

TERZO MEETING DI EMATOLOGIA NON ONCOLOGICA

Boscolo Hotel Astoria
Firenze 26-27 gennaio 2017



Eritroblastopenie selettive congenite e acquisite

Ugo Ramenghi

*Dipartimento Scienze Pediatriche e Sanità Pubblica,
Università di Torino*

TERZO MEETING DI EMATOLOGIA NON ONCOLOGICA

Boscolo Hotel Astoria
Firenze 26-27 gennaio 2017

Disclosure:

Novartis Oncology

Elena

E' una signora di 51 anni che viene ricoverata per anemia.

Ha notato pallore ingravescente da alcuni mesi, per astenia ha deciso di fare gli esami.

Elena

esame emocromocitometrico

(51 anni)

Hb	4.7 g/dL
GR	2.080.000/ μ L
MCV	106 μ^3
Piastrine	112.000 / μ L
G.B. totali	3080 / μ L
Neutrofili	1400
Linfociti	1300
Reticolociti	14080 / μ L (0,6%)

ESAME OBIETTIVO

Buone condizioni generali, mucose pallide.

PAO 125/75mmHg. AC e AR nella norma.

Addome trattabile, non dolente nè dolorabile, OI in limiti.

Non malformazioni somatiche. Peso: 62 kg.

Esami «di routine» normali (enzimi epatici e creatinina)

Anamnesi recente

Menopausa da 8 mesi.

Non urine scure, mai notato subittero.

Non riferite epigastralgie, non melena.

Elena
(51 anni)

Hb	4.7 g/dL
GR	2.080.000/ μ L
MCV	106 μ^3
Piastrine	112.000 / μ L
G.B. totali	3080 / μ L
Neutrofili	1400
Linfociti	1300
Reticolociti	14080 / μ L (0,6%)

Folati e B12 livelli normali (elevati)

APLASIA ERITROIDE (PRCA)

- INFEZIONI VIRALI (Parvovirus B19,...)
 - TEC (Transient Erithroblastopenia of Childhood)
- CONGENITE (anemia di Blackfan Diamond, Pearson, AF...)
- SECONDARIE a NEOPLASIE (Linfomi)
- SECONDARIE a PATOLOGIE AUTOIMMUNI
- MIELODISPLASIE (citopenie refrattarie,...)

Accertamenti

Midollo - osteomieliopsia.

Trasfusa (Coombs negativo)

biopsia osteomidollare:

Non blasti

aspetti dismielopoietici

discreta linfoplasmacitosi

Serie eritroide scarsamente rappresentata

Citogenetica: cariotipo normale (46,XX)

Elena

esame emocromocitometrico

(51 anni)

Hb	4.7 g/dL
GR	2.080.000/ μ L
MCV	106 μ^3
Piastrine	112.000 / μ L
G.B. totali	3080 / μ L
Neutrofili	1400
Linfociti	1300
Reticolociti	14080 / μ L (0,6%)

Anamnesi familiare

Padre deceduto per ictus ischemico all'età di 78 anni.

Madre con emiparesi destra per ischemia cerebrale all'età di 2 anni.

Sorella con anemia moderata e bassa statura.

Fratello deceduto a 30 anni per leucemia acuta.

Anamnesi personale

Nata a termine da gravidanza decorsa fisiologicamente. Parto spontaneo, peso alla nascita 2500 g. Condizioni alla nascita buone. Fino all'età di 2 anni riferita buona salute.

A 2 anni anemia severa (Hb 2 g/dl). Aplasia della serie eritroide all'aspirato midollare.

Trasfusa, inizia differenti cicli di trattamento steroidi per os, androgeni per via intramuscolare complessi vitaminici del gruppo B

con solo parziale e transitoria risalita dei valori emoglobinici. saltuarie trasfusioni di emazie (circa 5-6 trasfusioni all'anno)

Sino a 14 anni

Anamnesi personale

a 14 anni menarca e i valori di Hb aumentano

Sempre > 10 g/dL

A 18 anni gravidanza: necessita di 2 trasfusioni

Nei controlli dopo il parto incremento e la paziente sta bene sino all'attuale ricovero

(menopausa da 8 mesi)

Elena: evoluzione

Prosegue per 8 mesi con emotrasfusioni mensili

«Non è che ho la stessa malattia che ha avuto mia figlia?»

Era anemica quando è nata, l'hanno trasfusa alcune volte, poi le hanno dato del cortisone e a 12 anni è guarita.

Hanno detto che aveva una anemia di Blackfan Diamond

Anemia di Blackfan Diamond

- **Anemia congenita per deficit selettivo eritroide**
 - anemia macrocitica presente nel primo anno di vita
 - Reticolocitopenia
 - Midollo normocellulare con deficit selettivo eritroide
 - Normali o poco ridotti i neutrofili e le piastrine

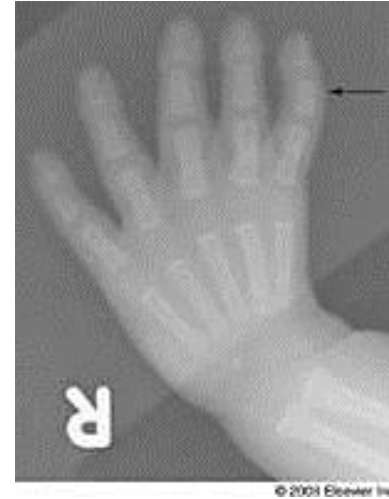
Malformazioni (30-40% in letteratura)

- **arto superiore**
- **cuore**
- **craniofacciali**
- **urogenitali**

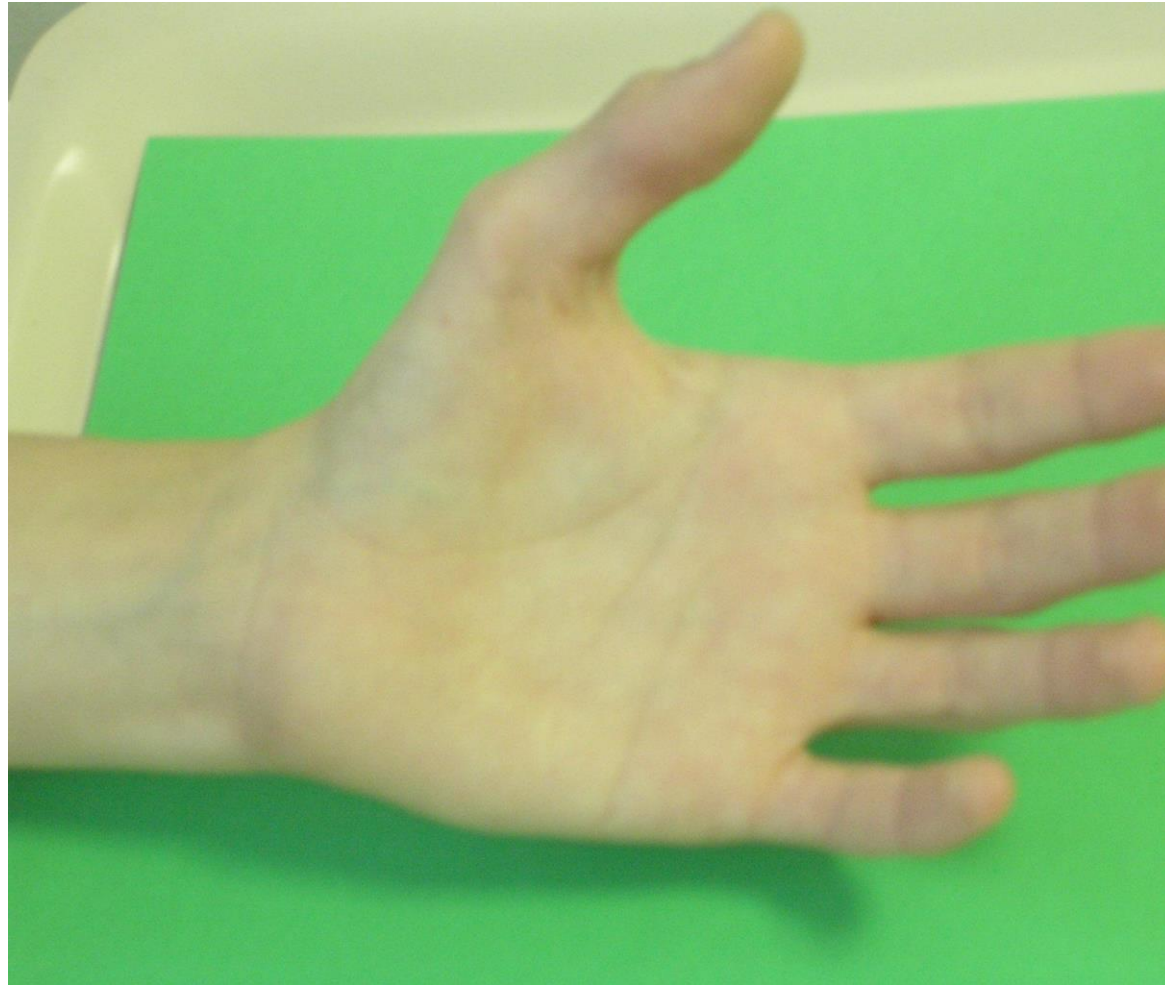
- **ritardo mentale**
- **bassa statura**

Mano

- ipoplasia eminenza tenar
- pollice ipoplasico
- pollice trifalangeo
- duplicazione del pollice

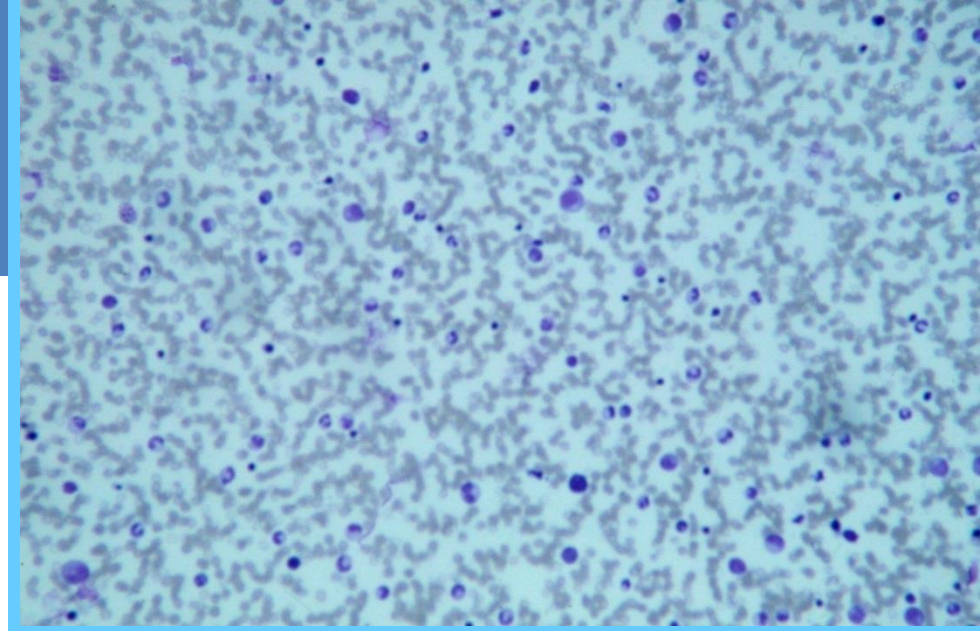


Ipoplasia eminenzia tenar



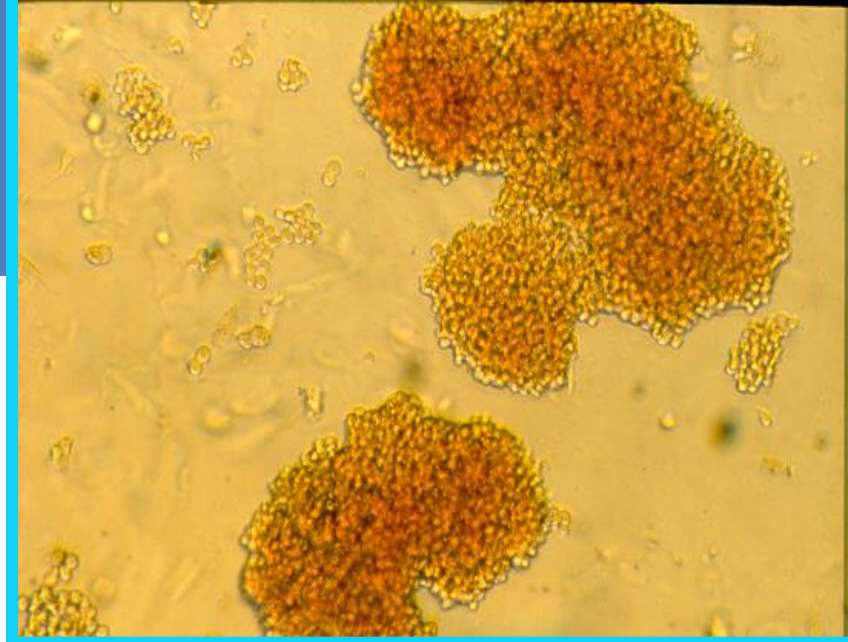
DBA

dati ematologici

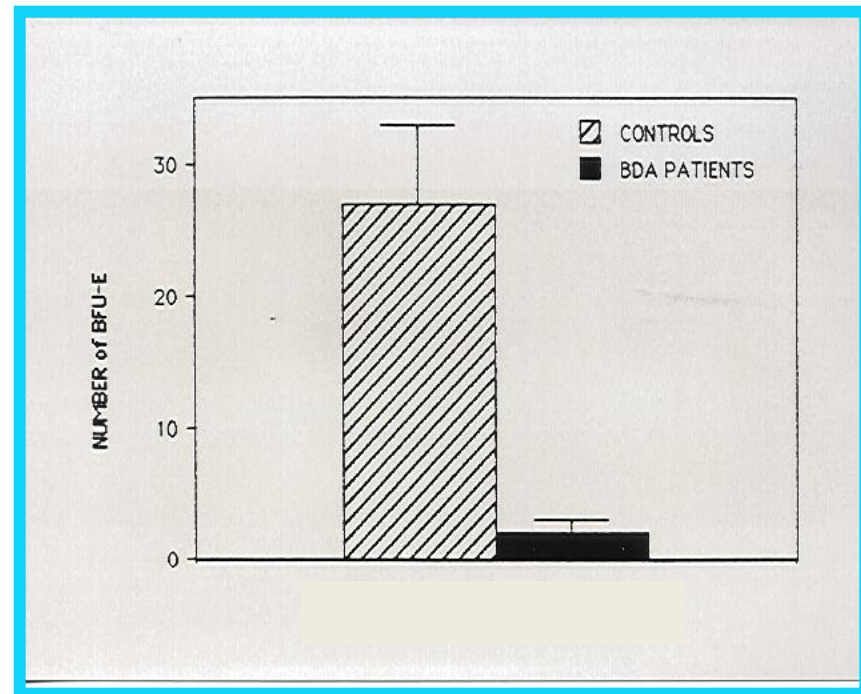


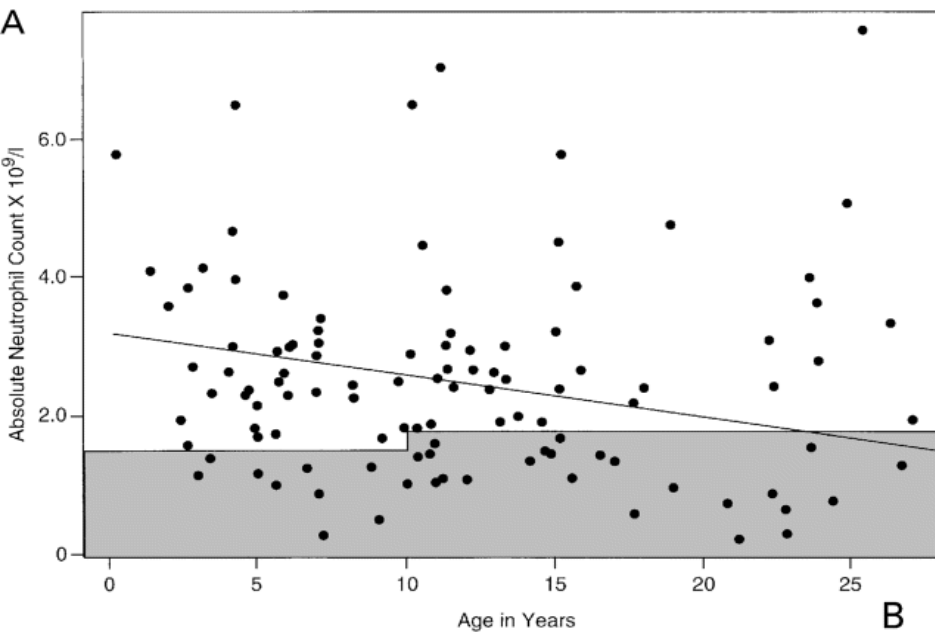
- Elevati livelli di Hb fetale
 - elevato MCV
 - elevati livelli di acido folico, vitamina B12, e
- Livelli di Eritropoietina molto elevati
 - Aumento attività della adenosina deaminasi eritrocitaria (eADA)

DBA: quadro «in vitro»



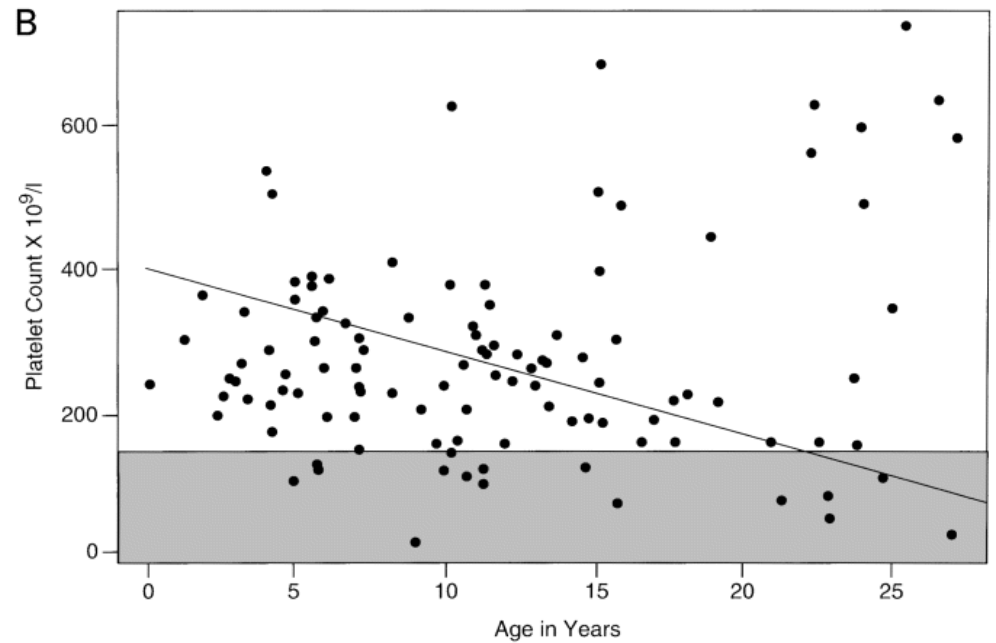
- Colonie eritroidi:
riduzione delle BFU-E e
delle CFU-E
- incremento con SCF
 - progenitori eritroidi:
blocco proliferativo e
differenziativo,
apoptosi





Neutrofili e piastrine

PMN



Piastrine

Giri et al. Br J Haematol 108:167, 2000

Diamond Blackfan anemia: dati del Registro AIEOP

NEOPLASIE

Table 2. Neoplasms in patients from the DBAR

DBAR UPIN	Cancer diagnosis	Sex	Age at diagnosis, y	DBA status at cancer diagnosis	Outcome	Gene
0009-200	Adenocarcinoma of the colon	M	43	Unknown	Alive	Not tested
0300-104	Adenocarcinoma of the colon	F	34	TD	Died	<i>RPS19</i>
0438-200	Adenocarcinoma of the colon	F	49	SD	Alive	Negative
0143-200	Osteogenic sarcoma	M	22	TD, A, rhGH	Died, sepsis	Not tested
0354-200	Osteogenic sarcoma	F	12	TD, A	Died, metastatic disease	Not tested
0185-200						Not tested
0438-200						Negative
0458-200						<i>RPS19</i>
0416-102						<i>RPS19</i>
0534-200						<i>RPS19</i>
0109-101						<i>RPL35a</i>
0024-200						<i>RPS19</i>
0245-002						<i>RPL11</i>
0245-102						<i>RPL11</i>
0025-102						<i>RPL5</i>
0365-200						<i>RPL5</i>
0364-101						Negative
0387-200	AML	M	44	SD	Died, chemotherapy/BMT, PD	Not tested
0100-200	MDS	M	17	TD	Died, sepsis	Not tested
0308-200	MDS	M	2	SD	Alive	Not tested
0364-101	MDS	M	45	On no treatment	Died (progressed to AML)	Negative
0438-200	MDS	F	51	TD, on azathioprine	Alive	Negative
0200-200*	Osteogenic sarcoma	M	4	TD, s/p BMT, rhGH	Died, metastatic disease	Not tested
0260-200*	Rectal cancer	F	28	s/p BMT	Alive	Not tested
0277-101*	Basal cell cancer	M	30	SD	Alive	Not tested

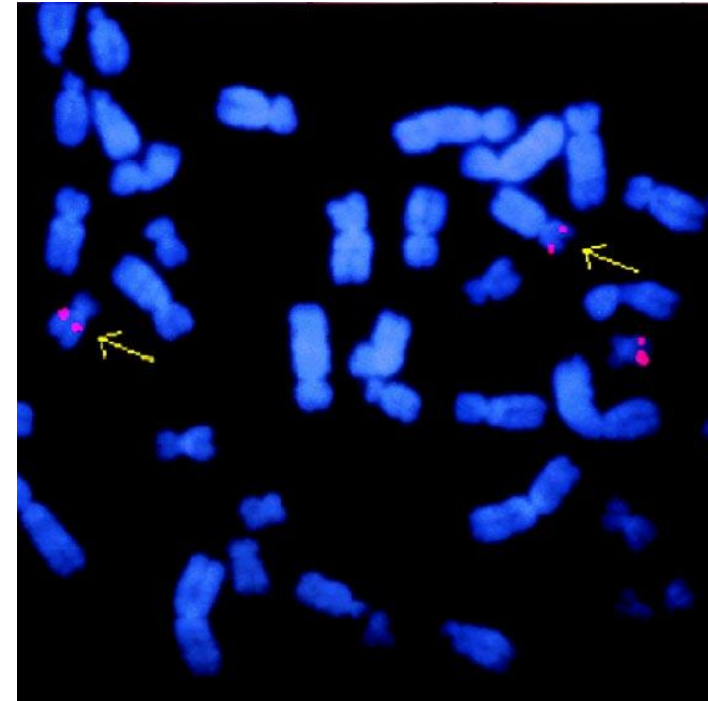
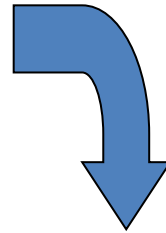
4/239 pz

1. MDS 4 anni
2. Osteosarcoma 20 anni (10 anni post TCSE)
3. Adenocarcinoma gastrico 47 anni
4. Carcinoma tiroideo 37 anni

Anemia di Diamond-Blackfan (DBA)

traslocazione bilanciata 46XX t(X;19)(p21;q13)

- FISH analisi
- Ricerca di microdelezioni



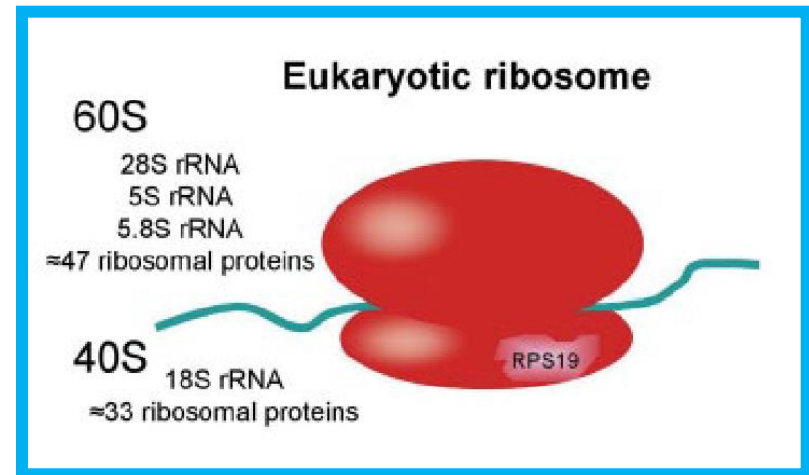
The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia

Natalia Draptchinskaia^{1*}, Peter Gustavsson^{1*}, Björn Andersson², Monica Pettersson³, Thiébaud-Noël Willig^{4,5}, Irma Dianzani⁶, Sarah Ball⁷, Gil Tchernia^{4,5}, Joakim Klar¹, Hans Matsson¹, Dimitri Tentler¹, Narla Mohandas⁴, Birgit Carlsson¹ & Niklas Dahl¹

nature genetics • volume 21 • february 1999

I geni DBA codificano per RP

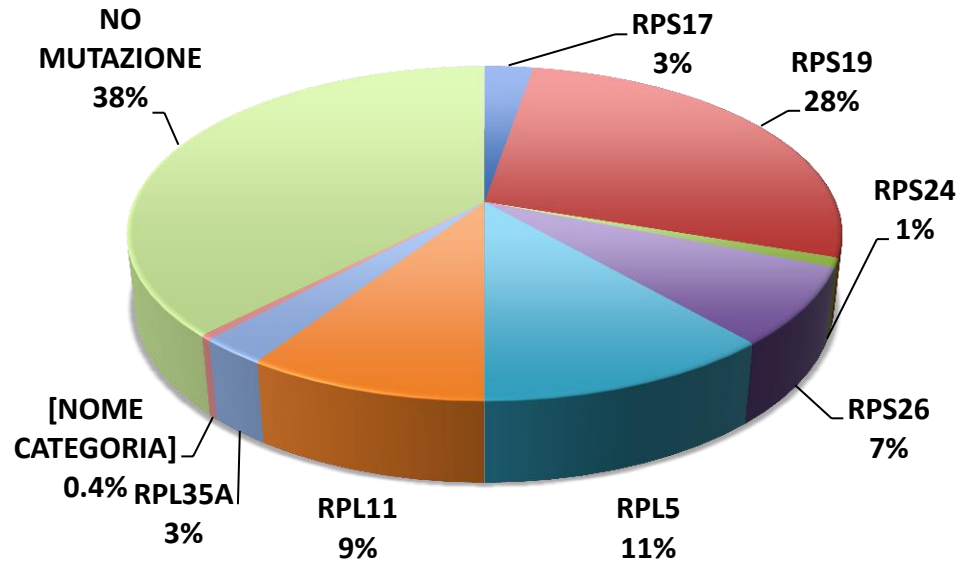
- RPS19
- RPL5
- RPL11
- RPS26
- RPS24
- RPL35a
- RPS17
- RPS7
- RPS10
- RPL26



La DBA è una ribosomopatia

Diagnosi molecolare

228/239 (95.4%) pazienti



20% mutazioni = delezioni

correlazione genotipo/fenotipo

RPL5



RPL5

e

RPL11

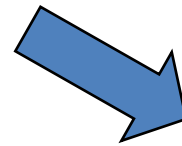


RPS26



**QUASI 60% DEI PAZIENTI PRESENTA RIPRESA ERITROPOIESI dopo
STEROIDI**

A DOSI CONVENZIONALI (PDN 1-2 mg/Kg)



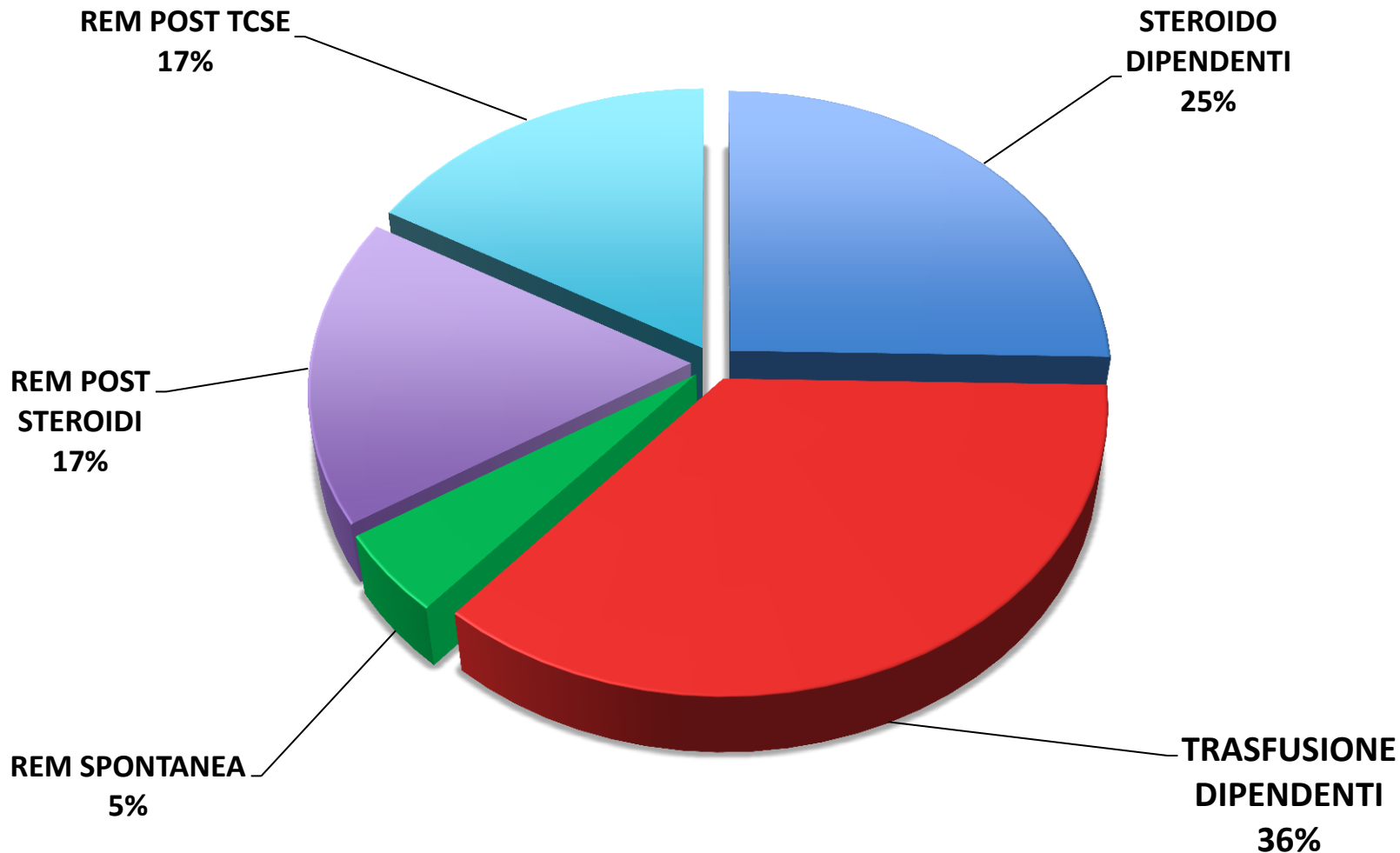
(< 0,2 mg/Kg/die)

**ritardo di crescita
fratture patologiche (18% USA)
cataratta (9% USA)**

DBA : remissione spontanea

- **90% nei primi 2 anni di malattia**
- **di questi, 80 % tra gli steroido responsivi**

Diamond Blackfan anemia: follow-up (dati del Registro AIEOP)



Ribosomopatie umane

Fenotipo:

- bone marrow failure
- predisposizione al cancro
- malformazioni

- Diamond-Blackfan Anemia (DBA)
- Dyskeratosis congenita (DC)
- Shwachman-Diamond syndrome (SDS)

- 5q- MDS syndrome

ereditarie

acquisita

- Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen
- Benjamin L. Ebert^{1,2,3}, Jennifer Pretz¹, Jocelyn Bosco¹, Cindy Y. Chang¹, Pablo Tamayo¹, Naomi Galili⁴, Azra Raza⁴, David E. Root¹, Eyal Attar⁵, Steven R. Ellis⁶ & Todd R. Golub^{1,2,7}
 - NATURE, GENNAIO 2008

Ribosomopatie umane

Fenotipo:

- bone marrow failure
- predisposizione al cancro
- malformazioni

Meccanismo patogenetico:
attivazione dello stress
ribosomale
p53 activation



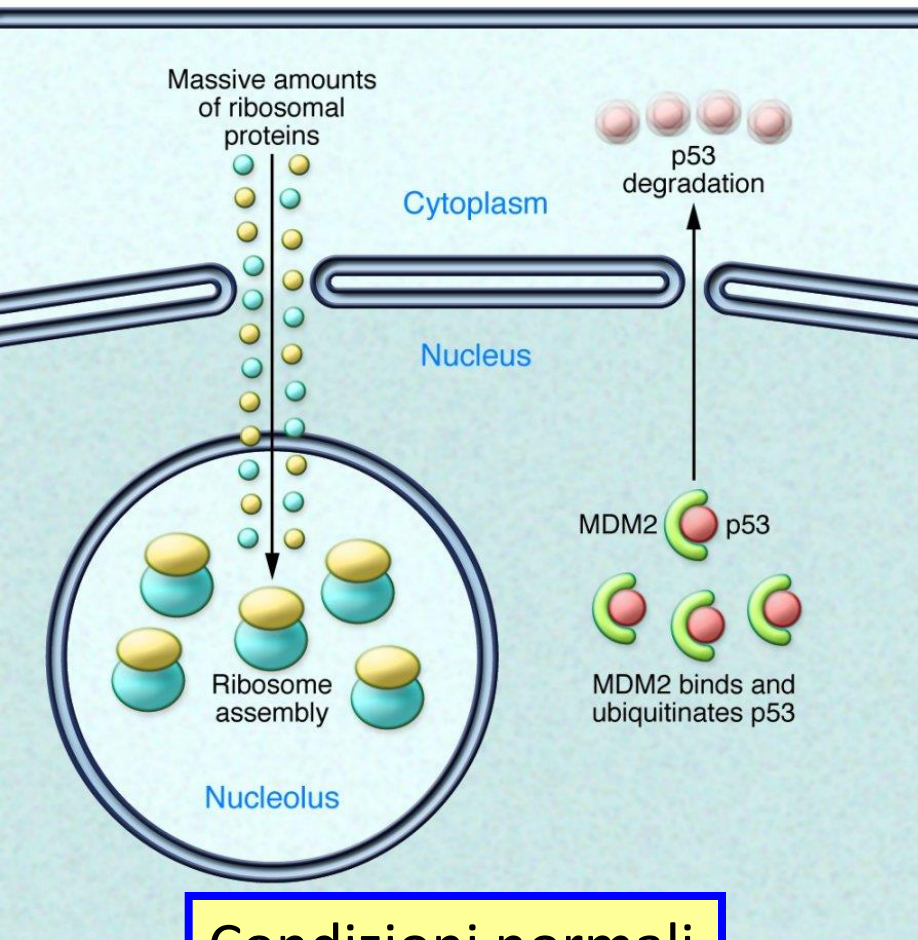
- Diamond-Blackfan Anemia (DBA)
- Dyskeratosis congenita (DC)
- Shwachman-Diamond syndrome (SDS)

- 5q- MDS syndrome

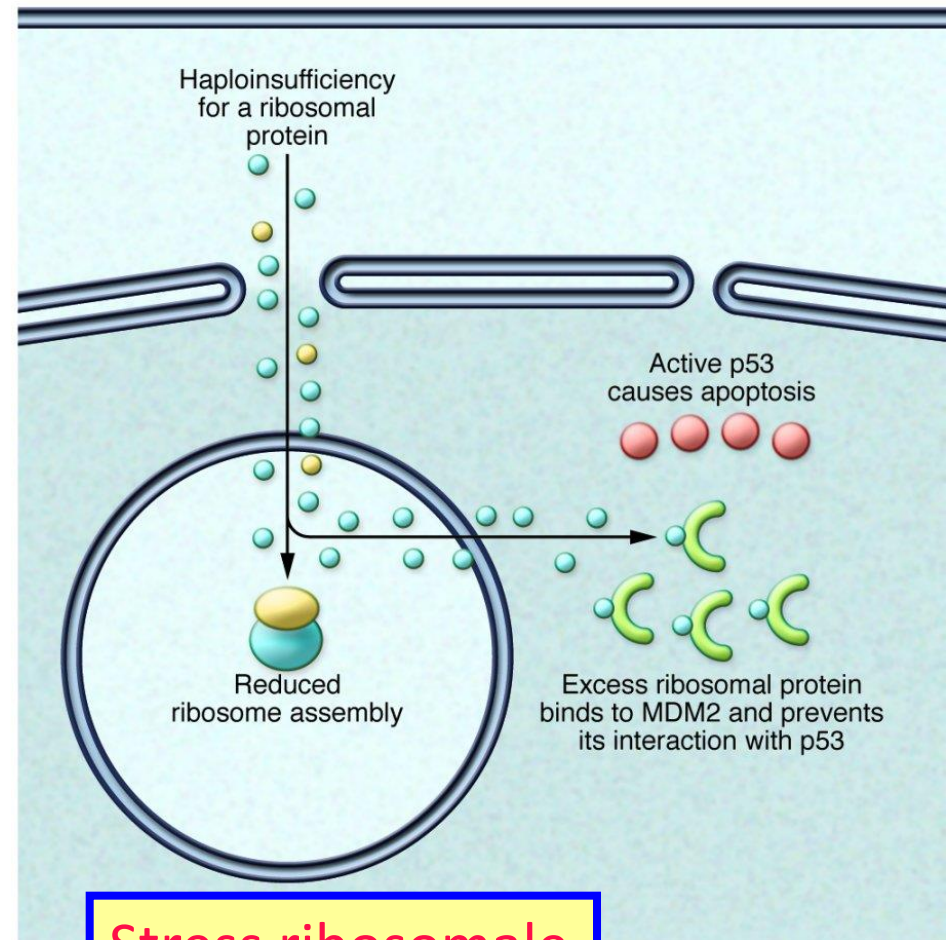
ereditarie

acquisita

Alcune RP (e il complesso RPL5-RPL11-RNA5S) sequestrano MDM2



Condizioni normali



Stress ribosomale

Bessler, JCI 2012

Modelli animali: Zebrafish

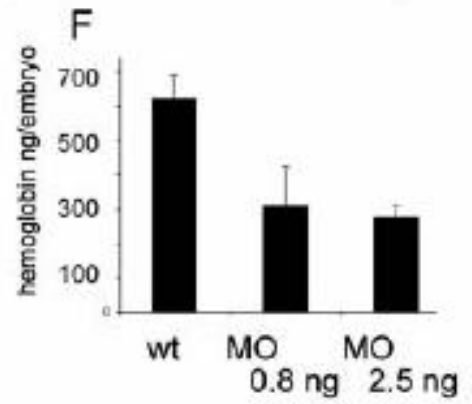
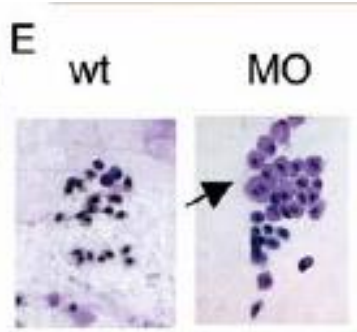


- Zebrafish con difetto di RPS19 malformazioni (testa, occhi, cuore), alterata eritropoiesi, ridotti livelli di Hb



Edema, malformazione occhi

Assenza degli occhi e del cervello, pinna ventrale abnormemente grande

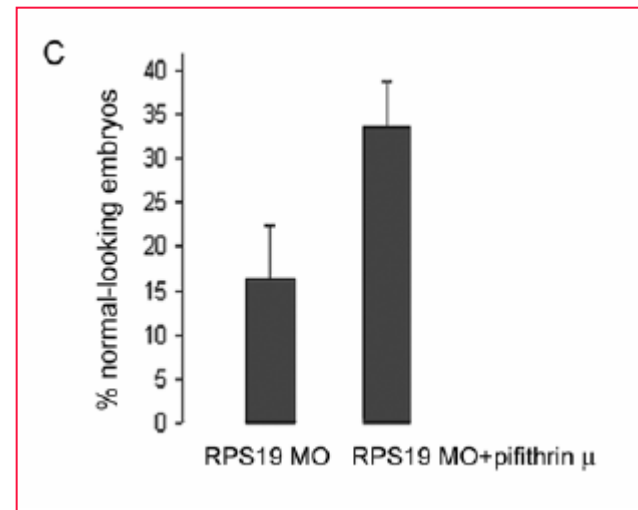
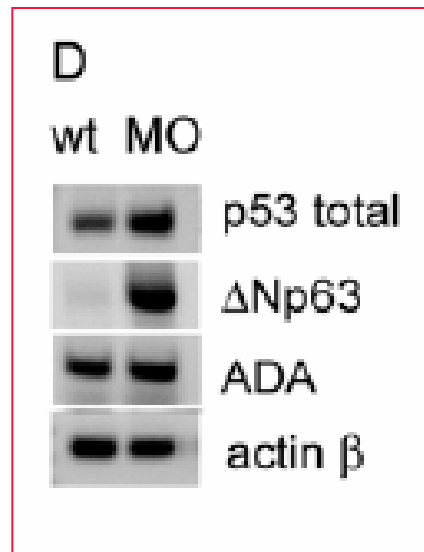
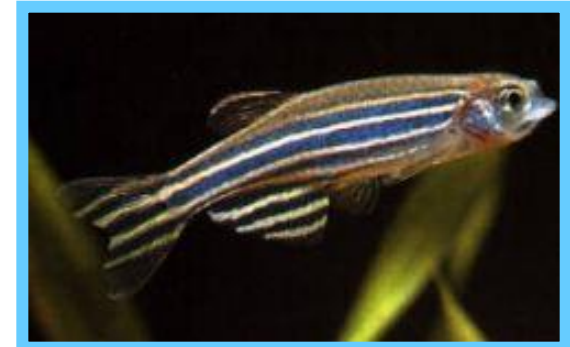


a 72 giorni poche cellule ematiche e del cuore nei morphants
Hb ridotta

Danilova et al., 2008

Modelli animali: Zebrafish

- Zebrafish con difetto di RPS19 attivazione di p53 e presenza di delta P63
- la pifitrina reverta il fenotipo



Danilova et al., 2008

Hb > 8 g/dL

Desferioxamina,

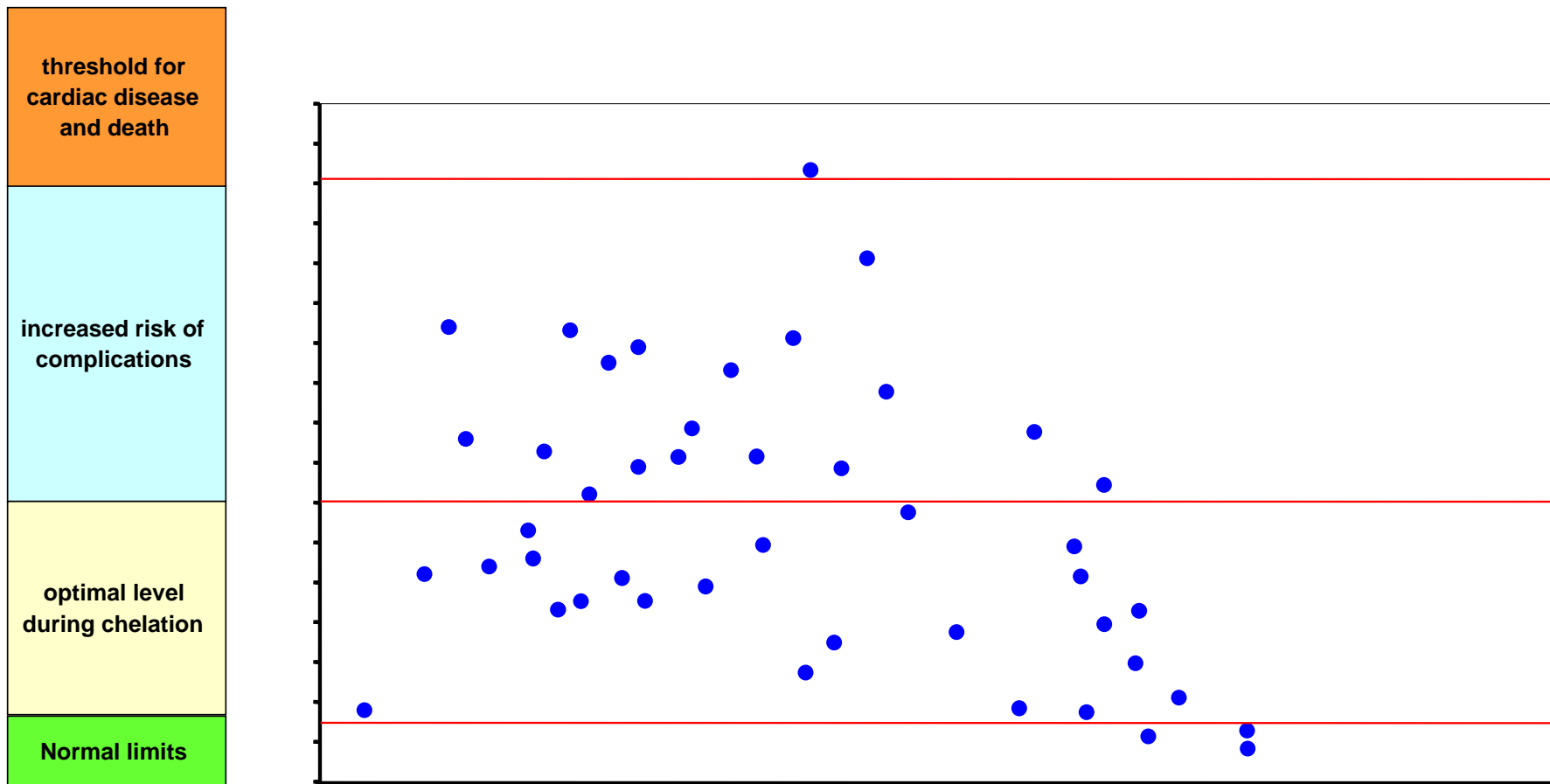
Deferasirox?

(deferiprone)

Quando iniziare?

160-180 ml GR/Kg

DBA : sovraccarico marziale



Elena: evoluzione

Dosaggio EPO . > 800 mU/mL

Mutazione del gene RPS19 (c.280 C->T, R94X) in eterozigosi

DBA : forme «atipiche» o «non classiche»

The spectrum of *non-classical* Diamond-Blackfan anemia: a case of late beginning transfusion dependency associated to a new *RPL5* mutation

**Piero Farruggia,¹ Paola Quarello,²
Emanuela Garelli,² Olivia Paolicchi,³
Giovanni Battista Ruffo,⁴ Liana Cuccia,⁴
Sonia Cannella,¹ Giuseppa Bruno,¹
Paolo D'Angelo¹**

Pediatric Reports 2012; volume 4:e25

DBA : forme «atipiche» o «non classiche»

Maschio lieve anemia macrocitica (8-10,5 g/dL)

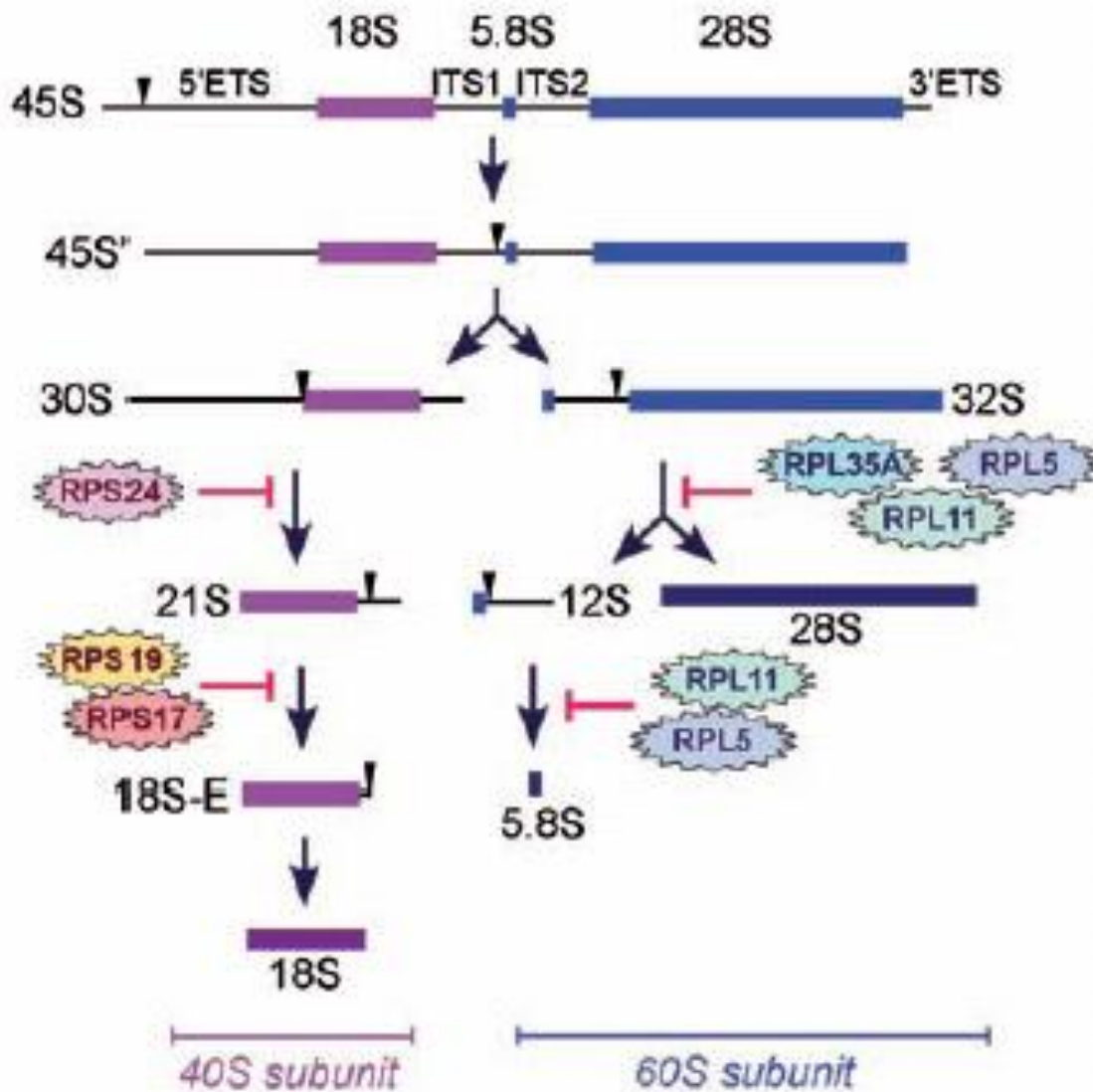
- Ricovero gastroenterite 4aa (6,6 g/dL)
- A 12 aa astenia Hb 4,7 g/dL,

Dosaggio EPO . 1600 mU/mL

Midollo : ipoplasia della serie eritroide

Mutazione del gene RPL5 (c.283delT) in eterozigosi

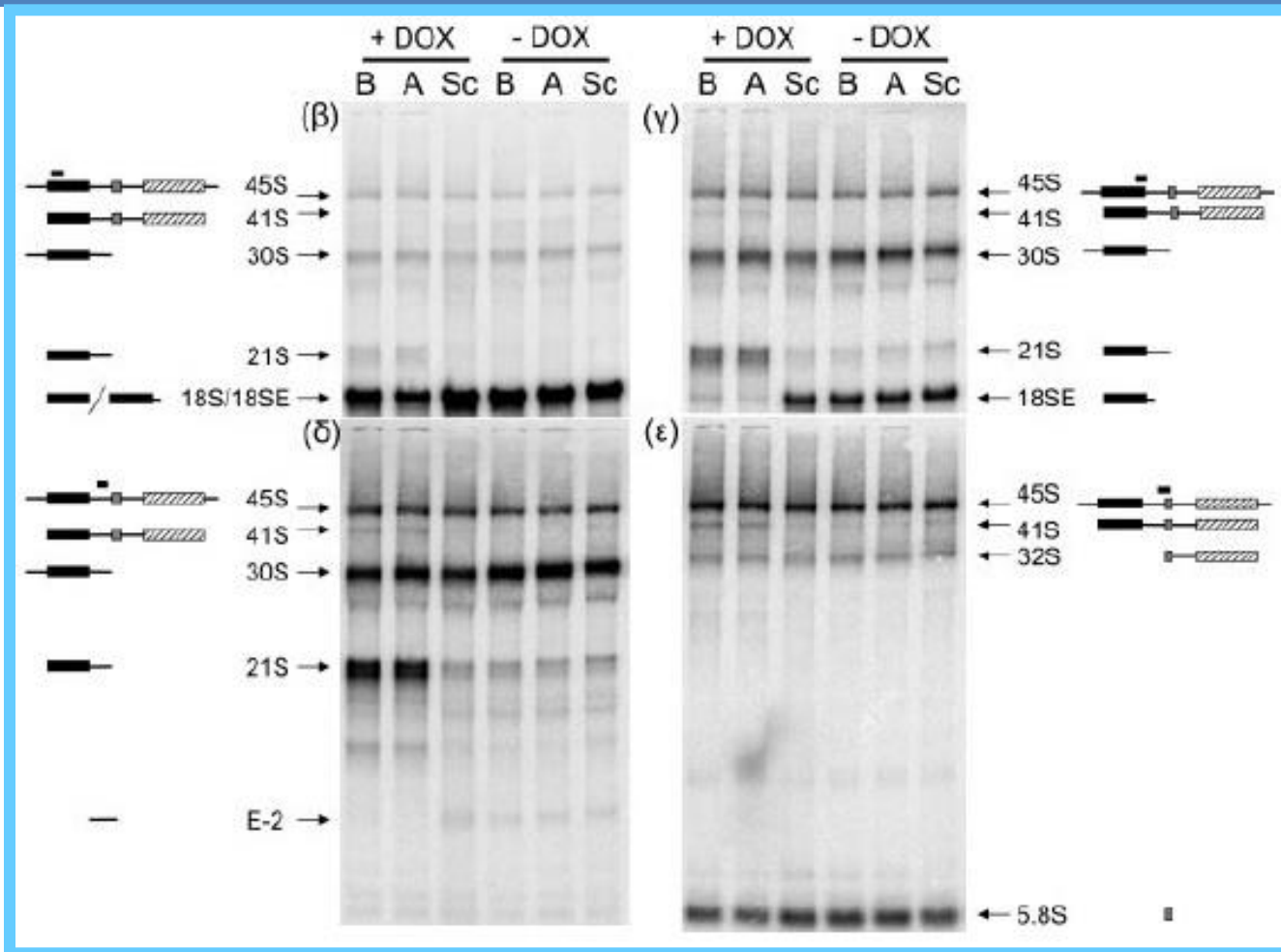
- **Elevati livelli di EPO, non correlati all'anemia**
- **Elevati livelli di ADA eritrocitari (se non trasfusi)**
- **MACROCITOSI persistente**
- **Anamnesi personale di «lieve» anemia cronica**
- **Anamnesi familiare di anemia e/o malformazioni**



Le RP partecipano al processamento dell'rRNA in step differenti

Gleizes 2008

Il difetto di RPS19 provoca abnorme processamento dell'rRNA

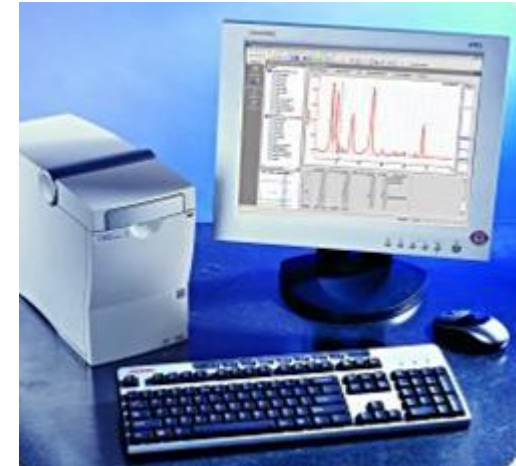


*Flygare,
Aspesi
Blood 2007*

- Northern blot: cellule TF-1 silenziate per RPS19 mostrano un accumulo di precursori dell'rRNA

Bioanalyzer

**Caratterizzazione qualitativa/quantitativa di RNA
mediante elettroforesi capillare con
Agilent Bioanalyzer 2100 - NANO chip**

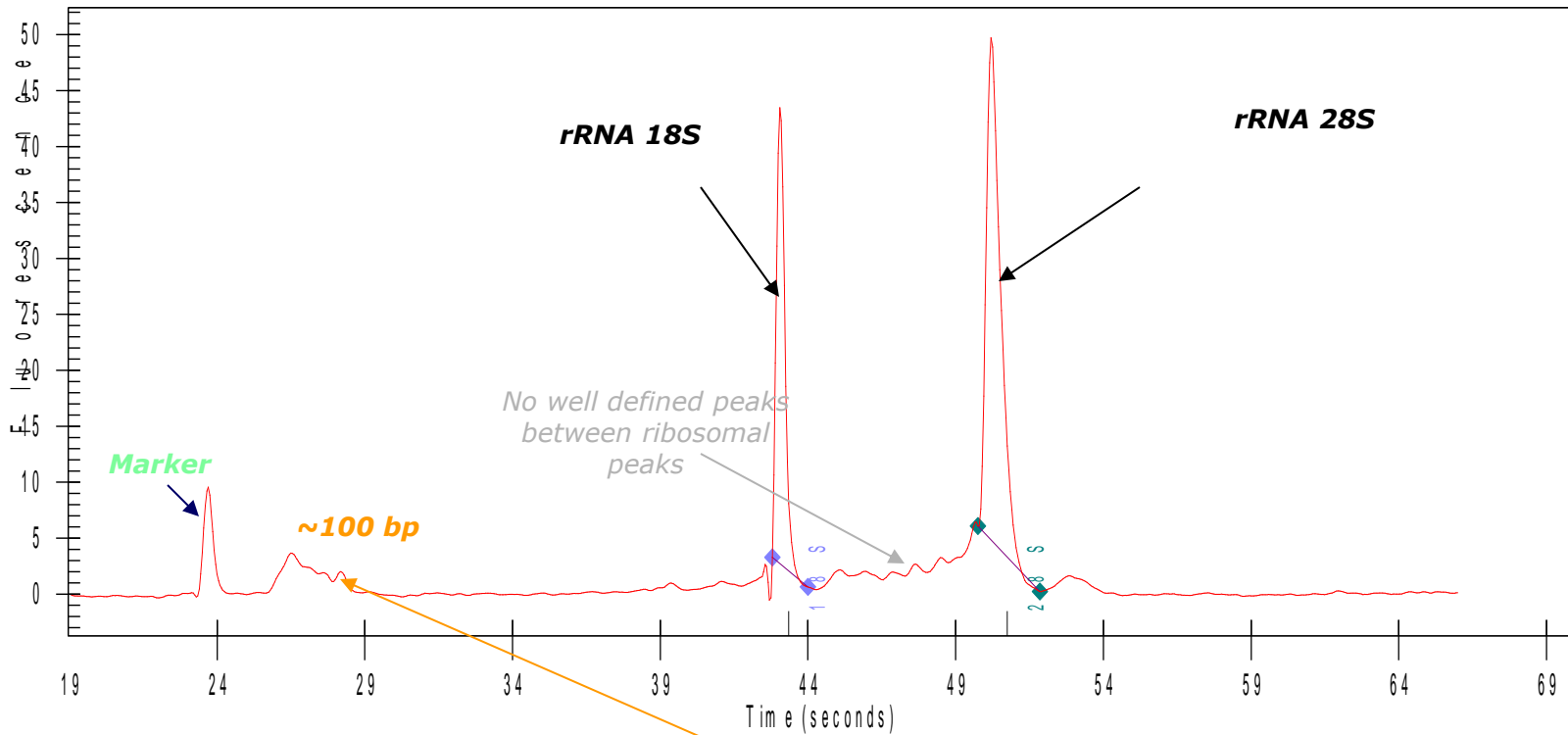


10 RNA OTTIMA QUALITA'

R.I.N.
(RNA Integrity Number)

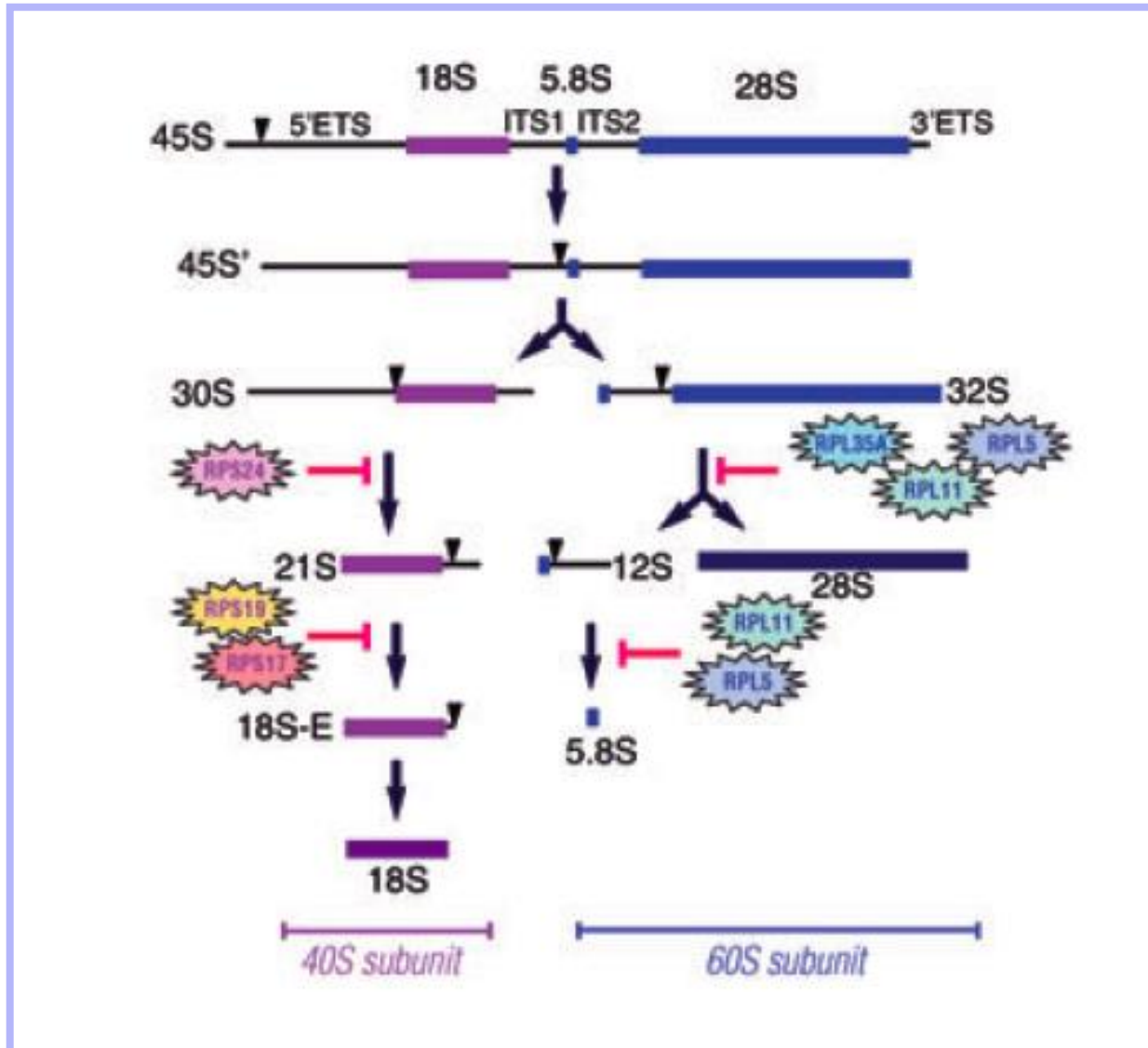
0 RNA DEGRADATO

Analisi RNA ribosomiale

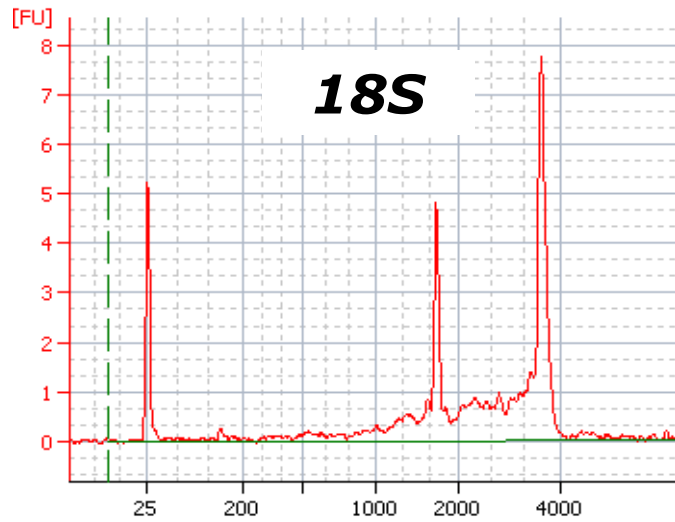
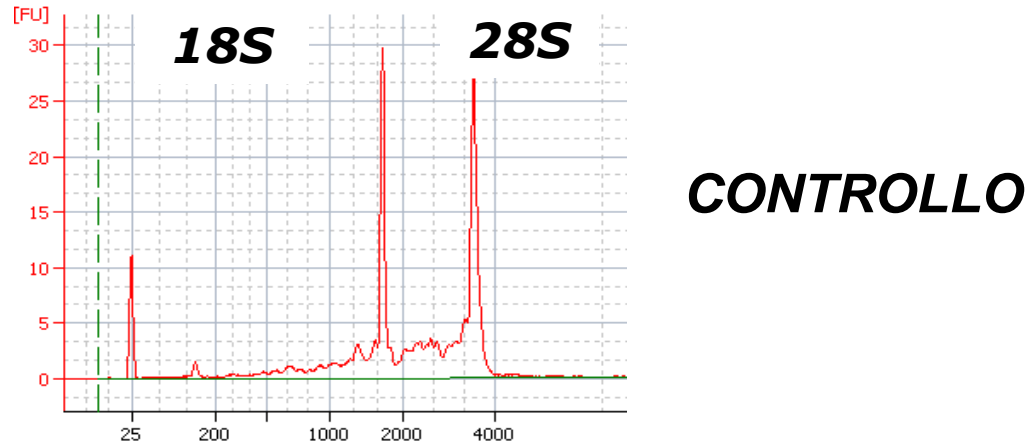


5S and 5.8S, tRNAs, and small RNA fragments about 100bp

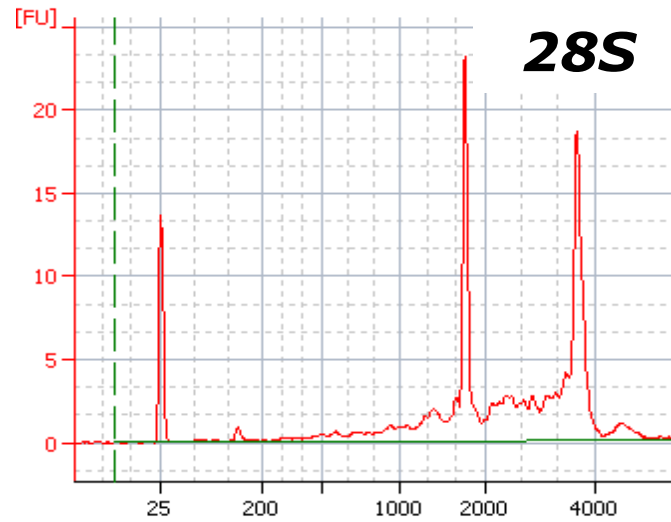
Analisi RNA ribosomiale



Analisi RNA ribosomiale



MUTAZIONE RPS



MUTAZIONE RPL

Analisi rRNA su LINFOCITI



prelievo eparinato sangue

Ficoll

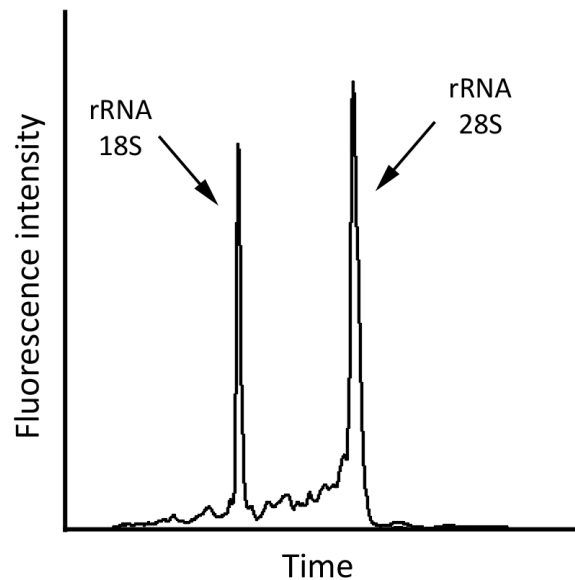
semina mononucleate

coltura 96 h

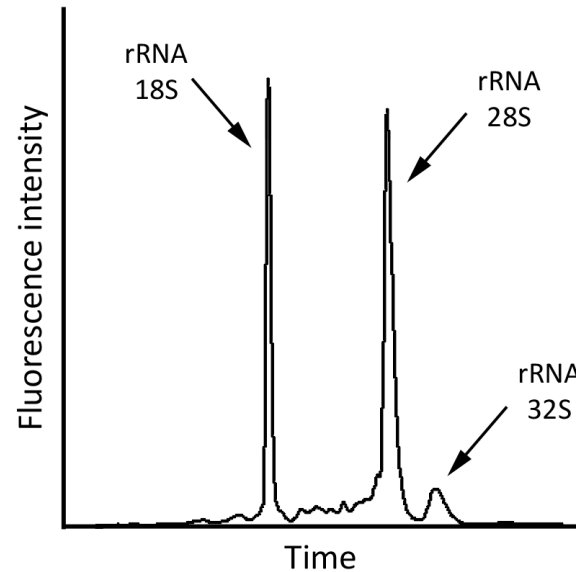
estrazione RNA

Analisi degli rRNA da linfociti di paziente con Bioanalyzer (Agilent)

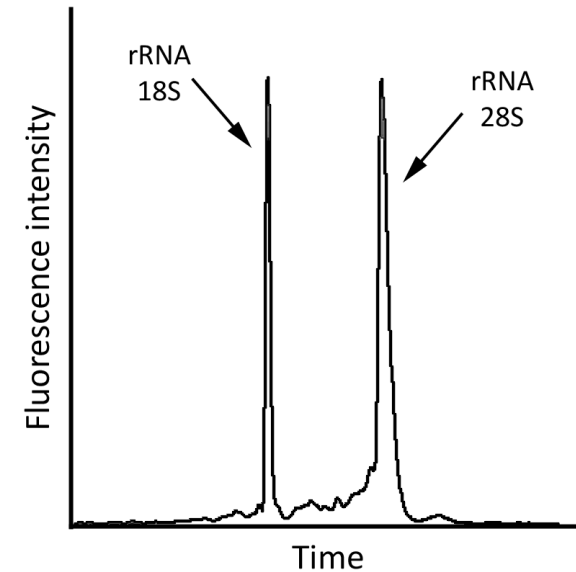
- alterazione del rapporto 28S/18S
- aumento dell'rRNA 32S nel difetto di RPL



40S Gene Defect



60S Gene Defect



Normal

Quarello P. et al. 2015

Grazie !



Ematologia, Dip Scienze Pediatriche Torino

Paola Quarello, Marta Goglio

Biologia molecolare: Emanuela Garelli, Adriana Carando,

Biologia cellulare: Nicoletta Crescenzo, Luiselda Foglia

Dip. Scienze Mediche, Novara, Università del Piemonte Orientale

Irma Dianzani, Anna Aspesi, Marta Betti.

Dip. Biologia, Università Tor Vergata, Roma

Fabrizio Loreni

Dip. Biologia, Università Louisville, Kentucky,

USA

Steve ELLIS

