



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Terapia Pediatrica e Farmacologia dello Sviluppo

Ciclo XXV

TITOLO TESI

Geni modificatori della Beta talassemia e sviluppo di un algoritmo
per la predizione della severità clinica

Settore Scientifico Disciplinare MED/01

Presentata da:

Dott.ssa Marcella Francavilla

Coordinatore Dottorato

Prof. Paolo Moi

Relatore

Prof. Paolo Moi

ESAME FINALE ANNO ACCADEMICO 2013 - 2014

...A Daniele, Francesca Maria e Marianna Carola con amore.

INDICE

INTRODUZIONE	4
L'emoglobina	4
La talassemia	5
Distribuzione geografica e prevalenza	6
Severità e fattori genetici	6
1. SCOPO DELLA TESI	7
2. MATERIALI E METODI	8
2.1 La popolazione studiata e il fenotipo clinico	8
2.2 Selezione dei marcatori genetici e genotipizzazione	10
2.3 Controlli di qualità e statistica descrittiva	12
2.4 Statistica inferenziale	13
2.5 Applicazione Web	14
3. RISULTATI	14
3.1 Controlli di qualità e statistica descrittiva	14
3.2 Statistica inferenziale	20
3.3 Applicazione Web	21
4. CONCLUSIONI E DISCUSSIONE	22
5. REFERENZE	25
6. RINGRAZIAMENTI	29

INTRODUZIONE

Le Talassemie sono un gruppo eterogeneo di patologie ereditarie che si trasmettono con modalità autosomica recessiva e trovano la loro causa in mutazioni sui geni che codificano le catene dell'emoglobina.

L'emoglobina

L'emoglobina è una proteina globulare tetramericata, costituita da quattro catene polipeptidiche (due coppie), legate ciascuna ad un gruppo prostetico detto *Heme*, al centro del quale si trova un atomo di ferro (Fig. 1). Attraverso il legame reversibile tra il ferro e l'ossigeno l'emoglobina svolge la funzione importantissima di trasportatore dell'ossigeno dai polmoni a tutto il corpo, attraverso il circolo sanguigno.

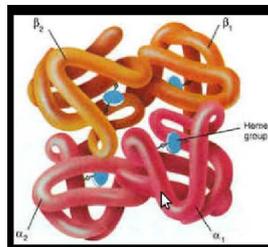


Fig. 1: La molecola di emoglobina dell'adulto (HbA2)

Nell'uomo esistono differenti molecole di emoglobina (Fig. 2).

- Le emoglobine embrionali, sono tre molecole diverse che si caratterizzano per il tipo di catene che le compongono: Gower I ($\zeta 2\epsilon 2$) e Gower II ($\alpha 2\epsilon 2$) e Portland ($\zeta 2\gamma 2$) e sono presenti in periodo embrionale;
- L'emoglobina Fetale (HbF) è costituita da due catene α e due γ ($\alpha 2\gamma 2$), è presente nel periodo fetale come emoglobina dominante e rimane in tracce (<1%) o in rari casi in proporzioni maggiori, per tutta la vita;
- l'emoglobina A (HbA) è costituita da due catene α e due catene β ($\alpha 2\beta 2$) ed è presente nell'adulto in concentrazione maggiore rispetto alle altre (96%);
- l'emoglobina A2 (HbA2) è costituita da due catene α e due catene δ ($\alpha 2\delta 2$) ed è presente nell'adulto in quantità limitata (<3%).

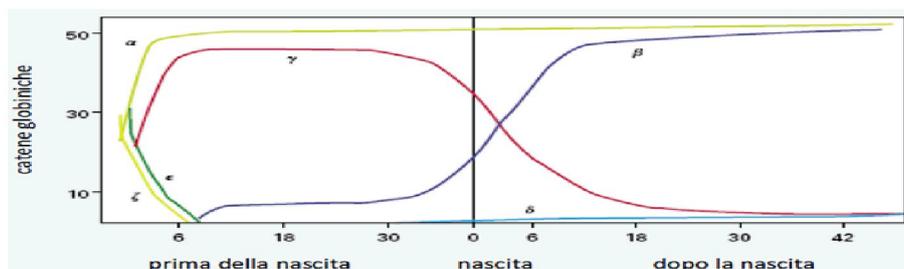


Fig.2: Modificazioni del tipo di emoglobina durante lo sviluppo prenatale e postnatale

Le catene emoglobiniche umane sono espresse in percentuale di emoglobina sul totale

I geni strutturali, responsabili della produzione delle catene globiniche sono localizzati nel braccio corto del cromosoma 11 (11p15.5), per le catene beta simili e nel braccio corto del cromosoma 16 (16p13.3), per le catene di tipo Alfa (Fig. 3).

In particolare i geni dell'emoglobina adulta (HbA) sono localizzati nelle posizioni chr16:226679-227520 per *HBA1* (catene Alfa 1), chr16:222846-223709 per *HBA2* (catene Alfa 2), chr11:5246696-5248301 per *HBB* (catene beta) (1, 2, 3).

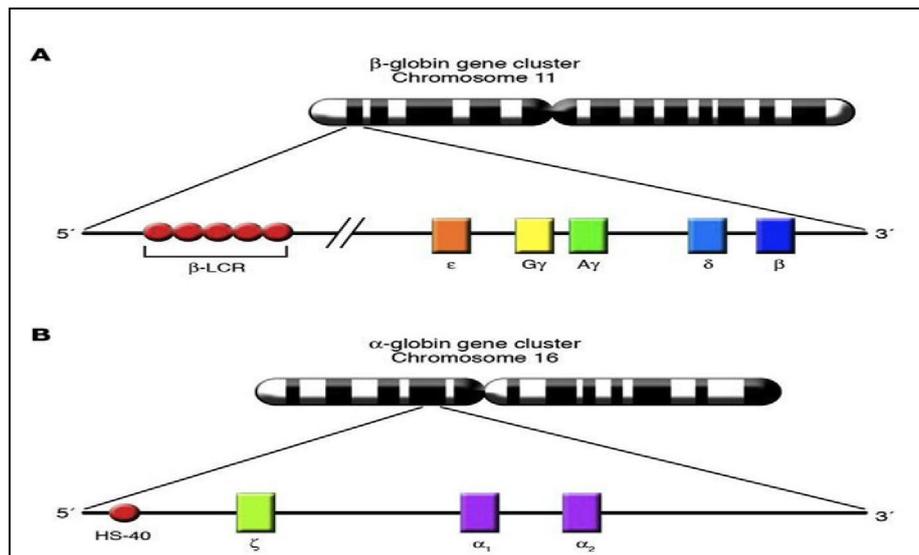


Fig. 3: Raffigurazione schematica della disposizione dei geni globinici sui cromosomi 11 e 16.

Nel cromosoma 11 sono localizzati i geni beta simili (ε, γ, δ, β), nel cromosoma 16 sono localizzati i geni Alfa simili (ζ, α₁, α₂).

La talassemia

In presenza di due mutazioni sui geni globinici, e in funzione del tipo di gene globinico interessato, si osservano le varie sindromi talassemiche. La beta talassemia si presenta con mutazioni, su entrambi i cromosomi omologhi, del gene *HBB*.

Le mutazioni identificate fin'ora, sono 839 (4) e comprendono principalmente sostituzioni, inserzioni e delezioni che provocano alterazioni a tutti i livelli della sintesi delle catene globiniche. Come conseguenza si possono avere catene funzionali, non funzionali o con funzionalità ridotta. Le prime mutazioni non sono patologiche, le seconde e le terze danno origine all'alterazione della sintesi delle catene Beta globiniche e quindi dell'emoglobina. Quando la quantità è ridotta si parla di b⁺ talassemie, quando è assente di b⁰ talassemie. Negli eritroblasti inoltre la presenza di catene Alfa in eccesso, determina la formazione di aggregati altamente tossici che precipitano all'interno dei globuli rossi e costituiscono un fattore critico nella patofisiologia della Beta talassemia (3, 5).

Distribuzione geografica e prevalenza

La Beta talassemia è presente principalmente fra le popolazioni di origine mediterranea, africana e asiatica (Fig. 4) e in alcune regioni (come la Sardegna) la sua diffusione è endemica per la presenza in passato, nelle stesse zone geografiche, della malaria. Infatti il portatore eterozigote per la Beta talassemia, ha una protezione nei confronti del *Plasmodium falciparum* (agente di trasmissione malarico) rispetto all'individuo sano.

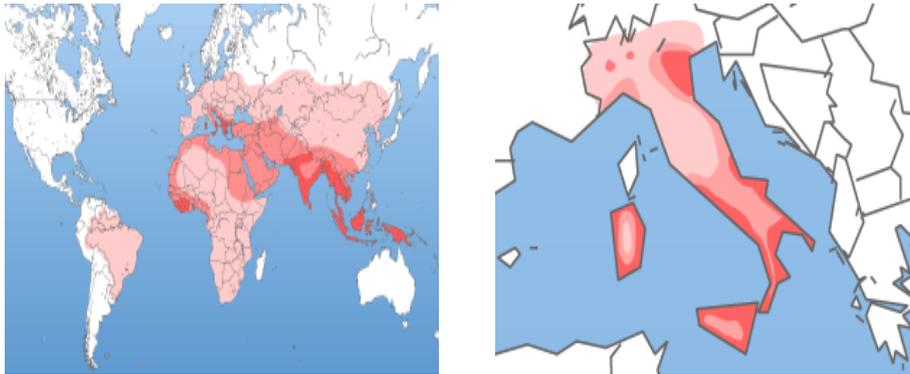


Fig. 4: La distribuzione geografica della Beta talassemia nel mondo
(ANMI ONLUS Centro studi Microcitemie ROMA)

In Italia la prevalenza dei portatori sani di Beta talassemia varia dal 2.4 % nel Lazio al 12.9 % in Sardegna. Quest'ultima, avendo un così elevato numero di portatori sani (300000 circa su 1.6 milioni) è la regione italiana a più elevato rischio con 1:8 individui portatori (2).

Nonostante il numero elevato di mutazioni Beta globiniche fin'ora note, ogni regione geografica presenta delle peculiari mutazioni con frequenza maggiore, fino ad arrivare alla quasi esclusività di un'unica mutazione causativa, in regioni con elevato grado di omogeneità genetica, come la Sardegna, dove gli individui malati sono nella quasi totalità portatori della mutazione Beta^{°39}. Nei due centri sardi inseriti nello studio infatti la percentuale varia dal 85% al 90%.

Severità e fattori genetici

Oltre all'elevato numero di mutazioni esistenti sul gene *HBB* descritte finora, che determinano la produzione ridotta o assente delle catene Beta, in base al tipo di mutazione (lieve o severa), esiste una variabilità interindividuale in soggetti talassemici che presentano le stesse mutazioni. Questo ha portato nel tempo a ricercare varianti genetiche, su geni alternativi ad *HBB*, che potessero influenzare la severità clinica della patologia.

Sono stati così identificati numerosi determinanti genetici che contribuiscono effettivamente a migliorare il fenotipo Beta talassemico, esercitando il loro effetto in modi diversi ma riducendo sostanzialmente la quantità di catene Alfa globiniche in eccesso.

I principali meccanismi che influenzano la severità clinica si possono riassumere nei tre gruppi seguenti:

- Associazione di mutazioni sui geni *HBB* di diversa entità:
le mutazioni sui cromosomi omologhi possono essere entrambe severe, lievi o silenti o di gravità diversa. Questo modifica la severità del fenotipo.
- Mutazioni dei geni Beta e Alfa insieme:
La coeredità di una mutazione in omozigosi sui geni Beta globinici e di una mutazione sui geni Alfa globinici riduce la produzione di catene Beta e Alfa, riducendo così lo squilibrio fra catene Alfa e non Alfa.
- Modificatori in cis o in trans della produzione di catene gamma [*Xmnl* (cis), *BCL11A* (trans) e *HBS1L-MYB* (trans)]:
La coeredità di Beta talassemia e di determinanti genetici che favoriscono la produzione di emoglobina fetale (HbF) nella vita adulta può far variare sensibilmente il fenotipo (6, 7).

Il tipo di mutazioni sui geni *HBB* e *HBA1*, *HBA2* sono ampiamente studiate e la genotipizzazione di *Xmnl*, cis modificatore della produzione di catene Gamma globiniche (*HBG2*: *g.-158C > T* polimorfismo) viene effettuata da tempo nella maggior parte dei centri che si occupano di pazienti talassemici (8, 9). Inoltre, l'era degli studi di associazione Genome-Wide ha notevolmente contribuito alla recente identificazione di regioni di DNA che agiscono sulla produzione di emoglobina fetale come il gene *BCL11A* e la regione intergenica di *HBS1L-MYB*. (10-15).

Precedenti studi hanno dimostrato il contributo che modificatori genetici noti hanno dato alla classificazione fenotipica di talassemia Major e Intermedia, e hanno dimostrato come effettivamente una grande percentuale del fenotipo malattia sia determinato geneticamente (16,17). Questa condizione rende la Beta talassemia una delle poche malattie monogeniche con presentazione clinica complessa, accuratamente prevedibile su base genetica, e questo tipo di studio potrebbe in futuro essere precursore di altri studi sulla predizione genetica applicata alla clinica di altre patologie.

1. SCOPO DELLA TESI

Lo sviluppo di questo lavoro deriva da un articolo pubblicato nel 2014 sulla rivista *Haematologica* (Danjou F, Francavilla M, et al. *A genetic score for the prediction of Beta-thalassemia severity*) risultato dall'estensione di un precedente studio sulla popolazione sarda (18). Esso aveva lo scopo di creare uno strumento di ausilio efficace, su base genetica e statistica, per personalizzare la cura e gestione del paziente Beta talassemico.

Lo studio è stato realizzato su una coorte internazionale di 890 pazienti Beta Talassemici altamente differenziata dal punto di vista genetico. Esso si basa sul contributo di sette marcatori genetici, noti dalla letteratura scientifica come influenti sulla severità della Beta talassemia. In particolare è stato creato un modello predittivo di severità, attraverso la realizzazione di un algoritmo di predizione, che si serve di tali marcatori.

La severità è stata valutata come l'età di inizio delle trasfusioni regolari. Infatti si è riscontrato che tale parametro descrive il quadro clinico della malattia in modo più preciso rispetto allo status di talassemia Major e Intermedia (18).

Dopo la realizzazione del modello, e affinché lo stesso potesse essere fruibile in modo semplice e versatile ad un pubblico più ampio possibile, è stata realizzata un'applicazione Web gratuita e liberamente accessibile, in cui possono essere inseriti i genotipi dei marcatori genetici di un generico paziente e da cui viene calcolato uno score predittivo di gravità della Beta talassemia: il TSS (Thalassemia Severity Score). Tale score, che va da 0 a 10, è diviso in quattro categorie di gravità ed è direttamente proporzionale alla severità della patologia.

I principali fruitori di questa ricerca sono i pazienti adulti e pediatrici già sottoposti a terapia trasfusionale regolare (TDT) o non ancora trasfusi regolarmente (NTDT).

- Sui primi vi possono essere dei vantaggi in merito ad una migliore gestione della patologia;
- Sui secondi può essere effettuata la previsione dell'inizio delle trasfusioni e valutata in modo più accurato la necessità di effettuare il trapianto da cellule staminali eritropoietiche.

Infatti, sebbene tutte le manifestazioni cliniche della malattia possono richiedere quattro o cinque anni di vita prima di stabilizzarsi, il trapianto ha maggiori possibilità di attecchire se effettuato in un'età molto precoce (specialmente se effettuato da cordone ombelicale). In questa situazione l'abilità di prevedere in anticipo il fenotipo malattia, sarebbe di estrema importanza per il buon esito del trapianto e la guarigione.

2. MATERIALI E METODI

2.1 La popolazione studiata e il fenotipo clinico

La popolazione studiata è costituita da 890 pazienti Beta Talassemici, sia major che intermedi, con diverse mutazioni causative, provenienti da quattro centri microcitemici internazionali e due sardi: l'Ospedale San Luigi Gonzaga di Torino, il Centro di Ematologia per le Microcitemie e anomalie congenite Ospedale Galliera di Genova, il Centro di riferimento francese per la

talassemia di Marsiglia e l'Ospedale Universitario di Malta, il Dipartimento di Clinica Pediatrica II dell'Ospedale regionale per le Microcitemie di Cagliari e il Day Hospital Ematologia Adulti del medesimo Ospedale.



Ospedale regionale per le Microcitemie – Clinica Pediatrica II
Ospedale regionale per le Microcitemie – Day Hospital Ematologia Adulti



University of Torino



Ematologia - Centro Microcitemia e Anemie Congenite,
Ospedale Galliera, Genova, Italy



French ref. Center for Thalassemia
Assistance Publique Hopitaux de Marseille- France



Laboratory of Molecular Genetics, Department of Physiology
and Biochemistry, University of Malta

I dati relativi al programma di trasfusioni dei pazienti sono stati raccolti attraverso la banca dati di cartelle computerizzate WebTHAL (Fig. 5, <http://www.thalassemia.it>), in uso per la gestione quotidiana dei pazienti, nei centri italiani; e attraverso la trasmissione diretta dei dati per gli altri due centri esteri.



Fig. 5: La pagina Web THAL accessibile per il reperimento dei dati relativi al programma trasfusionale dei pazienti in cura nei centri microcitemici italiani

Il fenotipo necessario per l'inizio della terapia trasfusionale è stato individuato mediante un criterio standard, che prevedeva l'inizio delle trasfusioni con livelli di emoglobina inferiore a 7 g/dl per più di due settimane in assenza di infezioni, l'ingrossamento da moderato a grave della milza, alterazioni scheletriche iniziali e scarsa crescita.

La definizione di "paziente regolarmente trasfuso" (TDT) è stata utilizzata per individui sottoposti a più di otto trasfusioni di sangue ogni anno, e di "paziente non regolarmente trasfuso" per pazienti non trasfusi o soggetti a trasfusioni irregolari.

Questo studio retrospettivo è stato condotto in conformità con la Dichiarazione di Helsinki e tutti i pazienti hanno firmato il consenso informato per l'analisi del DNA e il loro uso a scopo di ricerca.

2.2 Selezione dei marcatori genetici e genotipizzazione

I marcatori genetici utilizzati sono stati: il gene Beta globinico (*HBB*), le mutazioni sui geni Alfa globinici (*HBA1* e *HBA2*) insieme al numero di tali mutazioni, il polimorfismo *HBB*: *g.-158C>T*, uno SNP nella regione intergenica *HBS1L-MYB* (rs9399137) e due SNPs localizzati nel secondo introne del gene *BCL11A* (rs1427407 e rs10189857) (Fig. 6).

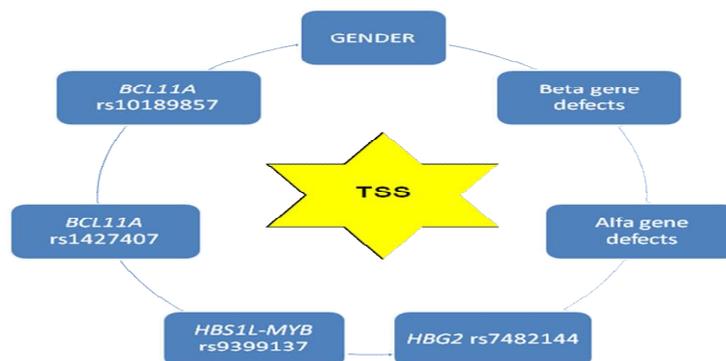


Fig. 6: I marcatori genetici utilizzati nello studio per la realizzazione dello score di severità della Beta talassemia (TSS)

Tali marcatori sono, in letteratura, fortemente associati alla severità della Beta talassemia e ai livelli di emoglobina fetale. Infatti influenzano, in maniera indipendente, i livelli di HbF e alcuni di loro migliorano il fenotipo Beta talassemico; per tale motivo sono considerati veri e propri predittori genetici (10, 18, 19-25).

- ***HBB***:

È il gene che sintetizza le catene Beta globiniche, e che, se mutato in entrambi i cromosomi, determina l'inattivazione parziale o completa della loro espressione responsabile della malattia. Questo comporta lo squilibrio del rapporto fra catene Beta e catene Alfa e quindi determina la forma lieve o severa della Beta talassemia.

- *HBA1, HBA2:*

Sono i geni che sintetizzano le catene Alfa globiniche. In funzione delle loro mutazioni, e quindi della capacità di produrre o meno catene Alfa globiniche il fenotipo clinico può variare. In presenza di ridotta produzione di catene Alfa contemporaneamente alle catene Beta, il fenotipo clinico migliora in quanto non si hanno tutti gli effetti negativi dovuti alla produzione eccessiva di catene Alfa globiniche libere e alla loro precipitazione all'interno dei globuli rossi, con gli effetti tossici correlati.

I difetti sul gene Alfa-globinico considerati sono stati: delezione 3,7 kb di tipo I, II e III [NG_000006.1: g.34164_37967del3804, HbVar id: 1078 e 1079, rispettivamente], delezione 4.2 kb [id HbVar: 1079], delezione Mediterranea di tipo I [NG_000006.1: g.24664_41064del16401], grande delezione di 20.5 kb [NG_000006.1: g.15164_37864del22701], la piccola delezione HphI [*HBA2*: C.95+2_95+6delTGAGG] e la mutazione NcoI [*HBA2*: c.2T>C].

- *HBG2, rs7482144:*

E' un sito di restrizione XmnI localizzato sul cromosoma 11 in posizione 5276169 bp, 158 paia di basi (bp) a monte del gene *HBG2*. Questo polimorfismo (*HBG2*:g.-158C>T), è associato da molto tempo ad un aumento di produzione di emoglobina fetale (HbF) con la conseguenza di migliorare il fenotipo Beta talassemico e dell'anemia falciforme in quanto riduce la presenza di catene Alfa globiniche libere (26, 27, 28).

- *HBS1L-MYB, rs9399137:*

Questo polimorfismo è localizzato sul cromosoma 6 in posizione 135419018 bp, nella regione intergenica del gene *HBS1L-MYB*. E' stato associato in diverse popolazioni ad aumentati livelli di emoglobina fetale (29, 30, 31). Tale SNP si trova in linkage disequilibrium completo con la delezione di tre paia di basi rs66650371, situata in prossimità di quattro siti di legame per fattori di trascrizione eritropoietici, associati funzionalmente ai livelli di HbF (32).

- *BCL11A, rs1427407:*

Si trova all'interno dell'introne 2 sul gene *BCL11A* del cromosoma 2 in posizione 60718043 bp. Tale variante è nota in diversi studi basati sull'intero genoma (Genome Wide Association Study) per la sua alta associazione con i livelli di HbF. Inoltre è in alto linkage disequilibrium con l'rs766432 e l'rs4671393 ($r^2=0.96$ e $r^2=0.92$ rispettivamente dai dati del 1000 Genome Project sulla popolazione caucasica). Queste due ultime varianti sono anch'esse strettamente correlate ai livelli di HbF secondo diversi lavori scientifici (29, 33, 34).

- *BCL11A*, rs10189857:

È localizzato dentro l'introne 2 del gene *BCL11A*, sul cromosoma 2 in posizione 60713235 bp. Si trova in completo linkage disequilibrium con la variante rs7599488, nel database pubblico di 1000 Genome Project in riferimento alla popolazione caucasica e, secondo una ben documentata letteratura scientifica (31, 35) ha un effetto additivo indipendente sui livelli di HbF rispetto allo SNP rs1427407.

Per ogni paziente è stato effettuato un prelievo di sangue venoso, da cui, attraverso metodi standard, è stato estratto il DNA (Fig. 7).



Fig. 7: Dal prelievo di sangue venoso si ottiene il DNA genomico, da cui si possono genotipizzare i diversi geni e SNPs.

L'analisi di mutazione del gene Beta globinico è stata effettuata mediante il sequenziamento diretto del gene. I difetti sui geni Alfa-globinici considerati sono stati indagati mediante GAP-PCR (le grandi delezioni), e per digestione mediante enzimi di restrizione (le altre mutazioni) (25). Il polimorfismo *HBG2*: g.-158C> T (rs7482144) è stato determinato come descritto in precedenza (36), mentre gli altri SNPs sono stati genotipizzati direttamente mediante il saggio di genotipizzazione degli SNPs con TaqMan (Applied Biosystems, Warrington, UK).

2.3 Controlli di qualità e statistica descrittiva

Tutti i dati relativi ai pazienti dei diversi centri sono stati riuniti in un unico dataset, il quale è stato sottoposto a numerosi e accurati controlli di qualità.

Tra questi il controllo di coerenza, la standardizzazione della nomenclatura, l'uniformazione delle variabili, l'analisi di pattern nei valori mancanti, la ricerca dei dati incompleti fra i vari dipartimenti di ematologia e la correzione dei dati non attendibili, l'eliminazione dei dati incompleti che non si sono potuti recuperare o correggere.

Sul campione ripulito è stata effettuata l'analisi di statistica descrittiva, che ha permesso di conoscere tutti i dati a disposizione e descriverli in modo strutturato.

Tutte le analisi statistiche sono state condotte utilizzando la versione SPSS 20.0 pacchetto software (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Il sesso è stato codificato 0 nelle femmine e 1 nei maschi. Le mutazioni del gene *HBB* sono state codificate in base alla loro gravità, come riportato in letteratura

(<http://globin.bx.psu.edu/hbvar>) in mild/mild=1 (lieve/lieve), mild/severe=2 (lieve/grave) e severe/severe=3 (grave/grave). I difetti dei geni *HBA1* e *HBA2* sono stati classificati come 0, 1 o 2 a seconda del numero di copie delete o mutate dei geni alfa (rispettivamente 0,1,o 2). Per ogni SNP, infine, è stata definita una variabile con il valore di 0, 1 o 2 in riferimento al numero di copie dell' allele meno frequente (vedi tabella 1 per i dettagli).

2.4 Statistica inferenziale

Sull'intera coorte è stata effettuata l'analisi statistica inferenziale che ha permesso di dedurre informazioni sulla popolazione generale di Beta talassemici.

Per tale scopo il campione disponibile, è stato suddiviso in modo casuale in due set: uno di training (71% dell'intero dataset) e uno di testing (il restante 29%). Il primo è stato utilizzato per costruire un modello di rischio proporzionale di Cox per l'età d'inizio delle trasfusioni regolari, mediante l'utilizzo dei marcatori genetici come predittori. Da esso è stato elaborato un algoritmo di predizione della severità della Beta talassemia mediante la realizzazione di uno score chiamato *Thalassemia Severity Score (TSS)*.

Il secondo set, di testing, è stato utilizzato successivamente per verificare l'abilità predittiva del modello, mediante l'analisi dei rischi proporzionali di Cox, l'analisi di sopravvivenza di Kaplan-Meier e le le curve ROC per la previsione dello status TDT-NTDT.

La scelta del modello di rischio proporzionale di Cox è stata fatta perché, in pazienti Beta talassemici, la morte per qualsiasi causa è un evento che entra in concorrenza in modo insignificante riguardo all'inizio delle trasfusioni regolari. Per tale analisi di sopravvivenza, il centro da cui proveniva ogni paziente è stato utilizzato come variabile di stratificazione, i pazienti sono stati considerati "incensurati" se venivano sottoposti a trasfusioni regolari di sangue (TDT) e "censurati" se non sottoposti a trasfusioni regolari (NTDT), e tutte le variabili sono state trattate come categoriche.

Sono stati riportati l'R² di Cox e Snell e l'indice di concordanza di Harrell (C-index), per valutare il grado di adattamento del modello ai dati sperimentali.

Dopo l'elaborazione del modello di Cox, i parametri sono stati usati per realizzare uno score predittivo di uso più semplice (una scala di severità da 0 a 10) chiamato *talassemia Severity Score (TSS)* e ottenuto nel modo seguente:

Il calcolo del LPS (score di predizione lineare) è stato ottenuto dalla somma dei logaritmi naturali degli HR di ogni marcatore per ogni individuo (tab3) (le categorie di riferimento hanno HR =1) come segue:

$$\text{LPS} = \sum \ln (\text{HR valore dei genotipi})$$

Successivamente i valori di LPS sono stati standardizzati in uno score di severità da 0 a 10 (TSS) nel seguente modo:

$$\text{TSS} = (9.5 + \text{LPS})^6 / 80000$$

L'accuratezza della predizione dello score è stata verificata anch'essa sul testing set.

2.5 Applicazione Web

All'interno del progetto è stata realizzata un'applicazione Web chiamata TSS Web-tool (Thalassemia Severity Score Web-tool), accessibile gratuitamente dal sito <http://tss.unica.it>, e disponibile per qualunque utente.

Tale applicazione permette di calcolare il TSS di un generico paziente Beta talassemico mediante l'inserimento genotipico dei sei marcatori genetici usati nello studio, ad esso riferiti e il sesso come di seguito elencati:

- il genotipo dei quattro SNP presenti nello studio:
 - rs7482144;
 - rs9399137;
 - rs1427407;
 - rs10189857.
- il numero di mutazioni sui geni Alfa globinici (nessuna mutazione, una o due mutazioni);
- il fenotipo Beta riferito ai singoli cromosomi omologhi (lieve/lieve, lieve/severo, severo/severo);
- il sesso.

Subito dopo aver inserito i dati, l'applicazione calcola lo score di predizione della severità della Beta talassemia, mediante il valore del TSS e la curva di sopravvivenza corrispondente.

Le curve di sopravvivenza osservabili sono quattro, fra loro significativamente diverse; esse offrono una presentazione grafica della previsione e valutano la probabilità di entrare in trasfusioni in funzione dell'età del paziente.

3. RISULTATI

3.1 Controllo di Qualità e statistica descrittiva

Dall'eliminazione dei dati non attendibili o incompleti sono stati rimossi 31 pazienti, e la coorte finale di studio è risultata composta da 859 individui.

I dati ad essi relativi, riuniti nell'unico dataset, erano composti dal 49.9% di maschi e dal 50.1% di femmine. Inoltre l'11,76% degli individui risultavano non regolarmente trasfusi (NTDT) e l'88.24% regolarmente trasfusi (TDT) (Fig. 8, 9).

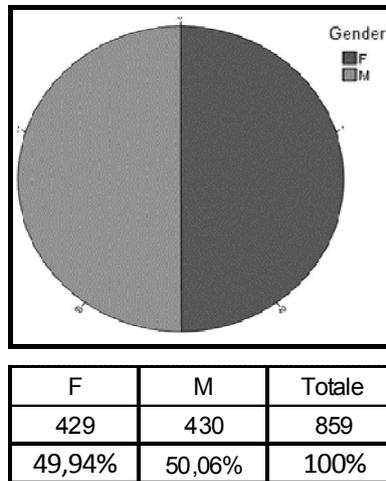


Fig. 8: La distribuzione del sesso nei pazienti nella Coorte

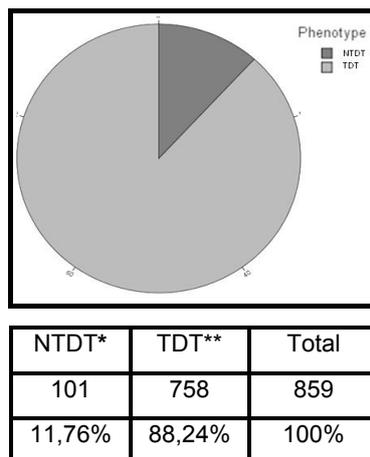


Fig. 9: La distribuzione del fenotipo nei pazienti nella Coorte

*NTDT = Individui non regolarmente trasfusi, TDT** = individui regolarmente trasfusi (minimo 8 trasfusioni/ anno)

Nell'insieme sono state osservate 45 diverse mutazioni causative della Beta talassemia e 65 genotipi Beta talassemici differenti (Fig. 10).

	CLASSIC NAME	INTERNATIONAL NAME (HGVS)
1	Codon39(C->T)/Codon39(C->T)	HBB:c.118C>T/HBB:c.118C>T
2	IVS-I-110(G->A)/Codon39(C->T)	HBB:c.93-21G>A/HBB:c.118C>T
3	IVS-I-6(T->C)/Codon39(C->T)	HBB:c.92+6T>C/HBB:c.118C>T
4	Codon6(-A)/Codon39(C->T)	HBB:c.20delA/HBB:c.118C>T
5	IVS-I-110(G->A)/IVS-I-110(G->A)	HBB:c.93-21G>A/HBB:c.93-21G>A
6	IVS-I-1(G->T,A)/Codon39(C->T)	HBB:c.92+1G>T,A/HBB:c.118C>T
7	IVS-I-6(T->C)/IVS-I-6(T->C)	HBB:c.92+6T>C/HBB:c.92+6T>C
8	IVS-I-110(G->A)/IVS-I-6(T->C)	HBB:c.93-21G>A/HBB:c.92+6T>C
9	IVS-I-110(G->A)/IVS-I-1(G->T,A)	HBB:c.93-21G>A/HBB:c.92+1G>T,A
10	Codon76(-C)/Codon39(C->T)	HBB:c.230delC/HBB:c.118C>T
11	IVS-I-6(T->C)/IVS-I-1(G->T,A)	HBB:c.92+6T>C/HBB:c.92+1G>T,A
12	-87(C->A,G,T)/Codon39(C->T)	HBB:c.-137C>A,G,T/HBB:c.118C>T
13	IVS-I-1(G->T,A)/IVS-I-1(G->T,A)	HBB:c.92+1G>T,A/HBB:c.92+1G>T,A
14	IVS-I-6(T->C)/IVS-II-1(G->C,A,T)	HBB:c.92+6T>C/HBB:c.315+1G>C,A,T
15	IVS-I-110(G->A)/IVS-II-745(C->G)	HBB:c.93-21G>A/HBB:c.316-106C>G
16	Codon6(-A)/Codon6(-A)	HBB:c.20delA/HBB:c.20delA
17	IVS-II-745(C->G)/Codon39(C->T)	HBB:c.316-106C>G/HBB:c.118C>T
18	deltabeta0/Codon39(C->T)	NG_000007.3:g.51483_165148del113666,NG_000007.3:g.60375_153285del92911,NG_000007.3:g.(60530_60730)_ (72351_72551)del11822,NG_000007.3:g.64336_77738del13403/HBB:c.118C>T
19	IVS-I-110(G->A)/Codon6(-A)	HBB:c.93-21G>A/HBB:c.20delA
20	-101(C->T)/Codon39(C->T)	HBB:c.-151C>T/HBB:c.118C>T
21	IVS-II-1(G->C,A,T)/Codon39(C->T)	HBB:c.315+1G>C,A,T/HBB:c.118C>T
22	IVS-II-1(G->C,A,T)/Codon44(-C)	HBB:c.315+1G>C,A,T/HBB:c.135delC
23	HbE/Codons4142(-TTCT)	HBB:c.79G>A/HBB:c.126_129delCTTT
24	IVS-I-1(G->T,A)/IVS-II-1(G->C,A,T)	HBB:c.92+1G>T,A/HBB:c.315+1G>C,A,T
25	IVS-I-1(G->T,A)/IVS-II-745(C->G)	HBB:c.92+1G>T,A/HBB:c.316-106C>G
26	IVS-I-2(T->G,A,C)/Codon6(-A)	HBB:c.92+2T>G,A,C/HBB:c.20delA
27	IVS-I-2(T->G,A,C)/IVS-I-2(T->G,A,C)	HBB:c.92+2T>G,A,C/HBB:c.92+2T>G,A,C
28	IVS-I-6(T->C)/Codon6(-A)	HBB:c.92+6T>C/HBB:c.20delA
29	IVS-I-6(T->C)/IVS-II-745(C->G)	HBB:c.92+6T>C/HBB:c.316-106C>G
30	IVS-I-110(G->A)/Codon44(-C)	HBB:c.93-21G>A/HBB:c.135delC
31	IVS-I-110(G->A)/IVS-II-654(C->T)	HBB:c.93-21G>A/HBB:c.316-197C>T
32	-87(C->A,G,T)/-87(C->A,G,T)	HBB:c.-137C>A,G,T/HBB:c.-137C>A,G,T
33	-29(A->G)/-29(A->G)	HBB:c.-79A>G/HBB:c.-79A>G
34	Codons36/37(-T)/Codons36/37(-T)	HBB:c.112delT/HBB:c.112delT
35	Codon5(-CT)/Codon39(C->T)	HBB:c.17_18delCT/HBB:c.118C>T
36	Codon5(-CT)/Codon5(-CT)	HBB:c.17_18delCT/HBB:c.17_18delCT
37	Codon8(-AA)/Codon8(-AA)	HBB:c.25_26delAA/HBB:c.25_26delAA
38	IVS-II-1(G->C,A,T)/Codon8(-AA)	HBB:c.315+1G>C,A,T/HBB:c.25_26delAA
39	IVS-II-745(C->G)/IVS-II-745(C->G)	HBB:c.316-106C>G/HBB:c.316-106C>G
40	IVS-II-654(C->T)/Codon39(C->T)	HBB:c.316-197C>T/HBB:c.118C>T
41	IVS-II-654(C->T)/Codons4142(-TTCT)	HBB:c.316-197C>T/HBB:c.126_129delCTTT
42	IVS-II-849(A->G,C)/Codon39(C->T)	HBB:c.316-2A>G,C/HBB:c.118C>T
43	Codon17(A->T)/Codons4142(-TTCT)	HBB:c.52A>T/HBB:c.126_129delCTTT
44	HbE/IVS-II-654(C->T)	HBB:c.79G>A/HBB:c.316-197C>T
45	HbKnossos/Codon39(C->T)	HBB:c.82G>T/HBB:c.118C>T
46	IVS-I-1(G->T,A)/-87(C->A,G,T)	HBB:c.92+1G>T,A/HBB:c.-137C>A,G,T
47	IVS-I-1(G->T,A)/Codon6(-A)	HBB:c.92+1G>T,A/HBB:c.20delA
48	IVS-I-1(G->T,A)/IVS-II-848(C->A)	HBB:c.92+1G>T,A/HBB:c.316-3C>A
49	IVS-I-2(T->G,A,C)/-87(C->A,G,T)	HBB:c.92+2T>G,A,C/HBB:c.-137C>A,G,T
50	IVS-I-2(T->G,A,C)/Codon39(C->T)	HBB:c.92+2T>G,A,C/HBB:c.118C>T
51	IVS-I-5(G->C)/IVS-II-848(C->A)	HBB:c.92+5G>C/HBB:c.316-3C>A
52	IVS-I-6(T->C)/Codon44(-C)	HBB:c.92+6T>C/HBB:c.135delC
53	IVS-I-6(T->C)/Codon15(G->A),Codon15(-T)	HBB:c.92+6T>C/HBB:c.47G>A,HBB:c.48G>A,HBB:c.46delT
54	IVS-I-110(G->A)/-87(C->A,G,T)	HBB:c.93-21G>A/HBB:c.-137C>A,G,T
55	IVS-I-110(G->A)/-88(C>G,T,A)	HBB:c.93-21G>A/HBB:c.-138C>G,T,A
56	IVS-I-110(G->A)/-29(A->G)	HBB:c.93-21G>A/HBB:c.-79A>G
57	IVS-I-110(G->A)/Codon76(-C)	HBB:c.93-21G>A/HBB:c.230delC
58	IVS-I-110(G->A)/IVS-II-1(G->C,A,T)	HBB:c.93-21G>A/HBB:c.315+1G>C,A,T
59	IVS-I-110(G->A)/IVS-I-5(G->C)	HBB:c.93-21G>A/HBB:c.92+5G>C
60	Codon30(AGG->AGC)/IVS-I-130(+1)/Codon30(AGG->AGC)/IVS-I-130(+1)]	HBB:c.93G>C/HBB:c.93G>C
61	deltabeta0/deltabeta0	NG_000007.3:g.51483_165148del113666,NG_000007.3:g.60375_153285del92911,NG_000007.3:g.(60530_60730)_ (72351_72551)del11822,NG_000007.3:g.64336_77738del13403/HBB:c.118C>T
62	HbLepore-Hollandia/IVS-I-6(T->C)	NG_000007.3:g.63290_70702del/HBB:c.92+6T>C
63	HbLepore-Boston-Washington/Codon39(C->T)	NG_000007.3:g.63632_71046del/HBB:c.118C>T
64	deltabeta0/IVS-I-6(T->C)	NG_000007.3:g.64336_77738del13403/HBB:c.92+6T>C
65	1,393bpdeletion/Codon24(T->A)	NG_000007.3:g.70060_71452del1393/HBB:c.75T>A

Fig. 10: I 65 genotipi Beta osservati nella coorte studiata.

Il nome compare nella nomenclatura classica a sinistra e internazionale (HGVS) a destra.

Fra questi ultimi quelli più frequenti erano *HBB*: c.118C> T / *HBB*: c.118C> T (65,5%), *HBB*: c.93-21G> A / *HBB*: c.118C> T (5,6%) e *HBB*: c.92 +6 T> C / *HBB*: c.118C> T (4,1%) (Fig. 11).

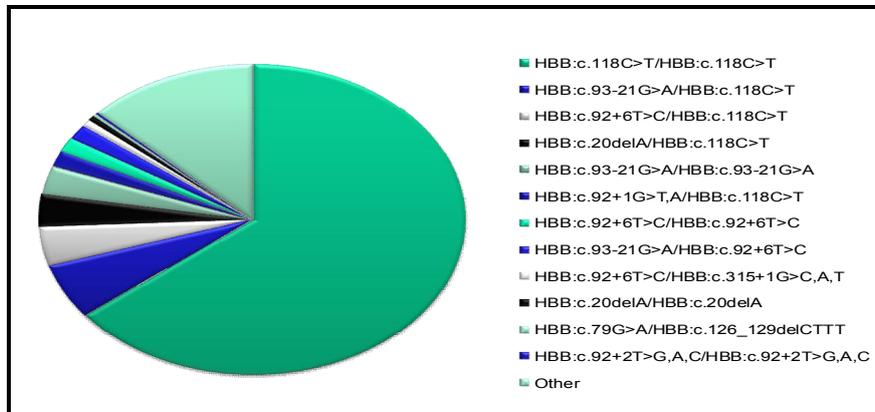


Fig. 11: i genotipi più frequenti nell'intera coorte (nomenclatura internazionale HGVS).

Le frequenze del gene *HBB* differivano inoltre tra i diversi centri, in particolare nei centri italiani si sono osservati principalmente pazienti omozigoti per *HBB*: c.118C> T ed eterozigoti *HBB*: c.93-21G> A / *HBB*: c.118C> T e *HBB*: c. 92 +6 T> C / *HBB*: c.118C> T; nei centri non-italiani la frequenza più elevata era per i genotipi *HBB*: c.92 +6 T> C / *HBB*: c.92 +6 T> C a Malta e *HBB*: c.93-21G> A / *HBB*: c.93-21G> A a Marsiglia. In Sardegna, regione caratterizzata da isolamento genetico, la mutazione più frequente era *HBB*: c.118C> T / *HBB*: c.118C> T.

Fra le mutazioni sui geni Alfa-globinici presenti nella coorte, la più comune era la delezione di 3,7 kb di tipo I (nel 22,0% una delezione e nel 6,5% due delezioni).

Le MAF (minor allele frequency) dei polimorfismi da singolo nucleotide (SNP) studiati erano del 3% per l'rs7482144 (*HBB*: g.-158C> T), del 18% per l'rs9399137 (*HBS1L-MYB* regione intergenica), del 21% per l'rs1427407 e del 40% per l'rs10189857 (*BCL11A*) (tabella 1).

Tabella 1

Le frequenze alleliche degli SNP inseriti nello studio
(*le MAF, minor allele frequency)

rs7482144	C (-)	96,92%
	T (+)	3,08*%
rs9399137	T	81,72%
	C	18,28*%
rs1427407	G	78,81%
	T	21,19*%
rs10189857	A	60,42%
	G	39,58*%

Sulle mutazioni Alfa e Beta globiniche e' stato effettuato un accorpamento dei diversi genotipi in tre categorie di severità della mutazione. La distribuzione completa, insieme alle frequenze genotipiche degli SNP e dei geni Alfa è presentata nella tabella 2.

Tabella 2

Frequenze dei modulatori genetici della Beta talassemia

Loci	posizione (GRCh37.p10)	Categorie		N. di casi	frequenze
Mutazioni <i>HBB</i>	chr11:5246696-5248301	lieve/lieve	b+_lieve/b+_lieve	13	1,51%
			b+_silente/b0_severa	4	0,47%
			b+_lieve /b0_lieve	2	0,23%
			b0_lieve /b0_lieve	1	0,12%
		lieve/severa	b+_lieve /b0_severa	60	6,98%
			b+_lieve /b+_severa	20	2,33%
			b0_lieve /b0_severa	5	0,58%
			b+_lieve/b0_lieve	2	0,23%
		severa/severa	b0_severa /b0_severa	643	74,85%
			b+_severa /b0_severa	75	8,73%
b+_severa /b+_severa	34		3,96%		
Mutazioni <i>HBA1, HBA1</i>	chr16:226679-227520	0 mutazioni		560	65,19%
		1 mutazione (da 3.7kb-I, 4.2kb e delezioni HphI o NcoI)		230	26,78%
		2 mutazioni (da MED-I, 20.5kb, 3.7kb-I/II/III, 4.2kb e delezioni HphI o NcoI)		69	8,03%
<i>HBG2</i>	rs7482144 (HBG2:g.-158C>T)	chr11:5276169	C/C (-/-)	812	94,53%
			C/T (-/+)	41	4,77%
			T/T (+/+)	6	0,70%
Regione intergenica <i>HBS1L-MYB</i>	rs9399137	chr6:135419018	T/T	556	64,73%
			C/T	292	33,99%
			C/C	11	1,28%
<i>BCL11A</i>	rs1427407	chr2:60713235	G/G	535	62,28%
			G/T	284	33,06%
			T/T	40	4,66%
	rs10189857	chr2:60718043	A/A	418	48,66%
			A/G	310	36,09%
			G/G	131	15,25%

Considerando i due gruppi di individui trasfusi (TDT) e non trasfusi (NTDT), sono state calcolate sia le proporzioni che le mediane di età alla prima trasfusione o follow up (rispettivamente per questi due gruppi).

Questi due dati descrivono in modo efficace la severità della patologia all'interno della coorte studiata (tabella 3).

Tabella 3

Distribuzione dei modulatori genetici della severità della Beta talassemia nella coorte studiata

loci		Mediana dell'età alla prima trasfusione (5°-95° percentile) dei pazienti TDT	Proporzione di NTDT* (incremento rispetto ai TDT totali)
Mutazioni <i>HBB</i>		lieve/lieve	54 [27 -698]
		lieve/severa	19 [4 -131]
		severa/severa	10 [2 -75]
Mutazioni <i>HBA1</i> , <i>HBA2</i>		0 mutazioni	10 [2 -72]
		1 mutazione	12 [3 -82]
		2 mutazioni	26 [6 -118]
<i>HBG2</i>	rs7482144 (<i>HBG2</i> :g.-158C>T)	C/C (-/-)	11 [3 -77]
		C/T (-/+)	35 [3 -131]
		T/T (+/+)	56 [8 -265]
Regione intergenica <i>HBS1L-MYB</i>	rs9399137	T/T	10 [2 -77]
		C/T	13 [3 -93]
		C/C	28 [3 -32]
<i>BCL11A</i>	rs1427407	G/G	9 [2 -81]
		G/T	14 [3 -77]
		T/T	22 [6 -70]
	rs10189857	A/A	10 [2 -66]
		A/G	11 [3 -81]
		G/G	13 [3 -95]

*La proporzione di pazienti NTDT nell'intera coorte è 11.76%, (101/859).

NTDT = Non trasfusione dipendente (Comprende gli individui che nella classificazione classica vengono definiti Intermedi, non trasfusi)

**TDT = Trasfusione dipendente (Comprende gli individui che nella classificazione classica vengono definiti Major e gli intermedi che sono entrati in trasfusioni regolari in età avanzata)

Dalla tabella descrittiva si può osservare come i modificatori genetici in cui si ha un maggiore aumento di NTDT rispetto alla percentuale di NTDT di tutta la coorte, siano le mutazioni lievi sul gene *HBB*, due mutazioni dei geni *HBA*, il genotipo C/T, nel gene *HBG2*- rs7482144, C/C nella regione intergenica di *HBS1L-MYB*- rs9399137, T/T nel gene *BCL11A*- rs1427407 e A/A nel gene *BCL11A*- rs10189857. In presenza di queste mutazioni, il fenotipo Beta talassemico assume una forma moderata. Tuttavia, sebbene questi risultati diano un'indicazione relativa al loro effetto sulla severità, non tengono in considerazione la coeredità degli altri modificatori caratterizzati.

3.2 Statistica Inferenziale

I risultati del modello di rischio proporzionale di Cox, costruito su un campione casuale corrispondente al 71% della coorte (il training set costituito da 613 pazienti), sono presentati nella tabella 4.

Tabella 4

Risultati del modello di rischio proporzionale di Cox sul set di training della coorte

Modificatori dell'età di inizio delle trasfusioni regolari			p-value	Hazard Ratio (folds of later transfusion start probability)		Cox and Snell R2 (Harrell's C-index)	
Sesso	Femmina	3.35E-02	referenza		0.01 (0.532)	0.343 (0.703)	
	maschio		3.35E-02	0.825 (1.212)			
Mutazioni <i>HBB</i>	severa/severa	6.51E-14	referenza		0.105 (0.581)		
	lieve/severa		5.33E-09	0.373 (2.684)			
	lieve/lieve		1.05E-08	0.032 (30.899)			
Mutazioni <i>HBA1, HBA2</i>	0 mutazioni	3.16E-13	referenza		0.056 (0.569)		
	1 mutazione		6.86E-05	0.646 (1.549)			
	2 mutazioni		9.79E-13	0.252 (3.971)			
<i>HBG2</i>	rs7482144 (<i>HBG2:g.-158C>T</i>)	<i>C/C (-/-)</i>	1.46E-08	referenza			0.06 (0.532)
		<i>C/T (-/+)</i>		5.41E-08	0.221 (4.522)		
		<i>T/T (+/+)</i>		8.02E-05	0.052 (19.360)		
Regione intergenica <i>HBS1L-MYB</i>	rs9399137	<i>T/T</i>	5.86E-09	referenza		0.039 (0.549)	
		<i>C/T</i>		8.69E-08	0.598 (1.673)		
		<i>C/C</i>		6.16E-04	0.158 (6.320)		
<i>BCL11A</i>	rs1427407	<i>G/G</i>	2.26E-06	referenza		0.042 (0.563)	
		<i>G/T</i>		5.75E-04	0.702 (1.425)		
		<i>T/T</i>		1.09E-05	0.362 (2.759)		
	rs10189857	<i>A/A</i>	2.71E-02	referenza			
		<i>A/G</i>		9.00E-01	0.987 (1.013)		
		<i>G/G</i>		1.40E-02	0.689 (1.451)		

Dai risultati del modello il tipo di mutazione sul gene *HBB* è risultato avere l'effetto più forte sulla severità ematologica della β -talassemia, con un rischio di avvio di terapia trasfusionale aumentato di 30 volte se si confronta il fenotipo severo/severo con il fenotipo lieve/lieve (lieve/lieve: HR=0.032, $p<0.001$), seguito dal polimorfismo *HBG2:g.-159C>T* (omozigote T/T:HR=0.052, $p<0.001$), quindi dall'rs9399137 (*HBS1L-MYB*; omozigote C/C: HR = 0.158, $p<0.001$), mutazioni dei geni *HBA* (due difetti: HR = 0.252, $p<0.001$), rs1427407 (*BCL11A*; omozigote T/T: HR= 0.362, $p<0.001$), rs 10189857 (*BCL11A*; omozigote G/G: HR=0.689, $p=0.014$) e il sesso (maschi: HR=0.825, $p=0.033$).

Il potere discriminante del modello è risultato alto (C-index = 0,703; R2 = 0,343), e in gran parte dipendente dalla Beta-globina (C-index = 0,581, R2 = 0,150) e dai modulatori della produzione

di catene della Gamma globina (*HBG2*: g .-158C> T, *BCL11A* e *HBS1L-MYB* loci: C-index = 0,607, R2 = 0,133).

La parte restante del potere discriminante del modello è attribuibile alle mutazioni delle catene Alfa-globiniche e al sesso (C-index = 0,569, R2 = 0,056 e C -index = 0,532, R2 = 0.010, rispettivamente).

La validazione del modello è stata condotta sul set di testing costituito dal 29% della coorte, (in totale 246 individui) ed ha avuto lo scopo di confermarne l'accuratezza predittiva.

Come per il set di training, anche per il set di testing, sia i predittori lineari grezzi (LPS) che lo score standardizzato che ne è stato derivato (TSS) correlano altamente con la probabilità di sopravvivenza senza trasfusioni ($p < 0.001$) e con la predizione dello status di TDT rispetto a NTDT (AUC=0.769, $p < 0.001$).

Come si può visualizzare sotto (Fig. 12) l'analisi di Kaplan-Meyer della predizione della sopravvivenza libera da trasfusioni effettuata sul set di training e quello di testing mostrano quattro curve di sopravvivenza significativamente differenti:

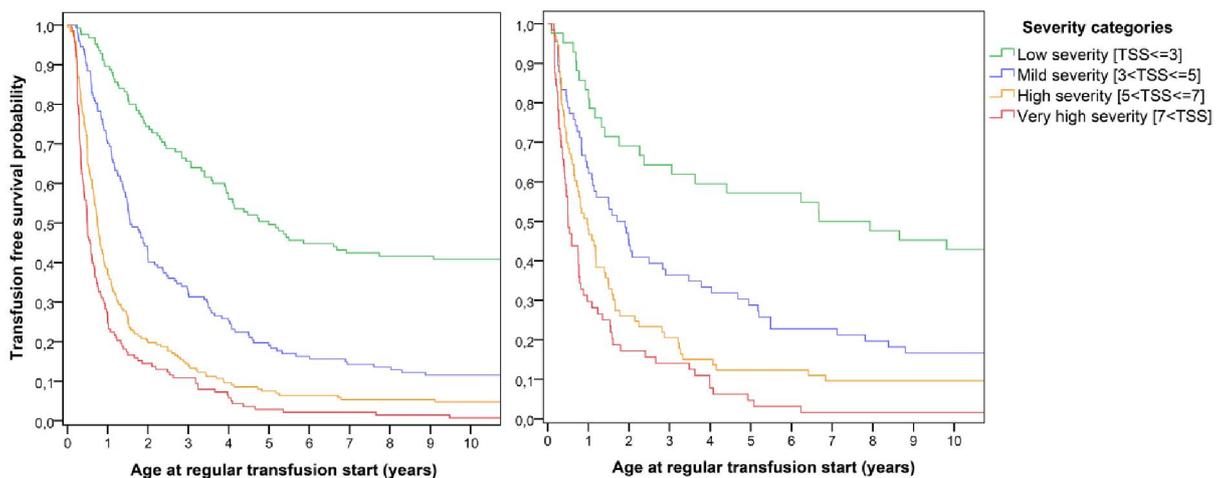


Fig. 12:Le quattro curve di sopravvivenza significativamente differenti ottenute dall'analisi di Kaplan-Meyer della predizione della sopravvivenza libera da trasfusioni attraverso il TSS sul set di training (sinistra) e quello di testing (destra).

In ascisse compare l'età di inizio delle trasfusioni regolari (in anni), in ordinate la probabilità di sopravvivenza senza trasfusioni (espressa mediante un valore da 0 a 10)

3.3 Applicazione Web

Il calcolo del TSS automatizzato è liberamente disponibile alla pagina Web <http://tss.unica.it>. La foto della pagina Web, dove si devono inserire i genotipi dei sei marcatori genetici e il sesso del generico paziente da studiare, è visualizzabile in Fig. 13:

THALASSEMIA SEVERITY SCORE (TSS)

A genetic based score for the prediction of Beta-Thalassemia clinical severity

Score Computation

Gender:

Alpha genes defects:

HbG2g-158C>T:

rs7482144:

BCL11A:

rs1427407:

Beta phenotype:

HBS1L-MYP:

rs5399137:

BCL11A:

rs10189857:

Participating centers:

- 1. Università degli Studi di Cagliari, Italy; Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina clinica e Molecolare
- 2. Dipartimento di Scienze Mediche "Mario Aresu"
- 3. Ospedale per le Microcitemie di Cagliari, Italy; Day Hospital Ematologia Adulti
- 4. Clinica Pediatrica 2
- 5. University of Torino
- 6. Ematologia-Centro della Microcitemia ed Anemie Congenite, Ospedale Galliera, Genova, Italy
- 7. French reference center for Thalassemia Assistance Publique-Hopitaux de Marseille-France
- 8. Laboratory of Molecular Genetics, Department of Physiology and Biochemistry, University of Malta, Msida, Malta

Thalassemia Severity Score

Decades of research on the genetic bases of beta-thalassemia allow to now accurately predict its clinical severity. The present web-page calculates a genetic severity score, based on a multicenter study that will be object of a publication soon (for preliminary study please see Danjou et al., 2012). This multi-center study used the age at first transfusion observed in more than 800 beta-thalassemic patients as a surrogate of clinical severity, to produce the Thalassemia Severity Score. Score varies from 0 to 10 in increasing order of clinical severity. For different ranges of TSS this calculator also produces corresponding transfusion-free survival curves as observed in the original study cohort (thick line corresponds to the calculated score).

Fig. 13: visualizzazione nella pagina Web dei dati da inserire per il calcolo dello score di gravità della Beta talassemia

Dall'inserimento dei dati l'applicazione calcola il TSS e presenta graficamente la curva di sopravvivenza di appartenenza, come nell'esempio di Fig. 14 :

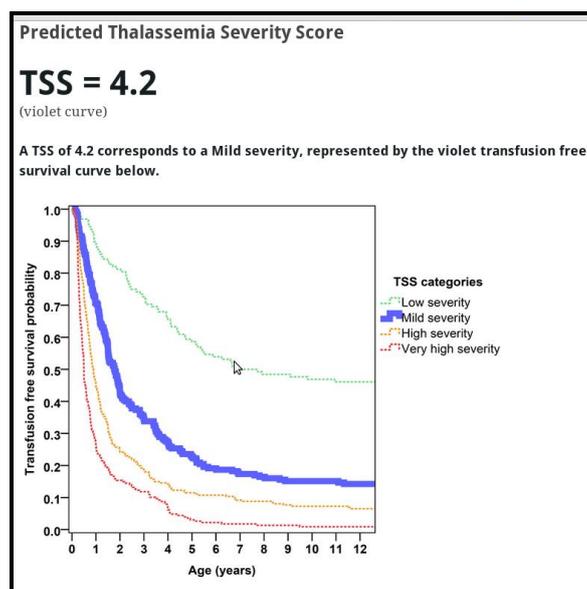


Fig. 14: La curva di sopravvivenza (in blu grassetto) associata ad un generico paziente, ottenuta dal calcolo del TSS.

Si può notare in questo individuo una predizione di severità media per la Beta talassemia

In ascisse compare l'età di inizio delle trasfusioni regolari (in anni), in ordinate la probabilità di sopravvivenza senza trasfusioni (espressa mediante un valore da 0 a 10)

4. CONCLUSIONI E DISCUSSIONE

Questo studio multicentrico, che ha coinvolto 890 pazienti Beta-talassemiaci di sei centri microcitemici diversi, provenienti da tre paesi del bacino del Mediterraneo, ha dimostrato la capacità di misurare e prevedere con precisione la gravità ematologica della malattia utilizzando marcatori genetici e il sesso.

Da questo studio, è stato creato uno score semplice da interpretare: una scala crescente da 0 a 10, denominata *Thalassemia Severity Score (TSS)*.

il TSS, utilizzando solo i marcatori genetici, necessita di un'unica valutazione, è già disponibile durante la gravidanza, ha validità per tutta la vita e potrebbe quindi essere una buona soluzione per mantenere intatte le informazioni sulla predisposizione alla gravità nei pazienti.

L'impiego del TSS e la sua capacità di anticipare il fenotipo, in periodo fetale, nei primi anni di vita e dopo l'inizio della terapia trasfusionale, deve essere inteso fondamentalmente come un ausilio a tutte le altre informazioni cliniche già a disposizione del personale medico. Inoltre, esistono alcuni limiti specifici legati all'utilizzo dei soli predittori genetici:

- In primo luogo, non tutti gli indicatori hanno dimostrato la loro causalità. Infatti sebbene le mutazioni sui geni *HBB*, *HBA1* e *HBA2* sono con sicurezza responsabili del malfunzionamento delle proteine da essi espresse, l'implicazione diretta e il meccanismo d'azione degli rs1427407, rs10189857, rs9399137 e rs7482144 non è ancora pienamente dimostrato. Questi marcatori possono essere surrogati delle varianti causative, e anche se il modello statistico finale non varierebbe molto, se un'altra variante si dovesse rivelare causativa, lo score dovrebbe essere aggiornato.
- In secondo luogo, anche se le popolazioni in cui queste varianti sono state associate con successo rappresentano grande parte dei gruppi etnici esistenti, non tutte le popolazioni sono state testate e alcune particolari strutture di linkage disequilibrium potrebbero rendere il modello meno accurato in queste popolazioni (4, 6-8, 12, 14-16).

Tuttavia, per le sue caratteristiche lo studio presenta numerosi vantaggi:

- la capacità di previsione dello score potrebbe fornire informazioni utili durante il periodo prenatale, fornendo un'informazione aggiuntiva, rispetto alla presenza di malattia (già effettuata correntemente), relativa alla possibile severità ematologica (in questo vi sono evidenti limiti etici da non sottovalutare).
- In secondo luogo durante i primi anni di vita l'ausilio del TSS risulta vantaggioso:
 - per la previsione del decorso patologico e della severità della malattia in supporto alle difficili decisioni cliniche riguardanti la scelta di quando intraprendere la terapia trasfusionale.
 - per valutare l'utilità del trapianto da cellule staminali ematopoietiche. Il TSS potrebbe essere di grande ausilio in fase di decisione sull'utilità e fattibilità del trapianto di cellule staminali. Quest'ultimo infatti, nonostante il fenotipo possa richiedere anche quattro o cinque anni per stabilizzarsi, è più efficiente se

effettuato nei primi anni di vita (in particolare se la donazione avviene da sangue di cordone).

- In ultimo, dopo l'inizio della terapia trasfusionale regolare il calcolo del TSS potrebbe servire per sostenere le decisioni cliniche e sviluppare scale di severità più complete, che possano incorporare, oltre al TSS, delle misure cliniche, o anche per individuare pazienti outliers sulla base della severità clinica effettiva, rapportata alla severità ematologica attesa dal background genetico.

Il TSS potrebbe essere utilizzato come una scala standardizzata per definire meglio la gravità ematologica dei pazienti e superare la dicotomia di talassemia Major/Intermedia soprattutto in considerazione del fatto che ad oggi la categoria degli intermedi non è più ben definita, in quanto sempre più spesso vengono trasfusi regolarmente.

Infine, un' applicazione che si prevede di poter avere in futuro è la possibilità di classificare meglio i pazienti talassemici arruolati negli studi clinici per i fattori stimolanti l'eritropoiesi.

Si auspica che i risultati ottenuti possano aiutare alla presa in carico dei pazienti Beta talassemici, usando il TSS sia come uno score predittivo che come una scala standardizzata di severità, che possa consentire di superare la dicotomia Major/ Intermedi ed essere un vantaggioso supporto alle decisioni cliniche.

5. REFERENZE

1. Sante Tura, Michele Baccharani. *Corso di Malattie del Sangue* Esculapio 2011.
2. M.M. Atzeni, A. Masala. *La Beta talassemia omozigote*. Caleidoscopio Italiano 2002.
3. Antonio Cao, MD, and Renzo Galanello. *Review, Beta-thalassemia*. Gen Med 2010;12 (2): 61-76).
4. <http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html> Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemias - updated on March 2014.
5. Genetics Home Reference, 06.04.2015 ghr.nlm.nih.gov.
6. Antonio Cao, Paolo Moi, and Renzo Galanello. *Recent advances in β -thalassemias*. Pediatr Rep. 2011; 3(2): e17.
7. Thein SL. *Genetic modifiers of Beta-thalassemia*. Haematologica. 2005;90:649–60) .
8. Taher A, Musallam KM, Cappellini MD. *Thalassaemia intermedia: an update*. Mediterr J Hematol Infect Dis. 2009;1(1):e2009004.
9. Cao A, Galanello R, Rosatelli MC. *Genotype-phenotype correlations in beta-thalassemias*. Blood Rev. 1994;8(1):1–12.
10. Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MAC, Araújo AS, Uda M, Sanna S, et al. *DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease*. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105(33):11869–74.
11. Sedgewick AE, Timofeev N, Sebastiani P, So JCC, Ma ESK, Chan LC, et al. *BCL11A is a major HbF quantitative trait locus in three different populations with [beta]-hemoglobinopathies*. Blood Cells Mol Dis. 2008;41(3):255–8.
12. Garner C, Tatu T, Reittie JE, Littlewood T, Darley J, Cervino S, et al. *Genetic influences on F cells and other hematologic variables: a twin heritability study*. Blood. 2000;95(1):342–6.
13. Creary LE, Ulug P, Menzel S, McKenzie CA, Hanchard NA, Taylor V, et al. *Genetic variation on chromosome 6 influences F cell levels in healthy individuals of African descent and HbF levels in sickle cell patients*. PLoS One. 2009;4(1):e4218.
14. So CC, Song YQ, Tsang ST, Tang LF, Chan AY, Ma ES, et al. *The HBS1L-MYB intergenic region on chromosome 6q23 is a quantitative trait locus controlling fetal haemoglobin level in carriers of beta-thalassaemia*. J Med Genet. 2008;45(11):745–51.

15. Menzel S, Thein SL. Genetic architecture of hemoglobin F control. *Curr Opin Hematol.* 2009;16(3):179–86.
16. Galanello R, Sanna S, Perseu L, et al. *Amelioration of Sardinian beta0 thalassemia by genetic modifiers. Blood.* 2009;114(18):3935–3937.
17. Badens C, Joly P, Agouti I, et al. *Variants in genetic modifiers of β -thalassemia can help to predict the major or intermedia type of the disease. Haematologica.* 2011;96(11):1712–1714.
18. Danjou F, Anni F, Perseu L, et al. *Genetic modifiers of β -thalassemia and clinical severity as assessed by age at first transfusion. Haematologica.* 2012;97(7):989–993.
19. Gilman J, Huisman T. *DNA sequence variation associated with elevated fetal G gamma globin production. Blood.* 1985;66(4):783–787.

20. Labie D, Dunda-Belkhodja O, Rouabhi F, et al. *The -158 site 5' to the G gamma gene and G gamma expression. Blood.* 1985;66(6):1463–1465.
21. Menzel S, Garner C, Gut I, et al. *A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. Nat Genet.* 2007;39(10):1197–1199.
22. Galarneau G, Palmer CD, Sankaran VG, et al. *Fine-mapping at three loci known to affect fetal hemoglobin levels explains additional genetic variation. Nat Genet.* 2010;42(12):1049–1051.
23. Solovieff N, Milton JN, Hartley SW, et al. *Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: genome-wide association studies suggest a regulatory region in the 5' olfactory receptor gene cluster. Blood.* 2010;115(9):1815–1822.
24. Bhatnagar P, Purvis S, Barron-Casella E, et al. *Genome-wide association study identifies genetic variants influencing F-cell levels in sickle-cell patients. J Hum Genet.* 2011;56(4):316–323.
25. Farrell JJ, Sherva RM, Chen Z-Y, et al. *A 3-bp deletion in the HBS1L-MYB intergenic region on chromosome 6q23 is associated with HbF expression. Blood.* 2011;117(18):4935–4945.
26. Labie D, Dunda-Belkhodja O, Rouabhi F, et al. *The -158 site 5' to the G Gamma gene and G Gamma expression. Blood.* 1985;66(6):1463–1465.
27. Gilman JG, Huisman TH. *DNA sequence variation associated with elevated fetal G Gamma globin production. Blood.* 1985;66(4):783–787.
28. Nguyen TK, Joly P, Bardel C, et al. *The XmnI (G)Gamma polymorphism influences hemoglobin F synthesis contrary to BCL11A and HBS1L-MYB SNPs in a cohort of 57 Beta-thalassemia intermedia patients. Blood Cells. Mol. Dis.* 2010;45(2):124–127.
29. Menzel S, Garner C, Gut I, et al. *A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc finger protein on chromosome 2p15. Nat. Genet.* 2007;39(10):1197–1199.
30. Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MAC, et al. *DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and Betaglobin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008;105(33):11869–11874.
31. Galarneau G, Palmer CD, Sankaran VG, et al. *Fine-mapping at three loci known to affect fetal hemoglobin levels explains additional genetic variation. Nat. Genet.* 2010;42(12):1049–1051.

32. Farrell JJ, Sherva RM, Chen Z-Y, et al. *A 3-bp deletion in the HBS1L-MYB intergenic region on chromosome 6q23 is associated with HbF expression.* Blood. 2011;117(18):4935–4945.
33. Solovieff N, Milton J, Hartley S, et al. *Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: genome-wide association studies suggest a regulatory region in the 5' olfactory receptor gene cluster.* Blood. 2010;115(9):1815-1822.
34. Bhatnagar P, Purvis S, Barron-Casella E, et al. *Genome-wide association study identifies genetic variants influencing F-cell levels in sickle-cell patients.* J. Hum. Genet. 2011;56(4):316–323.
35. Bauer DE, Kamran SC, Lessard S, et al. *An erythroid enhancer of BCL11A subject to genetic variation determines fetal hemoglobin level.* Science. 2013;342(6155):253–257.
36. Sutton M, Bouhassira EE, Nagel RL. *Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta-like globin gene cluster haplotypes.* Am J Hematol. 1989;32(1):66–69.

6. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio Professor Galanello per l'opportunità che mi ha dato di lavorare con lui e i pazienti Beta talassemici, che spero avranno un vantaggio da questo studio, offerto loro con amore e passione;

Ringrazio Fabrice Danjou e Franco Anni per il loro importante supporto nella mia formazione e per la loro amicizia che ha reso stimolante e spesso divertente la fatica lavorativa;

Ringrazio tutti coloro che in qualche modo sono stati amici, sostenitori e compagni in questo mio percorso di vita e di crescita;

Ringrazio i miei genitori e fratelli per tutto ciò che gratuitamente mi hanno donato e mi donano ancora;

Ringrazio infine Daniele per la sua presenza costante e l'incoraggiamento continuo, nel lavoro e nella vita. Grazie anche alle nostre bambine meravigliose che riempiono di gioia le nostre giornate.