con basso rischio di evoluzione acuta, l'anemia e il supporto trasfusionale incidono in modo significativo sulla morbilità e mortalità dei pazienti (oltre in termini di qualità di vita e costi sociali)^(6,7).

Prevalenza e conseguenze cliniche dell'anemia

Nei pazienti con SMD, la presenza di anemia severa (trasfusione-dipendente) ha un effetto importante sulla probabilità di sopravvi-

venza. In uno studio su 374 pazienti con SMD, la comparsa di una necessità trasfusionale regolare è risultata associata ad una probabilità significativamente più bassa di sopravvivenza^(3,7).

Diversi meccanismi possono spiegare l'impatto negativo indipendente dell'anemia severa sull'outcome clinico dei pazienti con SMD. In primo luogo, la severità dell'anemia probabilmente riflette una maggiore severità della malattia in termini biologici (ovvero i pazienti con anemia trasfusione-dipendente evolvono in percentuale più elevata e in tempi più brevi in leucemia acuta mieloide (LMA) rispetto ai soggetti con anemia non severa). In secondo luogo, l'anemia cronica è associata ad una maggiore mortalità e morbilità di per sé nella popolazione generale, soprattutto negli anziani e nei pazienti con malattia cardiaca preesistente. Infine, la trasfusione-dipendenza impatta sulla morbilità e mortalità per gli effetti del sovraccarico di ferro secondario⁽⁸⁾.

In ragione del significato prognostico indipendente, il concetto di anemia severa trasfusione-dipendente è stato progressivamente integrato negli score prognostici di uso clinico in queste patologie. Il primo esempio in questo senso è rappresentato dal WHO *classification-based Prognostic Scoring System* (WPSS). Sulla base della classificazione WHO e della trasfusione-dipendenza, è stato definito un sistema di punteggio prognostico che è in grado di classificare i pazienti con SMD in cinque gruppi di rischio⁽⁹⁾.

Nel tempo, l'uso della trasfusione-dipendenza è stato criticato come criterio troppo soggettivo per definire la gravità dell'anemia. Per ovviare a questa limitazione, nel 2011 è stata integrata nello score WPSS una definizione di anemia severa maggiormente oggettiva, basata sulle soglie di emoglobina (ossia <9g/dl nei maschi e <8g/dl nelle femmine)⁽⁷⁾.

Più recentemente, il gruppo di lavoro internazionale per la prognosi delle SMD (IWG-PM) ha rivisto lo score convenzionale (*International Prognostic Scoring System*, IPSS), sulla base dei risultati dell'analisi di una coorte multicentrica molto ampia di pazienti trattati con terapia di supporto. Nello score *IPSS-revised* (IPSS-R, Tabella 1), sono stati determinati 5 nuovi gruppi di rischio citogenetico, insieme a categorie ridefinite riguardo alla percentuale di blasti del midollo osseo e a citopenie del sangue periferico stratificate in livelli di severità crescente⁽⁵⁾.

La migliore definizione del peso prognostico dell'anemia nello score, assieme ad una più accurata definizione delle implicazioni cliniche di anomalie citogenetiche ricorrenti, consente una definizione più accurata della prognosi dei singoli pazienti con SMD, in particolare quelli nelle fasi di malattia più precoci. Questi dati dimostrano che l'implementazione clinica degli score che includono la valutazione della presenza di anemia severa migliora il processo clinico decisionale a livello individuale. Per questi motivi, l'IPSS-R è stato recentemente incorporato nell'ambito di linee guida terapeutiche e nelle nuove sperimentazioni cliniche.

Nelle SMD, la malattia cardiovascolare è una causa prevalente di mortalità non leucemica ed è strettamente associata alla severità dell'anemia (7,8). I meccanismi di adattamento cardiovascolare all'anemia comprendono una riduzione del post-carico e un aumento del precarico cardiaco. Con la persistenza di questi compensi fisiopatologici, il cuore risponde con un cambiamento di geometria cardiaca (rimodellamento), dapprima con ipertrofia ventricolare sinistra e, in casi gravi, con lo scompenso cardiaco (10). Da un punto di vista clinico generale, i pazienti trasfusione-dipendenti hanno un rischio di scompenso cardiaco e una mortalità 2 volte superiore rispetto ai pazienti non trasfusione-dipendenti (7).

Tenendo presente che quasi tutti i pazienti affetti da SMD presentano anemia nel corso della malattia, la terapia di supporto trasfusionale, da sola o associata ad altri trattamenti, rimane tra i

provvedimenti più diffusi e di maggiore importanza (3).

Scopo della terapia trasfusionale è mantenere o migliorare la qualità della vita (*quality of life*, QoL) e prevenire la morbilità e la mortalità associate alla citopenia severa. La decisione di effettuare una trasfusione di emazie concentrate nel paziente affetto da SMD è basata sulla concentrazione dell'emoglobina e sulle condizioni cliniche del paziente (3). Sebbene le trasfusioni di emazie concentrate siano la terapia di elezione del trattamento dell'anemia severa, tale terapia induce un sovraccarico di ferro secondario, che può a sua volta rappresentare una causa di morbilità (11). Nell'uomo fisiologicamente mancano i meccanismi di escrezione del ferro in eccesso, che quindi tende ad accumularsi nei tessuti. Ogni unità di emazie concentrate contiene 200-250 mg di ferro, per cui un paziente affetto da SMD che riceve 2-4 unità di emazie concentrate al mese riceve 0,3-0,6 mg/kg di ferro al giorno. Così, una volta che la quantità di ferro nel corpo supera i livelli normali di immagazzinamento, possono verificarsi danni funzionali e strutturali epatici, endocrini (diabete mellito) e cardiaci. Oltre al sovraccarico associato alla trasfusione, alcuni pazienti con SMD presentano livelli elevati di ferritina anche se non hanno mai ricevuto trasfusioni di emazie, situazione questa che indica un alterato metabolismo del ferro (l'eritropoiesi inefficace nei pazienti affetti da SMD è associata a livelli ridotti di epcidina, con conseguente aumento dell'assorbimento intestinale del ferro) (11).

Variabili	Score						
	0	0,5	1	1,5	2	3	≥ 4
Cariotipo*	Moito favorevole		Favorevole		Intermedio	Sfavorevole	Moito sfavorevole
Blasti (%)	0-2	-	3-4	-	5-10	> 10	-
Emoglobina	≥ 10		8-9	< 8	-	-	-
Piastrine	≥ 100	50-99	< 50	-	-	-	-
ANC	≥ 0,8	< 0,8	-	-	-	-	-
GRUPPI DI RISCHIO SCORE ≤1,5 = Moito basso (mediana di sopravvivenza 9,3 anni - rischio di evoluzione leucemica raro) SCORE 2-3 = Basso (mediana di sopravvivenza 6,3 anni - rischio leucemica del 25% a 10,8 anni) SCORE 4-4,5 = Intermedio (mediana di sopravvivenza 3,3 anni - rischio leucemica del 25% a 3,2 anni) SCORE 5-6 = Alto (mediana di sopravvivenza 1,2 anni - rischio leucemica del 25% a 1,4 anni) SCORE >6 = Moito alto (mediana di sopravvivenza 0,6 anni - rischio leucemica del 25% a 0,7 anni)							
* Moito favorevole: -Y, del(11q); * Favorevole: normale, del(5q), del(12), del(20q), doppia alterazione che include del(5q); * Intermedio: del(7q), +8, +17, i(17q), altre anomalie; * Sfavorevole: cariotipo complesso (3 anomalie), doppia alterazione che include -7/del(7q); 7, inv(3)/t(3q)/del(3q); * Moito sfavorevole: cariotipo (>3 anomalie).							

Tabella 1 - Score IPSS-revised.

Fisiopatologia dell'eritropoiesi inefficace

SMD con del5q

Nell'ambito delle SMD, un sottogruppo di pazienti presenta una delezione isolata del cromosoma 5 (del5q) e caratteristiche peculiari, ovvero una grave anemia macrocitica, una conta piastrinica normale o elevata (con megacariociti ipolobati) e un basso rischio di progressione leucemica⁽¹²⁾.

Il primo passo verso la chiarificazione del meccanismo dell'eritropoiesi inefficace nella SMD associata a del5q è stato la definizione di una regione comune deleta (CDR) del braccio lungo del cromosoma 5 (che contiene circa 40 geni), presente in tutti i pazienti. Tale delezione eterozigote è sufficiente ad indurre il fenotipo clinico⁽¹³⁾. Il gene RPS14 (che codifica per un componente della subunità 40S dei ribosomi) è collocato nella CDR ed è stato identificato come un gene critico nell'induzione di anemia nella sindrome da 5q-, attraverso un blocco significativo della differenziazione eritroide⁽¹⁴⁾. Mutazioni eterozigosi-inattivanti sono state descritte in una sindrome congenita, l'anemia di Diamond-Blackfan (DBA) caratterizzata da una grave anemia macrocitica, analoga a quella che si riscontra nella sindrome da 5q-. Circa il 25% dei casi di DBA ha mutazioni nel gene RPS19 (che codifica per un componente diverso della subunità 40S dei ribosomi)⁽¹⁵⁾.

In conclusione, l'aploinsufficienza di geni ribosomali è fortemente coinvolta nella patogenesi dell'eritropoiesi inefficace nelle SMD con del5q e nella DBA. L'espressione diminuita di RPS14 e RPS19 provoca un drastico aumento dei livelli totali di p53 nelle cellule eritroidi, con arresto del ciclo cellulare e induzione dell'apoptosi. In modelli sperimentali, questa condizione è associata alla comparsa fenotipica di anemia macrocitica^(16,17).

La lenalidomide, analogo più potente e meno tossico della talidomide, dotata in test preclinici di importanti effetti immunomodulatori, anti-infiammatori e anti-angiogenetici ha rivelato sin dal primo studio clinico di fase II un'inattesa efficacia nelle SMD, con particolare riferimento al gruppo con anomalia 5q- (risposta globale dell'83% con il 75% di risposte citogenetiche complete)⁽¹⁸⁾. Questa prima osservazione è stata subito seguita da studi di fase III che hanno confermato questi dati estremamente rilevanti dal punto di vista clinico (67% di risposte eritroidi nello studio SMD-003 e 56% nello studio SMD-004)^(19,20).

Dati più recenti hanno fornito informazioni sul perché lenalidomide mostra una efficacia specifica nei pazienti con SMD e del5q. In particolare, studi sperimentali hanno mostrato che lenalidomide induce l'ubiquitinazione della caseina chinasi 1A1 (CK1 α) con conseguente degradazione. CK1 α è codificata da un gene all'interno della CDR sul braccio lungo del cromosoma 5 e la sua aploinsufficienza sensibilizza le cellule 5q- al trattamento con il farmaco.⁽²¹⁾ Anche se lenalidomide può colpire selettivamente i cloni del5q, non è un trattamento curativo; circa il 50% dei pazienti ha infatti una recidiva clinica e citogenetica entro 2-3 anni di trattamento. Nei pazienti che ricadono, si pensa che queste cellule staminali resistenti

si espandano, ripopolando in modo dominante il compartimento dei progenitori emopoietici. Il preciso meccanismo molecolare sottostante alla resistenza acquisita a lenalidomide non è stato completamente chiarito, ma sembra essere associato alla presenza di un clone con mutazione del gene TP53 (che codifica per la proteina p53), già presente in una fase precoce di malattia in quasi un quinto dei pazienti SMD con del5q. Queste mutazioni sono associate ad una prognosi più severa con un aumento del rischio di evoluzione leucemica e una ridotta probabilità di risposta a lenalidomide⁽²²⁾.

SMD con mutazione del gene SF3B1

Per alcune SMD con citopenia isolata, lieve, con blasti midollari <5% e con cariotipo normale, la diagnosi differenziale con altre patologie non neoplastiche diventa difficile. Una componente essenziale della definizione di SMD è la dimostrazione della natura clonale dell'eritropoiesi mielodisplastica⁽²³⁾. Con tecniche di citogenetica convenzionale una anomalia cromosomica clonale è identificabile in meno della metà dei pazienti con SMD. In uno studio estremamente rilevante, Walter et al.⁽²⁴⁾ hanno eseguito un sequenziamento completo del genoma per identificare mutazioni somatiche ricorrenti in campioni di midollo osseo di pazienti con LMA secondaria a SMD (in cui erano disponibili cellule midollari nella fase SMD e nella fase leucemica acuta). Circa il 90% delle cellule del midollo osseo è risultato clonale in questi pazienti, già nella fase di SMD. Questo studio formalmente ha dimostrato che quasi tutte le cellule delle linee cellulari mieloidi del midollo osseo (cioè cellule eritroidi immature, precursori granulocitari/monocitari e megacariociti) sono derivate clonalmente da uno stesso progenitore nei pazienti SMD sin dal momento della diagnosi. Una volta che il clone mielodisplastico è diventato completamente dominante nel midollo osseo, la malattia può o meno apparire clinicamente evidente. Ad esempio, una mutazione somatica del gene SF3B1 sembra essere in grado di causare un fenotipo clinico di per sé (SMD con sideroblasti ad anello), mentre una mutazione del gene TET2 può determinare ematopoiesi clonale senza manifestazioni ematologiche, suggerendo che potrebbero essere necessari altri geni mutanti che collaborino nell'induzione di un fenotipo ematologico clinicamente evidente⁽²⁵⁻²⁸⁾. Mutazioni nei geni coinvolti nel processo di *splicing* dell'RNA si trovano in oltre il 50% dei pazienti con SMD. L'osservazione che le mutazioni dello spliceosoma sono principalmente mutazioni fondanti associate a diversi fenotipi clinici ha portato a ipotizzare che esse possano dare luogo a cloni con predestinazione genetica diversa. Le mutazioni somatiche del gene SF3B1 si trovano quasi esclusivamente nei pazienti con SMD con sideroblasti ad anello (cellule eritroidi con accumulo di ferro mitocondriale), caratterizzati da una buona prognosi e un basso rischio di evoluzione leucemica. Altre mutazioni dello spliceosoma indicano, invece, una prognosi severa. Le mutazioni del gene SRSF2 si trovano principalmente nei pazienti con displasia multilineare e/o eccesso di blasti e, a differenza delle mutazioni di SF3B1, si associano ad un elevato rischio di evoluzione leucemica e ridotta sopravvivenza. Mutazioni di SRSF2 sono state rilevate in circa un quinto dei casi di LMA secondaria ad altra

neoplasia mieloide e nel 40-50% dei pazienti con leucemia mielomonocitica cronica. Mutazioni di U2AF1, riportate in vari sottotipi SMD, sono ritenute predittive di un elevato rischio di evoluzione leucemica e breve sopravvivenza ⁽²⁵⁻²⁸⁾.

Nelle SMD a basso rischio, l'obiettivo principale della terapia è la riduzione dell'anemia e dei sintomi ad essa correlati ⁽³⁾. I fattori di stimolazione dell'eritropoiesi [eritropoietina (EPO) ricombinante, darbepoetina] possono contribuire ad innalzare i livelli di emoglobina, inducendo per periodi significativi un miglioramento della qualità di vita nei casi non ancora trasfusione-dipendenti e per alcuni pazienti trasfusione-dipendenti possono ridurre o anche abolire la dipendenza trasfusionale ⁽³⁾. Pur non essendoci ancora risultati da studi prospettici, dati retrospettivi di elevata qualità mostrano come l'incremento dei valori di emoglobine e/o riduzione o abolizione della dipendenza trasfusionale, si possono associare ad aumento della aspettativa di vita. I dati degli studi di fase II disponibili non consentono di dimostrare la superiorità di una delle diverse molecole di ESA sulle altre, così come non sembrano emergere sicure differenze di risposta tra ESA da soli o associati ai fattori di crescita mieloidi G-CSF o GM-CSF. Dosi settimanali di 40.000 UI di EPO o di 30.000 UI di EPO o 150 µg di darbepoetina costituiscono la dose standard di attacco della terapia, anche se numerosi lavori suggeriscono che dosaggi più elevati (60-80.000 UI di EPO e 300 µg di darbepoetina) possono indurre una percentuale superiore di risposte. La presenza di un basso numero di blasti midollari con appartenenza a uno score IPSS basso o int-1, uno scarso o assente fabbisogno trasfusionale e livelli di EPO endogena <500 UI sono fattori favorevoli alla risposta agli ESA ⁽³⁾.

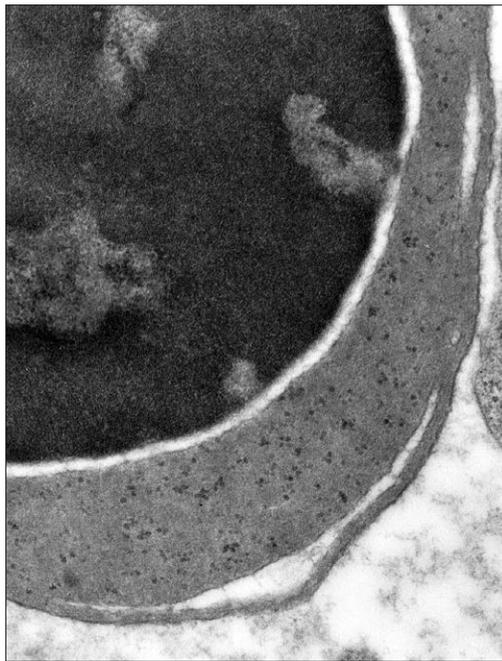
Globalmente tuttavia, se si considera l'intera popolazione dei pazienti con SMD a basso rischio, gli ESA inducono un beneficio clinico in circa 1 paziente su 3 ⁽³⁾. Rimane quindi un grosso *unmet clinical need* nel trattamento dell'anemia nelle SMD. In questo contesto, recentemente una nuova categoria di farmaci inibitori del *pathway* TGF-β, ha mostrato all'interno di studi clinici di fase I-II risultati estremamente promettenti nel trattamento dell'anemia da eritropoiesi inefficace nelle SMD ⁽²⁹⁻³⁰⁾. Il meccanismo di azione di questi farmaci è totalmente indipendente dall'eritropoietina (gli ESA agiscono stimolando attraverso un segnale anti-apoptotico i precursori eritroidi precoci, mentre i farmaci inibitori TGF-β agiscono nelle fasi terminali della differenziazione eritroide) e da questo deriva la possibilità di risposta anche in soggetti che hanno fallito precedentemente una terapia con ESA. Inoltre, così come lenalidomide è particolarmente efficace nei soggetti con del5q, il farmaco capostipite di questa nuova categoria di composti, luspatercept ha mostrato un tropismo selettivo per i pazienti con anemia sideroblastica (in particolare in presenza della mutazione SF3B1, associata ad una probabilità di risposta >60%) ^(29,30).

Le SMD a basso rischio, quindi, si stanno rivelando un campo elettivo per lo sviluppo di programmi di medicina personalizzata. In un prossimo futuro a breve termine, ci aspettiamo che lo screening mutazionale del paziente orienti la scelta terapeutica individuale nel trattamento dell'anemia verso il farmaco con maggiori probabilità di risposta (lenalidomide vs. ESA vs. luspatercept), con conseguente incremento globale della qualità ed aspettativa di vita dei pazienti e maggiore razionalizzazione ed appropriatezza nell'utilizzo delle risorse del sistema sanitario.

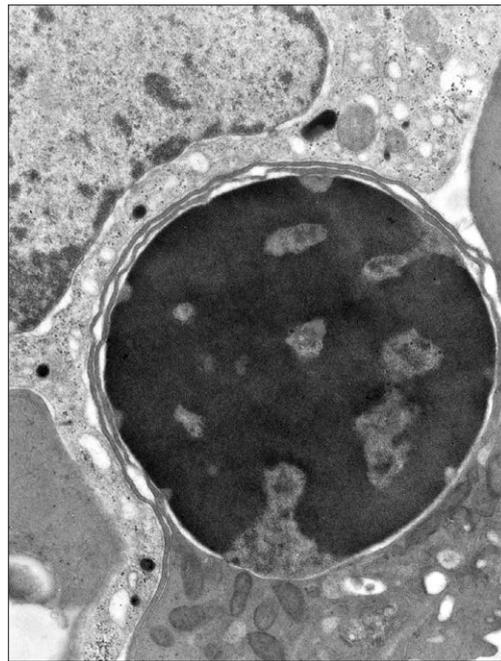
Bibliografia

1. Adès L, Itzykson R, Fenaux P. Myelodysplastic syndrome. *Lancet*. 2014;383(9936):2239-2252.
2. Cazzola M, Della Porta MG, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood*. 2013;122(25):4021-4034.
3. Malcovati L, Hellstrom-Lindberg E, Bowen D, et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood*. 2013;122(17):2943-2964.
4. Greenberg PL, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997;89(6):2079-2088.
5. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;120(12):2454-2465.
6. De Swart L, Smith A, Johnston TW, et al. Validation of the revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes: a report from the prospective European LeukemiaNet MDS (EUMDS) registry. *Br J Haematol*. 2015;170(3):372-383.
7. Malcovati L, Della Porta MG, Strupp C, et al. Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS). *Haematologica*. 2011;96(10):1433-1440.
8. Malcovati L, Della Porta M, Pascutto C, et al. Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria. A basis for clinical decision-making. *J Clin Oncol*. 2005;23(30):7594-7603.
9. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2007;25(23):3503-3510.
10. Oliva EN, Dimitrov BD, Benedetto F, et al. Hemoglobin level threshold for cardiac remodeling and quality of life in myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*. 2005;29(10):1217-1219.
11. Angelucci E, Urru SAM, Pilo F, et al. Myelodysplastic syndromes and iron chelation therapy. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2017;9(1):e2017021.
12. Van den Berghe H, Cassiman JJ, David G, et al. Distinct haematological disorder with deletion of long arm of no. 5 chromosome. *Nature*. 1974;251(5474):437-438.
13. Boulwood J, Fidler C, Lewis S, et al. Molecular mapping of uncharacteristically small 5q deletions in two patients with the 5q syndrome: delineation of the critical region on 5q and identification of a 5q-breakpoint. *Genomics*. 1994;19(3):425-432.
14. Ebert BL, Pretz J, Bosco J, et al. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature*. 2008;451(7176):335-339.
15. Draptchinskaia N, Gustavsson P, Andersson B, et al. The gene encoding

- ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfananaemia. *Nat Genet.* 1999;21(2):169-175.
16. Narla A, Ebert BL. Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood.* 2010;115(16):3196-3205.
 17. Barlow JL, Drynan LF, Hewett DR, et al. A p53-dependent mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q- syndrome. *Nat Med.* 2009;16(1):59-66.
 18. List A, Kurtin S, Roe DJ, et al. Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med.* 2005;352(6):549-557.
 19. List A, Dewald G, Bennett J, et al. ; Myelodysplastic Syndrome-003 Study Investigators. Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N Engl J Med.* 2006;355(14):1456-1465.
 20. Fenaux P, Giagounidis A, Selleslag D, et al. ; MDS-004 Lenalidomide del5q Study Group. A randomized phase 3 study of lenalidomide versus placebo in RBC transfusion-dependent patients with Low-/Intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with del5q. *Blood.* 2011;118(14):3765-3776.
 21. Krönke J, Fink EC, Hollenbach PW, et al. Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1 α in del(5q) MDS. *Nature.* 2015;523(7559):183-188.
 22. Jädersten M, Saft L, Smith A, et al. TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J Clin Oncol.* 2011;29(15):1971-1979.
 23. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391-2340.
 24. Walter MJ, Shen D, Ding L, et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2012;366(12):1090-1098.
 25. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med.* 2011;365(15):1384-1395.
 26. Kennedy JA, Ebert BL. Clinical implications of genetic mutations in myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol.* 2017;35(9):968-997.
 27. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature.* 2011;478(7367):64-69.
 28. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2013;122(22):3616-3627.
 29. Fenaux P, Kiladjian JJ, Platzbecker U. Luspatercept for the treatment of anemia in myelodysplastic syndromes (MDS) and primary myelofibrosis (PMF). *Blood.* 2019;133(8):790-794.
 30. Platzbecker U, Germing U, Götze KS, et al. Luspatercept for the treatment of anaemia in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes (PACE-MDS): a multicentre, open-label phase 2 dose-finding study with long-term extension study. *Lancet Oncol.* 2017;18(1):1338-1347.



Anemia Diseritropietica Congenita: eritroblasto con alterazioni della membrana citoplasmatica e della cromatina nucleare al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Delilieri).



Anemia Diseritropietica Congenita: fagocitosi di eritroblasto con alterazioni della membrana citoplasmatica e della cromatina nucleare al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Delilieri).

Parole Chiave

Eritropoiesi inefficace, rischio citogenetico, anemia, terapia trasfusionale.

Indirizzi per la corrispondenza

Matteo G Della Porta
 Humanitas Cancer Center & Humanitas University
 Via Manzoni 56
 20089 Rozzano MILANO
 Tel +39 02 8224 7668
 Mail: matteo.della_porta@hunimed.eu



Emoglobinuria parossistica notturna



Francesco Lanza

UO Ematologia, Ospedali di Ravenna, Lugo e Faenza - Rete Trapianti CSE Metropolitana della Romagna

Introduzione

L'emoglobinuria parossistica notturna (EPN) è un raro disordine ematologico di tipo acquisito derivante dall'espansione clonale non maligna di una o più cellule staminali emopoietiche che hanno subito una mutazione a carico del gene PIG-A che si manifesta clinicamente con emolisi intravascolare acuta e cronica, elevata incidenza di eventi trombo-embolici prevalentemente venosi e un grado variabile di insufficienza midollare con possibili citopenie periferiche. L'età media di insorgenza della patologia è compresa tra i 20 ed i 40 anni, ma occasionalmente può essere riscontrata in età infantile o adulta-senile⁽¹⁻⁵⁾. È una patologia rara con una incidenza di 1-5 casi per milione di abitanti per anno; colpisce entrambi i sessi. In questi ultimi 10-20 anni, questa malattia ha suscitato un interesse crescente da parte dei ricercatori e clinici per una serie di motivi di ordine clinico e biologico: in *primis* la disponibilità di un esame diagnostico di laboratorio basato su un test di tipo citofluorimetrico per la sua identificazione; secondariamente per la recente commercializzazione di una terapia specifica e altamente efficace, basata sull'impiego di un anticorpo monoclonale anti-complemento, e infine per gli interessanti sviluppi di tipo biologico che ne hanno reso un modello di patologia di estremo interesse per gli scienziati che operano nel settore emopoietico^(2,4-7).

Un quadro clinico assimilabile a EPN è stato per la prima volta osservato già alla fine dell'800, e nello stesso periodo è stata ipotizzata una abnorme suscettibilità dei globuli rossi (GR) alla lisi in ambiente acido, specie durante le ore notturne a causa dell'accumulo di anidride carbonica nel sangue. Sulla base di questa osservazione, nel 1937 Thomas Ham ha messo a punto il test, che tutt'ora porta il suo nome, in grado di evidenziare una maggiore suscettibilità litica delle emazie di soggetti con EPN dopo esposizione al siero acidificato; ciò non avveniva nei GR normali. Circa a metà del '900 è stato scoperto il complemento, un complesso sistema di proteine dell'immunità naturale, che provoca la neutralizzazione e la lisi degli agenti infettivi, ma non delle cellule normali del proprio organismo. Nel 1966, Rosse e Dacie hanno dimostrato la maggior suscettibilità dei GR di

pazienti con EPN alla lisi del complemento ed hanno osservato che in questi pazienti è inoltre presente un mosaicismo di cellule normali e cellule patologiche⁽⁷⁾. Nel 1970 il gruppo di Luzzato ha dimostrato la clonalità della malattia; le cellule patologiche dell'EPN infatti derivano dalla proliferazione di una comune cellula emopoietica progenitrice portatrice del danno genetico somatico che si riverbera su tutta la progenie ematopoietica (globuli rossi, globuli bianchi e piastrine)⁽¹⁻²⁾.

Patogenesi

Nel 1993 Kinoshita e Takeda⁽¹⁾ hanno identificato per la prima volta una mutazione genetica specifica della malattia EPN, risultata responsabile dei difetti di sintesi delle molecole di tipo GPI. Si tratta di mutazioni somatiche (acquisite) presenti sul cromosoma X, all'interno di un gene noto come PIG-A (Figura 1)^(2,3). La mutazione genica caratteristica della malattia EPN determina la scomparsa di alcune glicoproteine di membrana sulla superficie cellulare che causano delle alterazioni metaboliche e biochimiche responsabili dei sintomi di malattia. In dettaglio, la proteina codificata dal gene PIG-A è rappresentata da un enzima, glicosiltransferasi, che catalizza la sintesi della proteina glicosilfosfatidil-inositolo (GPI), la quale funge da àncora per numerose glicoproteine di membrana (denominate GPI *linked*) nei precursori midollari e a cascata nei diversi citotipi ematici delle diverse filiere ematopoietiche^(3,4). Come conseguenza delle mutazioni a carico di PIG-A, le cellule staminali mutate e tutta la loro progenie mostrano carenze più o meno marcate nell'espressione di tali proteine GPI-*linked*, proporzionali al grado di deficit enzimatico causato dalla mutazione del gene PIG-A (Figura 2).

La manifestazione clinica peculiare in corso di EPN, ovvero lo stato emolitico intravascolare cronico con possibili acuzie, è dovuto alla carenza di due proteine GPI-*linked* presenti sulla membrana eritrocitaria, denominate CD55 (CD=cluster di differenziazione) e CD59, che le rendono particolarmente suscettibili all'azione litica esercitata dal complemento. Il CD55 (o fattore di accelerazione del decadimento) previene la formazione del fattore C3-convertasi del complemento e ne aumenta l'instabilità; il CD59 (o inibitore di membrana della lisi reattiva) inibisce invece la formazione del

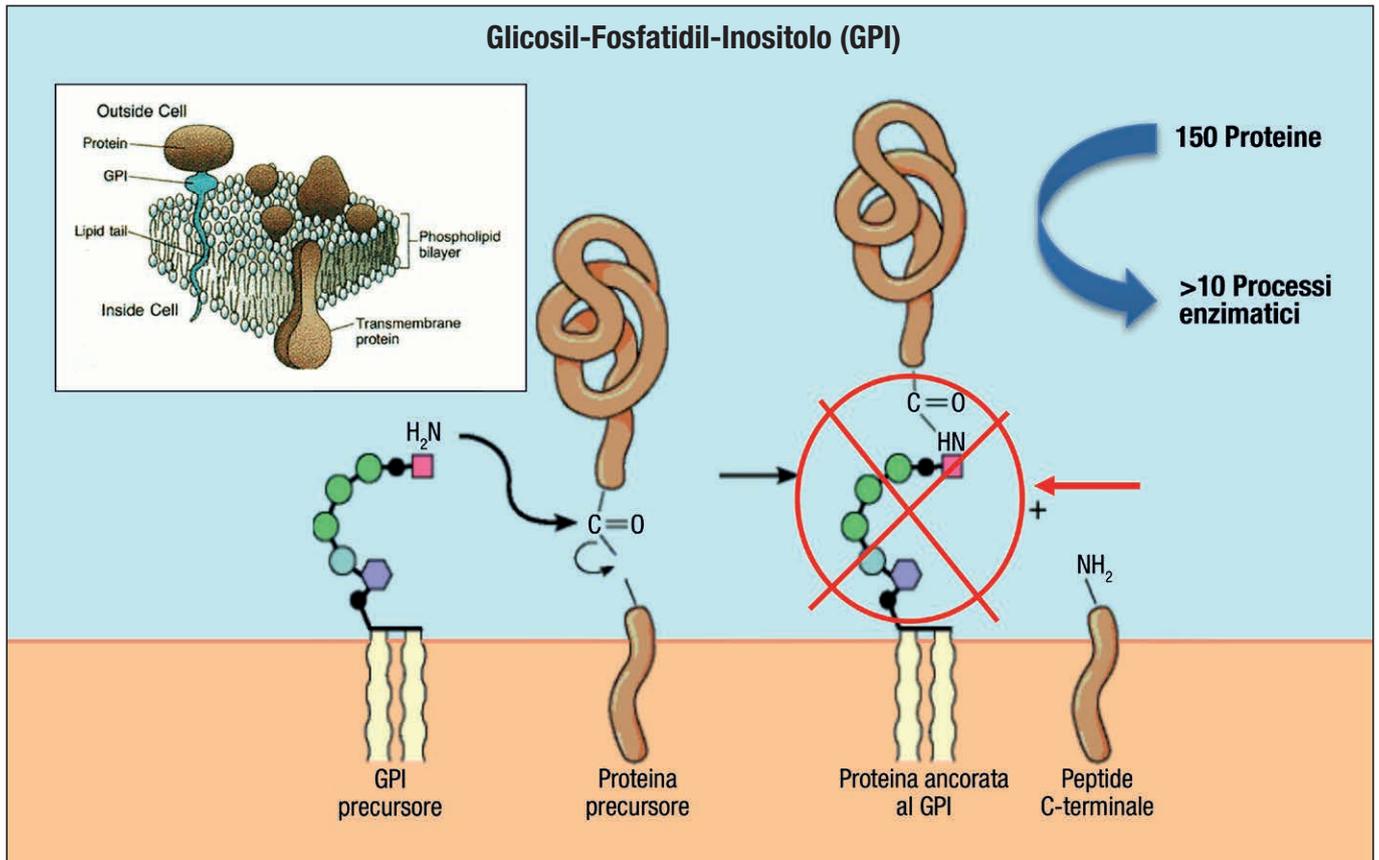
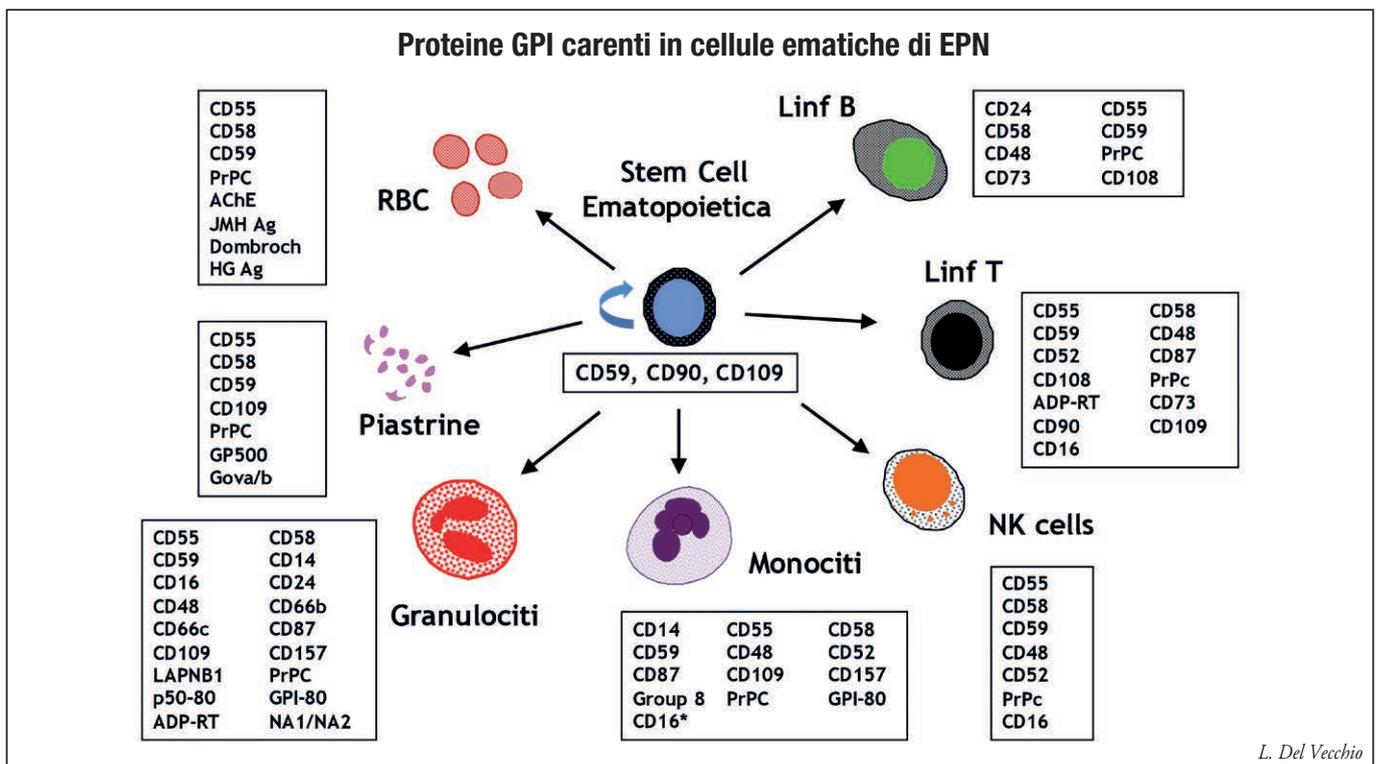


Figura 1 - La molecola GPI svolge un ruolo importante nell'ancoraggio di proteine che non possono penetrare all'interno della membrana lipidica per la mancanza di un segmento idrofobo sufficientemente esteso. Circa 150 proteine e oltre 10 enzimi sono coinvolti nella formazione delle molecole GPI. Nel riquadro in alto a sinistra sono evidenziati i diversi tipi di proteine di membrana citoplasmatica tra cui le molecole transmembrana che rappresentano le forme più frequenti.



L. Del Vecchio

Figura 2 - La figura elenca le principali molecole di tipo GPI carenti nei diversi citotipi ematici dei pazienti affetti da EPN (ottenuta dal prof Luigi del Vecchio - Università di Napoli). CD: cluster di differenziazione.

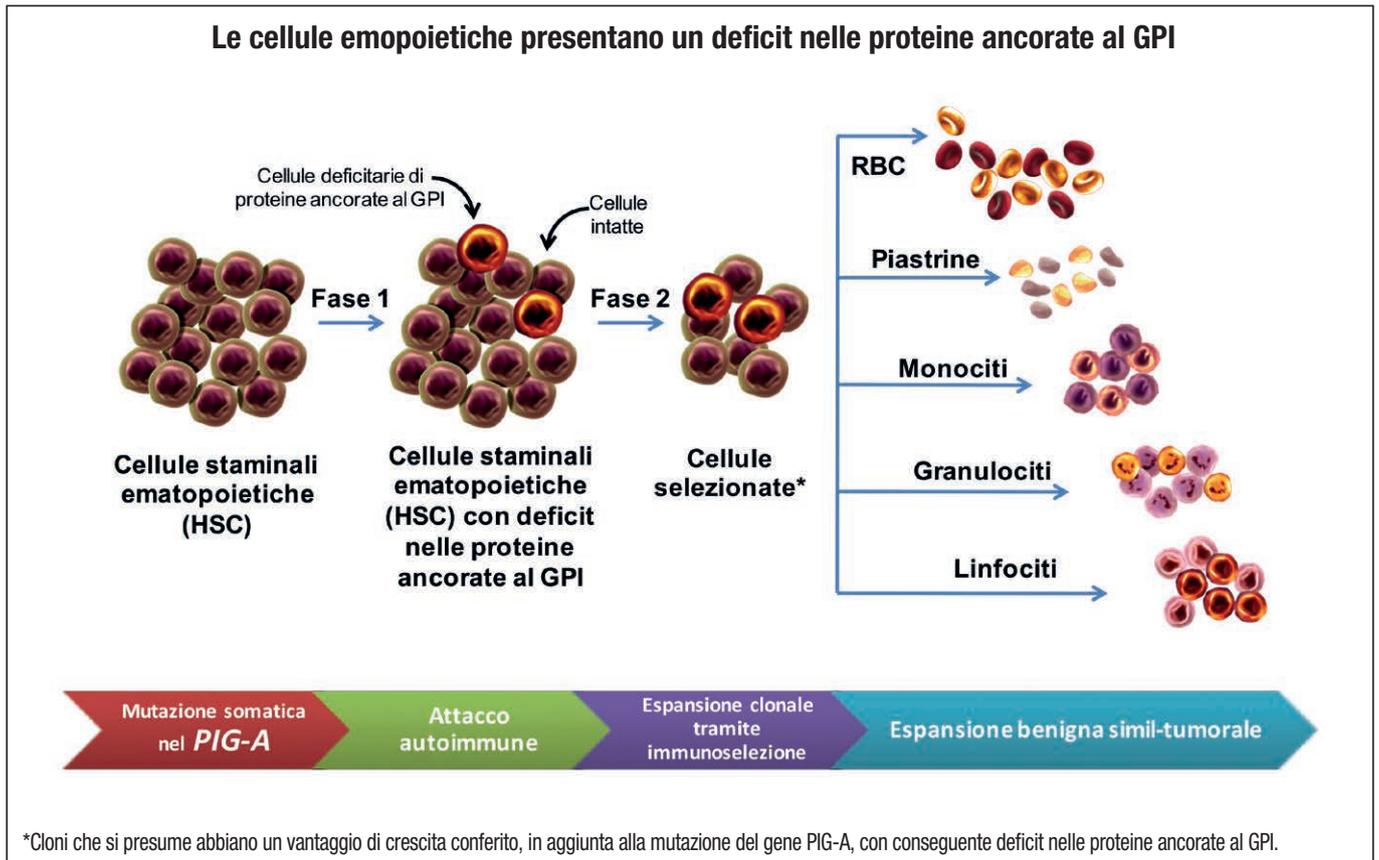


Figura 3 - Meccanismo di selezione clonale delle cellule GPI carenti e GPI-esprimenti nello schema emopoietico sottoposto ad un attacco autoimmune.

complesso di attacco alla membrana da parte del complemento nelle cellule ematiche. La perdita di queste due molecole rende quindi i GR maggiormente suscettibili alla lisi complementare.

La catena di eventi patogenetici in corso di EPN non è, comunque, ancora stata chiarita del tutto in quanto le numerosissime mutazioni fino ad ora identificate nel gene PIG-A causano la carenza delle proteine GPI-ancorate, ma non sono sufficienti a spiegare il vantaggio proliferativo dei cloni EPN. A tale riguardo si ipotizza l'azione di un danno tossico-immunologico mediato dai linfociti T che colpisce la normale mielopoiesi e risparmia le cellule GPI-carenti di tipo EPN. È possibile che in questa situazione giochino un ruolo la comparsa di mutazioni geniche addizionali che conferiscono un vantaggio proliferativo al clone EPN rispetto alle cellule emopoietiche normali ^(2,8,9) (Figura 3).

L'applicazione di metodiche di sequenziamento massivo del genoma quali la *next generation sequencing* (NGS) hanno identificato che i pazienti con EPN presentano mutazioni geniche a carico non solo del gene PIG-A ma anche di altri geni cosiddetti mieloidi, associati a patologie mieloidi quali le leucemie acute mieloidi e neoplasie mieloproliferative croniche, quali i geni TET2, SUZ12, U2AF1, JAK2 ⁽⁹⁾.

In un recente articolo è stata inoltre ipotizzata una origine congenita della mutazione del gene PIG-T in un paziente con un quadro clinico assimilabile a EPN, insorta dopo sviluppo di una mutazione somatica nella seconda copia del gene PIG-T coin-

volto nell'assemblare la molecola GPI con le proteine sulla superficie cellulare ⁽¹⁰⁻¹²⁾.

Criteri diagnostici

Dal punto di vista clinico-laboratoristico, la malattia EPN è molto eterogenea e include, secondo la classificazione di Parker ⁽⁴⁾, forme classiche a prevalente componente emolitica, forme associate a citopenia talora correlate a quadri di disfunzioni midollari quali la ipo-aplasia midollare o sindromi mielodisplastiche, e forme per lo più silenziose dal punto di vista clinico caratterizzate da microcloni GPI-carenti (Tabella 1).

Categorie	Emolisi	Disfunzione midollare
Forma classica	+	-
EPN associata ad altre patologie midollari (SMD, AA)	+	+
Subclinica	-	+/-

Tabella 1 - Classificazione di Parker della malattia EPN⁽⁴⁾

Le principali caratteristiche cliniche osservabili in corso di EPN, e la loro frequenza percentuale sono mostrate in Tabella 2. La percentuale di leucociti carenti in molecole GPI può variare da < 0,01- 0,1 al 99%. Molte di queste manifestazioni cliniche sono di grande aiuto nell'iter diagnostico della malattia e sono riassumibili come riportato di seguito ^(2,8).

Astenia, ridotta qualità della vita (<i>quality of life</i>)	95%
Anemia	80-90%
Dolore addominale	40-60%
Trombosi	40%
Insufficienza midollare con citopenia (piastrinopenia e/o neutropenia)	10-45%
Disfagia	30-40%
Insufficienza renale (GFR < 60 ml/min)	30%
Disfunzione erettile	35-50%
Emoglobinuria	20-25%
Dispnea	20%
Ipertensione polmonare	10-25%

Tabella 2 - Principali manifestazioni cliniche e loro frequenza

- **Anemia emolitica, di tipo intravascolare, negativa al test di Coombs e quindi non di tipo autoimmune.** Si contraddistingue per un marcato aumento del valore plasmatico di lattato deidrogenasi (LDH), una riduzione del valore della aptoglobina, incremento dei reticolociti e talora della bilirubina indiretta. Sono presenti inoltre elevati livelli plasmatici di emoglobina libera. La maggior parte dei pazienti manifesta emolisi intravascolare cronica con esacerbazioni acute (crisi emolitiche in condizioni di iper-attivazione del complemento, come ad esempio in seguito ad episodi infettivi batterici o virali). Una moderna classificazione delle anemie emolitiche è illustrata in Tabella 3.
- **Urine ipercromiche**, di colore tipo coca cola o marsala, correlate alla presenza di emoglobinuria macroscopica, che è comunque tipicamente a *pousse* (Figura 4). L'emoglobinuria può quindi essere macroscopica, qualora le urine siano ipercromiche, ma spesso solamente microscopica, rilevabile con i test biochimici sui campioni urinari. Costante è la presenza di emosiderinuria urinaria. La frequenza delle emissioni di urine scure varia da paziente a paziente, occorrendo generalmente 2-3 volte al mese, talora giornalmente o in poche giornate in un anno in altri casi.
- **Sideropenia e ridotto valore della ferritina** come effetto della iperplasia eritroide tipica delle forme emolitiche.
- **Segni di disfunzione midollare:** ipoplasia/aplasia midollare, sindrome mielodisplastica a basso rischio tipo anemia refrattaria con

	Cause intracorporeali	Cause extracorporeali
Ereditarie	- Emoglobinopatie - Enzimopatie - Membranopatie - Altro (rara PIG-T EPN)	HUS Familiare (carezza proteina C regolatoria)
Acquisite	Emoglobinuria parossistica notturna	- Malaria - Auto-immune - Drug-induced - Micro-angiopatica

Tabella 3 - Classificazione delle anemie emolitiche sulla base di criteri genetici e di localizzazione del danno cellulare.



Figura 4 - Esame delle urine nei diversi momenti della giornata in paziente con EPN. Rilievo di urine ipercromiche color marsala evidenziate nelle prime urine del mattino raccolte al risveglio del paziente dopo il periodo notturno.

displasia unilineare, o altre citopenie di incerto significato con possibile granulocitopenia e/o trombocitopenia.

- **Trombosi** in sedi atipiche (coinvolgimento vasi intra-addominali, sindrome di Budd-Chiari, vene cerebrali) e/o presenza di trombosi recidivanti anche in pazienti in trattamento con farmaci anticoagulanti orali (TAO).
- **Dolore addominale** come segno di sofferenza o ipoperfusione dei vasi arteriosi o venosi del circolo addominale.

Compromissione della muscolatura liscia: spasmo esofageo, disfagia e nell'uomo disfunzione erettile.

La gravità delle manifestazioni cliniche dipende da numerosi fattori clinici e generalmente correla con i livelli di LDH, entità e frequenza di episodi emolitici acuti, dimensione percentuale del clone EPN. Spesso si rileva astenia, pallore, emissione di urine scure al mattino. Sebbene l'esordio della malattia sia variabile e spesso insidioso da riconoscere, il decorso risulta essere sempre di tipo cronico. Talora trascorrono 5-10 o più anni tra la comparsa dei primi sintomi e la diagnosi definitiva di EPN. Oggigiorno, almeno nei paesi a sviluppo industriale, la diagnosi risulta più agevole, grazie alla diffusione delle metodiche citometriche nella maggioranza dei centri ospedalieri.

Esami di laboratorio

L'anemia, per lo più macrocitica, è riscontrabile con elevata frequenza in corso di EPN con valori di emoglobina che però pos-

sono variare tra 12 g/dL fino a 3-5 g/dL; nei casi di emolisi molto ridotta, il valore dell'emoglobina può tuttavia essere normale o lievemente ridotto. Qualora si instauri una carenza marziale dovuta alla continua perdita di emoglobina ed emosiderina attraverso le urine, può instaurarsi microcitosi delle emazie. Il numero dei reticolociti è nella maggior parte dei casi aumentato. I parametri ematochimici dell'emolisi intravascolare sono rappresentati da aumento del valore LDH (valore medio 800 U/L, con valori > 2.000 U/L in 10-25% dei casi), aumento della bilirubina indiretta, riduzione della emoglobinemia e dei livelli di aptoglobina. Costante il rilievo della emosiderinuria nelle urine, da ricercarsi con test specifici per la ricerca del ferro.

Il depauperamento progressivo delle riserve marziali dell'organismo provoca diminuzione dei livelli di sideremia e di ferritina sierica. I pazienti che ricevono trasfusioni periodiche di emazie presentano condizione di emosiderosi secondaria che si aggrava progressivamente in diretta dipendenza alla richiesta trasfusionale.

Durante l'esacerbazione delle crisi emolitiche può comparire la caratteristica emoglobinuria. Per quanto attiene il sintomo emoglobinuria vanno fatte le seguenti precisazioni:

- l'emoglobinuria vera e propria (ovvero il passaggio dell'emoglobina libera nelle urine) si osserva nel 25% dei pazienti, determinando il caratteristico viraggio delle urine dal colore giallo al rossastro, fino al marrone scuro (urine "coca cola" o "marsala"), in stretta dipendenza all'entità dell'emolisi;
- l'emoglobinuria secondaria alla emolisi non è necessariamente notturna ma sembra essere più frequente durante le ore di sonno, anche diurno, forse a causa di variazioni del pH urinario;
- l'entità dell'emolisi è in parte correlata alle dimensioni del clone EPN, al valore di LDH ematico, presenza di fenomeni trombotici e prevalenza di cloni GPI completamente carenti (tipo III) rispetto a quelli del tipo II (parzialmente carenti). Vi sono però casi con cloni < 20% con spiccati segni di emolisi;
- per quanto l'emolisi sia costante e cronica, l'emoglobinuria è irregolare e può essere favorita da infezioni, interventi chirurgici, stress psicofisici, e, nella donna, dalla gestazione.

Frequente il riscontro di neutropenia con deficit della fosfatasi alcalina leucocitaria, e la piastrinopenia.

La cellularità del midollo è ridotta nei casi di EPN di tipo II, associati ad ipoplasia midollare, mentre risulta normale o aumentata con prevalenza di precursori eritroidi in fase basofila o policromatica nelle forme di EPN classica di tipo emolitica. Possibile il riscontro morfologico e istologico di lievi fenomeni di diseritropoiesi nucleare e citoplasmatica anche nelle forme floride emolitiche.

Lo screening dello stato trombofilico del paziente (ricerca lupus anticoagulante, anticorpi anticardiolipina, deficit antitrombina, proteina C, proteina S, fattore V Leiden, mutazioni della protrombina, iperomocisteinemia) è utile per valutare il rischio trombotico del paziente con EPN nel caso che la malattia esordisca con uno o più eventi trombotici. Ciò al fine di verificare un aumento del rischio trombotico correlato alla concomitanza di fattori genetici pro-trombotici, utili nel monitoraggio della malattia.

Test di Ham

Fino agli anni '80, la diagnosi di EPN si fondava sull'esecuzione del test di Ham, che oggi giorno mantiene un valore meramente storico, essendo superato dal test citofluorimetrico. Il test di Ham, o test del siero acidificato, consiste nell'incubare le emazie del paziente in siero normale compatibile, non riscaldato e acidificato: se sono normali restano intatte, se il paziente ha una EPN vanno incontro a lisi. Questo effetto non si ottiene, invece, in seguito a trattamento del siero per mezzo del calore che inibisce l'attività delle proteine del complemento. I sieri utilizzati nei vari controlli sono quindi il siero del paziente e un pool di sieri normali freschi acidificati e privi del complemento in quanto il complemento è stato rimosso^(2,4).

Test citofluorimetrico

Fino agli anni '80-90, il test di Ham ha rappresentato l'esame di elezione per la diagnostica di laboratorio di EPN, ma negli ultimi 20-25 anni è stato progressivamente sostituito dall'applicazione della metodica citofluorimetrica con l'impiego di anticorpi monoclonali che riconoscono le proteine GPI-ancorate e sono coniugati con fluorocromi che li rendono visibili all'analisi strumentale⁽¹³⁻¹⁵⁾. Oggigiorno, l'esame laboratoristico patognomonico per la diagnosi di EPN è rappresentato dallo studio della espressione delle proteine GPI-linked nelle diverse cellule ematiche mediante tecnica di citometria a flusso di tipo multicromatica. Il test è nato dalla osservazione che tutte queste proteine richiedono un glicolipide, noto come glicosilfosfatidil-inositolo (GPI), per potere aderire alla superficie cellulare. I cloni EPN si caratterizzano per una difettosa sintesi di questa ancora che fa perdere l'espressione di tutte le proteine ad essa ancorate. La mancanza di molecole GPI può essere parziale o totale come illustrato nel paragrafo successivo⁽¹⁶⁻¹⁸⁾.

La citometria a flusso rappresenta la metodica d'elezione per la diagnosi definitiva di EPN. È un test semplice e rapido che ha permesso di ridurre in maniera significativa l'intervallo di tempo tra comparsa dei sintomi di malattia e diagnosi clinica. L'esame citometrico ha un specificità prossima al 100% e una elevata sensibilità che consente di evidenziare anche la presenza di cloni molto piccoli in condizioni subcliniche. L'estrema specificità della citometria a flusso deriva dalla sua capacità di valutare direttamente in modo qualitativo e quantitativo l'espressione delle proteine GPI-linked di membrana tramite l'uso di anticorpi monoclonali marcati con sostanze fluorescenti. Storicamente, le prime molecole di membrana ad essere state valutate in caso di sospetto EPN sono rappresentate dal CD55 e CD59, ovvero le due molecole più direttamente coinvolte nella patogenesi della malattia. Studi recenti di citometria multicolore hanno però dimostrato che l'analisi dell'espressione di questi marcatori sulle emazie non consente una corretta valutazione dell'entità del clone EPN, a causa di diversi fattori: interferenza rappresentata dalla stessa emolisi, nonché dalla pratica di trasfusioni nei soggetti trasfusione - dipendenti, per quanto attiene le emazie, e scarsa sensibilità del marcatore CD55 nel quantificare in maniera affidabile la carenza di molecole GPI. Lo stesso è avvenuto per la quantificazione dei cloni EPN nei granulociti neutrofilici e monocitici. Per ovviare a

questa limitazione si è quindi passati allo studio dell'espressione di altre molecole GPI-linked, in particolare sui leucociti. Le più recenti linee guida, sia italiane che internazionali, suggeriscono di eseguire l'analisi su almeno 2 popolazioni leucocitarie, i granulociti neutrofilo come popolazione di riferimento e i monociti come popolazione di conferma, considerando l'espressione di molecole GPI-linked specifiche quali CD16, CD24, CD66b sui granulociti, CD14 o CD48 e CD157 sui monociti. Nella popolazione eritrocitaria i markers di elezione sono rappresentati dal CD59 e dal CD235 per la corretta identificazione della popolazione eritrocitaria. Per evitare di considerare erroneamente come cloni EPN forme immature che esprimono fisiologicamente in maniera ridotta tali molecole di membrana, si rende necessario effettuare il test citofluorimetrico esclusivamente su campioni di sangue periferico, escludendo i campioni midollari. Le popolazioni granulocitarie e monocitarie devono essere identificate in maniera specifica mediante *gate* immunologico, utilizzando anticorpi monoclonali anti CD15 o CD33. La recente introduzione nella pratica laboratoristica di un nuovo reagente altamente sensibile e specifico per lo studio delle molecole GPI-linked sui leucociti e denominato FLAER (*Fluorescent Aerolysin*) ha dato un notevole impulso alla diagnostica di EPN. Il FLAER rappresenta una variante inattiva della tossina batterica detta aerolisina: la peculiarità più rilevante di questa molecola è quella di legare direttamente l'ancora GPI, risentendo in misura minore dello stadio maturativo cellulare, e la

possibilità di essere impiegata in analisi multiparametriche unitamente ai marker immunofenotipici citati in precedenza⁽¹⁹⁻²¹⁾. In base ai dati citofluorimetrici, i pazienti con EPN possono contenere tre distinte popolazioni di emazie che presentano un diverso grado di sensibilità alla lisi complemento-mediata: normale (definita anche clone EPN-I), 3-5 volte superiore al normale (definita clone EPN-II o parzialmente carenti in molecole GPI) e 25-30 volte superiore al normale (o clone EPN-III, completamente deficitari in molecole GPI) (Tabella 4, Figura 5).

Il test citofluorimetrico va eseguito su campione di sangue periferico
La carenza di molecole GPI va accertata in almeno 2 citotipi ematici (granulociti neutrofilo e globuli rossi o monociti)
Nei GR la percentuale di molecole GPI carente è sempre inferiore che nei GB, in quanto una parte sono emolizzati o, nei casi trasfusi, sono di origine del donatore
Per identificare piccoli cloni EPN è necessario identificare almeno 30 elementi GPI carenti - Analisi ad alta sensibilità: 0,01% / 300.000 eventi - Analisi a sensibilità standard: 0,1% / 30.000 eventi - Analisi a bassa sensibilità: 1% / 3.000 eventi

Tabella 4 - Ruolo della citometria a flusso nella diagnosi di EPN clinica e subclinica. Elenco delle principali caratteristiche diagnostiche necessarie per la diagnosi di EPN.

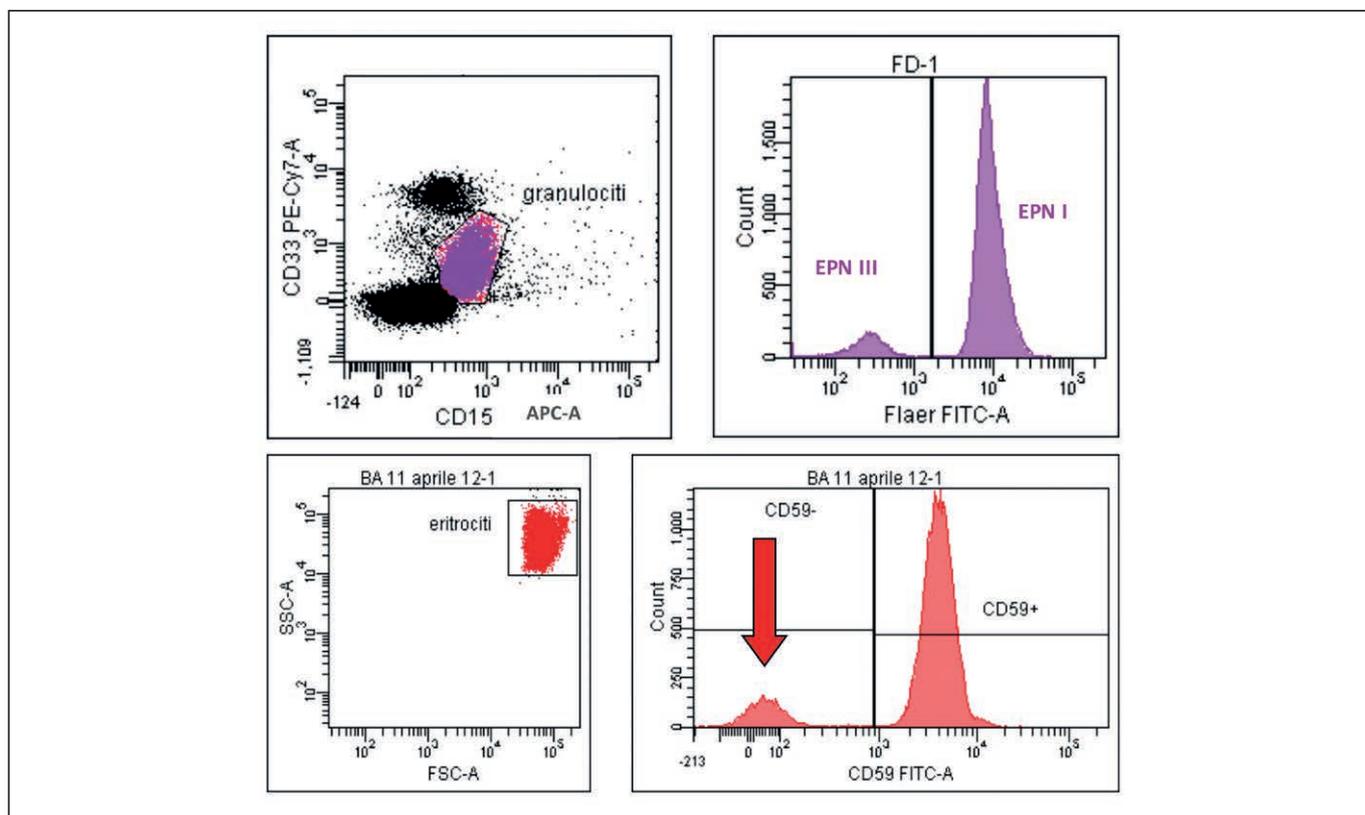


Figura 5 - Test diagnostico di EPN in citometria a flusso. Distribuzione delle popolazioni GPI positive e negative nella popolazione granulocitaria ed eritrocitaria analizzata in corso di EPN.

Nel 2005 l'*International PNH Interest Group* (I-PIG) ha proposto uno schema classificativo che considera l'individuazione citofluorimetrica di un clone EPN la condizione necessaria, ma non sufficiente, per porre la diagnosi di EPN, in assenza di informazioni cliniche circa l'emolisi e lo stato funzionale del midollo osseo. Oggigiorno si ritiene che la diagnosi deve essere sia laboratoristica che clinica, per quanto risulta chiaro che la presenza di cloni EPN di una certa significatività rappresentino la espressione patognomica di una malattia EPN⁽¹⁶⁻²¹⁾.

L'applicazione di moderne tecniche di citometria multicolore ad alta sensibilità che prevedono l'acquisizione di 500.000 fino a 2 milioni ed oltre di eventi, ha permesso di identificare la presenza di cloni di EPN con frequenza inferiore a 1/10.000 (< 0,01%) in diverse condizioni ematologiche e internistiche, ma il significato clinico di queste forme non è ancora stato chiarito⁽²¹⁻²²⁾.

Negli ultimi 10-15 anni, grazie all'impegno di un ricercatore italiano, (prof Luigi del Vecchio, Università di Napoli) è stato creato un archivio nazionale di cloni EPN (denominato Clonoteca EPN), che consiste in un database per la raccolta di informazioni anamnestiche e diagnostiche per i casi di EPN sospetta e conclamata. Con questo strumento è possibile effettuare valutazioni statistiche e monitorare nel tempo i casi risultati positivi. Questo ha permesso di identificare diverse varianti rare di EPN, quali quelle presenti solo sui globuli bianchi e non sulle emazie (*white* PNH, di tipo non emolitico, che colpisce solo i leucociti e non i GR), o varianti esclusive per i monociti, o per granulociti neutrofili o per globuli rossi. I risvolti clinici e molecolari di queste rare varianti laboratoristiche sono in corso di valutazione da parte del gruppo di Ravenna in collaborazione con il gruppo dell'Università di Napoli.

La biopsia midollare non è necessaria per la diagnosi, ma è di particolare aiuto nell'inquadramento dei casi associati a citopenia con sospetta insufficienza midollare. In questi casi la biopsia osteo-midollare, l'agoaspirato midollare coadiuvato da analisi citogenetiche, biomolecolari, citoenzimatiche e immunofenotipiche permettono di porre diagnosi di sindrome mielodisplastica o ipo-aplasia midollare⁽²⁾.

Screening trombotico

Sebbene il meccanismo fisiopatologico non sia stato ancora completamente chiarito, i pazienti con EPN sia nella forma florida che associata a disfunzione midollare presentano un aumentato rischio di episodi tromboembolici sia di natura venosa che, in minor misura, arteriosa. Nelle casistiche più ampie pubblicate in epoca pre-eculizumab, il riscontro di una o più trombosi è stato osservato in circa il 40% dei casi, identificando quindi la EPN come una delle patologie internistiche gravata da maggiore rischio trombotico in medicina interna⁽²³⁻²⁴⁾.

La trombosi rappresenta la principale causa di morte nei pazienti affetti da EPN, costituendo il 60-65% degli eventi fatali in questi pazienti.

Per quanto il meccanismo patogenetico alla base della trombosi non sia stato identificato con univocità, sono stati descritti diversi fattori pro-coagulanti quali:

- azione esercitata dall'emoglobina libera e da altre sostanze rilasciate

dagli eritrociti lisati quali ADP;

- stato di attivazione delle piastrine a causa della minor espressione di proteine GPI-linked in grado di contrastare l'azione del complemento;
- stato di attivazione delle cellule endoteliali di rivestimento dei vasi sanguigni;
- stato di attivazione dei leucociti;
- riduzione dell'efficienza della fibrinolisi endogena.

L'occlusione dei piccoli vasi del distretto addominale è all'origine della frequente dolorabilità addominale riferita dai pazienti, così come l'occlusione di piccoli vasi cerebrali sembra essere alla base della sintomatologia dolorosa che colpisce la funzione visiva o la comparsa di sintomi neurologici. Anche la funzionalità renale può essere compromessa da eventi trombotici che si localizzano a questo livello. Frequenti sono inoltre trombosi che colpiscono sedi inusuali, quali venule epatiche e vena porta, determinando il quadro clinico della sindrome di Budd-Chiari⁽²³⁻²⁴⁾.

Parametri ematologici

Un terzo segno clinico che di frequente si accompagna all'EPN è rappresentato dalla citopenia uni- o multilineare, che può sfociare in gravi forme di aplasia midollare. L'evoluzione dell'EPN in forme di mielodisplasia o leucosi acuta è rara.

Il legame tra EPN ed aplasia midollare è molto stretto e complesso e ancora in buona parte da chiarire: infatti, se in taluni casi l'aplasia risulta essere una complicanza che segue lo stato morboso dell'EPN, in molti altri l'EPN segue lo stato di anemia refrattaria o di aplasia vera e propria, addirittura migliorando la citopenia. Vi è una correlazione epidemiologica tra insorgenza di aplasia midollare ed EPN: ad esempio nei paesi orientali quali la Thailandia in cui la prevalenza di queste 2 forme appare nettamente aumentata.

La stretta correlazione tra le due condizioni è di sicuro interesse scientifico e si può ipotizzare che le alterazioni di membrana del clone patologico riescano in qualche modo a proteggerlo da un disordine immunologico/autoimmune mediato dai linfociti T che induce l'aplasia midollare, attaccando le molecole GPI sulla superficie cellulare. L'emopoiesi GPI carente sembra avere un vantaggio proliferativo rispetto alla emopoiesi normale, per cui l'emergere di cloni EPN determina spesso un progressivo miglioramento del deficit produttivo midollare⁽²⁵⁻²⁶⁾.

Parametri di funzionalità renale

L'insufficienza renale cronica è un rilievo frequente in corso di EPN, anche se questa manifestazione clinica è stata fino ad ora oggetto di pochi studi approfonditi in casistiche di un certo rilievo, dove il 64% dei pazienti con EPN presenta un danno renale variabile tra stadio 1 e 5 con compromissione della sua funzione. Il 21% di questi presentava una insufficienza renale agli stadi 3-4 o 5 (fase terminale). Una analisi retrospettiva del Registro spagnolo ha osservato che il danno renale compare mediamente dopo 6 anni, mentre l'intervallo dalla diagnosi alla comparsa di insufficienza renale cronica era di 12 anni. Emoglobinuria, dolore addominale e dispnea sono i fattori predittivi di comparsa di danno renale; di interesse inoltre l'associazione tro-

vata in alcuni studi tra incidenza di eventi trombotici e danno renale, permettendoci di ipotizzare che l'insorgenza di fenomeni ischemici trombotici di tipo micro-macrovascolari possano rendere conto dello sviluppo della IRC (27-29).

Nei pazienti con EPN la mortalità correlata alla IRC o acuta è stata stimata attorno al 10%.

Dal punto di vista anatomopatologico, vi sono pochi studi fino ad ora eseguiti in biopsie renali di pazienti affetti da EPN. Nei pochi report pubblicati, comprese alcune osservazioni personali, sono state identificate le seguenti alterazioni:

- presenza di glomeruli sclero-ialini;
- dilatazioni delle anse capillari;
- presenza di tubuli con segni di sofferenza e caratterizzati da depositi di emosiderina a livello intraepiteliale (evidenziati in colorazioni al Blu di Prussia);
- quadri di atrofia tubulare;
- ispessimento parietale dei vasi;
- comparsa di cilindri ialini endoluminali.

Dal punto di vista eziopatogenetico i seguenti eventi fisiopatologici sembrano giocare un ruolo nel determinismo della IRC: attivazione incontrollata del complemento, emolisi acuta e cronica, rilascio di Hb libera, deplezione ossido nitrico (NO), formazione metaemoglobina, stress ossidativo con accumulo di ROS, eccesso di emosiderina nel filtrato glomerulare, deposito di emosiderina nei tubuli prossimali, risposta infiammatoria locale, stimolo pro-apoptotico per cellule renali, danni delle membrane cellulari compresa quella mitocondriale, emosideruria ed emoglobinuria (Figura 6).

Gli studi radiologici in RMN hanno evidenziato che i danni renali in corso di EPN hanno un pattern abbastanza tipico caratterizzato da inversione del pattern cortico-midollare in T1 e da una riduzione

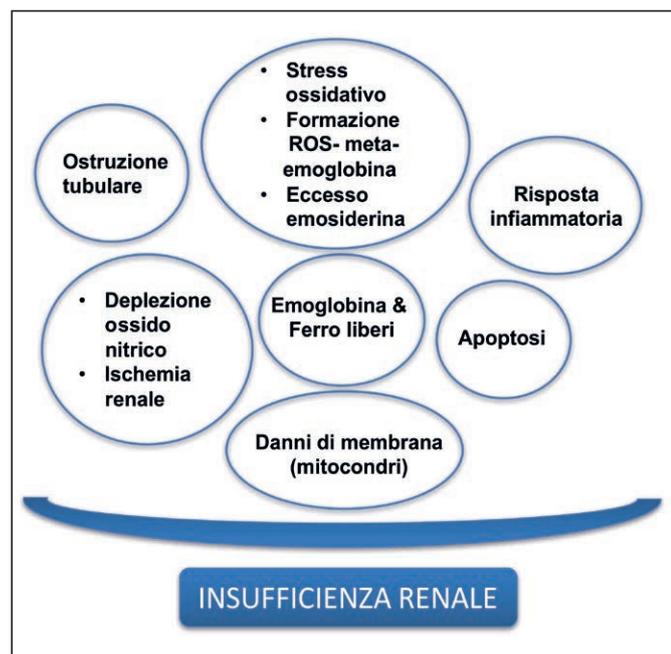


Figura 6 - Principali meccanismi fisiopatologici responsabili del danno renale in corso di EPN.

della intensità di segnale a livello corticale in T2.

Sia gli studi registrativi che alcuni trials clinici più recenti hanno inequivocabilmente dimostrato come l'eculizumab sia in grado di stabilizzare i danni renali nei pazienti con EPN, rispetto ai pazienti trattati con terapia sintomatica.

Nell'eventualità si verificano episodi trombotici, il paziente dovrà essere sottoposto ad indagini di imaging quali la tomografia computerizzata/TAC, la risonanza magnetica nucleare/RM nelle sedi anatomiche interessate.

L'esame del midollo osseo mediante aspirato midollare e biopsia ossea è necessario per la corretta classificazione della malattia, in quanto permette di distinguere tra EPN classica ed EPN associata ad insufficienza midollare.

Lo screening dello stato trombofilico del paziente (ricerca lupus anticoagulante, anticorpi anticardiolipina, deficit antitrombina, proteina C, proteina S, fattore V Leiden, mutazioni della protrombina, iperomocisteinemia) è utile per valutare il rischio trombotico del paziente, aggiuntivo rispetto al rischio già significativo dovuto alla presenza della EPN e per valutare una eventuale TAO.

Esami di monitoraggio

Di seguito è riportato l'elenco degli esami/visite necessarie nel follow up del paziente affetto da EPN (Tabella 5).

Esame/procedura	Indicazioni
Esami di Laboratorio	
- Emocromo - Funzionalità epatica - Funzionalità renale - Funzionalità cardiaca - Parametri della coagulazione	Ogni mese alla diagnosi (ogni 2-3 mesi durante la terapia con eculizumab)
- Valutazione del clone EPN in citometria a flusso	Ogni 6 mesi, o più frequenti in caso di variazioni del quadro clinico
- Screening trombofilico	Consigliato in fase di esordio di EPN nel caso si siano verificati episodi trombotici
- Aspirato midollare	Da eseguirsi nei casi di EPN associata a sindrome mielodisplastica o anemia aplastica-ipoplastica
Valutazione Clinica	
- Ecocardiogramma	Ogni mese alla diagnosi (ogni 2-3 mesi durante la terapia con eculizumab) Intervalli di tempo variabili in base alla presenza o assenza di alterazioni di rilievo

Tabella 5 - Indagini diagnostiche complementari necessarie per un corretto inquadramento e follow up del paziente con sospetto EPN.

Nei pazienti con una diagnosi confermata di EPN, in presenza di condizioni cliniche stabili, la dimensione del clone patologico dovrebbe essere monitorata ad intervalli regolari, semestrali o annuali, al fine di accertare riduzioni o aumento delle dimensioni del clone EPN. Al contrario, ogni peggioramento dei segni clinici dovrebbe indurre a controlli più frequenti. I pazienti che si presentano con un quadro di emolisi o di trombosi senza una chiara diagnosi di EPN, dovrebbero essere testati in modo seriale, al fine di poter individuare un eventuale clone EPN al momento della sua comparsa. Sono state dimostrate risoluzioni spontanee di cloni EPN in casi sporadici. Nei casi di anemia aplastica o di sindrome mielodisplastica in cui, grazie a metodiche ad alta sensibilità, si sia individuato un microclone EPN, un monitoraggio prolungato può essere importante perché l'incremento delle dimensioni del clone può anticipare la trasformazione dell'aplasia in EPN emolitica. Trattandosi di patologia cronica che può incidere sullo stile di vita del paziente e dei familiari, nei casi in cui si rendesse necessario è consigliabile un adeguato supporto psicologico al fine di garantire un sereno rapporto con la patologia medesima e le sue implicazioni ⁽³⁰⁾.

Sono stati inoltre identificati diversi indici di outcome, quali la presenza o assenza di sintomi di malattia, gli indici di qualità della vita, gli indici di emolisi, l'incidenza di eventi trombotici, la richiesta di supporto trasfusionale.

In letteratura non sono presenti studi in merito al monitoraggio del paziente affetto da EPN non in terapia. Recentemente sono comparse indicazioni sulla valutazione di questi pazienti all'interno delle linee guida spagnole e tedesche sulla gestione del paziente affetto da EPN. Nelle linee guida non sono tuttavia indicate le tempistiche e precisati gli aspetti da valutare nel corso del monitoraggio del paziente. Nel 2017, un panel di esperti italiani ha pubblicato delle raccomandazioni per la presa in carico ed il monitoraggio dei pazienti affetti da EPN ⁽³⁰⁾ (Tabella 6).

Terapia

Fino a 10-15 anni fa, la terapia dell'EPN è stata prevalentemente finalizzata al controllo dei sintomi di malattia. Con la sola terapia di supporto, tuttavia, nel 1995 la mortalità osservata si attestava al 35% a 5 anni dalla diagnosi, con una mediana di sopravvivenza di 10,3 anni; per quanto questi dati siano stati confermati anche in casistiche più recenti, in un ulteriore studio si è evidenziata una mediana di sopravvivenza notevolmente più lunga, pari a 22 anni ⁽³¹⁻⁴⁰⁾.

Terapia sintomatica

- **Anemia.** Si basa sull'uso di trasfusioni di globuli rossi concentrati per correggere l'anemia; l'impiego di prodotti a base di ferro per via orale o endovena; somministrazione di folati, eritropoietina (EPO) o androgeni, questi ultimi per correggere un quadro di ipoplasia midollare. L'uso di EPO è controversa, in quanto vi sono evidenze che possa stimolare prevalentemente i cloni EPN rispetto ai GR normali. I corticosteroidi (prednisone, 0,5-1 mg/kg/die con successiva riduzione progressiva dei dosaggi) sono stati impiegati in passato per ridurre l'emolisi intravascolare ma oggi giorno ven-

Esame/procedura	Indicazioni
Esami di Laboratorio	
- Emocromo - Funzionalità Epatica - Funzionalità Renale - Funzionalità Cardiaca - Parametri della coagulazione	Ogni mese alla diagnosi (ogni 2-3 mesi durante la terapia con eculizumab)
- Valutazione del clone EPN in citometria a flusso	Ogni 6 mesi, o più frequenti in caso di variazioni del quadro clinico
Valutazione Clinica	Ogni mese alla diagnosi (ogni 2-3 mesi durante la terapia con eculizumab)
Dati anamnestici e di base	
Dati anagrafici e storia familiare	
Età di esordio e sintomi	
Valutazione sintomatologia del paziente (emoglobinuria, astenia, dolore addominale, disfagia, dispnea, disfunzione erettile)	
Emocromo	
LDH	
Clone EPN all'esordio di malattia	
Inquadramento clinico e follow up	
Esame emocromocitometrico con conta reticolocitaria	
LDH, bilirubina, aptoglobina, esame urine completo e funzionalità renale	
Valutazione del clone EPN in citometria a flusso	

Tabella 6 - Esami e procedure per la presa in carico e il monitoraggio dei pazienti con EPN. ⁽³⁰⁾

gono riservati al trattamento dell'emolisi extravascolare, possibile complicanza in corso di trattamento con eculizumab (vedi paragrafo terapia con eculizumab).

- **Sovraccarico di ferro.** I pazienti in terapia trasfusionale cronica possono sviluppare dei quadri di siderocromatosi con livelli di ferritina molto elevati (> 2.000 ng/ml) per cui è indicata una terapia ferrochelante con farmaci orali o mediante microinfusore sottocute.
- **Trombosi.** Si basa sull'impiego terapeutico di eparina a basso peso molecolare e anticoagulanti orali tipo TAO (dicumarolici, scarsa l'esperienza con i nuovi anticoagulanti orali). Nel periodo antecedente all'immissione in commercio dell'eculizumab, i dicumarolici sono stati impiegati in profilassi per la prevenzione della trombosi nei pazienti con EPN. Tale pratica però è risul-

tata poco efficace nel ridurre l'incidenza di eventi trombotici, per cui oggi il suo impiego risulta sporadico. Va inoltre considerato in questi pazienti il rischio emorragico, che in alcuni pazienti risulta elevato a causa della concomitante piastrinopenia. Nei casi di sindrome di Budd-Chiari, può essere indicata la terapia trombolitica.

- **Terapia del dolore.** Si fonda sull'uso di farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS), antispastici e, solo occasionalmente, di analgesici maggiori di tipo morfino.

Anticorpi monoclonali anti-complemento

Eculizumab è un anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro la frazione C5 del complemento. Il legame con il C5 esercita in vitro e in vivo una potente azione inibitoria nei confronti dell'attività biologica esercitata dalla frazione 5 complemento. Eculizumab, quindi, bloccando l'attivazione del complemento terminale, risulta in grado di inibire la citolisi dei GR e di conseguenza blocca efficacemente l'emolisi intravascolare limitando il rilascio di emoglobina libera. Eculizumab è stato sviluppato attraverso 3 studi clinici controllati, svolti su un totale di 195 pazienti. Questi studi hanno inequivocabilmente dimostrato come questo farmaco eserciti un ruolo terapeutico fondamentale nel controllo dei segni e sintomi correlati ad EPN.

Tra le principali attività cliniche di eculizumab ricordiamo:

- **Riduzione dell'emolisi:** LDH rappresenta l'indice più sensibile di emolisi intravascolare. Una sua riduzione dell'86% è osservabile dopo 12 mesi di trattamento (da una media di 2051 U/L a 297 U/L).
- **Riduzione della necessità trasfusionale:** il fabbisogno trasfusionale viene ridotto del 74%. I pazienti non rispondono tutti alla medesima maniera per cui vi sono i cosiddetti *good responder* in cui i valori di Hb rientrano ai valori di normalità fino a casi con risposte minime o assenti. La presenza concomitante di ipoplasia midollare può limitare l'efficacia clinica del farmaco.
- **Riduzione dell'incidenza di trombosi:** la riduzione dell'incidenza di eventi trombo-embolici in seguito a terapia con eculizumab è rilevante, a prescindere dal fatto che i pazienti fossero o meno in terapia anticoagulante (rispettivamente 94% vs 92% di eventi trombotici in meno).
- **Protezione dalle complicanze internistiche:** eculizumab riduce in maniera significativa sia l'incidenza di ipertensione polmonare, che di insufficienza renale.
- **Effetto su sintomi e qualità della vita:** eculizumab ha dimostrato un miglioramento rapido e clinicamente significativo dell'affaticamento ed un miglioramento della qualità della vita generale mantenuto nel tempo.
- **Effetto sulla sopravvivenza:** l'aspettativa di vita dei pazienti con EPN è drasticamente migliorata dopo l'avvento del farmaco eculizumab. Recenti studi hanno evidenziato che in seguito a trattamento con eculizumab, la sopravvivenza media dei pazienti EPN è del 95,5% a 5 anni, sovrapponibile a quella della popolazione normale di pari sesso ed età.

Bisogna comunque sottolineare che l'inibizione del complemento indotta dal farmaco predispone ad infezioni batteriche, in particolare batteri capsulati come il meningococco. Per contrastare questo effetto indesiderato si ricorre alla vaccinazione anti-meningococcica dei soggetti prima di intraprendere il trattamento con eculizumab. La vaccinazione consigliata è di tipo tetravalente, per assicurare una copertura per i sottotipi A, C, W, Y del meningococco. Negli ultimi anni si è reso disponibile anche il vaccino per il sottotipo B del meningococco; questo però viene generalmente somministrato dopo l'inizio del trattamento con eculizumab.

Nella pratica clinica, fino ad oggi non sono stati definiti con precisione i criteri di eleggibilità per il trattamento con eculizumab. Dal punto di vista regolatorio, un aumento del valore di LDH superiore a 1,5 volte, l'anemia o la presenza di sintomi elencati più avanti, possono essere utilizzati per intraprendere il trattamento con eculizumab. Esistono però notevoli divergenze cliniche nell'approccio alla terapia sia nel territorio nazionale che a livello europeo e mondiale in generale, per cui è auspicabile che un panel di esperti possa fornire nel prossimo futuro delle raccomandazioni utili in questo contesto.

Come regola generale, si può affermare che i pazienti che presentano elevati indici di emolisi (LDH \geq 1,5 ULN, ed in particolare $>$ 1.000-1.500 U/L), la presenza di una sintomatologia clinica evidente (uno o più sintomi tra i seguenti: astenia, dispnea, dolori addominali, disfagia, disfunzione erettile), severa anemia, frequenti crisi di emoglobinuria, eventi trombotici in atto o progressi, presenza di cloni EPN di grossa taglia ($>$ 50%), sono considerate categorie ad alto rischio che inducono il clinico ad iniziare un trattamento con eculizumab.

I pazienti di nuova diagnosi necessitano di uno stretto monitoraggio clinico e del clone PNH al fine di valutare l'evoluzione della malattia, specialmente nelle forme associate ad ipoplasia midollare.

Eculizumab viene somministrato al dosaggio di 600 mg mediante infusione endovenosa, una volta la settimana, durante la fase di induzione di 4 settimane. Dalla 5^a settimana inizia la fase di mantenimento con infusioni di eculizumab 900 mg ogni 14 ± 2 giorni. La terapia va proseguita per anni, verosimilmente per tutta la vita, ad eccezione di quei rari casi in cui il clone EPN tende a ridursi progressivamente fino alla sua scomparsa. La somministrazione di eculizumab può essere anticipata ad un intervallo di 12 giorni dalla precedente terapia, qualora il paziente presenti urine marsalate e/o incremento del valore di LDH in 12^a o 13^a giornata dopo la precedente infusione. In rari casi può essere necessario un dosaggio di 1.200 mg per ridurre l'emolisi di alcuni pazienti con EPN non controllati dal dosaggio convenzionale.

Gli effetti collaterali di eculizumab si sono dimostrati di entità lieve o moderata, anche nella somministrazione a lungo termine. È stato registrato un lieve aumento nell'incidenza di infezioni meningococciche (0,6%), per cui è obbligatoria l'esecuzione di una vaccinazione profilattica contro la *Neisseria meningitidis* prima dell'inizio della somministrazione di eculizumab, con periodici ri-

chiami (3-5 anni a seconda del tipo di vaccino) per tutta la durata del trattamento.

Un altro fenomeno osservabile in una minoranza di pazienti con EPN in trattamento con eculizumab è la perdita progressiva dell'efficacia del farmaco sul mantenimento dei valori di emoglobina nel range di normalità. In una elevata percentuale di questi casi è documentabile la comparsa di una emolisi extravascolare C3 mediata, con positivizzazione del test di Coombs correlato all'azione della frazione 3 del complemento. Per limitare l'aggravarsi di questo fenomeno sono state proposte diverse terapie spesso poco efficaci o non scevre di rischi quali la terapia steroidea a dosaggio medio-elevato, la splenectomia chirurgica, l'embolizzazione selettiva splenica. La positivizzazione del test di Coombs C3 mediato è riscontrabile in una frazione significativa di casi, ma per fortuna in 2/3 di questi il rilievo di laboratorio risulta privo di risvolti clinici.

Terapia immunosoppressiva

È indicata nelle varianti di EPN associata ad aplasia severa e si basa sulla somministrazione di siero antilinfocitario, ciclosporina, steroidi e fattori TPO mimetici quali eltrombopag.

Trapianto di cellule staminali emopoietiche

Fino a 10-15 anni fa, ovvero in epoca pre-eculizumab, il trapianto di cellule staminali emopoietiche di tipo allogenico rappresentava l'unica opportunità di cura definitiva di questa malattia.

Nelle casistiche fino ad oggi riportate in letteratura, la mortalità correlata alla procedura allo-trapiantologica si aggira tra il 25 e il 50%, per cui oggi questa terapia va riservata a casi selezionati in cui la malattia risulta particolarmente severa e invalidante per il paziente in assenza di risposta ai trattamenti convenzionali ivi compreso l'eculizumab. Una storia di trombosi pre-trapianto rappresenta un fattore prognostico negativo sull'outcome dei pazienti. Nei casi fino ad ora descritti è riportata inoltre una elevata incidenza di malattia veno-occlusiva (VOD) (fino al 50% dei casi), e di GvHD grado 3-4 (30-40%).

Il trapianto allogenico viene generalmente praticato nelle forme associate ad aplasia severa non responsive ai trattamenti immunosoppressivi o ai rari casi di mielodisplasie a basso rischio evoluti in alto rischio con blastosi periferica e midollare⁽⁴⁰⁻⁴¹⁾.

Non vi sono protocolli clinici condivisi per la gestione ottimale del paziente con EPN in terapia con eculizumab che viene sottoposto a trapianto allogenico di cellule staminali. Per quanto è possibile è consigliabile eseguire una infusione di eculizumab nei giorni precedenti al trapianto e possibilmente anche nelle prime settimane successive al trapianto al fine di limitare l'incidenza di gravi crisi emolitiche; non è chiara l'interferenza dell'eculizumab con i farmaci immunosoppressori generalmente impiegati in questo setting o i suoi rapporti con il rischio di insorgenza di GvHD. Risulta quindi fondamentale l'attenzione da parte del clinico ematologo nella sorveglianza clinica dei sintomi e segni correlati alla EPN nelle prime settimane/mesi che seguono alla esecuzione del trapianto allogenico.

Controindicato il trapianto autologo di cellule staminali eseguito in maniera sperimentale negli anni '90 e inizio 2000, ma privo di effetto terapeutico.

In conclusione, quindi, possiamo dire che il trapianto ha un ruolo controverso nelle forme floride emolitiche di EPN, in quanto oggi la elevata mortalità peri-trapiantologica ne limita l'uso, almeno nelle forme responsive all'eculizumab.

Terapie sperimentali

Sono attualmente in corso numerose sperimentazioni cliniche basate sull'impiego di molecole in grado di inibire le frazioni del complemento (C3 e C5) con diverse modalità di attacco e variamente ingegnerizzate⁽⁴²⁻⁴⁵⁾. È in fase avanzata di commercializzazione un anticorpo monoclonale anti-C5 a lunga emivita (ravulizumab) somministrabile per via ev ogni 8 settimane, invece che ogni 2 settimane come eculizumab. Questa molecola è già disponibile in terapia negli Stati Uniti in quanto approvata dal loro ente regolatore (FDA).

Sono in corso di studio inoltre alcune combinazioni di farmaci come esemplificato in Tabella 7.

Terapie in sperimentazione	Variante clinica	Farmaci associati
Ravulizumab (anticorpo monoclonale anti-C5 di tipo <i>long acting</i> da somministrarsi ev ogni 8 settimane), approvato FDA	Forma classica e associata ad anemia aplastica	
Anticorpo monoclonale anti-C5 sc		
Coversina		
Anticorpi monoclonali anti-C3 (compostatina, simil fattore H, simil CR1 (recettore complemento 1))		
TT30 (anti-C3), molecola ingegnerizzata fra CR2 (recettore complemento 2- CD21) e fattore H		
Agenti agonisti di inibitori del complemento (CFB, CFD)		
siRNA anti-C5 o anti-CFB		
Peptidi ciclici (anti-C5)- infusione giornaliera sc		
Compostatina (anti C5)		
Ecuzumab	Mielodisplasie associate ad EPN	Azacitidina

Tabella 7 - Terapie in sperimentazione.

Problematiche internistiche

EPN in gravidanza

In epoca antecedente all'impiego clinico di eculizumab, le gravidanze in corso di EPN erano considerate assolutamente controindicate e difficili da gestire a causa del rischio di aumentata emolisi, incrementato fabbisogno trasfusionale, peggioramento della neutropenia e piastrinopenia, ed aumento nell'incidenza di eventi trombotici con possibile evoluzione fatale sia per la madre che per il feto. Le gravide non in terapia con eculizumab hanno un rischio di morte fetale intrauterina del 5-10%, un ritardo nell'accrescimento fetale, complicanze respiratorie, probabilità di un parto pre-termine in oltre 1/3 dei casi. In questi casi la mortalità materna è pari al 10-20% dei casi, con elevata probabilità di sviluppare patologie quali eclampsia, ipertensione gestazionale, severe infezioni.

In seguito all'introduzione di eculizumab, sono stati descritti in letteratura numerosi casi di gravidanze portate a termine con successo e senza complicazioni in soggetti con EPN. Eculizumab passa la barriera placentare mentre non è stato trovato nel latte materno. Una profilassi con eparina a basso peso molecolare è raccomandata alla dose standard di 4.000 U/die, che può essere aumentata fino al dosaggio terapeutico di 100 U/kg/die nei casi più severi. La terapia anticoagulante deve essere proseguita per almeno 6 settimane in puerperio.

Alla luce dei dati attuali, la gravidanza deve essere seguita da un team multidisciplinare esperto in gravidanze ad alto rischio, mantenendo un attento follow up anche nel periodo *post partum*, considerato anch'esso ad elevato rischio di eventi trombotici. Eculizumab va iniziato precocemente nelle donne gravide non in trattamento precedentemente, possibilmente dopo il primo trimestre, ma non vi sono dati sfavorevoli al suo uso anche nel primo trimestre di gravidanza. Se la donna è già in terapia con eculizumab questo va continuato per tutto il periodo della gravidanza senza interruzioni e proseguito per almeno 3 mesi dopo il parto. Nelle donne gravide, diversi centri

tendono ad aumentare il dosaggio e in alcuni casi anche la frequenza (settimanale) di somministrazione di eculizumab ⁽⁴⁶⁾.

EPN e interventi chirurgici

Nei pazienti sottoposti a interventi chirurgici che non sono in trattamento con eculizumab, è indicato seguire una serie di norme cliniche sia nella fase pre- che post-chirurgica al fine di limitare il rischio di episodi emolitici:

- idratazione pre e post-intervento (500-1000 cc di fisiologica/soluzione salina);
- trasfusione di emazie concentrate lavate sia nelle fasi pre che post intervento (nel caso si realizzi la necessità di eseguire emotrasfusioni). Il lavaggio delle emazie non risulta oggi giorno più necessario qualora la preparazione delle emazie sia eseguita con tecniche trasfusionali che riducano al minimo la quantità di plasma presente nella sacca finale;
- eseguire dosaggio di BNP, ECG, ed ecocardiogramma, eco-addome con studio doppler (prima e dopo l'intervento), radiografia del torace 2P (prima dell'intervento);
- usare preferenzialmente paracetamolo come analgesici nel post intervento;
- eseguire profilassi con eparina a basso peso molecolare;
- profilassi antibiotica per copertura meningococco;
- monitoraggio giornaliero pre e post intervento di emocromo, indici di emolisi (bilirubina diretta e frazionata, LDH, aptoglobina) e funzionalità renale + PCR.

Nel caso il paziente sia in trattamento con eculizumab, questo possibilmente deve essere somministrato entro 48 ore dall'intervento; nel post-intervento, se subentrano segni clinici e laboratoristici suggestivi di emolisi, l'infusione di eculizumab può essere ripetuta anche a distanza di pochi giorni dalla precedente somministrazione, accorciando quindi l'intervallo di somministrazione da 14 gg fino a 3-5 giorni, a seconda della situazione clinica.

Bibliografia

1. Oni SB, Osunkoya BO, Luzzatto L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: evidence for monoclonal origin of abnormal red cells. *Blood*. 1970;36(2):145-52.
2. Luzzatto L, Risitano AM, Notaro R. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and eculizumab. *Haematologica*. 2010;95(4):523-26.
3. Bessler M, Mason P, Hillmen P, et al. Somatic mutations and cellular selection in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Lancet*. 1994;343(8903):951-53.
4. Parker C, Omine M, Richards S, et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2005;106(12):3699-3709.
5. Schrezenmeier H, Muus P, Socie G, et al. Baseline characteristics and disease burden in patients in the International Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Registry. *Haematologica*. 2014;99(10):1574-81.
6. De Latour RP, Mary JY, Salanoubat C, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood*. 2008;112(8):3099-106.
7. Rosse WF, Dacie JV. Immune lysis of normal human and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) red blood cells. I. The sensitivity of PNH red cells to lysis by complement and specific antibody. *J Clin Invest*. 1966;45(5):736-48.
8. Luzzatto L, Bessler M, Rotoli B. Somatic mutations in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: A blessing in disguise? *Cell*. 1997;88(1):1-4.
9. Shen W, Clemente MJ, Naoko H, et al. Deep sequencing reveals stepwise mutation acquisition in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest*. 2014;124(10):4529-4538.
10. Luzzatto L. PNH from mutations of another PIG gene. *Blood*. 2013;122(7):1099-1100.
11. Krawitz PM, Hochsmann B, Murakami Y, et al. A case of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria caused by a germline mutation and a somatic mutation in PIGT. *Blood*. 2013;122(7):1312-15.
12. Kvarnung M, Nilsson D, Lindstrand A, et al. A novel intellectual disability syndrome caused by GPI anchor deficiency due to homozygous mutations in PIGT. *J Med Genet*. 2013;50(8):521-28.
13. van der Schoot CE, Huizinga TWJ, Van't Veer-Korthof E, et al. Deficiency of glycosyl phosphatidylinositol-linked membrane glycoproteins of leukocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, Description of a new diagnostic cytofluorimetric assay. *Blood*. 1990;76(9):1853-59.

14. Hall SE, Rosse WF. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 1996;87(12):5332-40.
15. Richards SJ, Rawstron AC, Hillmen P. Application of flow cytometry to the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom* 2000;42(4):223-33.
16. Borowitz MJ, Craig F, Diguseppe JA, et al. On behalf of the Clinical Flow Cytometry Society. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry - A consensus guideline. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010;78(4):211-30.
17. Dezern AE, Borowitz MJ. ICCS/ESCCA Consensus Guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders Part 1 - Clinical Utility. *Cytometry Part B*. 2018;94(1):16-22.
18. Lanza F. Issue Highlights. *Clin Cytometry*. 2018;94(4):557-560.
19. Brodsky RA, Mukhina GL, Li S, et al. Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. *Am J Clin Pathol*. 2000;114(3):459-66.
20. Sutherland DR, Kuek N, Azcona-Olivera J, et al. Use of FLAER-based white blood cell assay in the primary screening of PNH clones. *Am J Clin Pathol*. 2009;132(2):564-572.
21. Sutherland DR, Illingworth A, Marinov I, et al. ICCS/ESCCA Consensus Guidelines to detect GPI-deficient cells in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) and related Disorders Part 2 - Reagent Selection and Assay Optimization for High-Sensitivity Testing. *Cytometry Part B Clin Cytom* 2018;94(1):23-48.
22. Sutherland DR, Keeney M, Illingworth A. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal clones by flow cytometry. *Cytometry Part B*. 2012;82(4):195-208.
23. Hill A, Kelly RJ, Hillmen P. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2013;121(25):4985-96.
24. Griffin M, Hillmen P, Munir T, et al. Significant hemolysis is not required for thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* 2018; haematol.2018.198846; Doi:10.3324/haematol.2018.198846.
25. Morado M, Freire Sandes A, Colorado E, et al. Diagnostic screening of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Prospective multicentric evaluation of the current medical indications. *Cytometry Part B* 2017;92(5):361-370.
26. Lanza F, Lazzari MC, Brambilla P, et al. An unusual association of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, myelodysplastic syndrome and diffuse large B-cell Non-Hodgkin Lymphoma in a Caucasian man. *Ann Hematol*. 2016;95(9):1555-57.
27. Villegas A, Núñez R, Gaya A, et al. Presence of acute and chronic renal failure in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: results of a retrospective analysis from the Spanish PNH Registry. *Ann Hematol*. 2017;96(10):1727-1733.
28. Kokoris S, Gavrilaki E, Miari A, et al. Renal involvement in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: an update on clinical features, pathophysiology and treatment. *Hematology* 2018;23(8):558-66.
29. Ram R, Adiraju KP, Gudithi S, et al. Renal manifestations in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Indian J Nephrol*. 2017;27(4):289-93.
30. Aydin S, Barcellini W, De Vivo A, et al. Il monitoraggio del paziente con emoglobinuria parossistica notturna. *Medici Oggi*. 2017;2:1-12.
31. Hillmen P, Young NS, Schubert J, et al. The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 2006;355(12):1233-1243.
32. Brodsky RA, Young NS, Antonioli E, et al. Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2008;111(4):1840-47.
33. Brodsky RA. How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2009;113(26):6522-27.
34. Luzzatto L, Gianfaldoni G, Notaro R. Management of paroxysmal nocturnal emoglobinuria. *Br J Haematol* 2011;153(6):709-20.
35. Hillmen P, Muus P, Duhrsen U, et al. Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2007;110(12):4123-28.
36. Hill A, Rother R, Arnold L, et al. Eculizumab prevents intravascular hemolysis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and unmasks low-level extravascular hemolysis occurring through C3 opsonization. *Haematologica*. 2010;95(4):567-73.
37. Kelly RJ, Hill A, Arnold LM, et al. Long-term treatment with eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sustained efficacy and improved survival. *Blood*. 2011;117(25):6786-92.
38. Loschi M, Porcher R, Barraco F, et al. Impact of eculizumab treatment on paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a treatment versus no-treatment study. *Am J Hematol*. 2016;91(4):366-70.
39. Peffault de Latour R, Fremeaux-Bacchi V, Porcher R, et al. Assessing complement blockade in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria receiving eculizumab. *Blood*. 2015;125(5):775-83.
40. Santarone S, Bacigalupo A, Risitano A, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal emoglobinuria: long term results of a retrospective study on behalf of the Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). *Haematologica*. 2010;95(6):983-88.
41. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, et al. Impact of drug development on the use of stem cell transplantation: a report by the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant*. 2017;52(2):191-96.
42. Risitano AM, Notaro R, Pascariello C, et al. The complement receptor 2/factor H fusion protein TT30 protects paroxysmal nocturnal hemoglobinuria erythrocytes from complement-mediated hemolysis and C3 fragment. *Blood*. 2012;119(26):6307-16.
43. Lee JW, Sicre de Fontbrune F, Wong Lee Lee L, et al. Ravulizumab (ALXN1210) vs eculizumab in adult patients with PNH naive to complement inhibitors: the 301 study. *Blood*. 2019;133(6):530-39.
44. Sahelijo L, Mujeebuddin A, Mitchell D, et al. First in human single-ascending dose study: safety, biomarker, pharmacokinetics and exposure-response relationships of ALXN1210, a humanized monoclonal antibody to C5, with marked half-life extension and potential for significantly longer dosing intervals. *Blood*. 2015;126(23):4777.

Parole Chiave

Emolisi intravascolare, citofluorimetria, molecole GPI, complemento, gene PIG-A, trombosi, eculizumab

Ringraziamenti

Lavoro dedicato alla memoria del prof Luigi del Vecchio (Università degli studi di Napoli), appassionato didatta e studioso di questa malattia, oltre che collega e amico di lunga data.

Indirizzi per la corrispondenza

Francesco Lanza

UO di Ematologia, Ospedale di Ravenna,

Via Randi n. 5,

48121 Ravenna

Mail: francesco.lanza@auslromagna.it



Anemia aplastica acquisita



Antonio M. Risitano e Serena Marotta

Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia - Centro Trapianti di Midollo Osseo
Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

Introduzione

Le citopenie sono le più comuni manifestazioni ematologiche, e possono essere causate da diverse malattie ematologiche. Nella maggioranza dei casi le citopenie sono secondarie a neoplasie ematologiche o a cause iatrogene, ma in alcuni casi sono dovute a diverse alterazioni primitive del midollo osseo, che vanno sotto il nome di sindromi da insufficienza midollare^(1,2). La forma più tipica di insufficienza midollare è l'anemia aplastica (AA), una condizione in cui il normale tessuto emopoietico midollare scompare, ed il midollo osseo si presenta privo di cellule ematologiche con prevalenza (relativa) del tessuto adiposo. La prima descrizione di un caso di AA si deve a Paul Ehrlich, e risale al 1888; l'introduzione del termine aplasia si deve però probabilmente ad una successiva descrizione da parte di Vaquez e Aubertin⁽³⁾. Da allora sono state identificate diverse forme di AA (o aplasia midollare), alcune delle quali sono congenite altre acquisite (Tabella 1). Le forme congenite sono generalmente associate a specifici quadri sindromici, e sono fisiopatologicamente caratterizzate da deficit funzionali intrinseci delle cellule staminali emopoietiche (CSE)⁽⁴⁾. A seconda della specifica malattia vi è la compromissione di specifiche funzioni cellulari: nell'anemia di Fanconi è compromesso il riparo del DNA,^(5,6) nella discheratosi congenita vi è un deficit della preservazione della lunghezza dei telomeri (da questo il nome di telomeropatie)⁽⁷⁻⁹⁾ mentre difetti della funzione ribosomiale sono tipici della sindrome di Schwachman-Diamond⁽¹⁰⁾ e della anemia di Diamond-Blackfan⁽¹¹⁾ (e di altre patologie definite appunto ribosomopatie)⁽¹¹⁾. Più frequentemente, l'AA è una patologia acquisita, definita AA idiopatica perché nella maggioranza dei casi non è identificabile nessuna causa specifica (fanno eccezione le forme iatrogene secondarie ad irradiazione⁽¹²⁾ o a farmaci mielotossici,⁽¹³⁾ e le rare forme associate ad infezioni virali)^(14,15). Dal punto di vista fisiopatologico i meccanismi patogenetici delle forme acquisite sono completamente diversi da quelli delle forme congenite, in quanto non vi è evidenza di alterazioni funzionali intrinseche delle CSE, e sono dimostrate sistematiche alterazioni immunologiche che definiscono una chiara patogenesi immuno-mediata (nonostante dal punto di vista terminologico persista la definizione di AA idiopatica). In questa review ci soffermeremo sulla AA acquisita idiopatica (immuno-mediata), discutendo le più recenti acquisizioni fisiopatologiche e le ultime novità terapeutiche.

AA costituzionali

- Anemia di Fanconi
- Discheratosi congenita
- Sindrome di Shwachman-Diamond
- Sindrome di Diamond-Blackfan
- Trombocitopenia amegacariocitica

AA acquisite

Primitiva

Isolata

- Anemia aplastica idiopatica

Eventualmente associate con diverse condizioni mediche

- Malattie ematologiche:
 - Emoglobinuria parossistica notturna (sindrome AA/EPN)
 - Disordini da linfociti LGL
- Epatite sieronegativa (sindrome epatite-anemia aplastica)
- Malattie autoimmuni
 - Fascite eosinofila
 - Artrite reumatoide
 - Ipogammaglobulinemia
- Timoma
- Gravidanza

Secondarie

- Radiazioni
- Agenti chimici e farmaci
 - Tossicità diretta (farmaci citostatici, benzene, etc.)
 - Reazioni idiosincrasiche (cloramfenicolo, FANS, insetticidi, anti-convulsivi, antiprotozoari, sulfamidici ed altri antibiotici, anti-tiroidei, anti-diabetici, inibitori dell'anidrasa carbonica, sedativi e tranquillanti, allopurinolo, oro e altri metalli pesanti)
- Virus
 - Virus epatitici non-A, non-B, non-C
 - Epstein-Barr virus
 - Citomegalovirus
 - Parvovirus
 - HIV

Tabella 1 Classificazione delle anemie aplastiche.

Fisiopatologia

La presentazione tipica dell'AA è la pancitopenia, che è chiaramente secondaria alla compromissione della funzione midollare, caratterizzata dalla riduzione di tutti i progenitori emopoietici e di conseguenza delle cellule mature del sangue. La fisiopatologia dell'AA è stata studiata in maniera approfondita a partire dagli anni '70, ed è stato possibile identificare i diversi momenti fisiopatologici alla base della malattia.

Cellule staminali emopoietiche

La funzione emopoietica del midollo è sostenuta da un numero relativamente ridotto (poche centinaia) di CSE, che sono in grado di garantire la produzione di tutte le cellule mature del sangue durante l'intera vita di un soggetto. La caratteristica peculiare delle CSE è la capacità di avere una divisione cellulare asimmetrica: dopo questo tipo di divisione una cellula figlia si differenzia, mentre l'altra rimane una CSE, garantendo l'integrità del compartimento delle CSE. Lo studio delle CSE nell'uomo non è semplice, ma si avvale di alcuni saggi *in vitro* che rappresentano un ottimo surrogato funzionale delle CSE; tra questi, il più specifico è la valutazione delle cellule inizianti le colture a lungo termine (*long-term culture initiating cells, LTC-IC*). I saggi di LTC-IC hanno dimostrato che nei pazienti affetti da AA il numero di LTC-IC è drasticamente ridotto sia nel sangue periferico sia nel sangue midollare;^(16, 17) questa compromissione quantitativa del pool di CSE è documentabile anche usando test meno specifici, come i progenitori emopoietici valutati nelle colture in metilcellulosa e le cellule CD34+ valutate in citofluorimetria^(17, 18). I saggi di LTC-IC sono basati sulla co-cultura di potenziali progenitori emopoietici su cellule stromali midollari: è opportuno sottolineare che nei pazienti aplastici la compromissione è limitata alla componente emopoietica, mentre la funzione stromale è perfettamente normale⁽¹⁶⁾. Questi dati documentano in maniera univoca come nei pazienti con AA vi sia una compromissione quantitativa delle CSE, ma non danno informazioni sulla causa che ha provocato la deplezione del compartimento staminale. Infatti, la documentazione della riduzione delle CSE (o almeno di quelle funzionali) non permette di chiarire se essa sia stata causata dalla distruzione diretta di alcune CSE, dalla loro inibizione funzionale, o dalla semplice perdita della capacità di divisione asimmetrica (in altri termini, le CSE si sono a poco a poco trasformate in progenitori senza capacità di *self-renewal*). Dal punto di vista funzionale, le CSE residue dei pazienti affetti da AA sono state studiate con il *gene expression profiling*: l'analisi del trascrittoma documenta l'aumentata espressione di geni coinvolti nell'apoptosi e nella risposta immunologica/infiammatoria o allo stress, senza aumento dell'espressione di geni coinvolti nel ciclo cellulare⁽¹⁹⁾. Questi dati sembrano confermare che nei pazienti affetti da AA la compromissione delle CSE è esclusivamente quantitativa, e che le CSE residue sono qualitativamente normali, anche se funzionalmente compromesse a causa del danno estrinseco.⁽¹⁹⁾ Le cause di questo danno estrinseco sono discusse di seguito.

Citochine e infiammazione

Una delle osservazioni cardine nello studio della fisiopatologia delle AA è stata la documentazione che nei pazienti i livelli di interferone γ (IFN- γ) sono aumentati sia nel sangue circolante sia, soprattutto, nel sangue midollare⁽²⁰⁾. Poiché era ben noto che IFN- γ fosse una delle citochine con maggiore azione inibitoria sulle cellule emopoietiche, fu subito intuito che le aumentate concentrazioni di IFN- γ fossero uno dei meccanismi patogenetici della compromissione delle CSE nell'AA⁽²⁰⁾. Questa ipotesi era anche supportata da dati sperimentali *in vitro*, secondo i quali l'aggiunta di anticorpi anti-IFN- γ nelle colture emopoietiche dei pazienti affetti migliorava la crescita *in vitro* dei progenitori emopoietici dei pazienti affetti (mentre nelle colture di soggetti sani non si osservava nessuna differenza)⁽²⁰⁾. L'azione inibitoria di IFN- γ e di altre citochine (per es. TNF- α)^(21, 22) sui progenitori emopoietici è stata largamente confermata in studi successivi, che hanno documentato come questa azione sia sia diretta (per es. attraverso recettori dell'IFN che regolano i *pathways* intracellulari di STAT e SOCS, con effetto sulla capacità proliferante e sulla capacità di *self-renewal* delle CSE),⁽²³⁾ sia mediata dall'iperespressione di Fas, che rende le cellule più suscettibili all'apoptosi⁽²⁴⁾. Una ulteriore conferma del ruolo cardine dell'IFN- γ è venuta da un elegante modello *in vitro*, in cui l'azione inibitoria di IFN- γ è stata documentata in colture emopoietiche a lungo termine effettuate con cellule stromali modificate per produrre costitutivamente significative quantità di IFN- γ ⁽²⁵⁾. Più recentemente nuovi dati sperimentali hanno ipotizzato un nuovo meccanismo dell'azione inibitoria di IFN- γ sui progenitori emopoietici: IFN- γ sembrerebbe infatti formare degli eterodimeri con la trombopoietina (TPO), andando in tal modo ad interferire con l'interazione tra la TPO e il suo recettore cMPL, inibendo di fatto un meccanismo di trasduzione del segnale essenziale per la sopravvivenza delle CSE⁽²⁶⁾. L'importanza dell'IFN- γ nella fisiopatologia dell'AA è anche supportata da osservazioni *in vivo*, che documentano come la presenza di linfociti T produttori di IFN- γ sia documentabile nella maggioranza dei pazienti affetti da AA, e correli in maniera diretta con l'attività della malattia stessa⁽²⁷⁾. Questi dati sono di particolare interesse perché suggeriscono che la produzione aberrante di IFN- γ derivi dai linfociti T, che rappresentano appunto un altro degli attori principali coinvolti nella fisiopatologia delle AA.

Immunità mediata dalle cellule T

Il possibile ruolo del sistema immunitario, ed in particolare dei linfociti T, nella fisiopatologia dell'AA è stato ipotizzato fin dai primi studi sperimentali sulle AA^(28, 29). Già a metà degli anni '80 era chiaro che nei pazienti con AA vi fosse un aumento di linfociti T CD8+ a fenotipo citotossico,⁽³⁰⁻³²⁾ che potevano esercitare una forte azione inibitoria sull'emopoiesi sia attraverso la produzione di citochine⁽²⁰⁾ sia attraverso una citotossicità cellulare diretta mediata da perforina o da Fas.^(24, 33) Studi più recenti hanno chiarito come nei pazienti affetti da AA vi sia una aberrante polarizzazione dei linfociti, con aumento dei Th1 (con iperespressione di TBET)⁽³⁴⁾ e dei Th17,⁽³⁵⁾ e riduzione dei Th2 e dei Treg.^(36, 37) Ancora oggi

però non è completamente chiarito se la presenza di questi linfociti citotossici⁽³⁸⁾ produttori di citochine di tipo 1 (IFN- γ e TNF- α) sia un epifenomeno generato nell'ambito di un più ampio disordine infiammatorio, o piuttosto il segno di un disordine autoimmune, eventualmente antigene-specifico. La dimostrazione nei pazienti affetti da AA di diffuse alterazioni di diverse sottopopolazioni T, ed in particolare dei diversi sottotipi di Tregs (che regolano gran parte della funzionalità delle cellule T),⁽³⁹⁾ rappresenta un forte indizio che l'AA sia una malattia auto-immune mediata da cellule T. Negli anni, un forte supporto a questa ipotesi è venuto dagli studi sul repertorio dei linfociti T, mirati ad evidenziare la presenza di popolazioni oligo-clonali (detectate in base alla sequenza del loro TCR) come marcatore surrogato di una risposta immune specifica antigene-indotta. Questi studi, condotti da diversi gruppi, hanno chiaramente documentato come il repertorio T-cellulare dei pazienti affetti da AA sia oligoclonale a causa dell'espansione (verosimilmente antigene-indotta) di pochi cloni T auto-reattivi⁽⁴⁰⁻⁴³⁾. In alcuni di questi studi è stato anche dimostrato il ruolo patogenetico di questi cloni, attraverso la loro azione inibitoria *in vitro*^(40, 44) e/o attraverso la loro correlazione con l'attività di malattia *in vivo*⁽⁴⁴⁾. Sulla base di questi dati è ormai riconosciuto che l'AA è una malattia auto-immune mediata da cellule T; al momento, non è stato però identificato l'antigene alla base della risposta immune patologica. Negli anni, diversi auto-anticorpi specifici per diverse proteine (*kinectin*, *diazepam-binding inhibitor-related protein 1* e *moesin*)⁽⁴⁵⁻⁴⁸⁾ sono stati identificati nei pazienti affetti da AA, ma il loro ruolo fisiopatologico è molto dubbio, e sembrano alterazioni aspecifiche secondarie alla compromissione del controllo immunologico e non indicatori specifici di antigeni potenzialmente coinvolti nella fisiopatologia delle AA. Ad oggi, l'identificazione dell'antigene (o degli antigeni) alla base della risposta auto-immune causa dell'AA è risultata impossibile, anche se alcune osservazioni descritte di seguito sembrano suggerire alcune valide ipotesi di lavoro.

AA ed emoglobinuria parossistica notturna

L'AA è una rara malattia ematologica con incidenza nel mondo occidentale di 1-3 casi per milione di abitanti; in maniera sorprendente, quasi la metà dei casi⁽⁴⁹⁾ si associa ad un'altra rarissima malattia ematologica, l'emoglobinuria parossistica notturna (EPN)⁽⁵⁰⁾. Chiaramente, una così frequente associazione tra due patologie così rare non può essere una coincidenza,⁽⁵¹⁾ ed ha permesso di capire meglio la fisiopatologia di entrambe le malattie, con la loro eventuale correlazione. L'EPN è definita clinicamente dalla triade sintomatologica di anemia emolitica cronica complemento-mediata, severo stato trombofilico ed insufficienza midollare⁽⁵⁰⁾. Dal punto di vista clinico, l'associazione tra AA ed EPN è dovuta all'osservazione che pazienti con diagnosi iniziale di AA possono successivamente sviluppare una EPN, e viceversa^(52, 53). Inoltre, molto spesso le manifestazioni delle due malattie possono coesistere, in maniera clinica o sub-clinica: come detto sopra, circa il 40% dei pazienti con AA presenta una popolazione di cellule a fenotipo EPN (indipendentemente dalle manifestazioni cliniche di emolisi o trombosi),^(49, 54)

e una percentuale anche superiore di pazienti con EPN presenta citopenie più o meno severe che possono andare a configurare la sindrome clinica AA/EPN,^(55, 56) o delle forme intermedie in cui l'emolisi è associata a citopenie che non consentono la diagnosi di AA conclamata⁽⁵⁷⁾. L'EPN è una malattia clonale non neoplastica dovuta all'espansione di una o più CSE con una mutazione somatica del gene *PIGA*⁽⁵⁸⁾; il deficit enzimatico conseguente (che impedisce la sintesi dell'ancora di glicosil-fosfatidil-inositolo-GPI⁽⁵⁹⁾, e di conseguenza l'espressione in membrana di tutte le proteine *GPI-linked*, tra cui i regolatori del complemento CD55 e CD59), determina il fenotipo clinico legato all'incapacità delle cellule affette di regolare sulla propria superficie l'attivazione complementare. Dal punto di vista fisiopatologico, la caratteristica dell'EPN è l'espansione di CSE *PIGA*^{mut}, che non hanno alcun vantaggio intrinseco di crescita. Queste stesse cellule *PIGA*^{mut} sono presenti anche nei soggetti sani, nei quali restano però a livelli bassissimi (< 30 cellule per milione);⁽⁶⁰⁾ al contrario, le cellule *PIGA*^{mut} tendono ad espandersi nei soggetti affetti da AA⁽⁴⁹⁾. Tutte queste osservazioni portano due conclusioni:

- L'evento cardine della fisiopatologia dell'EPN (e cioè l'espansione delle cellule *PIGA*^{mut}) richiede non solo la mutazione somatica del gene *PIGA*, ma anche la presenza di una condizione concomitante che permetta una selezione darwiniana delle CSE *PIGA*^{mut}^(61, 62). Questa condizione non è altro che un attacco immunologico che, essendo specifico per le CSE normali e risparmiando quelle *PIGA*^{mut}, determina una pressione selettiva immunologica che favorisce l'espansione dell'emopoiesi *PIGA*^{mut}^(62, 63).
- L'evento cardine della fisiopatologia dell'AA potrebbe essere un attacco auto-immune simile a quello alla base dell'EPN: in particolare, almeno in alcuni casi, è possibile ipotizzare che l'antigene target sia condiviso, giustificando la frequente emergenza di popolazioni *PIGA*^{mut} nei pazienti con AA.

Nell'ambito dell'EPN, è stato ipotizzato che l'antigene target possa essere la stessa ancora GPI, che è appunto assente sulle cellule *PIGA*^{mut}; trattandosi di un antigene glicolipidico, non sarebbe presentato attraverso molecole HLA ma attraverso CD1d. Questa ipotesi è stata studiata ricercando nei pazienti EPN la presenza di cellule T specifiche per l'ancora GPI. In un elegante studio che ha utilizzato una stimolazione con cellule presentanti l'antigene GPI all'interno di CD1d è stato documentato come in tutti i pazienti con EPN siano evidenziabili piccole popolazioni di linfociti T specifici per l'ancora GPI⁽⁶⁴⁾. Più recentemente, gli stessi linfociti GPI-specifici sono stati documentati anche nel 75% dei pazienti con AA⁽⁶⁵⁾. Tutti questi dati corroborano l'ipotesi che uno dei possibili antigeni dell'attacco immunologico mediato da cellule T alla base dell'AA possa essere l'ancora GPI.

AA e immune escape

L'associazione tra AA e EPN e i dati sperimentali descritti sopra confermano la presenza di un attacco immunologico alla base dell'AA; in questo contesto, mutazioni inattivanti del gene *PIGA* permettono lo sviluppo di cellule *PIGA*^{mut} fenotipicamente suscettibili di espansione selettiva, in quanto risparmiate dall'attacco im-

munologico. Questo *immune escape* è ampiamente riconosciuto e documentato nel contesto dell'EPN,^(63, 66, 67) ed è un'ulteriore conferma della fisiopatologia immuno-mediata dell'AA. Va però sottolineato che probabilmente il fenomeno *immune escape* potrebbe essere molto più ampio e versatile, in quanto qualsiasi clone che sviluppi una resistenza all'attacco immunologico sottostante all'AA potrebbe espandersi⁽⁶⁸⁾. In accordo con questa interpretazione c'è la recente osservazione che cellule ematologiche che non esprimono particolari antigeni HLA possono espandersi nel contesto di una AA^(69, 70). Una migliore comprensione di questi meccanismi immunologici sembra essenziale per una corretta interpretazione dei dati relativi all'espansione di cloni ematopoietici ed alla loro cinetica nell'ambito della storia naturale e dell'evoluzione clinica dell'AA.

Diagnosi e presentazione clinica

Il sospetto e la diagnosi di AA sono basati sul riscontro della citopenia, riguardante una o più linee ematologiche; la gravità della citopenia determina anche la severità della AA^(71, 72).

La diagnosi di **AA moderata** è basata sulla presenza di almeno 2 delle seguenti condizioni: i) Hb <10 g/dL; ii) neutrofilo <1.000/ μ L; iii) piastrine <80.000/ μ L. La diagnosi di **AA severa** è basata sulla documentazione di una cellularità <30% alla biopsia ossea, in associazione ad almeno 2 delle seguenti condizioni: i) reticolociti <60.000/ μ L (con i contatori automatici, <20.000 in caso di conta manuale al microscopio); ii) neutrofilo <500/ μ L; iii) piastrine <20.000/ μ L.

Nel caso in cui nel contesto di una AA severa la conta di neutrofilo sia <200/ μ L, la malattia viene definita **AA super-severa**. Va sottolineato che, oltre all'emocromo, la diagnosi di AA necessita non solo dell'agoaspirato midollare ma anche della biopsia ossea. Come già detto, per la diagnosi di AA severa è necessario che la cellularità midollare alla biopsia ossea sia inferiore al 30%; l'ipocellularità è generalmente visibile anche all'agoaspirato midollare, che però non è sufficiente per una diagnosi definitiva. Lo studio del sangue midollare va sempre completato con l'analisi citogenetica, che è essenziale per la diagnosi differenziale con alcune forme di sindrome mielodisplastica a presentazione ipoplasica. La conta citofluorimetrica delle cellule CD34⁺ può in questi casi risultare informativa, in quanto nei soggetti con AA le cellule CD34⁺ sono generalmente <0,1% (e comunque <1%). Lo studio citofluorimetrico del sangue periferico mirato alla ricerca di popolazioni cellulari GPI-carenti (cioè a fenotipo EPN) può essere molto informativa sia per documentare la presenza di piccole popolazioni a forte significato fisiopatologico (la presenza di cellule EPN rappresenta *bona fide* una conferma della presenza di una AA acquisita immuno-mediata), sia eventualmente per riconoscere un'eventuale sindrome AA/EPN.

Altri esami specifici mirati a studiare gli aspetti immunologici (per es., studio delle sottopopolazioni linfocitarie, studio del riarrangiamento del TCR, studio delle citochine circolanti, etc.) hanno al momento solo scopo di ricerca e non sono utilizzati nella pratica clinica quotidiana. Ulteriori esami di approfondimento sono necessari non tanto a confermare la presenza dell'AA, ma quanto ad escludere

altre patologie che potrebbero presentarsi con un quadro aplastico. Nella diagnosi differenziale della AA vanno innanzitutto inserite tutte le neoplasie ematologiche che possono manifestarsi con una citopenia periferica. Nella maggioranza dei casi lo studio dell'agoaspirato midollare (con la conta delle cellule CD34⁺ e l'analisi cariotipica) e della biopsia ossea permettono di giungere facilmente alla diagnosi corretta, ma va ricordato che talvolta la diagnosi differenziale può essere più complicata del previsto (per es. nel caso di forme pauciblastiche, o in alcuni casi di leucemie acute megacarioblastiche, o ancora nelle mielofibrosi). Una volta effettuata la diagnosi presuntiva di AA diventa indispensabile definirne la possibile causa, in modo da definire la forma specifica di AA. In questo contesto è indispensabile innanzitutto differenziare tra le forme acquisite e quelle costituzionali, effettuando tutti gli esami che possono aiutare nella diagnosi (su tutti, il test di instabilità cromosomica al diepossibutano, DEB test, per la diagnosi di anemia di Fanconi, e lo studio della lunghezza dei telomeri per la diagnosi della discheratosi congenita o di altre telomeropatie)⁽⁴⁾. A tale proposito va sottolineato come negli ultimi anni si sia dimostrato che le forme costituzionali possono talvolta presentarsi clinicamente anche nell'età adulta, suggerendo di estendere anche agli adulti lo screening per le forme costituzionali. In base alla probabilità di trovarsi di fronte ad una forma costituzionale (età, fenotipo clinico, anamnesi ematologica) potrà valutarsi l'indicazione ad esami di secondo livello mirati alla ricerca specifica delle più frequenti mutazioni associate alle AA costituzionali (alcuni di questi esami sono già rientrati nella routine standard per lo studio delle AA pediatriche). Una volta escluse le forme costituzionali, la diagnostica differenziale delle forme acquisite di AA è relativamente semplice: la fisiopatologia immuno-mediata può essere confermata in base alla presenza di cellule a fenotipo EPN, mentre hanno minimo valore clinico più sofisticati studi immunologici. Negli ultimi anni, con lo sviluppo delle tecnologie di *next generation sequencing* (NGS), sta diventando possibile identificare la presenza di cloni con specifiche mutazioni somatiche; l'interpretazione di questi dati però resta estremamente complessa (e non univocamente condivisa), e ad oggi l'identificazione di queste mutazioni somatiche non è informativa né a diagnosi né durante il follow up.

Dal punto di vista clinico, le manifestazioni della malattia sono direttamente secondarie alla gravità della citopenia, con l'astenia tipica dell'anemia, il rischio infettivo associato alla neutropenia, e quello emorragico associato alla piastrinopenia. Queste manifestazioni non sono diverse da quelle osservabili nelle citopenie causate da altre condizioni morbose. Anche se non esistono altre manifestazioni cliniche tipiche dell'AA, va comunque ricordato che talvolta l'AA può essere associata ad altre condizioni cliniche che vanno tempestivamente identificate e riconosciute; tra queste, oltre all'EPN già discussa in precedenza (con le manifestazioni emolitiche e trombotiche), vanno sottolineate l'epatite sieronegativa (quadro della sindrome epatite/AA), le AA associate ad altre patologie autoimmuni (in particolare la fascite eosinofila) e le forme associate a timoma. La presenza di linfociti LGL (*large granular lymphocytes*)

è relativamente frequente nei pazienti con AA, e può rappresentare un marcatore della aberrante (e patogenetica) risposta T cellulare e non necessariamente una neoplasia a cellule T.

Terapia

Il trattamento dell'AA è basato su due opzioni terapeutiche: il trapianto di midollo osseo (TMO) allogenico e la terapia immunosoppressiva (IST). Storicamente, è bene ricordare che queste due strategie terapeutiche hanno entrambe le loro radici nei primi tentativi di TMO effettuati negli anni '70^(73,74). In quelle esperienze fu osservato in maniera inattesa che alcuni pazienti che rigettavano il midollo del donatore dopo un periodo variabile avevano un miglioramento della loro funzione emopoietica grazie ad una ricostituzione autologa⁽⁷³⁻⁷⁵⁾. Sulla base di queste osservazioni si sviluppò l'ipotesi che la ricostituzione autologa fosse dovuta all'azione della IST somministrata durante il regime di condizionamento pre-TMO e non al trapianto stesso delle CSE allogeniche^(75,76). Le successive sperimentazioni cliniche documentarono come l'IST a base di globulina anti-linfocitaria (ALG) fosse in grado di migliorare la funzione emopoietica dei pazienti affetti da AA, indipendentemente dall'aggiunta di CSE allogeniche⁽⁷⁶⁻⁷⁸⁾. Da allora, IST e TMO sono diventate le due terapie standard dell'AA^(79,80); la scelta tra le due opzioni terapeutiche è basata sulle probabilità di successo delle due terapie, che sono condizionate da diversi fattori riguardanti il paziente specifico.

Trapianto di midollo osseo allogenico

Come già detto, il TMO è stato il primo trattamento efficace per l'AA, e di converso l'AA è stata tra le prime indicazioni per le quali il TMO si è dimostrato efficace. I primi trapianti effettuati per AA negli anni '60 hanno utilizzato donatori singenici,⁽⁸¹⁾ mentre negli anni '70 il TMO da donatore familiare HLA-identico si è consolidato come terapia potenzialmente curativa per le AA⁽⁷⁴⁾ e cominciarono le prime aneddotiche segnalazioni di trapianti da donatori non familiari⁽⁸²⁾. Da allora i risultati del TMO come trattamento delle AA sono progressivamente migliorati, grazie ad una migliore prevenzione e trattamento della più temibile complicanza del TMO, la malattia da trapianto verso l'ospite (*graft versus host disease*, GvHD). Va sottolineato infatti che, non essendo l'AA una malattia neoplastica che può beneficiare di una reazione allogenica (la cosiddetta *graft versus leukemia*) per la prevenzione della ricaduta, la GvHD è la complicanza che più di tutte impatta sulla mortalità e morbilità dei pazienti AA sottoposti a TMO. La prima misura preventiva per la prevenzione della GvHD è la scelta di un donatore il più compatibile possibile: da questo punto di vista fin dagli anni '80 è stato chiaro come ci fosse un gap considerevole tra i risultati del TMO da donatore familiare HLA-identico e quelli da donatore HLA-identico non familiare. Grazie alle migliori tecniche di tipizzazione tissutale negli ultimi anni questa differenza si è progressivamente ridotta, e la sopravvivenza dei pazienti trapiantati da donatore non familiare è simile (ma comunque leggermente inferiore) a quella dei trapianti da donatore familiare^(83,84). Il condizionamento pre-TMO nelle AA è mirato più alla deplezione del sistema immunitario (indispensabile

per permettere l'attecchimento, e necessario per trattare l'alterazione immunologica alla base dell'AA) che non alla mielo-ablazione (di fatto si tratta di un condizionamento non mielo-ablativo). Storicamente, il condizionamento che si è dimostrato più efficace è stato basato sull'utilizzo della ciclofosfamida ad alte dosi (200 mg/kg suddivise in 4 giorni)⁽⁸⁵⁾; l'aggiunta alla ciclofosfamida della globulina anti-timocitaria di coniglio (r-ATG, Thymoglobuline®) ha dimostrato di migliorare l'outcome, riducendo l'incidenza di GvHD. Il beneficio del r-ATG non era emerso inizialmente nella prima analisi di uno studio randomizzato⁽⁸⁶⁾, ma è stato successivamente dimostrato da numerose analisi retrospettive^(87,88). Queste stesse analisi hanno anche documentato come la scelta della fonte delle CSE abbia un impatto importante sulla prognosi a lungo termine, in quanto le CSE midollari sono associate ad un minore rischio di GvHD e a una sopravvivenza a lungo termine superiore rispetto alle CSE periferiche^(87,88). La procedura trapiantologica standard per un paziente affetto da AA trapiantato da donatore familiare HLA-identico prevede:⁽⁸⁹⁾ i) un condizionamento a base di ciclofosfamida 200 mg dose totale; ii) l'aggiunta di una T-deplezione in vivo a base di r-ATG; iii) l'utilizzo del midollo come fonte di CSE; iv) una immunosoppressione post-trapianto a base di ciclosporina A (CsA) e metotressato. In considerazione dell'elevata tossicità riscontrata nei pazienti >40 anni, in questo setting sono stati sviluppati protocolli di condizionamento alternativi basati sull'utilizzo della fludarabina in associazione alla ciclofosfamida, eventualmente con una minima dose di irradiazione corporea totale (2 Gy)⁽⁹⁰⁾. L'ottimizzazione delle procedure trapiantologiche ha portato la sopravvivenza dei pazienti sottoposti a TMO da donatore familiare HLA-identico a percentuali variabili tra il 50% e l'85%, determinate in larga parte dall'età del donatore⁽⁹¹⁾. Come anticipato, i risultati dei TMO da donatore MUD restano leggermente inferiori rispetto a quelli da donatore familiare, ma non cambiano i fattori di rischio e le misure da attuare per migliorare l'outcome. Nel TMO da donatore non familiare i regimi di condizionamento utilizzati sono diversi, e tutti basati sulla combinazione tra la fludarabina e la ciclofosfamida⁽⁹²⁾. In questo setting va sottolineato come si cerchi di ridurre la dose totale di ciclofosfamida; in un recente studio di fase I-II è stato documentato che la dose ottimale non dovrebbe superare i 50-100 mg/kg totali⁽⁹³⁾. Va sottolineato come la compatibilità HLA resti un fattore determinante per il successo del TMO, e la presenza di anche un singolo mismatch riduca la probabilità di sopravvivenza di quasi il 10%⁽⁹⁴⁾. A maggior ragione, secondo quanto visto anche per i trapianti da donatore familiare, è indispensabile ridurre il rischio di GvHD effettuando una T deplezione in vivo, preferendo il midollo come fonte di CSE, e effettuando una adeguata immunosoppressione di mantenimento nell'immediato periodo post-TMO.

Terapia immunosoppressiva

La storia moderna dell'IST dell'AA comincia negli anni '80, quando sulla base dei dati retrospettivi delle esperienze prevalentemente europee⁽⁹⁵⁾ furono disegnati i primi trial clinici a base di globulina anti-timocitaria di cavallo (h-ATG, siero anti-linfocitario

di cavallo). I dati del primo trial randomizzato verso placebo (in cui la percentuale di risposta era del 52%)⁽⁹⁶⁾ stabilirono il ruolo fondamentale dell'IST quale terapia eziologica per tutti i pazienti affetti da AA senza un donatore familiare HLA-identico⁽⁹⁶⁾. I rate di risposta sono stati in seguito confermati in altri trial clinici,^(97, 98) e furono successivamente migliorati con l'aggiunta della CsA, che in uno studio randomizzato di fase III portò le percentuali di risposte globali a 6 mesi fino al 65% (rispetto al 31% del braccio di controllo con h-ATG in monoterapia⁽⁹⁹⁾). Questi migliori risultati erano confermati anche a follow up più tardivi, attraverso i quali si documentava l'impatto della terapia di mantenimento con CsA per la prevenzione della ricaduta⁽¹⁰⁰⁾. Dalla fine degli anni '80 l'associazione tra h-ATG e CsA è diventata la IST standard per i pazienti affetti da AA, con un rate di risposte globali del 60-70%, confermato in numerosi studi prospettivi e retrospettivi⁽¹⁰¹⁻¹⁰³⁾.

Nei 20 anni successivi sono stati effettuati diversi tentativi per migliorare i risultati di questo regime di IST, purtroppo tutti senza successo. Tra i farmaci che non sono riusciti a migliorare l'efficacia dell'IST quando aggiunti a h-ATG e CsA vanno ricordati agenti immunosoppressivi come il micofenolato mofetile⁽¹⁰⁴⁾ e la rapamicina⁽¹⁰⁵⁾ ed il G-CSF^(106, 107). Altri farmaci con potente azione linfolitica sono stati utilizzati in alternativa a h-ATG come agenti linfocito-depletanti: la ciclofosfamida è stata descritta efficace in una esperienza monocentrica (con tasso di risposta del 50-70%),^(108, 109) ma questi dati non sono stati confermati in un successivo trial randomizzato chiuso precocemente per l'elevata mortalità infettiva associata alla ciclofosfamida ad alte dosi⁽¹¹⁰⁾. L'anticorpo monoclonale anti-CD52 alemtuzumab ha anch'esso mostrato una buona efficacia, con un profilo di tossicità accettabile^(111, 112). Il successivo sviluppo clinico nelle AA è stato compromesso dai risultati di uno studio di fase III per il trattamento di prima linea, in cui il braccio alemtuzumab è stato chiuso precocemente per l'elevata mortalità (3 casi) e la ridotta efficacia sui primi 16 pazienti arruolati⁽¹¹²⁾. Un discorso a parte merita l'utilizzo di una differente formulazione di ATG, la globulina anti-timocitaria di coniglio (r-ATG, Thymoglobuline®); il r-ATG era stato inizialmente utilizzato come terapia di seconda linea, con ottimi risultati clinici (risposte in circa il 50% nei ricaduti, e in circa il 30% dei refrattari)^(113, 114). Sulla base di questi dati, era stato disegnato uno studio randomizzato di fase III mirato a dimostrare la superiorità della terapia r-ATG + CsA rispetto a h-ATG + CsA. I risultati di questo studio hanno invece dimostrato che la terapia con r-ATG aveva una efficacia significativamente inferiore (a 6 mesi risposte globali 37% vs 68%), con un impatto significativo anche sulla sopravvivenza⁽¹¹⁵⁾. Questi dati sono stati successivamente confermati in un altro studio prospettico in cui la terapia con r-ATG e CsA è stata confrontata con una coorte retrospettiva⁽¹¹⁶⁾. Da allora numerosi studi retrospettivi hanno analizzato l'efficacia del r-ATG nel trattamento delle AA, con risultati abbastanza contrastanti (il rate di risposte varia tra il 35% ed il 65%). Nonostante alcuni studi documentino risultati eccellenti e siano basati su casistiche molto vaste,⁽¹¹⁷⁾ al momento nessuno studio ha potuto contrastare l'evidenza clinica basata sullo studio randomizzato condotto dall'NIH⁽¹¹⁵⁾.

A 50 anni dalla sua introduzione, l'IST standard per il trattamento dell'AA resta basata sull'associazione tra h-ATG (l'unica formulazione disponibile è rimasta l'ATGAM®, da utilizzare al dosaggio di 40 mg/kg/die per 4 giorni consecutivi) e CsA. In caso di mancata disponibilità di h-ATG, può essere utilizzato il r-ATG, che pure avendo una documentata attività biologica è associato ad una ridotta efficacia terapeutica.

Algoritmo terapeutico

Il successo del trattamento dell'AA dipende da molteplici fattori, in parte specifici per il trattamento effettuato, ed in parte comuni. Tra questi ultimi, l'età ha indubbiamente un impatto sulla sopravvivenza sia dopo IST⁽¹⁰⁷⁾ sia ancora di più dopo TMO⁽¹¹⁸⁾. Tra i fattori specifici per trattamento, nell'ambito del TMO un ruolo determinante è ricoperto dalla compatibilità HLA (e quindi dal tipo di donatore: HLA-identico familiare, vs HLA-identico non-familiare vs HLA-mismatched) e da alcune modalità di esecuzione del trapianto stesso (per es. l'utilizzo di CSE midollari vs periferiche⁽⁸⁸⁾ o l'utilizzo di una deplezione T in vivo)⁽¹¹⁹⁾. La scelta della più appropriata strategia terapeutica è basata sulle analisi retrospettive del trattamento delle AA, che permette di predire la sopravvivenza attesa con l'IST o con il TMO per ciascun paziente⁽⁹¹⁾. In base a questi dati è possibile definire un algoritmo terapeutico relativamente semplice, che al momento è condiviso dalla maggioranza degli esperti (Figura 1)^(118, 120-122). Nei pazienti minori di 20 anni il TMO da donatore HLA identico ha una sopravvivenza globale e libera da malattia a lungo termine dell'80-90%; poiché con l'IST la sopravvivenza globale è simile, ma quella libera da malattia è notevolmente inferiore, in pazienti <20 anni il TMO da donatore HLA-identico familiare è la terapia di prima linea. Nel caso in cui non vi sia un donatore HLA-identico familiare disponibile l'IST è generalmente la terapia di prima linea preferita. Ma poiché in questo setting anche i risultati del TMO da donatore HLA-identico non familiare appaiono (utilizzando alcuni protocolli di TMO) estremamente buoni, con una sopravvivenza a lungo termine >80%⁽¹²³⁾, in casi selezionati (e soprattutto quando un donatore è rapidamente disponibile) nei soggetti <20 anni può essere preso in considerazione come terapia di prima linea anche il TMO da donatore non familiare. Nei pazienti AA di età compresa tra i 20 e 40 anni l'outcome del TMO da donatore familiare HLA-identico è progressivamente migliorato negli ultimi decenni, ed al momento è associato ad una sopravvivenza libera da malattia attesa del 70-80%; anche se i risultati trapiantologici sono inferiori ai pazienti più giovani, la sopravvivenza globale e soprattutto libera da malattia resta comunque superiore a quella attesa con l'IST. Per tale motivo, anche nei pazienti AA di età tra i 20 ed i 40 anni la terapia standard di prima linea è il TMO se è disponibile un donatore HLA-identico familiare, o l'IST in assenza di donatore. Nei pazienti AA di età >40 anni i risultati sono peggiori, qualunque sia il trattamento scelto; nonostante il miglioramento delle procedure trapiantologiche, i risultati del TMO restano poco incoraggianti, in quanto la mortalità da trapianto continua ad aggirarsi intorno al 50%⁽¹²⁴⁾. Per tale motivo, la terapia di prima linea

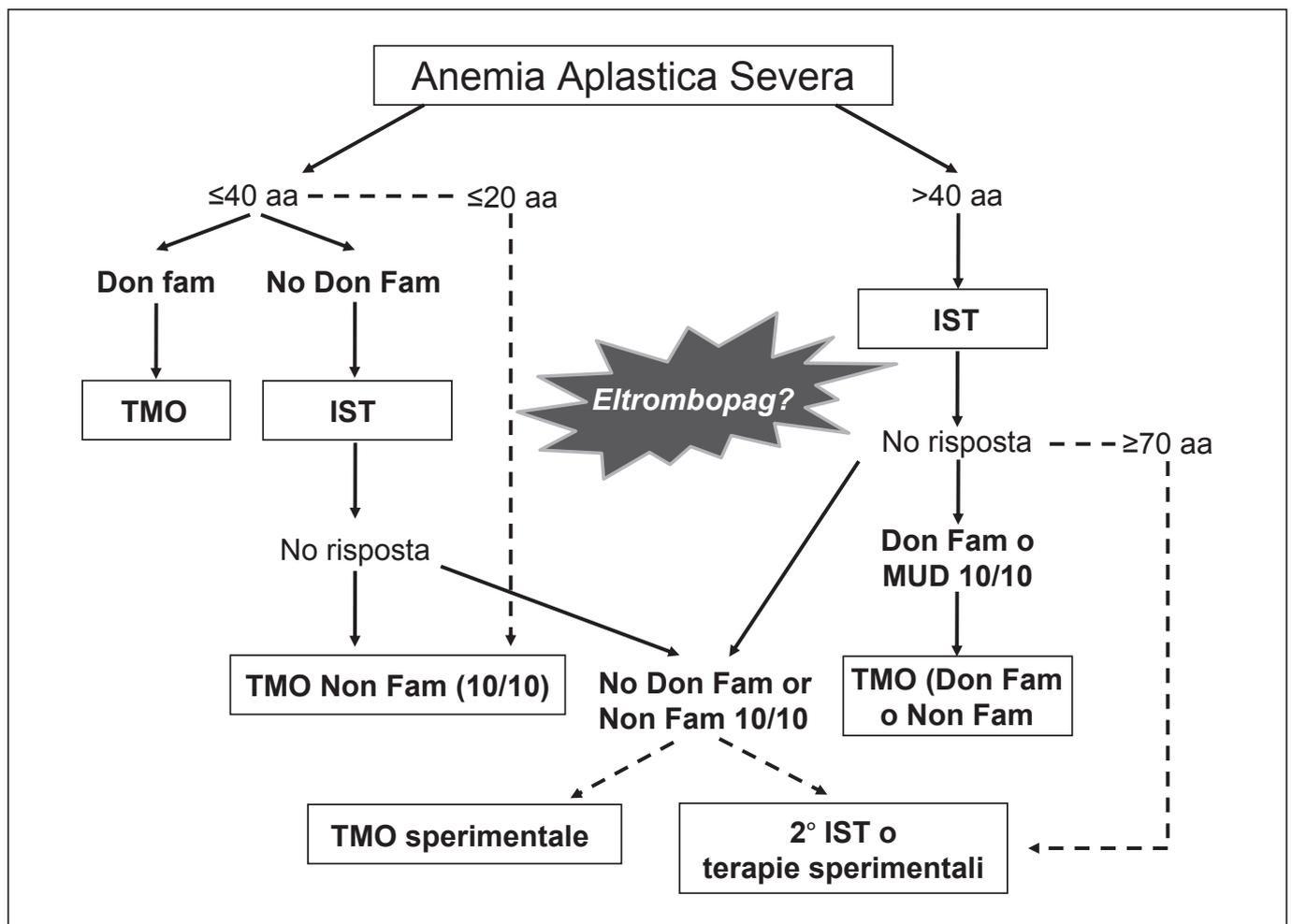


Figura 1 - Algoritmo terapeutico dei pazienti con anemia aplastica.

dei pazienti AA >40 anni resta l'IST; in considerazione della bassissima mortalità correlata al trattamento e della buona efficacia l'IST standard a base di h-ATG a CsA può essere presa in considerazione anche per pazienti anziani (fino ad 80 anni ed oltre)⁽¹²⁵⁾. Nell'algoritmo terapeutico delle AA vanno considerate anche le linee di trattamento successive alla prima, in quanto ricaduta e refrattarietà sono sempre possibili dopo l'IST. Nei pazienti giovani (<40 anni) il TMO, anche da donatore HLA-identico non familiare, resta la terapia di salvataggio preferita; in assenza di donatore HLA-identico è ragionevole tentare un secondo ciclo di IST, o procedere a TMO da donatore alternativo (non familiare con HLA-mismatch, aplo-identico familiare o cordone) preferibilmente nell'ambito di protocolli sperimentali. Per i pazienti >40 anni il TMO resta una terapia possibile in caso di pazienti che non abbiano comorbidità e che siano eleggibili a TMO; per i pazienti in cui la procedura trapiantologica è ad alto rischio (comunque per quelli >65-70 anni), la terapia di salvataggio preferita è un secondo ciclo di IST.

L'algoritmo appena proposto è basato su evidenze cliniche documentate, e necessariamente non contempla nuove recenti opzioni terapeutiche resesi disponibili negli ultimi anni. L'eltrombopag si

è già imposto come terapia di salvataggio utilizzabile in diversi setting; resta da capire, in base ai risultati a lungo termine, se il suo impiego sarà utilizzato come terapia ponte al TMO, o possa essere utilizzato (da solo o in associazione a IST) come terapia alternativa al trapianto stesso.

Sindrome AA/EPN

Come detto sopra, l'AA può presentarsi associata alla presenza di cellule a fenotipo EPN; se è vero che nella maggioranza dei casi la grandezza di questa popolazione è minima (<10% dei granulociti, <1% dei eritrociti) e non determina alcuna manifestazione clinica (EPN subclinica, stando alle classificazioni nosografiche dell'EPN),⁽⁵⁵⁾ più raramente un quadro di AA conclamata si può associare alla significativa espansione della popolazione EPN, con la presenza di un'emolisi clinicamente rilevante. È questo il quadro della sindrome AA/EPN, nella quale è indispensabile un'attenta valutazione di entrambe le componenti della malattia per impostare la strategia terapeutica. In generale, anche in presenza di emolisi significativa, la presenza di una AA severa va considerata clinicamente predominante e guida il trattamento. In altri termini, i pazienti con AA/EPN devono essere trattati come pazienti aplastici indipenden-

temente dalla presenza del clone EPN: la scelta terapeutica più appropriata è il TMO in caso di AA severa in pazienti <40 anni con un donatore HLA-identico familiare disponibile, o l'IST in tutte le altre condizioni. La presenza di emolisi clinicamente significativa può giustificare anche l'impiego della terapia anti-complemento come ponte al TMO (per ridurre il fabbisogno trasfusionale durante la procedura), o anche in combinazione con l'IST. In quest'ultimo contesto è stato riportato come IST e terapia anti-complemento possano essere utilizzate sequenzialmente o anche in contemporanea (per es. in pazienti EPN che sviluppino AA clinicamente significativa durante il trattamento con eculizumab) per trattare in maniera eziologica sia l'insufficienza midollare mediata da cellule T sia l'anemia emolitica mediata dal complemento⁽¹²⁶⁻¹²⁸⁾.

Recenti acquisizioni

Trapianto di midollo osseo allogenico

Il TMO ha visto un continuo miglioramento delle procedure trapiantologiche, con un progressivo miglioramento dell'outcome che è stato particolarmente rilevante per i TMO da donatore MUD (con risultati sempre più vicini a quelli dei TMO da donatore familiare) e per i pazienti più giovani. Nonostante questi progressi, l'outcome dei pazienti >40 anni sottoposti a TMO resta largamente insoddisfacente,⁽¹²⁴⁾ e nuove strategie si rendono necessarie. I risultati più incoraggianti dell'ultimo decennio vengono dall'esperienza anglosassone con un nuovo regime di condizionamento che utilizza l'anticorpo monoclonale anti-CD52 alemtuzumab per la T-deplezione in vivo in alternativa al r-ATG. Il regime di condizionamento completo comprende la fludarabine (F), la ciclofosfamide (C), e l'alemtuzumab - Campath (C), ed è pertanto noto come condizionamento FCC⁽¹²⁹⁾. Questo protocollo di condizionamento ha dimostrato una marcata riduzione del rischio di GvHD acuta (solo 11% e di grado I-II) e cronica (solo 4%), associata anche ad un ridotto rischio di rigetto (un altro dei problemi del TMO nei pazienti con AA, causato dalle alterazioni immunologiche alla base della fisiopatologia dell'AA); il risultato finale è di una sopravvivenza del 95% nei TMO da donatore familiare e 83% nei TMO da donatore non familiare, in una casistica con una età mediana di 35 anni⁽¹²⁹⁾. Successive analisi retrospettive confermano che l'utilizzo dell'alemtuzumab al posto del r-ATG riduca il rischio di GvHD acuta e cronica, con un possibile impatto sulla sopravvivenza a lungo termine^(119, 130, 131). Nonostante l'accesso all'alemtuzumab sia limitato (il farmaco non è più in commercio per le indicazioni ematologiche, che sono però coperte da un programma di uso compassionevole con fornitura gratuita), il protocollo FCC sembra una valida opzione per migliorare ulteriormente l'outcome del TMO soprattutto dove i risultati non sono soddisfacenti (per es. pazienti >40 anni). A completamento della discussione dei dati emergenti nel TMO, non si può evitare di menzionare il crescente sviluppo del TMO da donatore aplo-identico, ed in particolare di quello T-depleto con utilizzo delle alte dosi di ciclofosfamide post-TMO. Anche se le esperienze sono ancora limitate⁽¹³²⁻¹³⁴⁾, questa procedura potrebbe costituire una

valida opzione di terapia di salvataggio in pazienti che falliscono l'IST e non hanno un donatore HLA-identico disponibile.

Terapia non trapiantologica

Come già discusso in precedenza, le strategie di IST sviluppate negli anni '80 sono state oggetto di minimi miglioramenti nei 30 anni successivi⁽⁸⁰⁾; al contrario, nell'ultimo decennio stanno emergendo nuovi dati che promettono di rivoluzionare la terapia dell'AA. Eltrombopag (Revolade®) è un piccolo agonista della TPO (agente TPO-mimetico)⁽¹³⁵⁾ già approvato per il trattamento della porpora trombocitopenica idiopatica⁽¹³⁶⁾. L'impiego dell'eltrombopag nelle AA inizialmente non sembrava supportato da solide basi scientifiche, in quanto i livelli di TPO sono già particolarmente elevati nei pazienti affetti da AA^(137, 138). D'altra parte, numerosi dati *in vitro* dimostrano il ruolo chiave della TPO e del suo recettore c-MPL per garantire l'adeguato funzionamento delle CSE. Eltrombopag è stato dapprima studiato in un trial clinico di fase II come terapia di salvataggio in pazienti con AA refrattari all'IST⁽¹³⁹⁾. In questa prima esperienza 11 dei 25 pazienti trattati (44%) ha ottenuto un beneficio ematologico, con risposte che (in maniera alquanto sorprendente) riguardavano non solo le piastrine, ma anche i neutrofili e l'emoglobina, e la stessa cellularità midollare⁽¹³⁹⁾. L'estensione di questo studio ha confermato una risposta del 40% su una coorte di 43 pazienti totali, con risposte spesso durature che hanno talvolta consentito anche la sospensione del trattamento⁽¹⁴⁰⁾. In questa casistica si è osservato il 18% di evoluzione clonale con sviluppo di neoplasie mieloidi (sindromi mielodisplastiche o leucemie mieloidi acute, quasi esclusivamente in pazienti che non avevano risposto alla terapia con eltrombopag⁽¹⁴⁰⁾). Questi dati promettenti ottenuti in pazienti con AA refrattaria all'IST hanno documentato che eltrombopag è in grado di migliorare la funzione emopoietica dei pazienti con AA, agendo direttamente a livello delle CSE. Il meccanismo molecolare di eltrombopag non è noto: il suo legame con c-MPL potrebbe stimolare la proliferazione delle CSE rimanenti (reclutandole in circolo, o proteggendole dal danno immuno-mediato), o più semplicemente by-passare il blocco funzionale di c-MPL indotto dai dimeri TPO/IFN- γ ⁽²⁶⁾.

Sulla base di questi dati si è quindi sviluppato l'utilizzo di eltrombopag in pazienti con AA a diagnosi; l'approccio più ragionevole, in considerazione del meccanismo d'azione del farmaco, è stato quello di aggiungere eltrombopag alla IST standard a base di ATG di cavallo e CsA. Il primo studio di fase I-II con la triplice terapia a base di ATG, CsA ed eltrombopag è stato effettuato all'NIH. Nella prima presentazione dei dati relativa a 92 pazienti trattati secondo 3 diversi regimi terapeutici (eltrombopag per 6 mesi dal giorno +14, per 3 mesi dal g +14, o per 6 mesi dal giorno +1) il rate di risposta globale a 6 mesi è stato 80%, 87% e 94%, con una percentuale di risposta completa pari al 33%, 26% e 58% nelle tre coorti⁽¹⁴¹⁾. Questi dati di efficacia sono largamente superiori rispetto ai dati storici con ATG e CsA da sole, in cui le percentuali di risposte globali e complete attese sono pari al 66% ed al 10%, rispettivamente⁽¹⁴¹⁾. La superiorità della terapia triplice rispetto alla IST standard è al momento oggetto di un uno studio clinico di fase III randomizzato

che arruolerà 200 pazienti con diagnosi di AA severa: lo studio, condotto dall'EBMT, completerà l'arruolamento entro la metà del 2019, e i dati sull'endpoint primario (percentuali di risposte complete a 3 mesi) saranno disponibili per la fine del 2019⁽¹⁴²⁾. Auspicabilmente, i dati derivanti da questi trial clinici definiranno la nuova terapia non-trapiantologica standard dell'AA, in cui eltrombopag sarà aggiunto alla piattaforma di IST a base di ATG e CsA.

Emopoiesi clonale

Le moderne tecniche di *next generation sequencing* resesi disponibili negli ultimi anni hanno permesso di indagare in dettaglio la presenza di mutazioni somatiche nei pazienti affetti da AA. Dati prodotti da diversi gruppi di ricerca in diverse aree del mondo hanno documentato che queste mutazioni sono presenti nel 30-50% dei pazienti con AA, e riguardano specificamente un gruppo ristretto di geni che appaiono mutati in maniera ripetitiva nei pazienti aplastici⁽¹⁴³⁻¹⁴⁷⁾. La grandezza di queste popolazioni clonali è estremamente eterogenea, e può variare dal 5 al 10%⁽¹⁴³⁻¹⁴⁷⁾. L'interpretazione di questi dati ha suscitato un dibattito estremamente vivo esteso non solo al ruolo patogenetico di queste mutazioni, ma anche al significato della stessa clonalità nell'ambito dell'emopoiesi normale e patologica⁽¹⁴⁸⁻¹⁵¹⁾. Nell'ambito delle AA, i geni più frequentemente mutati sono *PIGA*, locus HLA, *ASXL1*, *BCOR*, *DNMT3A*; mentre mutazioni dei primi 2 geni sono caratteristiche solo delle AA (anche se mutazioni inattivanti dell'HLA sono note anche nelle leucemie acute, come meccanismo di ricaduta dopo TMO aploidentico)⁽¹⁵²⁾, mutazioni dei geni *ASXL1*, *BCOR*, *DNMT3A* sono ricorrenti anche nelle neoplasie mieloidi (sindromi mielodisplastiche e leucemie mieloidi acute). Alla luce di queste osservazioni si è ipotizzato che queste mutazioni, che prognosticamente hanno un impatto negativo sulla sopravvivenza a lungo termine⁽¹⁴⁷⁾, potessero rappresentare un marcatore precoce di evoluzione clonale, o più correttamente evoluzione verso una neoplasia mieloide. L'osservazione che queste stesse mutazioni siano rilevabili anche in soggetti sani molto anziani,^(153, 154) e che non necessariamente siano associate ad evoluzione clinica verso una neoplasia mieloide fa piuttosto credere che la maggioranza di queste mutazioni possa essere funzionalmente neutra, e rappresentare esclusivamente un marcatore di emopoiesi clonale, non necessariamente maligna o pre-maligna⁽¹⁴⁸⁻¹⁵¹⁾. Il significato di questa emopoiesi (oligo-)clonale resta incerto (da cui l'acronimo *clonal hemopoiesis of indetermined potential - CHIP*),⁽¹⁵⁵⁾ anche se è innegabile che alcune di queste mutazioni hanno un ruolo nel processo multistep di cancerogenesi⁽¹⁵⁶⁾. Va comunque sottolineato che la presenza di una di queste mutazioni non determina automaticamente il verificarsi delle altre mutazioni necessarie per lo sviluppo del fenotipo neoplastico; e che nelle AA la presenza di clonalità non è solo funzione delle caratteristiche intrinseche del clone mutato, ma anche il risultato della contrazione del numero di CSE caratteristica della fisiopatologia della malattia⁽¹⁵¹⁾. A questo fenomeno che stocasticamente può fare apparire come espansa una mutazione funzionalmente neutra emersa nel contesto di una popolazione già oligoclonale, si aggiunge la possibilità di una selezione attiva/passiva

di particolari cloni, come avviene ad esempio per le CSE *PIGA^{mut}* o *HLA* in grado di sfuggire all'attacco immunologico contro l'emopoiesi⁽¹⁵¹⁾.

In ogni caso, il significato dell'emopoiesi clonale nelle AA non va sottovalutato, in quanto esistono delle specifiche complicanze cliniche caratterizzate da emopoiesi clonale, descritte col termine *evoluzione clonale*; queste complicanze comprendono da una parte alcune neoplasie mieloidi (in questo caso sarebbe più corretto parlare di *evoluzione maligna*), e dall'altra l'EPN (evoluzione sicuramente clonale, ma non neoplastica)⁽¹⁵⁷⁾. Indipendentemente dalla specifica terapia immunosoppressiva effettuata, infatti, tra il 10% ed il 15% dei pazienti affetti da AA sviluppa una sindrome mielodisplastica o un'altra neoplasia mieloide^(100, 112, 115, 157). Al momento non vi sono fattori di rischio univoci in grado di identificare precocemente i pazienti AA che più probabilmente andranno incontro ad una evoluzione maligna, anche se la mancata risposta alla IST (e una ridotta lunghezza dei telomeri) appaiono associati ad un rischio più elevato⁽¹⁰¹⁾. In considerazione delle nuove terapie emergenti a base di eltrombopag, che stimola in maniera diretta le CSE, va considerato il rischio che una pressione proliferativa esterna potrebbe favorire l'espansione di cloni preneoplastici già esistenti, o aumentare il rischio di sviluppare mutazioni potenzialmente oncogeniche. Per tale motivo, pure se al momento sembra chiaro che l'aggiunta di eltrombopag all'IST standard aumenta il tasso di risposte ematologiche⁽¹⁴¹⁾, sarà fondamentale confermare in maniera randomizzata che l'eltrombopag non aumenti il rischio a lungo termine di una evoluzione maligna⁽¹⁴²⁾. L'altro possibile esempio di evoluzione clonale (in questo caso non neoplastica) è lo sviluppo di una EPN clinicamente conclamata, con un quadro chiaramente emolitico⁽⁵⁰⁾. Come detto in precedenza, la presenza di un quadro emolitico dal punto di vista terapeutico può richiedere l'utilizzo di una terapia anti-complemento. In questo contesto in cui si discutono osservazioni e terapie emergenti, va sottolineato come la terapia anti-complemento, finora basata su un unico anticorpo monoclonale anti-C5, si stia arricchendo di nuove molecole con caratteristiche e meccanismi d'azione molto diversi (Figura 2)⁽¹⁵⁸⁾. Pur non essendo argomento di questa discussione, appare opportuno segnalare che oltre ad inibitori terminali del complemento (che come eculizumab sono specifici per il C5) sono in via di sviluppo numerosi inibitori prossimali del complemento. Questi ultimi interferiscono con la cascata complementare a monte di C5, e più precisamente a livello di C3 (agenti anti-C3) o ancora più a monte a livello delle fasi iniziali dell'attivazione della via alternativa (agenti anti-fattore D e anti-fattore B). Tutti questi farmaci sono al momento in sperimentazione clinica in pazienti con EPN, e promettono nel giro di pochi mesi di rivoluzionare il trattamento dell'EPN⁽¹⁵⁹⁾.

Conclusioni

L'AA è una rara malattia ematologica nota da oltre 100 anni; fino a circa 50 anni fa erano ignoti i meccanismi fisiopatologici alla base della malattia, che restava invariabilmente fatale^(71, 72). Osservazioni cliniche e sperimentali hanno permesso di comprendere la patoge-

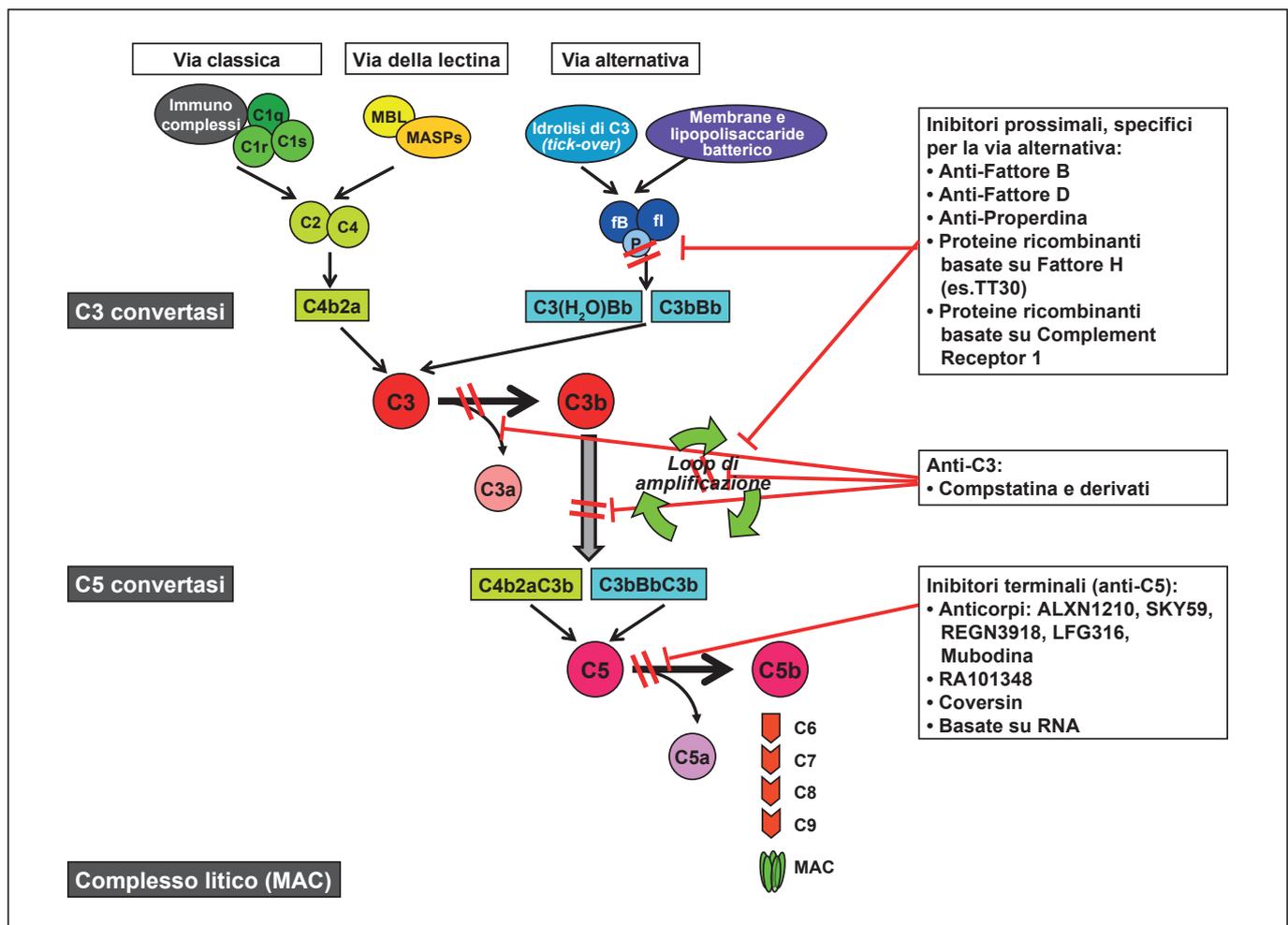


Figura 2 - Nuovi farmaci anti-complemento in sviluppo per l'emoglobinuria parossistica notturna^(158, 159).

nesi della malattia, sia nelle forme acquisite idiopatiche (che hanno una genesi immuno-mediata), sia nelle forme costituzionali, causate da diverse alterazioni geniche. Grazie a queste informazioni sono state definite opportune strategie terapeutiche, che hanno garantito probabilità di sopravvivenza a lungo termine largamente superiori al 50%. Il decennio in corso sta dimostrando che questi risultati sono ulteriormente migliorabili. Da una parte, il miglioramento delle procedure trapiantologiche sembra garantire tassi di cura superiori

all'80%; dall'altra, per i pazienti non candidati a trapianto, le terapie non trapiantologiche a base di immunosoppressori si sono arricchite dell'agente trombopoietino-mimetico eltrombopag, che ha portato i tassi di risposta oltre l'80%. Alla luce di questi dati si può chiaramente dire che l'AA rappresenta oggi uno degli esempi più brillanti della medicina moderna, dove la combinazione di ricerche di base e di ricerca clinica ha portato ad offrire possibilità di cura inimmaginabili anche solo pochi decenni fa.

Bibliografia

1. Young NS. Introduction: acquired aplastic anemia. *Semin Hematol.* 2000; 37(1):2.
2. Schultz JC, Shahidi NT. Detection of tumor necrosis factor-alpha in bone marrow plasma and peripheral blood plasma from patients with aplastic anemia. *Am J Hematol.* 1994;45(1):32-8.
3. Marmont AM. Who really discovered aplastic anemia? *Haematologica.* 1995;80(3):294.
4. Wegman-Ostrosky T, Savage SA. The genomics of inherited bone marrow failure: from mechanism to the clinic. *Br J Hematol.* 2017;177(4):526-42.
5. Soulier J. Fanconi anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011;2011:492-7.
6. Mehta PA, Tolar J. Fanconi Anemia. In: Adam, M.P., Ardinger, H.H., Pagon RA, et al., ed. *GeneReviews*. Seattle, WA: University of Washington Seattle;1993-2019.
7. Alter BP, Giri N, Savage SA, et al. Telomere length in inherited bone marrow failure syndromes. *Haematologica.* 2015;100(1):49-54.
8. Savage S. Dyskeratosis congenita. In: Adam, M.P., Ardinger, H.H., Pagon RA, et al., ed. *GeneReviews*. Seattle, WA: University of Washington Seattle;1993-2019.
9. Calado RT, Young NS. Telomere diseases. *N Engl J Med.* 2009;361(24):2353-65.

10. Myers KC, Davies SM, Shimamura A. Clinical and molecular pathophysiology of Shwachman-Diamond syndrome: an update. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2013;27(1):117-28.
11. Vlachos A, Muir E. How I treat Diamond-Blackfan anemia. *Blood.* 2010;116(19):3715-23.
12. Champlin R. Bone marrow aplasia due to radiation accidents: pathophysiology, assessment and treatment. *Baillieres Clin Haematol.* 1989;2(1):69-82.
13. Young NS. Drugs and chemicals. In: Young NS, Alter, B.P., ed. *Aplastic Anemia, Acquired and Inherited Philadelphia, PA.: WB Saunders.*; 1994:100-32.
14. Young NS. Viruses as agents of marrow failure. In: Young NS, Alter, B.P., ed. *Aplastic Anemia, Acquired and Inherited Philadelphia, PA.: WB Saunders.*; 1994:133-58.
15. Brown KE, Tisdale J, Barrett AJ, et al. Hepatitis-associated aplastic anemia. *N Engl J Med.* 1997;336(15):1059-64.
16. Marsh JC, Chang J, Testa NG, et al. The hematopoietic defect in aplastic anemia assessed by long-term marrow culture. *Blood.* 1990;76(9):1748-57.
17. Maciejewski JP, Selleri C, Sato T, et al. A severe and consistent deficit in marrow and circulating primitive hematopoietic cells (long-term culture-initiating cells) in acquired aplastic anemia. *Blood.* 1996;88(6):1983-91.
18. Manz CY, Nissen C, Wodnar-Filipowicz A. Deficiency of CD34+ c-kit+ and CD34+38- hematopoietic precursors in aplastic anemia after immuno-suppressive treatment. *Am J Hematol.* 1996;52(4):264-74.
19. Zeng W, Chen G, Kajigaya S, et al. Gene expression profiling in CD34 cells to identify differences between aplastic anemia patients and healthy volunteers. *Blood.* 2004;103(1):325-32.
20. Zoumbos NC, Gascon P, Djeu JY, et al. Interferon is a mediator of hematopoietic suppression in aplastic anemia in vitro and possibly in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985;82(1):188-92.
21. Selleri C, Sato T, Anderson S, et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha suppress both early and late stages of hematopoiesis and induce programmed cell death. *J Cell Physiol.* 1995;165(3):538-46.
22. Dufour C, Corcione A, Svahn J, et al. Interferon gamma and tumour necrosis factor alpha are overexpressed in bone marrow T lymphocytes from paediatric patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol.* 2001;115(4):1023-31.
23. Krebs DL, Hilton DJ. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem cells.* 2001;19(5):378-87.
24. Maciejewski JP, Selleri C, Sato T, et al. Increased expression of Fas antigen on bone marrow CD34+ cells of patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol.* 1995;91(1):245-52.
25. Selleri C, Maciejewski JP, Sato T, et al. Interferon-gamma constitutively expressed in the stromal microenvironment of human marrow cultures mediates potent hematopoietic inhibition. *Blood.* 1996;87(10):4149-57.
26. Alvarado LJ, Andreoni A, Huntsman HD, et al. Heterodimerization of TPO and IFN γ Impairs Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Signaling and Survival in Chronic Inflammation *Blood.* 2017;130(1):4.
27. Sloand E, Kim S, Maciejewski JP, et al. Intracellular interferon-gamma in circulating and marrow T cells detected by flow cytometry and the response to immunosuppressive therapy in patients with aplastic anemia. *Blood.* 2002;100(4):1185-91.
28. Kagan WA, Ascensao JA, Pahwa RN, et al. Aplastic anemia: presence in human bone marrow of cells that suppress myelopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1976;73(8):2890-4.
29. Ascensao J, Pahwa R, Kagan W, et al. Aplastic anaemia: Evidence for an immunological mechanism. *Lancet.* 1976;1(7961):669-71.
30. Zoumbos NC, Gascon P, Djeu JY, et al. Circulating activated suppressor T lymphocytes in aplastic anemia. *N Engl J Med.* 1985;312(5):257-65.
31. Gascon P, Zoumbos NC, Scala G, et al. Lymphokine abnormalities in aplastic anemia: implications for the mechanism of action of antithymocyte globulin. *Blood.* 1985;65(2):407-13.
32. Gascon P, Zoumbos N, Young N. Analysis of natural killer cells in patients with aplastic anemia. *Blood.* 1986;67(5):1349-55.
33. Maciejewski J, Selleri C, Anderson S, et al. Fas antigen expression on CD34+ human marrow cells is induced by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha and potentiates cytokine-mediated hematopoietic suppression in vitro. *Blood.* 1995;85(11):3183-90.
34. Solomou EE, Keyvanfar K, Young NS. T-bet, a Th1 transcription factor, is up-regulated in T cells from patients with aplastic anemia. *Blood.* 2006;107(10):3983-91.
35. de Latour RP, Visconte V, Takaku T, et al. Th17 immune responses contribute to the pathophysiology of aplastic anemia. *Blood.* 2010;116(20):4175-84.
36. Solomou EE, Rezvani K, Mielke S, et al. Deficient CD4+ CD25+ FOXP3+ T regulatory cells in acquired aplastic anemia. *Blood.* 2007;110(5):1603-6.
37. Kordasti S, Marsh J, Al-Khan S, et al. Functional characterization of CD4+ T cells in aplastic anemia. *Blood.* 2012;119(9):2033-43.
38. Kook H, Zeng W, Guibin C, et al. Increased cytotoxic T cells with effector phenotype in aplastic anemia and myelodysplasia. *Exp Hematol.* 2001;29(11):1270-7.
39. Kordasti S, Costantini B, Seidl T, et al. Deep phenotyping of Tregs identifies an immune signature for idiopathic aplastic anemia and predicts response to treatment. *Blood.* 2016;128(9):1193-205.
40. Nakao S, Takami A, Takamatsu H, et al. Isolation of a T-cell clone showing HLA-DRB1*0405-restricted cytotoxicity for hematopoietic cells in a patient with aplastic anemia. *Blood.* 1997;89(10):3691-9.
41. Zeng W, Nakao S, Takamatsu H, et al. Characterization of T-cell repertoire of the bone marrow in immune-mediated aplastic anemia: evidence for the involvement of antigen-driven T-cell response in cyclosporine-dependent aplastic anemia. *Blood.* 1999;93(9):3008-16.
42. Kook H, Risitano AM, Zeng W, et al. Changes in T-cell receptor VB repertoire in aplastic anemia: effects of different immunosuppressive regimens. *Blood.* 2002;99(10):3668-75.
43. Risitano AM, Kook H, Zeng W, et al. Oligoclonal and polyclonal CD4 and CD8 lymphocytes in aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria measured by V beta CDR3 spectratyping and flow cytometry. *Blood.* 2002;100(1):178-83.
44. Risitano AM, Maciejewski JP, Green S, et al. In-vivo dominant immune responses in aplastic anaemia: molecular tracking of putatively pathogenetic T-cell clones by TCR beta-CDR3 sequencing. *Lancet.* 2004;364(9431):355-64.
45. Hirano N, Butler MO, Von Bergwelt-Baildon MS, et al. Autoantibodies frequently detected in patients with aplastic anemia. *Blood.* 2003;102(13):4567-75.
46. Hirano N, Butler MO, Guinan EC, et al. Presence of anti-kinectin and anti-PMS1 antibodies in Japanese aplastic anaemia patients. *Br J Haematol.* 2005;128(2):221-3.
47. Takamatsu H, Feng X, Chuhjo T, et al. Specific antibodies to moesin, a membrane-cytoskeleton linker protein, are frequently detected in patients with acquired aplastic anemia. *Blood.* 2007;109(6):2514-20.
48. Feng X, Chuhjo T, Sugimori C, et al. Diazepam-binding inhibitor-related protein 1: a candidate autoantigen in acquired aplastic anemia patients harboring a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells. *Blood.* 2004;104(8):2425-31.
49. Scheinberg P, Marte M, Nunez O, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in severe aplastic anemia patients treated with horse anti-thymocyte globulin plus cyclosporine. *Haematologica.* 2010;95(7):1075-80.
50. Risitano AM. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. In: Silverberg, ed. *Anemia.* Rijeka, Croatia: InTech; 2012:331-74.

51. Dameshek W. Riddle: what do aplastic anemia, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and "hypoplastic" leukemia have in common? *Blood*. 1967;30(2):251-4.
52. Dacie JV, Lewis SM. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: variation in clinical severity and association with bone-marrow hypoplasia. *Br J Haematol*. 1961;7:442-57.
53. Lewis SM, Dacie JV. The aplastic anaemia--paroxysmal nocturnal haemoglobinuria syndrome. *Br J Haematol*. 1967;13(2):236-51.
54. Fores R, Alcocer M, Diez-Martin JL, et al. Flow cytometric analysis of decay-accelerating factor (CD55) on neutrophils from aplastic anaemia patients. *Br J Haematol*. 1995;90(3):728-30.
55. Parker C, Omine M, Richards S, et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2005;106(12):3699-709.
56. Schrezenmeier H, Muus P, Socie G, et al. Baseline characteristics and disease burden in patients in the International Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Registry. *Haematologica*. 2014;99(5):922-9.
57. de Latour RP, Mary JY, Salanoubat C, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood*. 2008;112(8):3099-106.
58. Takeda J, Miyata T, Kawagoe K, et al. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell*. 1993;73(4):703-11.
59. Takahashi M, Takeda J, Hirose S, et al. Deficient biosynthesis of N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol, the first intermediate of glycosyl phosphatidylinositol anchor biosynthesis, in cell lines established from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Exp Med*. 1993;177(2):517-21.
60. Araten DJ, Nafa K, Pakdeesuan K, et al. Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria genotype and phenotype are present in normal individuals. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(9):5209-14.
61. Rotoli B, Luzzatto L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Semin Hematol*. 1989;26(3):201-7.
62. Rotoli B, Luzzatto L. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Baillieres Clin Haematol* 1989;2(1):113-38.
63. Young NS, Maciejewski JP. Genetic and environmental effects in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: this little PIG-A goes "Why? Why? Why?". *J Clin Invest*. 2000;106(5):637-41.
64. Gargiulo L, Papaioannou M, Sica M, et al. Glycosylphosphatidylinositol-specific, CD1d-restricted T cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2013;121(14):2753-61.
65. Gargiulo L, Zaimoku Y, Scappini B, et al. Glycosylphosphatidylinositol-specific T cells, IFN-gamma-producing T cells, and pathogenesis of idiopathic aplastic anemia. *Blood*. 2017;129(3):388-92.
66. Luzzatto L, Notaro R. The "escape" model: a versatile mechanism for clonal expansion. *Br J Haematol*. 2019;184(3):465-466.
67. Luzzatto L, Bessler M, Rotoli B. Somatic mutations in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a blessing in disguise? *Cell*. 1997;88(1):1-4.
68. Risitano AM. Immune insights into AA. *Blood*. 2017;129(21):2824-6.
69. Zaimoku Y, Takamatsu H, Hosomichi K, et al. Identification of an HLA class I allele closely involved in the autoantigen presentation in acquired aplastic anemia. *Blood*. 2017;129(21):2908-16.
70. Babushok DV, Duke JL, Xie HM, et al. Somatic HLA Mutations Expose the Role of Class I-Mediated Autoimmunity in Aplastic Anemia and its Clonal Complications. *Blood Adv*. 2017;1(22):1900-10.
71. Camitta BM, Storb R, Thomas ED. Aplastic anemia (first of two parts): pathogenesis, diagnosis, treatment, and prognosis. *N Engl J Med*. 1982;306(11):645-52.
72. Camitta BM, Storb R, Thomas ED. Aplastic anemia (second of two parts): pathogenesis, diagnosis, treatment, and prognosis. *N Engl J Med*. 1982;306(12):712-8.
73. Mathe G, Schwarzenberg L. Treatment of bone marrow aplasia by bone marrow graft after conditioning with antilymphocyte globulin. Long term results. *Exp Hematol*. 1976;4(4):256-64.
74. Thomas ED, Storb R, Fefer A, et al. Aplastic anaemia treated by marrow transplantation. *Lancet* 1972;1(7745):284-9.
75. Speck B, Cornu P, Jeanner M, et al. Autologous marrow recovery following allogeneic marrow transplantation in a patient with severe aplastic anemia. *Exp Hematol*. 1976;4(3):131-7.
76. Speck B, Buckner CD, Cornu P, et al. Rationale for the use of ALG as sole immunosuppressant in allogeneic bone marrow transplantation for aplastic anemia. *Transplant Proc*. 1976;8(4):617-22.
77. Speck B, Gluckman E, Haak HL, et al. Treatment of aplastic anaemia by antilymphocyte globulin with or without marrow infusion. *Clin Haematol*. 1978;7(3):611-21.
78. Speck B, Gratwohl A, Nissen C, et al. Treatment of severe aplastic anaemia with antilymphocyte globulin or bone-marrow transplantation. *Br Med J*. 1981;282(6267):860-3.
79. Marotta S, Pagliuca S, Risitano AM. Hematopoietic stem cell transplantation for aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: current evidence and recommendations. *Expert review of hematology* 2014;7(6):775-89.
80. Risitano AM. Immunosuppressive therapies in the management of acquired immune-mediated marrow failures. *Current opinion in hematology* 2012;19(1):3-13.
81. Pillow RP, Epstein RB, Buckner CD, et al. Treatment of bone-marrow failure by isogeneic marrow infusion. *N Engl J Med*. 1966;275(2):94-7.
82. Speck B, Zwaan FE, van Rood JJ, et al. Allogeneic bone marrow transplantation in a patient with aplastic anemia using a phenotypically HL-A-identical unrelated donor. *Transplantation* 1973;16(1):24-8.
83. Maury S, Balere-Appert ML, Chir Z, et al. Unrelated stem cell transplantation for severe acquired aplastic anemia: improved outcome in the era of high-resolution HLA matching between donor and recipient. *Haematologica*. 2007;92(5):589-96.
84. Viollier R, Socie G, Tichelli A, et al. Recent improvement in outcome of unrelated donor transplantation for aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41(1):45-50.
85. Storb R, Ertzoni R, Anasetti C, et al. Cyclophosphamide combined with antithymocyte globulin in preparation for allogeneic marrow transplants in patients with aplastic anemia. *Blood*. 1994;84(3):941-9.
86. Champlin RE, Perez WS, Passweg JR, et al. Bone marrow transplantation for severe aplastic anemia: a randomized controlled study of conditioning regimens. *Blood*. 2007;109(10):4582-5.
87. Schrezenmeier H, Passweg JR, Marsh JC, et al. Worse outcome and more chronic GVHD with peripheral blood progenitor cells than bone marrow in HLA-matched sibling donor transplants for young patients with severe acquired aplastic anemia. *Blood*. 2007;110(4):1397-400.
88. Bacigalupo A, Socie G, Schrezenmeier H, et al. Bone marrow versus peripheral blood as the stem cell source for sibling transplants in acquired aplastic anemia: survival advantage for bone marrow in all age groups. *Haematologica*. 2012;97(8):1142-8.
89. Konopacki J, Porcher R, Robin M, et al. Long-term follow up after allogeneic stem cell transplantation in patients with severe aplastic anemia after cyclophosphamide plus antithymocyte globulin conditioning. *Haematologica*. 2012;97(5):710-6.
90. Maury S, Bacigalupo A, Anderlini P, et al. Improved outcome of patients older than 30 years receiving HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for severe acquired aplastic anemia using fludarabine-based conditioning: a comparison with conventional conditioning regimen. *Haematologica*. 2009;94(9):1312-5.

91. Bacigalupo A, Giammarco S, Sica S. Bone Marrow Transplantation versus immunosuppressive therapy in patients with acquired severe aplastic anemia. *Int J Hematol*. 2016;104(2):168-74.
92. Bacigalupo A, Socie G, Lanino E, et al. Fludarabine, cyclophosphamide, antithymocyte globulin, with or without low dose total body irradiation, for alternative donor transplants, in acquired severe aplastic anemia: a retrospective study from the EBMT-SAA Working Party. *Haematologica*. 2010;95(6):976-82.
93. Anderlini P, Wu J, Gersten I, et al. Cyclophosphamide conditioning in patients with severe aplastic anaemia given unrelated marrow transplantation: a phase 1-2 dose de-escalation study. *Lancet Haematol*. 2015;2(9):e367-75.
94. Eapen M, Horowitz MM. Alternative donor transplantation for aplastic anemia. *Hematology Am Soc of Hematol Educ Program* 2010;2010:43-6.
95. Gluckman E, Devergie A, Poros A, et al. Results of immunosuppression in 170 cases of severe aplastic anaemia. Report of the European Group of Bone Marrow Transplant (EGBMT). *Br J Haematol*. 1982;51(4):541-50.
96. Champlin R, Ho W, Gale RP. Antithymocyte globulin treatment in patients with aplastic anemia: a prospective randomized trial. *N Engl J Med*. 1983;308(3):113-8.
97. Young N, Griffith P, Brittain E, et al. A multicenter trial of antithymocyte globulin in aplastic anemia and related diseases. *Blood*. 1988;72(6):1861-9.
98. de Planque MM, Bacigalupo A, Wursch A, et al. Long-term follow-up of severe aplastic anaemia patients treated with antithymocyte globulin. Severe Aplastic Anaemia Working Party of the European Cooperative Group for Bone Marrow Transplantation (EBMT). *Br J Haematol*. 1989;73(1):121-6.
99. Frickhofen N, Kaltwasser JP, Schrezenmeier H, et al. Treatment of aplastic anemia with antilymphocyte globulin and methylprednisolone with or without cyclosporine. The German Aplastic Anemia Study Group. *N Engl J Med*. 1991;324(19):1297-304.
100. Frickhofen N, Heimpel H, Kaltwasser JP, et al. German Aplastic Anemia Study G. Antithymocyte globulin with or without cyclosporin A: 11-year follow-up of a randomized trial comparing treatments of aplastic anemia. *Blood*. 2003;101(4):1236-42.
101. Rosenfeld S, Follmann D, Nunez O, et al. Antithymocyte globulin and cyclosporine for severe aplastic anemia: association between hematologic response and long-term outcome. *JAMA*. 2003;289(9):1130-5.
102. Rosenfeld SJ, Kimball J, Vining D, et al. Intensive immunosuppression with antithymocyte globulin and cyclosporine as treatment for severe acquired aplastic anemia. *Blood*. 1995;85(11):3058-65.
103. Locasciulli A, Oneto R, Bacigalupo A, et al. Outcome of patients with acquired aplastic anemia given first line bone marrow transplantation or immunosuppressive treatment in the last decade: a report from the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Haematologica*. 2007;92(1):11-8.
104. Scheinberg P, Nunez O, Wu C, et al. Treatment of severe aplastic anaemia with combined immunosuppression: anti-thymocyte globulin, ciclosporin and mycophenolate mofetil. *Br J Haematol*. 2006;133(6):606-11.
105. Scheinberg P, Wu CO, Nunez O, et al. Treatment of severe aplastic anemia with a combination of horse antithymocyte globulin and cyclosporine, with or without sirolimus: a prospective randomized study. *Haematologica*. 2009;94(3):348-54.
106. Teramura M, Kimura A, Iwase S, et al. Treatment of severe aplastic anemia with antithymocyte globulin and cyclosporin A with or without G-CSF in adults: a multicenter randomized study in Japan. *Blood*. 2007;110(6):1756-61.
107. Tichelli A, Schrezenmeier H, Socie G, et al. A randomized controlled study in patients with newly diagnosed severe aplastic anemia receiving antithymocyte globulin (ATG), cyclosporine, with or without G-CSF: a study of the SAA Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*. 2011;117(17):4434-41.
108. Brodsky RA, Chen AR, Brodsky I, et al. High-dose cyclophosphamide as salvage therapy for severe aplastic anemia. *Exp Hematol*. 2004;32(5):435-40.
109. Brodsky RA, Chen AR, Dorr D, et al. High-dose cyclophosphamide for severe aplastic anemia: long-term follow-up. *Blood*. 2010;115(11):2136-41.
110. Tisdale JF, Maciejewski JP, Nunez O, et al. Late complications following treatment for severe aplastic anemia (SAA) with high-dose cyclophosphamide (Cy): follow-up of a randomized trial. *Blood*. 2002;100(13):4668-70.
111. Risitano AM, Selleri C, Serio B, et al. Alemtuzumab is safe and effective as immunosuppressive treatment for aplastic anaemia and single-lineage marrow failure: a pilot study and a survey from the EBMT WPSAA. *Br J Haematol*. 2010;148(5):791-6.
112. Scheinberg P, Nunez O, Weinstein B, et al. Activity of alemtuzumab monotherapy in treatment-naive, relapsed, and refractory severe acquired aplastic anemia. *Blood*. 2012;119(2):345-54.
113. Di Bona E, Rodeghiero F, Bruno B, et al. Rabbit antithymocyte globulin (r-ATG) plus cyclosporine and granulocyte colony stimulating factor is an effective treatment for aplastic anaemia patients unresponsive to a first course of intensive immunosuppressive therapy. Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO). *Br J Haematol*. 1999;107(2):330-4.
114. Scheinberg P, Nunez O, Young NS. Retreatment with rabbit anti-thymocyte globulin and ciclosporin for patients with relapsed or refractory severe aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2006;133(6):622-7.
115. Scheinberg P, Nunez O, Weinstein B, et al. Horse versus rabbit antithymocyte globulin in acquired aplastic anemia. *N Engl J Med*. 2011;365(5):430-8.
116. Marsh JC, Bacigalupo A, Schrezenmeier H, et al. Prospective study of rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine for aplastic anemia from the EBMT Severe Aplastic Anaemia Working Party. *Blood*. 2012;119(23):5391-6.
117. Bacigalupo A, Oneto R, Schrezenmeier H, et al. First line treatment of aplastic anemia with thymoglobuline in Europe and Asia: Outcome of 955 patients treated 2001-2012. *Am J Hematol*. 2019;94(1):165.
118. Bacigalupo A. How I treat acquired aplastic anemia. *Blood*. 2017;129(11):1428-36.
119. Samarasinghe S, Clesham K, Iacobelli S, et al. Impact of T-cell depletion strategies on outcomes following hematopoietic stem cell transplantation for idiopathic aplastic anemia: A study on behalf of the European blood and marrow transplant severe aplastic anemia working party. *Am J Hematol*. 2019;94(1):80-6.
120. Peffault de Latour R. Transplantation for bone marrow failure: current issues. *Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2016;2016(1):90-8.
121. Young NS. Aplastic Anemia. *N Engl J Med*. 2018;379(17):1643-56.
122. Killick SB, Bown N, Cavenagh J, et al. Guidelines for the diagnosis and management of adult aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2016;172(2):187-207.
123. Dufour C, Veys P, Carraro E, et al. Similar outcome of upfront-unrelated and matched sibling stem cell transplantation in idiopathic paediatric aplastic anaemia. A study on behalf of the UK Paediatric BMT Working Party, Paediatric Diseases Working Party and Severe Aplastic Anaemia Working Party of EBMT. *Br J Haematol*. 2015;171(4):585-94.
124. Giammarco S, Peffault de Latour R, Sica S, et al. Transplant outcome for patients with acquired aplastic anemia over the age of 40: has the outcome improved? *Blood*. 2018;131(17):1989-92.
125. Contejean A, Resche-Rigon M, Tamburini J, et al. Aplastic anemia in the elderly: a nationwide survey on behalf of the French Reference Center for Aplastic Anemia. *Haematologica*. 2019;104(2):256-62.
126. Marotta S, Giagnuolo G, Basile S, et al. Excellent outcome of concomitant intensive immunosuppression and eculizumab in aplastic anemia/paroxysmal nocturnal hemoglobinuria syndrome. *J Hematol Thromb Dis*. 2014;2(1).
127. Pagliuca S, Risitano AM, De Fontbrune FS, et al. Combined intensive immunosuppression and eculizumab for aplastic anemia in the context of hemolytic paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a retrospective analysis. *Bone Marrow Transplant*. 2018;53(1):105-7.

128. Griffin M, Kulasekararaj A, Gandhi S, et al. Concurrent treatment of aplastic anemia/paroxysmal nocturnal hemoglobinuria syndrome with immuno-suppressive therapy and eculizumab: a UK experience. *Haematologica*. 2018;103(8): e345-e7.
129. Marsh JC, Gupta V, Lim Z, et al. Alemtuzumab with fludarabine and cyclophosphamide reduces chronic graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation for acquired aplastic anemia. *Blood*. 2011;118(8):2351-7.
130. Samarasinghe S, Steward C, Hiwarkar P, et al. Excellent outcome of matched unrelated donor transplantation in paediatric aplastic anaemia following failure with immunosuppressive therapy: a United Kingdom multicentre retrospective experience. *Br J Haematol*. 2012;157(3):339-46.
131. Marsh JC, Pearce RM, Koh MB, et al. Retrospective study of alemtuzumab vs ATG-based conditioning without irradiation for unrelated and matched sibling donor transplants in acquired severe aplastic anemia: a study from the British Society for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(1):42-8.
132. DeZern AE, Luznik L, Fuchs EJ, et al. Post-transplantation cyclophosphamide for GVHD prophylaxis in severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplantation* 2011;46(7):1012-3.
133. DeZern AE, Brodsky RA. Haploidentical Donor Bone Marrow Transplantation for Severe Aplastic Anemia. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2018;32(4):629-42.
134. Clay J, Kulasekararaj AG, Potter V, et al. Nonmyeloablative peripheral blood haploidentical stem cell transplantation for refractory severe aplastic anemia. *Biol Bone Marrow Transplant*. 2014;20(11):1711-6.
135. Garnock-Jones KP, Keam SJ. *Eltrombopag*. *Drugs*. 2009;69(5):567-76.
136. Bussel JB, Cheng G, Saleh MN, et al. *Eltrombopag* for the treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*. 2007;357(22):2237-47.
137. Emmons RV, Reid DM, Cohen RL, et al. Human thrombopoietin levels are high when thrombocytopenia is due to megakaryocyte deficiency and low when due to increased platelet destruction. *Blood*. 1996;87(10):4068-71.
138. Feng X, Scheinberg P, Wu CO, et al. Cytokine signature profiles in acquired aplastic anemia and myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2011;96(4):602-6.
139. Olnes MJ, Scheinberg P, Calvo KR, et al. *Eltrombopag* and improved hematopoiesis in refractory aplastic anemia. *N Engl J Med*. 2012;367(1):11-9.
140. Desmond R, Townsley DM, Dumitriu B, et al. *Eltrombopag* restores trilineage hematopoiesis in refractory severe aplastic anemia that can be sustained on discontinuation of drug. *Blood*. 2014;123(12):1818-25.
141. Townsley DM, Scheinberg P, Winkler T, et al. *Eltrombopag* Added to Standard Immunosuppression for Aplastic Anemia. *N Engl J Med*. 2017;376(16):1540-50.
142. hATG+CsA vs hATG+CsA+Eltrombopag for SAA (RACE). *ClinicalTrials.gov*. A service of the U.S. National Institutes of Health. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02099747>.
143. Lane AA, Odejide O, Kopp N, et al. Low frequency clonal mutations recoverable by deep sequencing in patients with aplastic anemia. *Leukemia*. 2013;27(4):968-71.
144. Heuser M, Schlarman C, Dobbernack V, et al. Genetic characterization of acquired aplastic anemia by targeted sequencing. *Haematologica*. 2014;99(9):e165-7.
145. Kulasekararaj AG, Jiang J, Smith AE, et al. Somatic mutations identify a subgroup of aplastic anemia patients who progress to myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2014;124(17):2698-704.
146. Babushok DV, Olson TS, Bessler M. Somatic Mutations and Clonal Hematopoiesis in Aplastic Anemia. *N Engl J Med*. 2015;373(17):1673.
147. Yoshizato T, Dumitriu B, Hosokawa K, et al. Somatic Mutations and Clonal Hematopoiesis in Aplastic Anemia. *N Engl J Med*. 2015;373(1):35-47.
148. Ogawa S. Clonal hematopoiesis in acquired aplastic anemia. *Blood* 2016;128(3):337-47.
149. Stanley N, Olson TS, Babushok DV. Recent advances in understanding clonal hematopoiesis in aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2017;177(4):509-25.
150. Cooper JN, Young NS. Clonality in context: hematopoietic clones in their marrow environment. *Blood*. 2017;130(22):2363-72.
151. Luzzatto L, Risitano AM. Advances in understanding the pathogenesis of acquired aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2018;182(6):758-76.
152. Vago L, Perna SK, Zanussi M, et al. Loss of mismatched HLA in leukemia after stem cell transplantation. *N Engl J Med*. 2009;361(5):478-88.
153. Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2477-87.
154. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2488-98.
155. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2015;126(1):9-16.
156. Malcovati L, Galli A, Travaglino E, et al. Clinical significance of somatic mutation in unexplained blood cytopenia. *Blood*. 2017;129(25):3371-8.
157. Socie G, Rosenfeld S, Frickhofen N, et al. Late clonal diseases of treated aplastic anemia. *Semin Immunol*. 2000;37(1):91-101.
158. Risitano AM, Marotta S. Therapeutic complement inhibition in complement-mediated hemolytic anemias: Past, present and future. *Semin Immunol*. 2016;28(3):223-40.
159. Risitano AM, Marotta S. Toward complement inhibition 2.0: Next generation anti-complement agents for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol*. 2018;93(4):564-577.

Parole Chiave

Anemia aplastica, trapianto di midollo osseo, terapia immunosoppressiva, eltrombopag

Ringraziamenti

Associazione Italiana Emoglobinuria Parossistica Notturna (AIEPN); Severe Aplastic Anemia Working Party (SAAWP) dell'European society for Bone and Marrow Transplantation.

Indirizzi per la corrispondenza

Antonio M. Risitano

Professore Associato di Ematologia

Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia

Università degli Studi di Napoli Federico II

Via Pansini 5 80131 Napoli

Tel +39 081 7462037 - Fax +39 081 7464728

Cellulare +39 347 5786759

Email: amrisita@unina.it

Agenti stimolanti l'eritropoiesi



Roberto Latagliata, Serena Rosati, Michela Ansuinelli, Ida Carmosino, Massimo Breccia

Ematologia - Dipartimento di Medicina Traslationale e di Precisione - Università Sapienza di Roma

Introduzione

Gli agenti stimolanti l'eritropoiesi (ESA) sono un gruppo di proteine strutturalmente correlate all'eritropoietina (EPO), la cui azione biologica consiste nello stimolo dell'eritropoiesi midollare, con conseguente aumento dei livelli di emoglobina (Hb) nel sangue. Gli ESA sono stati inizialmente impiegati nel trattamento delle anemie secondarie a nefropatie⁽¹⁾, ma nel tempo il loro uso si è allargato ad anemie di varia altra eziologia.

In ambito onco-ematologico, gli ESA sono utilizzati attualmente sia nelle neoplasie linfoidi che nelle neoplasie mieloidi. Nelle neoplasie linfoidi (linfomi non Hodgkin, leucemia linfatica cronica, mieloma multiplo) il loro impiego è sostanzialmente di supporto e stimolo ad un midollo normale, ma depresso dalla chemioterapia in atto, in analogia all'uso in corso di chemioterapia per tumori solidi; al contrario, nelle neoplasie mieloidi gli ESA agiscono sulla componente midollare sede della malattia, e vanno pertanto considerati terapia attiva.

Nell'ambito delle neoplasie mieloidi, le sindromi mielodisplastiche (SMD) e le mielofibrosi primitive o secondarie a policitemia vera/trombocitemia essenziale (MP/S) sono attualmente le principali indicazioni terapeutiche degli ESA e verranno trattate specificamente di seguito.

Fisiologia dell'eritropoiesi

Viene definita eritropoiesi il complesso delle trasformazioni che nel midollo portano dalla cellula staminale totipotente alla formazione degli eritrociti maturi. Diverse sono le fasi di questo processo, che prevede la proliferazione delle cellule progenitrici eritroidi *Burst Forming Unit - Erythroid* (BFU-E) e *Colony Forming Unit - Erythroid* (CFU-E) seguita dalla proliferazione e progressiva differenziazione delle cellule precursori eritroidi (proeritroblasti, eritroblasti basofili, eritroblasti policromatofili) con progressivo accumulo dell'emoglobina nel citoplasma, fino alla formazione dell'eritroblasto ortocromatico, incapace di ulteriori divisioni e da cui viene espulso il nucleo con formazione dell'eritrocita maturo che viene liberato nel circolo^(2,3).

L'entità dell'eritropoiesi è fisiologicamente regolata da fattori stimolanti e fattori inibenti.

Di questi, l'EPO è il primo identificato nonché il più noto ed impiegato nella pratica clinica a fini terapeutici.

L'EPO è un ormone glicoproteico prodotto dalle cellule renali peritubulari (CRP), la cui parte proteica è costituita da 165 aminoacidi al momento della secrezione nel torrente circolatorio⁽⁴⁾. Il principale regolatore della produzione di EPO è la tensione di O₂ nel sangue, registrata dalle CRP. In presenza di un'elevata tensione di O₂ nel sangue, le CRP riducono la produzione di EPO; al contrario, in presenza di una ridotta tensione di O₂ nel sangue, si attiva nelle CRP la sintesi dell'*Hypoxia-Inducible Factor 1* (HIF-1) che a sua volta induce l'attivazione del gene dell'EPO e l'aumento della secrezione dell'EPO nel sangue⁽⁵⁾.

A livello del midollo osseo, l'EPO si lega ad uno specifico recettore di membrana presente sulle cellule progenitrici eritroidi (EPO-R): l'EPO-R è presente sulle CFU-E ed in minor misura sulle BFU-E e sui proeritroblasti, mentre è praticamente assente nelle fasi successive di maturazione della linea eritroide. Lo stimolo dell'EPO sull'eritropoiesi è quindi circoscritto alle fasi più precoci della differenziazione eritroide⁽⁶⁾.

A questo livello, il legame dell'EPO con l'EPO-R attiva attraverso la via di JAK-2/STAT una serie di segnali intracellulari che arrivano al nucleo, il cui risultato finale è un aumento della proliferazione e maturazione delle cellule progenitrici eritroidi⁽⁷⁾; inoltre, l'EPO è in grado di proteggere le cellule progenitrici eritroidi dalla fisiologica apoptosi che ne riduce il numero durante la maturazione in assenza dell'EPO stessa. Nel suo complesso, l'EPO è quindi in grado di espandere e rendere più efficiente l'eritropoiesi, con un aumento degli eritrociti e del livello di Hb nel sangue⁽³⁾.

Va ricordato che l'eritropoiesi normale, oltre che dallo stimolo positivo dell'EPO nelle fasi precoci a livello dei progenitori eritroidi, è regolata nelle fasi più avanzate da fattori inibitori: questi fattori, rappresentati dai ligandi della superfamiglia dei *Transforming Growth Factor* - beta, tramite legame con specifici recettori di superficie presenti sui precursori eritroidi e conseguente attivazione della via delle proteine SMAD, sono in grado di indurre apoptosi dei precursori eritroidi stessi⁽⁸⁾. Un quadro complessivo dell'eritropoiesi fisiologica è rappresentato nella Figura 1.

ERITROPOIESI FISIOLÓGICA

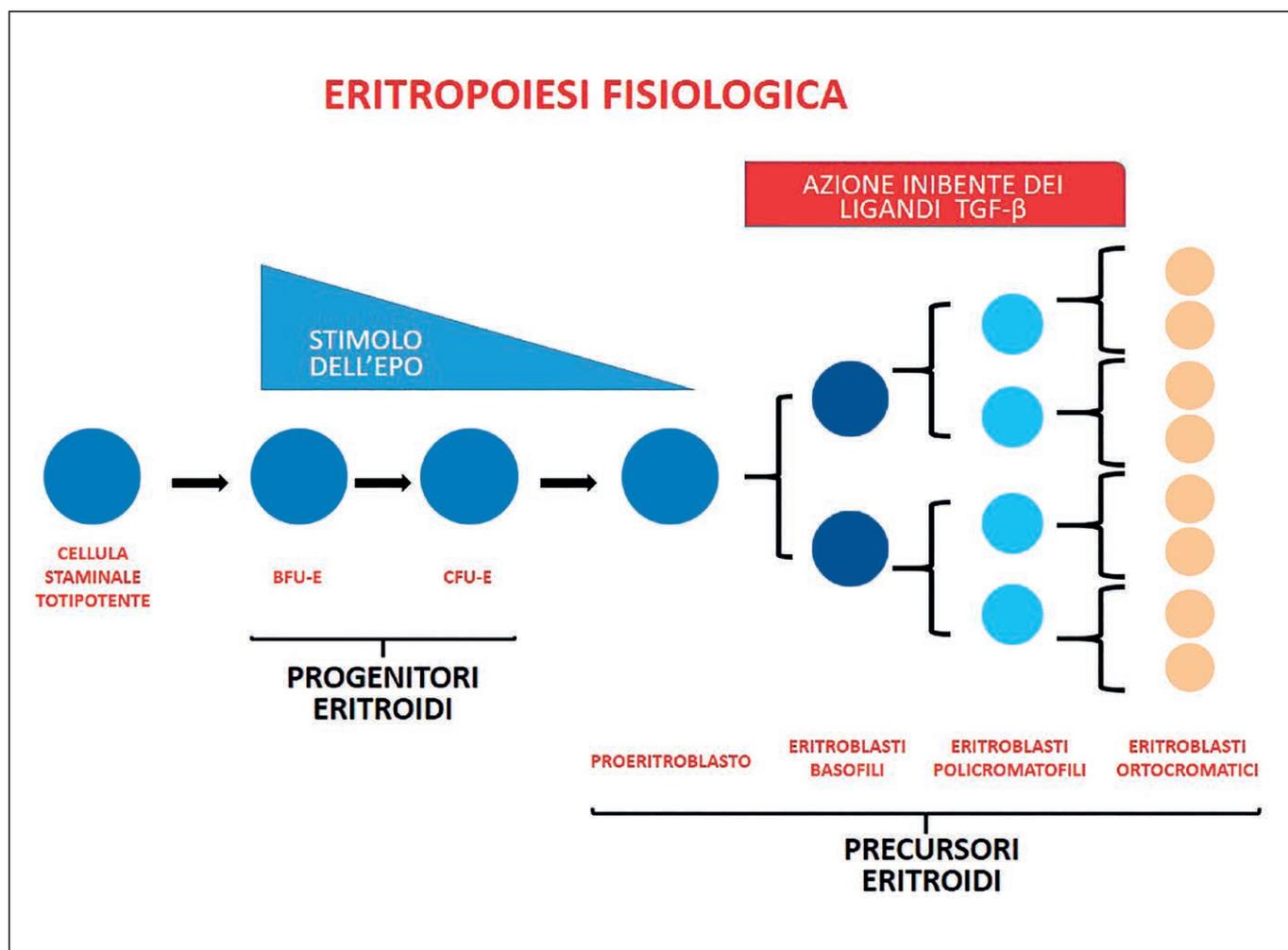


Figura 1 - Eritropoiesi fisiologica.

Caratteristiche chimico-biologiche

Come ricordato, l'EPO è una glicoproteina e gli ESA, sintetizzati con metodiche ricombinanti, ne ripetono la struttura proteica con più o meno importanti modifiche a carico della componente glicidica⁽⁹⁾.

	EPO-α	EPO-β	DPO
Peso molecolare	30400	30400	37100
N°aminoacidi	165	165	165 (5 diversi dall'EPO)
Catene glicidiche	4	5	6
N-glicani/O-glicani	3/1	4/1 (isoforme)	5/1
Residui sialici	≤ 14	≤ 14	≤ 22
Frazione glicidica	40%	40%	52%
Emivita, ore (sc)	18 - 24	18 - 24	48

Tabella 1 - Principali caratteristiche chimiche degli ESA disponibili nelle SMD

Esistono a tutt'oggi 3 principali ESA impiegati nel trattamento delle SMD: l'epoietina-alfa (EPO-α), l'epoietina-beta (EPO-β) e la darbepoietina (DPO). Le principali caratteristiche chimiche di queste molecole sono riassunte nella Tabella 1.

L'EPO-α è sostanzialmente identica all'EPO endogena, presentando anch'essa 4 catene glicidiche con una frazione glicidica complessiva del 40% e non più di 14 residui di acido sialico⁽¹⁰⁾.

L'EPO-β presenta lievi differenze rispetto all'EPO-α nella componente glicidica, con una diversa miscela di isoforme ed un maggior numero di residui N-glicani: queste differenze rendono l'EPO-β meno omogenea al tracciato elettroforetico sia rispetto all'EPO-α che all'EPO endogena, senza tuttavia differenze dal punto di vista farmacocinetico fra le 2 molecole⁽¹¹⁾.

Viceversa, la DPO presenta differenze di struttura più marcate nei confronti dell'EPO endogena. La struttura proteica presenta 5 varianti aminoacidiche rispetto all'EPO, mentre la struttura glicidica presenta un numero di residui sialici maggiore (fino a 22) con una frazione glicidica complessiva del 52%: questo incremento della componente glicidica conferisce alla DPO una prolungata emivita rispetto agli altri ESA⁽¹²⁾.

Terapie delle SMD

Eritropoiesi

L'eritropoiesi è quasi costantemente alterata nel corso delle SMD. Le alterazioni riguardano sia la proliferazione che la differenziazione degli elementi eritroidi, sia progenitori che precursori, con incremento patologico dell'apoptosi e della morte intramidollare delle cellule displastiche: il complesso di queste alterazioni viene definito eritropoiesi inefficace, ad indicare il principale effetto dal punto di vista clinico di una incapacità del midollo displastico di produrre un numero sufficiente di eritrociti maturi nel sangue, con conseguente anemia ⁽¹³⁾.

Da un punto di vista morfologico, l'eritropoiesi inefficace si traduce nei segni di displasia all'esame microscopico che sono indispensabili alla diagnosi di SMD e che devono essere presenti in almeno il 10% degli elementi della serie eritroide.

Le principali alterazioni morfologiche a carico degli elementi eritroidi consistono nella macro-megaloblastosi, in asincronie maturative nucleo-citoplasma, ponti internucleari, multinuclearità, inclusioni citoplasmatiche, formazione di sideroblasti ad anello da accumulo intramitochondriale di ferro.

I livelli di EPO endogena in corso di SMD tendono generalmente ad aumentare dai normali valori di 4 - 22 mU/ml a livelli più elevati, come tentativo fisiologico di compenso all'anemia. L'incremento dell'EPO tuttavia varia da paziente a paziente, raggiungendo in alcuni casi livelli molto elevati (> 15 - 20 volte il normale) e mantenendosi in altri casi a livelli inferiori a quelli attesi in base al grado di anemia ⁽¹⁴⁾; in quest'ultima evenienza si parla di inappropriata secrezione di EPO.

Le cellule progenitrici del clone displastico possiedono in genere una quantità normale di EPO-R sulla membrana: quest'ultimo peraltro non dimostra alterazioni strutturali ⁽¹⁵⁾. È verosimile che vi sia un'alterazione della trasmissione intracellulare del segnale attivato dal legame EPO/EPO-R, con ridotta attivazione della via di STAT-5 e conseguente ridotta proliferazione e differenziazione degli elementi eritroidi ⁽¹⁶⁾.

È importante ricordare, anche ai fini del trattamento con ESA, che nelle SMD all'esordio è presente una quota variabile di eritropoiesi normale residua, che tuttavia tende a ridursi nel tempo per l'espansione progressiva del clone displastico.

Indicazioni

L'anemia è il sintomo di più comune riscontro nelle SMD, essendo presente in circa il 50% dei pazienti alla diagnosi o comparso durante il corso della malattia in un altro 30% dei casi. La presenza di anemia si associa ad una ridotta sopravvivenza globale (SG), in particolare per aumento della mortalità da cause cardio-circolatorie ^(17,18), e ad una ridotta qualità di vita (QoL) ⁽¹⁹⁾.

Il trattamento di supporto con concentrati eritrocitari periodici dell'anemia severa (Hb < 8g/dl) a sua volta si associa a sovraccarico marziale, con conseguente danno a carico di numerosi parenchimi (cuore, fegato, ghiandole endocrine) ⁽²⁰⁾; inoltre, la formazione di

radicali liberi secondaria al sovraccarico marziale può danneggiare a livello del midollo osseo le cellule staminali, con peggioramento della displasia ed aumentato rischio di evoluzione in leucemia acuta mieloide (LAM) ⁽²¹⁾. È evidente pertanto come la terapia causale dell'anemia sia un obiettivo cruciale nella gestione dei pazienti affetti da SMD.

La scoperta della struttura, produzione e regolazione dell'EPO ha aperto una possibilità di cura in numerosi tipi di anemia, in particolare dagli anni '80 in poi con la possibilità tramite la tecnologia del DNA ricombinante della sintesi di adeguate quantità degli ESA.

Il ruolo degli ESA nell'anemia in corso di nefropatie, caratterizzate da una ridotta produzione di EPO endogena da parte del rene malato, è intuitiva ⁽¹⁾. Le SMD, al contrario, sono come già ricordato caratterizzate da dosaggi sierici aumentati di EPO endogena, quale normale meccanismo di compenso allo stato anemico, e pertanto il ruolo degli ESA è controverso. Due sono i possibili meccanismi d'azione degli ESA ipotizzati in questo ambito:

- 1) stimolazione sovramassimale del clone displastico da parte degli ESA a dosi farmacologiche, con superamento almeno parziale del difetto maturativo e riduzione dell'apoptosi intramidollare;
- 2) stimolazione selettiva delle cellule staminali normali residue, con conferimento di un vantaggio selettivo sul clone displastico e conseguente riesplorazione dell'eritropoiesi fisiologica.

Risultati

Basandosi sui suddetti possibili meccanismi di azione, gli ESA iniziarono ad essere impiegati in pazienti affetti da SMD a partire dall'inizio degli anni '90 fino a tutt'oggi. In questo lungo arco temporale, possiamo distinguere tre diverse fasi: a) fase degli studi iniziali, b) fase della maturità nell'impiego degli ESA, e c) fase degli studi randomizzati confirmatori.

Fase degli studi iniziali (1990 - 1999)

In questa prima fase temporale, corrispondente agli anni '90 ed iniziata immediatamente dopo l'impiego degli ESA nell'anemia in corso di nefropatie, una serie di studi (alcuni dei quali sintetizzati nella Tabella 2) testarono l'EPO- α e l'EPO- β su piccole coorti di pazienti non selezionati con SMD ^(22 - 29).

Questi studi iniziali permisero di acquisire alcune conoscenze importanti e tuttora valide nella pratica clinica sulle corrette modalità d'impiego degli ESA nelle SMD.

Per quanto concerne la somministrazione degli ESA, la via sottocutanea si dimostrò più comoda, e parimenti efficace, della somministrazione endovenosa, divenendo la via di scelta.

Altrettanto rapidamente fu chiaro che la dose richiesta nelle SMD era notevolmente più elevata di quella necessaria nelle anemie in corso di nefropatie: a partire da tali studi, il dosaggio iniziale standard dell'EPO- α e dell'EPO- β è stato stabilito in 30.000 - 40.000 UI a settimana, corrispondenti ad un dosaggio di 450-600 UI/kg/settimana. Tale dose standard settimanale nei primi studi era suddivisa in più somministrazioni, ma negli studi successivi la monosomministrazione settimanale è divenuta la modalità di scelta ⁽³⁰⁾.

Autore (anno)	N° pazienti	ESA	Dose iniziale	% risposte eritroidi
Aloe-Spiriti (1993)	23	EPO- α	800 UI/kg/sett	30,4
Ghio (1993)	13	EPO- α	75-250 UI/kg x 3/sett	38,0
Isnard (1994)	20	EPO- α	40-300 UI/kg x 3/sett	35,0
Stone (1994)	20	EPO- β	100-300 UI/kg x3/sett	35,0
Rose (1995)	100	EPO- α	150 UI/kg x3/sett	28,0
Di Raimondo (1996)	12	EPO- α	150 UI/kg x3/sett	58,3
Stasi (1997)	41	EPO- α	150 UI/kg x 3/sett	31,7
Ferrini (1998)	38	EPO- α	150 UI/kg/die	36,8

Tabella 2 - Risultati di alcuni studi iniziali sull'impiego degli ESA a dosaggio standard nelle SMD.

Per quanto concerne l'efficacia, va premesso che negli anni '90 gli studi utilizzarono criteri di risposta eritroide diversi da caso a caso, in assenza di una standardizzazione riconosciuta: pertanto, il confronto in termini di efficacia tra i vari studi di questa fase iniziale risente molto dei criteri di risposta utilizzati.

Fatta questa premessa, gli studi della fase iniziale evidenziarono complessivamente percentuali basse di risposte eritroidi, comprese fra il 25 ed il 58% dei soggetti trattati, con una mediana del 30-35% (Tabella 2). Una meta-analisi del 1997 su 17 studi di quel periodo iniziale riportò una risposta eritroide complessiva del 16%⁽³¹⁾.

L'unico studio randomizzato di questa prima fase, che confrontò pazienti trattati con EPO- α (150 UI/kg/die) verso placebo, dimostrò una percentuale di risposte eritroidi nel braccio attivo significativamente superiore a quella dei pazienti trattati con placebo (36,8% verso 10,8%, $p=0,007$)⁽²⁹⁾. Tuttavia, il numero ridotto di pazienti inseriti nello studio non permise al tempo conclusioni definitive.

Fase della maturità (2000 - 2017)

Alla fine degli anni '90, una serie di fattori hanno contribuito ad inaugurare una seconda fase più matura nell'impiego degli ESA in corso di SMD, durante la quale si sono costruite le basi per il trattamento odierno: la standardizzazione della risposta, la selezione dei pazienti e gli score predittivi e l'impiego degli ESA nella pratica clinica corrente.

Standardizzazione della risposta. Nel 2000 è stata pubblicata la prima classificazione della risposta al trattamento nelle SMD da parte dell'*International Working Group* (IWG), costituito da un gruppo di esperti di varia nazionalità⁽³²⁾: tale classificazione prevedeva, per quanto riguarda la risposta eritroide, una risposta maggiore (incremento dell'Hb ≥ 2 g/dl rispetto al basale e/o scomparsa del fabbisogno trasfusionale) ed una risposta minore (incremento dell'Hb $> 1 < 2$ g/dl rispetto al basale e/o riduzione $> 50\%$ del fabbisogno trasfusionale). Nel 2006 questi criteri sono stati modificati dall'IWG stesso, con la formulazione di un'unica risposta eritroide, definita dall'incremento dell'Hb $\geq 1,5$ g/dl rispetto al basale o dalla

riduzione nell'arco di 8 settimane di almeno 4 unità di emazie concentrate rispetto alle 8 settimane precedenti la terapia⁽³³⁾. L'introduzione di una standardizzazione della risposta eritroide ha reso molto più confrontabili i risultati dei vari studi.

La selezione dei pazienti e gli score predittivi. Nell'analisi dei risultati insoddisfacenti ottenuti dagli studi iniziali, è stato immediatamente chiaro che l'ampia variabilità di risposte osservata dipendeva in larga parte dalla differente selezione dei pazienti e che alcune caratteristiche cliniche o biologiche del singolo paziente erano in grado di influenzare la sua possibilità di ottenere una risposta eritroide al trattamento con gli ESA.

La sostanziale inefficacia degli ESA nelle SMD a rischio intermedio-2/alto secondo la classificazione IPSS è stata sottolineata in tutti gli studi iniziali, restringendo dalla fine degli anni '90 in poi il campo di applicazione degli ESA alle SMD a rischio basso/intermedio-1 con Hb < 10 g/dl e/o fabbisogno trasfusionale.

Oltre alla classificazione IPSS, il dosaggio dell'EPO endogena all'inizio del trattamento è stato uno dei fattori di risposta più importanti riportati da tutti gli studi⁽³⁴⁻⁴³⁾: in generale, per quanto concerne il singolo paziente, più bassa è l'EPO endogena all'inizio del trattamento, maggiori sono le possibilità di risposta eritroide. Nelle diverse casistiche, i valori soglia considerati per discriminare i soggetti a differente probabilità di risposta sono variati ampiamente: tuttavia, vi è generale accordo che per valori di EPO endogena > 500 mU/ml sia inutile una terapia con ESA a dosaggi standard e che al contrario valori di EPO endogena < 200 mU/ml si associno a percentuali di risposta eritroide $> 50\%$.

Un altro fattore predittivo evidenziato nella maggior parte degli studi è stato il fabbisogno trasfusionale all'inizio della terapia. I pazienti senza fabbisogno trasfusionale hanno le maggiori possibilità di risposta, mentre i pazienti con elevato fabbisogno trasfusionale (> 2 unità di emazie/mese) hanno una probabilità di risposta $< 20\%$ ^(40,42,43).

Altri fattori predittivi di scarsa risposta agli ESA, la cui importanza è stata riportata solo in alcuni studi ma non in altri, sono stati il livello di Hb < 8 g/dl all'inizio del trattamento⁽⁴²⁾, la presenza della

delezione del braccio lungo del cromosoma 5 (del5q-), un lungo intervallo dalla diagnosi⁽⁴⁴⁾.

Come in altre patologie, si è cercato nel corso degli anni di utilizzare assieme i diversi fattori prognostici identificati, per creare uno score di probabilità di risposta che fosse più accurato dei singoli fattori. Il primo ad essere elaborato e che viene tuttora utilizzato è stato il cosiddetto Nordic Score, in cui i pazienti in base al fabbisogno trasfusionale (< 2 unità/mese vs ≥ 2 unità/mese) ed al dosaggio pre-terapia dell'EPO endogena (< 100 mU/ml verso 100 - 500 mU/ml verso > 500 mU/ml) vengono assegnati a 3 categorie di probabilità di risposta: probabilità alta (74%), probabilità intermedia (23%) e probabilità bassa (7%)⁽⁴⁵⁾.

Molto recentemente, è stato elaborato un nuovo score (denominato ITACA score) su di una ampia casistica italo-canadese di 996 pazienti trattati con ESA, assegnando un punteggio di 1 ai seguenti 3 parametri: EPO endogena < 100 mU/ml, non fabbisogno trasfusionale ed IPSS *low-risk*⁽⁴⁶⁾. I pazienti sono stati distinti in base al punteggio complessivo individuale in 4 gruppi (da punteggio 0 a punteggio 3) con diversa probabilità di risposta eritroide (rispettivamente 23%, 43%, 67%, 85%). Nei confronti del Nordic score, l'ITACA score sembra avere un potere di discriminazione della risposta maggiore, ma il suo uso nella pratica clinica è ancora limitato. *Impiego degli ESA nella pratica clinica corrente.* In assenza di terapie alternative efficaci nei pazienti anemici con SMD a basso rischio, gli ESA sono entrati dal 2000 in poi nella pratica clinica corrente come prima linea di trattamento: in Italia, in particolare, ne è stata possibile la dispensazione in base alla legge 648 sui farmaci per le patologie orfane.

Questo impiego clinico diffuso degli ESA, recepito da tutte le linee-guida nel trattamento delle SMD a basso rischio, ha permesso di raccogliere dati in studi retrospettivi su più ampie casistiche unicentriche o multicentriche di pazienti con SMD a basso rischio seguiti nella *real-life*^(42,46).

Risultati con gli ESA a dosaggio iniziale standard

Dal 2000 ad oggi, basandosi sui fattori favorevoli sopra menzionati, numerosi studi prospettici di fase II e studi retrospettivi sono stati condotti su ampie coorti di pazienti. Bisogna inoltre ricordare che dai primi anni del 2000 anche la DPO ha iniziato ad essere utilizzata nelle SMD, al dosaggio iniziale standard di 150 mcg/settimana.

I risultati di questi studi, alcuni dei quali riportati nella Tabella 3⁽³⁴⁻⁴³⁾, hanno permesso non solo di migliorare notevolmente le percentuali di risposte eritroidi ottenibili con gli ESA a dosaggio iniziale standard grazie ad una più accurata selezione dei pazienti trattati, ma anche di valutare e codificare altri parametri importanti nell'utilizzo degli ESA, quali la durata della risposta e l'eventuale impatto sulla SG.

Grazie a questi studi si sono andate progressivamente consolidando le seguenti considerazioni sul corretto impiego degli ESA a dosi iniziali standard, che sono a tutt'oggi valide nella pratica clinica corrente:

- la risposta eritroide si ottiene in genere entro il secondo/terzo mese di terapia: in assenza di una risposta eritroide al terzo mese, è indicato un incremento della dose settimanale a 60.000 - 80.000 UI;
- in assenza di risposta eritroide dopo tre mesi dall'incremento della dose, è ragionevole sospendere il trattamento per inefficacia;
- negli studi in cui è stata valutata prospetticamente, la QoL è sempre significativamente migliorata nei pazienti rispondenti^(36,39);
- nei diversi studi (Tabella 3) non si sono evidenziate sostanziali differenze di risposta eritroide con l'uso dei diversi ESA, che pertanto vanno considerati equivalenti per quanto concerne l'efficacia;
- l'impiego degli ESA si è dimostrato efficace e sicuro anche in pazienti di età molto avanzata⁽⁴⁷⁾: pertanto, non vi sono limiti d'età all'utilizzo degli ESA;
- durante il trattamento con ESA va monitorato attentamente il bilancio marziale per il possibile instaurarsi di una carenza re-

AUTORE (ANNO)	N° pazienti	ESA	DOSE INIZIALE	% RISPOSTE ERITROIDI	DURATA MEDIANA DI RISPOSTA (MESI)	SG MEDIANA (MESI)
Terpos (2002)	281	EPO-α	150 UI/kg x 3/sett	45,1	17,0	NR
Musto (2005)	37	DPO	150 mcg/sett	41,0	NR	NR
Stasi (2005)	53	DPO	150 mcg/sett	38,0	Non raggiunta	NR
Giraldo (2006)	69	DPO	75-300 mcg/sett	55,0	NR	NR
Gabrilove (2008)	144	DPO	500 mcg/3 sett	49,0	NR	NR
Oliva (2010)	41	DPO	150 mcg/sett	48,0	NR	NR
Balleari (2011)	55	EPO-α	40.000 UI/sett	65,5	Non raggiunta	NR
Molteni (2013)	58	EPO-α/β	30.000-40.000 UI/sett	57,0	29,0	NR
Buccisano (2016)	361	EPO-α/β	30.000-40.000 UI/sett	55,4	12,4	57,1
Houston (2017)	199	EPO-α/β, DPO	40.000 UI/150 mcg/sett	47,0	NR	NR

Tabella 3 - Risultati di alcuni studi sull'impiego degli ESA a dosaggio standard nelle SMD negli anni 2000 - 2016.

lativa di ferro: in questi casi, l'inserimento di un breve ciclo di terapia marziale è in grado di ottenere/riacquistare una risposta eritroide ⁽⁴¹⁾;

- la durata mediana di risposta si attesta nei diversi studi mediamente sui 12 - 18 mesi, con un range da 3 a 24 mesi ed una incidenza di ricomparsa dell'anemia > 50% (Tabella 3);
- alcuni studi hanno permesso, seppure in maniera retrospettiva, di osservare una SG significativamente più lunga nei soggetti con risposta eritroide agli ESA rispetto ai soggetti resistenti ⁽⁴²⁾.

Le acquisizioni cliniche sull'uso degli ESA nelle SMD che si sono andate formando in questa fase hanno trovato un corrispettivo ed una formalizzazione nelle numerose linee-guida sul trattamento delle SMD uscite negli stessi anni.

Fra le tante, peraltro molto simili fra di loro, vanno ricordate quelle della Società Italiana di Ematologia del 2010 ⁽⁴⁸⁾ e dell'*European LeukemiaNet* (ELN) del 2013 ⁽⁴⁹⁾. In entrambe viene posta indicazione al trattamento con ESA dei pazienti a basso rischio (IPSS low/int-1) con anemia (Hb < 10 g/dl) e livelli di EPO endogena < 500 mU/ml, laddove possibile prima che compaia un fabbisogno trasfusionale importante (> 2 unità/mese).

Un caso particolare, ripreso anche dalle linee-guida, riguarda i pazienti con SMD e del5q- che presentano risposte agli ESA minori rispetto alle altre SMD, come riportato dal gruppo francese (risposte eritroidi 43% nelle SMD con del5q- verso 64% nelle SMD senza del5q-, p=0.03) ⁽⁵⁰⁾. Poiché nei pazienti con del5q- è invece molto attiva la lenalidomide, che però è gravata anche da notevole tossicità a differenza degli ESA, rimane ancora incerto quale debba essere l'approccio di prima linea da utilizzare in questi pazienti: in linea di massima, trattandosi anche di soggetti generalmente molto anziani e con molte comorbidità, un atteggiamento prudente potrebbe prevedere un iniziale approccio con gli ESA, seguito da un precoce passaggio alla lenalidomide in assenza di risposta eritroide al 3° mese di ESA.

Fase degli studi randomizzati confirmatori (2017-2018)

Tutti i dati riportati nelle fasi precedenti sono basati in massima parte su studi non randomizzati o su analisi retrospettive. In realtà,

fino al 2017 non sono stati disponibili dati da studi randomizzati sull'efficacia degli ESA verso placebo di sufficiente ampiezza e validità statistica, ritenuti indispensabili dagli organi regolatori per una approvazione definitiva dell'indicazione terapeutica degli ESA nelle SMD a basso rischio.

A partire dal 2011, per rispondere a questa esigenza, sono stati iniziati due studi randomizzati con ESA a dosaggio standard verso placebo, sponsorizzati dalle rispettive case farmaceutiche. Nel primo (ARCADE) è stata impiegata la DPO ⁽⁵¹⁾ mentre nel secondo (EPOANE) è stata impiegata l'EPO- α ⁽⁵²⁾. L'obiettivo primario di entrambi gli studi era la percentuale di risposte eritroidi alla 24^a settimana di trattamento.

I risultati dei due studi, riportati nella Tabella 4, sono stati pubblicati nel 2017 (ARCADE) e nel 2018 (EPOANE) ed in entrambi la percentuale di risposte eritroidi alla 24^a settimana è risultata significativamente superiore nei pazienti trattati con ESA rispetto ai pazienti trattati con placebo, raggiungendo pertanto l'obiettivo primario ed aprendo la strada all'approvazione degli ESA nel prontuario terapeutico.

È possibile migliorare i risultati degli ESA a dosaggio standard?

La maggior parte degli studi e delle analisi retrospettive sull'impiego degli ESA a dosaggio iniziale standard hanno riportato percentuali di risposte eritroidi \leq 50%. Nei due studi randomizzati ARCADE ed EPOANE si sono osservate nel braccio di trattamento con ESA percentuali anche inferiori (alla 24^a settimana di terapia il 14,7% nell'ARCADE ed il 31,8% nell'EPOANE, rispettivamente) ^(51,52).

Si è pertanto sentita l'esigenza di provare a migliorare i dati ottenibili con gli ESA a dosaggio iniziale standard fin dai primi anni del loro impiego. Le strategie impiegate sono state diverse, ma quelle che a tutt'oggi si sono rivelate più efficaci sono essenzialmente due: l'associazione degli ESA con il fattore di crescita granulocitario (G-CSF) e l'impiego delle alte dosi di ESA.

	ARCADE		EPOANE	
	DPO	Placebo	EPO- α	PLACEBO
N°pazienti (M/F)	97	49	85	45
Età mediana, anni (range IQ/range)	74 (68 - 79)	73 (66 - 80)	85 (40 - 94)	75 (36 - 87)
IPSS low/int-1, %	51,0/49,0	50,5/49,5	42,4/57,6	51,1/48,9
Tipo di ESA	DPO	-	EPO- α	-
Dosaggio iniziale	500 mcg/3 sett	-	450 UI/kg/sett	-
Risposta eritroide (24 ^a sett) (%)	14,7	0	31,8	4,4
Significatività ESA verso placebo	p=0,016		p<0,001	

Tabella 4 - Risultati degli studi randomizzati di fase III ARCADE ed EPOANE (ESA verso placebo).

Associazione degli ESA con il G-CSF

L'impiego del G-CSF in associazione agli ESA trova un razionale biologico nell'inibizione dell'apoptosi indotta dal G-CSF, che è sinergica con l'analoga azione dell'EPO endogena e degli ESA⁽⁵³⁾; questa azione del G-CSF sull'eritropoiesi displastica sembra particolarmente attiva nelle SMD con sideroblasti ad anello⁽⁵⁴⁾.

Diversi studi hanno quindi testato l'associazione del G-CSF con gli ESA nella clinica: alcuni studi hanno usato l'associazione dall'inizio del trattamento⁽⁵⁵⁻⁵⁹⁾, mentre in altri casi il G-CSF è stato introdotto dopo 2 - 3 mesi di ESA come terapia di salvataggio nei pazienti resistenti^(60,61).

Il primo approccio (terapia simultanea ESA + G-CSF) ha prodotto percentuali di risposta eritroide sovrapponibili a quelle ottenute con gli ESA da soli a dosi iniziali standard⁽⁶²⁾. L'uso sequenziale del G-CSF nei pazienti resistenti ai soli ESA ha permesso di ottenere un ulteriore 10 - 15% di pazienti rispondenti^(60,61), percentuale questa non diversa da quella ottenibile con il semplice incremento della dose degli ESA.

Va peraltro ricordato che in Italia l'uso del G-CSF in associazione agli ESA è fuori indicazione da scheda tecnica, e pertanto il suo impiego è limitatissimo nella pratica clinica corrente.

Impiego delle alte dosi di ESA

L'incremento della dose di ESA, comunemente impiegato nella pratica clinica nei pazienti resistenti al trattamento iniziale a dosaggio standard, ha permesso in diversi studi di ottenere una risposta eritroide nel 10 - 15% di tali soggetti. L'incremento era peraltro ben tollerato e non si associava a tossicità aggiuntive rispetto alla dose standard.

Partendo da queste osservazioni, alcuni studi hanno testato negli anni la possibilità di utilizzare fin dall'inizio del trattamento gli ESA ad alte dosi, corrispondenti a 60.000 - 80.000 UI/settimana per l'EPO- α e l'EPO- β e a ≥ 300 mcg/settimana per la DPO, con lo scopo di sfruttarne al meglio il sovradosaggio farmacologico nel superamento delle alterazioni proliferative e maturative del clone displastico.

Nella Tabella 5 sono riassunti alcuni di questi studi, che hanno evidenziato percentuali di risposta eritroide costantemente $\geq 50\%$ ed in diversi casi intorno al 65 - 70%, senza tuttavia un apparente prolungamento della durata di risposta^(42,63-66).

Anche utilizzando le alte dosi di ESA, i principali fattori predittivi di

risposta sono rimasti il dosaggio dell'EPO endogena e la presenza/assenza di fabbisogno trasfusionale pretrattamento^(42,63-66).

Allo stato attuale, in mancanza di studi randomizzati che comparino prospetticamente i risultati ottenibili con dosi iniziali standard verso quelli ottenibili con le alte dosi, entrambi gli approcci iniziali sono usati a seconda dell'esperienza del singolo medico e/o delle caratteristiche più o meno favorevoli per la risposta del singolo paziente⁽⁶⁷⁾: va ricordato, tuttavia, che nelle linee-guida della SIE⁽⁴⁸⁾ i dosaggi iniziali consigliati per l'EPO- α e l'EPO- β sono le 60.000 - 80.000 UI/settimana.

Tossicità degli ESA

La tossicità rilevata nei pazienti con SMD durante il trattamento con ESA, sia a dosi iniziali standard che ad alte dosi, è stata costituita essenzialmente da fenomeni trombotici e crisi ipertensive. Entrambe queste tossicità sono comunque comparse in meno del 5% dei pazienti trattati ed in presenza di fattori predisponenti^(42,63,66,68).

Il riscontro di fenomeni trombotici è stato ampiamente segnalato in pazienti affetti da neoplasie solide trattati con ESA per anemia in corso di chemioterapia: diverse meta-analisi hanno dimostrato un significativo incremento del rischio trombotico in questi pazienti⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾, con conseguente indicazione alla cautela nell'uso degli ESA in pazienti con fattori predisponenti o in associazione a chemioterapie ad alto rischio trombogenico.

Tuttavia, l'aumentato rischio trombotico evidenziato in questi studi è verosimilmente legato alla patologia neoplastica in sé piuttosto che al trattamento con ESA: questo spiega la ridotta incidenza dei fenomeni trombotici osservata in corso di ESA nei pazienti con SMD. Un altro effetto avverso molto raro e grave riportato in corso di terapia con ESA è stato l'insorgenza di un'aplasia eritroide selettiva, legata alla somministrazione sottocutanea dell'EPO- α e dovuta alla formazione di anticorpi anti-eritrociti secondari ad eccipienti presenti nella formulazione.

Tale complicanza è stata riportata da numerosi autori in pazienti con anemia secondaria a nefropatie^(72,73): al contrario, è stata descritta solo in casi isolati di pazienti affetti da SMD trattati con ESA^(74,75) e pertanto non sembra costituire un problema in questo sottogruppo.

Cosa succede dopo il fallimento degli ESA?

Uno dei punti più critici nel trattamento attuale delle SMD a basso

AUTORE (ANNO)	N° pazienti	ESA	DOSE INIZIALE	% RISPOSTE ERITROIDI	DURATA MEDIANA DI RISPOSTA (MESI)	SG MEDIANA
Aloe Spiriti (2005)	133	EPO- α	80.000 UI/sett	68,0	NR	NR
Latagliata (2008)	60	EPO- α	80.000 UI/sett	50,0	12,0	NR
Park (2008)	403	EPO- α/β , DPO	60.000 UI/300 mcg/sett	62,0	20,0	64% a 5 anni
Latagliata (2015)	140	EPO- α	80.000 UI/sett	56,4	10,9	79% a 24 mesi
Buccisano (2016)	182	EPO- α	60.000-80.000 UI/sett	69,2	14,0	57,1 mesi

Tabella 5 - Risultati sull'impiego degli ESA ad alte dosi nelle SMD.

rischio è l'approccio ai pazienti trattati con ESA e resistenti o recidivati dopo una iniziale risposta. I risultati in questo gruppo di pazienti sono infatti molto deludenti per quanto concerne l'ottenimento di una risposta eritroide.

Diversi approcci sono stati testati negli anni, fra cui sono stati già ricordati l'aumento della dose di ESA in caso di trattamento con dosi iniziali standard e l'aggiunta del G-CSF. L'impiego della lenalidomide, da sola o in associazione con gli ESA, è stato valutato in diversi studi riassunti nella Tabella 6⁽⁷⁶⁻⁷⁸⁾: complessivamente, la possibilità di ottenere una risposta eritroide è stata di circa il 25%, con una durata mediana peraltro breve (< 12 mesi). Allo stesso modo, l'impiego dell'azacitidina da sola o in associazione con l'EPO-β non ha dato risultati migliori (Tabella 6)⁽⁷⁹⁾.

Una analisi retrospettiva su di un'ampia casistica internazionale di 1.698 pazienti ha confermato la scarsa efficacia della lenalidomide e dell'azacitidina come terapia di seconda linea nei pazienti resistenti/recidivati dopo trattamento di prima linea con ESA⁽⁸⁰⁾: tuttavia, nella stessa analisi è stato sottolineato che questi pazienti non perdono le caratteristiche di basso rischio e mantengono una prognosi relativamente buona con una lunga sopravvivenza.

Prospettive future

Dai risultati fin qui riportati emerge chiaramente come la terapia con ESA costituisca la prima linea nel trattamento dell'anemia nelle SMD a basso rischio: altrettanto chiaramente emerge la necessità di futuri sviluppi per migliorare i risultati ottenibili a tutt'oggi con gli ESA.

La più promettente prospettiva futura nasce dai recenti risultati riportati con gli inibitori dei ligandi della superfamiglia dei *Transforming Growth Factor* - beta, capaci di catturare questi ultimi in circolo evitandone il legame con i corrispondenti recettori e la conseguente inibizione dell'eritropoiesi. Le due molecole utilizzate (sotatercept e luspatercept) si sono dimostrate efficaci in studi di fase 2 su pazienti resistenti/refrattari agli ESA⁽⁸¹⁻⁸²⁾, in particolare nelle forme con sideroblasti ad anello.

Il grande interesse risiede nella possibile associazione in prima linea di questi farmaci con gli ESA, considerandone l'effetto a diversi livelli dell'eritropoiesi e quindi la possibile sinergia d'azione.

Terapia della mielofibrosi primitiva/secondaria

L'anemia in corso di MP/S riconosce una genesi multifattoriale, essendo dovuta alla progressiva sostituzione fibrotica del midollo osseo, all'aumentata produzione di citochine infiammatorie ad azione inibente sull'eritropoiesi, all'aumentata distruzione degli eritrociti da parte della milza ingrandita ed anche in parte all'emodiluizione, e tende a peggiorare nel corso del tempo⁽⁸³⁾.

Nella MP/S una terapia con ESA può essere adottata in due contesti diversi di anemia:

- pazienti senza rilevante splenomegalia e/o sintomi sistemici, in cui l'anemia è isolata e costituisce il motivo primario di trattamento. In questi casi gli ESA vengono usati da soli o in associazione al danazolo;
- pazienti in trattamento con ruxolitinib per splenomegalia e/o sintomi sistemici, in cui l'anemia compare o si aggrava come effetto avverso del trattamento primario.

Anemia isolata

Per quanto riguarda il trattamento con ESA dell'anemia isolata in corso di MP/S, le principali casistiche in letteratura sono riportate nella Tabella 7⁽⁸³⁻⁹⁰⁾.

Come si evince dalla Tabella 7, le casistiche disponibili spesso hanno valutato numeri esigui di pazienti e hanno evidenziato percentuali molto differenti di risposte eritroidi, con una mediana di circa il 40-45%.

L'ampio range di risposte eritroidi è dovuto a diversi fattori, fra i quali una diversa selezione dei pazienti (in alcuni studi venivano esclusi dalla terapia con ESA i pazienti con livelli endogeni di EPO > 125 mU/ml), una diversa valutazione da studio a studio della risposta eritroide e una percentuale variabile nei diversi studi di soggetti sottoposti ad altri trattamenti concomitanti (idrossiurea, danazolo, ruxolitinib).

Anche per quanto concerne i fattori predittivi di risposta, non vi è stata concordanza fra i diversi studi. I livelli di EPO endogena sono risultati fattore predittivo in alcuni studi⁽⁸⁸⁾ ma non in altri^(87,89), così come la presenza di un fabbisogno trasfusionale^(86,89). Nello studio policentrico spagnolo, che ha arruolato retrospettivamente il maggior numero di pazienti, sono stati identificati come fattori

AUTORE (ANNO)	N° pazienti	TERAPIA	% TRASFUSIONE INDIPENDENZA	DURATA MEDIANA (MESI)
Komrokji (2012)	25	Lena (10 mg/die)	22	11
Toma (2016)	66 66	Lena (10 mg/die) vs Lena + EPO-α	14 24	18 15
Santini (2016)	160	Lena (10 mg/die) vs placebo	26,9 (vs 2,5, p <0,001)	8
Thepot (2016)	49 49	Aza (75 mg/m ² 5/28 gg) vs Aza + EPO-β	16 14	8 10

Tabella 6 - Risultati sull'impiego della lenalidomide e dell'azacitidina in pazienti resistenti/recidivati dopo ESA.

AUTORE (ANNO)	N° pazienti	ESA	DOSE INIZIALE	% RISPOSTE ERITROIDI	DURATA MEDIANA DI RISPOSTA (MESI)
Aloe Spiriti (1993)	7	EPO- α	160 UI/kg/die	57	NR
Hasselbalch (2002)	13	EPO- α	10.000 UI x 3/sett	84	NR
Cervantes (2004)	20	EPO- α	10.000 UI x 3/sett	45	12,5
Cervantes (2006)	20	DPO	150 mcg/sett	40	NR
Tsiara (2007)	20	EPO- α	10.000 UI x 3/sett	60	NR
Huang (2009)	43	EPO- α	NR	23	NR
Hernandez-Boluda (2017)	163	EPO- α (55) DPO (108)	20.000-40.000/sett 150 mcg/sett	53	19,3

Tabella 7 - Risultati sull'impiego degli ESA nell'anemia isolata in corso di MP.

predittivi positivi di risposta il sesso femminile, una ferritina < 200 ng/ml ed una leucocitosi > 10 x 10⁹/l: va però ricordato che in questo studio sono stati in genere esclusi dal trattamento i soggetti con EPO endogena > 125 mU/ml⁽⁹⁰⁾.

Come per le SMD, il rischio trombotico non sembra essere stato aumentato nelle MP/S dalla terapia con gli ESA⁽⁹⁰⁾. Un incremento della splenomegalia durante terapia con ESA si è osservato in circa il 25% dei pazienti, ma è stato difficile attribuirlo ad un effetto degli ESA piuttosto che ad una progressione della MP/S⁽⁹⁰⁾.

Questi dati, pur nella loro eterogeneità, depongono per una relativa efficacia e sicurezza degli ESA in questo sottogruppo di pazienti.

Anemia secondaria

Il ruxolitinib, inibitore di JAK-1/2, è diventato nella pratica clinica corrente la prima opzione nel trattamento della MP/S con splenomegalia e/o sintomi sistemici⁽⁹¹⁾. La tossicità più importante del ruxolitinib è quella ematologica, in particolare la comparsa di anemia o il suo peggioramento se già presente all'inizio della

terapia: circa il 30 - 40% dei pazienti sviluppa un'anemia di grado 3 - 4 WHO, in particolare nei primi 12 mesi di trattamento con il ruxolitinib⁽⁹²⁾.

Il ricorso agli ESA per trattare l'anemia secondaria al ruxolitinib è tuttora controverso⁽⁹³⁾, ma l'impiego degli ESA in queste circostanze è molto diffuso nella pratica clinica corrente.

In un recente lavoro di un gruppo multicentrico italiano sono stati raccolti dati su una casistica retrospettiva *real-life* di 59 pazienti trattati con qualunque tipo di ESA a dosaggio iniziale standard durante la terapia con ruxolitinib: una risposta all'anemia, secondo i criteri codificati dall'*International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT)* nel 2013⁽⁹⁴⁾, si è avuta nel 54% dei casi e si è dimostrata durevole nel tempo, con il 96% dei pazienti rispondenti che mantenevano la risposta ad un follow up mediano di 48 mesi e senza che si siano osservati fenomeni trombotici⁽⁹⁵⁾. Si può pertanto concludere che anche questo impiego degli ESA in corso di MP/S sia efficace e privo di effetti collaterali imprevisti.

Bibliografia

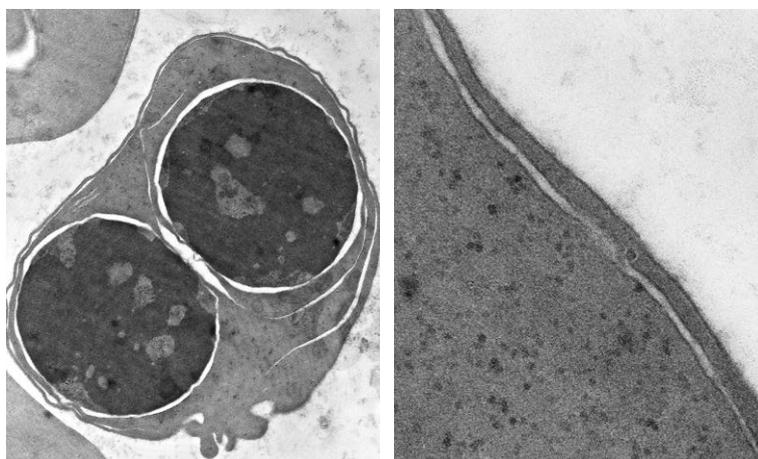
1. Eschbach JW. The anemia of chronic renal failure: pathophysiology and the effects of recombinant erythropoietin. *Kidney Int.* 1989;35(1):134-48.
2. Breda L, Rivella S. Modulators of erythropoiesis: emerging therapies for hemoglobinopathies and disorders of red cell production. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2014;28(2):375-86.
3. Nandakumar SK, Ullrich JC, Sankaran VG. Advances in understanding erythropoiesis: evolving perspectives. *Br J Haematol.* 2016;173(2):206-18.
4. Lai PH, Everett R, Wang FE, et al. Structural characterization of human erythropoietin. *J Biol Chem.* 1986;261(7):3116-21.
5. Shih HM, Wu CJ, Lin SL. Physiology and pathophysiology of renal erythropoietin-producing cells. *J Formos Med Assoc.* 2018;117(11):955-963.
6. Elliott S, Sinclair A, Collins H, et al. Progress in detecting cell-surface protein receptors: the erythropoietin receptor example. *Ann Hematol.* 2014;93(2):181-92.
7. Perreault AA, Venters BJ. Integrative view on how erythropoietin signaling controls transcription patterns in erythroid cells. *Curr Opin Hematol.* 2018;25(3):189-195.
8. Kang YJ, Shin JW, Yoon JH, et al. Inhibition of erythropoiesis by Smad6 in human cord blood hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;423(4):750-6.
9. Inoue N, Takeuchi M, Ohashi H, et al. The production of recombinant human erythropoietin. *Biotechnol Annu Rev.* 1995;1:297-313.
10. Markham A, Bryson HM. Epoetin alfa. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in nonrenal applications. *Drugs.* 1995;49(2):232-254.
11. Skibeli V, Nissen-Lie G, Torjesen P. Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. *Blood.* 2001;98(13):3626-34.
12. Egrie JC, Dwyer E, Browne JK, et al. Darbepoetin alfa has a longer circulating

- half-life and greater in vivo potency than recombinant human erythropoietin. *Exp Hematol.* 2003;31(3):290-29.
13. Angelucci E, Cianciulli P, Finelli C, et al. Unraveling the mechanisms behind iron overload and ineffective hematopoiesis in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* 2017;62:108-115.
 14. Bowen DT, Jacobs A, Cotes PM, et al. Serum erythropoietin and erythropoiesis in patients with myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol.* 1990;44(1):30-32.
 15. Backx B, Broeders L, Hoefsloot LH, et al. Erythropoiesis in myelodysplastic syndrome: expression of receptors for erythropoietin and kit ligand. *Leukemia.* 1996;10(3):466-472.
 16. Hoefsloot LH, van Amelsvoort MP, Broeders LC, et al. Erythropoietin-induced activation of STAT5 is impaired in the myelodysplastic syndrome. *Blood.* 1997;89(5):1690-1700.
 17. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol.* 2007;25(23):3503-10.
 18. Pfeilstöcker M, Tuechler H, Sanz G, et al. Time-dependent changes in mortality and transformation risk in MDS. *Blood.* 2016;128(7):902-10.
 19. Oliva EN, Finelli C, Santini V, et al. Quality of life and physicians' perception in myelodysplastic syndromes. *Am J Blood Res.* 2012;2(2):136-47.
 20. Gattermann N. Iron overload in myelodysplastic syndromes (MDS). *Int J Hematol.* 2018;107(1):55-63.
 21. Isidori A, Borin L, Elli E, et al. Iron toxicity - Its effect on the bone marrow. *Blood Rev.* 2018;32(6):473-479.
 22. Ghio R, Balleari E, Ballestrero A, et al. Subcutaneous recombinant human erythropoietin for the treatment of anemia in myelodysplastic syndromes. *Acta Haematol.* 1993;90(2):58-64.
 23. Isnard F, Najman A, Jaar B, et al. Efficacy of recombinant human erythropoietin in the treatment of refractory anemias without excess of blasts in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma.* 1994;12(3-4):307-14.
 24. Stone RM, Bernstein SH, Demetri G, et al. Therapy with recombinant human erythropoietin in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* 1994;18(10):769-76.
 25. Ghio R, Balleari E, Ballestrero A, et al. Subcutaneous recombinant human erythropoietin for the treatment of anemia in myelodysplastic syndromes. *Acta Haematol.* 1993;90(2):58-64.
 26. Di Raimondo F, Longo G, Cacciola E Jr, et al. A good response rate to recombinant erythropoietin alone may be expected in selected myelodysplastic patients. A preliminary clinical study. *Eur J Haematol.* 1996;56(1-2):7-11.
 27. Stasi R, Brunetti M, Bussa S, et al. Response to recombinant human erythropoietin in patients with myelodysplastic syndromes. *Clin Cancer Res.* 1997;3(5):733-9.
 28. Ferrini PR, Grossi A, Vannucchi AM, et al. A randomized double-blind placebo-controlled study with subcutaneous recombinant human erythropoietin in patients with low-risk myelodysplastic syndromes. Italian Cooperative Study Group for rHuEpo in Myelodysplastic Syndromes. *Br J Haematol.* 1998;103(4):1070-4.
 29. Cheung W, Minton N, Gunawardena K. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of epoetin alfa once weekly and three times weekly. *Eur J Clin Pharmacol.* 2001;57(5):411-418.
 30. Hellström-Lindberg E. Efficacy of erythropoietin in the myelodysplastic syndromes: a meta-analysis of 205 patients from 17 studies. *Br J Haematol.* 1995;89(1):67-71.
 31. Cheson BD, Bennett JM, Kantarjian H, et al. World Health Organization (WHO) international working group. Report of an international working group to standardize response criteria for myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2000;96(12):3671-3674.
 32. Cheson BD, Greenberg PL, Bennett JM, et al. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. *Blood.* 2006;108(2):419-25.
 33. Terpos E, Mougiou A, Kouraklis A, et al. Prolonged administration of erythropoietin increases erythroid response rate in myelodysplastic syndromes: a phase II trial in 281 patients. *Br J Haematol.* 2002;118(1):174-80.
 34. Musto P, Lanza F, Balleari E, et al. Darbepoetin alpha for the treatment of anaemia in low-intermediate risk myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 2005;128(2):204-209.
 35. Stasi R, Abruzzese E, Lanzetta G, et al. Darbepoetin alfa for the treatment of anemic patients with low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes. *Ann Oncol.* 2005;16(12):1921-27.
 36. Giraldo P, Nomdedeu B, Loscertales J, et al. Darbepoetin alpha for the treatment of anemia in patients with myelodysplastic syndromes. *Cancer.* 2006;107(12):2807-16.
 37. Gabrilove J, Paquette R, Lyons RM, et al. Phase 2, single-arm trial to evaluate the effectiveness of darbepoetin alfa for correcting anaemia in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 2008;142(3):379-93.
 38. Oliva EN, Nobile F, Alimena G, et al. Darbepoetin alfa for the treatment of anemia associated with myelodysplastic syndromes: efficacy and quality of life. *Leuk Lymphoma.* 2010;51(6):1007-14.
 39. Balleari E, Clavio M, Arboscello E, et al. Weekly standard doses of rh-EPO are highly effective for the treatment of anemic patients with low-intermediate 1 risk myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* 2011;35(11):1472-6.
 40. Molteni A, Riva M, Greco R, et al. Verifying Hellström-Lindberg score as predictive tool for response to erythropoietin therapy according to the "International Working Group" criteria, in anemic patients affected by myelodysplastic syndrome: a monocentric experience. *Int J Hematol.* 2013;97(4):472-9.
 41. Buccisano F, Piccioni AL, Nobile C, et al. Real-life use of erythropoiesis-stimulating agents in myelodysplastic syndromes: a "Gruppo Romano Mielodisplasia (GROM)" multicenter study. *Ann Hematol.* 2016;95(7):1059-65.
 42. Houston BL, Jayakar J, Wells RA, et al. A predictive model of response to erythropoietin stimulating agents in myelodysplastic syndrome: from the Canadian MDS patient registry. *Ann Hematol.* 2017;96(12):2025-2029.
 43. Park S, Kelaidi C, Sapena R, et al. Early introduction of ESA in low risk MDS patients may delay the need for RBC transfusion: a retrospective analysis on 112 patients. *Leuk Res.* 2010;34(11):1430-6.
 44. Hellstrom-Lindberg E, Negrin R, Stein R, et al. Erythroid response to treatment with G-CSF plus erythropoietin for the anaemia of patients with myelodysplastic syndromes: proposal for a predictive model. *Br J Haematol.* 1997;99(2):344-351.
 45. Buckstein R, Balleari E, Wells R, et al. ITACA: A new validated international erythropoietic stimulating agent-response score that further refines the predictive power of previous scoring systems. *Am J Hematol.* 2017;92(10):1037-1046.
 46. Tatarelli C, Piccioni AL, Maurillo L, et al. Recombinant human erythropoietin in very elderly patients with myelodysplastic syndromes: results from a retrospective study. *Ann Hematol.* 2014;93(8):1413-20.
 47. Santini V, Alessandrino PE, Angelucci E, et al. Clinical management of myelodysplastic syndromes: update of SIE, SIES, GITMO practice guidelines. *Leuk Res.* 2010;34(12):1576-88.
 48. Malcovati L, Hellström-Lindberg E, Bowen D, et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood.* 2013;122(17):2943-64.
 49. Kelaidi C, Park S, Brechignac S, et al. Treatment of myelodysplastic syndromes with 5q deletion before the lenalidomide era; the GFM experience with EPO and thalidomide. *Leuk Res.* 2008;32(7):1049-53.
 50. Platzbecker U, Symeonidis A, Oliva EN, et al. A phase 3 randomized placebo-controlled trial of darbepoetin alfa in patients with anemia and lower-risk my-

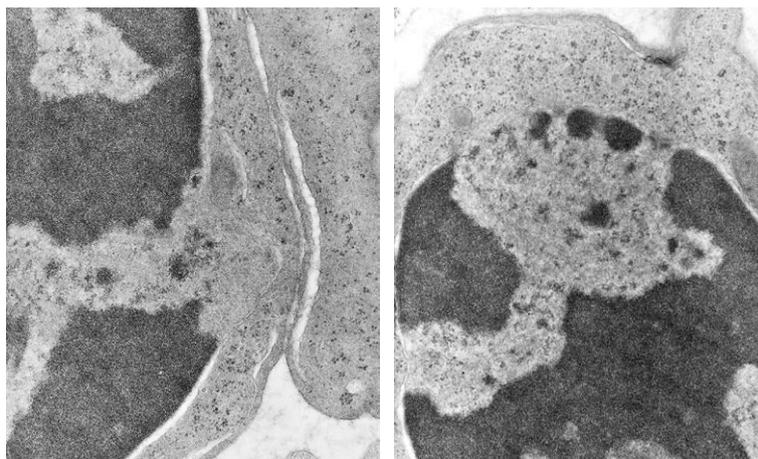
- elodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2017;31(9):1944-1950.
51. Fenaux P, Santini V, Spiriti MAA, et al. A phase 3 randomized, placebo-controlled study assessing the efficacy and safety of epoetin- α in anemic patients with low-risk MDS. *Leukemia*. 2018;32(12):2648-2658.
 52. Hellström-Lindberg E, van de Loosdrecht A. Erythropoiesis stimulating agents and other growth factors in low-risk MDS. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2013;26(4):401-10.
 53. Schmidt-Mende J, Tehranchi R, Forsblom AM, et al. Granulocyte colony-stimulating factor inhibits Fas-triggered apoptosis in bone marrow cells isolated from patients with refractory anemia with ringed sideroblasts. *Leukemia*. 2001;15(5):742-51.
 54. Imamura M, Kobayashi M, Kobayashi S, et al. Failure of combination therapy with recombinant granulocyte colony-stimulating factor and erythropoietin in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol*. 1994;68(4):163-6.
 55. Mantovani L, Lentini G, Hentschel B, et al. Treatment of anaemia in myelodysplastic syndromes with prolonged administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor and erythropoietin. *Br J Haematol*. 2000;109(2):367-75.
 56. Hellström-Lindberg E, Gulbrandsen N, Lindberg G, et al. A validated decision model for treating the anaemia of myelodysplastic syndromes with erythropoietin + granulocyte colony - stimulating factor: significant effects on quality of life. *Br J Haematol*. 2003;120(6):1037-46.
 57. Balleari E, Rossi E, Clavio M, et al. Erythropoietin plus granulocyte colony-stimulating factor is better than erythropoietin alone to treat anemia in low-risk myelodysplastic syndromes: results from a randomized single-centre study. *Ann Hematol*. 2006;85(3):174-80.
 58. Jädersten M, Malcovati L, Dybedal I, et al. Erythropoietin and granulocyte-colony stimulating factor treatment associated with improved survival in myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol*. 2008;26(21):3607-17.
 59. Remacha AF, Arrizabalaga B, Villegas A, et al. Erythropoietin plus granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of myelodysplastic syndromes. Identification of a subgroup of responders. The Spanish Erythropathology Group. *Haematologica*. 1999;84(12):1058-64.
 60. Kelaidi C, Beyne-Rauzy O, Braun T, et al. High response rate and improved exercise capacity and quality of life with a new regimen of darbepoetin alfa with or without filgrastim in lower-risk myelodysplastic syndromes: a phase II study by the GFM. *Ann Hematol*. 2013;92(5):621-31.
 61. Mundle S, Lefebvre P, Vekeman F, et al. An assessment of erythroid response to EPOetin alpha as a single agent versus in combination with granulocyte- or granulocytemacrophage-colony-stimulating factor in myelodysplastic syndromes using a meta-analysis approach. *Cancer*. 2009;115(4):706-15.
 62. Spiriti MA, Latagliata R, Niscola P, et al. Impact of a new dosing regimen of epoetin alfa on quality of life and anemia in patients with low-risk myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol*. 2005;84(3):167-76.
 63. Latagliata R, Oliva EN, Volpicelli P, et al. Twice-weekly high-dose rHuEpo for the treatment of anemia in patients with low-risk myelodysplastic syndromes. *Acta Haematol*. 2008;120(2):104-7.
 64. Park S, Grabar S, Kelaidi C, et al. Predictive factors of response and survival in myelodysplastic syndrome treated with erythropoietin and G-CSF: the GFM experience. *Blood*. 2008;111(2):574-82.
 65. Latagliata R, Alati C, Carmosino I, et al. Erythropoietin treatment in patients with myelodysplastic syndromes and type 2 diabetes. *J Diabetes*. 2015;7(4):493-6.
 66. Balleari E, Corso LD. High-dose recombinant human erythropoietin for "low-risk" myelodysplastic patients: is more better? *Chin Clin Oncol*. 2012;1(2):25.
 67. Park S, Fenaux P, Greenberg P, et al. Efficacy and safety of darbepoetin alpha in patients with myelodysplastic syndromes: a systematic review and meta-analysis. *Br J Haematol*. 2016;174(5):730-47.
 68. Bohlius J, Wilson J, Seidenfeld J, et al. Recombinant human erythropoietins and cancer patients: updated meta-analysis of 57 studies including 9353 patients. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(10):708-714.
 69. Tonelli M, Hemmelgarn B, Reiman T, et al. Benefits and harms of erythropoiesis-stimulating agents for anemia related to cancer: a meta-analysis. *CMAJ*. 2009;180(11):E62-71.
 70. Crathorne L, Huxley N, Haasova M, et al. The effectiveness and cost-effectiveness of erythropoiesis-stimulating agents (epoetin and darbepoetin) for treating cancer treatment-induced anaemia (including review of technology appraisal no. 142): a systematic review and economic model. *Health Technol Assess*. 2016;20(13):1-588.
 71. Rahbar M, Chitsazian Z, Abdoli F, et al. Pure red cell aplasia due to antibody against erythropoietin in hemodialysis patients. *J Nephropathol*. 2017;6(1):25-29.
 72. Jacob S, Nichols J, Macdougall IC, et al. Investigating Serious Adverse Drug Reactions in Patients Receiving Erythropoiesis-Stimulating Agents: A Root Cause Analysis Using the "ANTICIPATE" Framework. *Am J Ther*. 2018;25(6):e670-e674.
 73. Quint L, Casadevall N, Giraudier S. Pure red cell aplasia in patients with refractory anaemia treated with two different recombinant erythropoietins. *Br J Haematol*. 2004;124(6):842.
 74. Luraschi A, Montanara S, Fedeli P, et al. Pure red cell aplasia in patient affected by myelodysplastic syndrome treated with R-Epo. *Recenti Prog Med*. 2008;99(5):255-7.
 75. Komrokji RS, Lancet JE, Swern AS, et al. Combined treatment with lenalidomide and epoetin alfa in lower-risk patients with myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2012;120(17):3419-24.
 76. Toma A, Kosmider O, Chevret S, et al. Lenalidomide with or without erythropoietin in transfusion-dependent erythropoiesis-stimulating agent-refractory lower-risk MDS without 5q deletion. *Leukemia*. 2016;30(4):897-905.
 77. Santini V, Almeida A, Giagounidis A, et al. Randomized Phase III Study of Lenalidomide Versus Placebo in RBC Transfusion-Dependent Patients With Lower-Risk Non-del(5q) Myelodysplastic Syndromes and Ineligible for or Refractory to Erythropoiesis-Stimulating Agents. *J Clin Oncol*. 2016;34(25):2988-96.
 78. Thépot S, Ben Abdelali R, Chevret S, et al. A randomized phase II trial of azacitidine +/- epoetin- β in lower-risk myelodysplastic syndromes resistant to erythropoietic stimulating agents. *Haematologica*. 2016;101(8):918-25.
 79. Park S, Hamel JE, Toma A, et al. Outcome of Lower-Risk Patients With Myelodysplastic Syndromes Without 5q Deletion After Failure of Erythropoiesis-Stimulating Agents. *J Clin Oncol*. 2017;35(14):1591-1597.
 80. Platzbecker U, Germing U, Götze KS, et al. Luspatercept for the treatment of anaemia in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes (PACE-MDS): a multicentre, open-label phase 2 dose-finding study with long-term extension study. *Lancet Oncol*. 2017;18(10):1338-1347.
 81. Komrokji R, Garcia-Manero G, Ades L, et al. Sotatercept with long-term extension for the treatment of anaemia in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes: a phase 2, dose-ranging trial. *Lancet Haematol*. 2018;5(2):e63-e72.
 82. Tefferi A. Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *J Clin Oncol*. 2005;23(33):8520-8530.
 83. Aloe Spiriti M, Latagliata R, Avvisati G, et al. Erythropoietin treatment of idiopathic myelofibrosis. *Haematologica*. 1993;78(6):371-3.
 84. Hasselbalch HC, Clausen NT, Jensen BA. Successful treatment of anemia in idiopathic myelofibrosis with recombinant human erythropoietin. *Am J Hematol*. 2002;70(2):92-99.
 85. Cervantes F, Alvarez-Larran A, Hernandez-Boluda JC, et al. Erythropoietin treatment of the anaemia of myelofibrosis with myeloid metaplasia: results in 20 patients and review of the literature. *Br J Haematol*. 2004;127(4):399-403.
 86. Cervantes F, Alvarez-Larran A, Hernandez-Boluda JC, et al. Darbepoetin-alpha for the anaemia of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol*. 2006;134(2):184-186.

87. Tsiara SN, Chaidos A, Bourantas LK, et al. Recombinant human erythropoietin for the treatment of anaemia in patients with chronic idiopathic myelofibrosis. *Acta Haematol.* 2007;117(3):156-161.
88. Huang J, Tefferi A. Erythropoiesis stimulating agents have limited therapeutic activity in transfusion-dependent patients with primary myelofibrosis regardless of serum erythropoietin level. *Eur Haematol.* 2009;83(2):154-155.
89. Hernández-Boluda JC, Correa JG, García-Delgado R, et al. Predictive factors for anemia response to erythropoiesis-stimulating agents in myelofibrosis. *Eur J Haematol.* 2017;98(4):407-414.
90. Bose P, Alfayez M, Verstovsek S. New Concepts of Treatment for Patients with Myelofibrosis. *Curr Treat Options Oncol.* 2019;20(1):5.
91. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, et al. Long-term treatment with ruxolitinib for patients with myelofibrosis: 5-year update from the randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 COMFORT-I trial. *J Hematol Oncol.* 2017;10(1):55.
92. McMullin MF, Harrison CN, Niederwieser D, et al. The use of erythropoiesis-stimulating agents with ruxolitinib in patients with myelofibrosis in COMFORT-II: an open-label, phase 3 study assessing efficacy and safety of ruxolitinib versus best available therapy in the treatment of myelofibrosis. *Exp Hematol Oncol.* 2015;4:26.
93. Tefferi A, Cervantes F, Mesa R, et al. Revised response criteria for myelofibrosis: International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) and European LeukemiaNet (ELN) consensus report. *Blood.* 2013;122(8):1395-1398.
94. Crisà E, Cilloni D, Elli EM, et al. The use of erythropoiesis-stimulating agents is safe and effective in the management of anaemia in myelofibrosis patients treated with ruxolitinib. *Br J Haematol.* 2018;182(5):701-704.

Anemia Diseritropoietica Congenita



Alterazioni delle membrane nucleari e citoplasmatiche in eritroblasti al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Delilieri).



Alterazioni della cromatina nucleare in eritroblasti al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Delilieri).

Parole Chiave

ESA, eritropoiesi, sindromi mielodisplastiche, mielofibrosi, anemia

Indirizzi per la corrispondenza

Roberto Latagliata

Tel: 06-49974437

Fax: 06-44241984

Mail: latagliata@bce.uniroma1.it

La rivista è consultabile anche sui siti web:

Ematologia oncologica

www.ematologiaoncologica.it

Fondazione Matarelli

www.fondazionematarelli.it

Società Italiana di Ematologia (SIE)

www.siematologia.it

Società Italiana di Ematologia Sperimentale (SIES)

www.siesonline.it

Fondazione Beat Leukemia Dr Alessandro Cevenini

www.beat-leukemia.com

Nel prossimo numero: Anno 6 - Numero 2 - 2019

Malattia Minima Residua nelle Leucemie

Leucemia mieloide acuta

Leucemia linfatica cronica

Leucemia linfoblastica acuta pediatrica

Leucemia linfoblastica acuta dell'adulto

Uno sguardo al futuro: la biopsia liquida

Con il supporto non condizionante di

