

# VARIANTI STRUTTURALI DELL' EMOGLOBINA

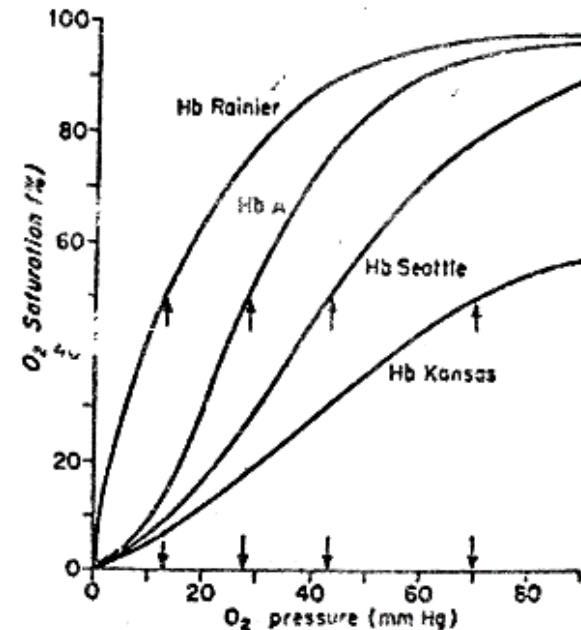
Piu' di 200:

- HbS ( $\beta_6\text{Glu}\rightarrow\text{Val}$ )  $\Rightarrow$  **ANEMIA FALCIFORME**

- HbC ( $\beta_6\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}$ )  $\Rightarrow$  lieve anemia emolitica (Africa occidentale)

- HbM (eme fissato nella forma ferrica)  $\Rightarrow$  non lega l'O<sub>2</sub>

- Hb Chesapeake  $\Rightarrow$  Hb con elevata affinità per l'O<sub>2</sub>



# ***ANEMIA FALCIFORME***

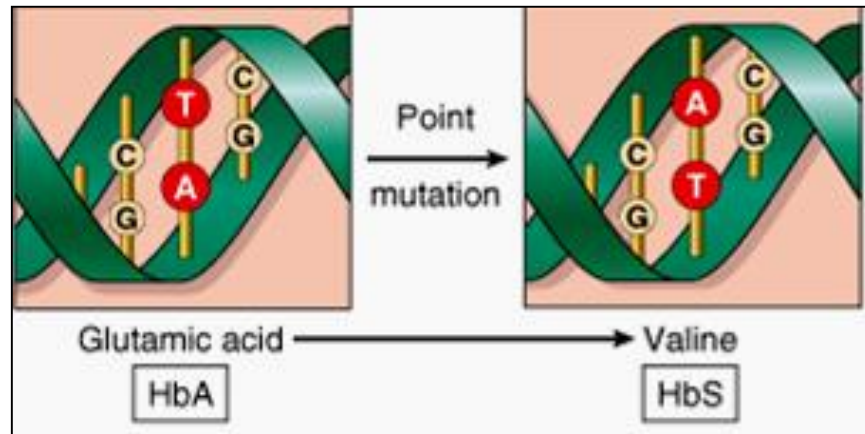
**Malattia autosomica recessiva**

**8% neri americani è eterozigote**

**1/700 neri americani sono affetti**

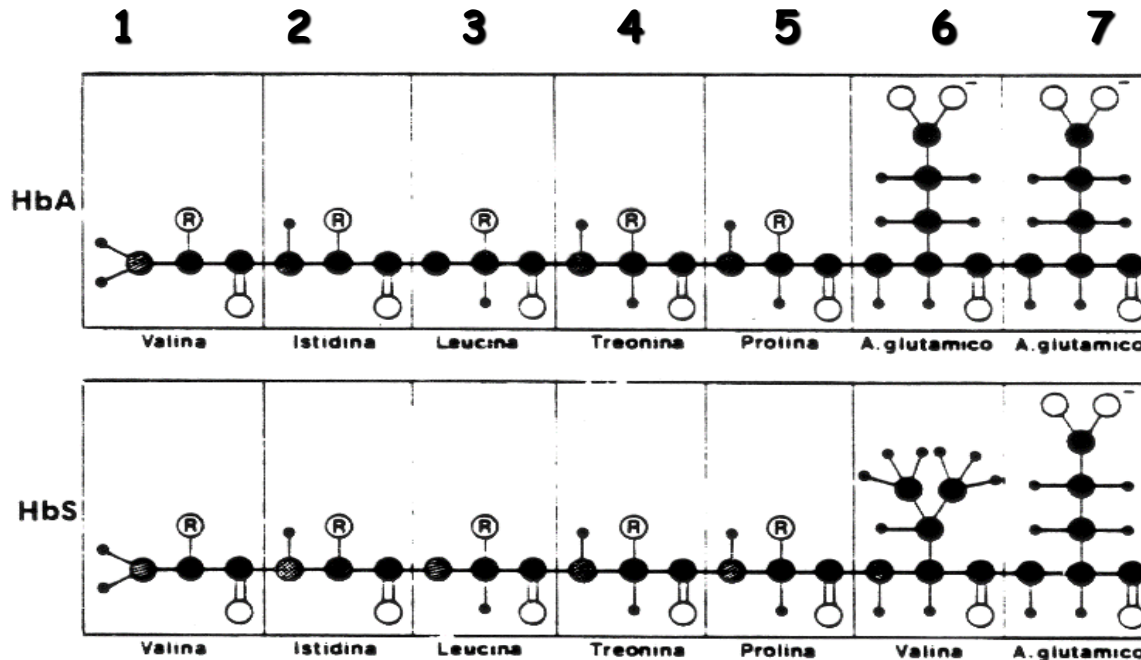
**Nei paesi dove la malaria è endemica fino al 30 % dei  
neri africani è eterozigote → *POLIMORFISMO*  
*BILANCIATO***

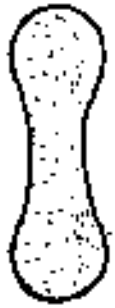
# Difetto molecolare: HbS ( $\beta_6$ Glu $\rightarrow$ Val) $\rightarrow$ alterazione delle proprietà chimico-fisiche dell' Hb



**Polare**

**Apolare**





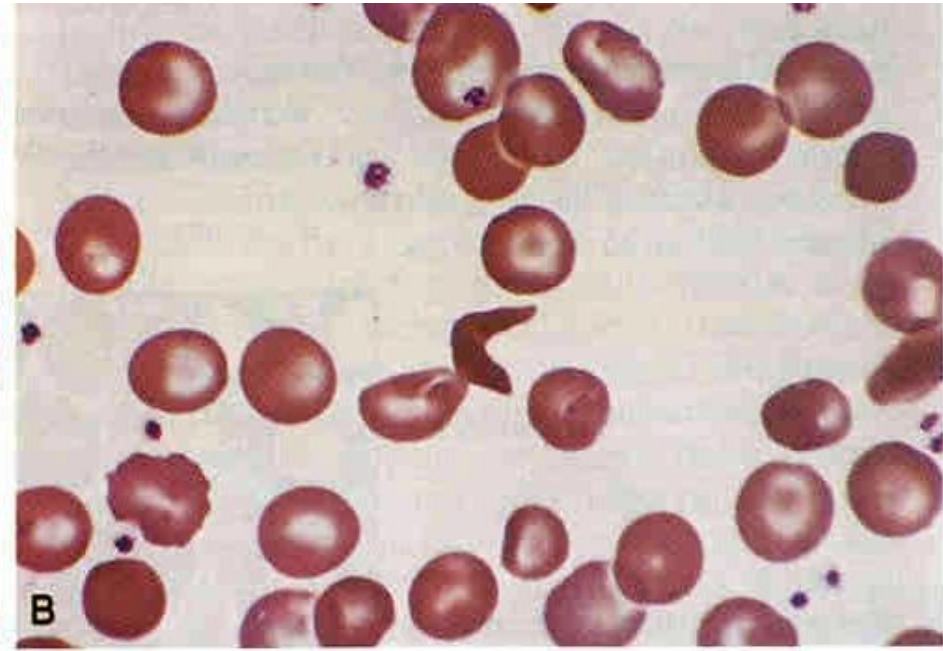
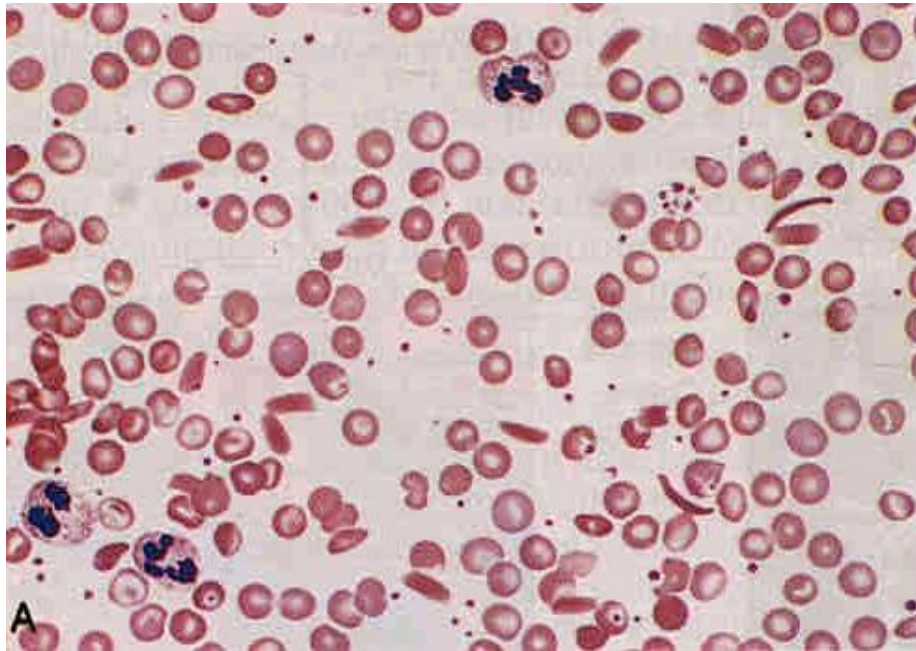
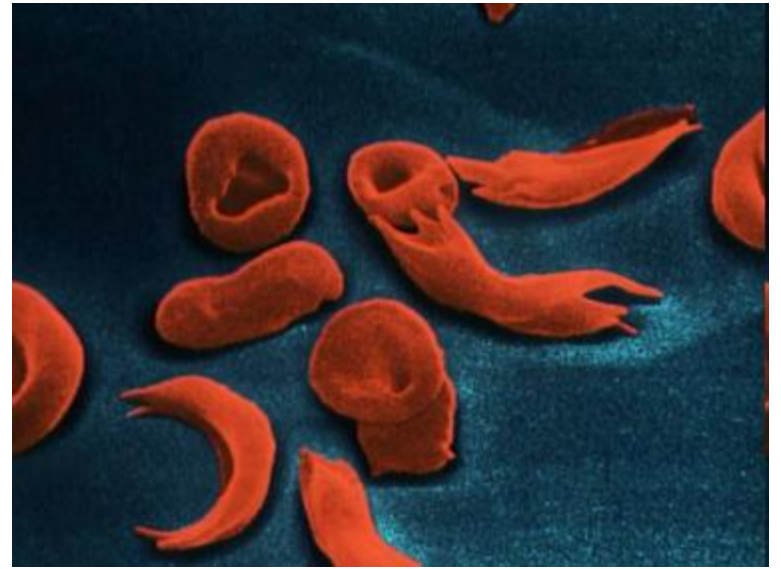
100% O<sub>2</sub>  
Saturation



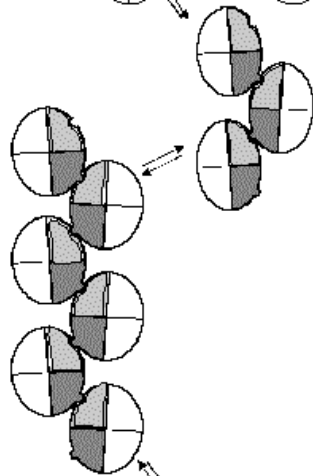
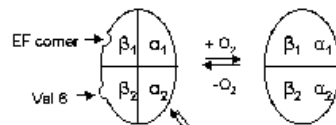
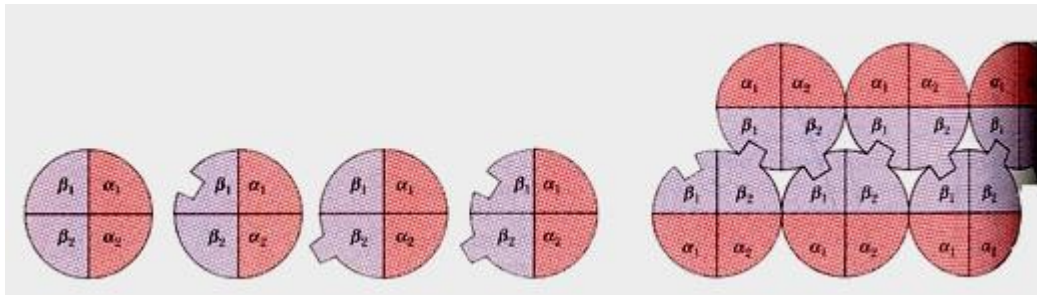
50% O<sub>2</sub>  
Saturation



0% O<sub>2</sub>  
Saturation

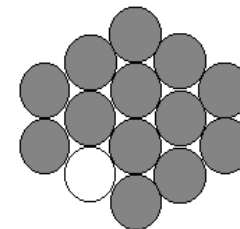
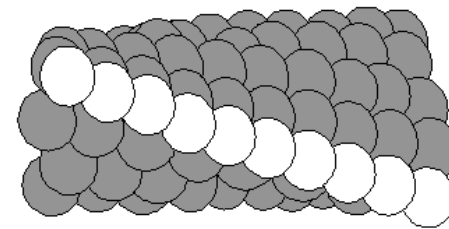


# Perché i globuli rossi assumono la forma a falce?



Larger complexes (Stable Nuclei)

Rod-like Polymers



**fibrille di 14 filamenti**

**filamenti di 10 HbS**

## La velocità di polimerizzazione dipende da:

### 1) Quantità di HbS

- Negli eterozigoti ~ 40% dell' Hb è HbS → se non esposto ad ipossia di grado elevato non presenta né emolisi né anemia
- La presenza di HbF previene la polimerizzazione di HbS → nel neonato la malattia non si manifesta fino al 5-6 mese di vita.
- Doppi eterozigoti HbS/HbC presentano una malattia più lieve rispetto agli omozigoti HbS/HbS

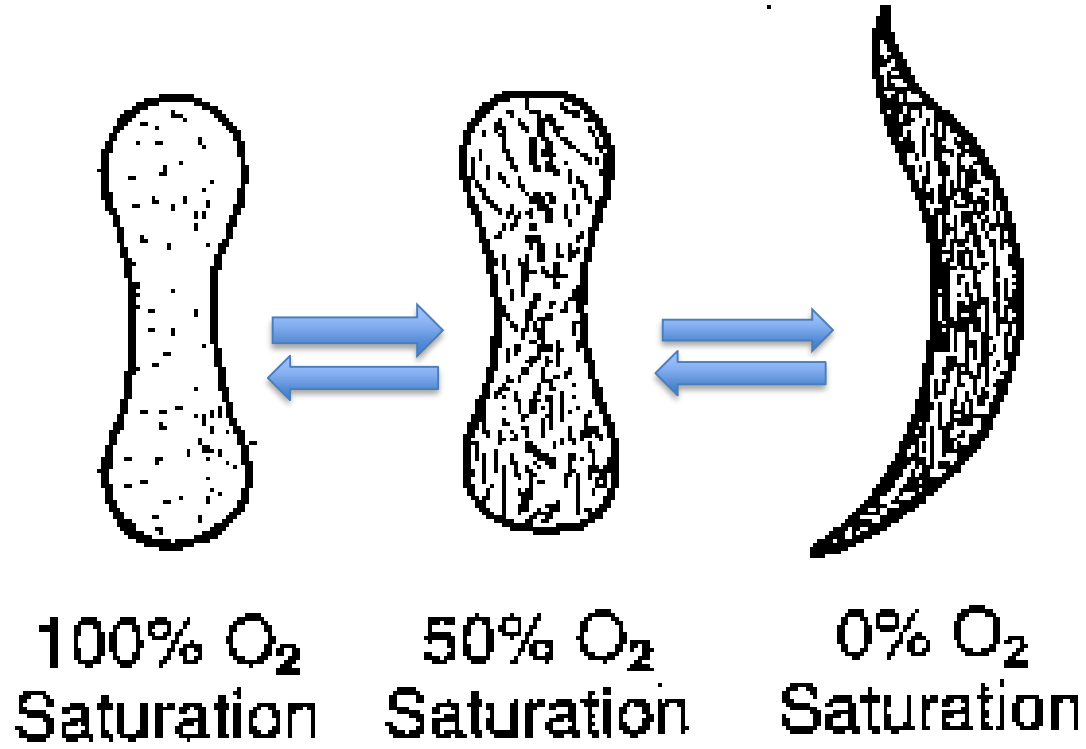
### 2) Concentrazione corpuscolare media di emoglobina (MCHC)

- Ambiente ipertonico della midollare del rene favorisce la disidratazione e facilita la falcizzazione
- Omozigoti in cui coesiste  $\alpha$ -talassemia hanno una forma più lieve

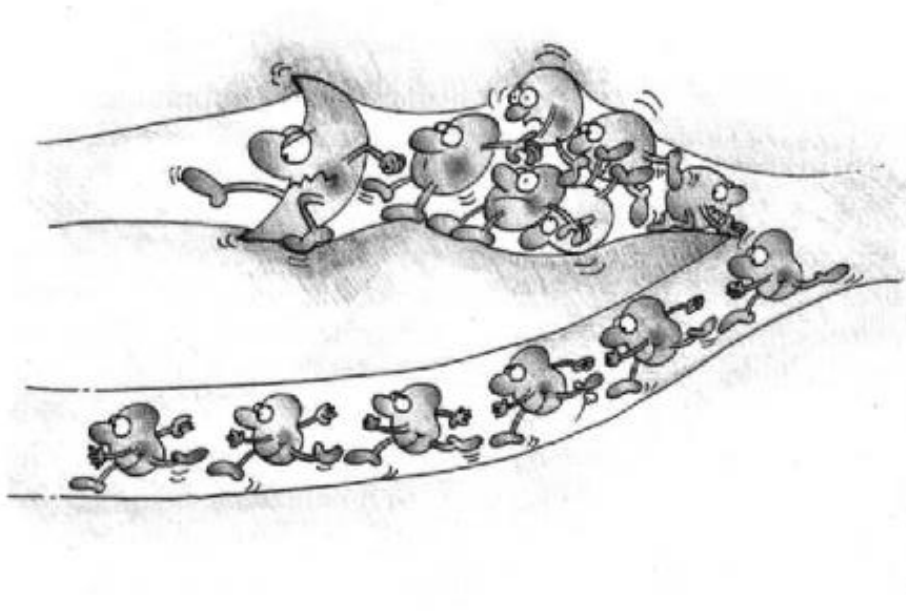
### 3) Diminuzione del pH riduce l'affinità per l'O<sub>2</sub> e quindi aumenta la falcizzazione

### 4) Tempo di transito dei GR attraverso i vasi

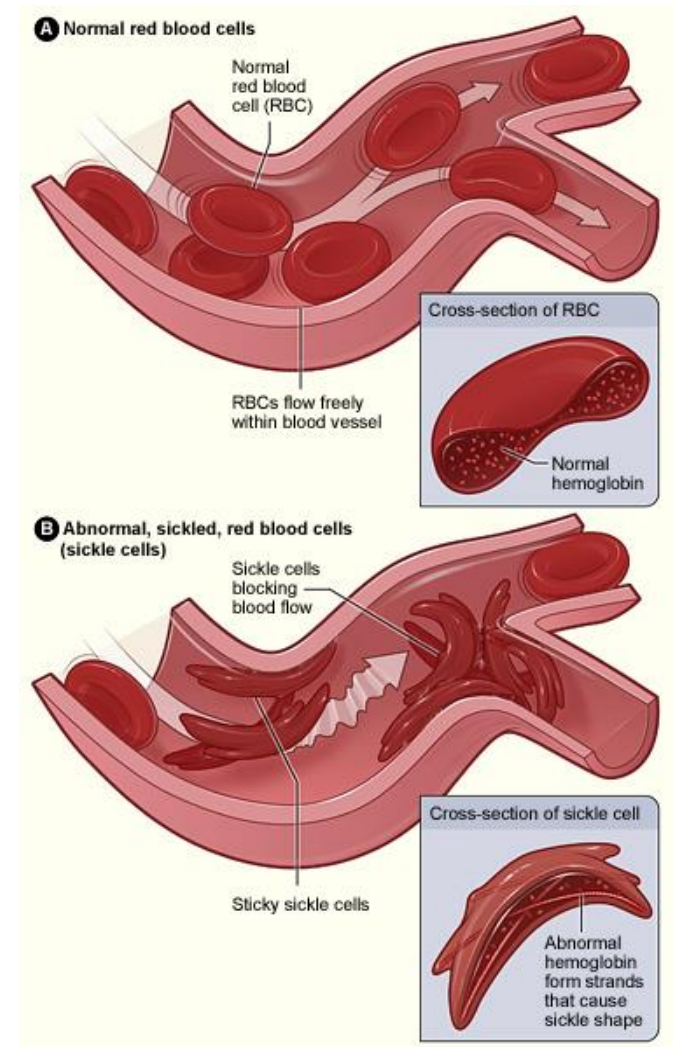
**LA FALCIZZAZIONE E' REVERSIBILE PER CIRCA UNA DECINA  
DI CICLI DI  
OSSIGENAZIONE E DEOSSIGENAZIONE**



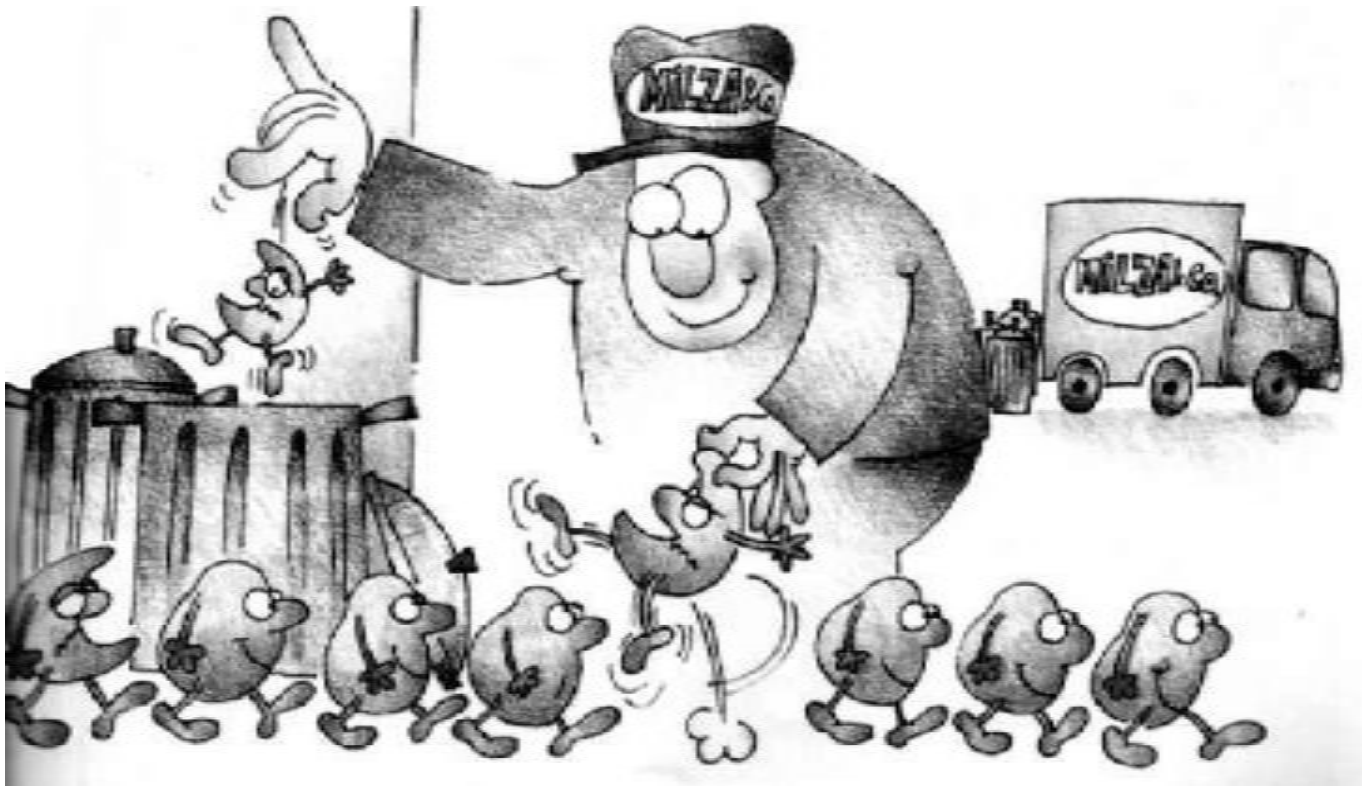
Le cellule irreversibilmente falcizzate ma anche quelle apparentemente normali hanno membrane rigide ed indeformabili nei confronti dell'endotelio vascolare



## MICROCLUSIONI VASCOLARI



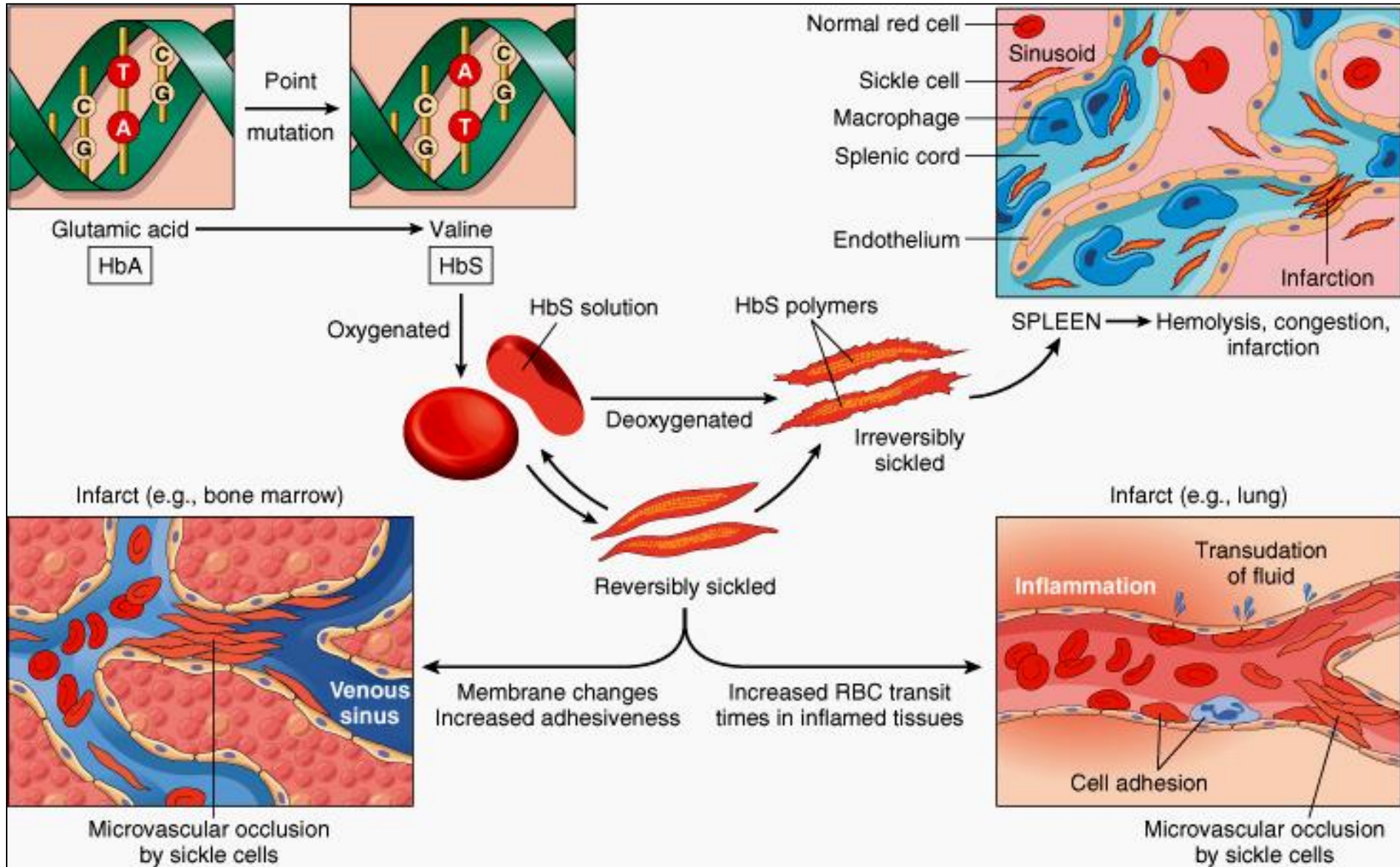




Le cellule irreversibilmente falcizzate sono sequestrate dalla milza, dove vengono eliminate dal sistema fagocitico mononucleato.

Si può verificare anche emolisi intravascolare per aumentata fragilità della membrana. La vita media dei GR è molto ridotta (da 120 a 20 gg).

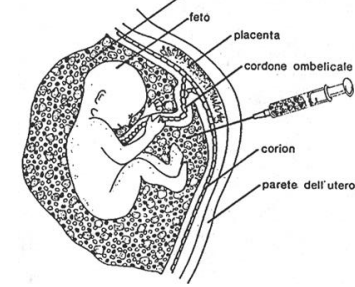
# ANEMIA FALCIFORME



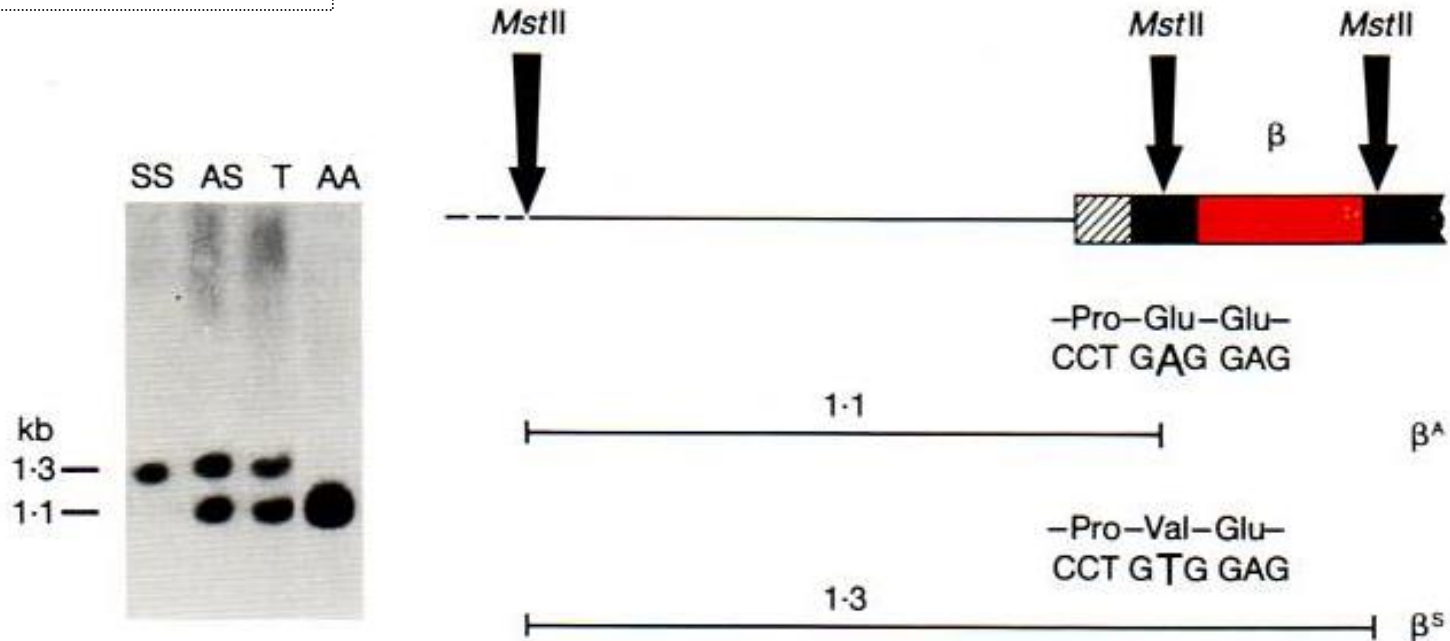
# QUADRO CLINICO

- Anemia Emolitica cronica
- Occlusione dei piccoli vasi che determina un danno ischemico: complicazioni vasocclusive sptt. a livello di ossa, milza, reni, fegato, encefalo, retina, pene e polmoni (crisi dolorose)
- Iperbilirubinemia cronica
- Susceptibilità alle infezioni (soprattutto Pneumococchi ed Haemophilus influenzae)

# DIAGNOSI (1)



Mst II → CCTGAGG



**Figure 42** The diagnosis of sickle cell anaemia by restriction enzyme analysis of fetal DNA. The base substitution which causes sickle cell anaemia removes an *MstII* site. In normal DNA a *MstII* fragment of 1.1 kb is generated, as shown. The absence of the *MstII* site in DNA from individuals with the sickle cell mutation generates a longer *MstII* fragment of 1.3 kb. Heterozygotes show both 1.1 and 1.3 kb bands while homozygotes show only a 1.3 kb band. The inset shows the results of this type of analysis on a pregnancy at risk for a fetus with sickle cell anaemia. The trophoblast DNA (T) is compared with normal (AA), sickle cell trait (AS) and sickle cell anaemia (SS) DNA. Clearly, the fetus (T) is heterozygous for the sickle cell gene.

## DIAGNOSI (2)

- Striscio di sangue
- Elettroforesi

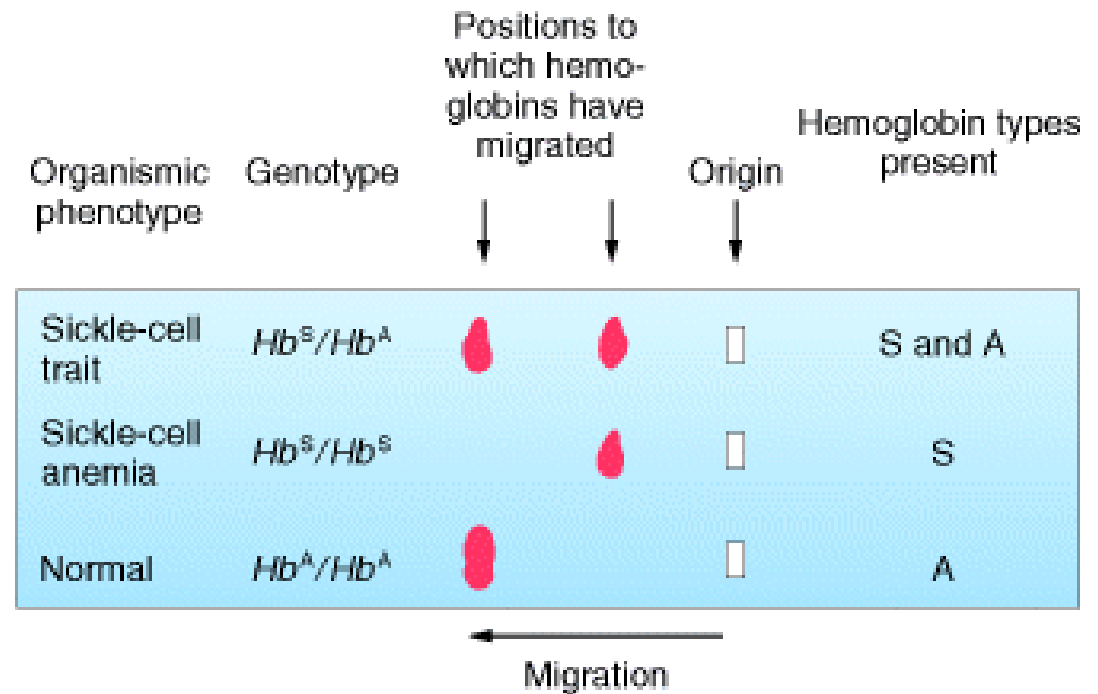
## PROGNOSI

90% raggiungono i 20 anni

50% di questi oltre la 5 decade

## TERAPIA

- Antibiotici
- Trasfusioni
- Chemioterapia con idrossiurea aumenta la concentrazione di HbF e riduce la frequenza delle crisi vasoocclusive



For the Primer, visit [doi:10.1038/nrdp.2018.10](https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.10)

➔ Sickle cell disease (SCD) is a group of conditions with autosomal codominant inheritance characterized by mutations in *HBB* (which encodes haemoglobin (Hb) subunit  $\beta$ ). The sickle haemoglobin (HbS) allele  $\beta^S$  causes a Glu6Lys substitution in the  $\beta$ -globin protein; individuals with two  $\beta^S$  alleles have sickle cell anaemia (SCA), the most common and severe form of SCD.

## SCREENING

Universal newborn screening programmes have reduced SCD mortality in countries where they are available. These programmes enable early diagnosis and treatment of SCD, and identification of individuals who carry one  $\beta^S$  allele or other *HBB* variants, which could be relevant for future genetic counselling. However, in high-burden, low-resource settings, the implementation of these programmes is difficult.

## DIAGNOSIS

Specific Hb tests are required to confirm the diagnosis of SCD. The clinical manifestations of SCD vary, but the shared hallmark is recurrent vaso-occlusive pain crises. These recurrent ischaemic injuries can cause long-term damage to any organ.

## ACUTE

Stroke

Acute chest syndrome

Pain

## CHRONIC

Chronic kidney disease

Gallstones

Avascular necrosis

## SCD MANIFESTATIONS

## PATHOPHYSIOLOGY

Hb is a tetrameric protein expressed by red blood cells

When HbS is deoxygenated, it can polymerize; this process is reversed when HbS binds oxygen

Sickle red blood cells are susceptible to haemolysis, and can aggregate and obstruct the blood flow, leading to vaso-occlusive pain crises

HbS includes two mutant sickle  $\beta$ -globin subunits

HbS polymers stiffen the red blood cells and can deform them to assume a crescent shape

## Rx MANAGEMENT

There are three disease-modifying therapies: hydroxycarbamide (which increases the expression of fetal Hb, a type of Hb that cannot polymerize), blood

transfusion and haematopoietic stem cell transplantation, but their availability is limited in low-resource settings. These therapies and advances in the

treatment of acute complications can prolong survival; as patients age, the prevention of chronic complications becomes increasingly important.

## EPIDEMIOLOGY

An estimated 230,000 neonates in sub-Saharan Africa were born with SCA in 2010, corresponding to ~75% of newborn babies with SCA worldwide. The prevalence of SCD varies by ethnicity; of note, among African-Americans, ~1 in 360 newborn babies have SCD. In sub-Saharan Africa, SCA mortality in children of <5 years of age is 50–90%. Even with the best medical care, the life expectancy of individuals with SCD is shortened by >20 years.

Having one copy of the  $\beta^S$  allele confers some protection against malaria caused by *Plasmodium falciparum*; as a result, the prevalence of the  $\beta^S$  allele is highest in areas of malaria endemicity.

## OUTLOOK

The development of accurate and affordable rapid diagnostic tests would help to implement universal newborn screening programmes in high-burden, low-income areas and, as a result, contribute to save millions of lives. Gene therapy has the potential to cure SCD: clinical trials using lentiviral vectors to insert engineered globin genes are ongoing. New gene editing approaches based on CRISPR–Cas9 are another promising approach for SCD.

# DISORDINI GENETICI DELL' EMOGLOBINA

1) Anomalie Strutturali dell'emoglobina

2) Difetto di sintesi di una o più catene di emoglobina  
(*TALASSEMIE*)

# TALASSEMIE

Sono un gruppo eterogeneo di patologie genetiche ereditarie caratterizzate da una diminuzione della sintesi delle catene alfa o beta dell' Hb.

## TALASSEMIE $\alpha$

- Talassemie  $\alpha^+$  → ridotta sintesi di catene  $\alpha$
- Talassemie  $\alpha^0$  → assente produzione di catene  $\alpha$

## TALASSEMIE $\beta$

- Talassemie  $\beta^+$  → ridotta sintesi di catene  $\beta$
- Talassemie  $\beta^0$  → assente produzione di catene  $\beta$



## CONSEGUENZE:

a) ridotta formazione di emoglobina con conseguente marcata anemia microcitica ipocromica.

b) presenza di catene globiniche in eccesso libere che, non potendo formare emoglobina nella sua conformazione tetrameric, tendono a precipitare nella cellula (es.  $\beta$ -talassemia) oppure tendono ad aggregare spontaneamente dando luogo a tetrameri anomali (es. tetramero  $\beta_4$  nell' $\alpha$ -talassemia). Nel primo caso gli eritrociti muoiono già a livello di eritroblasto nel midollo osseo; nel secondo caso arrivano a maturazione ma poi si verifica emolisi per precipitazione dei tetrameri → **GRAVE ANEMIA**

- Su scala mondiale è la più frequente malattia geneticamente determinata
- Frequente nei paesi mediterranei: Sicilia, Sardegna, Delta del Po, Grecia, Cipro
- Anche Africa, Medio-Oriente, Asia sud-orientale, India e zone endemiche per la malaria

*In eterozigosi i geni talassemici proteggono dall'infezione malarica, aumentando la sopravvivenza e il potenziale riproduttivo dei portatori* → **POLIMORFISMO**  
**BILANCIATO**

# TALASSEMIE $\alpha$

- Talassemie  $\alpha^+$   $\rightarrow$  ridotta sintesi di catene  $\alpha$
- Talassemie  $\alpha^0$   $\rightarrow$  assente produzione di catene  $\alpha$

Difetti molecolari si distinguono in

**-DELEZIONI**

**-NON DELEZIONI (rare)**

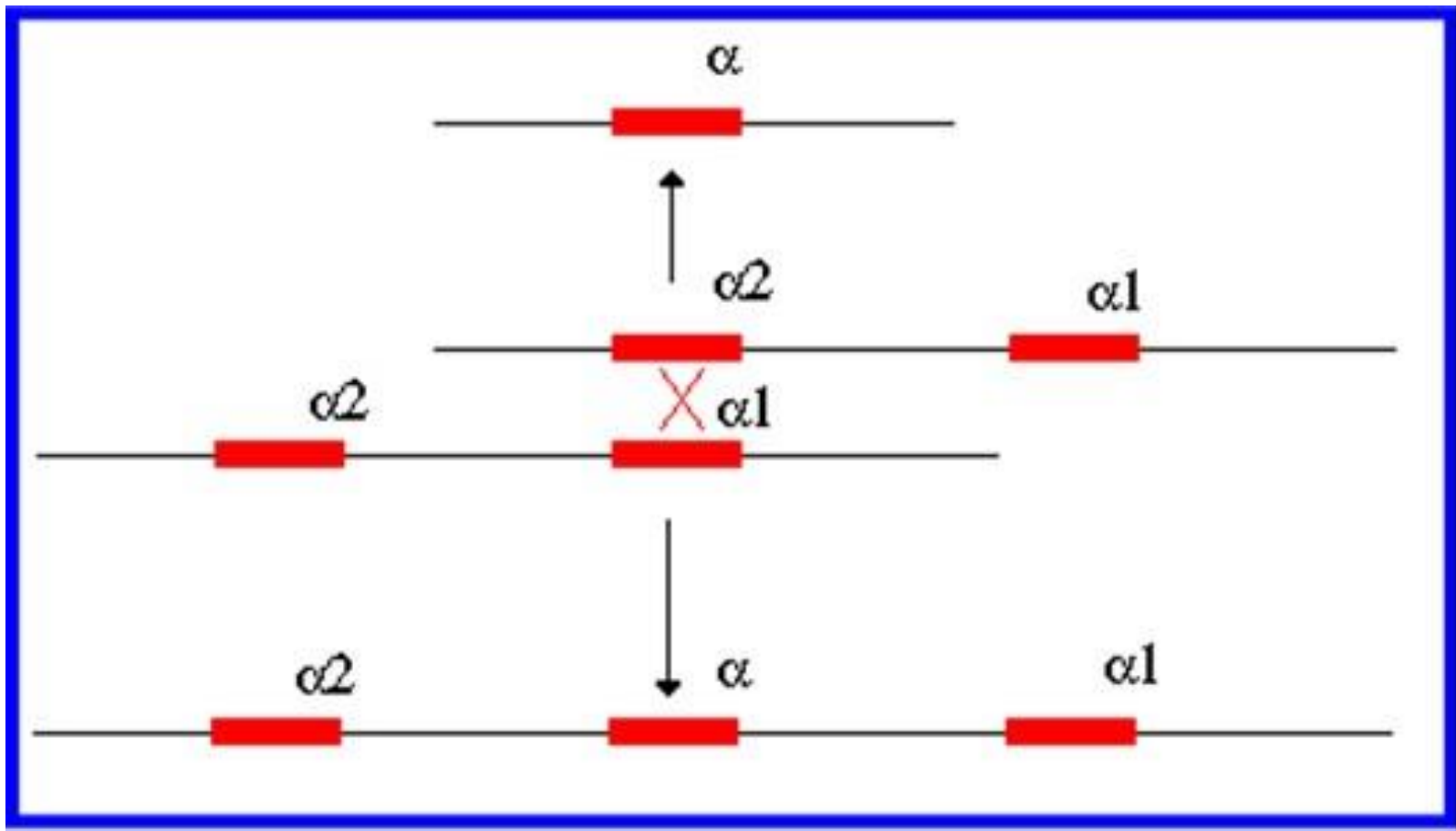
## NON DELEZIONI (rare)

- Mutazioni del codone d' inizio o della sequenza subito a monte
- Mutazioni non senso che creano un codone di STOP
- Mutazioni nel sito di poliadenilazione

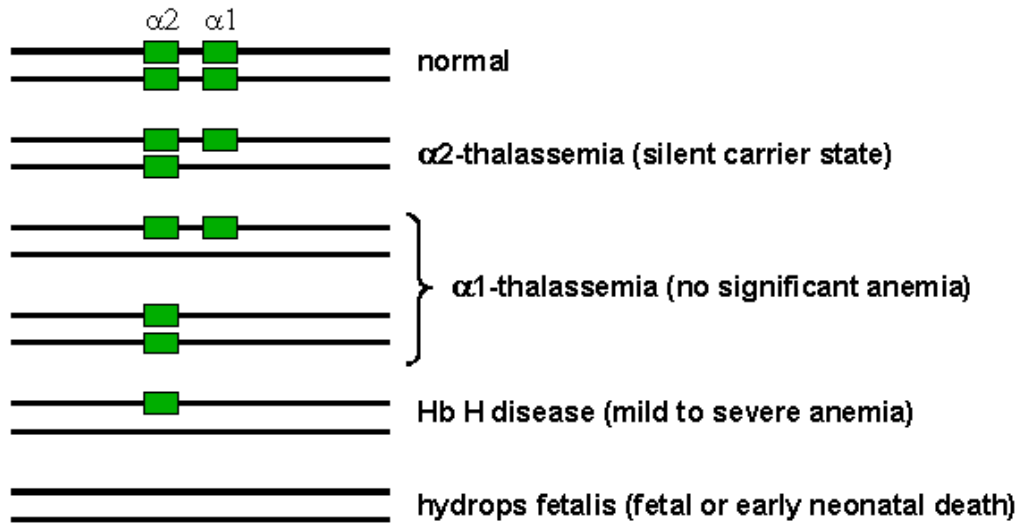
# *DELEZIONI*

## Unequal crossing over: $\alpha$ -thalassemia

- unequal crossing over gave rise to the loss of one of the genes
- the two  $\alpha$ -globin genes arose by gene duplication: they are identical
- inheritance of the deleted chromosome gives rise to  $\alpha$ -thalassemia



- normally there are four  $\alpha$ -globin genes in heterozygotic somatic cells
- loss of  $\alpha$ -globin genes results in different severities of  $\alpha$ -thalassemia depending on the number of genes lost in combination with deletion chromosomes



## Sindromi cliniche classificate in base al numero di geni $\alpha$ interessati dalla delezione

Presenza o assenza di anemia e la sua relativa gravità dipende dal numero di geni  $\alpha$  deleti

alta affinità per  $O_2$  ←

precipita nei GR ←

Hb Bart ( $\gamma_4$ ) ←

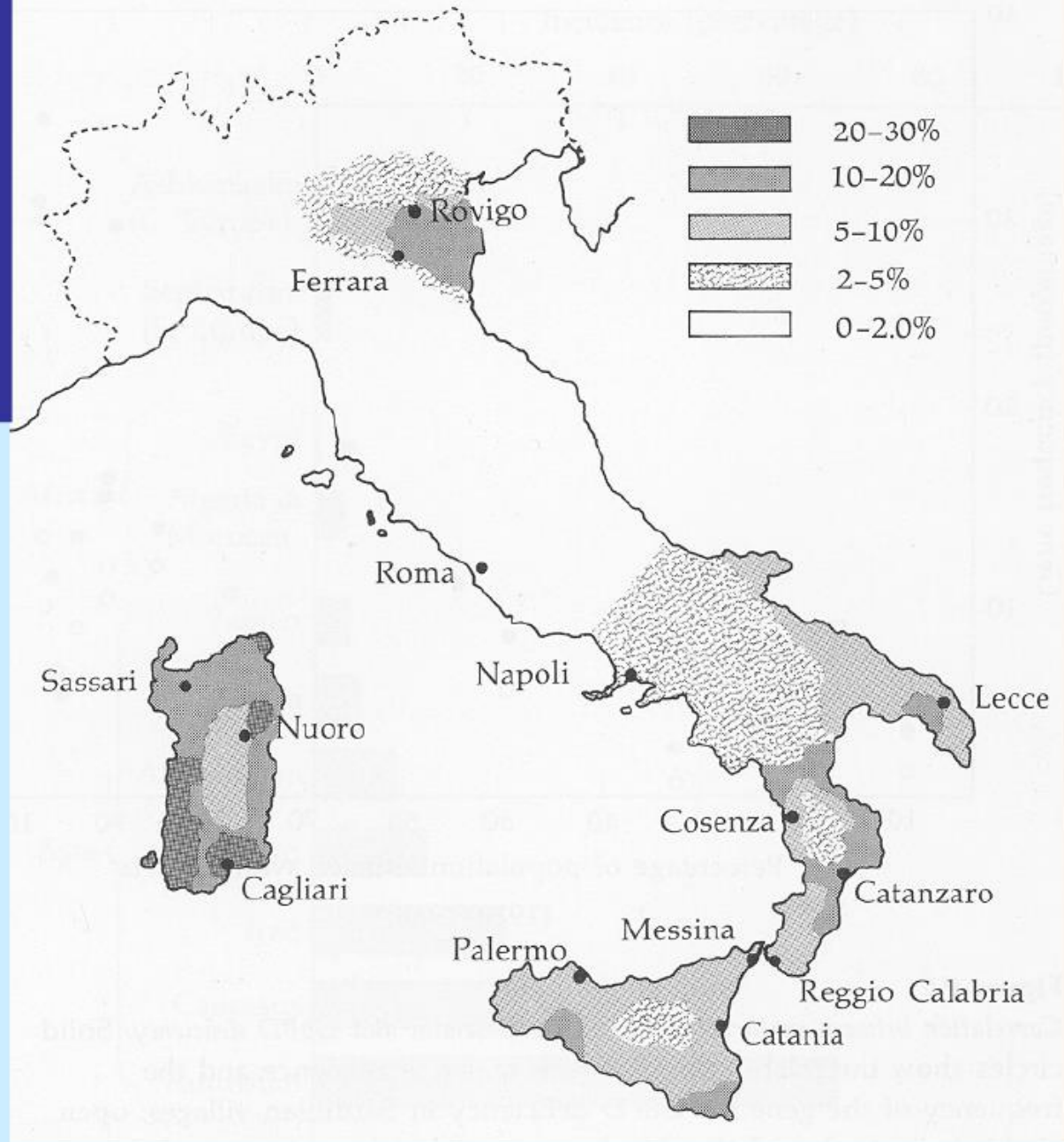
$\alpha$ -talassemia		
portatore silente	$-\alpha/\alpha$	Asintomatico e senza anomalità strutturali del sangue
tratto $\alpha$ -talassemico	$--/\alpha$ $\alpha-/α-$	asintomatico ma con lieve anemia emolitica e con alcune cellule microcitiche
Malattia H dell'emoglobina	$--/\alpha-$	Moderata anemia emolitica con ipocromia e microcitosi, forme di HbH da tetrameri di catene $\beta$ .
Letale (idrope fetale)	$---/---$	Mortale <i>in utero</i>

# TALASSEMIE $\beta$

- Talassemie  $\beta^+$   $\rightarrow$  ridotta sintesi di catene  $\beta$
- Talassemie  $\beta^0$   $\rightarrow$  assente produzione di catene  $\beta$

# Incidenza della $\beta$ talassemia in Italia

E' indicata la frequenza degli eterozigoti

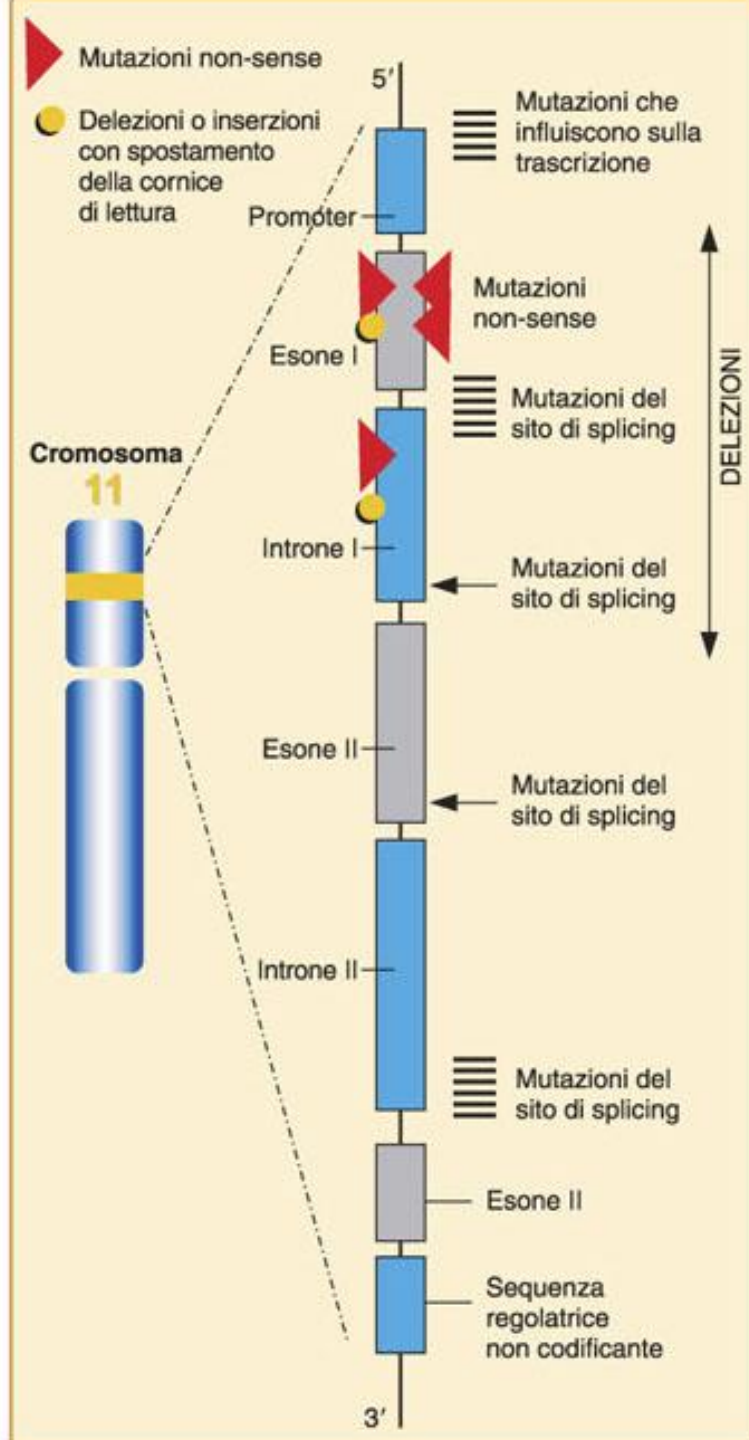




Causate da:

- **NON DELEZIONI (molto frequenti mutazioni puntiformi)**
- **DELEZIONI (rare)**

# LE NON DELEZIONI



# LE NON DELEZIONI

Possono modificare:

## I) La Trascrizione: sono state descritte mutazioni

- nel TATA box: (-30 dall' inizio della trascrizione)
- nella sequenza a -90 importante per la trascrizione del gene della  $\beta$ -globina

## II) Il significato dell' mRNA

- Mutazioni NON SENSO: introducono codoni di stop  
→ Interruzione della catena polipeptidica ( $\beta^\circ$ )  
Esempi: codoni 17 (A-T); 39 (C-T); 15 (G-A); 121 (A-T)
- Mutazioni frameshift: talora causano anticipo della terminazione  
Esempi: -2/COD8; -1/COD16; -1/COD44; +1/COD8 o 9

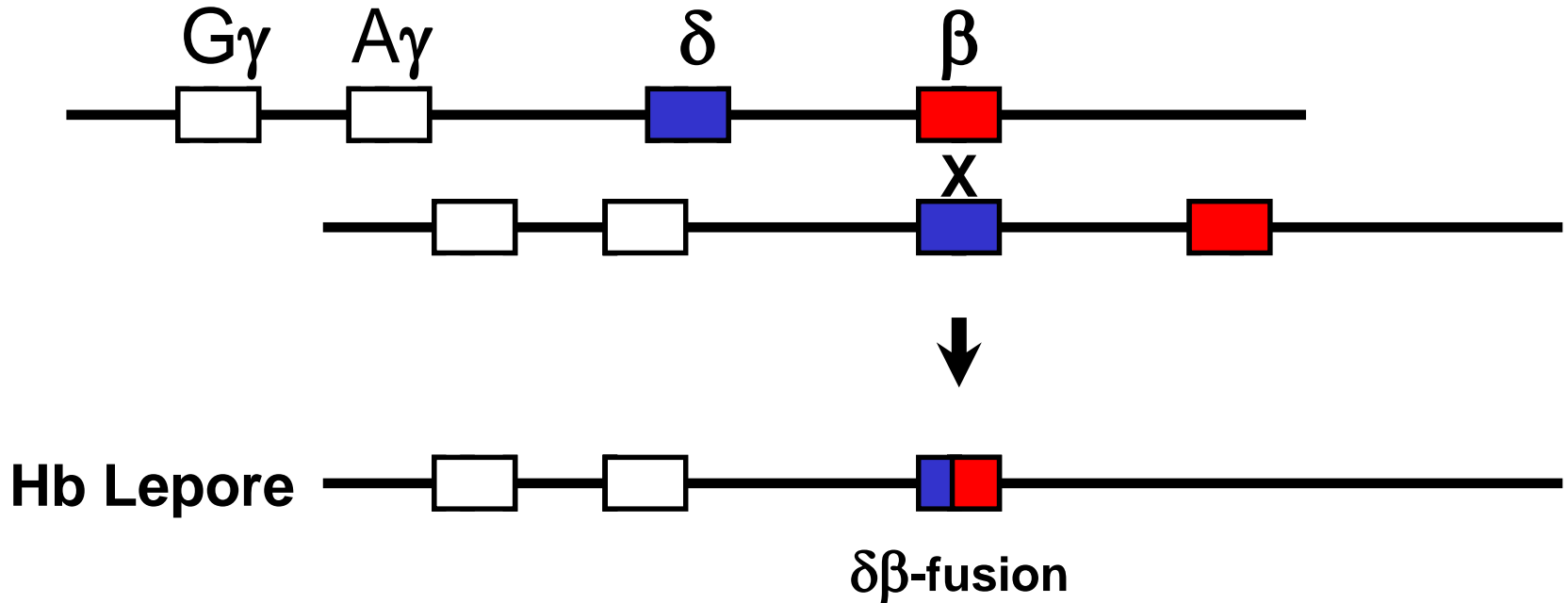
## III) LO SPLICING

- Mutazione di una base nel sito di splicing nella giunzione tra introne ed esone annulla completamente le sintesi ( $\beta^\circ$ )
- Creazione di siti di splicing alternativo ( $\beta+$ )

## IV) LA POLIADENILAZIONE

# *LE DELEZIONI*

Unequal crossing over: hemoglobin Lepore ( $\beta$ -thalassemia)



- unequal crossing over occurred due to the close homology of the  $\delta$ - and  $\beta$ -genes: only 10 out of 146 residues differ (the genes are ~90% homologous to each other)
- the consequence can be severe  $\beta$ -thalassemia due to decreased synthesis of the  $\delta\beta$ -fusion (due to the weak  $\delta$ -globin promoter)

# Patofisiologia della beta-talassemia

Ridotta o assente sintesi di catene di classe  $\beta$

Eccesso catene  $\alpha$

Catene  $\alpha$  non formano tetrameri, ma si legano alla membrana dei GR e dei precursori danneggiandola, ad alte concentrazioni formano aggregati tossici

$\beta^0/\beta^0$  - TALASSEMIA MAJOR  
(MORBO O ANEMIA DI COOLEY)

Si manifesta in genere entro i primi due anni di vita. Eritropoiesi inefficiente, anemia, ipertrofia del tessuto ematopoietico con deformazioni scheletriche, ipertrofia del fegato e della milza che si riattivano come organi ematopoietici

$\beta^0/\beta^+$  o  $\beta^+/\beta^+$   
**TALASSEMIA INTERMEDIA**

Quadro clinico più attenuato che compare nell'infanzia o anche più tardi, con anemia lieve o moderata, talvolta ritardi nella crescita e anomalie ossee.

---

**Eterozigote  $\beta^0/+$  o  $\beta^+/+$**   
**TALASSEMIA MINOR:**  
portatore sano o  
oligosintomatico; microcitemico

# **$\beta$ -TALASSEMIA MAJOR (morbo di Cooley)**

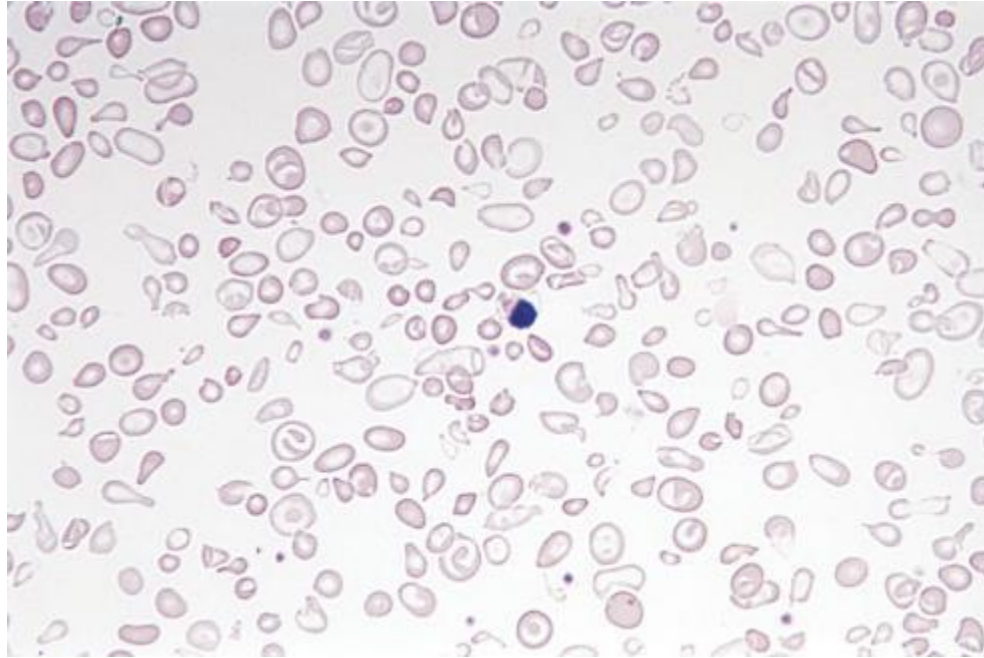
Genotipo:  $\beta^0/\beta^0$ .

E' la più comune forma talassemica nei paesi mediterranei ed in alcune parti dell'Africa e del sud-est asiatico.

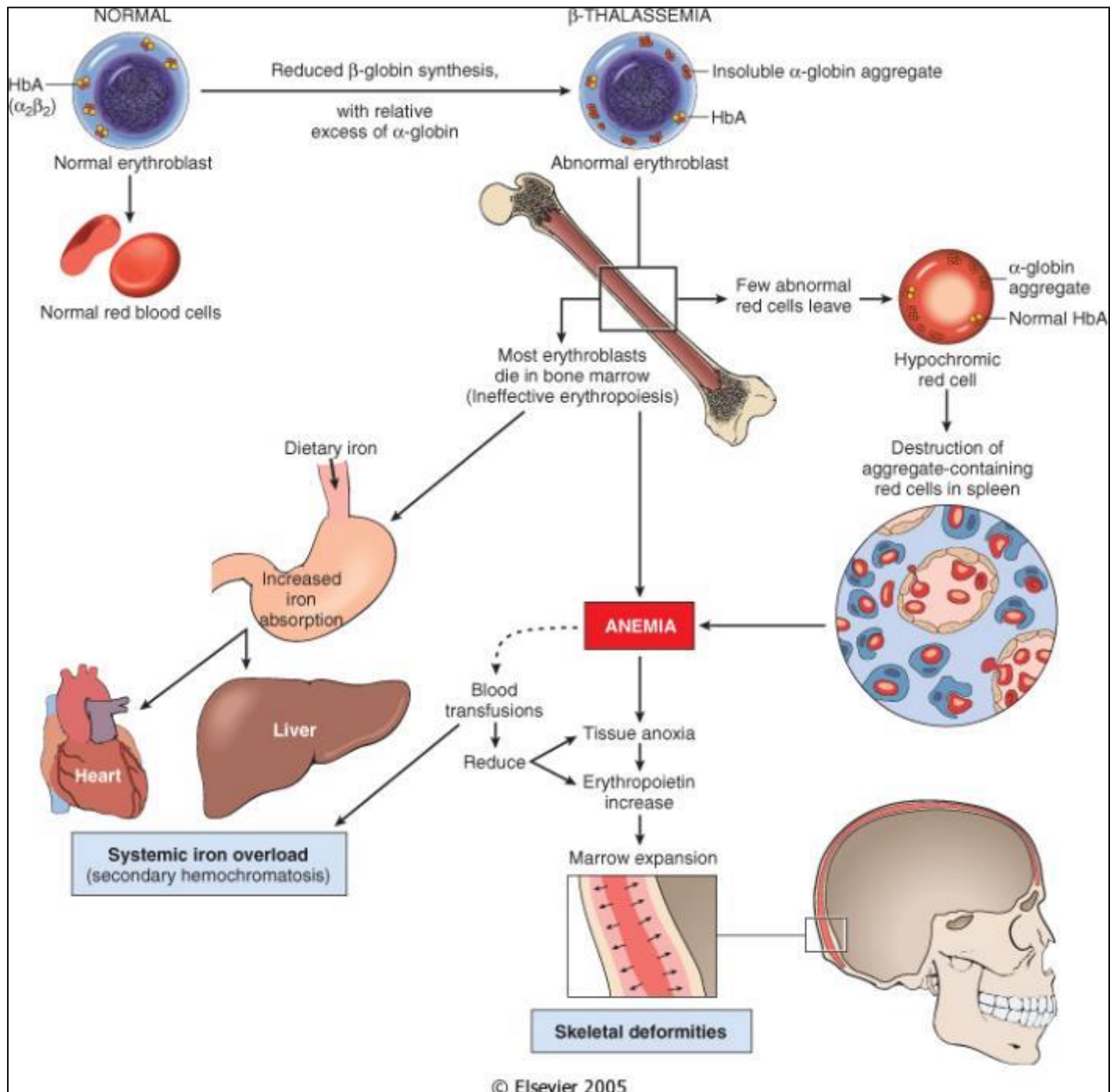
Quadro clinico: anemia grave che si manifesta 6-9 mesi dopo la nascita quando la sintesi di emoglobina si sposta da HbF a HbA.

# Conseguenze dell'alterata sintesi delle catene $\beta$

- **Manca adeguata produzione di HbA**  $\longrightarrow$  GR microcitici e ipocromici



- **Squilibrio tra la sintesi delle globine  $\alpha$  e  $\beta$**   $\longrightarrow$  formazione di aggregati di catene  $\alpha$  che precipitano  $\longrightarrow$  distruzione per apoptosi degli eritroblasti midollari (eritropoiesi inefficace). Gli eritrociti che sfuggono alla morte intramidollare sono sequestrati e distrutti dalla milza (emolisi)





# CLINICA DEL MORBO DI COOLEY

## ANEMIA

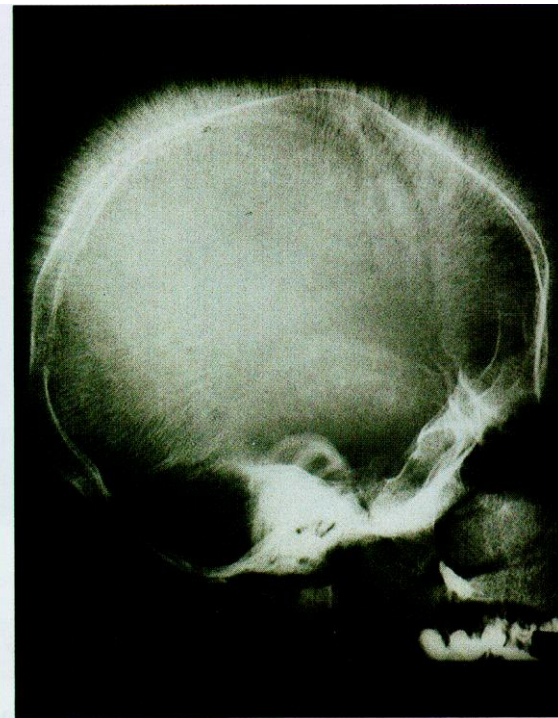
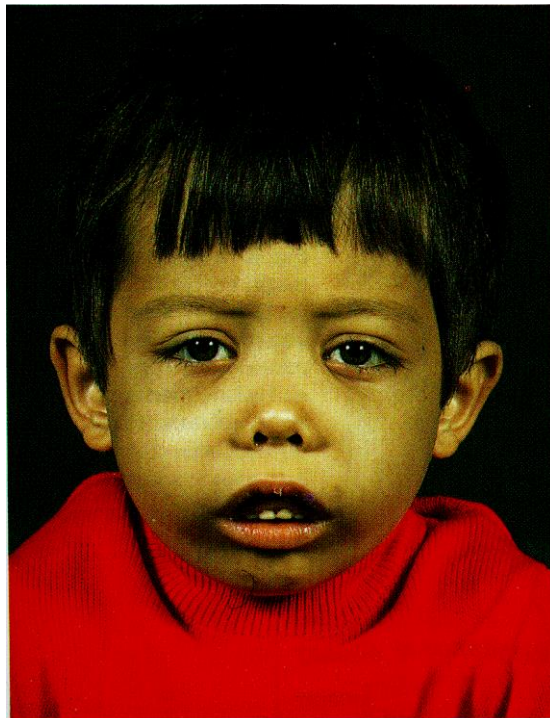
- **Pallore-colorito itterico**
- **Splenomegalia: per iperplasia della polpa rossa secondaria all'esaltata eritrocateresi**
- **Epatomegalia: per persistenza post fetale di emopoiesi extramidollare**



# CLINICA DEL MORBO DI COOLEY

## ALTERAZIONI OSSEE

- Secondarie all'iperplasia del tessuto emopoietico nelle ossa spugnose
- Alterazioni caratteristiche: facies simil-asiatica
- Alterazioni radiologiche caratteristiche (per es. cranio a spazzola, osteoporosi)
- Deformità articolari e prematura fusione delle epifisi



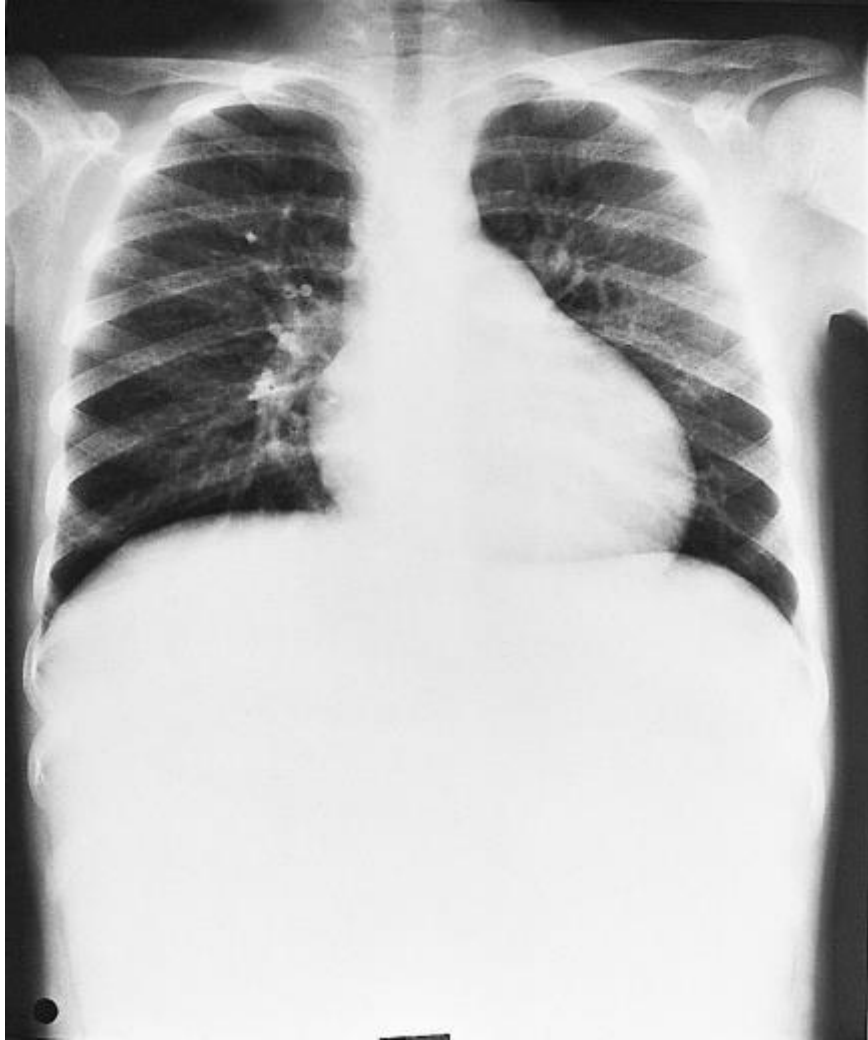
# CLINICA DEL MORBO DI COOLEY

## SOVRACCARICO DI FERRO

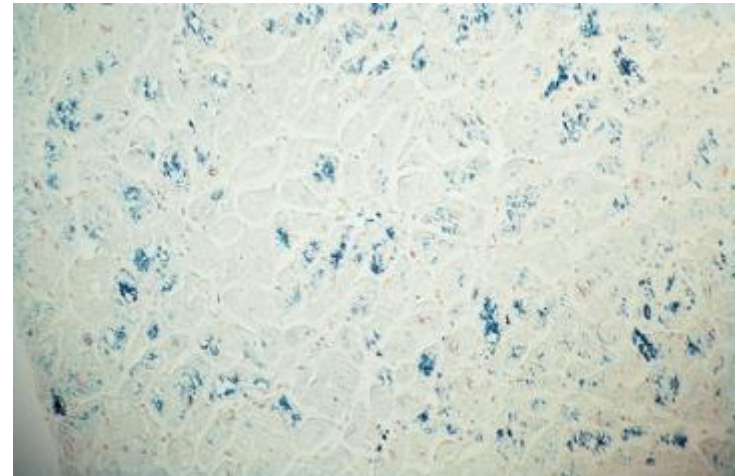
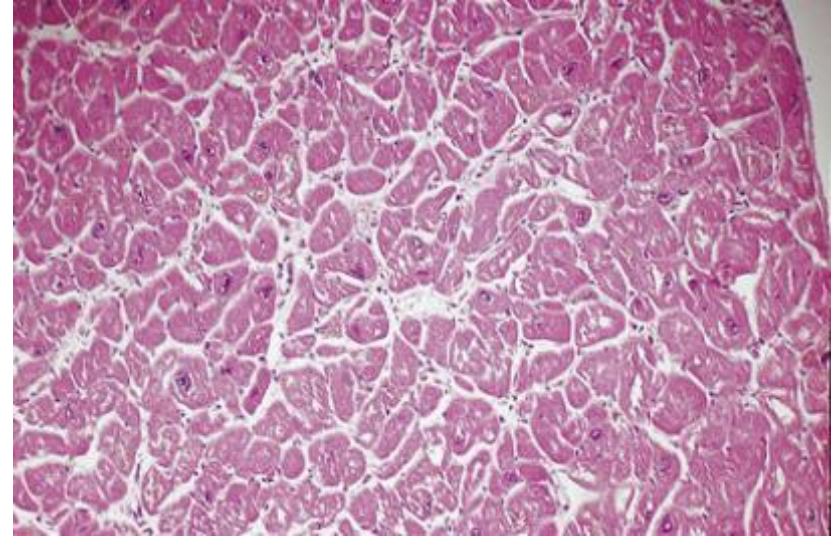
Per:

- Aumentato assorbimento di ferro per espansione dell'eritropoiesi
- Carico emotrasfusionale
- I sintomi si sviluppano soprattutto con l'età
- Organi bersaglio: fegato, cuore, ghiandole endocrine (pancreas, paratiroidi, gonadi, ipofisi, tiroide)
- Quadri clinici più invalidanti: insufficienza cardiaca, diabete, cirrosi epatica

## CLINICA DEL MORBO DI COOLEY

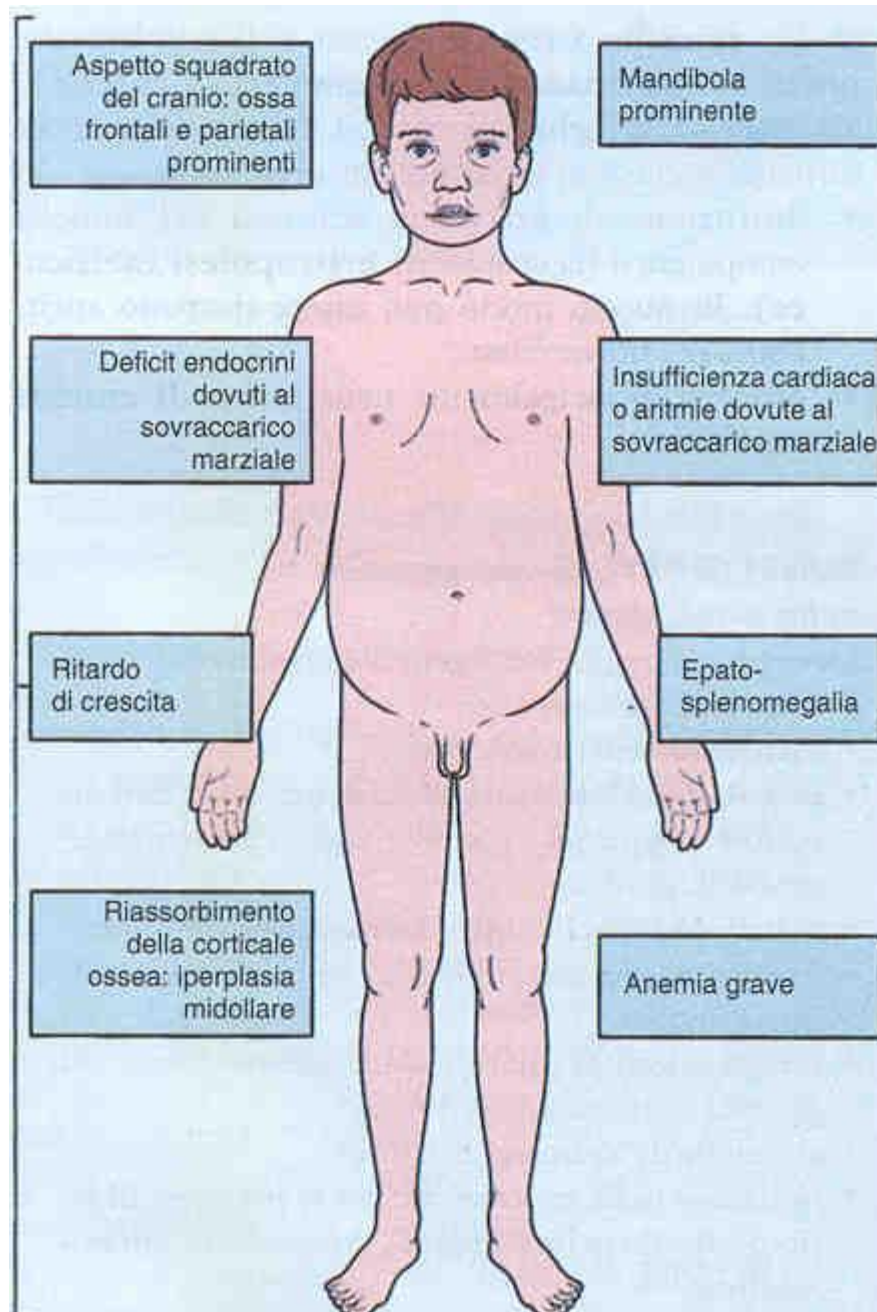


Cardiomegalia in paziente con Morbo di Cooley e sovraccarico marziale



Sezioni post mortem di miocardio con depositi di ferro

Alterazioni ossee da espansione del midollo; neoformazione ossea del cranio: cranio a spazzola



Eccessivo accumulo di ferro da trasfusioni e da aumentato assorbimento intestinale in seguito alla eritropoiesi inefficace.

# TERAPIA

- TRASFUSIONI PERIODICHE
- TRATTAMENTI CON FARMACI CHELANTI DEL FERRO

**IL TRAPIANTO DI MIDOLLO OSSEO è L'UNICA TERAPIA CHE OFFRE  
UNA CURA E TROVA SEMPRE MAGGIORE IMPIEGO**