



15 Giugno 2008

*Le Eritrocitosi
Congenite*

Bruno Nobili



GEMINI 2008

**GIORNATE MULTIDISCIPLINARI
INTERATTIVE ITALIANE
DI PEDIATRIA**

DEDICATO AL PROF. MAURIZIO MIRAGLIA DEL GIUDICE

**15 - 17 GIUGNO 2008
CENTRO CONGRESSI SIMERI (CZ)**

Con il Patrocinio



SIP



Dipartimento Pediatria "F. Fedele"
Università di Napoli

Polycythaemia ≠ erythrocytosis

Traditionally, polycythaemia has been used to identify a group of varied disorders with an increase in circulating red cells that are typified by a persistently raised haematocrit (Hct).

Since only the red cell lineage is involved, the term **erythrocytosis** has more validity.

The term **polycythaemia** is retained in relation to the clonal disorder, **polycythaemia vera (PV)**, in which three cell lineages are involved.

Erythrocytosis (1)

- Elevated red cell mass ($> 25\%$ more than mean normal predicted value, or **Hb more than 185 g/L in men, 165 g/L in women** or more than 97th percentile of method-specific reference range for age, sex, and altitude of residence)
- Patients with a persistently raised venous haematocrit (**Hct**) (**>0.52 males, >0.48 females for >2 months**) should, in general, be investigated by measurement of their red cell mass (**RCM**).

Erythrocytosis (2)

- However, males and females with **Hct values above 0.60 and 0.56** respectively can be assumed to have an absolute erythrocytosis and do not require confirmatory studies
- **Polycythaemia vera (PV)** can be masked in patients that present with iron deficient anaemia and it may be necessary to administer iron to correct this.

Red cell mass

- Traditionally, results and normal ranges are expressed in terms of **ml/kg** total body weight.
- Radionucleotide Panel of the International Committee for Standardisation in Haematology (ICSH, 1980)
- RCM should be expressed in relation to surface area as recommended by the ICSH.
- The diagnosis of absolute erythrocytosis is made when an individual's measured RCM is more than 25% above their mean predicted value
- The term “apparent/relative erythrocytosis” should be reserved for states of dehydration.



ERITROCITOSI

➤ PRIMITIVE

- ✓ Normali o bassi livelli sierici di Epo
- ✓ Ipersensibilità dei progenitori eritroidi all' Epo *in vitro*

➤ SECONDARIE

- ✓ Alti livelli sierici di Epo
- ✓ Normale risposta dei progenitori eritroidi all' Epo *in vitro*

Classificazione (a)

A. Incremento primario di Epo (livelli di Epo inappropriatamente alti)

1. Tumori secernenti Epo
2. Lesioni renali secernenti Epo

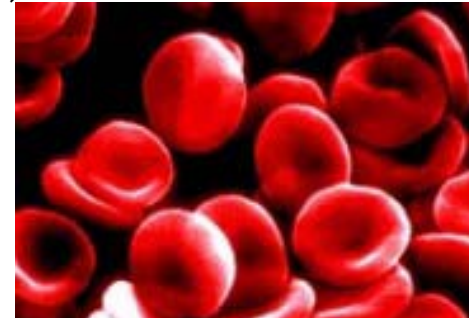
B. Incremento secondario di Epo (livelli di Epo appropriatamente alti)

1. Ipossiemia secondaria a:

- a. malattia polmonare cronica
- b. shunts cardiaci dx-sx
- c. apnea notturna
- d. obesità massiva (Pickwickian syndrome)
- e. altitudine
- f. esposizione cronica al monossido di carbonio (fumatori)

2. Ipossia secondaria ad un difetto degli eritrociti:

- a. emoglobine ad alta affinità per l'ossigeno
- b. assenza o riduzione di 2,3DPG
- c. alcuni casi di Metaemoglobinemia congenita
- d. metaemoglobinemia

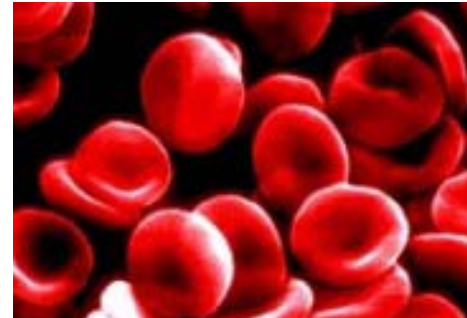


Classificazione (b)

C Policitemia di Chuvash (alti livelli di Epo)

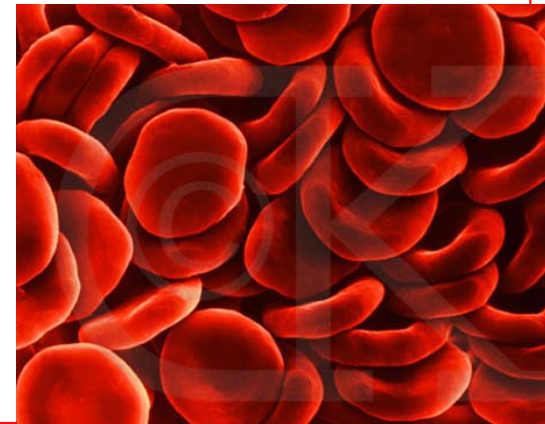
D Mutazioni del recettore dell'Epo (PFCP, bassi livelli di Epo)

E Policitemia familiare idiopatica (sia alti che bassi livelli di Epo)



Eritrocitosi congenite ed acquisite

- **Acquisite**
 - **secondaria ad aumentata secrezione di EPO**
ipossia cronica da malattie polmonari
neoplasie secernenti EPO
 - **secondaria**
esposizione al Co
aumentati livelli di IGF1
- **Congenite**
 - **da alterazioni del "Oxygen sensing"**
omozigosi Chuvash per mutazione VHL ←
altri genotipi VHL
altre mutazioni (PHD2 - HIF2 α)
 - **policitemia congenita primitiva familiare**
mutazione EPO R
mutazioni non identificate
 - **emoglobina ad alterata affinità per l'O**
aumentata affinità
deficit di 2,3 DPG
metemoglobinemia
 - **cardiopatie congenite cianogene**



Il sistema sensore dell'ossigeno

Vascular growth and regulation

α1B-adrenergic receptor
 Adrenomedullin
 Endothelin 1
 Heme oxygenase 1 (HO-1)
 Nitric oxide synthase II (NOS-2)
 Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1)
 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Iron metabolism and erythropoiesis

Ceruloplasmin
 Erythropoietin (EPO)
 Transferrin and its receptor

Glucose uptake and metabolism

Glucose transporters 1 and 3 (GLUT-1 and -3)
 Adenylate kinase 3
 Glycolysis: aldolases A and C, enolase 1, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), hexokinases 1 and 2, lactate dehydrogenase A (LDH A), phosphofructokinase L (PFK L), phosphoglycerate kinase 1 (PGK-1), pyruvate kinase M

Collagen matrix formation

Collagen type V-α₁
 Prolyl-4-hydroxylase-α₁

Regulation of HIF-1 transactivation

p35srj/CITED2

Proliferation, differentiation, and cell viability

Cyclin G2
 Differentiated embryo chondrocyte 1 (DEC-1)
 Insulin-like growth factor 2 (IGF-2)
 Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP) 1, 2, and 3
 NIP-1
 NIX
 p21
 Transforming growth factor (TGF)-α, -β₃
 VEGF, EPO

Catecholamine biosynthesis

Tyrosine hydroxylase (TH)

Regulation of extracellular pH

Carbonic anhydrases (CA) 9 and 12

For references, refer to Semenza [151] and Maxwell et al. [152].

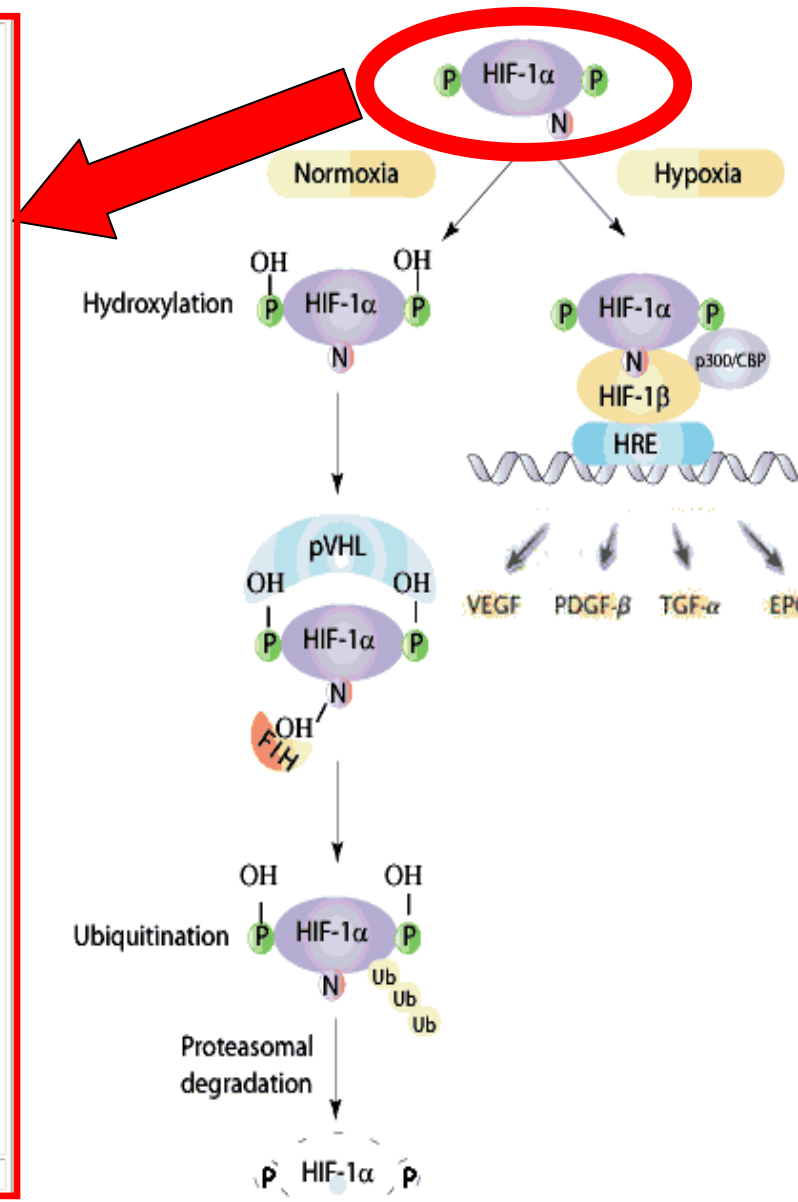
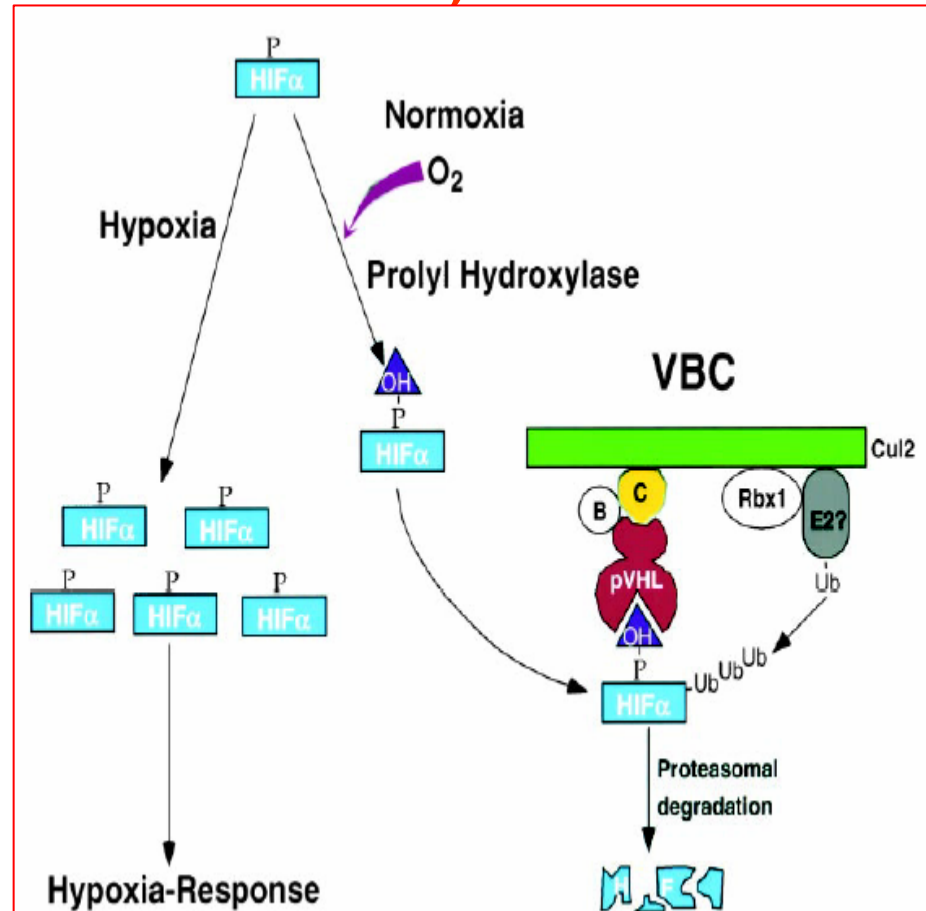


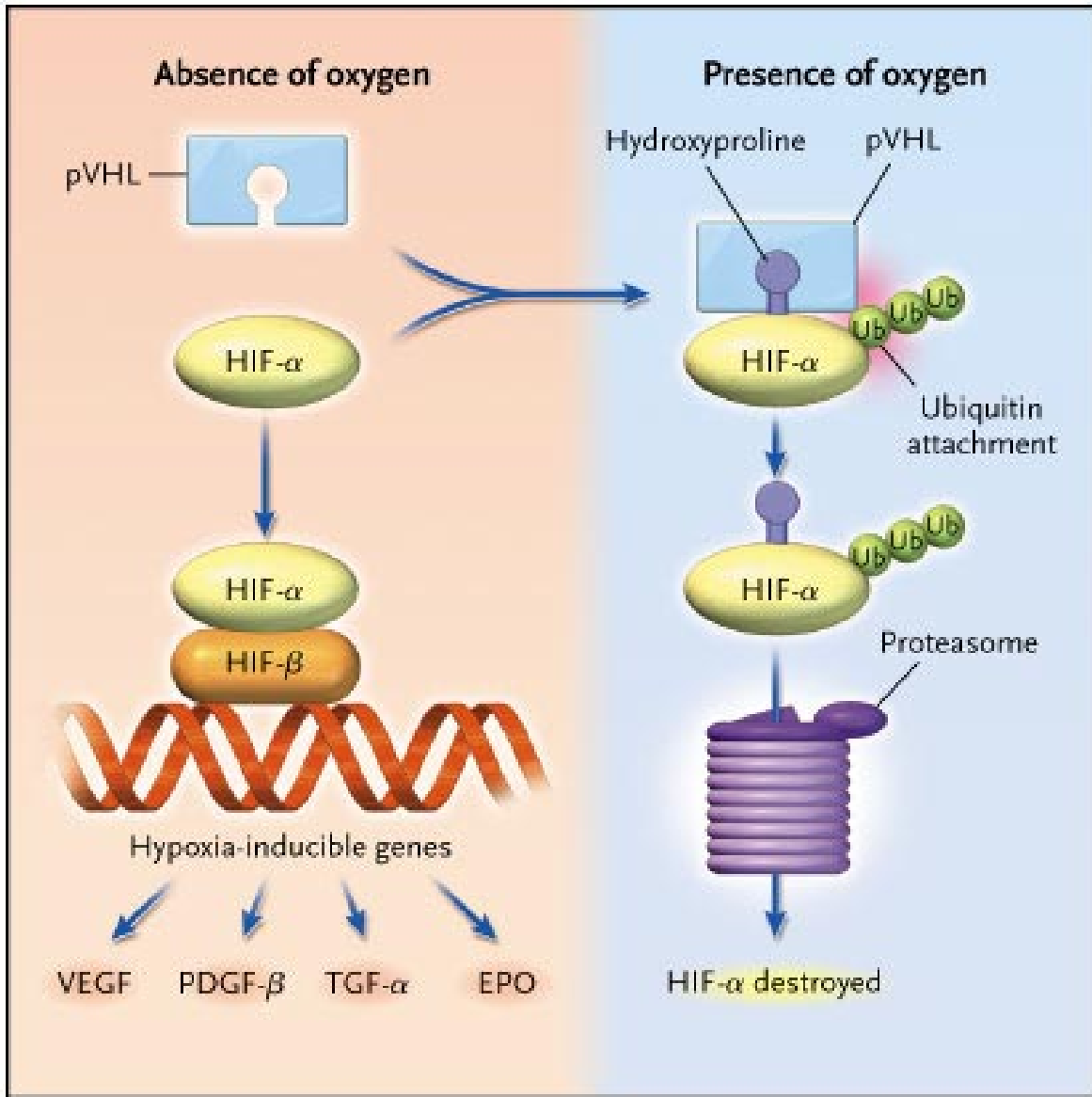
Table 1. Transcriptional targets of hHIF-1

Il sistema sensore dell'ossigeno

- HIF-1 α (hypoxia inducible factor)

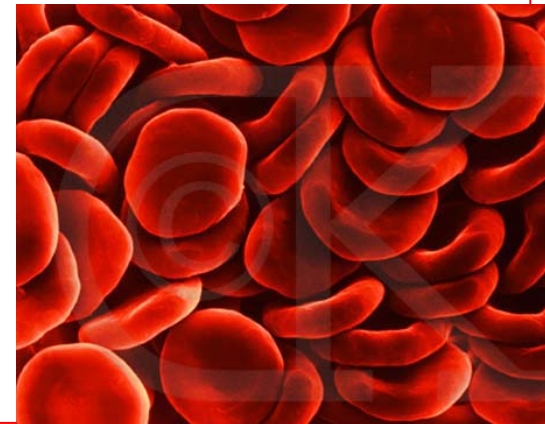
- VHL protein
- Elongin B,C
- Rbx1
- Cul 2
- PHDs
- FIH





Eritrocitosi congenite ed acquisite

- **Acquisite**
 - **secondaria ad aumentata secrezione di EPO**
ipossia cronica da malattie polmonari
neoplasie secernenti EPO
 - **secondaria**
esposizione al Co
aumentati livelli di IGF1
- **Congenite**
 - **da alterazioni del "Oxygen sensing"**
omozigosi Chuvash per mutazione VHL ←
altri genotipi VHL
altre mutazioni (PHD2)
 - **policitemia congenita primitiva familiare**
mutazione EPO R
mutazioni non identificate
 - **emoglobina ad alterata affinità per l'O**
aumentata affinità
deficit di 2,3 DPG
metemoglobinemia
 - **cardiopatie congenite cianogene**



Policitemia di Chuvash

Anomalia del pathway del sistema sensore dell'ossigeno

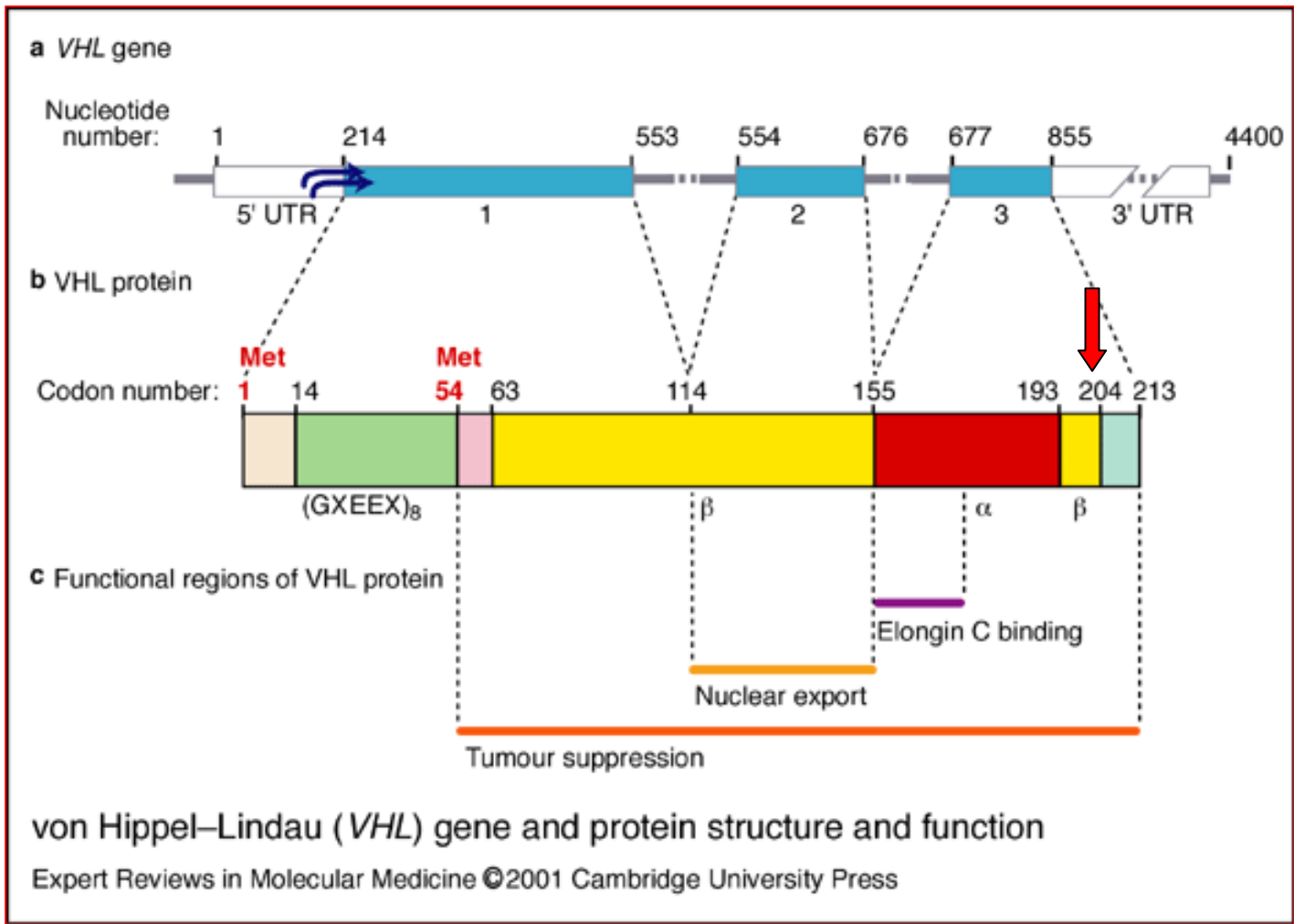
“La **Repubblica Autonoma di Chuvash** è sulla sponda orientale del fiume Volga, nella parte centrale della Russia Europea”



“La **policitemia di Chuvash** è una malattia autosomica recessiva caratterizzata da incremento dei livelli sierici di Epo e della concentrazione emoglobinica in normossia”



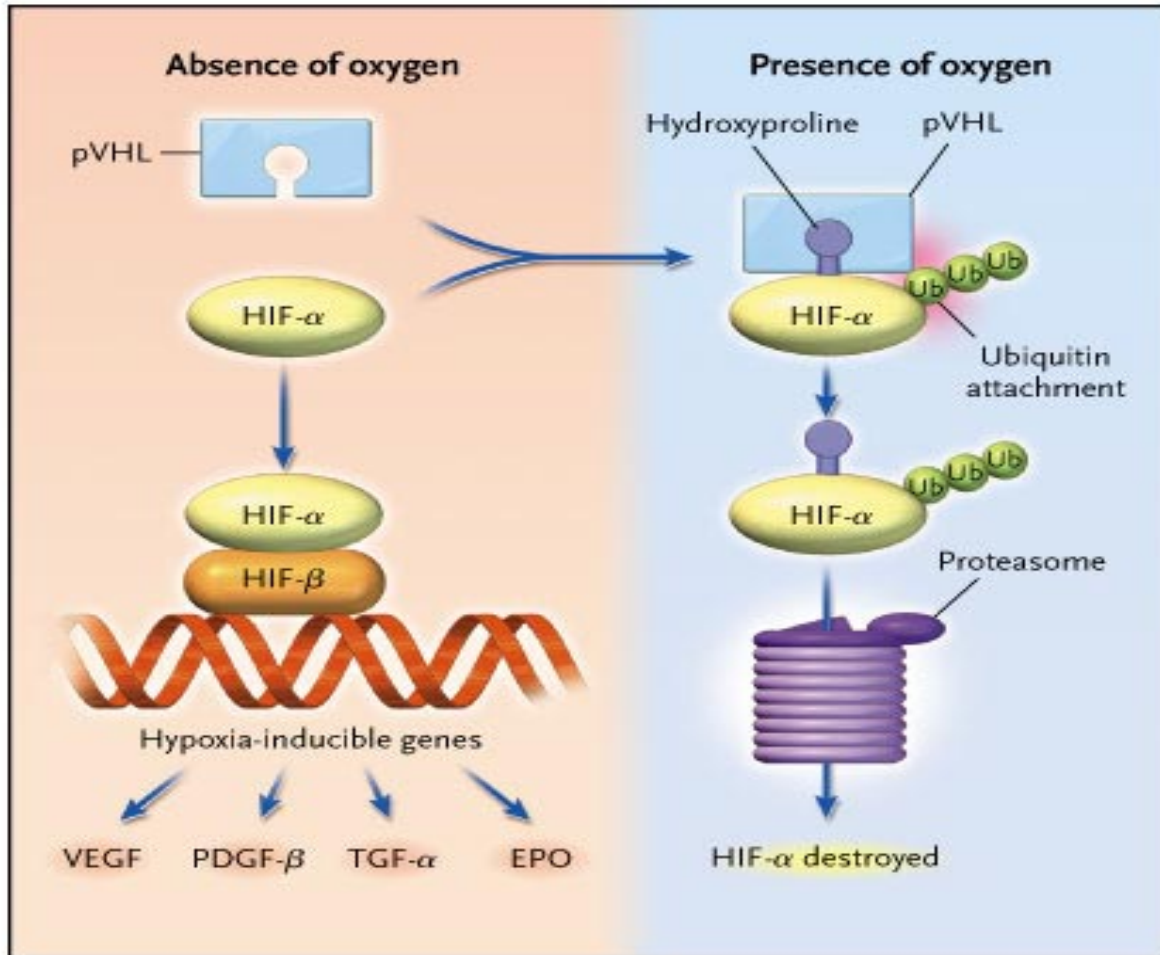
- Il locus associato alla **policitemia di Chuvash** mappa al **cromosoma 3p25**. Questa regione contiene il **gene VHL**.
- Le sequenze mostravano una mutazione C598T in VHL con la sostituzione di Arg in Trp al residuo amino-acidico 200
- Tutti i soggetti con **policitemia di Chuvash** erano omozigoti per l'allele mutato (T), mentre tutti gli eterozigoti mostravano sia l'allele mutato (T) che il *wild-type* (C)



gene Von Hippel–Lindau (*VHL*) e la struttura e la funzione proteica

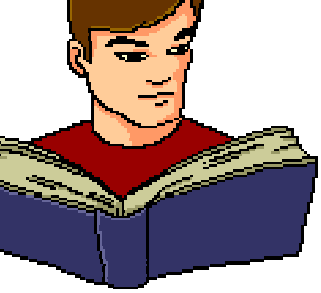
a) Struttura del gene *VHL* (nucleotidi 1–4400) comprende 3 esoni (blue). Regioni non tradotte 5' and 3' (UTRs), e diversi siti di inizio trascrizionale (curve). b) domini α e β (codoni 1–213), e le due metionine (Met) ai codoni di start (ai codoni 1 e 54). La regione (GXEEEX)₈ è un motivo pentamerico ripetuto con un non noto significato funzionale. c) Regioni proteiche richieste per funzioni diverse.

“La sostituzione **Arg200Trp** riduce l’affinità di VHL per l’Hypoxia-Inducible Factor α (HIF1 α), determinando una riduzione dell’ubiquitinazione in condizioni di normossia”



Manifestazioni cliniche (N. Pazienti 96)

- Età media : 16 anni (range 6-36 anni)
- Emoglobina (media 18.3 ± 0.3 g/dL)
- Ematocrito (media 59.3 ± 0.9 %)
- Anomalie vascolari
 - ✓ Emangiomi vertebrali
 - ✓ Vene varicose
 - ✓ Ipotensione arteriosa
 - ✓ Ipertensione polmonare *(Haematologica 2006)
- Mortalità prematura relativa ad eventi vascolari cerebrali e trombosi periferiche (età media: 42 anni)
- Assenza di tumori



Il nostro studio

HEMATOPOIESIS

Von Hippel-Lindau–dependent polycythemia is endemic on the island of Ischia: identification of a novel cluster

Silverio Perrotta, Bruno Nobili, Marcella Ferraro, Carmela Migliaccio, Adriana Borriello, Valeria Cucciolla, Vincenzo Martinelli, Francesca Rossi, Francesca Punzo, Paola Cirillo, Giuseppe Parisi, Vincenzo Zappia, Bruno Rotoli, and Fulvio Della Ragione

BLOOD, 15 JANUARY 2006 • VOLUME 107, NUMBER 2



Pazienti

- 22 pazienti di 13 famiglie
- 8 appartenevano alla famiglia A
- 3 appartenevano alla famiglia B
- 11 non presentavano parenti affetti
- tutti vivevano in Campania
- tutti discendevano da famiglie residenti in Campania da diverse generazioni
- età media alla diagnosi 19 anni (range 1-34 anni)
- PC-like

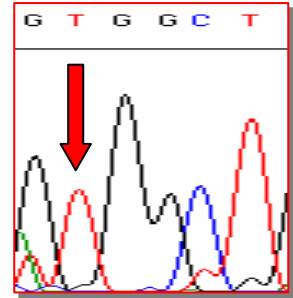
Criteri diagnostici

- livelli di emoglobina persistentemente elevati (superiore a 18 g/dl nei maschi, superiore a 16.5 g/dl nelle femmine o superiore a 2 DS rispetto al sesso e all'età nei bambini);
- assenza di splenomegalia;
- normale conta leucocitaria e piastrinica;
- emoglobina con normale affinità per l'ossigeno;
- assoluto o relativo incremento dei livelli sierici di Epo in condizioni pre-flebotomiche (Prchal e coll.);
- assenza di cause note di policitemia secondaria.

Caratteristiche biochimiche

	Pazienti con policitemia	Familiari non affetti (n=40)	p
Erythropoietin (mIU/ml)	61.9±12.8	6.4±6.9	0.001
Hemoglobin (g/dl)	18.5±0.8	13.3±0.7	0.001
Serum transferrin receptor (µg/ml)	9.5 (8.7-10.5)	6.2 (5.9-6.5)	<0.001

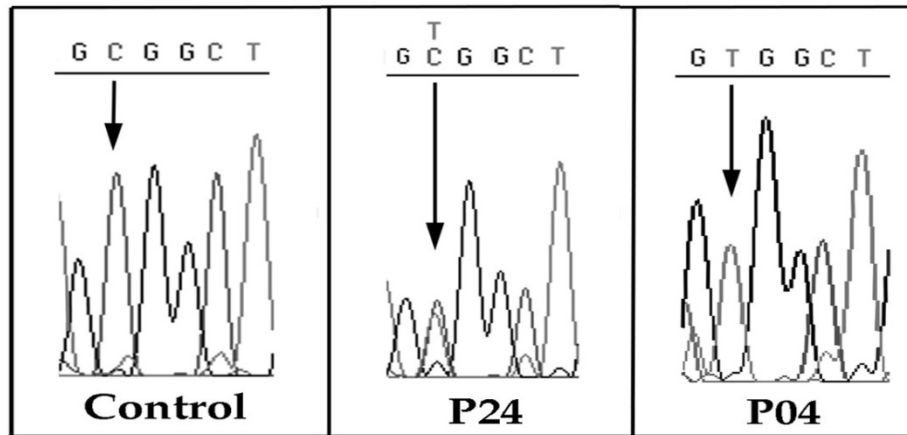
Analisi molecolare-funzionale



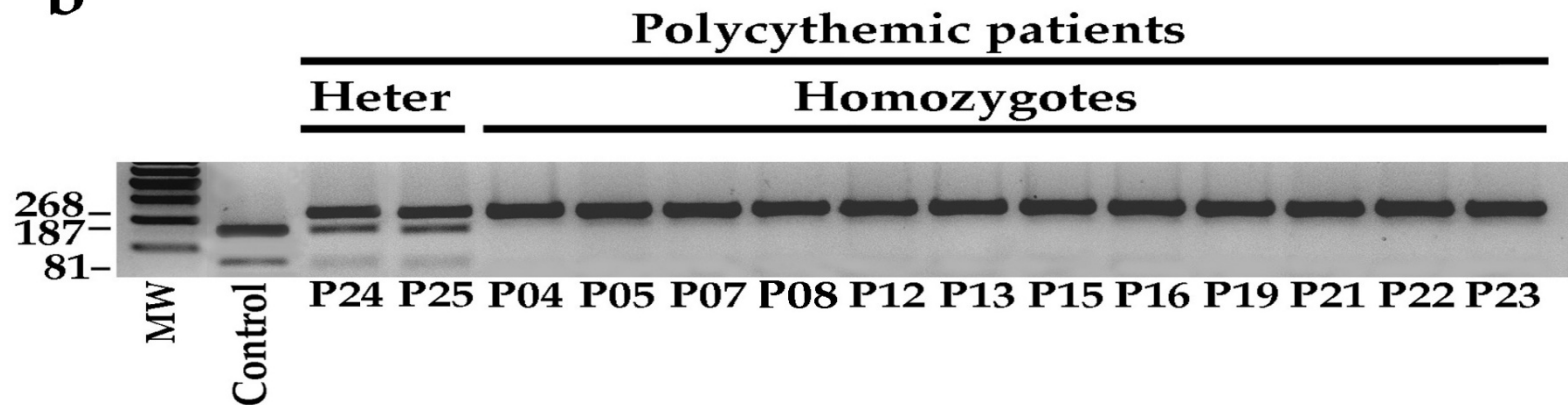
- PCR e sequenziamento del gene VHL
- Western blotting per pVHL e pHIF1a
- Attività di HIF1a
- RT-PCR dei geni target HIF1 α (es. EPO e VEGF)
- PCR real time di geni target

Determinazione della mutazione VHL

a



b

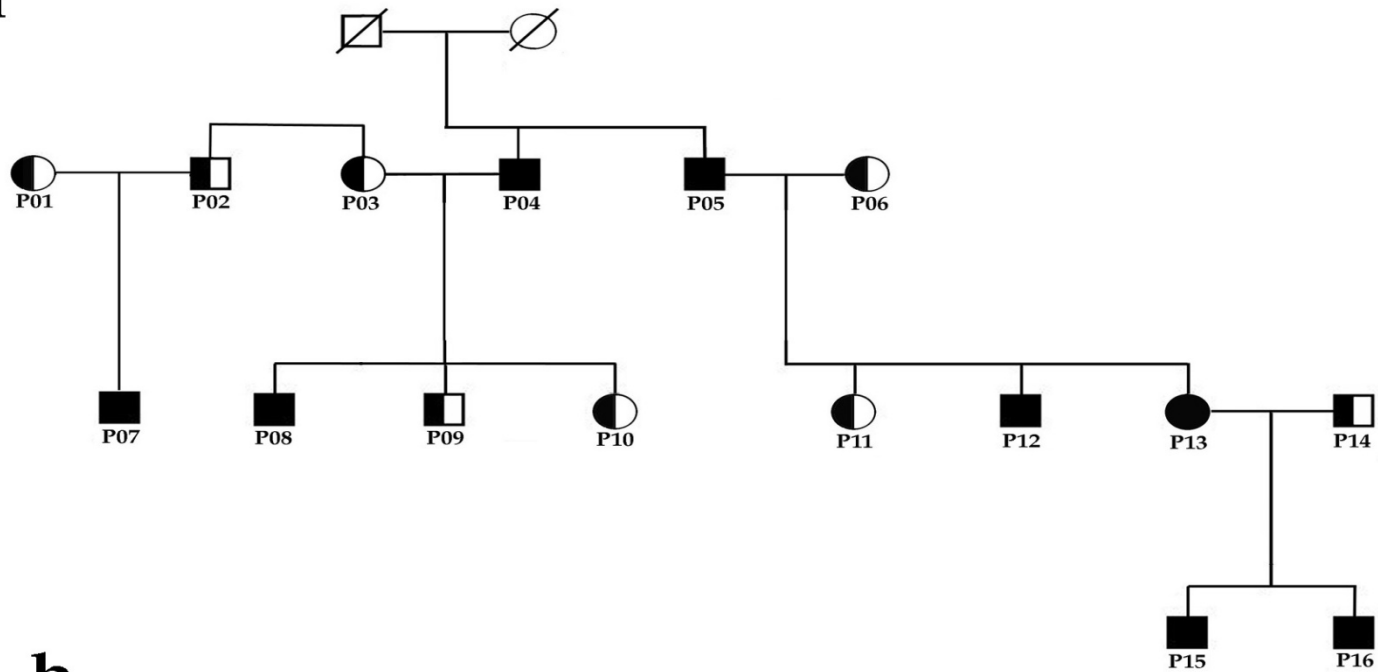


Risultati (1)

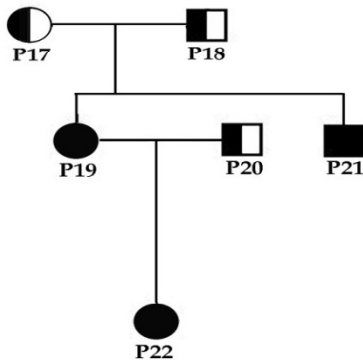
- **14/22** mutati
- **12/14** omozigoti: **famiglia A e B** : 6 omozigoti con un genitore omozigote (4pz)
 - P23** : originario di Ischia, genitori eterozigoti non consanguinei
- **2/14** eterozigoti malati

Pedigrees delle due famiglie dell'isola di Ischia

a



b



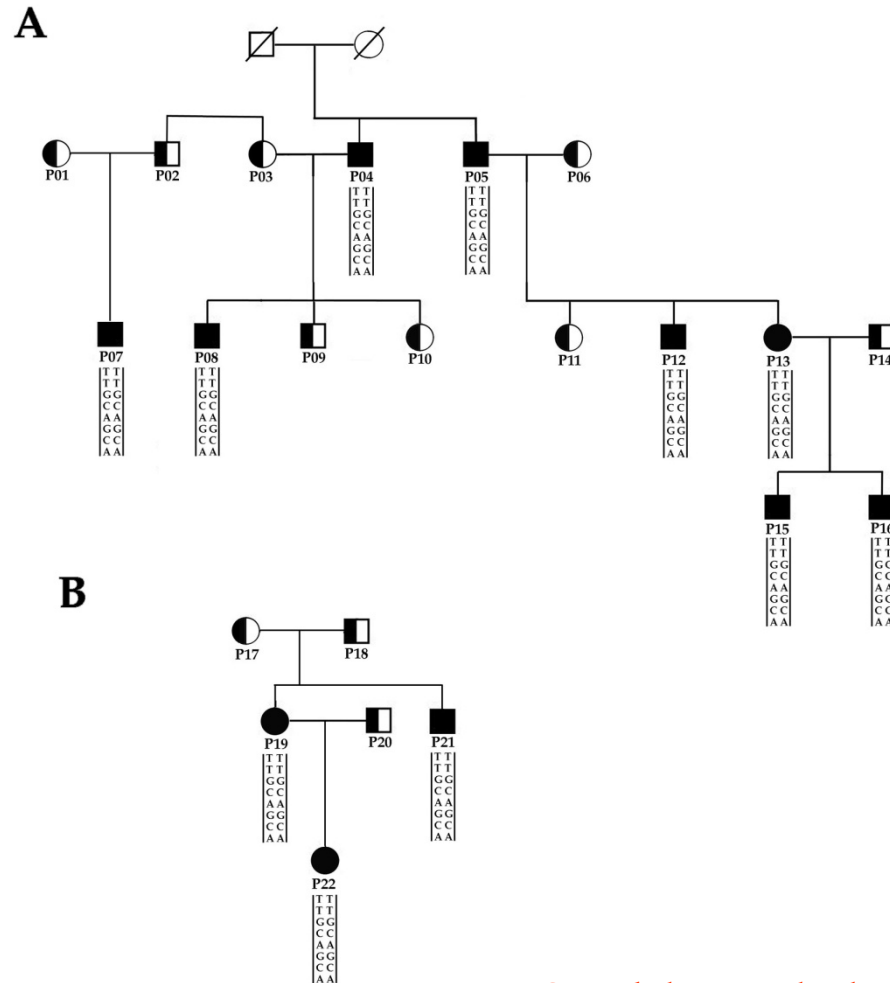
Risultati (2)

- ▶ **Frequenza della mutazione ad Ischia: 9 eterozigoti/64 sani (0.0703)**
- ▶ **100 controlli italiani non campani: assenza della mutazione VHL**

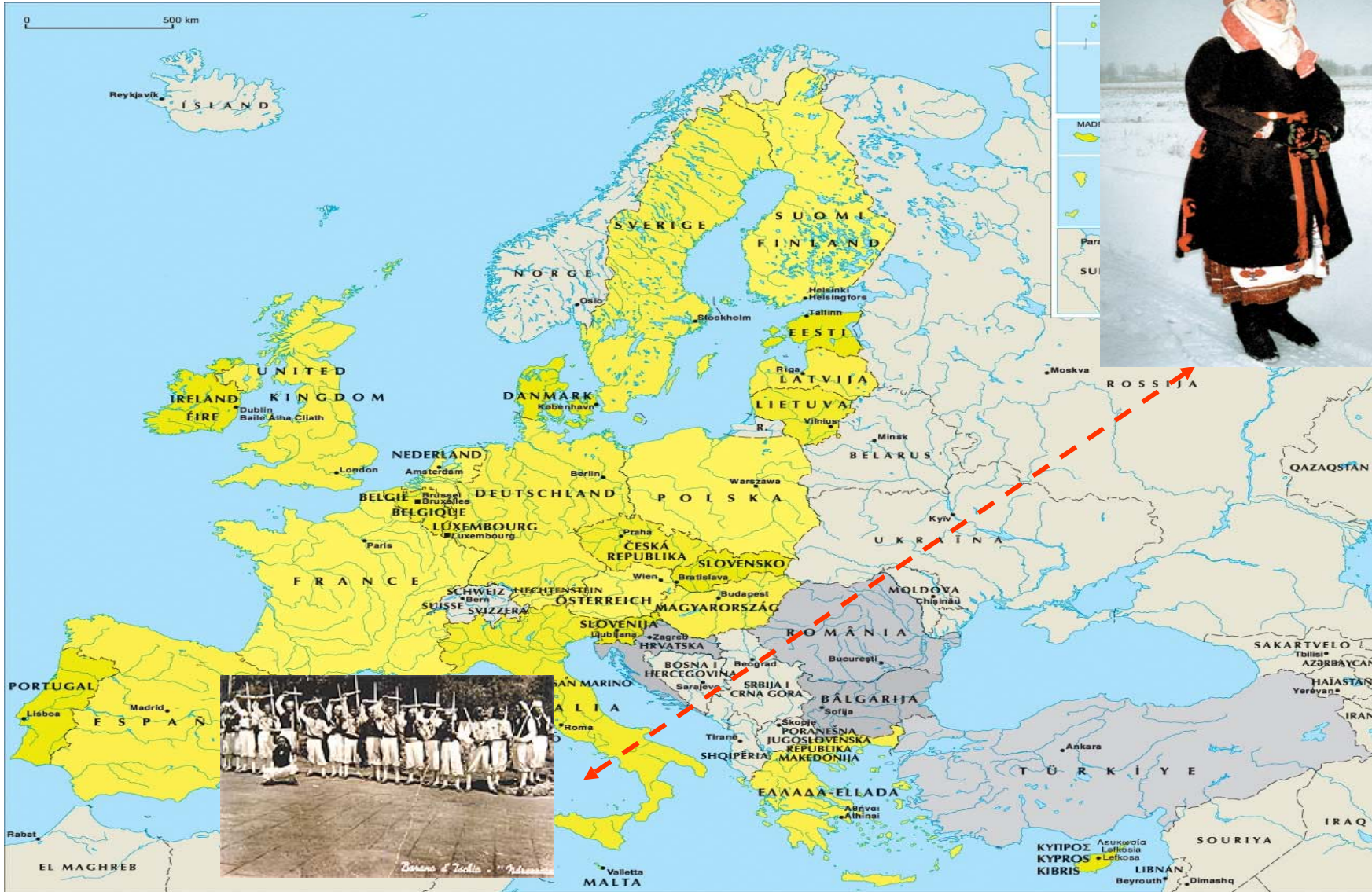
La mutazione VHL è endemica ad Ischia

Aplotipo

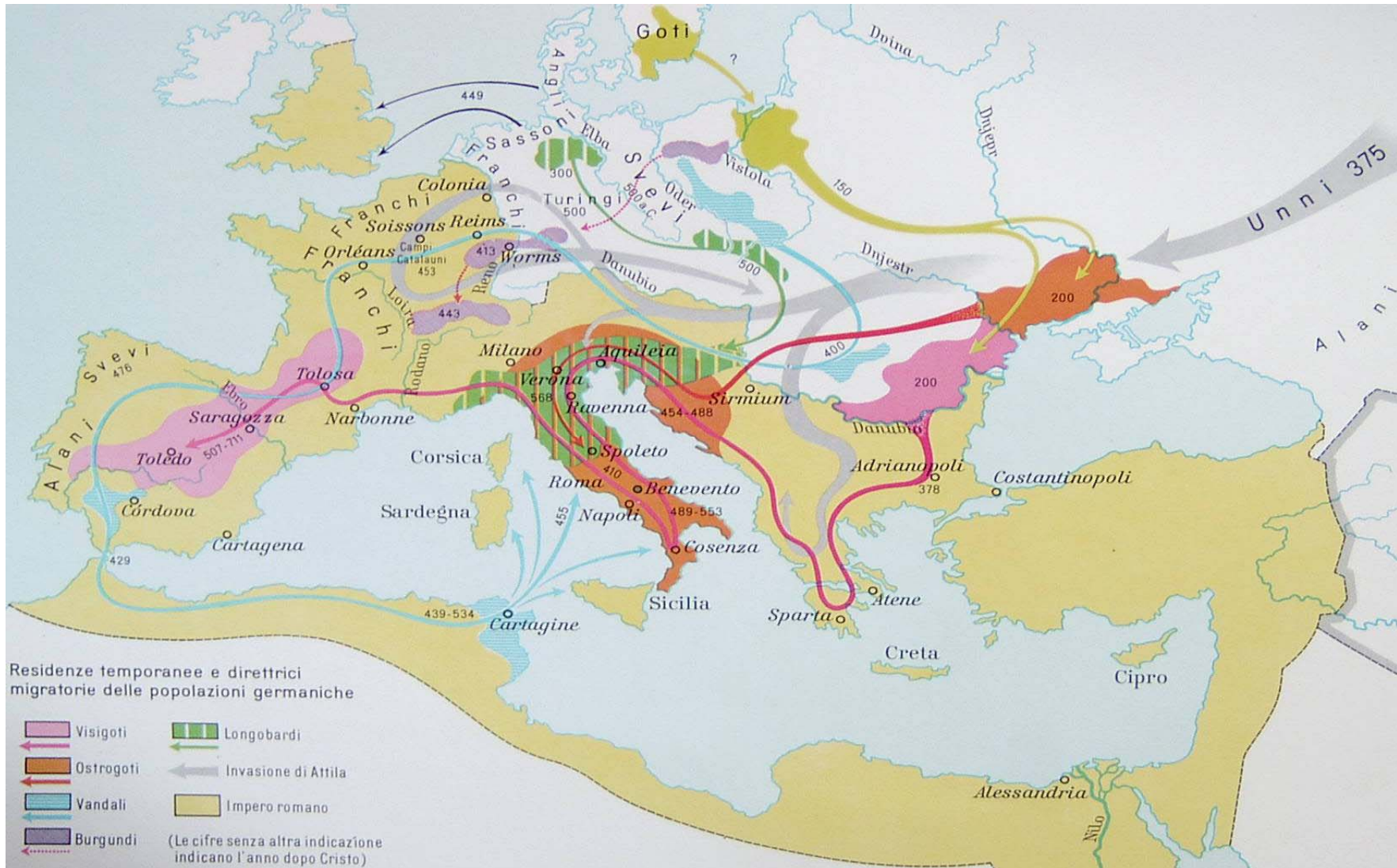
➤ I nostri pazienti presentano lo stesso aplotipo della popolazione Chuvash



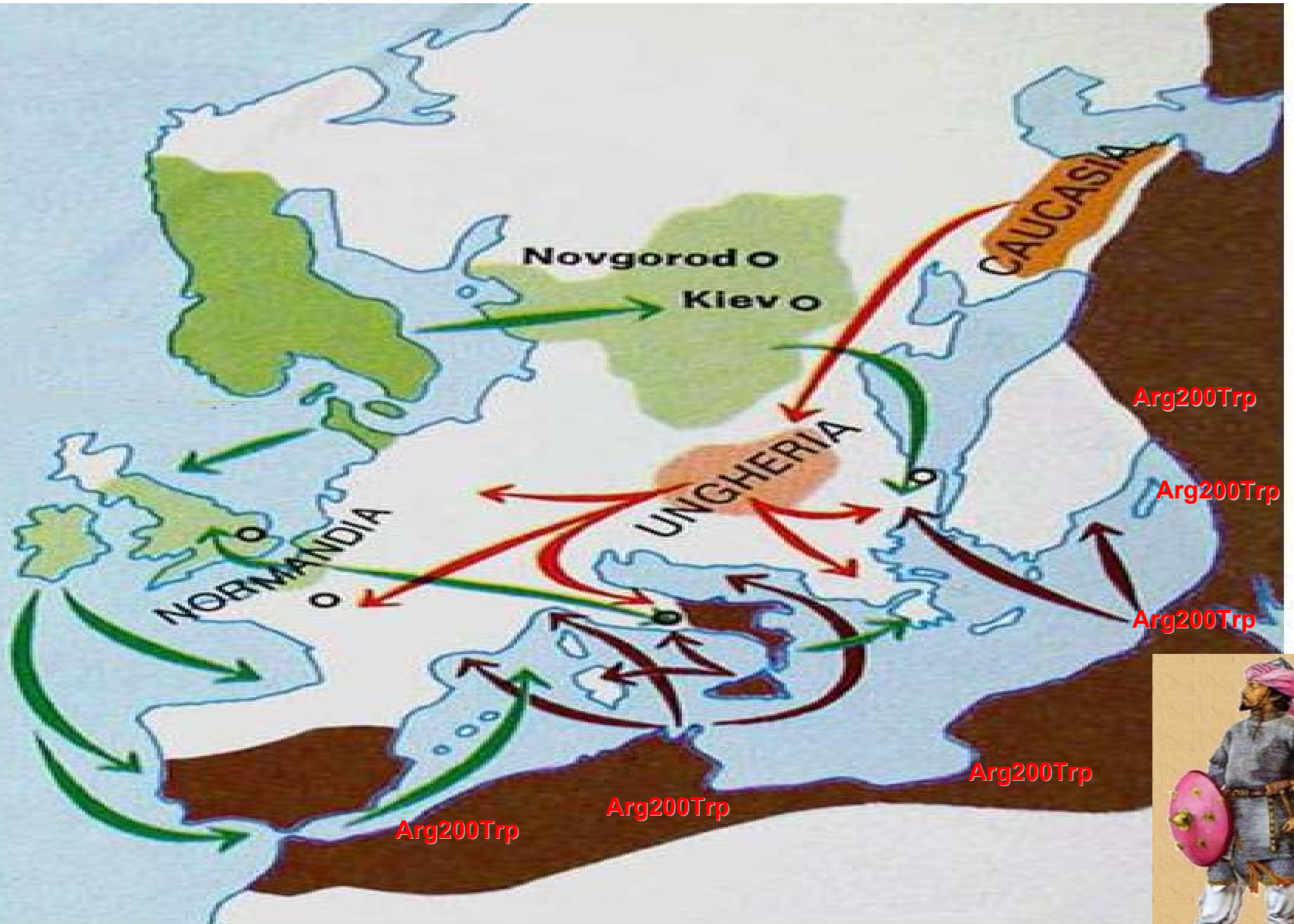
Evento fondatore



Invasioni barbariche (401-476)

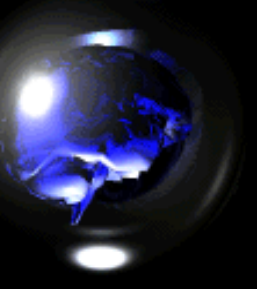


Incursioni Saracene del IX-X sec



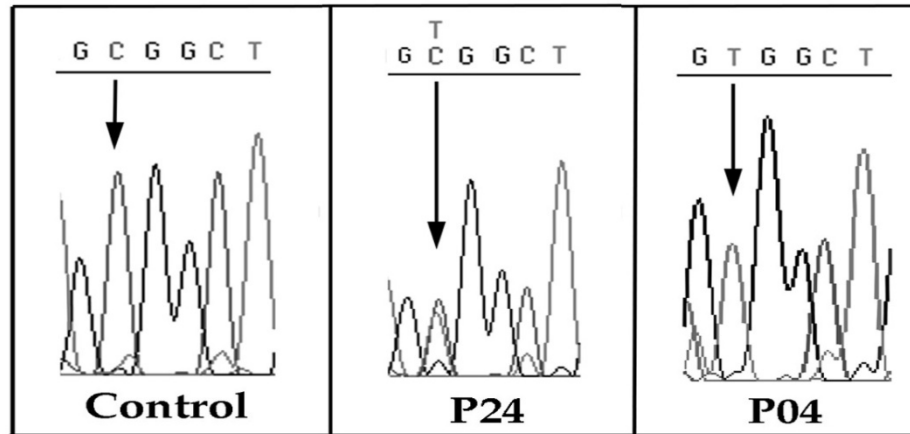
Heterozygotes could have some selective advantages that favor the spread and maintenance of the mutated allele

- Advantages in terms of iron metabolism, erythropoiesis and development.
- For instance, improved erythropoiesis could compensate for iron deficiency consequent to a fish-based diet.
- Moreover, a slight increase of HIF-1 α -regulated cytokines (VEGF) might be useful in such conditions as pre-eclampsia.
- Improved protection against bacterial infections (action bactericidal of neutrophils)

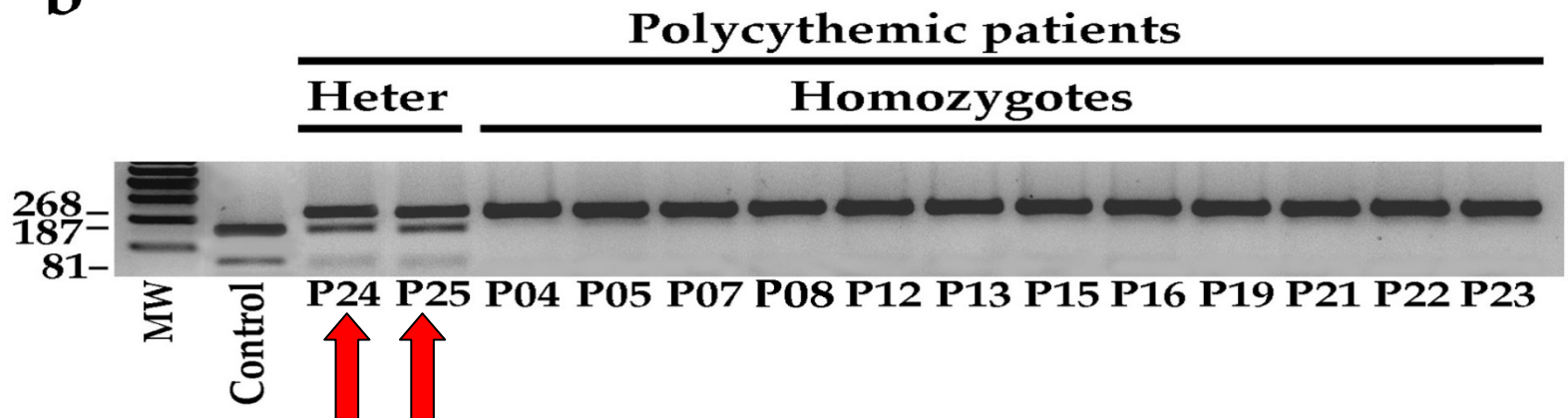


Gli Eterozigoti Malati

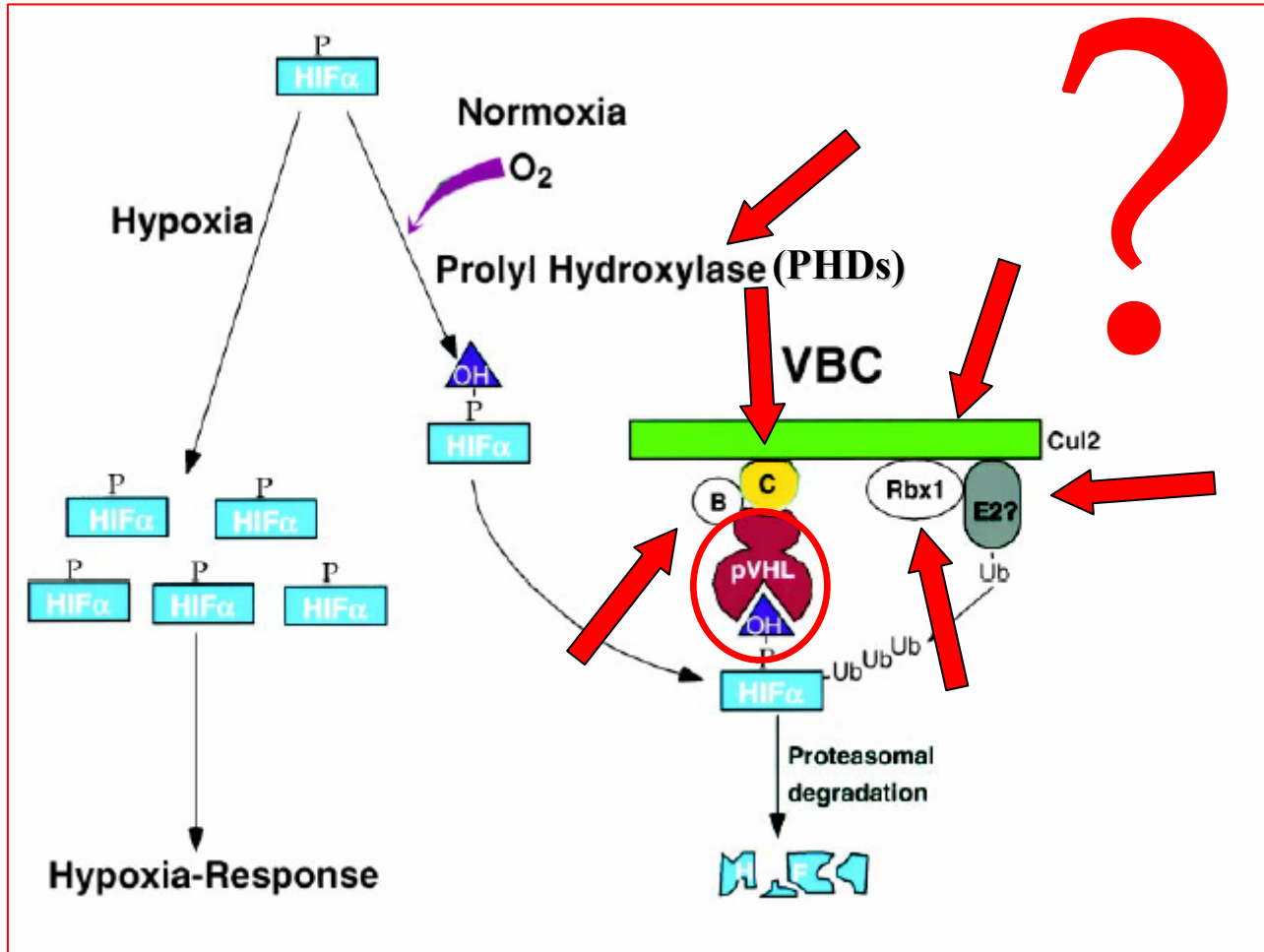
a

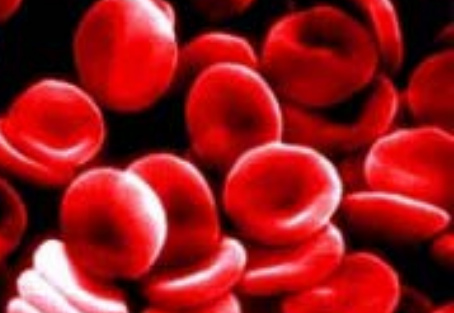


b



Oxygen-dependent polyubiquitination of Hypoxia-Inducible Factor α (HIF1 α) by pVHL





O' sanghe sarracino



Sindrome di Von Hippel-Lindau (VHL)

- **1/35.000**
- **Autosomica dominante**
- **Mutazione germinale + mutazione somatica**
- **Emangioblastoma della retina e del SNC**
- **Carcinoma renale**
- **Feocromocitoma**